

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Manca KOLENC

**VEZAVA PROTEINOV NLP NA LIPIDNE MEMBRANE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**BINDING OF NLP PROTEINS TO LIPID MEMBRANES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je dne 3. 6. 2011 sprejela temo in za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Gregorja Anderluha.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Kristina Sepčič  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Gregor Anderluh, mentor  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter Maček, recenzent  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 26.1.2012

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Manca Kolenc

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 577:543.544:663.71(043.2)=163.6  
KG proteini NLP/lipidne membrane/tobak/tankoplastna kromatografija/  
elektroforeza/multilamelarni vezikli  
AV KOLENC, Manca  
SA ANDERLUH, Gregor (mentor)/ MAČEK, Peter (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2012  
IN VEZAVA PROTEINOV NLP NA LIPIDNE MEMBRANE  
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)  
OP XI, 61 str., 5 pregl., 48 sl., 38 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
A Nekateri rastlinski patogeni izločajo proteine NLP (ang. NEP1-like protein), ki lahko na dvokaličnicah povzročajo nekroze, izločanje etilena, preobčutljivostni odziv in druge simptome. NLP so podobni aktinoporinom, citolitičnim toksinom iz morskih veternic, ki tvorijo transmembranske pore. Na podlagi strukturne podobnosti z aktinoporini predvidevamo, da imajo tudi NLP sposobnost lizirati celične membrane z vezavo nanje. Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti, ali se proteini NLP specifično vežejo na lipide iz celičnih membran tobaka (*Nicotiana tabacum*). Uporabili smo tri NLP: NLP<sub>Pp</sub>, NLP<sub>Pcc</sub> in NLP<sub>Pya</sub>. Lipide iz listov tobaka smo najprej identificirali s tankoplastno kromatografijo in jih frakcionirali z adsorpcijsko kromatografijo ter gradientnim centrifugiranjem. Dobljene frakcije lipidov smo inkubirali z vsakim od treh proteinov NLP. Elektroforeza inkubiranih frakcij je pokazala, da se protein NLP<sub>Pcc</sub> veže s frakcijo lipidov, ki je po gradientnem centrifugirjanju imela največjo gostoto. V frakciji, kjer je prišlo do vezave, je najmanj osem lipidov. Potrdimo lahko, da se NLP<sub>Pcc</sub> veže na vsaj en lipid iz tobaka. Za natančno določitev lipida bi bile potrebne nadaljnje raziskave.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 577:543.544:663.71(043.2)=163.6  
CX proteins NLP/ lipid membranes/ tobacco/ thin layer chromatography/  
electrophoresis/ multilamellar vesicles  
AU KOLENC, Manca  
AA ANDERLUH Gregor (supervisor)/ MAČEK Peter (reviewer)  
PP SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2012  
TI BINDING OF NLP PROTEINS TO LIPID MEMBRANES  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XI, 61 p., 5 tab., 48 fig., 38 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Plant pathogens secrete NLP proteins (NEP1-like proteins), which can cause necrosis, ethylene producing, hypersensitive response and other symptoms in dicotyledonous plants. NLPs are similar to actinoporins, cytolytic toxins from sea anemones that form transmembrane pores. Based on the structural similarity with actinoporins, we expect that NLPs too, can damage cell membranes upon binding to them. In this research, we want to determine if NLPs can specifically bind to certain lipids in cell membrane of tobacco (*Nicotiana tabacum*). We use three NLP's: NLP<sub>Pp</sub>, NLP<sub>Pcc</sub>, and NLP<sub>Pya</sub>. We first identified lipids from tobacco leaf extracts with thin layer chromatography and divided the extract to lipid fractions according to lipid density using a adsorption chromatography and gradient centrifugation. Fractions were incubated with each of the three NLP proteins. Electrophoresis of incubated fractions showed that NLP<sub>Pcc</sub> binds to the lipid fraction with highest density after gradient centrifugation. We could not identify the lipid in question with thin layer chromatography, because the fraction, which showed NLP binding, contained at least eight lipid types. We showed, that the protein NLP<sub>Pcc</sub> can bind to at least one lipid from tobacco. To identify that lipid molecule, more experiments are required.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1 NAMEN DELA</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
<b>2.1 PROTEINI NLP</b>	<b>2</b>
2.1.1 Značilnosti proteinov NLP in vpliv na rastline	2
2.1.2 NLP-ji: elicitorji, toksini ali oboje?	3
2.1.3 Pozitivna vloga NLP-jev pri virulenci rastlinskih patogenov	5
2.1.4 Prisotnost NLP-jev v glivah, oomicetah in bakterijah	5
2.1.5 Velika skupina genov NLP v rodu <i>Phytophthora</i>	6
2.1.6 Struktura proteinov NLP	6
2.1.6.1 Podobnost z aktinoporini	7
2.1.6.2 Tip 1, tip 2 in NPP1 področje	8
<b>2.2 LIPIDI V TOBAKU</b>	<b>9</b>
2.2.1 Tobak	9
2.2.2 Odziv tobaka na NEP1	9
2.2.3 Rastlinske membrane in lipidi	11
2.2.4 Skladišče energije v rastlinah	13
2.2.5 Težave pri izolaciji lipidov	14
2.2.6 Delo z lipidimi (ekstrakcija, shranjevanje)	15
2.2.7 Lipidi v tobaku	15
2.2.8 Razlike med enokaličnicami in dvokaličnicami v lipidni sestavi	16
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>18</b>
<b>3.1 MATERIALI in OPREMA</b>	<b>18</b>
3.1.1 Uporabljene kemikalije	18

3.1.2 Aparature in druga laboratorijska oprema	20
3.1.3 Priprava pufrov	21
3.1.4 Lipidi iz tobaka	22
3.1.5 Proteini NLP	22
3.1.6 Protitelesa, testi in proteinski markerji	22
3.1.7 Kontrolni lipidi	22
<b>3.2 METODE</b>	<b>23</b>
3.2.1 Izolacija lipidov iz tobaka	23
3.2.2 Enodimenzionalna tankoplastna kromatografija	23
3.2.3 Dvodimenzionalne tankoplastna kromatografija	24
3.2.4 Adsorpcijska kromatografija	26
3.2.5 Multilamelarni vezikli	27
3.2.6. Fosfolipidni test	27
3.2.7 Inkubacija MLV s proteini NLP in centrifugiranje	28
3.2.8 NaDS gel za elektroforezo	28
3.2.9 Elektroforeza	29
3.2.10 Gradientno centrifugiranje celičnega ekstrakta v perkolu	30
3.2.11 BCA proteinski test	31
3.2.12 Točkovni odtisi	31
<b>4 REZULTATI</b>	<b>32</b>
<b>4.1 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA LIPIDOV IZ TOBAKA</b>	<b>32</b>
<b>4.2 VEZAVA PROTEINOV NLP NA LIPIDE IZ TOBAKA</b>	<b>37</b>
<b>4.3 IDENTIFIKACIJA LIPIDA, NA KATEREGA SE VEŽE PROTEIN NLP</b>	<b>45</b>
<b>4.4 ZNAČILNOSTI FRAKCIJ</b>	<b>49</b>
<b>4.5. TOČKOVNI ODTIS</b>	<b>50</b>
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>52</b>
<b>5.1 RAZPRAVA</b>	<b>52</b>
<b>5.2 SKLEPI</b>	<b>56</b>
<b>6 POVZETEK</b>	<b>57</b>
<b>7 VIRI</b>	<b>58</b>
<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO SLIK

Slika 1: Kristalne strukture proteinov.	7
Slika 2: Pršenje tobaka s proteinom NEP1 iz glive <i>Fusarium oxysporum</i> inducira nekroze.	10
Slika 3: Protein NLP <sub>pcc</sub> iz po Gramu negativnih bakterij <i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp. <i>carotovorum</i> povzroča celično smrt na listih tobaka.	11
Slika 4: Deleži tipov lipidov v kloroplastih tobaka.	16
Slika 5: Deleži tipov lipidov pri dvokaličnici detelji.	16
Slika 6: Deleži tipov lipidov pri enokaličnici rži.	17
Slika 7: Shematska predstavitev dvodimenzionalne TLC.	25
Slika 8: Multilamelarni vezikel.	27
Slika 9: Enodimenzionalna tankoplastna kromatografija vseh izoliranih lipidov, vizualizirana pod UV svetlobo.	34
Slika 10: Dvodimenzionalna tankoplastna kromatografija celokupnega ekstrakta lipidov iz tobaka ( <i>Nicotiana tabacum</i> ), vizualizirano pod UV svetlobo.	35
Slika 11: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida gangliozida (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.	35
Slika 12: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida POPS (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.	35
Slika 13: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida sfingomielina (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.	36
Slika 14: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida fosfoetanolamina (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.	36
Slika 15: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida POPC (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.	36
Slika 16: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida POPG (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.	36
Slika 17: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida galaktozilceramida (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.	36

Slika 18: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida glukozilceramida (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.	36
Slika 19: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida stigmasterola (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.	37
Slika 20: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida holesterola (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo	37
Slika 21: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida $\beta$ -sitosterola (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.	37
Slika 22: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida ergosterola (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.	37
Slika 23: Dvodimenzionalna TLC frakcije 2, vizualizirano pod UV svetlobo.	38
Slika 24: Dvodimenzionalna TLC frakcije 3, vizualizirano pod UV svetlobo.	38
Slika 25: Shematski prikaz prekrivanja lipidov.	38
Slika 26: Elektroforeza 20 µl MLV narejenih iz frakcije 2, ki smo jo izolirali iz tobaka, inkubiranih s 5 µg posameznega proteina NLP (NLP <sub>Pp</sub> , NLP <sub>Pcc</sub> , NLP <sub>Pya</sub> ) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV.	39
Slika 27: Elektroforeza 20 µl MLV narejenih iz frakcije 2, ki smo jo izolirali iz tobaka, inkubiranih z 2,5 µg posameznega proteina NLP (NLP <sub>Pp</sub> , NLP <sub>Pcc</sub> , NLP <sub>Pya</sub> ) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV.	40
Slika 28: Elektroforeza 40 µl MLV narejenih iz frakcije 2, ki smo jo izolirali iz tobaka, inkubiranih z 1 µg posameznega proteina NLP (NLP <sub>Pp</sub> , NLP <sub>Pcc</sub> , NLP <sub>Pya</sub> ) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV.	40
Slika 29: Elektroforeza 40 µl MLV narejenih iz frakcije 2, ki smo jo izolirali iz tobaka, inkubiranih z 2,5 µg posameznega proteina NLP (NLP <sub>Pp</sub> , NLP <sub>Pcc</sub> , NLP <sub>Pya</sub> ) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV.	41
Slika 30: Elektroforeza 20 µl MLV narejenih iz frakcije 2, ki smo jo izolirali iz tobaka, inkubiranih s 5 µg posameznega proteina NLP (NLP <sub>Pp</sub> , NLP <sub>Pcc</sub> , NLP <sub>Pya</sub> ) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV.	41
Slika 31: Elektroforeza 20 µl MLV narejenih iz frakcije 3, ki smo jo izolirali iz tobaka, inkubiranih z 2,5 µg posameznega proteina NLP (NLP <sub>Pp</sub> , NLP <sub>Pcc</sub> , NLP <sub>Pya</sub> ) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV.	42
Slika 32: Elektroforeza 40 µl MLV narejenih iz frakcije 3, ki smo jo izolirali iz tobaka, inkubiranih z 1 µg posameznega proteina NLP (NLP <sub>Pp</sub> , NLP <sub>Pcc</sub> , NLP <sub>Pya</sub> ) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV.	42

Slika 33: Elektroforeza 130 µl MLV narejenih iz frakcije 2 in 150 µl MLV narejenih iz frakcije 3 (v frakcijah so bili izolirani lipidi iz tobaka) inkubiranih s 5 µg posameznega proteina NLP (NLP <sub>Pp</sub> , NLP <sub>Pcc</sub> , NLP <sub>Pya</sub> ) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV.	43
Slika 34: Elektroforeza 50 µl MLV narejenih iz frakcije 2 in frakcije 3, ki smo jih izolirali iz tobaka, inkubiranih z 2,5 µg posameznega proteina NLP (NLP <sub>Pp</sub> , NLP <sub>Pcc</sub> , NLP <sub>Pya</sub> ) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV.	43
Slika 35: Elektroforeza MLV narejenih iz frakcije C, Č in D (izoliranih iz tobaka) po 100 µl inkubiranih s 5 µg proteina NLP <sub>Pcc</sub> ni pokazala prisotnosti vezave proteina NLP <sub>Pcc</sub> na lipide v MLV.	44
Slika 36: Elektroforeza 100 µl MLV narejenih iz frakcije E (izoliranih iz tobaka) inkubiranih s 5 µg proteina NLP <sub>Pcc</sub> ni pokazala prisotnosti vezave proteina NLP <sub>Pcc</sub> na lipide v MLV, pri frakciji F pa je prišlo do vezave proteina NLP <sub>Pcc</sub> na lipide v MLV, kjer je bila inkubacija prav tako: 100 µl MLV narejenih iz frakcije F s 5 µg proteina NLP <sub>Pcc</sub> .	45
Slika 37: Elektroforeza 100 µl MLV narejenih iz frakcije A in B (izoliranih iz tobaka) inkubiranih s 5 µg proteina NLP <sub>Pcc</sub> ni pokazala prisotnosti vezave proteina NLP <sub>Pcc</sub> na lipide v MLV, pri frakciji G pa je prišlo do vezave proteina NLP <sub>Pcc</sub> na lipide v MLV, kjer je bila inkubacija prav tako: 100 µl MLV narejenih iz frakcije G s 5 µg proteina NLP <sub>Pcc</sub> .	46
Slika 38: Enodimenzionalna tankoplastna kromatografija frakcij od A do G lipidov iz tobaka, vizualizirana z amonijevim sulfatom.	47
Slika 39: Dvodimenzionalna TLC frakcije F, vizualizirano z amonijevim sulfatom.	48
Slika 40: Dvodimenzionalna TLC frakcije G, vizualizirano z amonijevim sulfatom.	48
Slika 41: Dvodimenzionalna TLC frakcije A, vizualizirano z amonijevim sulfatom.	49
Slika 42: Dvodimenzionalna TLC frakcije C, vizualizirano z amonijevim sulfatom.	49
Slika 43: Dvodimenzionalna TLC frakcije D, vizualizirano z amonijevim sulfatom.	49
Slika 44: Dvodimenzionalna TLC frakcije 7, vizualizirano z amonijevim sulfatom.	49
Slika 45: Shema prekrivanja lipidov frakcij A-G.	50
Slika 46: Prikaz koncentracije proteinov (µg/mL) pridobljenih z BCA testom.	52
Slika 47: Točkovni odtis pred razvijanjem v peroksidaznem substratu.	52
Slika 48: Točkovni odtis po razvijanju v peroksidaznem substratu.	53

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: V raziskavi uporabljene kemikalije.	18
Preglednica 2: Uporabljena laboratorijska oprema in aparature.	20
Preglednica 3: Uporabljeni pufri, topila in raztopine.	21
Preglednica 4: Fosfolipidni test: koncentracija fosfolipidov v frakcijah 2 in 3 pridobljenih z adsorpcijsko kromatografijo.	51
Preglednica 5: Fosfolipidni test: koncentracija fosfolipidov v frakcijah A-G pridobljenih z gradientnim centrifugiranjem.	51

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2D-TLC	dvodimenzionalna tankoplastna kromatografija
APS	amonijev persulfat
BCA	ang. bicinchoninic acid
BSA	ang. bovine serum albumin
BHT	2,6-di-tert-butil-p-cresol (ang. butylated hydroxy toluene)
DG	diacilglicerol
DGDG	digalaktosildiacilglicerol
DPG	difosfatidilglicerol
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
HEPES	N- [ 2-hidroksietil ]piperazin-N'- [ 2-etan-sulfonska kislina ]
MGDG	monogalaktozildiacilglicerol
MES	2-morfolinoetansulfonska kislina
MLV	multilamelarni vezikel (ang. multilamellar vesicles)
NEP1	protein, ki povzroča nekroze in inducira produkcijo etilena (ang. necrosis and ethylene inducing peptide 1)
NLP	skupina proteinov, ki je podobna NEP1 (ang. NEP1-like protein)
PAMP	molekula, ki se veže na receptor v gostitelju, ki prepozna vzorec in sproži obrambno reakcijo (ang. pathogen associated molecular pattern)
PC	fosfatidilholin
PE	fosfatidiletanolamin
PG	fosfatidilglicerol
PI	fosfatidilinozitol
PS	fosfatidilserin
SPE	ekstrakcija na trdni fazi (ang. solid phase extraction)
SQDG	sulfokinovozilglicerol (ang. sulfoquinovosyldiacylglycerol)
Temed	tetrametiletilendiamin
TLC	tankoplastna kromatografija (ang. thin-layer chromatography)
UV	ultravijolična svetloba

## 1 UVOD

Milijone let koevolucije med rastlinami in rastlinskimi patogeni je oblikovalo sposobnost patogenov, da so premagali rastlinsko odpornost in sposobnost rastlin, da so se z napadi patogenov spopadle (Jones in Dangl, 2006). Rastlinske celice se odzivajo na različne kemične signale v njihovem okolju, kot so npr. fragmenti celične stene, ki so na površini patogena, in na dele lastne celične stene, ki se sprostijo kot odziv na vdirajočega rastlinskega patogena ali na spojino, ki jo patogen izloča. Patogeni lahko izdelujejo različne toksine, ki pospešujejo bolezenski razvoj, ali molekule, kot so proteini, majhni peptidi, glikoproteini ali oligosaharidi, ki v rastlini aktivirajo mehanizme za obrambo pred patogenom in jih zato imenujemo tudi elicitorji. Veliko elicitorjev lahko rastlinske celice ubije (Jennings in sod., 2001).

V nekaterih patogenih organizmih so odkrili proteine NLP (ang. NEP1-like protein), ki v listih večine dvokaličnic povzročajo nekroze, proizvajanje etilena in preobčutljivostni odziv. Take simptome povzročijo proteini NLP tudi na listih tobaka (*Nicotiana tabacum*). Mehanizem, s katerim proteini NLP poškodujejo celične membrane, še ni znan. Na podlagi strukturne podobnosti proteinov NLP z aktinoporini, citolitičnimi proteini iz morskih veternic, pa predvidevamo, da imajo sposobnost lizirati celične membrane.

### 1.1 NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo raziskovali vezavo proteinov NLP na rastlinske celične membrane. Preverili bomo vezavo rekombinantnih proteinov  $NLP_{Pb}$  (protein, ki ga izloča *Phytophthora parasitica*) (Fellbrich in sod., 2002),  $NLP_{Pcc}$  (iz *Pectobacterium carotovorum* ssp. *Carotovorum*) (Mattinen in sod., 2004) in  $NLP_{Pya}$  (iz *Phytium aphanidermatum*) (Veit in sod., 2001) na lipide iz tobakovih listov in poskusili identificirati lipid, na katerega se proteini vežejo.

Delovna hipoteza:

Proteini NLP se specifično vežejo na lipide iz tobaka.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PROTEINI NLP

#### 2.1.1 Značilnosti proteinov NLP in vpliv na rastline

Proteine NLP izločajo nekateri patogeni organizmi in lahko pri rastlinah povzročajo številne spremembe kot so nekroze, proizvajanje etilena, aktiviranje obrambnega mehanizma, celično smrt (Gijzen in Nürnberg, 2006), aktiviranje MAP kinaz, induciranje pretokov ionov skozi celične membrane, produkcijo reaktivnih kisikovih spojin, indukcijo obrambnih genov (Küfner in sod., 2009), sintezo fitoaleksinov (substanc za obrambo pred mikroorganizmi, predvsem glivami (Heldt, 1999)), povečanje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  v citoplazmi in številne druge hitre spremembe v fiziologiji in genski ekspresiji (Jennings in sod., 2001; Veit in sod., 2001; Fellbrich in sod., 2002). Te spremembe se navzven lahko kažejo tudi kot venenje rastline. Občutljivost rastline na proteine NLP se spreminja z njenim razvojem (Gijzen in Nürnberg, 2006).

Proteini NLP sprožijo tudi aktivacijo imunskega sistema, kar je pogojeno z razpadom rastlinske celične membrane in s tem sprožena celična smrt. Iz nekrotičnih celic se sprostijo rastlini lastne molekule, ki jih prepoznajo sosednje rastlinske celice, in so znak za poškodbo tkiva oz. prisotnost patogena. Rastlina prepozna delovanje NLP in ne proteina samega. NLP-ji aktivirajo rastlinsko obrambo in glede na to jih lahko primerjamo s sprožilci pri živalski imunosti, kar so npr. toksini (Küfner in sod., 2009).

Proteini NLP se razlikujejo v sposobnosti povzročanja nekroz, nekateri pa celične smrti ne morejo povzročiti. Izmed štirih NLP, ki jih najdemo pri vrsti *Phytophthora infestans*, le en povzroča nekroze. Primerjava aktivnosti štirih različnih NLP-jev na *Nicotiana benthamiana* je pokazala zelo različne simptome. NLP-ji so bili iz oomicete, glive in dveh bakterij. Učinki, ki so jih povzročili, so se raztezali od zelo obširnih nekroz do nikakršnih sprememb. Vsi pa so pokazali učinke na sojinih celicah (Qutob in sod., 2002).

Poskusi na protoplastih, rastlinskih celicah brez celične stene, so pokazali, da je zunanja celična membrana mesto vezave in delovanja proteinov NLP. Kljub odstranitvi celične stene, celice niso izgubile občutljivosti na NLP, saj so aktivirale obrambne mehanizme in kmalu zatem tudi umrle (Gijzen in Nürnberg, 2006).

Analize genoma so pokazale, da je družina proteinov NLP velika in raznolika. NLP-ji so kodirani s 50-60 lokusi v vsaki vrsti, čeprav je več kot polovica genov verjetno psevdogenov (Gijzen in Nürnberg, 2006).

### **2.1.2 NLP-ji: elicitorji, toksini ali oboje?**

Rastlina preko poškodb lastnega tkiva prepozna napad in ustavi širjenje patogena, s čimer okužbo omeji. Molekule, ki vplivajo na interakcijo med rastlino in patogenom so elicitorji in toksini. Toksin je spojina, ki jo proizvaja organizem in je strupena za rastline ali živali. Patogeni lahko proizvajajo toksine, ki sprožijo celično smrt, pospešujejo bolezen in pripomorejo k virulenci. Številni toksini imajo ločeni področji za vezavo na receptorje in za toksične funkcije (Gijzen in Nürnberg, 2006).

Patogeni poleg toksinov izločajo tudi druge molekule, ki povzročijo smrt rastlinskih celic. Take molekule so npr. elicitorji, ki ji rastlinske celice prepoznaajo in ob tem aktivirajo obrambne mehanizme, ki omejijo ali upočasnijo širjenje bolezni, lahko pa tudi vodijo v celično smrt. Elicitorji se precej razlikujejo v strukturi in funkciji, vežejo pa se na receptorje za avirulenčne proteine (AVR, ang. avirulence protein) ali njim podobne receptorje. Za večino proteinov AVR patogena ima rastlina protein R (ang. resistance), ki kodira receptor, ki veže ustrezen protein AVR, ob vezavi pa se sproži obrambni odgovor rastline (Gijzen in Nürnberg, 2006).

Včasih je težko razlikovati med elicitorji in toksini. Ločilo se glede na funkcijo, kriterij za razlikovanje pa je prispevek molekule k virulenci patogena oziroma odpornosti gostitelja. Pomembno je, kako molekulo zazna rastlinski imunski sistem, vendar v določenih primerih to še ni poznano. Če hočemo razumeti vlogo molekule v procesu bolezni, moramo poznati tudi njen način delovanja. Lep primer je 24-kDa ekstracelularni protein NEP1, ki je prvi odkriti NLP (Gijzen in Nürnberg, 2006). Izoliran je bil iz glive *Fusarium oxysporum* (Bailey, 1995). Ta protein sproži nekroze in biosintezo etilena v številnih dvokaličnicah, zato so ga imenovali NEP1 (ang. necrosis and ethylene inducing peptide 1) (Küfner in sod., 2009). V času odkritja proteina njegovega nukleotidnega zaporedja niso mogli povezati z nobenim znanim proteinom ali funkcionalno skupino, od takrat do danes pa je bilo odkritih veliko podobnih proteinov v različnih organizmih. To je vodilo v povečano zanimanje za določitev njihovega delovanja in vloge v interakciji med rastlinami in patogeni (Gijzen in Nürnberg, 2006).

Kasnejše raziskave so identificirale več oomicet, gliv in bakterij, ki izločajo proteine NLP kot na primer PaNIE oziroma NLP<sub>Pya</sub> iz *Pythium aphanidermatum* (Veit in sod., 2001), NPP1 oziroma NLP<sub>Pp</sub> iz *Phytophthora parasitica* (Fellbrich in sod., 2002), PsojNIP oziroma NLP<sub>Ps</sub> iz *Phytophthora sojae* (Qutob, 2002) in NIP oziroma NLP<sub>Pcc</sub> iz *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (Mattinen in sod., 2004). Proteine NLP so našli tudi v bakterijah *Bacillus halodurans*, (Jennings in sod., 2001) *Bacillus licheniformis*, *Streptomyces coelicolor*, *Vibrio pommerensis* in glivah *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Gibberella zae*, *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa*, *Verticillium dahliae* ter oomicetah *Phytophthora infestans* in *Pythium monosporum* (Gijzen in Nürnberg, 2006).

Vsi našteti proteini izzovejo različne obrambne odzive v številnih dvokaličnicah. Zanimivo je, da v raziskavah poudarjajo, da NLP proteini ne škodujejo enokaličnicam, čeprav so jih našli tudi v patogenih, ki okužijo izključno enokaličnice (Motteram in sod., 2009).

Hitre in številne obrambne reakcije, ki se aktivirajo v celicah dvokaličnic kot odziv na NLP, so primerljive z odzivom organizma na dobro opisane elicitorje oz. PAMP, kot so na primer flagelin iz *Escherichie coli* (Felix in sod., 1999) ali transglutaminaza (glikoprotein) iz *Phytophthora parasitica* (Brunner in sod., 2002). PAMP (ang. pathogen associated molecular pattern) so molekule, ki so značilne za mikrobe in se vežejo na receptorje v gostiteljevih celicah, ki prepoznajo določen molekularni vzorec, in sprožijo obrambno reakcijo (Gijzen in Nürnberg, 2006).

Med proteini NLP in PAMP obstajajo značilne razlike. Oboji delujejo na zunanji celični membrani, povzročijo aktivacijo rastlinskega obrambnega sistema, a le NLP lahko povzročijo celično smrt. Proteini NLP se vežejo na membrano, kjer predvidoma direktno izvršijo svoj vpliv na celico, medtem ko se PAMP vežejo na posebne membranske receptorje, preko katerih sprožijo odziv celice. NLP so zato občutljivi na temperaturo, PAMP pa ne, saj se na receptor vežejo le s kratkim aminokislinskim zaporedjem v svoji zgradbi in celotna terciarna zgradba proteina v osnovi ni pomembna. Spekter gostiteljskih rastlin je pri NLP širok, pri posameznem PAMP pa ozek (Fliegmann in sod., 2004; Ron in Avni, 2004). Patogeni NLP se izrazijo le, ko je to potrebno za njegovo širjenje in virulenco, PAMP pa so nujni za obstoj patogena in se izražajo stalno. PAMP povzročijo celično smrt le v izjemnih primerih, medtem ko NLP povzročijo poškodbe tkiva v vseh dvokaličnicah, na katerih so potekale raziskave. NLP izzovejo celično smrt zaradi preobčutljivostnega odziva rastline nanje (Küfner in sod., 2009).

Te lastnosti nakazujejo, da so NLP v določenih lastnostih bližje encimom ali toksinom kot elicitorjem ali PAMP-om, a nekaj raziskovalcev meni nasprotno. Ključno vprašanje je, ali NLP reagirajo z receptorji, ki prepozna vzorce, in tako prožijo odziv celice, ali pa so direktno škodljivi za celico, npr. s tvorbo lukenj v membrane ali z interakcijo s tarčno molekulo v membrani. Taki primarni toksični učinki v določenih primerih aktivirajo programirano celično smrt (Gijzen in Nürnberg, 2006). Ottmann in sod. (2009) proteine NLP na podlagi strukturne podobnosti z aktinoporini opredelijo kot citolitične fitotoksine.

Stimulacija obrambnega odziva rastline s proteini NLP ima podobne lastnosti kot PTI (s PAMP sprožena imunost, ang. PAMP-triggered immunity). PTI je odziv rastline na PAMP. PTI zviša osnovno imunost dovezne gostiteljske rastline (Boller in Yang He, 2009).

### **2.1.3 Pozitivna vloga NLP-jev pri virulenci rastlinskih patogenov**

Poskusi genske transformacije z glivo *Fusarium oxysporum* so pokazali, da ekspresija NEP1 ne zmanjša agresivnosti in virulence tega patogena do njegovega gostitelja (Bailey in sod., 2002). Odkrili so, da ima NEP1 pozitivno vlogo pri virulenci glive *Colletotrichum coccodes*. Transformacija te glive z NEP1 iz *Fusarium oxysporum* zviša njeno virulenco in poveča razpon gostiteljev. Če inokuliramo transformirano kulturo *Colletotrichum coccodes* v sadike rastline *Abutilon theophrasti*, povzročijo hitro smrt, medtem ko netransformirana kultura *Colletotrichum coccodes* povzroča le blage simptome bolezni (Amsellem in sod., 2002). Transformirani NEP1 okuži tudi paradižnik in tobak, ki sta odporna na divji tip kulture *Colletotrichum coccodes*. (Gijzen in Nürnberg, 2006).

### **2.1.4 Prisotnost NLP-jev v glivah, oomicetah in bakterijah**

S širjenjem genomskih in proteomskeh metod analize se širi tudi družina proteinov NLP. Gene za kodiranje NLP ali proteine same so našli v prokariontskih in evkariontskih organizmih: glivah, oomicetah in tudi v po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah. Večina vrst, ki ima NLP proteine, so rastlinski patogeni, vendar se najdejo tudi izjeme. Primerjave med proteini iz genskih bank nam prinesejo informacije o evoluciji NLP proteinov (Gijzen in Nürnberg, 2006).

Vzrok za prisotnost NLP v tako različnih organizmih, kot so glive in bakterije, je najverjetnejše horizontalni genski prenos. Na to nakazujejo tudi evolucijska razmerja med

zaporedji bakterijskih proteinov NLP, saj njihov izvor ni monofiletski, ampak so pomešani z nukleotidnimi zaporedji proteinov gliv (Gijzen in Nürnberger, 2006).

### **2.1.5 Velika skupina genov NLP v rodu *Phytophthora***

V rod *Phytophthora* uvrščamo približno 65 vrst, ki so med najbolj škodljivimi rastlinskimi patogeni na planetu (Kamoun, 2003). Spadajo med oomicete (Cooke in sod., 2000).

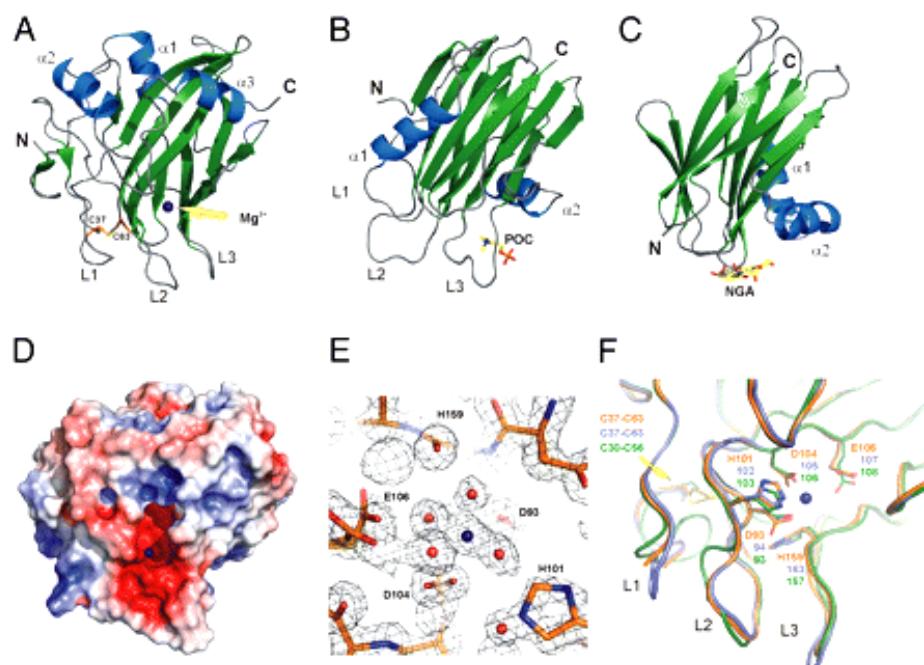
Čeprav so proteini NLP iz rodu *Phytophthora* precej raznoliki, pa v primerjavi z drugimi proteini NLP tvorijo monofiletsko skupino. Vsi vsebujejo NPP1 domeno tipa 1 (ang. necrosis-inducing *Phytophthora* protein 1) in dodatno hidrofilno področje, vrinjeno med signalni peptid in NPP1 domeno. Slednje najdemo tudi pri NLP pri *P. sojae* in *P. ramorum*. Rastlinske patogene glive *Magnaporthe grisea* in *Gibberella zeae* imajo genski zapis za štiri proteine NLP, glivi *Aspergillus nidulans* in *Aspergillus fumigatus*, ki nista rastlinska patogena, imata zapis le za dva, le en tak gen pa je prisoten v genomu glive *Neurospora crassa*. Geni, ki kodirajo NLP, so bili v eni kopiji najdeni tudi v številnih drugih rastlinskih patogenih in saprofitskih bakterijah, vendar NLP gotovo niso skupna značilnost bakterijskega genoma. Dokazi kažejo, da so različice NLP, prisotne pri rodu *Phytophthora*, nastale iz enega prednorskega gena, potem pa so skozi evolucijo ti geni postali zelo raznoliki (Gijzen in Nürnberger, 2006).

### **2.1.6 Struktura proteinov NLP**

Kristalna struktura NLP<sub>PyA</sub> ima eno domeno. Na sredini ima β-sandvič, ki ga sestavlja trije trakovi v prvi ravnini in 5 antiparalelnih trakov v drugi ravnini. Na vrhu ga obdajajo trije α-heliksi tako, da tvorijo ravno površino. Spodnjo stran polipeptida tvorijo tri široke zanke (L1, L2, L3). Nad zankami je vdolbina z negativnim nabojem, v kateri je dvovalentni kation Mg<sup>2+</sup> (Slika 1) (Küfner in sod., 2009). Strukturno podobni proteini so lektini iz gliv: XCL iz *Xerocomus chrysenteron* (Birck in sod., 2004), ABL iz *Agaricus bisporus* (Carrizo in sod., 2005) in aktinoporini iz morskih vetrnic ekvinatoksin II-EqtII iz *Actinia equina* in stiholizin II-StnII iz *Stichodactyla helianthus* (Athanasiadis in sod., 2001; Hinds in sod., 2002).

Domeni, ki reagirata z membrano pri perfringolizinu (domena 4) in pri PKCα (domena C2), imata podobno topologijo, kot jo najdemo pri NLP<sub>PyA</sub>. Vsi ti proteini reagirajo s specifičnimi strukturami na membrani. Perfringolizin potrebuje za interakcijo z membrano

sterol, lektini in aktinoporini pa sladkorje in sfingomielin. Podobno je lahko tudi površina NLP<sub>Pya</sub> primerna za vezavo na specifične komponente izpostavljene na površini membran. Pri vezavi najverjetneje sodeluje tudi dvovalentni kation (Küfner in sod., 2009).



**Slika 1: Kristalne strukture proteinov.** (A) Kristalna struktura proteina NLP<sub>Pya</sub>. Modro prikazani elementi sekundarne strukture so  $\alpha$ -heliksi, zeleno pa  $\beta$ -trakovi. (B) Aktinoporin; stiholizin, (C) lektin-ABL, NGA (N-acetilgalaktozamin), POC (fosforilholin), (D)elektrostatsko površje NLP<sub>Pya</sub>, barve prikazujejo pozitiven in negativen potencial, (E) prikaz elektronske gostote v okolici magnezijevega iona, (F) primerjava strukture NLP<sub>Pya</sub> (oranžno) z NLP<sub>Pp</sub> (modro) in NLP<sub>Pcc</sub> (zeleno) (prirejeno po Ottman in sod., 2009).

#### 2.1.6.1 Podobnost z aktinoporini

Kristalna struktura NLP<sub>Pya</sub> je razkrila strukturno podobnost z aktinoporini (Küfner in sod., 2009). To so citolitični 20 kDa veliki toksini iz morskih veternic, ki tvorijo transmembranske pore (Anderluh in Maček, 2002). Proteine NLP lahko po funkciji primerjamo z aktinoporini, le da lahko NLP poškodujejo le membrane rastlin dvokaličnic. Enokaličnice so odporne na delovanje NLP. Strukturno funkcionalne analize so pokazale, da NLP delujejo citolitično tako, da vzdržujejo pravilno lego dvovalentnega kationa v jamici, ali pa preko tvorbe domnevne membranske zanke, s katero lahko reagirajo z lipidnimi membranami (Küfner in sod., 2009).

Aktinoporini tvorijo pore tako, da se z N-terminalnim heliksom vsidrajo v gostiteljske celične membrane (Anderluh in Maček, 2002). Ta N-terminalni heliks je pri  $NLP_{PyA}$  dolg 29 aminokislin.  $NLP_{PyA}$  vključuje tudi kratek heliks  $\alpha 1$ , ki bistveno sodeluje pri celični smrti, ki jo inducira  $NLP_{Pp}$ .  $NLP_{PyA}$  ima hidrofoben del, ki je podoben hidrofobnemu delu aktinoporinov in perfringolizina, in bi lahko reagiral z lipidnim slojem membrane (Küfner in sod., 2009).

#### 2.1.6.2 Tip 1, tip 2 in NPP1 področje

Proteini NLP imajo NPP1 področje, ki lahko vsebuje 2 ali 4 ohranjene cisteinske ostanke, zato jih ustrezno razdelimo v tip 1 in tip 2. Tip 1 je prisoten pri bakterijah, glivah in oomicetah, tip 2 pa le pri bakterijah in glivah. Isti organizem, na primer gliva *Magnaporthe grisea*, ima lahko oba tipa proteinov. Značilnost NPP1 domene pri obeh tipih je osrednji predel s heptapeptidom, ki je sestavljen iz aminokislina GHRHDWE (aminokisline 100-106 v  $NLP_{PyA}$ )<sup>1</sup> (Gijzen in Nürnberg, 2006). Heptapeptid je del negativno nabite vdolbine na površju proteina. Tri aminokisline heptapeptida (H101, D104, E106) so vpletene v vzdrževanje pravilne lege dvovalentnega kationa v vdolbini (Slika 1F). To področje je pomembno za biološko aktivnost proteinov NLP, kar so potrdili tako, da so vsako posamezno aminokislino heptapeptida zamenjali z alaninom v  $NLP_{Pp}$  in  $NLP_{Pcc}$  ter določili stopnjo virulentnosti, delež nekroz in preverili, ali spremenjeni proteini prehajajo celično membrano v celicah lista tobaka. H101, D104 in E106 so pomembne pri citolitični aktivnosti proteinov NLP in za vpetje  $Mg^{2+}$ . Pri proučevanju pomembnosti negativnega naboja vdolbine so zamenjali D104 z nenabito aminokislino ali z drugo kationsko oziroma anionsko aminokislino. Vse razen ene mutante, ki je imela anionsko aminokislino, so izgubile citolitično aktivnost (Ottmann in sod., 2009).

Regije, pomembne za aktivnost proteina NLP, so določili s primerjanjem različnih peptidov in njihovih mutant, ki so jih dobili iz NPP1 zaporedja iz vrste *Phytophthora parasitica*. Ključen za pravilno delovanje se je izkazal cisteinski par v tipu 1, za aktivnost proteina pa je manj pomembna C-terminalna regija (Fellbrich in sod., 2002).

---

<sup>1</sup> Vsaka črka pomeni aminokislino (G-glicin, H-histidin, R-arginin, D-asparaginska kislina, W-triptofan, E-glutaminska kislina).

## 2.2 LIPIDI V TOBAKU

### 2.2.1 Tobak

Navadni tobak (*Nicotiana tabacum*) uvrščamo v rod *Nicotiana* skupaj še s 60 drugimi vrstami in v družino Solanaceae. Prvi so ga uporabljali Indijanci za zdravilo, v čarovniške in verske namene. Za kajenje, žvečenje in njuhanje sta v uporabi dve vrsti: navadni tobak (*N. tabacum*) in kmečki tobak (*N. rustica*). Razlikujeta se predvsem v velikosti listov in občutljivosti na podnebje, obe pa vsebujeta strupeni alkaloid nikotin, ki nastane v koreninah in se transportira v liste. Koncentracija nikotina narašča, ko se rastlina bliža cvetenju, med cvetenjem in razvojem semen pa hitro pade. Nikotin povzroča srčno-žilne bolezni, pljučne bolezni in raka. Tobak uporabljamо tudi kot nadomestilo za pesticide v biološki pridelavi hrane, saj je nikotin učinkovit insekticid (Ross, 2005).

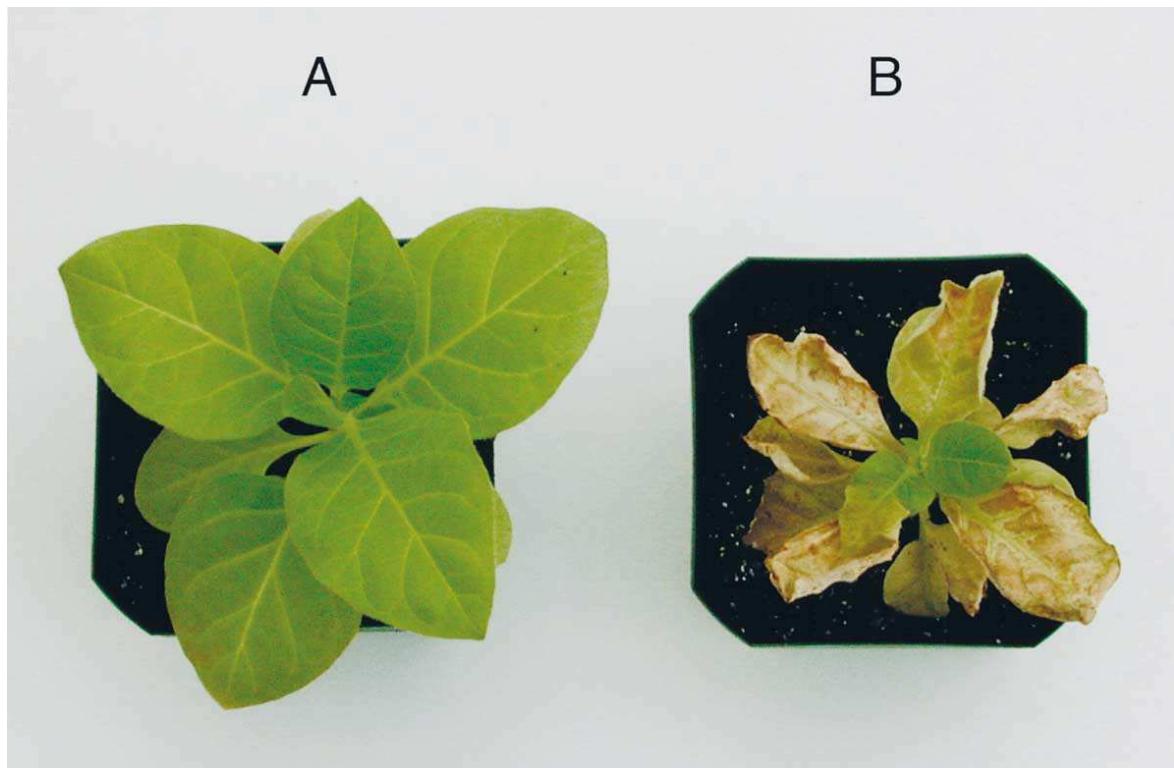
### 2.2.2 Odziv tobaka na NEP1

Na listih tobaka, ki so bili prepojeni s proteinom NEP1, so se pojavile nekroze (Slika 2). Število tobakovih celic, na katere je vplival protein NEP1, je v pozitivnem sorazmerju s količino proteina, ki je prepojil list. Učinek NEP1 se je pokazal le lokalno, kjer so bili listi tretirani s proteinom. Nekroze so vidne že, če tretiramo 1 g sveže listne teže z 0,5 µg NEP1. Po tretiranju z NEP1 robovi listov tobaka postanejo temno rjavi, se sušijo in zvijajo. Protein je nekrozo sprožil tudi v celični kulturi tobaka (Jennings in sod., 2001).

Drugi odziv tobaka na tretiranje z NEP1 je bila biosinteza rastlinskega hormona etilena. Večje koncentracije NEP1 so inducirale sintezo večjih količin etilena. Največ etilena je bilo proizvedenega 3 ure po tretiranju. Biosinteza je povezana z aktivacijo vsaj dveh genov: ACC sintaze in ACC oksidaze. Analitska tehnika northern prenos je potrdila, da tretiranje z NEP1 inducira transkripcijo obeh encimov, ki sodelujeta pri biosintezi etilena (Jennings in sod., 2001).

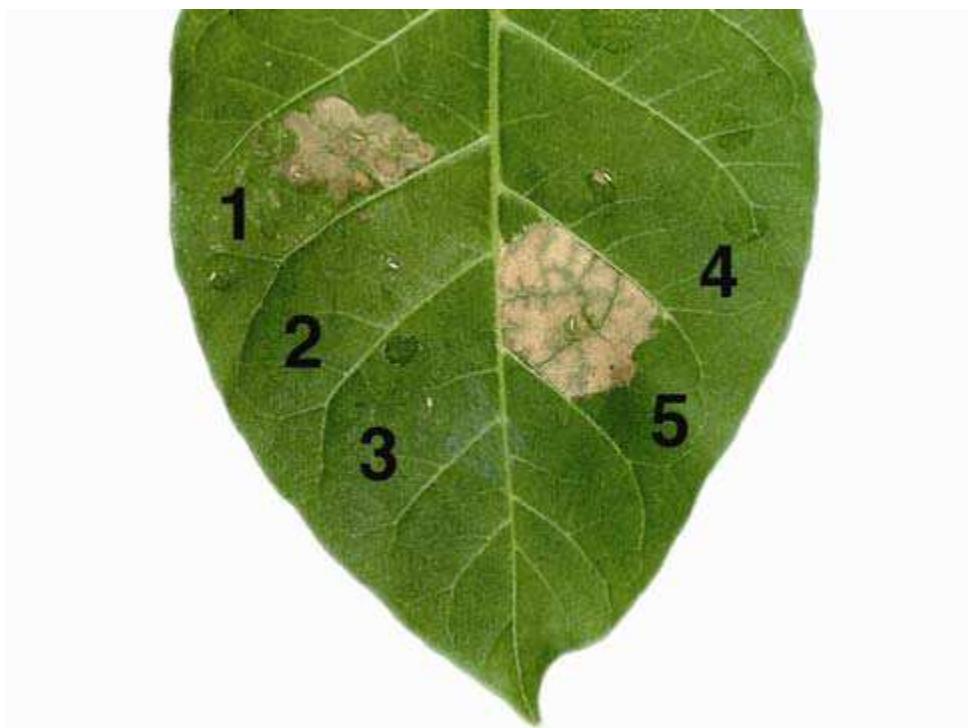
Poraba O<sub>2</sub> je bila pri celičnih kulturah tobaka, ki so bile tretirane z NEP1, večja kot pri netretiranih kontrolah. Po 90 minutah se je poraba ustavila, kar nakazuje na zelo zmanjšano respiracijo celic. Tretiranje z NEP1 je povzročilo tudi povečanje pH in koncentracije K<sup>+</sup> zunaj celic, v citoplazmi pa se je povečala koncentracija H<sup>+</sup>. Povečanje [H<sup>+</sup>] povzroči fosforilacijo proteinov, to pa je povezano s preobčutljivostnim odzivom, ki ga povzroči nekompatibilna interakcija rastline in patogena. Protein harpin, elicitor iz rodu

*Pectobacterium*, tudi povzroča spremembe koncentracij  $K^+$  in  $H^+$  v celicah tobaka. Harpini lahko inducirajo tudi sistemsko rezistenco, ki varuje rastline pred številnimi boleznimi in insekti, v nasprotju pa NEP1 pomaga pri razvoju bolezni (Jennings in sod., 2001).



**Slika 2: Pršenje tobaka s proteinom NEP1 iz glive *Fusarium oxysporum* inducira nekroze.** (A) Zdrava kontrolna rastlina, (B) Rastlina, izpostavljena NEP1, ki je inducirala nekroze. (prirejeno po Jennings in sod., 2001).

Izpostavljenost proteinu  $NLP_{pec}$  povzroča na tobaku preobčutljivostni odziv in poškodbe tkiva (Slika 3), vendar do teh simptomov pride le pri nizkem pH in nizki temperaturi. Preobčutljivostni odziv v tobaku, kot je že omenjeno, povzročijo tudi harpini, zato sklepajo, da jim je  $NLP_{pec}$  podoben (Mattinen, 2004).



**Slika 3: Protein NLP<sub>pcc</sub> iz po Gramu negativnih bakterij *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* povzroča celično smrt na listih tobaka.** Nekrotične spremembe so vidne v listnih poljih označenih s številkama 1 in 5 (prirejeno po Mattinen, 2004).

### 2.2.3 Rastlinske membrane in lipidi

Celične membrane so lipidni dvosloji. Lipidi v membrani imajo amfifilne lastnosti in igrajo osrednjo vlogo pri njeni molekularni organizaciji. Sestavljeni so iz polarne glave in nepolarnega repa (Harwood, 1997). Taki lipidi so glicerofosfolipidi, sfingolipidi, glikolipidi, steroli in glikozilgliceridi. Glicerofosfolipidi, ki so prisotni v celičnih membranah, so fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol, fosfatidilholin in fosfatidilglicerol. Sfingolipidi v membranah so ceramidi, sfingomielini in glikosfingolipidi. Rastlinski steroli oziroma fitosteroli so  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol in kampesterol (Boyer, 2005). Rastlinske membrane vsebujejo tudi glikozilgliceride kot so monogalaktozildiacilglicerol (MGDG), digalaktozildiacilglicerol (DGDG) in sulfokinovozildiacilglicerol (SQDG) (Harwood, 1997).

Lipidi v membranah nimajo le strukturne vloge, saj je od njihove sestave v membrani odvisna aktivnost nekaterih encimov, ki so vezani na membrane (Tevini in Lichtenthaler, 1977). V membranah najdemo integralne proteine, ki so lahko vstavljeni v enega ali oba

sloja membrane, in periferne proteine, ki so vezani na površino membrane (Harwood, 1997).

Celična membrana obdaja celico in jo ščiti pred zunanjimi vplivi. Je selektivno prepustna, kar pomeni, da v celico in iz nje spusti le specifične snovi v nadzorovanih količinah. Celica se sporazumeva s svojo okolico skozi celično membrano, v katero so vgrajeni proteinski receptorji, ki prenašajo kemijske signale in uravnavajo metabolne procese znotraj celice. Pomembna lastnost membrane je tudi njena fluidnost (Boyer, 2005; Berg 2002).

Membrane različnih rastlinskih organelov (plazmalema, mitohodriji, tilakoide) se razlikujejo v naboru tipov lipidov in njihovih razmerjih. Tilakoidne membrane v kloroplastu večinoma vsebujejo glikozilgliceride. Mitohondrijska in celična membrana ne vsebuje glikozilgliceridov, ampak fosfolipide. V fotosintezno aktivnih delih rastline 80% vseh membranskih lipidov predstavljajo lipidi v tilakoidnih membranah. Rastline obsegajo velik del biosfere in zato sta glikozilglicerida MGDG in DGDG najštevilčnejša membranska lipida na zemlji (Heldt, 1999). Malo manjši delež zastopajo glicerofosfolipidi kot so na primer fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol in fosfatidilglicerol. Fosfatidilglicerol je še posebej značilen za fotosintetsko tkivo in je lahko večinski glicerofosfolipid v nekaterih algah. Triacilgliceridi so v listih rastlin zastopani minimalno (Tevini in Lichtenthaler, 1977).

Fluidnost membran je odvisna od deleža nenasičenih maščobnih kislin, vsebnosti sterolov in temperature. Pri nekaterih rastlinah, ki rastejo pri nižji temperaturi, zaradi katere fluidnost membrane pada, se v celično membrano vključi več nenasičenih maščobnih kislin, da povečajo membransko fluidnost. Toleranco na mraz pri tobaku so povečali tako, da so povečali delež nenasičenih maščobnih kislin v membranskih lipidih. Steroli znižajo fluidnost membrane (Heldt, 1999).

V rastlinski membrani lipidi predstavljajo okoli 50 % celotne teže membrane. Gliceridi, proste maščobne kisline in steroli predstavljajo od 30 do 50 % celotne lipidne teže membrane. Razmerje steroli : fosfolipidi je veliko večje v zunanji celični membrani, kot v membranah znotraj celice (Hodges in sod, 1972).

Sterolne molekule lahko uredijo fosfolipide v monosloje, kar zmanjša prepustnost in fluidnost membrane. Visoka koncentracija sterolov v plazmalemi torej pomaga omejiti oziroma zmanjšati prepustnost membrane, ki je direktno izpostavljena zunanjemu mediju. Tretiranje protoplastov trave iz rodu *Avena* z antibiotiki je pokazalo, da so bili steroli prisotni na zunanji površini protoplastov (Tevini in Lichtenthaler, 1977).

Terpenski oziroma terpenoidni lipidi v višjih rastlinah so lahko v celoti izoprenski derivati (karoten) ali pa so sestavljeni iz terpenoidnega in neterpenoidnega dela (ubikinon). Terpenoidi so biosintetizirani iz izoprenskih enot, ki so sestavljene iz petih ogljikovih atomov. Z združevanjem teh enot dobimo monoterpenoide, seskviterpenoide, diterpenoide, triterpenoide, tetraterpenoide in politerpenoide. Tipični enostavnii izoprenski lipidi so steroli,  $\beta$ -amirin,  $\beta$ -karoten in kastaprenoli. Značilni mešani terpenoidi so klorofil a, ubikinon, plastokinon-9,  $\alpha$ -tokoferil kinon, filokinon (vitamin K), tokoferol, plastokromanol. Najstevilčnejši plastokinon v višjih rastlinah je plastokinon A. Plastokinona B in C sta zastopana v rastlinah le v manjših količinah. Lahko sta produkta biološke razgradnje (Tevini in Lichtenthaler, 1977).

Različni terpenoidni lipidi se v listih višjih rastlin nahajajo v določenih organelih (npr. kloroplast, mitohondrij...). Med izjeme spada  $\alpha$ -tokoferol. Večina tega lipida se nahaja v kloroplastih, malo pa so ga našli tudi v mitohondriih. Tudi filokinon so našli v obeh organelih. Steroli so prisotni v vseh membranah (Tevini in Lichtenthaler, 1977).

#### **2.2.4 Skladišče energije v rastlinah**

Najstevilčnejša skupina lipidov, v katerih je skladiščene veliko energije, so triacilgliceroli (Christie, 2003). Najdemo jih v semenih, olivah, avokadu. Njihova prednost je, da so za skladiščenje v tkiva lažji od ogljikovih hidratov (Heldt, 1999). Večina skladiščnih tkiv pri rastlinah vsebuje škrob. V gomoljih krompirja in jabolku so kompleksni glikolipidi in fosfolipidi edini lipidi, ki so prisotni (Christie, 2003).

Če kloroplaste tretiramo z detergentom, nastaneta dve frakciji. V zgornji je fotosistem 1 in v spodnji fotosistem 2.  $\beta$ -karoten in filokinoni se pojavljajo predvsem v fotosistemu 1, medtem ko so lutein, violaksantin, neoksantin in plastokinon v fotosistemu 2. Tokoferoli so razporejeni enakomerno med fotosistema. Razporeditev med fotosistemoma se lahko deloma spreminja s starostjo rastline. Pojav je bolj opazen pri C3 rastlinah kot pri C4. Starost rastline vpliva tudi na razporeditev poliprenolov, saj ti počasi migrirajo iz kloroplasta v celično steno (Tevini in Lichtenthaler, 1977).

### 2.2.5 Težave pri izolaciji lipidov

Izolacija celičnih delov iz rastlinskih celic se razlikuje od izolacije iz živalskih celic. Rastlinske celice so obdane s celično steno. Ta ne povzroča problemov pri izolaciji membran, ampak pri homogenizaciji. Slednja mora biti ravno dovolj močna, da pretrga celično steno, ne pa celičnih organelov. Rastlinske celice imajo vakuole obdane z membrano imenovane tonoplasti. Če se vakuole poškodujejo, se njihova vsebina izlije iz celic in razredči homogenat, lahko pa tudi zmanjša pH. Raztrgani tonoplasti se lahko pri izolaciji pomešajo s celičnimi membranami. Plastidi, ki jih vsebujejo rastline, sestavljajo organelni sistem, ki je po količini enak ali celo večji od mitohondrijskega. Kloroplasti vsebujejo velike količine klorofila, ki moti pri izolaciji lipidov, saj se pri homogenizaciji sprosti iz kloroplastov in pomeša z ostalimi lipidi in oteži analizo takih vzorcev (Findlay in Evans, 1990).

Tehnike za ločevanje celičnih organelov na frakcije so se zelo razvile, kljub temu so lipidne analize rastlinske plazmaleme še vedno težavne, saj jo je težje ločiti od ostalega tkiva. Med trenjem in homogenizacijo rastlinskega materiala se plazmalema pretrga v večje fragmente, ki se v gradientu razporedijo med jedra in mitohondrije celic ali manjši fragmenti pa med majhne vezikle. Celično membrano je zato težko ločiti od ostalih struktur v celici in jo analizirati kot izolirano enoto. Težko je tudi ločiti plazmalemo od tonoplasta, zato rezultati ponavadi obsegajo kombinacijo obeh (Tevini in Lichtenthaler, 1977).

Rezultati analiz za fosfolipide in maščobne kisline v rastlinskih plazmalemah niso enotni. Vzrok je v različnih analitskih tehnikah. Če plazmalemo izoliramo iz usedline z dolgotrajnim centrifugiranjem pri 100.000 g, dobimo velike količine lizolipidov. Fosfatidilholin in fosfatidiletanolamin skupaj ne presegata 30 % vseh fosfolipidov, vsebnost nenasičenih maščobnih kislin je zelo nizka. Če pri analizi začnemo s centrifugiranjem pri 3000 g, dobimo velike količine fosfatidilholina in fosfatidiletanolamina ter nenasičenih maščobnih kislin. Vzrok različnih rezultatov med tem dvema analizama bi lahko pripisali tudi različnemu izvoru celic. Upoštevati pa moramo tudi, da lahko med dolgotrajnim centrifugiranjem pride do razgradnje lipidov zaradi fosfolipaz (Tevini in Lichtenthaler, 1977).

### 2.2.6 Delo z lipidi (ekstrakcija, shranjevanje)

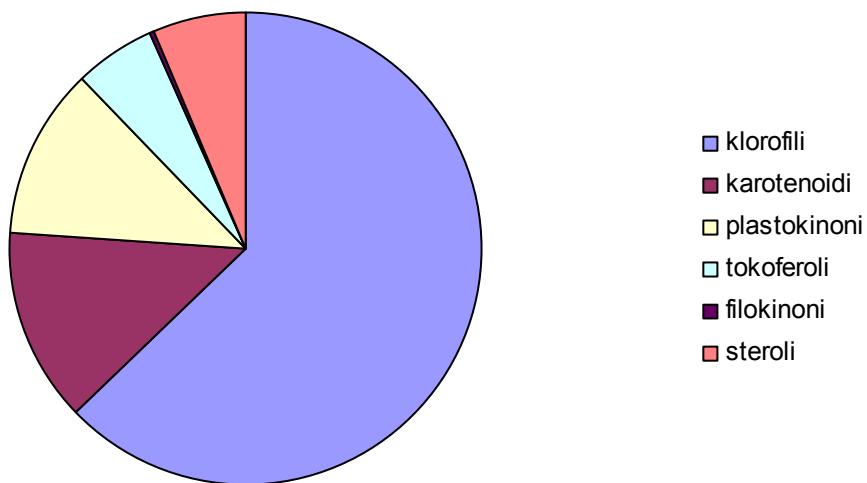
Pred analizo je potrebno lipide dobro ločiti od ostalih snovi v tkivu. Pri ekstrakciji moramo biti zelo pazljivi, saj lahko pride do oksidacije dvojne vezi v maščobnih kislinah. Zamrzovanje tkiva pred ekstrakcijo ali dodajanje organskih topil lahko povzroči, da lipidi pridejo v stik z lipolitičnimi encimi, ki lahko hidrolizirajo lipide. V rastlinskem tkivu se pri obdelavi sprosti encim fosfolipaza D, ki lahko razgradi fosfolipide, tako da nastane fosfatidna kislina in podobne spojine. Ugotovili so, da je pri ekstrakciji iz sojinih semen s kloroformom in metanolom fosfolipaza D povzročila nastanek fosfatidilmetanola (Christie, 2003).

Najbolje je, če se tkivo takoj sveže homogenizira in ekstrahirja lipide s topili pri najnižji možni temperaturi. Na zraku nenasičene maščobne kisline zelo hitro oksidirajo. Naravni antioksidanti, kot na primer tokoferoli, nudijo lipidom določeno zaščito, vendar je priporočljivo dodati tudi sintetične antioksidante kot na primer BHT (ang. 2,6-di-tert-butil-p-cresol (butylated hydroxy toluene)). Če nepravilno shranjujemo vzorce lipidov, lahko encimska oksidacija povzroči izgube nenasičenih maščobnih kislin in celo nepoškodovanih lipidov. Vzorce lipidov moramo shranjevati v dušikovi atmosferi. Če moramo skoncentrirati lipide, je večje količine topil najbolje odstraniti z rotavaporjem, kjer temperatura ne sme presegati 40 °C. Bučka, v kateri koncentriramo vzorec, ne sme biti prevelika, sicer se vzorec razprši po veliki površini steklovine in je bolj dostopen za kisik, kar lahko povzroči oksidacijo lipidov (Christie, 2003).

Očiščeni lipidni ekstrakti ali lipidni standardi niso v kontaktu z encimi, vendar so še vedno občutljivi na kisik. Ne smemo jih pustiti v suhem stanju. Lahko jih raztopimo v majhnem volumnu nepolarnega topila (npr.: heksan) in shranimo pri -20°C v stekleno posodo, ki jo preprihamo z dušikom ter dodamo antioksidante. Za dolgotrajno shranjevanje pa je idealno, da so posode, v katerih shranimo vzorce, pod vakuumom (Christie, 2003).

### 2.2.7 Lipidi v tobaku

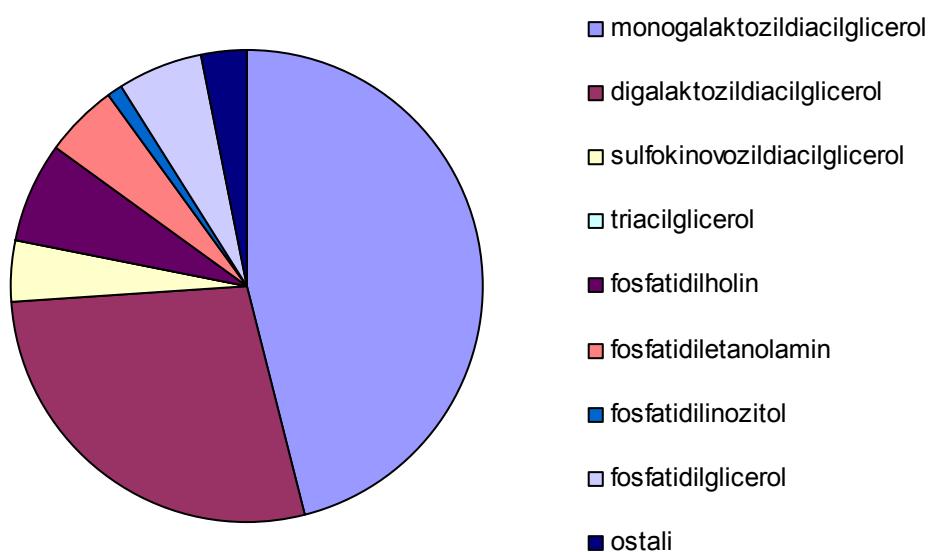
V kloroplastih zelenih listov tobaka so našli klorofile, karotenoide, plastokinone, tokoferole, filokinone in sterole (Slika 4). Klorofili so prisotni izključno v tilakoidah kloroplastov (Tevini in Lichtenthaler, 1977).



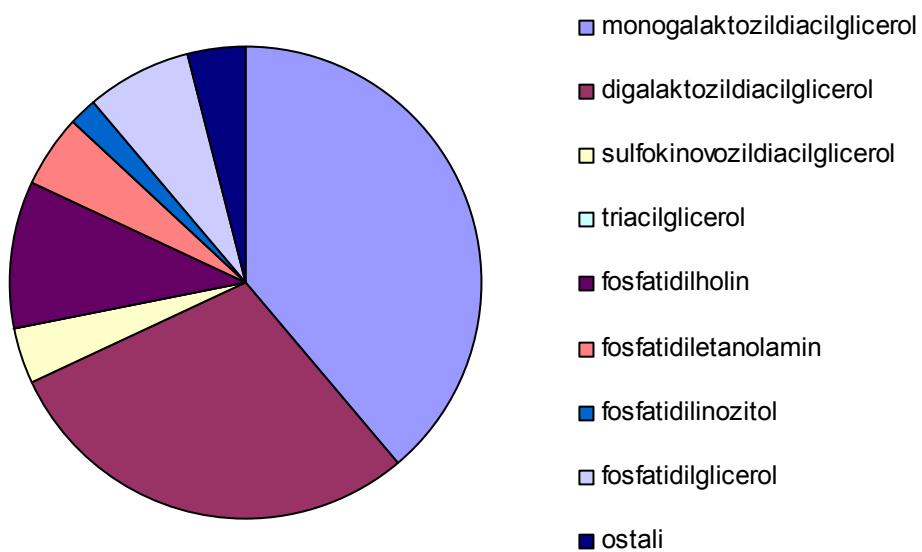
**Slika 4:** Deleži tipov lipidov v kloroplastih tobaka (prirejeno po Tevini in Lichtenhaller, 1977).

### 2.2.8 Razlike med enokaličnicami in dvokaličnicami v lipidni sestavi

Vsebnost in sestava lipidov je pri eno- in dvo-kaličnicah precej podobna, bistvene razlike opazimo le pri deležu MGDG in PC. Večji delež MGDG je v dvokaličnicah, PC pa v enokaličnicah (Slika 5 in 6) (Christie, 2003).



**Slika 5:** Deleži tipov lipidov pri dvokaličnici detelji (prirejeno po Christie, 2003).



Slika 6: Deleži tipov lipidov pri enokaličnici rži (prirejeno po Christie, 2003).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIALI in OPREMA

##### 3.1.1 Uporabljene kemikalije

**Preglednica 1: V raziskavi uporabljene kemikalije.**

Uporabljene kemikalije	Proizvajalec
BHT (ang. 2,6-di-tert-butil-p-cresol (butylated hydroxy toluene))	Sigma, ZDA
metanol	Merck, Nemčija
kloroform	Sigma, ZDA
ocetna kislina	Merck, Nemčija
amonijev sulfat	Merck, Nemčija
MES (2-morfolinoetansulfonska kislina)	Sigma, ZDA
akrilamid	Bio-Rad, ZDA
Temed (tetrametiletilendiamin)	Sigma, ZDA
tris	Merck, Nemčija
1,5% APS (amonijev persulfat)	Serva, Nemčija
NaDS (natrijev dodecil sulfat)	Merck, Nemčija
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Nemčija
sorbitol	Sigma, ZDA

'Nadaljevanje'

Uporabljene kemikalije	Proizvajalec
etilen glikol tetraocetna kislina (EGTA)	Sigma, ZDA
etilen diamin tetraocetna kislina (EDTA, ang. ethylenediaminetetraacetic acid)	Merck, Nemčija
HEPES N-[2-hidriksietil]piperazin-N'- [2-etan-sulfonska kislina]	Sigma, ZDA
NaHCO <sub>3</sub>	Alkaloid, Makedonija
KOH	Merck, Nemčija
KCl	Kemika, Hrvaška
goveji albumin (BSA, ang. bovine serum albumin)	Merck, Nemčija
perkol	Sigma, ZDA
primulin	Aldrich, ZDA
glutation	Merck, Nemčija
PVDF (ang. polyvinylidene fluoride) membrana	Sigma, ZDA
modro barvilo Coomassie Blue	Merck, Nemčija
destilirana voda	

### 3.1.2 Aparature in druga laboratorijska oprema

**Preglednica 2: Uporabljena laboratorijska oprema in aparature.**

Aparatura /oprema	Proizvajalec
SPE kolone	Waters, Irska
sistem za elektroforezo	Bio-Rad, ZDA
optični čitalec	Canon, Anglija
plošča za tankoplastno kromatografijo (TLC, ang. thin-layer chromatography)	Merck, Nemčija
rotavapor	Büchi, Švica
steklene kroglice	Sigma, ZDA
krožno mešalo	Tehtnica, Slovenija
MRX (čitalec mikrotitrnih plošč)	Dynex Technologies, ZDA
stresalnik (TS 100 Termo Shaker)	Biosan, Latvija
analitska tehtnica	Sartorius, Nemčija
centrifuga	Beckman Coulter, ZDA
centrifuga	SIGMA 3K30, Anglija

### 3.1.3 Priprava pufrov

**Preglednica 3: Uporabljeni pufri, topila in raztopine.**

Pufer/ topilo/ raztopine	Sestava
pufer MES	20 mM MES, 140 mM NaCl, pH 5,4 v dH <sub>2</sub> O
CIB (1x)	50 mL 2 x CIB in 50 mL dH <sub>2</sub> O
CIB (2x)	0,6 M sorbitol, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM EGTA, 10 mM EDTA, 40 mM HEPES, 20 mM NaHCO <sub>3</sub> , ph 8 v dH <sub>2</sub> O
5x nanašalni NaDS pufer	300 mM tris-HCl, 0,5 % Coomassie Blue, 25 % glicerol, 10 % NaDS, pH 8,8 v dH <sub>2</sub> O
10x NaDS pufer	1,92 M glicin, 35 mM NaDS, 25 mM tris v dH <sub>2</sub> O
pufer TBS	20 mM tris, 150 mM NaCl v dH <sub>2</sub> O
pufer za razvijanje	3 g Tris, 8 g NaCl, 0,1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> v dH <sub>2</sub> O
peroksidazni substrat	15 mg 4-Cl-1-naftola, 25 mL metanola, 25 mL pufra za razvijanje
topilo 1	kloroform, metanol, ocetna kislina, aceton, vode v razmerju 35 : 35 : 4 : 14 : 2
topilo 2	Kloroform, metanol, voda v razmerju 75 : 25 : 2,5
topilo 3	kloroform, metanol, ocetna kislina in voda v razmerju 80 : 9 : 12 : 2
mešanica za gradient perkola	26 mL perkola, 26 mL 2x CIB, 10 mg glutation perkola

### **3.1.4 Lipidi iz tobaka**

Rastline tobaka (*Nicotiana tabacum*) so bile vzgojene na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB). Liste smo porezali, ko so bile rastline stare 5 tednov in takoj izolirali lipide.

### **3.1.5 Proteini NLP**

V raziskavi uporabljene proteine  $NLP_{Pp}$ ,  $NLP_{Pcc}$ ,  $NLP_{Pya}$  je prijazno podaril prof. dr. Thorsten Nürnberg (Center for Plant Molecular Biology, University of Tübingen, Germany).

### **3.1.6 Protiteesa, testi in proteinski markerji**

Za identifikacijo proteinov NLP smo uporabili primarna kunčja in sekundarna anti-kunčja protiteesa, ki jih je prijazno podaril prof. dr. Thorsten Nürnberg (Center for Plant Molecular Biology; University of Tübingen, Germany).

Uporabili smo proteinske markerje Fermentas.

Za merjenje koncentracije proteinov smo uporabili BCA (ang. bicinchoninic acid) test (Thermo scientific).

Za merjenje koncentracije fosfolipidov smo uporabili fosfolipidni test (Wako Pure Chemical Industries),

### **3.1.7 Kontrolni lipidi**

Uporabili smo kontrolne lipide: POPC (palmitoil-oleil-fosfatidilholin), sfingomielin, holesterol, ganglioqid, POPS (palmitoil-oleil-fosfatidilserin), POPG (palmitoil-oleil-fosfatidilglicerol), 1-palmitoil-2-hidroksi-sn-glicero-3-fosfoetanolamin, D-laktozil-b-1,1 N-palmitoil-sfingozin D-galactozil ceramid, D-glukozil-b-1,1 ceramid, galaktozil ceramid, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol in ergosterol.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Izolacija lipidov iz tobaka

Lipide smo izolirali iz svežih listov takoj za tem, ko smo jih odrezali z rastline. 25 g listnega tkiva iz dveh rastlin smo trli v terilnici v prisotnosti tekočega dušika, dokler ni nastal prah. Odstranili smo slabo strte dele (žile) in dolili 10 mL raztopine metanola in BTH (v razmerju 10 mg BTH v 1 mL metanola) na 1 g začetnega rastlinskega materiala, ter 20 mL kloroforma z BHT (10 mg BHT na 1 mL kloroforma) na 1 g začetnega materiala. Dobro premešano suspenzijo smo eno uro inkubirali pri 4 °C. Po inkubaciji smo mešanico filtrirali, nefiltriran material pa ponovno vrnili v terilnico, dodali 30 mL mešanice kloroforma, metanola (v razmerju 2:1) in BHT (10 mg BTH na 1 mL mešanice), še enkrat strli in ponovno prefiltrirali. Filtrate smo združili in dodali toliko 0,88% KCl, da je zavzemal četrtino končnega volumna. Filtrat smo prelili v lij ločnik, kjer sta po 15 min nastali dve dobro ločeni fazi. Lipidi so bili v spodnji fazi, ki smo jo odlili in ji dodali toliko mešanice metanola in KCl v razmerju 1:1, da je zavzemala četrtino končnega volumna. Dobro smo premešali in prelili v lij ločnik, kjer sta po 15 min nastali dve fazi. Ločili smo spodnjo fazo in jo sušili na rotavaporju. Če je bilo mešanice preveč, smo jo postopoma dodajali v bučko med sušenjem, saj vsebina bučke ni smela biti prevelika. Topilo smo z rotavaporjem odstranjevali pri 55 milibarjih in sušili 4 ure. Dobili smo suh material.

### 3.2.2 Enodimensonalna tankoplastna kromatografija

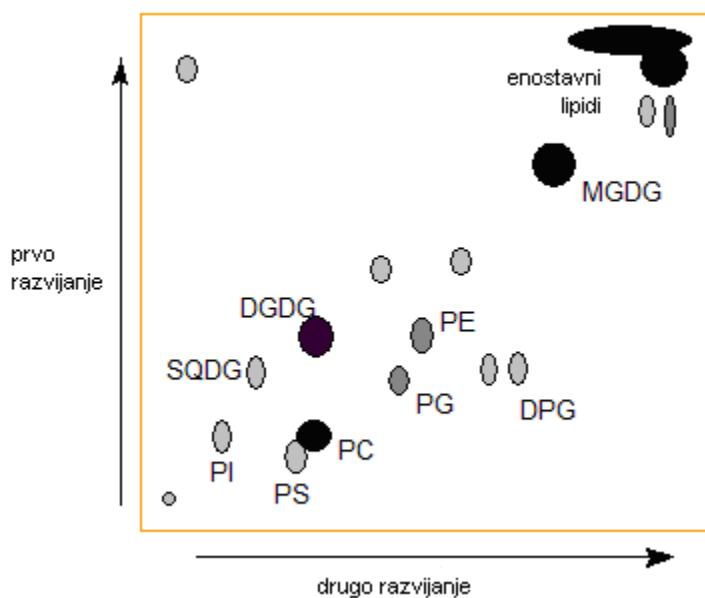
Tankoplastna kromatografija (TLC, ang. thin layer chromatography) je metoda, ki se uporablja za ločitev zmesi. Zaradi preprostosti je pogosto uporabljenha metoda za analizo lipidov. Pri TLC uporabljamo za nosilce snovi, ki tvorijo ob nanosu na trdo ravno podlago enakomerne tanke površine (Anderluh in sod., 2009). Za analize lipidov je najbolje uporabiti zelo tanko plast silikagela. Ta lahko vsebuje kalcijev sulfat za boljšo vezavo vzorca na ploščo (Christie, 2003).

Tehnika TLC se uporablja večinoma le za ločevanje majhnih molekul. Stacionarno fazo pri TLC predstavlja tanek sloj nosilca, ki je enakomerno nanešen na podlago. Na površino nosilca nanesemo vzorec in ga posušimo. Mobilna faza je sestavljena iz bolj ali manj polarnih organskih topil in vode, ki potujejo po plošči. Parcialni tlak topila mora biti v vsej komori enakomeren, ker le tako omogočimo pravilno potovanje mobilne faze (Anderluh in sod., 2009).

Uporabili smo suh material, ki smo ga dobili pri izolaciji lipidov iz tobaka (glej poglavje 3.2.1). Pripravili smo ploščo TLC velikosti 20x20 cm, pri kateri je nosilec snovi silikagel. Od spodnjega roba plošče smo odmerili 1,5 cm, kjer smo nanašali vzorce. Uporabili smo topilo 1 (glej poglavje 3.1.3). Steklene pipete, s katerimi smo nanašali vzorce smo spirali z mešanico kloroforma in metanola v razmerju 2:1 z dodanim BHT. 60 mg suhega materiala smo raztopili v 100 µL kloroforma in metanola (2 : 1) z BHT. Na TLC ploščo smo nanesli poznane lipide in naše vzorce v različnih količinah (3 µL, 6µL, 12 µL), da smo jih lahko primerjali z znanimi lipidi. Vzorce smo vedno nanašali po 3 µL in počakali da se pred naslednjim nanosom posušijo. V komoro za razvijanje TLC smo nalili 100 mL topila, ki smo ga premešali in jo zaprli ter počakali 15 minut, da se je v njej vzpostavil enakomeren parcialni tlak topila. Ploščo z nanešenimi vzorci smo pokonci postavili v topilo tako, da so bili vzorci nanosa nad gladino topila. Počakali smo, da je topilo priprovalo skoraj do vrha plošče, ploščo vzeli ven iz komore ter jo posušili v digestoriju. Medtem smo pripravili primulin v koncentraciji 5 mg/100 mL mešanice acetona in destilirane vode. Volumen acetona in volumen destilirane vode je bil v razmerju 8 : 2. Z njim smo napršili ploščo in jo pogledali pod UV svetlobo. Naprava za slikanje pod UV svetlobo je bila povezana z računalnikom. Preko monitorja smo videli lise lipidov. Nato smo plošče napršili še z 20 % raztopino amonijevega sulfata. Ko se je plošča posušila, smo jo dali v sterilizator za 20 minut na 180 °C. Lise lipidov so bile vidne s prostim očesom.

### **3.2.3 Dvodimensionalne tankoplastna kromatografija**

Kompleksne lipidne mešanice se ne morejo dobro ločiti s TLC v eni dimenziji. Kvaliteta ločitve je boljša, če ploščo razvijamo še v drugi dimenziji (dvodimensionalna TLC) (Slika 7). Pri tej metodi se vzorec nanese kot majhna točka v levem spodnjem kotu malo odmaknjena od obeh kotov. Ploščo razvijamo normalno v izbranem sistemu topil. Ko pride topilo skoraj do vrha, vzamemo ploščo iz kromatografske komore in jo posušimo v digestoriju. Ko je v komori vzpostavljen parcialni tlak drugega sistema topil, ploščo obrnemo za 90° v nasprotni smeri urinega kazalca in jo razvijamo še v tej smeri v drugem sistemu topil (Christie, 2003).



**Slika 7: Shematska predstavitev dvodimenzionalne TLC.** Ločitev kompleksnih lipidov iz rastlinskega tkiva. PI, fosfatidilinozitol; PS, fosfatidilserin; PC, fosfatidilholin; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamin; DPG, difosfatidilglicerol; SQDG, sulfokinovosildiacilglicerol; DGDG, digalaktozildiacilglicerol; MGDG, monogalaktozildiacilglicerol (Christie, 2003).

Zaradi velikih količin različnih lipidov, se ti niso dobro ločili med seboj, zato smo izvedli dvodimenzionalno TLC. Ploščo velikosti 20x20 cm smo pripravili tako, da smo označili spodnji in levi rob 1,5 cm od konca plošče. V spodnji levi kot, kjer sta se črti križali, smo tako kot pri enodimenzionalni TLC nanesli 10 µL vzorca (3x3,3 µL). V komoro smo nalili topilo 2 (glej poglavje 3.1.3), ga premešali in počakali 15 minut, da se je vzpostavil parcialni tlak topila. Ploščo z nanešenim vzorcem iz tobaka smo dali v komoro in počakali, da je topilo priprovalo skoraj do vrha, kar je trajalo dve uri. Ploščo smo vzeli ven in jo posušili v digestoriju, nato pa ločevanje ponovili še s topilom 3 (glej poglavje 3.1.3), pri čemer smo ploščo obrnili za 90° v nasprotno smer urinega kazalca in jo dali v komoro. Topilo je potovalo dve uri. Lipide smo si pogledali enako kot pri enodimenzionalni TLC. Postopek smo ponovili s ploščo velikosti 10x10 cm. Količina topila, ki je bila v komori, pa je bila 50 mL, saj so bile plošče manjše. Zaradi manjših dimenzij je topilo potrebovalo le 35-40 min, da je priprovalo do vrha.

### 3.2.4 Adsorpcijska kromatografija

Pri adsorpcijski kromatografiji nam kot adsorbent služi nosilec, ki ima na svoje površje vezane različno nabite skupine oziroma bolj ali manj polarne radikale. Stacionarna faza je trdna, mobilna pa tekoča. Metodo izvajamo v kolonski tehniki. Navadno začnemo kolono spirati z najbolj nepolarnim topilom, nadaljujemo pa z vedno bolj polarnimi topili, kar imenujemo eluotropna vrsta (Anderluh in sod., 2009).

V našem vzorcu iz tobaka je bilo veliko različnih in kompleksnih lipidov, zato smo jih želeli ločiti na frakcije, da bi bili bolje vidni na ploščah in bi jih lažje identificirali. Poslužili smo se metode adsorpcijske kromatografije oziroma ločitve s trdo fazo (SPE, ang. solid phase extraction). Uporabili smo SPE kolono, ki omogoča ločevanje raztopljenih snovi glede na njihove kemijske značilnosti. Raztopljeni lipidi se vežejo na stacionarno (trdo) fazo v koloni, od koder jih nato ločujemo glede na njihovo polarnost s spiranjem z različno polarnimi topili (mobilna faza). SPE kolono smo najprej ekvilibrirali s 100 mL kloroformom, nato pa dodali 1 g vzorca, zmešanega v 8 mL mešanice kloroform in metanola (2:1) z BHT. Ko se je vzorec posedel, smo kolono počasi sprali s 100 mL kloroform. Kolono smo nato sprali s 150 mL mešanice acetona in metanola v razmerju 9:1, sledilo pa je spiranje s 100 mL metanola. Tri tako dobljene frakcije smo z rotavaporjem sušili na 30 °C in 55 mbar do suhega. Frakcije so se ločile glede na polarnost lipidov, ki so jih vsebovale. Lipide v posamenzi frakciji smo ločili z dvodimensionalno TLC na ploščah velikosti 10x10 cm.

Suhemu materialu prve frakcije, ki smo ga dobili s sušenjem na rotavaporju, smo dodali 5 mL mešanice kloroform in metanola (2 : 1) z BHT. Na TLC ploščo smo nanesli 2 µL vzorca, nadaljevali pa smo s postopkom kot je zgoraj opisan za dvodimensionalno TLC. Ostali vzorec smo prepihal z dušikom, zaprli s parafilmom in shranili v zmrzovalni skrinji pri -20°C.

Ves postopek smo ponovili tudi z drugo in tretjo frakcijo, le da smo na ploščo dali 5 µL vzorca (2x 2,5µL) in naslednjič 12 µL (4x3 µL).

Ker lise niso bile dobro vidne, smo predvidevali, da smo vzorec preveč razredčili. Vzorce smo vzeli iz skrinje, posušili na rotavaporju in tokrat dodali 1 mL mešanice kloroform in metanola (2 : 1) z BHT. Na TLC plošče smo nanesli 12 µL frakcije 2 in 3. Tudi prvo frakcijo (temno zelene barve) smo ponovno skoncentrirali, kar je vzelo precej več časa kot pri drugi in tretji frakciji.

Poleg naših vzorcev smo z dvodimenzionalno TLC razvili tudi čiste znane lipide (glej poglavje 3.1.7), da bi z njihovo pomočjo identificirali lipide iz tobaka. Na 10 x 10 cm ploščo za TLC smo nanesli 50 µg vsakega lipida.

### 3.2.5 Multilamelarni vezikli

Multilamelarni vezikli (MLV) (Slika 8) spadajo med liposome. Liposomi so sferični vezikli, katerih membrane sestavljajo eden (unilamelarni vezikli) ali več (multilamelarni vezikli) lipidnih dvoslojev. MLV so veliki od 100 do 4000 nm. Sestavljajo jih amfifilni lipidi, ki imajo hidrofilno glavo in hidrofobni rep ter so urejeni v več lipidnih dvoslojev (Barel in sod., 2006).



**Slika 8: Multilamelarni vezikel**

Na rotavaporju posušenima frakcijama 2 in 3 smo dodali 0,5 mL 20 mM pufra MES in steklene kloglice, s pomočjo katerih smo na krožnem mešalu odstranili posušene lipide tobaka s stene bučke. Tako dobljeno vsebino bučke smo prelili v krio-stekleničko (fiolo za zamrzovanje) in jo za nekaj sekund potopili v tekoči dušik, da je vsebina zamrznila. Krio-stekleničko smo nato odtalili s toplo vodo in postopek zamrzovanja in taljenja ponovili še petkrat, s čimer smo pripravili MLV.

100 µL vzorca MLV smo uporabili za dvodimenzionalno TLC. Vzorec smo v krio-stekleničko zmešali z 200 µL mešanice kloroform in metanola (2 : 1) z BHT, da sta nastali dve fazi. Počakali smo, da se je raztopina posušila, pri čemer smo si pomagala s preprihovanjem z dušikom. Dodali smo 20 µL mešanice kloroform in metanola (2 : 1) z BHT, da smo posušeno snov odstranili s sten vialice, in jo nanesli na TLC ploščo velikosti 10x10 cm. TLC smo izvedli kot opisano v poglavju 3.2.3.

### 3.2.6. Fosfolipidni test

Koncentracijo fosfolipidov v MLV smo določili z encimskim testom Wako Pure Chemical Industries po navodilih proizvajalca. Potrebno količino encima smo raztopili v priloženem pufru do koncentracije 5 mg/mL. V jamice mikrotitrne plošče smo dali po 300 µL pripravljene encimske raztopine in 10 µL našega vzorca oz 10 µL priloženega standarda (3 mg/mL v holin kloridu), za kontrolo smo namesto vzorca uporabili destilirano vodo. Mikrotitrno ploščo smo inkubirali 20 minut na 37 °C. Po končani inkubaciji smo izmerili

absorbanco pri 630 nm. Koncentracijo fosfolipidov v vzorcu smo izračunali po naslednji enačbi:

$$[\text{konc. vzorca}] = (3 \text{ mg/mL} \times (\text{A}_{\text{vzorca}} - \text{A}_{\text{slepa}})) / (\text{A}_{\text{standard}} - \text{A}_{\text{slepa}}) \quad \dots(1)$$

### **3.2.7 Inkubacija MLV s proteini NLP in centrifugiranje**

MLV narejene iz lipidov posameznih frakcij smo inkubirali z različnimi NLP proteini ( $\text{NLP}_{\text{Pp}}$ ,  $\text{NLP}_{\text{Pcc}}$  in  $\text{NLP}_{\text{Pya}}$ ) in jih eno uro ali preko noči inkubirali pri 25 °C na stresalniku pri 1000 rpm. Po inkubaciji smo vzorce eno uro centrifugirali pri 8 °C in pri 52162 g. Vzorce smo ločili na supernatant, ki smo mu dodali toliko 5-kratnega nanašavnega pufra, da smo dobili enkratno koncentracijo (za 24 µl supernatanta smo dodali 6 µl 5-kratnega nanašavnega pufra) in na usedlino, ki smo ji dodali 16 µl MES pufra in 4 µl 5-kratnega nanašavnega pufra.

### **3.2.8 NaDS gel za elektroforezo**

Za elektroforezo smo v naših poskusih uporabljali 12% NaDS gel, ki smo ga pripravili tako, da smo zamešali 1,8 mL akrilamida, 3,104 mL destilirane vode, 0,75 mL 3 M tris pufra, 40 µl 10% NaDS, 300 µl 1,5% APS in 6 µl Temeda. Za posamezen gel smo uporabili 2 mL pripravljene mešanice in jo ulili med v naprej pripravljena stekelca za izdelavo gelov. Na vrh smo dali destilirano vodo in počakali 45 minut, da se je gel strdil.

Nanašalni gel smo pripravili iz 0,5 mL akrilamida, 2,945 mL destilirane vode, 1,25 mL 0,5 M tris pufra, 50 µl 10% NaDS, 250 µl 1,5% APS in 5 µl Temeda. Na vrh smo položili glavniček z 10 jamicami debeline 1 mm in počakali, da se je gel strdil.

10-kratni NaDS pufer smo pripravili iz 10 g NaDS, 30,3 g trisa, 144 g glicina ter 8 dl destilirane vode. Ko so se snovi ob mešanju z magnetnim mešalom popolnoma raztopile, smo dolili destilirano vodo do enega litra. Za elektroforezo smo uporabili 1x pufer (1 dl 10x pufer smo zmešali z 9 dl destilirane vode).

### 3.2.9 Elektroforeza

Elektroforeza je metoda za ločevanje komponent v določeni zmesi na osnovi naboja v električnem polju, v katerem anioni potujejo na anodo (+), kationi pa na katodo (-). Hitrost potovanja nabitega delca je v glavnem odvisna od električnega polja in elektrostatičnega privlaka nosilca. Nosilci električnega toka, ki teče med elektrodama, so nabite molekule vzorca in ioni, ki sestavljajo pufer, v katerem elektroforeza poteka (Anderluh in sod., 2009).

Elektroforeza nabitih snovi je lahko izvedena v raztopini ali v nekem nosilcu, ki je omočen z ustreznim pufrom. Da bi molekule, ki jih ločimo z elektroforezo videli, jih moramo pobarvati in fiksirati. Za barvanje proteinov se najpogosteje uporablja Coomassie modro barvilo (Anderluh in sod., 2009).

Za elektroforezo smo pripravili NaDS gele in pufer, kot je opisno v poglavju 3.2.8. Vzorce smo razdelili na supernatant in usedlino. V jamice smo nanesli 6 µL proteinskega markerja in 30 µL vzorca supernatanta (24 µL supernatanta in 6 µL 5-kratnega nanašalnega pufra) ter usedlino z 20 µL MES in 5-kratnega nanašalnega pufra (16 µL MES pufra in 4 µL 5-kratnega nanašalnega gela).

Elektroforezo smo 3 min izvajali pri 180 V, nato pa 70 min pri 120 V. Po elektroforezi smo gel 3x spirali z destilirano vodo po 10 min in ga preko noči na stresalniku barvali s Coomassie modrim. Naslednji dan smo gel sprali z destilirano vodo in ga v njej inkubirali še 20 min, preden smo ga poskenirali.

Postopek smo ponovili tudi z drugačnimi razmerji lipidov v MLV in proteinov; 10 : 1 (10 µg lipidov v MLV in 1 µg proteinov), 4 : 1 (10 µg lipidov v MLV in 2,5 µg proteinov), 2 : 1 (5 µg lipidov v MLV in 2,5 µg proteinov), 7 : 1 (18 µg lipidov in 2,5 µg proteinov) in 35:1 (35 µg lipidov in 1 µg proteinov).

Zaradi velike vsebnosti klorofila v frakciji 1 MLV niso nastali. Dodali smo jim mešanico kloroforma in metanola (2:1) z BHT in tretjino vzorca ponovno sušili na rotavaporju (55 mbar za 7 ur). Pripravili smo MLV. Ko smo preverili vsebnost lipidov, je bila ta zelo majhna. Pripravili smo vzorce iz 10 µg lipidov v MLV in 2,5 µg proteinov ter 20 µg lipidov v MLV in 1 µg proteinov. Ko smo vzorce centrifugirali, ni bilo usedline, saj je bilo premalo lipidov v vzorcu in tako nismo mogli preveriti, ali so se lipidi vezali s proteinimi.

Proteine smo poskušali vezati tudi na MLV pripravljene iz mešanice frakcije 2 in 3; 250 µL frakcije 2 v MLV in 20 µL frakcije 3 v MLV ter 250 µL frakcije 2 v MLV in 60 µL frakcije 3 v MLV. Pri prvi kombinaciji je bilo premajhna koncentracija lipidov, zato smo delali z drugo. Naredili smo 2 inkubaciji: 50 µg lipidov v MLV in 2,5 µg proteinov ter 40 µg lipidov v MLV in 5 µg proteinov.

Proteine smo poskušali vezati tudi na večje količine lipidov; 130 µL lipidov v MLV iz frakcije 2 in 2 µg proteina NLP<sub>Pcc</sub> ter 150 µL lipidov v MLV frakcije 3 in 2 µg proteina NLP<sub>Pcc</sub>.

### **3.2.10 Gradientno centrifugiranje celičnega ekstrakta v perkolu**

Ker so nas zanimali le lipidi iz plazemske membrane, klorofil v vzorcu pa je motil naše analize, smo uporabili metodo gradientnega centrifugiranja, s katero smo kloroplaste in ostale plastide odstranili iz celičnega ekstrakta (Kubis, 2008).

Najprej smo zmešali kemikalije za gradient perkola (glej poglavje 3.1.3). Pripravili smo ga s centrifugiranjem s centrifugo Beckman v rotorju SW28 30 minut na 43000 g pri 4 °C. V merilni valj smo natočili 50 mL 2 x CIB in dopolnili do 100 mL destilirane vode. 2 x CIB smo hranili na hladnjem. Vse delo je potekalo z ohlajenimi pufri in na ledu. Liste tobaka smo narezali na manjše koščke, odstranili debelejše žile in jih stehtali. Strli smo jih v terilnici s pomočjo tekočega dušika. Dodali smo CIB, še dodatno trli in vsebino terilnice čez najlonko prefiltrirali v erlenmajerico. Filtrat smo centrifugirali s centrifugo SIGMA 3K30 in velikim rotorjem 15 minut pri 8°C in 1000 g. Usedlino smo resuspendirali v 1 mL supernatanta, preostanek supernatanta pa smo zavrgli. Resuspendirano usedlino smo previdno nanesli na gradient perkola. Centrifugirali smo 12 minut pri 8°C in 7800 g. Filtrat se je razporedil po gradientu, s čimer smo ga lahko ločili na posamezne frakcije.

300 µL vsake dobljene frakcije smo prepahali z dušikom in shranili pri -80°C za nadaljne analize. Preostanku vzorcev posameznih frakcij smo dodali mešanico kloroform in metanola (2 : 1) z BHT in ekstrahirali lipide preko noči. Posebej smo pripravili bučke za rotavapor (10 mL) tako, da smo jih sprali s topili, temeljito posušili in natančno stehtali na analitski tehnicni. Spodnjo fazo vsake frakcije smo razdelili na pol in dali vsako v svojo bučko. Prva polovica je služila za pripravo MLV, druga pa za TLC. Frakcije smo vsaj 4 ure sušili na rotavaporju pri sobni temperaturi pri 50 mbar. Določili smo suho težo dobljenih lipidov in iz njih pripravili MLV, kot je opisano v poglavju 3.2.5 in s

fosfolipidnim testom izmerili koncentracijo lipidov. Dobljene MLV smo inkubirali s proteini NLP, in izvedli elektroforezo NaDS kot je opisano v poglavju 3.2.9.

Z drugo polovico frakcij smo izvedli TLC. Iz frakcij smo ekstrahirali lipide. Dodali smo 300 µL mešanice kloroforma in metanola (2 : 1) z BHT. Vzeli smo spodnjo fazo in jo posušili. Dodali smo 20 µL mešanice kloroforma in metanola (2 : 1) z BHT in vzorec nanesli na TLC ploščo. Shranjene frakcije smo tudi okarakterizirali, pomerili smo koncentracijo proteinov z BCA testom.

### **3.2.11 BCA proteinski test**

BCA proteinski test smo izvedli po navodilih proizvajalca. Delovni reagent smo pripravili z mešanjem BCA reagenta A in BCA reagenta B v razmerju 50:1, in odpipetirali 200 µl mešanice v jamice mikrotitrne plošče. V jamice smo dodali 6 µl posameznih vzorcev, kot kontrolo pa smo uporabili 6 µl destilirane vode. Ploščo smo pretresli na stresalniku za 30 s in inkubirali na 37 °C za 30 min. Ko se je plošča ohladila na sobno temperaturo, smo pomerili absorbanco pri 562 nm in iz albuminske umeritvene krivulje odčitali koncentracijo proteinov v vzorcih.

### **3.2.12 Točkovni odtisi**

12 frakcij lipidov smo posušili s prepihovanjem z dušikom in dodali 20 µl mešanice kloroforma in metanola (2 : 1) z BHT. Na dve TLC plošči smo nanesli 2 x 3 µl lipidov iz vsake frakcije. Prvo ploščo smo uporabili za TLC v eni dimenziji, drugo po za točkovni odtis.

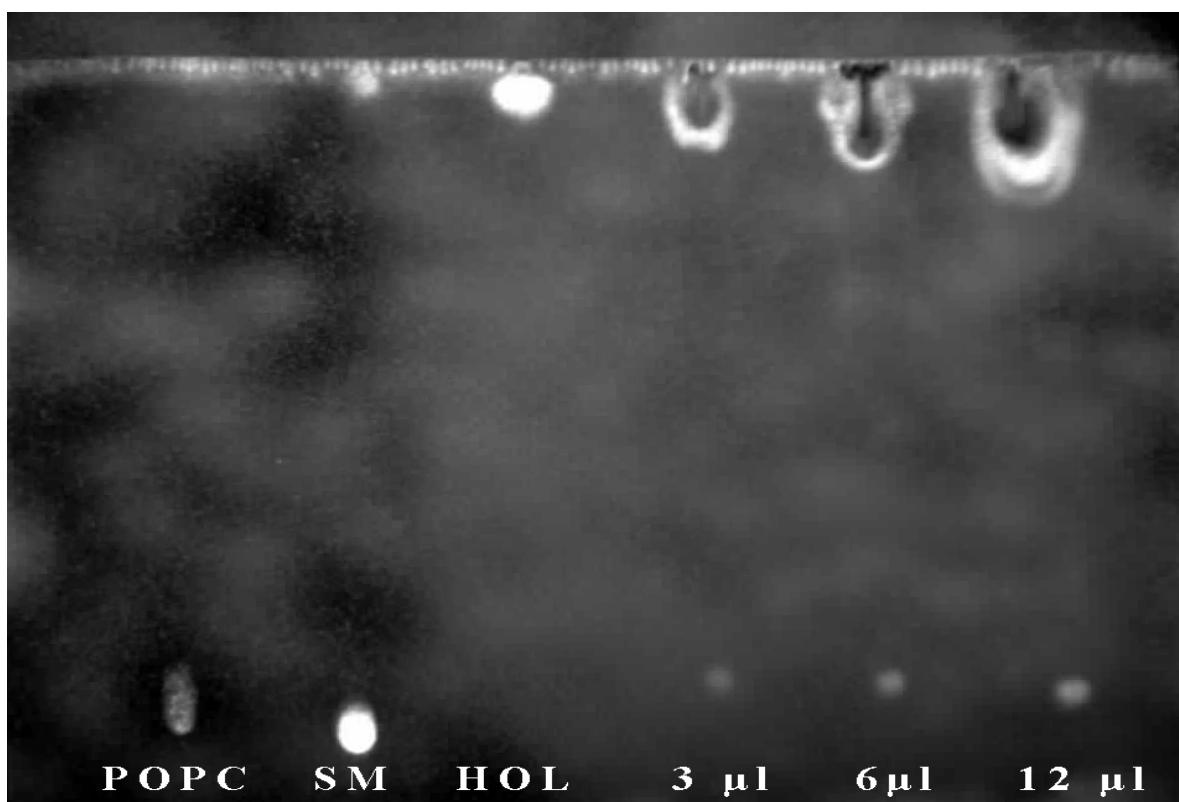
Na nanešene vzorce frakcij na drugi TLC plošči smo nanesli 5 x 2 µl proteina NLP<sub>Pcc</sub> s koncentracijo 0,1 mg/mL, protein pa smo za negativno kontrolo nanesli tudi na prazno mesto na plošči. Ko se je plošča posušila, smo jo čez noč stresali v 0,1 % BSA v TBS pri 4 °C, nakar smo jo sprali 3 x 10 min s TBS pufrom pri 4 °C in inkubirali s protitelesi. Uporabili smo 10 µl primarnih protiteles proti NLP proteinom in jih 2 uri inkubirali s ploščo na stresalniku v 0,1% BSA v TBS pufru. Po inkubaciji smo ploščo spirali 3 x 10 min na stresalniku, preden smo jo za 2 uri inkubirali na stresalniku s 10 µl sekundarnih protiteles v 0,1% BSA v TBS pufru. Po inkubaciji smo ploščo sprali 3 x 10 min na stresalniku. Vse inkubacije so potekale pri sobni temperaturi. Ploščo smo razvijali v 150 µl peroksidaznega substrata, dokler se ni obarvala. Reakcijo smo ustavili tako, da smo membrano prenesli v destilirano vodo.

## 4 REZULTATI

### 4.1 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA LIPIDOV IZ TOBAKA

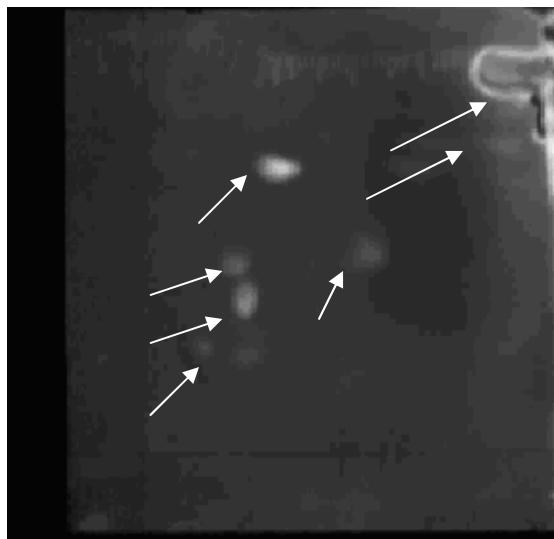
V naši raziskavi smo žeeli preveriti hipotezo, da se proteini NLP ( $NLP_{Pp}$ ,  $NLP_{Pcc}$  in  $NLP_{PyA}$ ) specifično vežejo na lipide iz listov tobaka (*Nicotiana tabacum*). Da bi to lahko naredili, smo najprej izolirali lipide iz homogeniziranih listov tobaka z ekstrakcijo z metanolom in kloroformom. Tako dobljene celokupne lipide smo ločili z eno- (Slika 9) in dvodimenzionalno (Slika 10) tankoplastno kromatografijo (TLC).

Za enodimenzionalno TLC smo nanesli različne količine našega ekstrakta (3, 6 in 12  $\mu$ L) in tri standarde za kontrolo (POPC, SM in holesterol). Kontrolni lipidi so se odzvali kot pričakovano (dobili smo posamezne lepo ločene lise), medtem ko se naši vzorci niso lepo ločili na posamezne lise. Dobili smo manjšo liso na dnu plošče, kjer se nahajajo bolj polarni lipidi, na vrhu plošče pa smo dobili veliko liso mešanice manj polarnih lipidov. Velikost lise je premo sorazmerna z nanešeno količino vzorca.

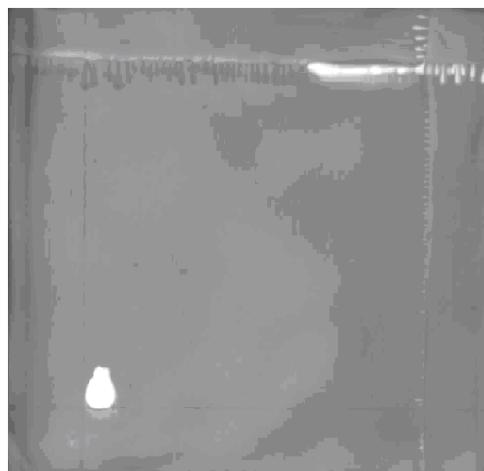


Slika 9: Enodimenzionalna tankoplastna kromatografija vseh izoliranih lipidov, vizualizirana pod UV svetlobo. Od leve proti desni si sledijo: POPC (50  $\mu$ g, ), SM (50  $\mu$ g, ), holesterol (50  $\mu$ g, ), 3  $\mu$ L, 6 $\mu$ L, 12  $\mu$ L našega ekstrakta lipidov iz tobaka. HOL= holesterol.

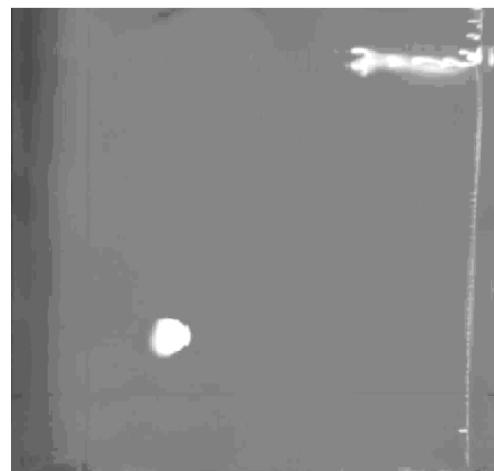
Pri enodimenzionalni TLC se lipidi niso dobro ločili, zato smo naredili dvodimenzionalno TLC (Slika 10). Tokrat so se lipidi ločili na 7 posameznih lis, ki smo jih primerjali s kontrolnimi lipidi. Uporabili smo sledeče lipide: gangliožid (Slika 11), POPS (Slika 12), sfingomielin (Slika 13), fosfoetanolamin (Slika 14), POPC (Slika 15), POPG (Slika 16), galaktoziceramid (Slika 17), glukozilceramid (Slika 18), stigmasterol (Slika 19), holesterol (Slika 20),  $\beta$ -sitosterol (Slika 21) in ergosterol (Slika 22).



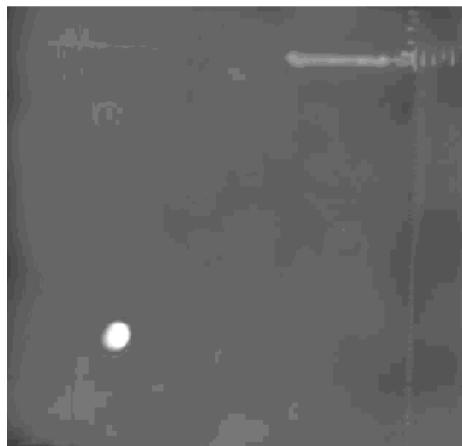
Slika 10: Dvodimenzionalna tankoplastna kromatografija celokupnega ekstrakta lipidov iz tobaka (*Nicotiana tabacum*), vizualizirano pod UV svetlobo.



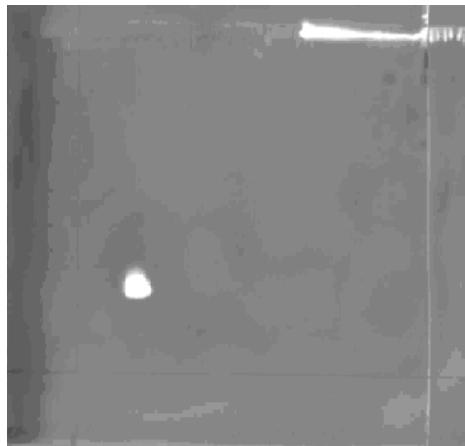
Slika 11: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida gangliožida (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.



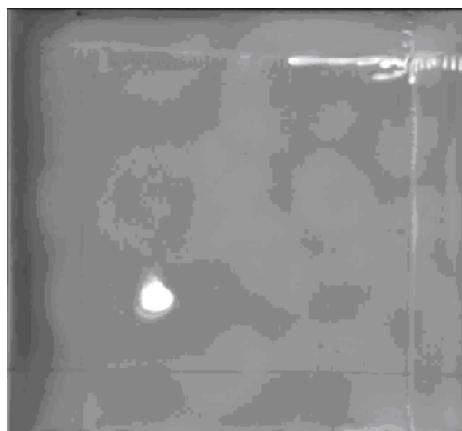
Slika 12: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida POPS (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.



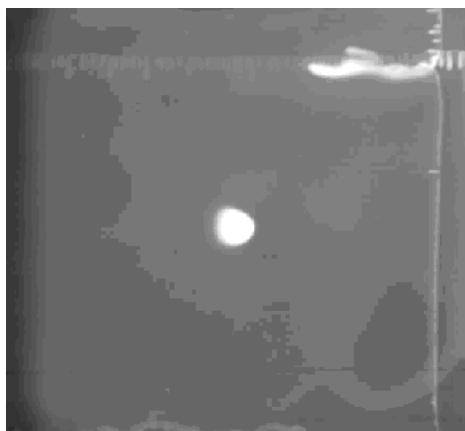
Slika 13: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida sfingomielina (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.



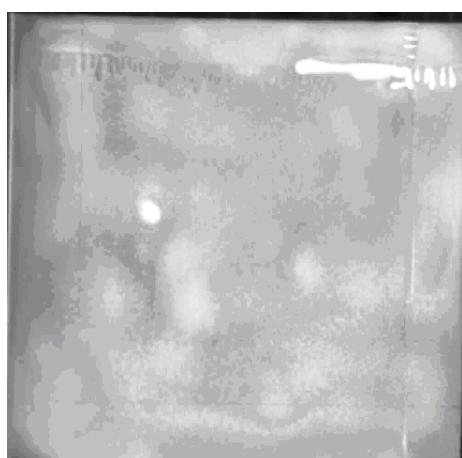
Slika 14: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida fosfoetanolamina (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.



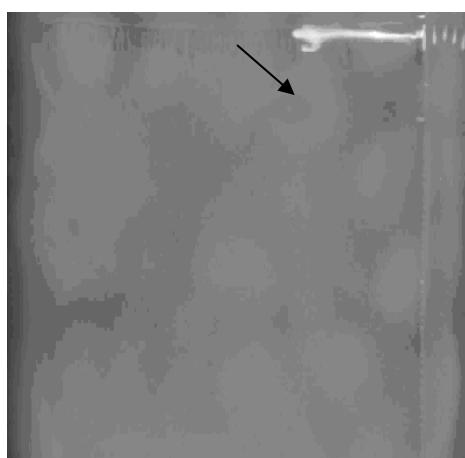
Slika 15: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida POPC (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.



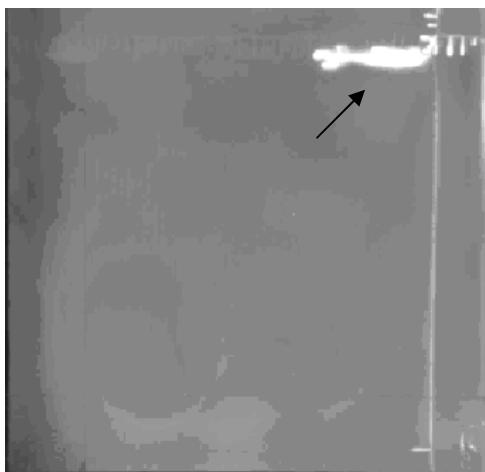
Slika 16: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida POPG (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.



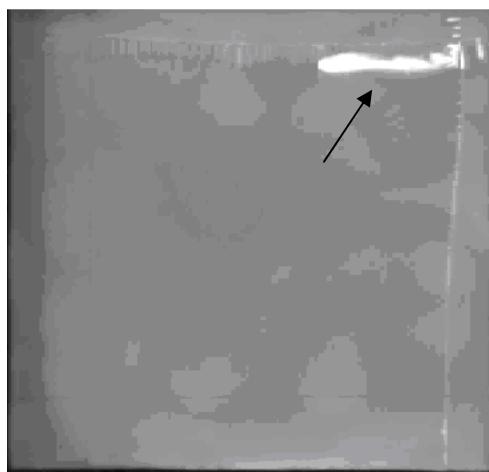
Slika 17: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida galaktozilceramida (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.



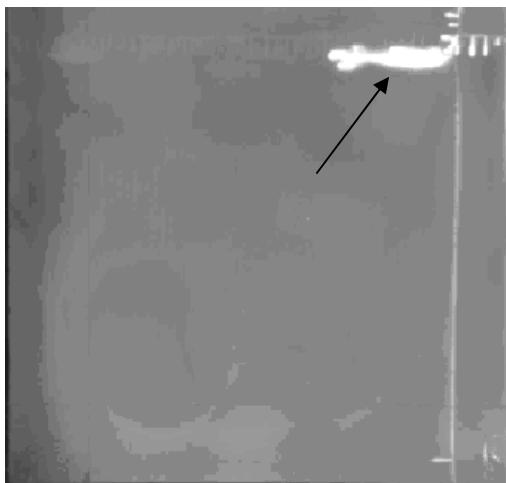
Slika 18: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida glukozilceramida (50 µg), vizualizirano pod UV svetlobo.



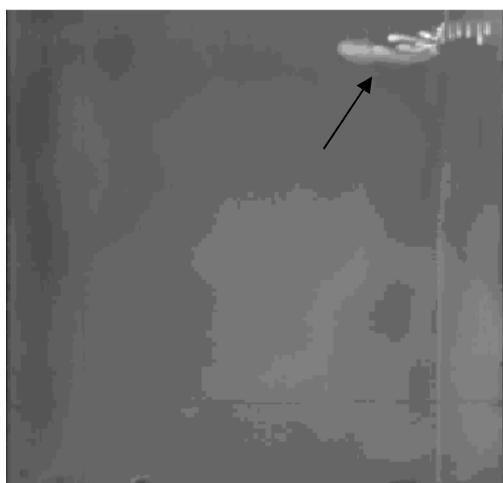
Slika 19: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida stigmasterola (50 µg), vizualizirano pod UV svetlogo.



Slika 20: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida holesterola (50 µg), vizualizirano pod UV svetlogo.

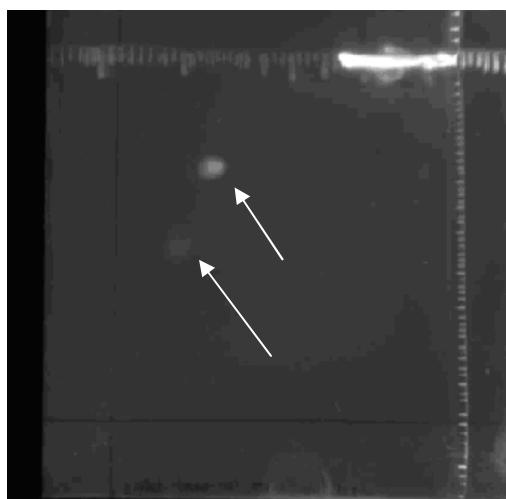


Slika 21: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida  $\beta$ -sitosterola (50 µg), vizualizirano pod UV svetlogo.

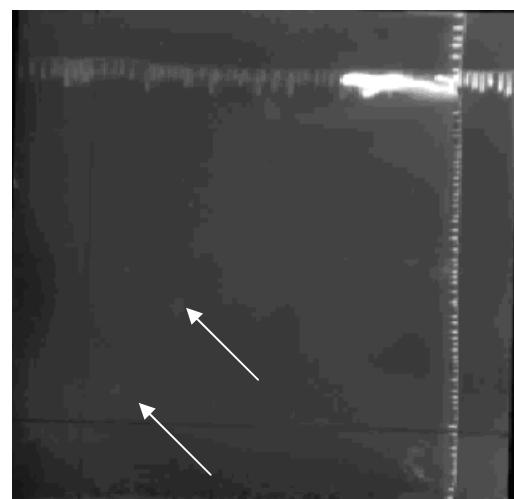


Slika 22: Dvodimenzionalna TLC kontrolnega lipida ergosterola (50 µg), vizualizirano pod UV svetlogo.

Ekstrakt vseh lipidov iz tobaka smo zaradi boljše ločljivosti ločili na tri frakcije z metodo adsorpcijske kromatografije, ki je lipide ločila na osnovi polarnosti. V prvi frakciji so bili najmanj polarni lipidi, v tretji pa najbolj. Na TLC plošče smo nanesli posamezne frakcije iz tobaka, ki smo jih dobili z adsorpcijsko kromatografijo; frakciji 2 (Slika 24) in 3 (Slika 25) sta se lepo ločili. Lise lipidov smo primerjali s kontrolnimi lipidi, da bi jih identificirali (Slika 27). Frakcija 1 se ni ločila na posamezne frakcije (rezultati niso prikazani), predvidevamo da zaradi velike vsebnosti klorofilov, ki so tudi motili izdelavo MLV v nadaljnih poskusih. Do vezave proteinov NLP na lipide iz 2. in 3. frakcije ni prišlo, zato lahko sklepamo, da je lipid, na katerega bi se vezal protein NLP v frakciji 1.

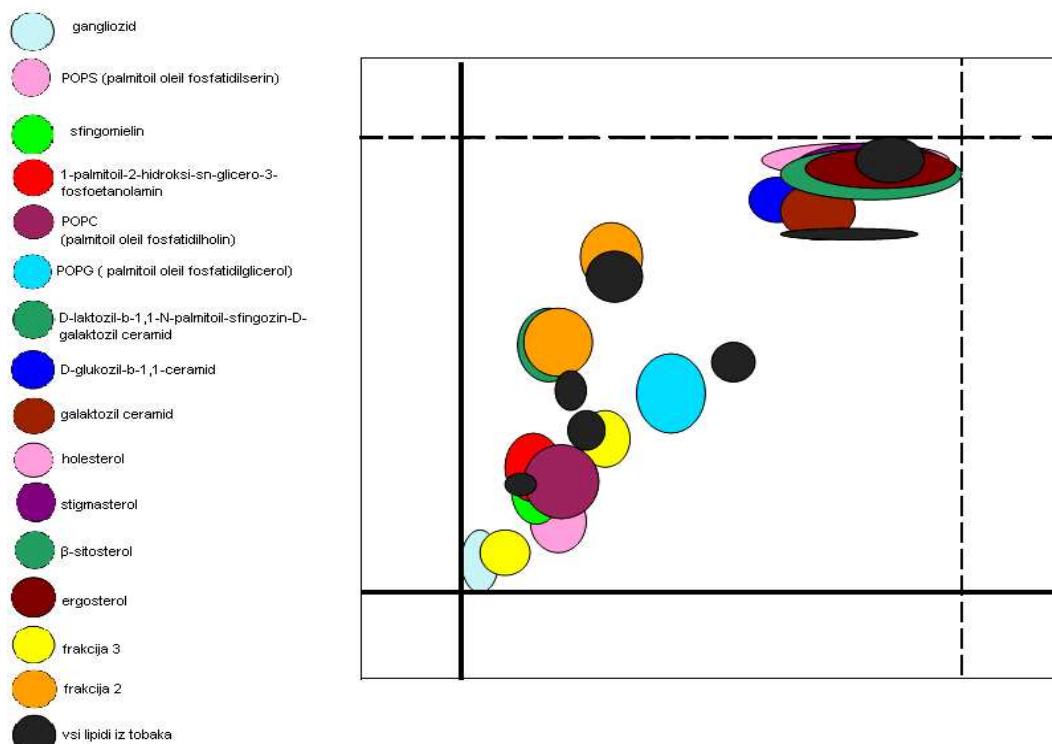


Slika 23: Dvodimenzionalna TLC frakcije 2, vizualizirano pod UV svetlobo.



Slika 24: Dvodimenzionalna TLC frakcije 3, vizualizirano pod UV svetlobo.

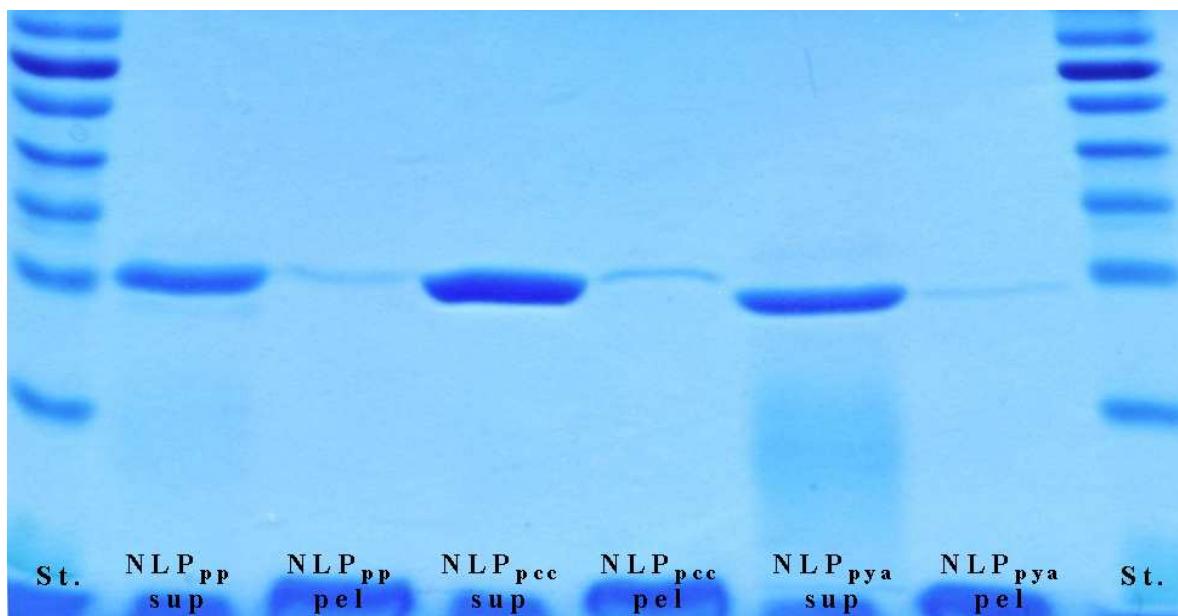
Kontrolne lipide, lipide iz tobaka ter posamezne frakcije smo vrisali v shemo (Slika 25), da bi jih primerjali in s tem identificirali lipide, ki so se ločili na lise. Na podlagi primerjave smo ugotovili skupine lipidov, ki so prisotne v tobakovi celični membrani: fosfolipidi, sfingolipidi, glikoziglyceridi in steroli. Za identifikacijo vseh lipidov nismo imeli dovolj različnih kontrolnih lipidov, saj se nekatere lise lipidov iz tobaka ne prekrivajo z nobenim kontrolnim lipidom. Lisa iz frakcije 1 bi prekrivala večino sterolov.



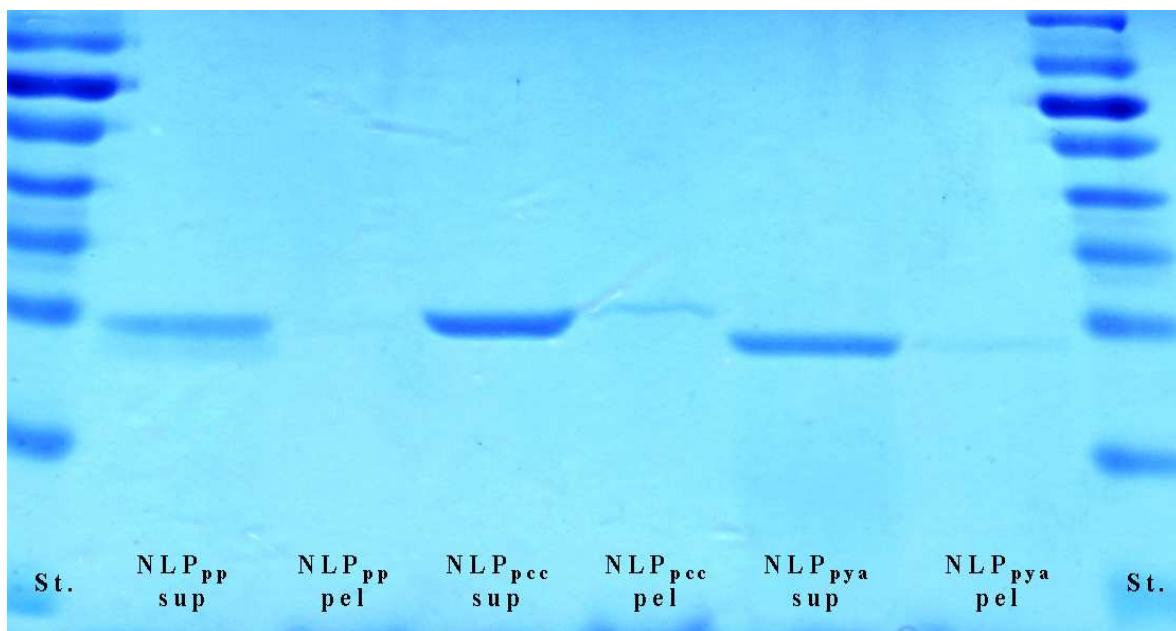
Slika 25: Shematski prikaz prekrivanja lipidov. Lise predstavljajo pozicijo lipidov na ploščah TLC.

#### 4.2 VEZAVA PROTEINOV NLP NA LIPIDE IZ TOBAKA

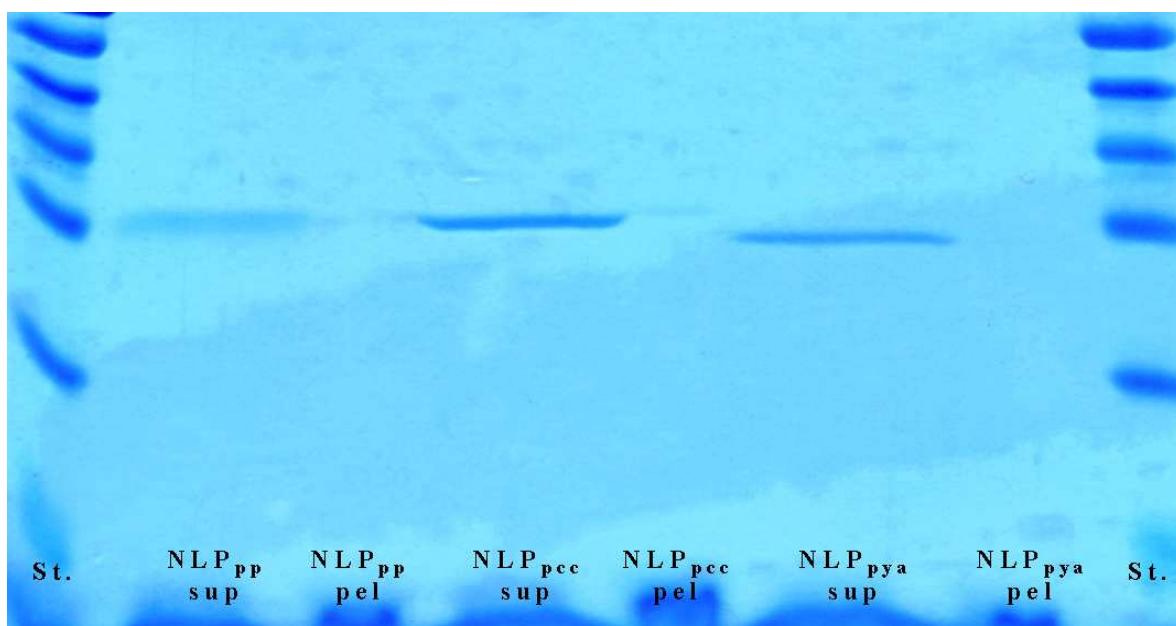
Iz tobakovih lipidov oziroma posameznih frakcij smo naredili multilamelarne vezikle. Vezikle smo inkubirali s tremi različnimi proteini NLP;  $NLP_{pp}$ ,  $NLP_{pcc}$ ,  $NLP_{pya}$ . Lipide in proteine smo mešali v različnih razmerjih: 20  $\mu\text{L}$  MLV frakcije 2 in 5  $\mu\text{g}$  posameznega proteina NLP (Slika 26), 20  $\mu\text{L}$  MLV frakcije 2 in 2,5  $\mu\text{g}$  posameznega proteina NLP (Slika 27), 40  $\mu\text{L}$  MLV frakcije 2 in 1  $\mu\text{g}$  posameznega proteina NLP (Slika 28), 40  $\mu\text{L}$  MLV frakcije 2 in 2,5  $\mu\text{g}$  posameznega proteina NLP (Slika 29), 20  $\mu\text{L}$  MLV frakcije 2 in 5  $\mu\text{g}$  posameznega proteina NLP (Slika 30), 20  $\mu\text{L}$  MLV frakcije 3 in 2,5  $\mu\text{g}$  posameznega proteina NLP (Slika 32), 130  $\mu\text{L}$  MLV frakcije 2 in 150  $\mu\text{L}$  MLV frakcije 3 s proteinom  $NLP_{pcc}$  (Slika 33), lipidi v MLV iz 2. in 3. frakcije (50  $\mu\text{L}$ ) in 2,5  $\mu\text{g}$  posameznega proteina NLP (Slika 34), frakcije C, Č, D (po 100  $\mu\text{L}$  MLV) in 5  $\mu\text{g}$  proteina  $NLP_{pcc}$ , (Slika 35), frakcije E, F (po 100  $\mu\text{L}$  MLV) in 5  $\mu\text{g}$  proteina  $NLP_{pcc}$  (Slika 36), frakcije A, B, G (po 100  $\mu\text{L}$  MLV) in 5  $\mu\text{g}$  proteina  $NLP_{pcc}$  (Slika 37). Mešanice smo centrifugirali, da smo dobili supernatant in usedlino vsakega vzorca, ki smo ju nanesli na NaDS gel, da bi preverili, ali so se proteini NLP vezali na lipide. Lipidi so bili v usedlini. Če so se proteini NLP vezali na lipide, smo jih opazili skupaj z lipidi v usedlini, če pa do vezave ni prišlo, so bili proteini v supernatantu. Proteine smo obarvali s Coomassie modrim.



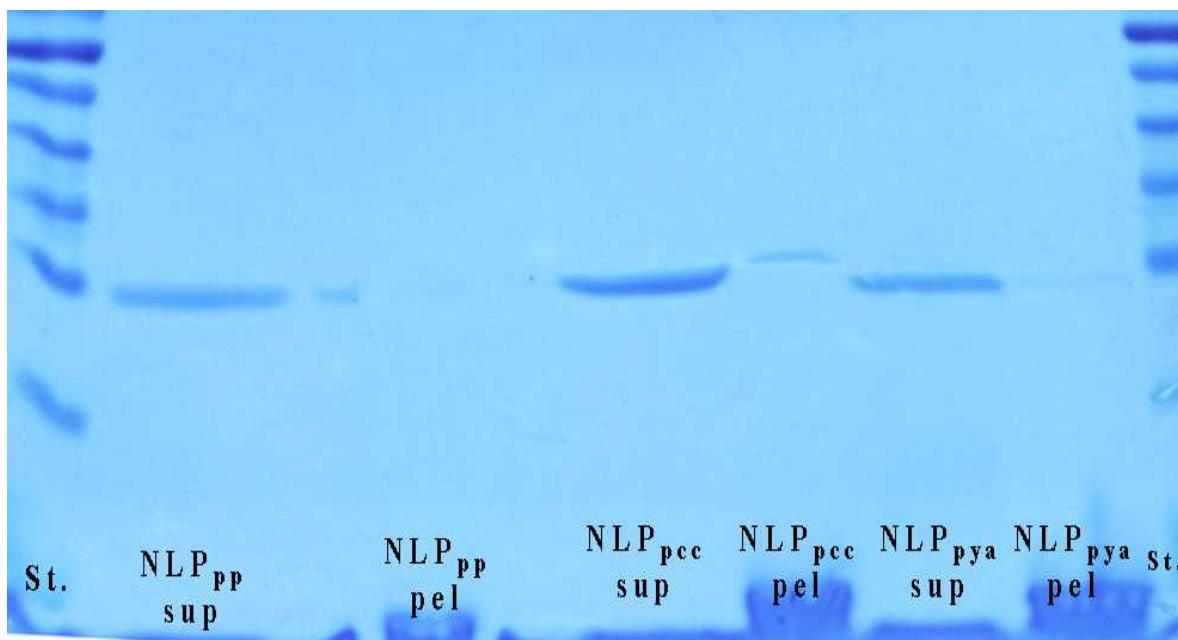
**Slika 26:** Elektroforeza 20  $\mu\text{l}$  MLV narejenih iz frakcije 2, ki smo jo izolirali iz tobaka, inkubiranih s 5  $\mu\text{g}$  posameznega proteina NLP ( $NLP_{pp}$ ,  $NLP_{pcc}$ ,  $NLP_{pya}$ ) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV. Razmerje protein : fosfolipid = 1 : 1. Inkubacija je potekala eno uro pri 25° C. Centrifugiranje je trajalo 1 uro pri 52162 g in 8° C. st.= standard, sup=supernatant, pel=usedlina. Proteine smo obarvali s Coomassie modrim.



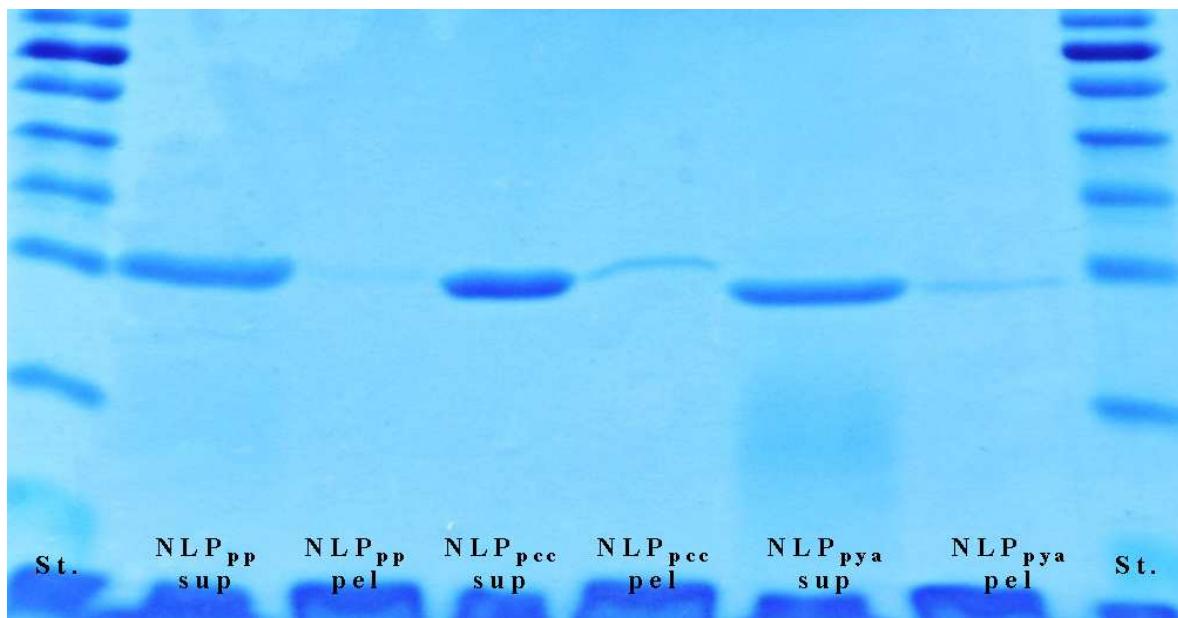
**Slika 27:** Elektroforeza 20 µl MLV narejenih iz frakcije 2, ki smo jo izolirali iz tobaka, inkubiranih z 2,5 µg posameznega proteina NLP (NLP<sub>Pp</sub>, NLP<sub>Pcc</sub>, NLP<sub>Pya</sub>) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV. Razmerje protein : fosfolipid = 1 : 2. Inkubacija je potekala eno uro pri 25° C. Centrifugiranje je trajalo 1 uro pri 52162 g in 8° C. st.= standard, sup=supernatant, pel=usedlina. Proteine smo obarvali s Coomassie modrim.



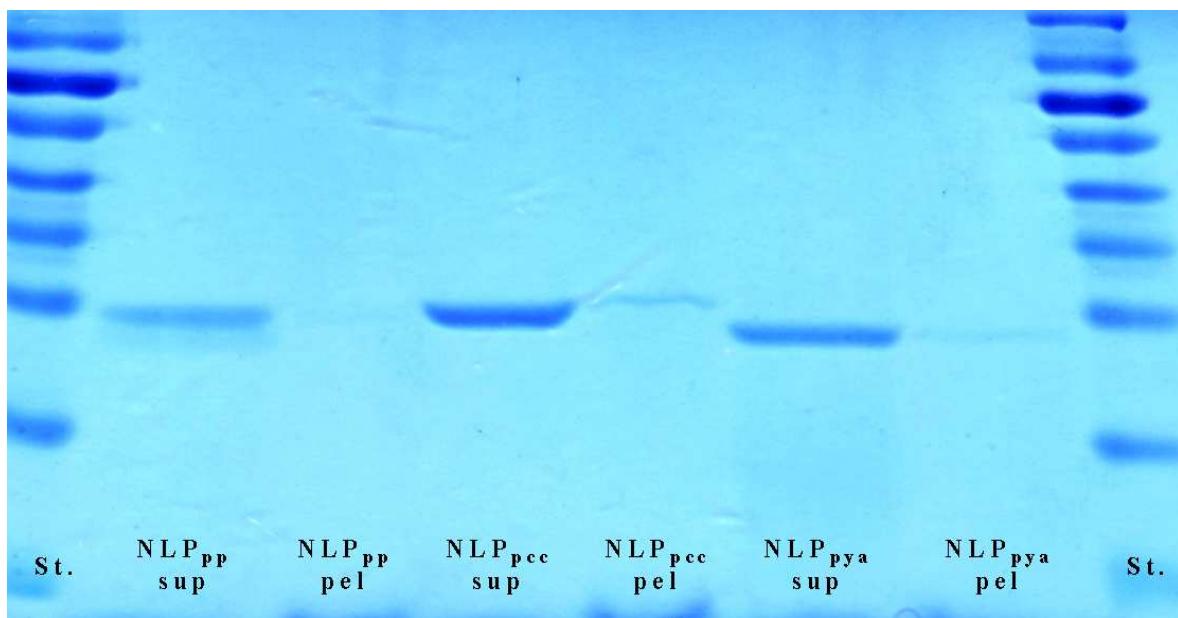
**Slika 28:** Elektroforeza 40 µl MLV narejenih iz frakcije 2, ki smo jo izolirali iz tobaka, inkubiranih z 1 µg posameznega proteina NLP (NLP<sub>Pp</sub>, NLP<sub>Pcc</sub>, NLP<sub>Pya</sub>) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV. Razmerje protein : fosfolipid = 1 : 10. Inkubacija je potekala eno uro pri 25° C. Centrifugiranje je trajalo 1 uro pri 52162 g in 8° C. st.= standard, sup=supernatant, pel=usedlina. Proteine smo obarvali s Coomassie modrim.



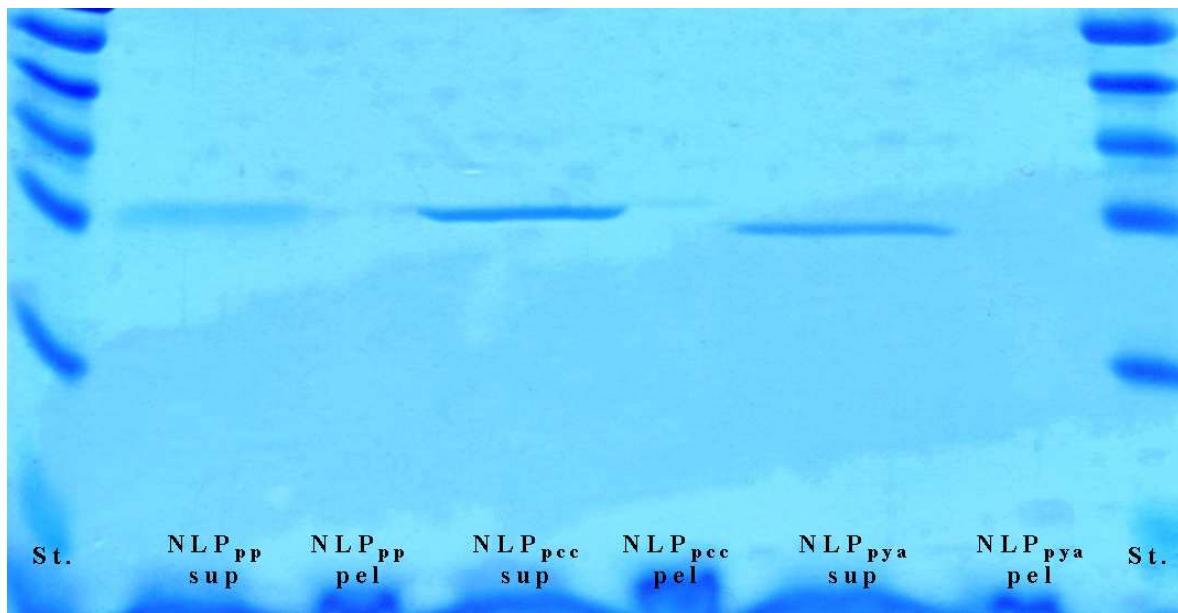
**Slika 29:** Elektroforeza 40 µl MLV narejenih iz frakcije 2, ki smo jo izolirali iz tobaka, inkubiranih z 2,5 µg posameznega proteina NLP (NLP<sub>pp</sub>, NLP<sub>pcc</sub>, NLP<sub>pya</sub>) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV. Razmerje protein : fosfolipid = 1 : 4. Inkubacija je potekala eno uro pri 25° C. Centrifugiranje je trajalo 1 uro pri 52162 g in 8° C. st.= standard, sup=supernatant, pel=usedlina. Proteine smo obarvali s Coomassie modrim.



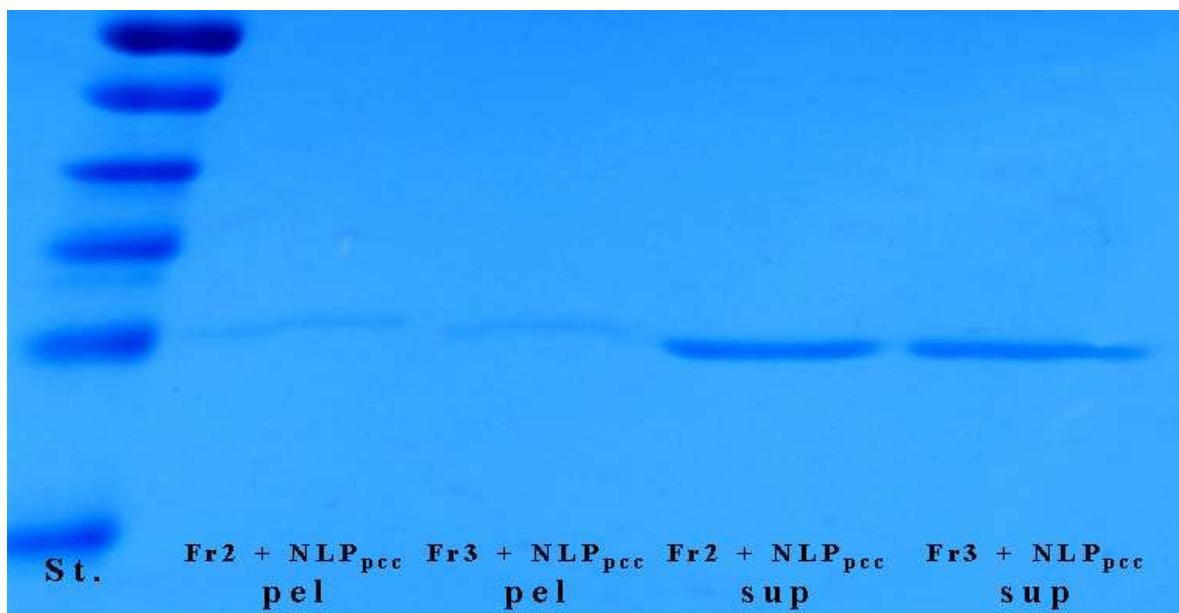
**Slika 30:** Elektroforeza 20 µl MLV narejenih iz frakcije 2, ki smo jo izolirali iz tobaka, inkubiranih s 5 µg posameznega proteina NLP (NLP<sub>pp</sub>, NLP<sub>pcc</sub>, NLP<sub>pya</sub>) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV. Razmerje protein : fosfolipid = 1 : 1. Inkubacija je potekala preko noči pri 25° C. Centrifugiranje je trajalo 1 uro pri 52162 g in 8° C. st.= standard, sup=supernatant, pel=usedlina. Proteine smo obarvali s Coomassie modrim.



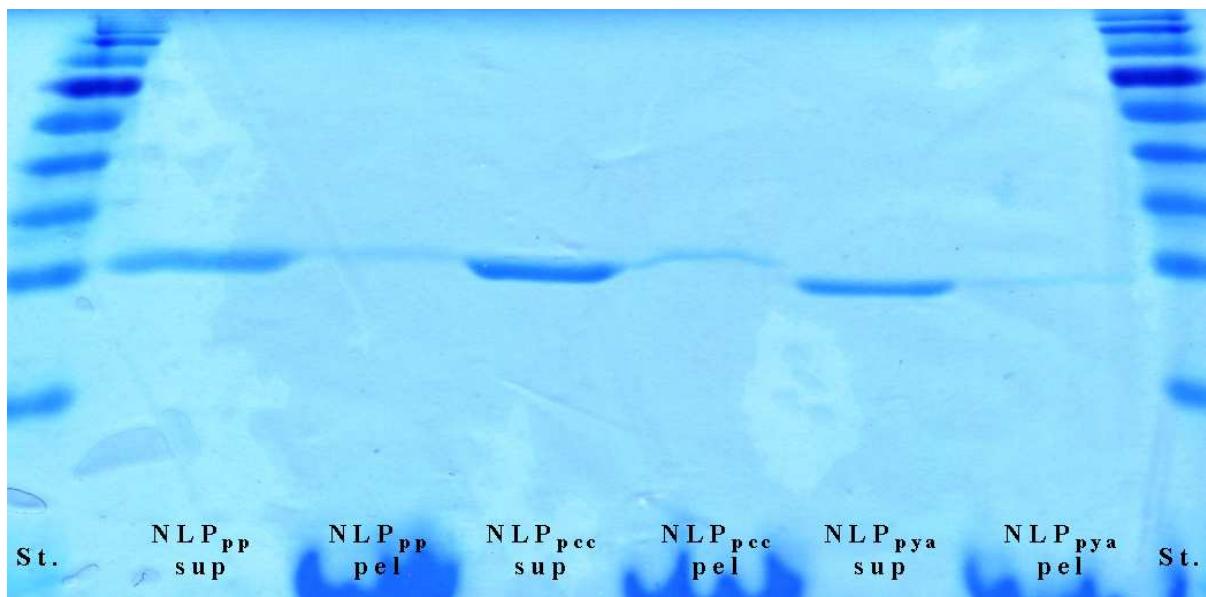
**Slika 31:** Elektroforeza 20 µl MLV narejenih iz frakcije 3, ki smo jo izolirali iz tobaka, inkubiranih z 2,5 µg posameznega proteina NLP (NLP<sub>pp</sub>, NLP<sub>pc</sub>c, NLP<sub>pya</sub>) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV. Razmerje protein : fosfolipid = 1 : 7. Inkubacija je potekala eno uro pri 25° C. Centrifugiranje je trajalo 1 uro pri 52162 g in 8° C. st.= standard, sup=supernatant, pel=usedlina. Proteine smo obarvali s Coomassie modrim.



**Slika 32:** Elektroforeza 40 µl MLV narejenih iz frakcije 3, ki smo jo izolirali iz tobaka, inkubiranih z 1 µg posameznega proteina NLP (NLP<sub>pp</sub>, NLP<sub>pc</sub>c, NLP<sub>pya</sub>) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV. Razmerje protein : fosfolipid = 1 : 35. Inkubacija je potekala eno uro pri 25° C. Centrifugiranje je trajalo 1 uro pri 52162 g in 8° C. st.= standard, sup=supernatant, pel=usedlina. Proteine smo obarvali s Coomassie modrim.

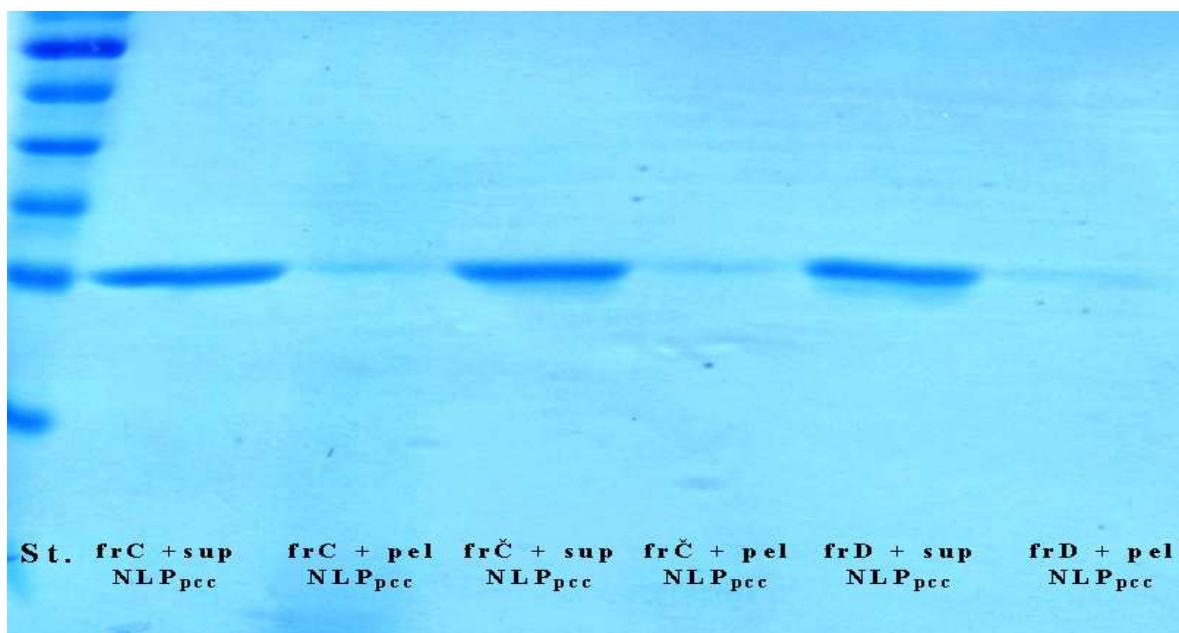


**Slika 33:** Elektroforeza 130 µl MLV narejenih iz frakcije 2 in 150 µl MLV narejenih iz frakcije 3 (v frakcijah so bili izolirani lipidi iz tobaka) inkubiranih s 5 µg posameznega proteina NLP (NLP<sub>Pp</sub>, NLP<sub>Pcc</sub>, NLP<sub>Pya</sub>) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV. Razmerje protein : fosfolipid (iz frakcije 2) = 1 : 7. Razmerje protein : fosfolipid (iz frakcije 3) = 1:27. Inkubacija je potekala eno uro pri 25° C. Centrifugiranje je trajalo 1 uro pri 52162 g in 8° C. st.= standard, sup=supernatant, pel=usedlina, fr=frakcija. Proteine smo obarvali s Coomassie modrim.

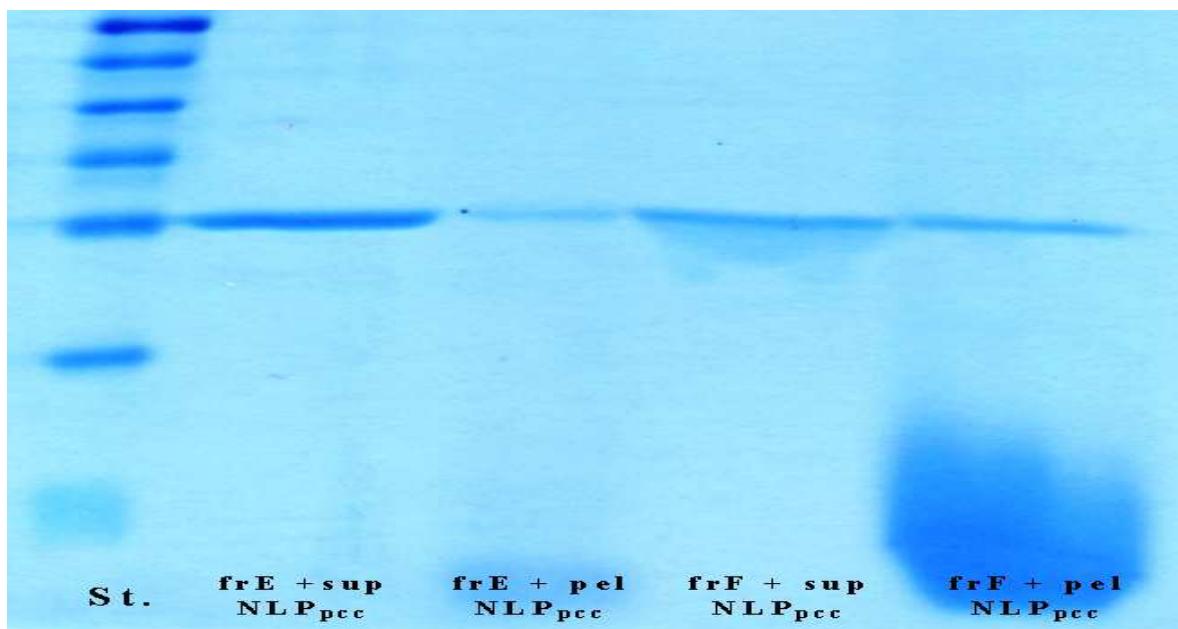


**Slika 34:** Elektroforeza 50 µl MLV narejenih iz frakcije 2 in frakcije 3, ki smo jih izolirali iz tobaka, inkubiranih z 2,5 µg posameznega proteina NLP (NLP<sub>Pp</sub>, NLP<sub>Pcc</sub>, NLP<sub>Pya</sub>) ni pokazala prisotnosti vezave proteinov NLP na lipide v MLV. Razmerje protein : fosfolipid = 1 : 11. Inkubacija je potekala eno uro pri 25° C. Centrifugiranje je trajalo 1 uro pri 52162 g in 8° C. st.= standard, sup=supernatant, pel=usedlina. Proteine smo obarvali s Coomassie modrim.

Lipide iz tobaka smo najprej razdelili na tri frakcije z adsorpcijsko kromatografijo. Do vezave proteinov NLP na lipide v MLV iz 2. in 3. frakcije ni prišlo. Prve frakcije nismo mogli uporabiti, saj iz nje nismo mogli narediti multilamelarnih veziklov. Postopek so najverjetneje motili klorofili. Da bi preverili, ali je lipid, na katerega bi se lahko vezali proteini NLP, v 1. frakciji, smo lipide ponovno ekstrahirali iz tobaka in jih z gradientnim centrifugiranjem razdelili na 8 frakcij (A-G). Iz dobljenih frakcij smo naredili MLV in jih inkubirali s tremi proteini NLP. Rezultati elektroforeze supernatantov in usedlin posameznih frakcij so prikazani na Slikah 35 – 37.

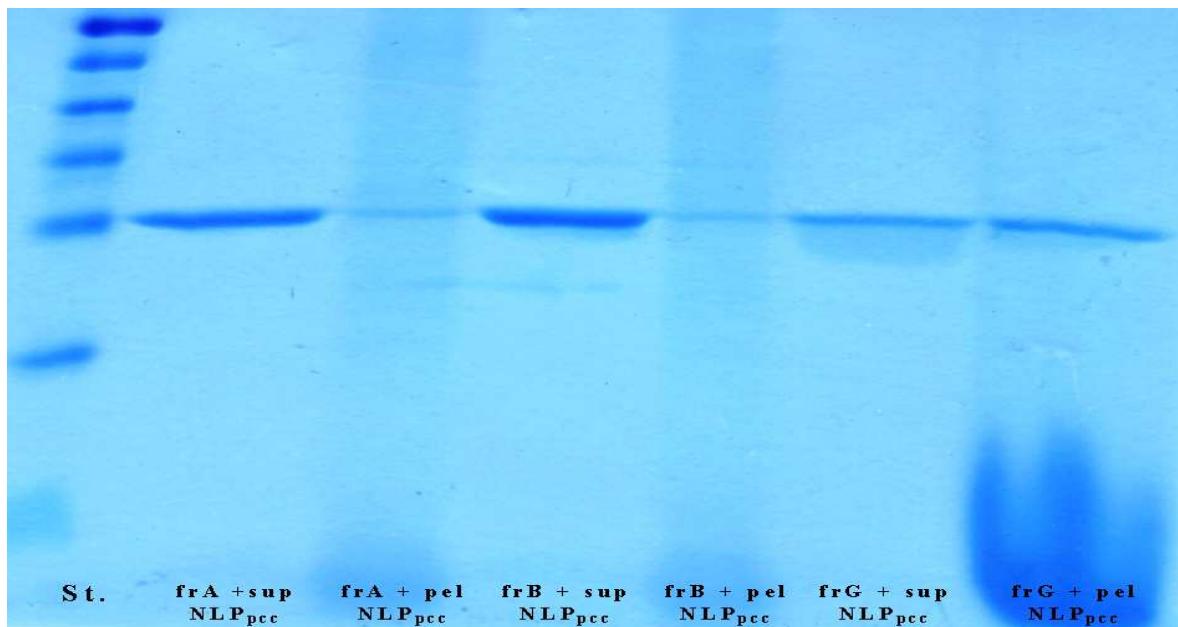


Slika 35: Elektroforeza MLV narejenih iz frakcij C, Č in D (izoliranih iz tobaka) po 100 µl inkubiranih s 5 µg proteina NLP<sub>pcc</sub> ni pokazala prisotnosti vezave proteina NLP<sub>pcc</sub> na lipide v MLV. Razmerje protein : fosfolipid (iz frakcije C) = 1 : 2. Razmerje protein : fosfolipid (iz frakcije Č) = 3 : 1. Razmerje protein : fosfolipid (iz frakcije D) = 5 : 1. Inkubacija je potekala eno uro pri 25° C. Centrifugiranje je trajalo 1 uro pri 52162 g in 8° C. st.= standard, sup=supernatant, pel=usedlina. Proteine smo obarvali s Coomassie modrim.



Slika 36: Elektroforeza 100 µl MLV narejenih iz frakcije E (izoliranih iz tobaka) inkubiranih s 5 µg proteina NLP<sub>ccc</sub> ni pokazala prisotnosti vezave proteina NLP<sub>ccc</sub> na lipide v MLV, pri frakciji F pa je prišlo do vezave proteina NLP<sub>ccc</sub> na lipide v MLV, kjer je bila inkubacija prav tako: 100 µl MLV narejenih iz frakcije F s 5 µg proteina NLP<sub>ccc</sub>. Razmerje protein : fosfolipid (iz frakcije E) = 1 : 5,5. Razmerje protein : fosfolipid (iz frakcije F) = 1 : 5,3. Inkubacija je potekala eno uro pri 25° C. Centrifugiranje je trajalo 1 uro pri 52162 g in 8° C. st.= standard, sup=supernatant, pel=usedlina. Proteine smo obarvali s Coomassie modrim.

V frakcijah F (Slika 36) in G (Slika 37) je prišlo do vezave med proteinom NLP in lipidi v MLV. Na lipide se je vezalo polovico proteinov NLP<sub>ccc</sub>. Vzorca je bilo dovolj, da smo naredili dvodimenzionalno tankoplastno kromatografijo (Slika 39-40), da bi videli, katere lipide imamo v vzorcu, ki se je vezal. Za ostale analize in ponovitev elektroforeze pa ga je zmanjkalo. Lipide smo ponovno izolirali iz tobaka, da bi poskus ponovili, vendar tokrat do vezave ni prišlo.



Slika 37: Elektroforeza 100 µl MLV narejenih iz frakcije A in B (izoliranih iz tobaka) inkubiranih s 5 µg proteina NLP<sub>pcc</sub> ni pokazala prisotnosti vezave proteina NLP<sub>pcc</sub> na lipide v MLV, pri frakciji G pa je prišlo do vezave proteina NLP<sub>pcc</sub> na lipide v MLV, kjer je bila inkubacija prav tako: 100 µl MLV narejenih iz frakcije G s 5 µg proteina NLP<sub>pcc</sub>. Razmerje protein : fosfolipid (iz frakcije A) = 1 : 2. Razmerje protein : fosfolipid (iz frakcije B) = 2,8 : 1. Razmerje protein : fosfolipid (iz frakcije G) = 1 : 8,5. Inkubacija je potekala eno uro pri 25° C. Centrifugiranje je trajalo 1 uro pri 52162 g in 8° C. st.= standard, sup=supernatant, pel=usedlina. Proteine smo obarvali s Coomassie modrim.

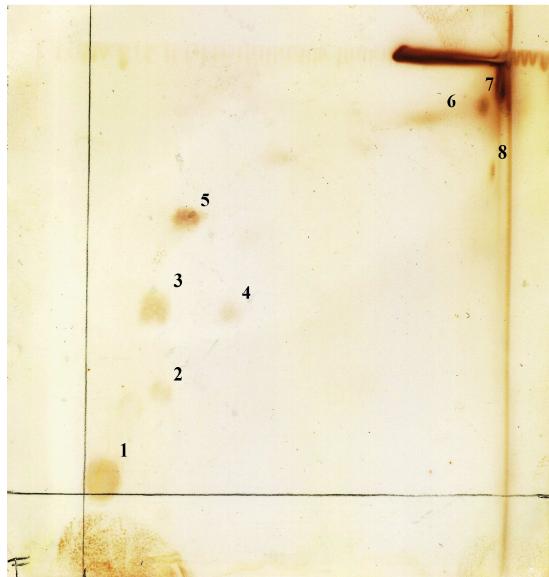
#### 4.3 IDENTIFIKACIJA LIPIDA, NA KATEREGA SE VEŽE PROTEIN NLP

Da bi kvantificirali in identificirali lipide v frakcijah, smo frakcije od A do G razvili z enodimenzionalno tankoplastno kromatografijo (Slika 38). Ločenost lipidov je bila slaba, lise so slabo vidne. Največ lis lipidov je bilo v frakcijah A, B, F in G. Vse štiri frakcije so bile zelene zaradi klorofilov, vendar sta bili frakciji A in B bolj intenzivno zeleni kot F in G.

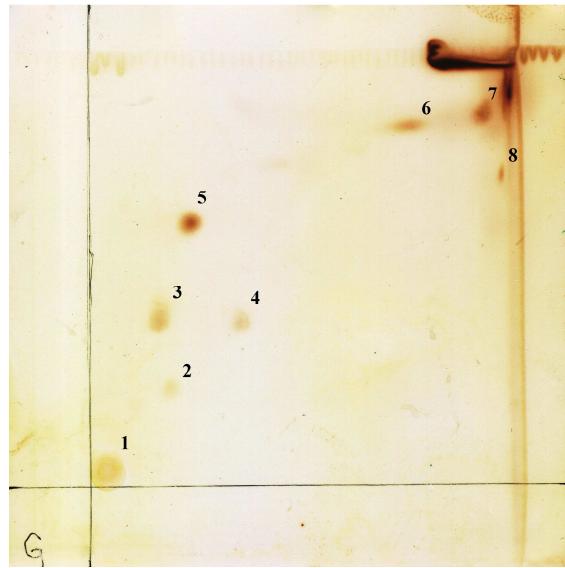


Slika 38: Enodimenzionalna tankoplastna kromatografija frakcij od A do G lipidov iz tobaka, vizualizirana z amonijevim sulfatom.

Za identifikacijo lipidov iz posameznih frakcij od A do G smo izolirane lipide razvili v dveh dimenzijah (Slika 39, Slika 40, Slika 41, Slika 42, Slika 43).

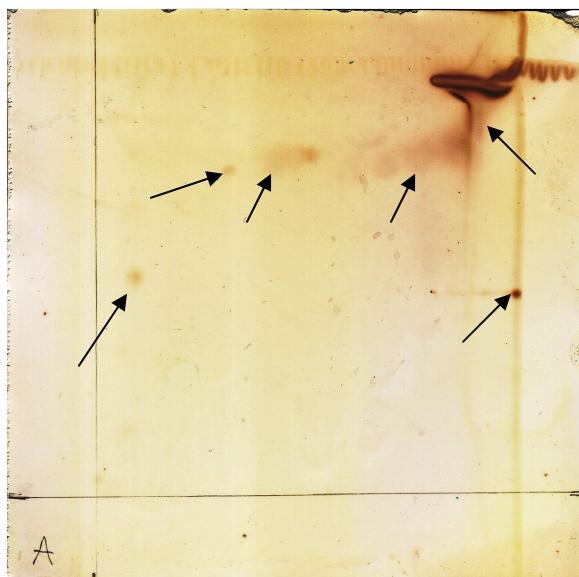


**Slika 39:** Dvodimenzionalna TLC frakcije F, vizualizirano z amonijevim sulfatom. Nanešenih 7 µg fosfolipidov.

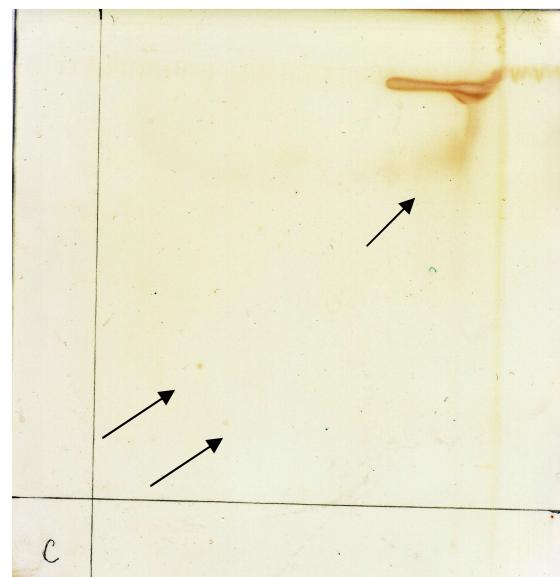


**Slika 40:** Dvodimenzionalna TLC frakcije G, vizualizirano z amonijevim sulfatom. Nanešenih 11 µg fosfolipidov.

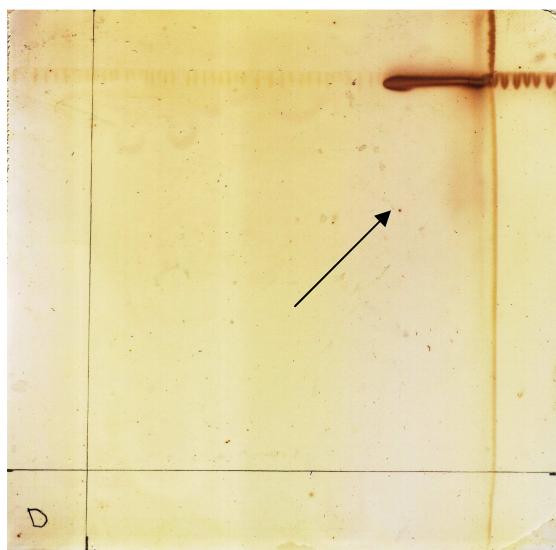
Po razvijanju so bile lise v frakciji F (Slika 39) in G (Slika 40), v katerih je prišlo do vezava proteina NLP<sub>cc</sub> na lipide, na enakih položajih na plošči TLC, kar najverjetneje pomeni, da so bili v obeh enaki lipidi. Ker smo videli 8 lepo ločenih lis sklepamo, da je bilo v frakcijah vsaj osem različnih lipidov, z uporabljenem metodo pa ne moremo določiti, kateri od teh lipidov se je vezal s proteinom NLP<sub>cc</sub>.



**Slika 41:** Dvodimenzionalna TLC frakcije A, vizualizirano z amonijevim sulfatom. Nanešen  $1 \mu\text{g}$  fosfolipidov.



**Slika 42:** Dvodimenzionalna TLC frakcije C, vizualizirano z amonijevim sulfatom. Nanešeni  $3 \mu\text{g}$  fosfolipidov.



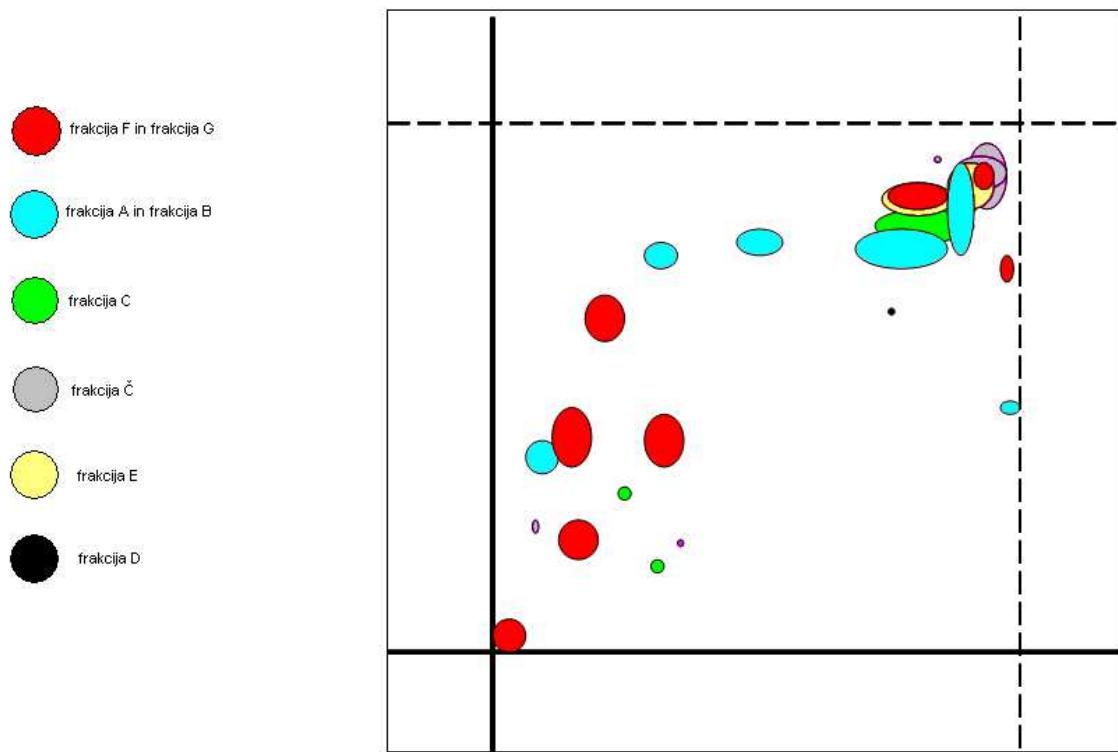
**Slika 43:** Dvodimenzionalna TLC frakcije D, vizualizirano z amonijevim sulfatom. Nanešeno  $0,1 \mu\text{g}$  fosfolipidov.



**Slika 44:** Dvodimenzionalna TLC frakcije 7, vizualizirano z amonijevim sulfatom.

V frakcijah A (Slika 41), B (podatki niso prikazani), C (Slika 42), Č (podatki niso prikazani), D (Slika 43) in E (podatki niso prikazani) je bilo manj lipidov. Frakciji A in B sta si bili podobni.

Poskus smo ponovili, tokrat smo frakcije označili 1-8 (podatki za frakcije 1-6 in 8 niso prikazani). V frakcijah je bilo več lipidov, kot v prejšnjem poskusu, zato smo predvidevali, da bo prišlo do vezave. V frakciji 7 (Slika 44) in 8 so bili vsi lipidi, ki so bili v frakcijah F in G in še drugi, vendar do vezave ni prišlo.



Slika 45: Shema prekrivanja lipidov frakcij A-G. Lise predstavljajo pozicijo lipidov na ploščah TLC.

Lise lipidov frakcij od A do G smo vrisali v shemo, da bi lažje sklepali, kateri lipid je tisti, na katerega se veže protein  $NLP_{Pcc}$ . Pri tem smo upoštevali prekrivanja med frakcijami in s kontrolnimi lipidmi.

En ali več lipidov, ki so se vezali s proteinom  $NLP_{Pcc}$ , so se nahajali v frakcijah F in G, v katerih pa je vsaj 8 različnih lipidov, ki jih predstavlja osem lepo ločenih lis. Prva lisa je obstala na mestu, kjer smo vzorec nanesli. Lisa prekriva kontrolni lipid ganglioqid. Druga lisa prekriva kontrolne lipide POPC (palmitoil-oleil-fosfatidilholin), sfingomielin in 1-palmitoil-2-hidroksi-sn-glicero-3-fosfoetanolamin. Tretja in četrta lisa ne Sovpadata z nobenim kontrolnim lipidom. Četrta lisa prekriva frakcijo 3, a nobenega kontrolnega lipida. Peta lisa prekriva frakcijo 2 in D-laktozil-b-1,1 N-palmitoil-sfingozin D-galaktozil ceramid. Šesta lisa prekriva liso iz frakcije E skoraj popolnoma. Od kontrolnih lipidov prekriva  $\beta$ -sitosterol in se dotika galaktozil ceramida ter stigmasterola. Sedma lisa prekriva

liso iz frakcije E in liso iz frakcije Č, vendar je manjša. Dotika se tudi lise iz frakcije C. Prekriva kontrolne lipide β-sitosterol, ergosterol in stigmasterol. Osma lisa ne prekriva nobene druge lise.

#### 4.4 ZNAČILNOSTI FRAKCIJ

Da bi bolje okarakterizirali z adsorpcijsko kromatografijo (Preglednica 4) in gradientnim centrifugiranjem (Preglednica 5) dobljene frakcije, smo jim s fosfolipidnim testom izmerili koncentracije fosfolipidov. V frakcijah F in G, v katerih je prišlo do vezave, je zelo velika koncentracija fosfolipidov. Tudi intenzivnost in število lis na ploščah TLC je večje. Pri frakcijah 2 in 3, dobljenih z adsorpcijsko kromatografijo, je koncentracija fosfolipidov velika, medtem ko je intenzivnost in število lis na ploščah TLC precej manjša kot pri frakcijah F in G. Sklepamo lahko, da je v frakcijah F in G prisotnih poleg fosfolipidov tudi več lipidov iz drugih skupin, kot pri frakcijah 2 in 3.

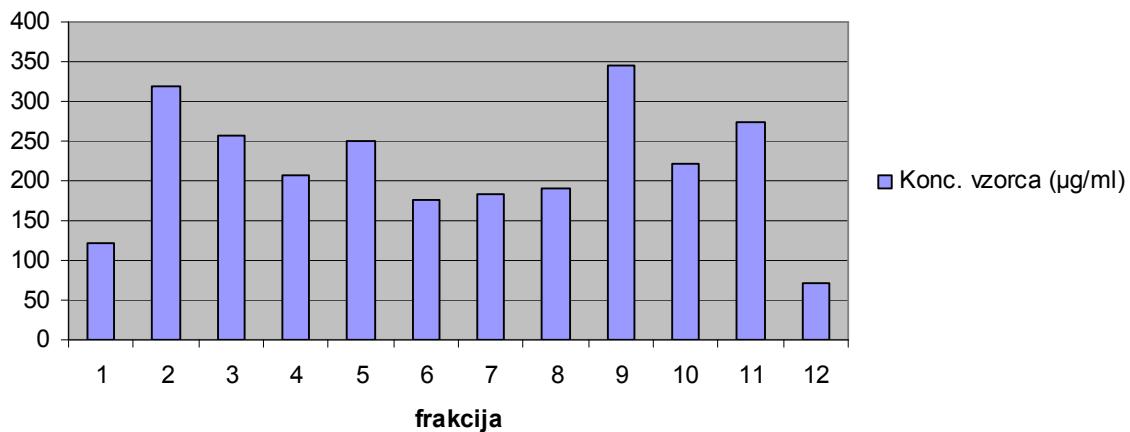
**Preglednica 4: Fosfolipidni test: koncentracija fosfolipidov v frakcijah 2 in 3 pridobljenih z adsorpcijsko kromatografijo.**

Frakcija:	Koncentracija fosfolipidov: [µg/mL]
2	258,7
3	885,9

**Preglednica 5: Fosfolipidni test: koncentracija fosfolipidov v frakcijah A-G pridobljenih z gradientnim centrifugiranjem.**

Frakcija:	Koncentracija fosfolipidov: [µg/mL]
A	96,1
B	18,1
C	96,7
Č	14,7
D	10,5
E	273,3
F	264,9
G	419,9

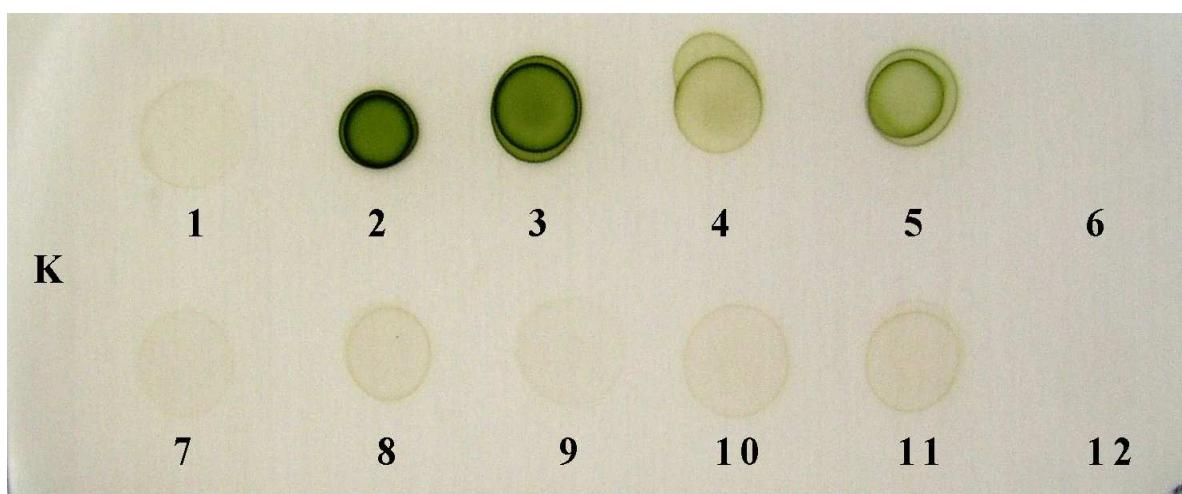
V vzorcu, kjer je prišlo do vezave z NLP smo želeli preveriti tudi koncentracijo proteinov, a smo za BCA test imeli premalo vzorca. V enem izmed ponavljanj poskusa smo dobili 12 frakcij, ki smo jim izmerili koncentracije proteinov (Slika 46) in naredili poskus z inkubacijo s proteini NLP, a do vezave ni prišlo (podatki niso prikazani).



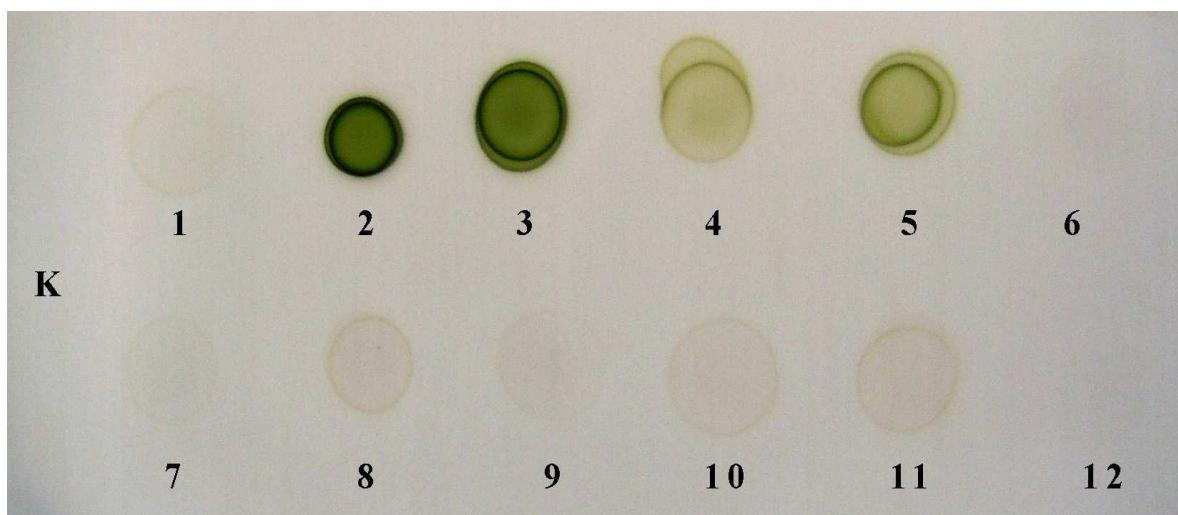
Slika 46: Prikaz koncentracije proteinov ( $\mu\text{g/mL}$ ) pridobljenih z BCA testom. Frakcije 1-12.

#### 4.5. TOČKOVNI ODTIS

Da do vezave proteinov NLP v 12 frakcijah res ni prišlo smo preverili še z metodo točkovnega odtisa. Na ploščo TLC smo nanesli frakcije lipidov, na njih pa protein  $\text{NLP}_{\text{PCC}}$ . Plošči TLC smo dodali primarna in sekundarna protitelesa. Če bi do vezave prišlo, bi po inkubaciji v peroksidaznem substratu lise potemnele. Na Sliki 47 je prikazana plošča pred razvijanjem v peroksidaznem substratu, na Sliki 48 pa po razvijanju. Vidimo lahko, da do sprememb v odtenkih lis ni prišlo, torej do vezave med lipidi v posameznih frakcijah in  $\text{NLP}_{\text{PCC}}$  proteinom ni prišlo.



Slika 47: Točkovni odtis pred razvijanjem v peroksidaznem substratu. Nanesli smo 12 frakcij lipidov po  $2 \times 3 \mu\text{l}$ . Na lipide smo nanesli  $5 \times 2 \mu\text{l}$  proteina  $\text{NLP}_{\text{PCC}}$ . Zgornja vrsta frakcije 1-6, spodnja vrsta frakcije 7-12. Levo na sredini negativna kontrola:  $5 \times 2 \mu\text{l}$  proteina  $\text{NLP}_{\text{PCC}}$ .



**Slika 48: Točkovni odtis po razvijanju v peroksidaznem substratu.** Nanesli smo 12 frakcij lipidov po 2x3  $\mu\text{l}$ . Na lipide smo nanesli 5x2 $\mu\text{l}$  proteina NLP<sub>Pcc</sub>. Zgornja vrsta frakcije 1-6, spodnja vrsta frakcije 7-12. Levo na sredini negativna kontrola: 5x2  $\mu\text{l}$  proteina NLP<sub>Pcc</sub>.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V naši raziskavi smo žeeli preveriti ali se proteini NLP specifično vežejo na lipide iz tobaka (*Nicotiana tabacum*). Lipide smo zato najprej izolirali iz svežih listov tobaka in nekatere tudi identificirali s tankoplastno kromatografijo. Da bi lažje izolirali in določili lipide, na katere se potencialno vežejo naši izbrani NLP ( $\text{NLP}_{\text{Pp}}$ ,  $\text{NLP}_{\text{Pcc}}$ ,  $\text{NLP}_{\text{PyA}}$ ), smo lipide ločili na frakcije s pomočjo adsorpcijske kromatografije in gradientnega centrifugiranja v perkolu. MLV, ki smo jih naredili iz posameznih frakcij, smo inkubirali s posameznimi proteini NLP.

Preden smo preverili vezavo proteinov na lipide v MLV, smo poskušali identificirati lipide v celokupnem izolatu, kar smo naredili s pomočjo položaja lis po razvijanju z dvodimenzionalno TLC izoliranih lipidov in posameznih frakcij, ki smo jih primerjali s položajem lis čistih znanih lipidov (Slika 25). V našem izolatu smo tako potrdili prisotnost fosfolipidov, sfingolipidov, glikosfingolipidov in sterolov. Iz primerjave naših rezultatov dvodimenzionalne TLC z rezultati druge raziskovalne skupine (Slika 7, Christie, 2003) lahko sklepamo, da so v naših izolatih prisotni tudi glikozilgliceridi. S TLC smo tako potrdili, da lipidne membrane pri tobaku vsebujejo zelo različne vrste lipidov, glede na obseg izoliranih in s TLC ločenih lipidov iz naših vzorcev pa predvidevamo, da smo uspeli izolirati večino tipov lipidov, ki se sicer nahajajo v membrani celic listov tobaka.

Za ločitev lipidov iz tobaka na frakcije smo uporabili dve metodi. Najprej smo jih ločili z adsorpcijsko kromatografijo na tri frakcije. Druga in tretja sta vsebovali zelo malo lipidov in tudi do vezave proteinov NLP na lipide v MLV ni prišlo. V prvi frakciji, ki je sicer vsebovala veliko lipidov, pa je bilo tudi zelo veliko klorofila, ki je motil izdelavo MLV, na katerih smo sicer preverjali vezavo proteinov na lipide. Da bi preverili, ali je tarčni lipid za NLP med lipidami v frakciji 1, smo izolirane lipide ločili še na več frakcij z gradientnim centrifugiranjem v perkolu in se tako znebili klorofila oziroma njegovo prisotnost omejili na manjši del frakcij. Način, kako bi se izognili prisotnosti zelenega klorofila bi bil tudi, da bi lipide izolirali iz etioliranih listov. Ker pa bi etioliranost lahko vplivala tudi na lipidno sestavo in razmerja med lipidami, smo se omejili na zelene liste, kakršne bi sicer našli tudi v naravi.

Iz izoliranih frakcij smo pripravili MLV. Uporabili smo jih, ker se proteini NLP vežejo na membrane in mogoče je za vezavo pomembna kombinacija več lipidov, kot pri

perfringolizinu, ki potrebuje za interakcijo z membrano sterol, ali lektinih in aktinoporinih, ki potrebujejo za vezavo prisotnost sladkorjev in sfingomielina (Küfner in sod., 2009). MLV smo inkubirali s proteini NLP v različnih razmerjih in pri različnih časih inkubacije. Ker do vezave večinoma ni prišlo, smo izolacijo lipidov in ločevanje na posamezne frakcije ponovili večkrat, s čimer smo se želeli izogniti možnosti, da bi zaradi napake v postopku izolacije in ločevanja prišlo do izgube lipida ali druge sestavine membrane, ki je potrebna za vezavo proteina NLP. Do vezave je prišlo le v frakcijah F in G (Slika 36 in Slika 37), ki smo ju dobili po gradientnem centrifugiranju. Nanje se je vezal protein NLP<sub>PC</sub>. Vezala se je približno polovica dodanih proteinov, druga polovica pa je ostala suspendirana v supernatantu. Domnevamo, da je bila koncentracija tarčnega lipida premajhna za vezavo vseh proteinov.

Vezava proteina NLP na lipide iz tobaka je uspela. Tako smo potrdili našo hipotezo, da se proteini NLP specifično vežejo na lipide iz tobaka. Iz frakcij, v katerih je prišlo do vezave, smo naredili dvodimenzionalno TLC (Slika 39 in Slika 40) in izmerili koncentracijo fosfolipidov (Preglednica 5), za dodatne raziskave ter natančnejšo identifikacijo lipida pa nam je zmanjkalo vzorca. Poskus smo ponovili z novimi sveže izoliranimi lipidi, a do vezave ni prišlo. Ponovljivost naših rezultatov je bila slaba. Naše ugotovitve zato niso zanesljive, saj jih nismo potrdili ponovno ali še s kakšno drugo metodo.

Frakciji F in G, v katerih je prišlo do vezave proteinov NLP, najverjetneje vsebujeta enake lipide, kar sklepamo po rezultatih dvodimenzionalne TLC (Slika 39 in Slika 40). Trdimo lahko tudi, da je v frakcijah vsaj 8 različnih lipidov, metoda tankoplastne kromatografije pa ne omogoča identifikacije lipida, na katerega so se proteini vezali. Teh 8 lipidov smo poskušali identificirati tako, da smo jih primerjali z lisami lipidov na ploščah TLC iz drugih frakcij in s kontrolnimi lipidi.

Prva lisa, ki je obstala na mestu, kjer smo vzorec nanesli, ustrezala poziciji kontrolnega lipida gangliozida. Obstaja tudi možnost, da smo na TLC ploščo nanesli preveliko količino lipidov in da vsi zato niso potovali naprej s topilom. Lisa bi tako lahko bila artefakt in ne bi pomenila položaja nekega določenega lipida, ampak zgolj mešanico nanešenih lipidov, ki zaradi prevelike gostote niso potovali s topilom. Druga lisa prekriva kontrolne lipide POPC (palmitoil-oleil-fosfatidilholin), sfingomelin in 1-palmitoil-2-hidroksi-sn-glicero-3-fosfoetanolamin. Lisa najverjetneje ustrezala enemu od teh lipidov. Tretja in četrta lisa ne prekrivata kontrolnih lipidov, četrta lisa pa prekriva liso iz frakcije 3 (Slika 24), ki smo jo dobili z adsorpcijsko kromatografijo. Peta lisa ustrezala poziciji lipida v frakciji 2 (Slika 23) in D-laktozil-b-1,1 N-palmitoil-sfingozin D-galaktozil ceramid. Šesta lisa skoraj popolnoma prekriva liso iz frakcije E, sovpada pa tudi s pozicijo kontrolnega lipida β-

sitosterola in se dotika galaktozil ceramida ter stigmasterola. Sedma lisa prekriva lisi iz frakcij E in Č, vendar je manjša, dotika pa se tudi lise iz frakcije C. Prekriva kontrolne lipide  $\beta$ -sitosterol, ergosterol in stigmasterol. Položaj osme lise ne ustreza nobeni drugi lisi.

Za natančnejšo določitev lipidov bi potrebovali večji nabor kontrolnih lipidov, saj tretja, četrta in osma lisa ne sovpadajo z nobenim kontrolnim lipidom in so tako ostale neidentificirane.

Lise, ki sovpadajo z lisami iz drugih frakcij, kot na primer 4., 5., 6. in 7., verjetno ne predstavljajo lipidov, na katere se je vezal NLP, saj v drugih frakcijah pri istih pogojih ni prišlo do vezave NLP. Ne moremo pa jih popolnoma izključiti, saj lahko pri vezavi le sodelujejo. Ugotovili so že, da potrebujejo določeni proteini ki so podobni proteinom NLP, kot na primer perfringolizin, lektini in aktinoporini, za vezavo z membrano prisotnost določenih lipidov. Če predpostavimo, da je prva lisa artefakt, predstavljajo lipide, na katere se je  $NLP_{Pcc}$  vezal, najverjetneje 2., 3. ali 8. lisa. Seveda gre lahko tudi za kombinacijo več različnih lipidov, ustrezno kombinacijo lipidov pa smo po ločevanju na frakcije dobili le v frakcijah F in G.

Ko smo ponovili poskus z osmimi frakcijami (tokrat smo frakcije označili s številkami od 1 do 8), do vezave ni prišlo. Primerjava dvodimensionalnih TLC frakcij F (Slika 39) in G (Slika 40) ter 7 (Slika 44) in 8 (podatki niso prikazani, identična frakciji 7) je pokazala, da so si frakcije med seboj zelo podobne. Vse lise, ki smo jih videli na plošči TLC frakcij F in G, so prisotne tudi na plošči TLC frakcij 7 in 8, le da so tu močnejše, torej je koncentracija lipidov večja. Prisotne so bile tudi nekatere nove lise, ki jih mogoče zaradi nižje koncentracije lipidov pri frakcijah F in G nismo opazili ali pa jih tam ni bilo. Lahko sklepamo, da je bilo določenih lipidov v frakcijah 7 in 8 preveč in so motili vezavo proteinov na lipide. Vzrok za neponovljivost rezultatov je lahko tudi premočna homogenizacija tobakovih listov pri frakcijah 1-8. Ob homogenizaciji smo mogoče poškodovali dele lipidov, ki so pomembni za vezavo proteinov NLP. Pomembno je, kako močna je homogenizacija, da ne uničimo sestavin celice, ki jih želimo izolirati. Vzrok, da do vezave ni prišlo, je lahko tudi premalo izoliranega lipida, ki je ključen za vezavo.

Rastlinske celice se od živalskih razlikujejo, saj imajo celično steno, vakuolo, tonoplast in plastide. Prav te razlike lahko vplivajo na večje težave pri izolaciji celičnih membran oziroma lipidov iz njih, kot bi bile pri živalskih celicah. Pri homogenizaciji moramo paziti, da raztrgamo celično steno, ne smemo pa poškodovati delov celice, ki jih želimo odstraniti iz tkiva. Vakuole se razlijejo in s tem razredčijo homogenizat, lahko pa tudi znižajo pH medija, v katerem delamo. Tonoplast, ki obdaja vakuole oziroma lipidi iz njega se lahko

pomešajo z lipidi iz celičnih membran. Klorofili iz plastidov pa motijo izdelavo MLV (Findlay in Evans, 1990).

Tudi pri analizi vzorcev je potrebna velika pazljivost. Paziti je treba, da so lipidi ves čas pri nizki temperaturi in da inaktiviramo encime, ki bi lahko lipide razgradili (pri obdelavi rastlinskega tkiva se sprošča fosfolipaza D (Christie, 2003)). Lipidi so se lahko med obdelavo poškodovali z oksidacijo. Ob stiku lipida s kisikom lahko dvojno vez v nenasičenih maščobnih kislinah napade kisik. Ta proces imenujemo avtooksidacija, pri njem pa nastanejo kompleksi produkti rumene barve in neprijetnega vonja, kot so krajši aldehydi in kisline (Boyer, 2005). S takim vzorcem bi dobili drugačne rezultate kot z neoksidiranimi lipidi. Da bi avtooksidacijo preprečili smo lipidom dodali antioksidant BHT in jih shranjevali v dušikovi atmosferi. Christie (2003) navaja, da je ekstrakcijo lipidov najbolje začeti z izopropanolom, ki deaktivira encime. Pri ekstrakciji smo lipide pustili kar nekaj časa na zraku. Nad njimi je bila vodna faza, kar jih je verjetno ščitilo pred stikom z zrakom, vendar ne vemo, če je bilo to dovolj. Lipidi so zelo občutljivi in med delom lahko hitro pride do napak, posledica pa je slaba ponovljivost rezultatov.

Z adsorpcijsko kromatografijo bi mogoče dosegli boljšo ločitev klorofilov od ostalih lipidov, če bi uporabili druga topila ali več zaporednih topil, kar bi nam prineslo več frakcij.

Postopek homogenizacije rastlinskega tkiva in izolacije lipidov bi bilo dobro izboljšati, da bi bila ponovljivost večja. Vezavo bi lahko preizkusili še s kakšno drugo metodo. Za identifikacijo lipidov iz tobaka bi potrebovali več kontrolnih lipidov.

Poskus bi lahko ponovili tako, da bi pri izdelavi MLV uporabili pufer, v katerem bi bili prisotni dvovalentni kationi ( $Mg^{2+}$ ), ki so prisotni v proteinih NLP in pomembni za biološko aktivnost teh proteinov (Ottmann in sod., 2009). Kationi na protein niso vezani močno in se lahko izgubijo. Do vezave na lipide tako ne bi prišlo.

## 5.2 SKLEPI

V membranah tobaka (*Nicotiana tabacum*) so prisotne različne skupine lipidov: fosfolipidi, sfingolipidi, glikosfingolipidi, steroli in glikozigliceridi.

Od treh uporabljenih proteinov NLP ( $NLP_{Pp}$ ,  $NLP_{Pcc}$ ,  $NLP_{PyA}$ ) lahko potrdimo, da se z lipidmi iz tobaka veže  $NLP_{Pcc}$ .

Za ločitev lipidov iz tobaka na frakcije je bolj primerno gradientno centrifugiranje kot ločitev z adsorpcijsko kromatografijo, saj dobimo več frakcij, pa tudi bolje se ločijo od klorofila, ki sicer ovira delo z lipidmi.

## 6 POVZETEK

Proteini NLP (ang. NEP1-like protein) povzročajo pri dvokaličnicah nekroze, tvorbo etilena, preobčutljivostni odziv rastline in druge simptome. Med dvokaličnice sodi tudi tobak (*Nicotiana tabacum*). NEP1 (ang. necrosis and ethylene inducing peptide 1) je bil prvi odkriti protein NLP. Izoliran je bil iz glive *Fusarium oxysporum*. Na tobaku povzroča nekroze, produkциjo etilena in preobčutljivostni odziv.

V naši raziskavi smo žeeli preveriti, ali se proteini NLP vežejo na lipide iz tobaka. Uporabili smo tri proteine NLP:  $NLP_{Pp}$ ,  $NLP_{Pcc}$ ,  $NLP_{Pya}$ . Iz tobaka smo izolirali lipide in jih ločili na frakcije. Za ločitev smo najprej uporabili adsorpcijsko kromatografijo (frakcije 1-3), a so nam pri izdelavi multilamelarnih veziklov delali težave klorofili, zato smo uporabili gradientno centrifugiranje s perkolom. Dobili smo več frakcij (A-G). Da bi identificirali proteine iz frakcij, smo lipide v vzorecih ločili z eno- in dvodimenzionalno tankoplastno kromatografijo (TLC) in jih primerjali z dobljenimi lisami znanih kontrolnih lipidov, razvitih pri istih pogojih, s čimer smo lahko naše lipide uvrstili v določene skupine lipidov.

Iz posameznih frakcij lipidov smo naredili multilamelarne vezikle (MLV) in jih za 1 h inkubirali z vsakim od treh proteinov NLP. Inkubirane vzorce smo centrifugirali eno uro na 8°C pri 52162 g, s čimer smo jih ločili na usedlino in supernatant, katere smo vsakega posebej za vsak vzorec nanesli na NaDS gel in naredili elektroforezo. Po končani elektroforezi smo proteine v geluobarvali z modrim barvilom. Lipidi so bili vedno v usedlini. Če so se nanje vezali proteini, so bili tudi proteini na gelu vidni v usedlini, sicer pa v supernatantu vzorca.

Ugotovili smo, da so v tobaku različne skupine lipidov: fosfolipidi, sfingolipidi, glikosfingolipidi, steroli in glikozilgliceridi. Od treh uporabljenih lipidov NLP lahko potrdimo, da se na lipide v MLV iz tobaka veže  $NLP_{Pcc}$ . Ko smo lipide iz tobaka ločili na frakcije od A do G z gradientnim centrifugiranjem, je do vezave prišlo v frakcijah F in G. V teh frakcijah je bila visoka koncentracija fosfolipidov. Dvodimenzionalna TLC oben frakcij je pokazala, da sta frakciji zelo podobni in da se v oben nahaja vsaj 8 lipidov, kar pa nam ni omogočilo identifikacije lipida, na katerega se je protein NLP vezal.

## 7 VIRI

Amsellem Z., Cohen B. A., Gressel J., 2002. Engineering hypervirulence in a mycoherbicidal fungus for efficient weed control. *Nature biotechnology*. 20: 1035-1039

Anderluh G., Maček P. 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon*. 40: 111-124

Anderluh G., Bavdek A., Sepčič K. 2009. Praktikum iz biokemije za študente prvostopenjskega bolonjskega programa Biologija. Scripta. Ljubljana.

Athanasiadis A., Anderluh G., Maček P., Turk D. 2001. Crystal structure of the soluble form of equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *Structure*. 9: 341-346

Barel A. O., Paye M., Maibach H.I. 2006. Handbook of Cosmetic Science and Technology. V: Liposomes. 3. izdaja. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton. 155-163

Bailey B. A. 1995. Purification of a protein from culture filtrates *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology*. 85: 1250-1255

Bailey B. A., Apel-Birkhold P. C., Luster D. G. 2002. Expression of NEP1 by *Fusarium oxysporum* f.sp. *erythroxylum* after gene replacement and overexpression using polietihelene glycol-mediated transformation. *Phytopathology*. 92: 833-841

Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. 2002. Biochemistry. 5. izdaja. New York. 974 str.

Birck C., Damian L., Marty-Detraves C., Lougarre A., Schulze-Briese C., Koehl P., et al. 2004. A new lectin family with structure similarity to actinoporins revealed by the crystal structure of *Xerocomus chrysenteron* lectin XCL. *Journal of Molecular Biology*. 344: 1409-1420

Boller T., Yang He S. 2009. Innate Immunity in Plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324: 742-744

Boyer R. 2005. Temelji biokemije. 2.izdaja. Ljubljana. Študentska založba. 634 str.

Brunner F., Rosahl S., Lee J., Rudd J. J., Geiler C., Kauppinen S., Rasmussen G., Scheel D., Nürnberger T. 2002. Pep-13, a plant defense inducing pathogen-associated pattern from Phytophthora transglutaminases. *The EMBO Journal*. 21: 6681-6688

Carrizo M. E., Capaldi S., Perduca M., Irazoqui F. J., Nores G. A., Monaco H. L. 2005. The antineoplastic lectin of the common edible mushroom (*Agaricus bisporus*) has two binding sites, each specific for a different configuration at a single epimeric hydroxyl. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 10614-10623

Christie W.W. 2003. Lipid analysis. Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. Tretja izdaja. England. The Oily Press.

Cooke D. E. L., Drenth A., Duncan J. M., Wagels G., Brasier C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*. 30: 17-32

Felix G., Duran J. D., Volko S., Boller T. 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal*. 18: 256-276

Fellbrich G., Romanski A., Varet A., Blume B., Brunner F., Engelhardt S., et al. 2002. NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *The plant journal*. 32: 375-390

Findlay J. B. C., Evans W. H. 1990. Biological membranes. A practical approach. Oxford University Press. New York. 304 str.

Fliegmann J., Mithöfer A., Wanner G., Ebel J. 2004. An ancient enzyme domain hidden in the putative  $\beta$ -glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 1132-1140

Gijzen M., Nürnberger T. 2006. Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* 67: 1800-1807

Guide to solid phase extraction. 1998. Bulletin 910. Sigma-Aldrich. USA

Harwood J.L. 1997. Plant lipid metabolism. V: Plant Biochemistry. Dey P. M., Harborne J.B. (ed) California. Academic Press. 237-271

Heldt H.W. 1999. Plant Biochemistry & Molecular Biology. New York. Spektrum Akademischer Verlag: 522 str.

Hinds M. G., Zhang W., Anderluh G., Hansen P. E., Norton R. S. 2002. Solution structure of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinatoxin II: implications for pore formation. Journal of Molecular Biology. 315: 1219-1229

Hodges T. K., Leonard R. T., Bracker C. E., Keenan T. W. 1972. Purification of an ion-stimulated adenosine triphosphatase from plant roots: association with plasma membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 69: 3307-3311

Jennings J. Apel-Birkhold P., Mock N., Baker C., Anderson J., Bailey B. 2001. Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium Oxysporum*. Plant Science 161: 891-899

Jones J. D. G., Dangl J.L. 2006. The plant immune system. Nature: 444: 323-329

Kamoun S. 2003. Molecular genetics of pathogenic oomycetes. Eukaryotic cell. 2: 191-199

Kubis S. E., Lilley K. S., Jarvis P. 2008. Isolation and preparation of chloroplasts from *Arabidopsis thaliana* plants. Methods in Molecular Biology 425: 171-186

Küfner I., Ottmann C., Oecking C., Nürnberg T. 2009. Cytolytic toxins as triggers of plant immune response. Plant Signaling & Behaviour 4, 10: 1-3

Mattinen L., Tshuikina M., Mae A., Pirhonen M. 2004. Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. Molecular Plant Microbe Interactions. 17: 1366-1375

Motteram J., Küfner I., Deller S., Brunner F., Hammond-Kosack K. E., Nürnberg T., Rudd J. J. 2009. Molecular characterization and functional analysis of MgNLP, the sole NPP1 domain containing protein, from the fungal wheat leaf pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Molecular Plant Microbe Interactions. 22: 790-799

Ottmann C., Luberacki B., Küfner I., Koch W., Brunner F., Weyand M., Mattinen C., Pirhonen M., Anderluh G., Seitz H., Nürnberg T., Oecking C. 2009. A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. Proceedings of the National Academy of Science USA 106, 25: 10359-10364

Qutob D. Kamoun S., Gijzen M. 2002. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. The Plant Journal. 32: 361-373

Ron M., Avni A. 2004. The receptor for the fungal elicitor ethylene inducing xylanase in a member of a resistance-like gene family in tomato. The plant cell. 16: 1604-1615u

Ross I. A. 2005. Medical plants of the world. Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses. New Jersey. Humana Press. 623 str.

Tevini M., Lichtenthaler H. 1977. Lipids and lipid polymers in higher plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 306 str.

Veit S., Wörle J. M., Nürnberg T., Koch W., Seitz H. U. 2001. A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, *Arabidopsis* and tobacco. Plant Physiology. 127: 832-841

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Gregorju Anderluhu za mentorstvo in za strokovne nasvete pri praktičnem delu ter pisanju diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Petru Mačku in predsednici komisije za zagovor prof. dr. Kristini Sepčič za pregled diplomskega dela in popravke.

Posebna zahvala gre Vesni Hodnik, ki mi je z nasveti in pomočjo v laboratoriju pomagala pri praktičnem delu. Hvala tudi vsem zaposlenim na katedri za biokemijo za koristne nasvete.

Iskreno se zahvaljujem mami Sonji Kolenc, očetu Ladu Kolencu in stari mami Mariji Kolenc za vso podporo pri študiju. Hvala tudi fantu Damjanu Antoliču za vzpodbudo ter prijateljicama Nataši Kurent in Maji Marušič, ker sta verjeli vame.

Zahvaljujem se tudi vsem sošolkam in sošolcem, še posebej Lari Kastelic, Jasni Lojk in Alenki Lozej, za pomoč in nasvete tekom študija in pri diplomi.