

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katja PIRC

**IZOLACIJA PROTIGLIVNIH PROTEINOV IZ DRUŽINE
LINUSITINOV IZ POGANJKA LANU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ISOLATION OF ANTIFUNGAL LINUSITIN PROTEINS FROM THE
FLAX SHOOT TIP**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Univerzitetni študij končujem z diplomsko nalogo. Praktično delo je bilo opravljeno na Katedri za eksperimentalno botaniko in Katedri za biokemijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije z dne 16.6.2006 in 10.7.2008 ter na osnovi Pravilnika o dodiplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Marina Dermastia, za somentorico dr. Sabina Anžlovar in za recenzenta prof. dr. Gregor Anderluh.

Mentorica: prof. dr. Marina Dermastia

Somentorica: dr. Sabina Anžlovar

Recenzent: prof. dr. Gregor Anderluh

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David Stopar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Marina Dermastia

Nacionalni inštitut za biologijo in

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: dr. Sabina Anžlovar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Gregor Anderluh

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katja Pirc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 547.96:581.19:633.52(043)=163.6
KG	linusitinski proteini/LIN1/osmotini/PR-5 proteini/mRNA/izolacija proteinov/ apikalni meristem/lan/etilenska indukcija
AV	PIRC, Katja
SA	DERMASTIA, Marina (mentorica)/ANŽLOVAR, Sabina (somentorica)/ ANDERLUH, Gregor (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	IZOLACIJA PROTIGLIVNIH PROTEINOV IZ DRUŽINE LINUSITINOV IZ POGANJKA LANU
TD	diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 49 str., 2 pregl., 12 sl., 57 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Iz lanu (<i>Linum usitatissimum</i>) so predhodno izolirali proteina linusitin in LIN1, ki s podobnimi proteini sestavlja družino linusitinov. Na osnovi biokemijskih in molekulskih lastnosti ju uvrščamo med osmotine, ki so bazična skupina petega razreda proteinov povezanih s patogenostjo. Linusitin so izolirali iz semen in radikul zdravih kalic lanu. Prav tako so iz radikul izolirali tudi LIN1, vendar pa so bile količine premajhne za nadaljnje študije nativnega proteina. Z <i>in situ</i> hibridizacijo so ugotovili, da pride do močnega izražanja <i>LIN1</i> mRNA tudi v apikalnem meristemtu poganjka po predhodni etilenski indukciji, zato smo predvidevali, da so vršički poganjka dober vir linusitinskega proteina. Za poskus izolacije linusitinskega proteina iz vršičkov smo priredili in optimizirali metode, ki so bile predhodno uporabljene pri izolaciji iz semen in radikul. Uvedli smo frakcionirano obarjanje, ki se je glede na veliko večji izkoristek proteinov v primerjavi s prejšnjimi poskusi izkazalo za zelo koristno. Vršički so sicer ugodnejši izhodiščni material za izolacijo proteinov kot semena in radikule, veliko težavo pa predstavlja izjemno dolgotrajno zbiranje izhodiščnega rastlinskega materiala. Z ekstrakcijo v bazičnem Na-bikarbonatnem pufru nam LIN1 ni uspelo izolirati. Glede na rezultate diplomskega dela predvidevamo, da bi zadostno količino proteina LIN1 izolirali po predhodni obdelavi rastlin z etilenom in z ekstrakcijo v kislem Na-acetatnem pufru.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 547.96:581.19:633.52(043)=163.6
CX linusitin proteins/LIN1/osmotins/PR-5 proteins/mRNA/protein isolation/apical meristem/flax/ethylene induction
AU PIRC, Katja
AA DERMASTIA, Marina (supervisor)/ANŽLOVAR, Sabina (co-advisor)/ANDERLUH, Gregor (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2008
TI ISOLATION OF ANTIFUNGAL LINUSITIN PROTEINS FROM THE FLAX SHOOT TIP
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 49 p., 2 tab., 12 fig., 57 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Flax (*Linum usitatissimum*) has to date been subject to the extraction of two proteins, linusitin and LIN1, two members of the linusitin protein family. Based on their biochemical and molecular characteristics they are also classified as osmotins, a base group of the fifth class of pathogen-related proteins. Linusitin was isolated from seeds and radicles of healthy flax seedlings. LIN1 has also been isolated from radicles, however the quantity extracted had been too minute to propagate further studies of this native protein. By means of *in situ* hybridization a strong display of *LIN1* mRNA after a preceding ethylene induction has been acknowledged in the apical meristem of a shoot tip. Thus we assumed that the shoot tip containing apical meristem is a solid source for the linusitin protein. In an attempt to isolate the linusitin protein from the shoot tip we customized and optimized some of the methods that had previously been used in the process of isolation from seeds and radicles. We implemented fractional precipitation, a method that proved very constructive based on a larger utilization rate of the proteins compared to previous experiments. Shoot tips are a superior source for isolating proteins compared to seeds and radicles, however a large impediment in the process is the time-consuming accumulation period. The result of the experimental isolation of LIN1 by means of extraction in base sodium-bicarbonate buffer was negative. Concluding on the basis of our results, our presumption is that a sufficient amount of the LIN1 protein could be gathered by combining the method of a preceding treatment of plants by ethylene and extraction in a acidic sodium-acetate buffer.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX

1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 OBRAMBNI MEHANIZMI RASTLINE	2
2.2 PR-PROTEINI	2
2.2.1 Klasifikacija PR-proteinov	3
2.2.2 PR-5 proteini	5
2.3 OSMOTINI IN OSMOTINU-PODOBNI PROTEINI	6
2.3.1 Biokemijske lastnosti	6
2.3.2 Izražanje osmotinov	8
2.3.2.1 Konstitutivno izražanje	8
2.3.2.2 Inducirano izražanje	9
2.4 PROTEINSKA DRUŽINA LINUSITINOV	9
2.4.1 Izražanje LIN1	11
2.5 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	14
2.5.1 Namen dela	14
2.5.2 Hipoteze	14
3 MATERIAL IN METODE	15
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	15
3.1.1 Vzgoja rastlin	15
3.1.2 Obdelava rastlin z etilenom	15
3.1.3 Priprava vršičkov poganjkrov rastlin za izolacijo	15
3.2 IZOLACIJA PROTEINA	16
3.2.1 Izolacijski postopek	16
3.2.2 Ekstrakcija proteina	18

3.2.2.1	Priprava pufrov za ekstrakcijo proteina	18
3.2.2.2	Ekstrakcija v 20 mM Na-bikarbonatnem pufru s pH 8,4	18
3.2.2.3	Ekstrakcija v 20 mM Na-acetatnem pufru s pH 5,0	19
3.2.3	Koncentriranje	20
3.2.4	Gelska kromatografija s HPLC	20
3.2.4.1	Priprava pufrov za kromatografijo	20
3.2.4.2	Potek kromatografije	20
3.3	DOLOČANJE NEKATERIH BIOKEMIJSKIH LASTNOSTI PROTEINA	21
3.3.1	Merjenje količine proteinov	21
3.3.2	SDS-PAGE elektroforeza	21
3.3.2.1	Kemikalije in priprava raztopin	21
3.3.2.2	Sestava 12 % ločevalnega poliakrilamidnega gela	22
3.3.2.3	Sestava 4 % nanašalnega poliakrilamidnega gela	23
3.3.2.4	Priprava vzorcev za elektroforezo	23
3.3.2.5	Nanašanje vzorcev na gel	23
3.3.2.6	Potek elektroforeze	24
3.3.3	Barvanje gela po elektroforezi	24
3.3.3.1	Barvanje s srebrovim nitratom	24
3.3.3.1.1	Kemikalije in priprava raztopin	24
3.3.3.1.2	Postopek barvanja	25
4	REZULTATI	26
4.1	OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJSKEGA POSTOPKA	26
4.1.1	SDS-PAGE elektroforeza grobega ekstrakta po ekstrakciji	26
4.1.1.1	SDS-PAGE elektroforeza po ekstrakciji v Na-bikarbonatnem pufru pH 8,4	27
4.1.2	Primerjava ekstrakcije med neobdelanimi in z etilenom obdelanimi rastlinami	29
4.1.3	Primerjava ekstrakcije z bazičnim in kislim pufrom	30
4.2	KONCENTRACIJA PROTEINOV	31
4.3	LOČBA PROTEINOV S HPLC	32
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	36
5.1	RAZPRAVA	36
5.2	SKLEPI	40
6	POVZETEK	41
7	VIRI	43
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Razredi PR- proteinov (Fritig in sod., 1998; Van Loon in Van Strien, 1999).	4
Preglednica 2: Koncentracija proteinov v grobem ekstraktu po ekstrakciji v Na-bikarbonatnem pufru pH 8,4	31

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: <i>In situ</i> hibridizacija <i>LIN1</i> mRNA v apikalnem meristemtu poganjka 6 in 22 dni starih rastlin (Anžlovar in sod., 2008).	13
Slika 2: Shema izolacije linusitinskih proteinov	17
Slika 3: SDS-PAGE elektroforeza grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po obarjanju z amonijevim sulfatom - neobdelane rastline (obarvano s PageBlue).	27
Slika 4: SDS-PAGE elektroforeza grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po obarjanju z amonijevim sulfatom - rastline obdelane z etilenom (obarvano s PageBlue).	28
Slika 5: SDS-PAGE elektroforeza 5-krat skoncentriranih grobih ekstraktov Na-bikarbonatne ekstrakcije po obarjanju z amonijevim sulfatom - neobdelane rastline (N) in rastline obdelane z etilenom (E) (obarvano s srebrovimi nitratimi)	29
Slika 6: SDS-PAGE elektroforeza 5-krat skoncentriranih grobih ekstraktov Na-bikarbonatne ekstrakcije in Na-acetatne ekstrakcije po obarjanju z amonijevim sulfatom - neobdelane rastline (obarvano s srebrovimi nitratimi).	30
Slika 7: Kromatogram grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po 1. obarjanju z amonijevim sulfatom - neobdelan vzorec.	33
Slika 8: Kromatogram grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po 1. obarjanju z amonijevim sulfatom - vzorec obdelan z etilenom.	33
Slika 9: Kromatogram grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po 2. obarjanju z amonijevim sulfatom - neobdelan vzorec.	34
Slika 10: Kromatogram grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po 2. obarjanju z amonijevim sulfatom - vzorec obdelan z etilenom.	34
Slika 11: Kromatogram grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po 3. obarjanju z amonijevim sulfatom - neobdelan vzorec.	35
Slika 12: Kromatogram grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po 3. obarjanju z amonijevim sulfatom - vzorec obdelan z etilenom.	35

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APS	amonijev persulfat
cDNA	komplementarna DNA (complementary DNA)
Da	dalton, enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase čistega izotopa ^{12}C
dH ₂ O	destilirana voda
DTT	ditiotreitol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high performance liquid chromatography)
MeJA	metil jasmonat
MeSA	metil salicilat
miliQ	deionizirana voda
mRNA	informacijska RNA (messenger RNA)
OLP	osmotinu podobni proteini (osmotin-like proteins)
PAGE	paliakrilamidna gelska elektroforeza (polyacrylamide gel electrophoresis)
ppm	delcev na milijon (parts per million)
PR-proteini	proteini, povezani s patogenostjo (pathogenesis-related proteins)
SDS	natrijev dodecilsulfat (sodium dodecyl sulphate)
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamid
Tris	tris(hidroksimetil) aminometan

1 UVOD

Rastline so vezane na pritrjen način življenja. Da bi lahko sprejele dovolj hranil iz okolja, so morale zelo povečati absorpcijske površine. Obsežni nadzemni in podzemni deli pa so tako izpostavljeni številnim patogenim organizmom, herbivorom in različnim stresnim dejavnikom iz okolja, kot so npr. suša, nizka temperatura in spremenjen vodni režim. Za preživetje v spreminjačem se okolju je kjučen hiter odgovor rastlin na zunanje dražljaje in sprožitev obrambnih mehanizmov na različnih ravneh (Bowles, 1990).

Rastline so razvile mnoge mehanizme protimikrobne obrambe, med katerimi so tudi proteini povezani s patogenostjo (PR-proteini; iz angl.: pathogenesis-related proteins). Mnogi PR-proteini so zaradi specifičnega delovanja na različne patogene glive zanimivi pri proizvodnji novih biofungicidov in v transgenem inženirstvu pri razvoju rastlin, odpornih proti patogenim glivam.

V okviru raziskav skupine za eksperimentalno botaniko na Oddelku za biologijo so iz semen in radikul lanu (*Linum usitatissimum*) izolirali več proteinov, ki sestavljajo družino linusitinov, iz razreda PR-5. Dokazali so že, da se linusitinski geni izražajo tkivno specifično, predvsem v koreninah in kalicah, prav tako pa se izrazijo tudi v meristemuh poganjka. Kljub veliki sintezi *LIN1* mRNA v meristemuh poganjka, odgovarjajoči protein iz tega tkiva še ni bil izoliran.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OBRAMBNI MEHANIZMI RASTLINE

Rastline v nasprotju z živalmi za zaščito pred patogeni nimajo imunskega sistema, zato so razvile druge mehanizme protimikrobne obrambe, ki so lahko konstitutivni ali inducibilni (Anžlovar, 2002). Pri sesalcih sproženo obrambo predstavlja imunski sistem, kjer se visoko specializirane celice prenašajo po telesu. Ker se pri rastlinah celice ne prenašajo, je obrambni odgovor celično avtonomen. To pomeni, da lahko vsaka posamezna celica zazna in odgovori na napad patogenega mikrobnega organizma (Bonas in Lahaye, 2002) ali na različne abiotske dejavnike s predobstoječo ali sproženo obrambo. Del obeh tipov obrambe so različne protimikrobne snovi, med njimi tudi PR-proteini (ref. v Anžlovar, 2002).

2.2 PR-PROTEINI

Kopičenje proteinov povezanih s patogenostjo, je eden izmed načinov s katerim se rastline odzovejo na biotski in/ali abiotski stres (Walton, 1997). PR-proteini predstavljajo veliko skupino evolucijsko in strukturno sorodnih proteinov z nizko molekulsko maso (Van Loon in Van Strien, 1999). Izraz so prvič uporabili za skupino proteinov, izoliranih iz listov tobaka po okužbi z virusom tobačnega mozaika. Do sedaj so PR-proteine detektirali v mnogih rastlinskih vrstah (Van Loon in Van Strien, 1999).

Njihovo sintezo lahko izzovejo okužbe z virusi, bakterijami ali glivami (Stintzi in sod., 1993; Rodrigo in sod., 1993; Hu in Reddy, 1997), rastlinski rastni regulatorji (Koiwa in sod., 1994) in različni abiotski stresi (Singh in sod., 1987a; Rodrigo in sod., 1993; Zhu in sod., 1993; Grillo in sod., 1995). Akumulacija PR-proteinov predstavlja glavno količinsko spremembo v proteinski sestavi med preobčutljivostnim odgovorom rastline (Fritig in sod., 1998). Nekateri PR-proteini so pogosti tudi v zdravih tkivih (Van Loon in Van Strien, 1999; Anžlovar in sod., 1998; Anžlovar in sod., 2006; Anžlovar in sod., 2008).

Konstitutivno izražanje enega ali več PR-proteinov upočasni razvoj določenih bolezni (Hammond-Kosack in Jones, 1997).

2.2.1 Klasifikacija PR-proteinov

Prvotno izolirane PR-proteine iz tobaka so na podlagi biokemijskih in molekularno-bioloških raziskav uvrstili v pet razredov (PR-1 do PR-5). Danes je znanih sedemnajst razredov PR-proteinov (Van Loon in Van Strien, 1999), (preglednica 1). Znotraj posamezne družine imajo mnogi predstavniki podobno biološko delovanje, razlikujejo pa se v drugih lastnostih, kot so specifičnost na substrat, fizikalno-kemijske lastnosti ali lokalizacija v celici (Anžlovar, 2002).

Določili so tudi kriterija za vključitev novih družin PR-proteinov: (1) izražanje proteinov mora sprožiti patogen v tkivu, v katerem se ti navadno ne izražajo in (2) sprožitev izražanja mora biti dokazana v vsaj dveh različnih kombinacijah rastline in patogena ali pa dokazana v eni kombinaciji rastline in patogena v dveh različnih laboratorijih.

V znanstveni literaturi poleg opisov izoliranih proteinov najdemo tudi vse več mRNA (cDNA), ki po izpeljanih aminokislinskih zaporedjih spadajo med že obstoječe družine PR-proteinov, vendar jih brez informacij o vlogi ustreznegata proteina ne moremo uvrstiti v sedanjo nomenklaturo. Zato so določili, da bodo PR-homologe na cDNA ali genomske ravni, o katerih ni informacij o izražanju ali lastnostih kodirajočega proteina ali pa se izražajo v zdravih tkivih, poimenovali PR-podobni proteini (PRL; PR-like) (Van Loon in sod., 1994).

Preglednica 1: Razredi PR- proteinov (Fritig in sod., 1998; Van Loon in Van Strien, 1999).

družina	predstavnik	lastnosti	ciljna struktura ali način delovanja
PR-1	PR-1a iz tobaka	protiglivno delovanje	verjetno membrana
PR-2	PR-2 iz tobaka	β -(1,3)-glukanaze	celična stena
PR-3	P in Q iz tobaka	hitinaze tipa I, II, IV, V, VI, VII	celična stena
PR-4	"R" iz tobaka	hitinaze tipa I in II	celična stena
PR-5	S iz tobaka	podobni taumatinu	membrana
PR-6	Inhibitor I iz paradižnika	proteinazni inhibitorji	proteinaze
PR-7	P69 iz paradižnika	endoproteinaze	ni podatkov
PR-8	hitinaza iz kumare	hitinaze tipa III	celična stena
PR-9	peroksidaza iz tobaka	peroksidaze	protimikrobnna aktivnost
PR-10	"PR-1" iz peteršilja	podobni ribonukleazam	ni podatkov
PR-11	hitinaze V iz tobaka	hitinaze tipa I	celična stena
PR-12	Rs-APF3 iz redkve	defenzini	membrana
PR-13	THI2.1 iz repnjakovca	tionini	membrana
PR-14	LTP4 iz ječmena	prenosni proteini lipidov	membrana
PR-15	OxOa iz ječmena	oksalat oksidaza	nastane H_2O_2
PR-16	OxOLP iz ječmena	podobni oksalat oksidazi	ni podatkov
PR-17	PRp27 iz tobaka	nepoznane	ni podatkov

2.2.2 PR-5 proteini

Proteini razreda PR-5 so evolucijsko ohranjeni v rastlinskem kraljestvu (Anžlovar in Dermastia, 2003). Različne PR-5 proteine, ki se izražajo konstitutivno v semenu ali plodu, ali njihovo sintezo sproži stres, so izolirali iz tobaka, koruze, ječmena, soje, paradižnika, buče, fižola, kostanja (ref. v Anžlovar in Dermastia, 2003), lanu (Borgmeyer in sod., 1992; Anžlovar in sod., 1998), in drugih rastlin (Vigers in sod., 1991).

Aminokislinska zaporedja vseh proteinov PR-5 kažejo podobnost s sladkim proteinom taumatinom, izoliranim iz sadežev zahodno afriške enokaličnice *Thaumatococcus danielii* Benth. (Van der Wel in Loeve, 1972). Zato celo skupino PR-5 proteinov imenujemo tudi taumatini in taumatinu-podobni proteini.

Večina proteinov PR-5 je monomerov z molekulsko maso okoli 25 kDa. Vsi imajo ohranjen motiv šestnajstih cisteinskih ostankov. Pri enokaličnicah so odkrili nekaj manjših predstavnikov z molekulsko maso okrog 17,5 kDa, ki jim manjka šest od ohranjenih šestnajstih cisteinskih ostankov. Kljub temu delujejo protiglivno (Hu in Reddy, 1997).

Proteini razreda PR-5 se glede na izoelektrične točke delijo v tri podskupine: kisli (npr. PR-S), bazični (npr. osmotin) in nevtralni (npr. OLP) (Anžlovar, 2002; Min in sod., 2004). Člani kiske skupine so ponavadi nameščeni v zunajceličnem prostoru, medtem ko so bazični proteini večinoma v vakuoli rastlinske celice (Anžlovar, 2002). Bazični PR-5 imajo C-terminalni propeptid različnih dolžin (ref. v Anžlovar in Dermastia, 2003), ki se potranslacijsko odcepi. Vključen naj bi bil v prenos proteina, ki bi bil sicer nameščen v apoplastu, v vakuolo (Melchers in sod., 1993).

Poleg glavnih podskupin PR-5 proteinov, so opisali tudi nekaj drugih sorodnih proteinov. Nekateri izmed njih vsebujejo aminokislinsko zaporedje povezano s patogenezo le kot del daljšega proteina (Wang in sod., 1996; Kuboyama in sod., 1997) in imajo verjetno vlogo v normalnih razvojnih procesih v rastlini.

2.3 OSMOTINI IN OSMOTINU-PODOBNI PROTEINI

Znotraj družine PR-5 so določili posebno podskupino osmotina in njemu zelo sorodnih proteinov (OLP; iz angl.: osmotin-like proteins). V nasprotju z izvenceličnimi oblikami PR-5, se osmotini domnevno kopičijo v vakuoli celice (Anžlovar in Dermastia, 2003).

Osmotin, ki je bazična izoforma PR-5 proteinov, so prvotno izolirali iz suspenzijske kulture celic tobaka, prilagojenih na visoko slanost (Singh in sod., 1987a).

Do sedaj so iz mnogih rastlinskih vrst izolirali več osmotinu zelo podobnih proteinov (ref. v Anžlovar in Dermastia, 2003).

2.3.1 Biokemijske lastnosti

Zrele osmotine sestavlja od 203 do 230 aminokislinskih ostankov. Njihove molekulske mase so od 24 kDa do 28 kDa (Anžlovar in Dermastia, 2003). N-terminalno zaporedje, ki je dolgo od 20 do 30 aminokislinskih ostankov, ima funkcijo signalnega peptida in naj bi bilo odgovorno za transport proteina preko membrane endoplazemskega retikuluma (Cheong in sod., 1997). Na koncu signalnega peptida, na mestu cepitve, je med nekaj osmotini ohranjen položaj alanina (Min in sod., 2004).

Med vsemi znanimi bazičnimi osmotini je ohranjen tudi domnevni C-terminalni propeptid različnih dolžin (ref. v Anžlovar in Dermastia, 2003). Njegovo postranslacijsko cepitev so dokazali pri AP24 iz tobaka. Postranslacijska cepitev je verjetno odgovorna za pravilno vakuolno lokalizacijo osmotinov in OLP, ki bi bili sicer usmerjeni v apoplast (Melchers in sod., 1993). Vakuolno lokalizacijo so dokazali za osmotin (Singh in sod., 1987a) in P23 iz paradižnika (Rodrigo in sod., 1993). Glede na prisotnost C-terminalnega peptida v vseh znanih bazičnih PR-5 proteinih domnevajo, da so ti proteini v glavnem locirani v vakuoli (Anžlovar in Dermastia, 2003).

V splošnem so C-terminalni signalni peptidi vakuolnih proteinov zelo različno dolgi in ne vsebujejo ohranjenih motivov (Vitale in Raikhel, 1999; Frigerio in sod., 2001). Dokaz, da je C-terminalni del bazičnih PR-5 proteinov res odgovoren za namestitev znotraj celice, so podali Melchers in sod. (1993), ko so odkrili, da se vakuolni protein AP24 lahko izloča tudi zunajcelično, če mu odstranimo 20 aminokislin dolg C-terminalni del. Tudi pri nevtralnem osmotinu, podobnem proteinu iz tobaka, je skrajšanje C-terminalnega dela povzročilo, da se je izločal v zunajcelični prostor (Sato in sod., 1995). Poskusi s transgenimi rastlinami tobaka in krompirja, ki imajo izražen osmotin s podaljšanim C-terminalnim delom iz 20 aminokislin ali brez njega, so potrdili, da je ta del odgovoren za znotrajcelično namestitev proteina (Liu in sod., 1996). Pokazali so tudi, da dolžina C-terminalnega zaporedja osmotina ne vpliva na protiglivno delovanje proteina (Liu in sod., 1996).

Skupno vsem osmotinom in OLP, kot tudi drugim PR-5 proteinom, je ohranjenih 16 cisteinskih ostankov. Ti tvorijo osem disulfidnih vezi, ki stabilizirajo tridimenzionalno strukturo zrelega proteina in jo ščitijo pred proteolitično razgradnjo (Roberts in Selitrennikoff, 1990; Anžlovar, 2002; Min in sod., 2004).

Čeprav ima nekaj nativnih OLP (npr. p23 in PR-5d iz tobaka) kationski značaj z bazično ali skoraj nevtralno izoelektrično točko, analiza aminokislinskega zaporedja pripadajoče cDNA kaže, da naj bi bili proteini kisli. To nakazuje na možnost postranslacijske modifikacije (Koiwa in sod., 1997; Anžlovar, 2002). Glikozilacijo, kot modifikacijo OLP, so že dokazali za Srgp24 glikoprotein iz halofita *Mesembryanthemum crystallinum* (Yen in sod., 1994), izključili pa je niso tudi za 25 kDa PR-5 protein iz radiča (*Cichorium*) (Anžlovar in Dermastia, 2003).

Podobnost med aminokislinskimi zaporedji osmotina in osmotinu-podobnih proteinov je med 32 % za BhOLP iz *Benincasa hispida* do 97 % za AP24 iz *Nicotiana tabacum* (Anžlovar in Dermastia, 2003).

2.3.2 Izražanje osmotinov

2.3.2.1 Konstitutivno izražanje

Več raziskav kaže, da se osmotini konstitutivno izražajo tkivno-specifično. Prisotni so v semenih, listih, koreninah, zorečih plodovih in cvetnih popkih, kar so rastlinska tkiva, ki potrebujejo posebno zaščito (Anžlovar in Dermastia, 2003).

Najvišjo raven *AtOSM* mRNA iz rastline *Arabidopsis thaliana* so zasledili v starejših listih, kar kaže na preventivno zaščito pred patogeni. Transkripti *AtOSM* so v zelo nizki ravni konstitutivno prisotni tudi v koreninah (Capelli in sod., 1997). Tudi sicer se večina osmotinov v koreninah konstitutivno izraža le v manjši meri (Anžlovar in Dermastia, 2003). Podobno nizko raven v koreninah so dokazali tudi za *BFTP* mRNA (Cheong in sod., 1997), v koreninah tobaka pa so zasledili tudi nizko raven osmotina (Koiwa in sod., 1994). Nasprotno je največ PhOSM (*Petunia hybrida*) (Kim in sod., 2002) in LIN1 (Anžlovar, 2002) mRNA izražene prav v koreninah. Osmotin so našli v cvetočih rastlinah tobaka (Neale in sod., 1990) in *BFTP* mRNA v cvetnih popkih (Cheong in sod., 1997), kar kaže na vlogo pri zaščiti cvetov pred mikrobnimi infekcijami. *BFTP* mRNA je bila zmerno izražena tudi v steblu, zelo nizko raven pa so našli tudi v koreninah in v listih (Cheong in sod., 1997). Dve izoformi paradižnikovih osmotin-podobnih proteinov, NP24 I in NP24 II, se različno pojavljata med procesom zorenja plodov (Pressey, 1997). Tako linusitin (Anžlovar in sod., 1998) kot OLP iz *Benincasa hispida* (Shih in sod., 2001) so izolirali iz semen rastlin, kjer naj bi imela zaščitno vlogo pri kalitvi semena.

Izražanje osmotinov je tudi razvojno regulirano. Tako je izražanje gena za PhOSM časovno uravnano z razvojem pestiča in obnovitvijo celične stene (Kim in sod., 2002). Poročali so tudi o koordinirani sintezi proteina CsTL1 in endohitinaze med razvojem semena in kalitvijo (Garcia-Casado in sod., 2000).

2.3.2.2 Inducirano izražanje

Indukcija osmotinov je posledica osmotskega šoka, ki ga lahko povzročijo abiotiski in biotski stresi. Suša, zmrzal ter povečana slanost tal povzročijo v rastlinskih celicah dehidracijo in s tem osmotski šok. Prav tako lahko napad patogena in ranitev tkiva povzročita osmotski šok zaradi iztekanja vode iz poškodovane celice. Na take stresne razmere se rastlina odzove s sprožitvijo različnih signalnih poti obrambe, ki vključujejo tudi sintezo osmotinov. Del teh poti so različni rastlinski rastni regulatorji, še posebej abscizinska kislina, salicilna kislina, jasmonska kislina in etilen (Zhu in sod., 1995a; Kim in sod., 2002).

Kopičenje mRNA za osmotin sproži abscizinska kislina (LaRosa in sod., 1985; Singh in sod., 1987b; Skriver in Mundy, 1990; Zhu in sod., 1993; Grillo in sod., 1995). Izražanje PhOSM proteina sproži okužba s patogenimi glivami in bakterijami, obdelava s salicilno in jasmonsko kislino ter ranitev (Kim in sod., 2002). Promoter gena *OSML13* in *OSML81* pri rastlini *Solanum commersonii* inducira okužba s *Phytophthora infestans*, obdelava s salicilno kislino, NaCl, abscizinsko kislino in rast na 4°C (Zhu in sod., 1995b). Kopičenje OLP, nevtralne oblike tobakovega PR-5, je povezano s solnim stresom in izpostavitvijo etilenu, ne pa tudi salicilni kislini (Koiwa in sod., 1994; Sato in sod., 1996). Zaradi osmotskega stresa pride do izražanja gena za osmotin in kopiranja proteina (LaRosa in sod., 1992; Grillo in sod., 1995). Ti primeri kažejo na zapleteno indukcijo in regulacijo osmotinskih genov.

2.4 PROTEINSKA DRUŽINA LINUSITINOV

Mnogo raziskav kaže, da osmotinski proteini obstajajo v majhnih proteinskih družinah v številnih rastlinah. Iz lanu so do sedaj izolirali dva proteina, ki ju po njunih biokemijskih lastnostih uvrščamo med osmotine. Linusitin so izolirali iz zdravih semen (Anžlovar in sod., 1998) in radikul kalic (Buh, 2004; Klančnik, 2005), LIN1 pa iz radikul zdravih kalic (Klančnik, 2005; Anžlovar in sod., 2006).

Linusitin je 25 kDa protein, za katerega je poznano le aminokislinsko zaporedje za N-konec (Borgmeyer in sod., 1992). Je termostabilen in deluje protiglivno z optimumom aktivnosti v nizkem pH območju (Anžlovar in sod., 1998). LIN1 pa je 23 kDa protein za katerega je poznano celotno nukleotidno zaporedje gena in izpeljano aminokislinsko zaporedje (Anžlovar in sod., 2006). Primerjava izpeljanega aminokislinskega zaporedja *LIN1* gena z N-terminalnim zaporedjem linusitina iz semen lanu (Borgmeyer in sod., 1992) je razkrila neujemanje v 11 od 37 aminokislin (Anžlovar in sod., 2006). Neskladnost zaporedij so nadalje potrdili s primerjavo prvih 5 aminokislin (AVIDI) N-terminalnega zaporedja LIN1 z odgovarjajočim zaporedjem (ARFDI) v linusitinu. Ker izpeljano aminokislinsko zaporedje *LIN1* gena in znano delno N-terminalno zaporedje izoliranega proteina LIN1 (Anžlovar in sod., 2006) kaže veliko podobnost z zaporedjem proteina linusitina (Anžlovar in sod., 1998), sklepajo, da sta linusitin in LIN1 predstavnika iste proteinske družine v lanu (Anžlovar in sod., 2006). Njuna lokalizacija in možne vloge v razvoju rastline pa se razlikujejo (Anžlovar in sod., 2006). Glavna razlika med obema proteinoma je izoelektrična točka. Za linusitin so eksperimentalno določili bazično izoelektrično točko (pI je med 8,6 in 10) (Anžlovar in sod., 1998), iz izpeljanega aminokislinskega zaporedja pa so za LIN1 izračunali kislo izoelektrično točko (pI = 4,9) (Anžlovar in sod., 2006).

Predviden zrel LIN1 protein kaže 72 % - 65 % identičnost z osmotinu-podobnimi proteini in 53 % identičnost s taumatinom. LIN1 ima najvišjo stopnjo identičnosti (72 %) z bazičnim proteinom OSML13 iz *Solanum commersonii* (Anžlovar in sod., 2006), 69 % identičnost ima z osmotinom in 65 % s PR-5d (Anžlovar in sod., 2006).

Skupna lastnost PR-5 proteinov je njihovo protiglivno delovanje (Anžlovar in Dermastia, 2003). V prejšnjih študijah linusitinske proteinske družine so pokazali, da linusitin deluje proti glivi *Alternaria alternata* in povzroči nastanek por v liposomih, sestavljenih iz podobnih membranskih lipidov kot pri glivah (Anžlovar in sod., 1998). Molekule linusitina naj bi zaradi elektrostatske privlačnosti reagirale z negativnimi fosfolipidi v glivni membrani, dokaz za to pa je povečana aktivnost linusitina ob povečani količini negativnega naboja v liposomalnih membranah. Vir negativnega naboja je relativno nepomemben, kar kaže, da gre lahko za nespecifično ionsko interakcijo. Linusitin deluje na

čiste liposomske membrane, zato mehanizem delovanja ne vključuje interakcije z membranskimi kanalčki ali receptorji (Anžlovar in sod., 1998).

Glede na visoko stopnjo identičnosti med linusitom in LIN1 in glede na prisotnost kisle reže in fenilalaninskih ostankov, ki naj bi bili odgovorni za protiglivno delovanje PR-5 proteinov, so sprva o podobnem delovanju sklepali tudi za LIN1 (Anžlovar in sod., 2006). Vendar pa je Jazbec (2007) v svoji diplomski nalogi dokazala, da je zaradi majhne razlike v aminokislinski sestavi, aktivnost teh dveh proteinov različna. LIN1 ne vpliva na rast gliv *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces hansenii*, *Hortaea werneckii* ter *Alternaria alternata*. Prav tako ne deluje na protoplaste testnih kvasovk, niti ne lizira umetnih liposomskih membran (Jazbec, 2007). Z dobljenimi rezultati so potrdili, da sta linusitin in LIN1 dva funkcionalno različna proteina iz skupine osmotinov.

2.4.1 Izražanje LIN1

Gen *LIN1* je v zdravih rastlinah lanu razvojno reguliran, transkripti pa se akumulirajo tkivno specifično (Anžlovar in sod., 2008). Da bi bolje razumeli vlogo LIN1 v razvoju in obrambi rastlin so z metodo hibridizacije northern (Anžlovar, 2002; Kogovšek, 2004; Anžlovar in sod., 2006) in z *in situ* hibridizacijo (Nikolić, 2006; Anžlovar in sod., 2008) sledili časovnemu in prostorskemu izražanju *LIN1* gena. Z obema metodama so najmočnejši signal zasledili v koreninah kalic in starejših rastlin (Anžlovar in sod., 2006, 2008). Specifično izražanje *LIN1* v koreninskih tkivih sovpada s prisotnostjo pogosto ponovljenega ATATT koreninskega motiva v njegovem promoterskem zaporedju. Ta motiv so prvotno našli v promoterju roLD genov, ki se v primerjavi z izražanjem v listih, preferenčno izražajo v koreninah (Pujade-Renaud in sod., 2005). O podobno prevladajočem koreninskem izražanju so poročali tudi za CAOSM1 mRNA iz *Capsicum annuum* (Hong in sod., 2004), PhOSM mRNA (Kim in sod., 2002) in PR-5d (Koiwa in sod., 1994). Vsi ti proteini kažejo visoko podobnost zaporedij z LIN1 (Anžlovar in Dermastia, 2003). V nasprotju pa so bile pri proteinih z manjšo homologijo z LIN1, kot so PR-5 protein BFTP (Cheong in sod., 1997) ali OLP iz *Arabidopsis thaliana* (Capelli in

sod., 1997), prisotne v koreninah zelo nizke ravni njihovih mRNA, ki pa so bile izražene večinoma v zgornjih delih rastlin, vključno s cvetovi.

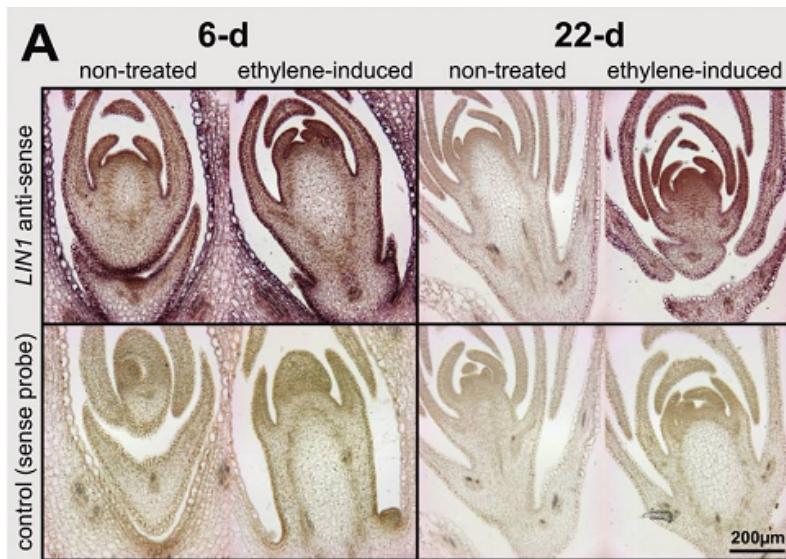
Ko so rastline lanu izpostavili različnim stresnim dejavnikom so ugotovili, da se *LIN1* ne odziva na obdelavo rastlin z MeJA (metil jasmonat) ali MeSA (metil salicilat) (Anžlovar, 2002), niti na obdelavo z NaCl, izpostavitvijo nizki temperaturi ali na ranitev (Kogovšek, 2004). Izražanje *LIN1* mRNA je v določenih tkivih sprožila le obdelava rastlin z etilenom (Kogovšek, 2004; Nikolić, 2006; Anžlovar in sod., 2008).

LIN1 mRNA se v mlajših rastlinah kopiči v vseh organih, ne glede na predhodno obdelavo rastlin z etilenom (Nikolić, 2006). S staranjem rastlin se spreminja tudi način izražanja *LIN1*. Konstitutivno se izraža v koreninah, v manjši meri pa tudi v nadzemnih tkivih (Nikolić, 2006).

Sistemsko konstitutivno izražanje so zaznali v 1 dan starih kalicah in v 6 dni starih rastlinah, pri katerih pa so mlajša tkiva (vršiček poganjka in mlade stranske korenine) vsebovale več *LIN1* mRNA (Nikolić, 2006). V 1 dan starih kalicah so največ *LIN1* mRNA zasledili v radikulah, prevodnih tkivih hipokotila in vršičku poganjka. V 6 dni starih sadikah se je kopiranje *LIN1* mRNA v vršičku poganjka povečalo (slika 1), v koreninah pa je bilo konstitutivno izražanje nizko in se ni povišalo po izpostavitvi etilenu (Nikolić, 2006; Anžlovar in sod., 2008).

V 22 dni starih rastlinah so dokazali visoko stopnjo konstitutivnega izražanja *LIN1* v koreninah ter nekoliko nižjo v hipokotilu in steblu. Tudi tukaj v koreninah ni prišlo do indukcije z etilenom (Nikolić, 2006; Anžlovar in sod., 2008).

V starejših rastlinah konstitutivnega izražanja v vršičku poganjka niso več zaznali. Po obdelavi rastlin z etilenom pa se je *LIN1* mRNA močno izrazila tudi v vršičku poganjka (slika 1) in listih 22 dni starih rastlin (Nikolić, 2006; Anžlovar in sod., 2008).



Slika 1: *In situ* hibridizacija *LIN1* mRNA v apikalnem meristemu poganjka 6 in 22 dni starih rastlin.

Hibridizacijski signal z antisense sondom (*LIN1* anti-sense) je viden kot vijolično obarvanje na zgornji polovici slike. Spodnji del slike prikazuje kontrolne rezine hibridizirane s sense sondom (control (sense probe)). Prikazane so rezine netretiranih (non-treated) in z etilenom induciranih (ethylene-induced) 6 in 22 dni starih rastlin (Anžlovar in sod., 2008).

Zaradi konstitutivne prisotnosti *LIN1* mRNA med kalitvijo in zaradi izključne indukcije z etilenom ter z nobenim drugim s patogenom-povezanim stimulatorjem, sklepajo, da kopiranje *LIN1* mRNA ni običajen odziv obrambnega tipa (Anžlovar in sod., 2008). To potrjujejo tudi rezultati, ki kažejo, da LIN1 ne deluje protiglivno (Jazbec, 2007). To bi bilo lahko povezano s samo dvema *cis*-elementoma v okvirju W v promoterski regiji *LIN1* gena. Tako je mogoče, da je povišana raven *LIN1* izražanja v mladih rastlinah del predhodnega obrambnega sistema, kot je predvideno tudi za hitinazo iz popra (Hong in Hwang, 2002), ali da LIN1 deluje v kombinaciji z drugimi PR-proteini. Glede na rezultate bi lahko alternativni scenarij vključeval LIN1 kot del regulatorne mreže vpletene v kalitev semen lanu (Anžlovar in sod., 2008).

2.5 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

2.5.1 Namen dela

Izolacija linusitinskih proteinov iz semen in radikul lanu je izredno težavna in zamudna. Ker je nativen protein LIN1 nujen za mnoge nadaljnje analize, bomo v diplomski nalogi protein po predhodni etilenski indukciji poskusili izolirali iz meristemov poganjka.

2.5.2 Hipoteze

Ker je sinteza mRNA za LIN1 po etilenski indukciji v meristemu poganjka velika, predvidevamo, da so meristemi dober vir linusitinskega proteina.

Predvidevamo, da bomo za izolacijo LIN1 iz meristemov poganjka morali metodo izolacije iz semen in radikul spremeniti oz. prilagoditi.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

3.1.1 Vzgoja rastlin

Uporabili smo semena lanu (*Linum usitatissimum* L.) dveh blagovnih znamk in sicer Biotop (Mediacor, d.o.o.) ter Natura (Žito). Semena smo posejali v lončke in korita. Uporabili smo zemljo za presajanje Valentin. Rastline so rasle v laboratoriju in rastlinjaku (izmenjava svetlobe in teme na 12 ur, 22°C), kjer je bila rast rastlin tudi mnogo hitrejša.

3.1.2 Obdelava rastlin z etilenom

Približno polovico vseh vzgojenih rastlin smo obdelali z etilenom. Lonček z 11 do 21 dni starimi rastlinami smo postavili v komoro za anaerobno gojenje mikroorganizmov. S pomočjo črpalk smo ustvarili vakuum ter komoro takoj nato napolnili z etilenom v koncentraciji 5 ppm. Atmosfero smo zamenjali tako, da smo komoro trikrat prepihalo z etilenom. Rastline smo v etilenu inkubirali 48 do 72 ur.

3.1.3 Priprava vršičkov poganjkov rastlin za izolacijo

Za izolacijo smo uporabili vršičke poganjkov lanu, ki so bili dolgi od 3 do 10 mm. Vsem rastlinam, tako obdelanim z etilenom kot neobdelanim, smo potrgali vršičke poganjkov. Vršičke smo sprva pripravljali v hladni sobi pri 4°C in kasneje v laboratoriju pri sobni temperaturi. Vršičke smo zamrznili v tekočem dušiku (-196°C) in jih shranili v skrinji pri -80°C.

3.2 IZOLACIJA PROTEINA

3.2.1 Izolacijski postopek

Za osnovo smo izbrali metodo, ki jo je za izolacijo linusitina iz semen lanu priredila Anžlovar (1997) po Borgmeyerju s sodelavci (1992).

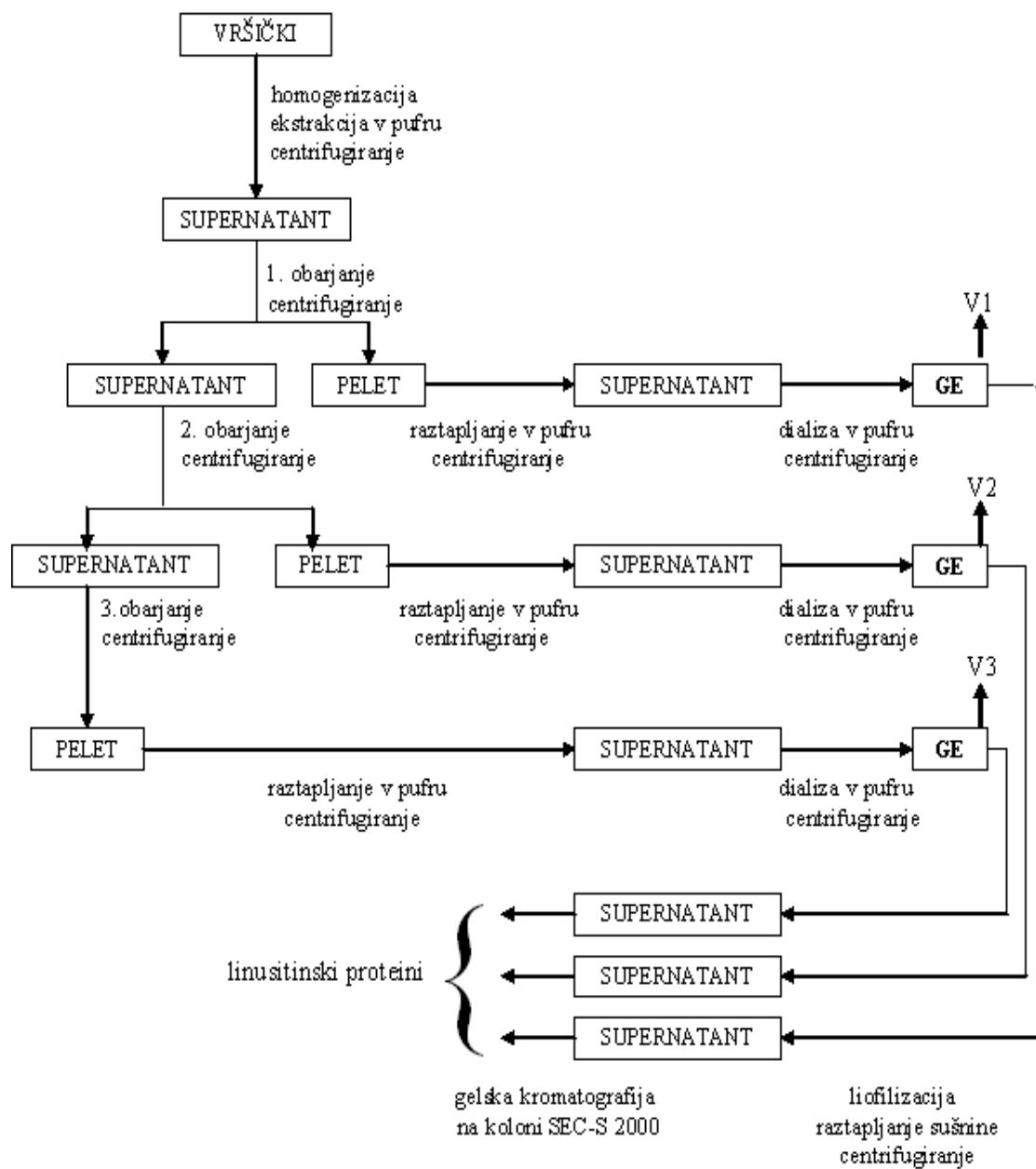
Pri izolaciji smo izpustili obarjanje s polietileniminom in ekstrakcijo s hitinom. Poleg tega smo namesto enkratnega obarjanja z amonijevim sulfatom do 60 % nasičenosti, izvedli frakcionirano obarjanje z amonijevim sulfatom do 25 %, 50 % in 75 % nasičenosti.

Izvedli smo pet zaporednih serij poiskusov in sicer: 1. izolacija - N, 2. izolacija - N, 3. izolacija - E, 4. izolacija - N in 5. izolacija - E. Oznaka N se nanaša na rastlinski material, ki ga nismo obdelali z etilenom, oznaka E pa na rastlinski material obdelan z etilenom.

Pri vseh izolacijah razen pri 2. izolaciji, kjer smo uporabili Na-acetatni pufer s pH 5.0, smo uporabili Na-bikarbonatni pufer s pH 8,4.

Pri 1., 2., in 3. izolaciji smo uporabili 25 g rastlinskega materiala, pri 4. in 5. izolaciji pa 50 g rastlinskega materiala.

Shema izolacije linusitinskih proteinov je prikazana na sliki 2.



Slika 2: Shema izolacije linusitinskih proteinov

V1 vzorec grobega ekstrakta po 1. obarjanju

V2 vzorec grobega ekstrakta po 2. obarjanju

V3 vzorec grobega ekstrakta po 3. obarjanju

GE grobki ekstrakt

3.2.2 Ekstrakcija proteina

3.2.2.1 Priprava pufrov za ekstrakcijo proteina

200 mM Na-bikarbonatni pufer, pH 8.4 - za 1000 ml

- 16,80 g Na-bikarbonata (Riedel de Höen)
- dolijemo ~ 900 ml dH₂O

Z dodajanjem 5 M NaOH in 1 M HCl uravnamo pH vrednost na 8,4 in dolijemo dH₂O do 1000 ml. Avtoklaviramo in shranimo pri sobni temperaturi. Pred uporabo redčimo 10-krat z dH₂O do koncentracije 20 mM in po potrebi uravnamo pH vrednost.

200 mM Na-acetatni pufer, pH 5.0 - za 1000 ml

- 16,41 g Na-acetata (POCH)
- dolijemo ~ 900 ml dH₂O

Z dodajanjem 5 M NaOH in 1 M HCl uravnamo pH vrednost na 5,0 in dolijemo dH₂O do 1000 ml. Avtoklaviramo in shranimo pri sobni temperaturi. Pred uporabo redčimo 10-krat z dH₂O do koncentracije 20 mM in po potrebi uravnamo pH vrednost.

3.2.2.2 Ekstrakcija v 20 mM Na-bikarbonatnem pufru s pH 8,4

Opisan je postopek pri katerem smo uporabili 25 g rastlinskega materiala. Pri uporabi 50 g rastlinskega materiala smo samo ustrezno povečali volumen dodanega pufra.

Vse stopnje ekstrakcije so potekale v hladni sobi pri temperaturi 4°C. Vršičke poganjkov (25 g) smo zamrznili v tekočem dušiku (-196°C) ter globoko zamrznjen rastlinski material trli v terilnici približno 30 minut oz. dokler nismo dobili drobnega prahu. Ker so bazični osmotinski proteini, vključujoč linusitin, predvidoma v vakuoli rastlinske celice, je popolna razdrobitev le-teh nujna za uspešno izolacijo. Homogenizirani material smo ekstrahirali 1 uro v 100 ml 20 mM Na-bikarbonatnem pufru s pH 8,4. Usedlino smo odstranili s centrifugiranjem (5000 obratov/min, 15 min) (centrifuga Sigma 3K30) in jo

zavrgli. Proteine v supernatantu smo oborili z dodatkom amonijevega sulfata (Merck) do 25 % nasičenosti z mešanjem na magnetnem mešalu 11 ur. Oborjene proteine smo zbrali s centrifugiranjem (15000 obratov/min, 15 min) ter jih raztopili v minimalni količini (približno 20 ml) 20 mM Na-bikarbonatnega pufra s pH 8,4. Supernatant smo ponovno oborili z dodatkom amonijevega sulfata do 50 % nasičenost z mešanjem na magnetnem mešalu 11 ur. Oborjene proteine smo zopet zbrali s centrifugiranjem (15000 obratov/min, 15 min) ter jih raztopili v minimalni količini 20 mM Na-bikarbonatnega pufra s pH 8,4. Nato smo supernatant še enkrat oborili z dodatkom amonijevega sulfata do 75 % nasičenosti z mešanjem na magnetnem mešalu 11 ur ter oborjene proteine ponovno zbrali s centrifugiranjem (15000 obratov/min, 15 min) in jih raztopili v minimalni količini 20 mM Na-bikarbonatnega pufra s pH 8,4. Supernatant smo zavrgli. Raztopljeni proteini iz vseh treh obarjan smo najprej centrifugirali (15000 obratov/min, 15 min) in nato dializirali (uporabili smo dializne membrane Spectrum, pore z območjem ločevanja od 12 do 14 kDa) proti 20 mM Na-bikarbonatnem pufru s pH 8,4. Dializo smo izvajali 9 ur, pri čemer smo dvakrat zamenjali pufer. Po dializi smo material centrifugirali (15000 obratov/min, 15 min) ter shranili grobi ekstrakt.

Iz vsake stopnje ekstrakcije smo odvzeli po 1 ali 2 ml vzorca (V1, V2, V3) (slika 2). Vzorčke smo shranili za analizo koncentracije proteinov in preverjanje čistosti in velikosti proteinov z SDS-PAGE elektroforezo.

Tako grobe ekstrakte kot vzorce smo shranili v hladilniku na 4°C.

3.2.2.3 Ekstrakcija v 20 mM Na-acetatnem pufru s pH 5,0

Ekstrakcijo smo izvedli popolnoma enako kot v 3.2.2.2, le da smo uporabili 20 mM Na-acetatni pufer s pH 5,0.

3.2.3 Koncentriranje

Grobe ekstrakte, vzorce in frakcije pridobljene s HPLC, smo koncentrirali z liofilizacijo v liofilizatorju Christ Alpha 2-4, tako da smo jih posušili do suhega in raztopili v znanem volumnu dH₂O.

3.2.4 Gelska kromatografija s HPLC

3.2.4.1 Priprava pufrov za kromatografijo

200 mM Na-bikarbonatni pufer, pH 8.4

Pripravimo na enak način kot opisano v 3.2.2.1, le da namesto dH₂O uporabimo miliQ.

0,1 M NaH₂PO₄, pH 3.0 (pufer za spiranje kolone po uporabi) – za 1000 ml

- 13,80 g NaH₂PO₄ · H₂O (Acros Organics)
- dolijemo ~ 900 ml miliQ

Z dodajanjem 1 M HCl uravnamo pH vrednost na 3,0 in dolijemo miliQ do 1000 ml.

Avtoklaviramo in shranimo pri sobni temperaturi.

3.2.4.2 Potek kromatografije

Pred nanosom vzorca na kromatografsko kolono je priporočljivo vzorec filtrirati, da iz njega odstranimo neraztopljene delce. Zaradi adsorpcije proteinov na membrane filtra (Buh, 2004) smo filtracijo nadomestili s centrifugiranjem vzorca (15000 obratov/min, 10 min) tik pred kromatografijo.

Grobe ekstrakte smo ločevali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z napravama Waters 996 in Waters 2690. Uporabili smo gelsko kolono BioSep SEC S-2000 (Phenomenex), ki ima prostornino 15 ml in območje ločevanja proteinov velikosti od 1 do

300 kDa. Kot mobilno fazo smo uporabili 20 mM Na-bikarbonatni pufer s pH 8,4. Ločevanje je potekalo pri pretoku 1,0 ml/min. Na kolono smo nanašali po 200 µl grobega ekstrakta. Absorpcijo smo merili pri valovni dolžini 280 nm. Zbirali smo frakcije posameznih vrhov.

3.3 DOLOČANJE NEKATERIH BIOKEMIJSKIH LASTNOSTI PROTEINA

3.3.1 Merjenje količine proteinov

Količino proteinov smo določali po metodi BCA. Reagente za BCA Protein Assay (Pierce, ZDA) smo mešali v razmerju A : B je 50 : 1. 10 µl vzorca v eppendorfovi epruveti smo dopolnili z 90 µl miliQ in 2 ml mešanice reagentov ter 30 minut inkubirali pri 37°C. Mešanico smo po inkubaciji takoj prelili v kiveto in spektrofotometrično (Perkin Elmer, Lambda BIO UV/VIS Spektrometer) pri valovni dolžini 562 nm izmerili absorbanco.

Koncentracijo proteinov smo določili iz umeritvene krivulje. Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili goveji serumski albumin (Merck).

3.3.2 SDS-PAGE elektroforeza

Proteine iz grobega ekstrakta, vzorcev in frakcij pridobljenih s HPLC smo ločili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE) v natrijevem dodecil sulfatu (SDS).

Napravo za elektroforezo (BioRad) smo sestavili po navodilih proizvajalca.

3.3.2.1 Kemikalije in priprava raztopin

- BioRad: 40 % akrilamid
- Merck: APS (amonijev persulfat), bromfenol modro, glicin, glicerol, SDS, TrisHCl, Tris
- Sigma: DTT (ditiotreitol), TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamid)

2x nanašalni pufer – za 100 ml

Zatehtamo 2 g SDS in 0,2 g bromfenol modro. Dolijemo 10 ml glicerola in 50 mM TrisHCl s pH 6,8 do 100 ml. Shranimo pri sobni temperaturi.

10x SDS elektroforetski pufer – za 1000 ml

Zatehtamo 10 g SDS, 30,3 g Tris in 144 g glicina ter dolijemo dH₂O do 1000 ml. Shranimo pri sobni temperaturi. Pred uporabo 10x redčimo, da dobimo 1x SDS.

10 % SDS - za 100 ml

Zatehtamo 10 g SDS in dolijemo dH₂O do 100 ml. Shranimo pri sobni temperaturi.

1 M DTT – za 1 ml

Zatehtamo 0,154 g DTT in dolijemo dH₂O do 1 ml. Shranimo pri -80°C.

1,5 % APS – za 100 ml

Zatehtamo 1,5 g APS in dolijemo dH₂O do 100 ml. Alikvotiramo in shranimo pri -80°C.

0,5 M Tris pufer, pH 6.8 – za 100 ml

Zatehtamo 6,06 g Tris in dolijemo dH₂O do 90 ml. Z 1 M HCl uravnamo pH vrednost na 6,8 in dolijemo dH₂O do 100 ml. Shranimo pri sobni temperaturi.

3 M Tris pufer, pH 8.8 – za 100 ml

Zatehtamo 36,34 g Tris in dolijemo dH₂O do 90 ml. Z 1 M HCl uravnamo pH vrednost na 8,8 in dolijemo dH₂O do 100 ml. Shranimo pri sobni temperaturi.

3.3.2.2 Sestava 12 % ločevalnega poliakrilamidnega gela

- 1,8 ml akrilamid
- 3,104 ml dH₂O
- 0,750 ml 3 M Tris pufer, pH 8.8
- 40 µl 10 % SDS

- 300 µl 1,5 % APS
- 6 µl TEMED

3.3.2.3 Sestava 4 % nanašalnega poliakrilamidnega gela

- 0,5 ml akrilamid
- 2,945 ml dH₂O
- 1,25 ml 0,5 M Tris pufer, pH 6.8
- 50 µl 10 % SDS
- 250 µl 1,5 % APS
- 5 µl TEMED

3.3.2.4 Priprava vzorcev za elektroforezo

V ependorffovi epruveti smo zmešali 10 µl vzorca, 10 µl 2x nanašalnega pufra in 5 µl DTT, ki je reducent in s cepitvijo disulfidnih vezi povzroči denaturacijo proteinov. V kasnejših poskusih smo dodajali po 2 µl DTT. Mešanico smo 5 minut kuhalili na 95°C in nato centrifugirali (13200 obratov/min, 10 sekund) (centrifuga Eppendorf centrifuge 5415D).

3.3.2.5 Nanašanje vzorcev na gel

V jamice na poliakrilamidnem gelu smo nanašali po 20 µl vzorca.

Uporabili smo standard (Page Ruler), ki vsebuje mešanico 10 rekombinantnih, visoko očiščenih obarvanih proteinov z molekulsko maso od 11 do 170 kDa, in sicer: 11 kDa, 17 kDa, 26 kDa, 34 kDa, 43 kDa, 56 kDa, 72 kDa, 95 kDa, 130 kDa in 170 kDa.

3.3.2.6 Potek elektroforeze

V začetnih poskusih smo elektroforezo izvajali na 200 V približno 35 minut. V kasnejših poskusih pa smo napetost znižali na 150 V in kasneje na 100 V in temu primerno podaljšali čas ločbe proteinov.

3.3.3 Barvanje gela po elektroforezi

V prejšnjih poskusih izolacije linusitinskih proteinov (Anžlovar, 1997; Buh, 2004; Klančnik, 2005) so gele barvali s Coomassie modrim in s srebrovim nitratom. Barvanje s srebrovim nitratom je do 100-krat občutljivejše od barvanja s Coomassie modrim.

V našem poskusu izolacije smo se zaradi enostavnosti postopka in večje občutljivosti najprej odločili za barvanje gelov z barvilm PageBlue (Fermentas), katerega občutljivost barvanja proteinov je ravno nekje med občutljivostjo Coomassie modrega in srebrovega nitrata (Podlesek, osebni razgovor). Gele smo barvali po navodilih proizvajalca.

3.3.3.1 Barvanje s srebrovim nitratom

3.3.3.1.1 Kemikalije in priprava raztopin

- Merck: natrijev tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), natrijev karbonat (Na_2CO_3), srebrov nitrat (AgNO_3), formaldehid
- Carlo Erba Reagents: etanol, ocetna kislina

Vse raztopine smo pripravili tik pred uporabo.

Raztopina 1: 40 % etanol in 20 % ocetna kislina - za 100 ml

- 42 ml 96 % etanola
- 10 ml 99, 9 % ocetne kisline
- dH_2O do 100 ml

0,02 % natrijev tiosulfat - za 100 ml

- 0,02 g Na₂S₂O₃
- dH₂O do 100 ml

0,15 % srebrov nitrat - za 100 ml

- 0,15 g AgNO₃
- dH₂O do 100 ml

Razvijalec: 2 % natrijev karbonat in 0,04 % formaldehid - za 400 ml

- 8 g Na₂CO₃
- 0,432 ml 37 % formaldehida
- dH₂O do 400 ml

1 % ocetna kislina - za 100 ml

- 1 ml 99,9 % ocetne kisline
- dH₂O do 100 ml

3.3.3.1.2 Postopek barvanja

Gele smo barvali v kadičkah ob konstantnem mešanju. Gel smo najprej 20 minut fiksirali v raztopini 1 in ga nato 2-krat po 15 minut spirali v dH₂O. Nato smo ga 1 minuto inkubirali z 0,02 % natrijevim tiosulfatom in nato 2-krat po 1 minuto spirali z dH₂O. Dodali smo ledeno mrzel 0,15 % srebrov nitrat in inkubirali 20 minut. Potem smo gel ponovno 2-krat po 1 minuto spirali z dH₂O. Dodali smo manjšo količino razvijalca, ga po 10 sekundah odlili in postopek ponovili. Nato smo dodali večjo količino razvijalca in na gelu opazovali pojavljanje proteinskih lis. Na koncu smo gel fiksirali v 1 % ocetni kislini.

4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJSKEGA POSTOPKA

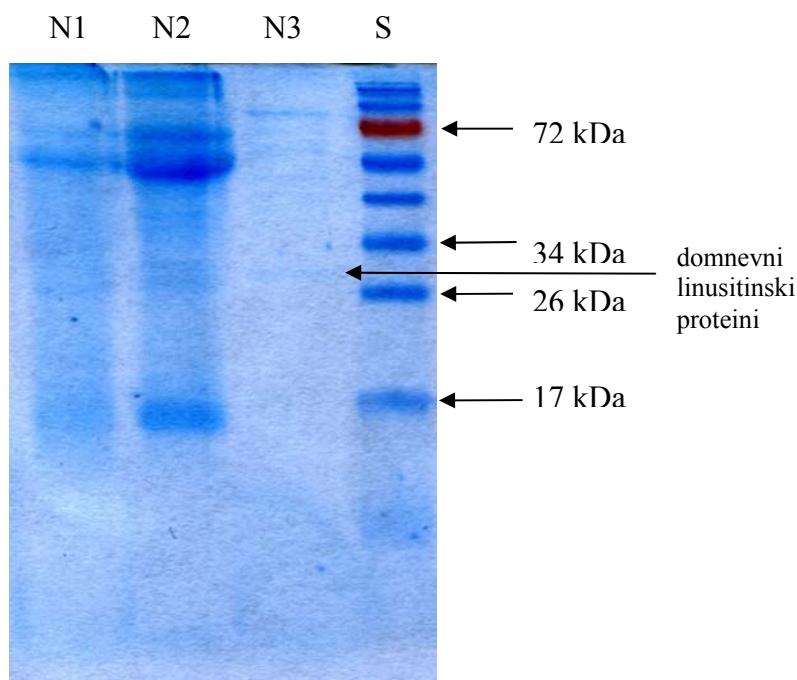
Na vse elektroforezne gele (slika 3-6) smo nanašali grobi ekstrakt iz vzorca odvzetega med izolacijo (V1, V2, V3). Proteine na gelu smo vizualizirali z barvilom PageBlue (slika 3, 4) in s srebrovim nitratom (slika 5, 6).

4.1.1 SDS-PAGE elektroforeza grobega ekstrakta po ekstrakciji

Po ekstrakciji proteinov v dveh različnih pufrih smo z SDS-PAGE elektroforezo grobega ekstrakta preverili v katerem pufru dobimo večji izkoristek proteinov z velikostjo okoli 26 kDa.

4.1.1.1 SDS-PAGE elektroforeza po ekstrakciji v Na-bikarbonatnem pufru pH 8,4

Na gelu vzorcev iz neobdelanih rastlin (slika 3) je po vseh treh obarjanjih vidna proteinska lisa okoli 26 kDa. Lisa je najmočnejša po 2. obarjanju. V vzorcu po 3. obarjanju se zelo šibka proteinska lisa nahaja rahlo nad velikostjo 26 kDa standarda.



Slika 3: SDS-PAGE elektroforeza grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po obarjanju z amonijevim sulfatom - neobdelane rastline (obarvano s PageBlue).

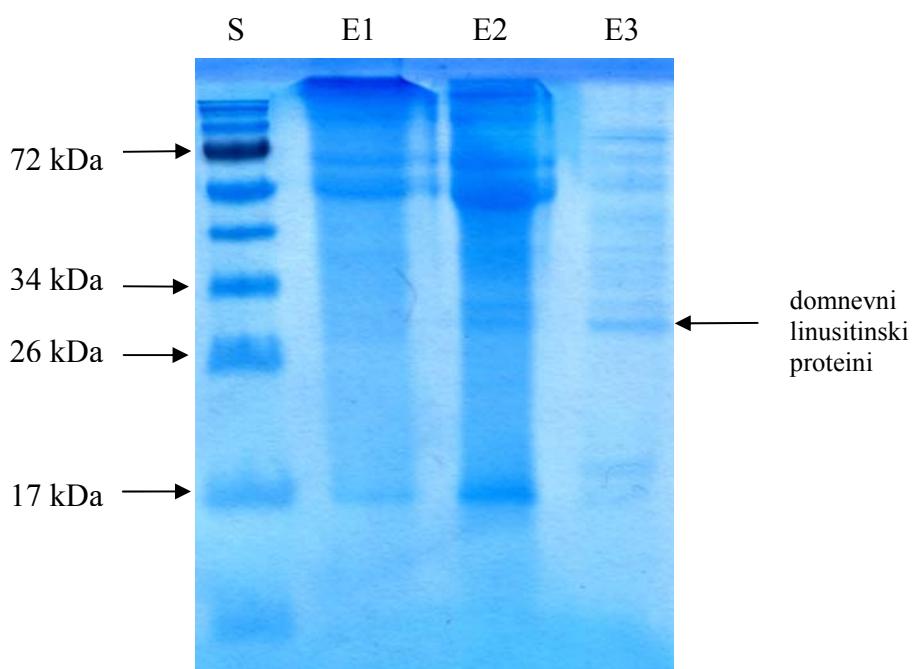
N1 grobi ekstrakt po 1. obarjanju

N2 grobi ekstrakt po 2. obarjanju

N3 grobi ekstrakt po 3. obarjanju

S standard

Predhodna obdelava rastlin z etilenom ni bistveno vplivala na vzorec izoliranih proteinov (slika 4). Podobno kot pri neobdelanih vzorcih smo opazili proteinsko liso velikosti okoli 26 kDa po vseh treh obarjanjih. Lisa je najmočnejša po 3. obarjanju. Tudi tukaj se proteinske lise po vseh treh obarjanjih nahajajo rahlo nad velikostjo 26 kDa standarda.



Slika 4: SDS-PAGE elektroforeza grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po obarjanju z amonijevim sulfatom - rastline obdelane z etilenom (obarvano s PageBlue).

S standard

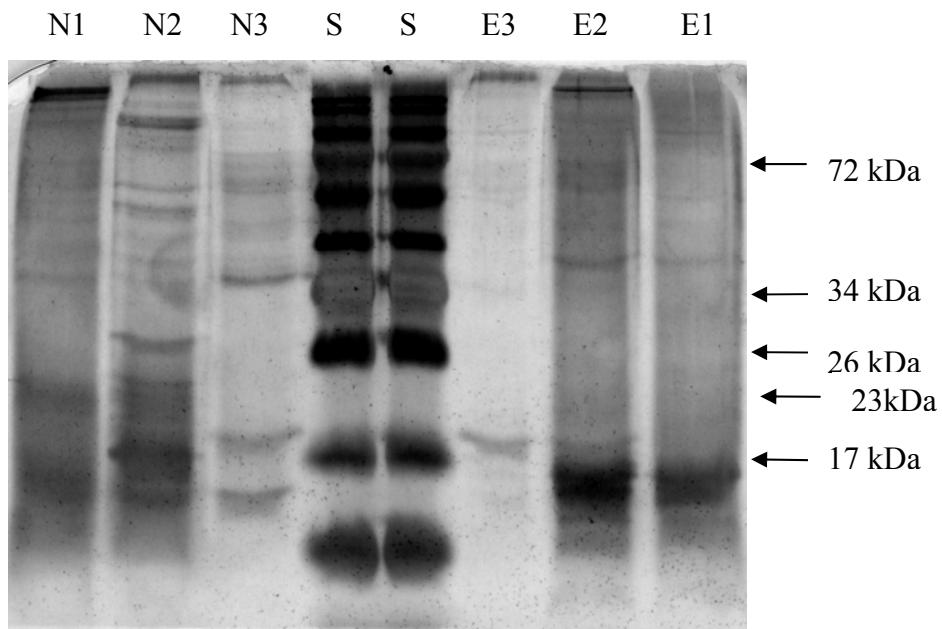
E1 grobi ekstrakt po 1. obarjanju

E2 grobi ekstrakt po 2. obarjanju

E3 grobi ekstrakt po 3. obarjanju

4.1.2 Primerjava ekstrakcije med neobdelanimi in z etilenom obdelanimi rastlinami

Pri vzorcih ekstrahiranih v bikarbonatnem pufru so razlike med neobdelanimi vzorci in vzorci obdelanimi z etilenom majhne (slika 5). V velikostnem razredu med 23 kDa in 26 kDa po 3.obarjanju ni vidnih proteinskih lis niti pri neobdelanih vzorcih niti pri vzorcih obdelanih z etilenom. Razlika je najbolj opazna po 2. obarjanju, ko v iskanem območju neobdelanih vzorcev dobimo več proteinskih lis.

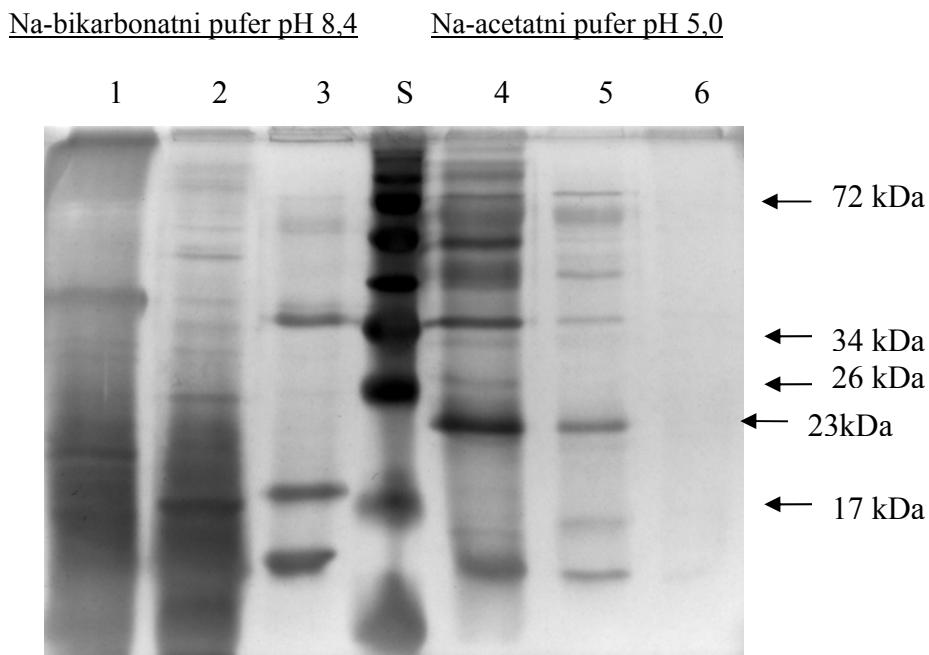


Slika 5: SDS-PAGE elektroforeza 5-krat skoncentriranih grobih ekstraktov Na-bikarbonatne ekstrakcije po obarjanju z amonijevim sulfatom - neobdelane rastline (N) in rastline obdelane z etilenom (E) (obarvano s srebrovim nitratom)

- N1 grobi ekstrakt po 1. obarjanju
- N2 grobi ekstrakt po 2. obarjanju
- N3 grobi ekstrakt po 3. obarjanju
- S standard
- E3 grobi ekstrakt po 3. obarjanju
- E2 grobi ekstrakt po 2. obarjanju
- E1 grobi ekstrakt po 1. obarjanju

4.1.3 Primerjava ekstrakcije z bazičnim in kislim pufrom

Na gelu neobdelanih vzorcev (slika 6) se vidijo razlike med ekstrakcijo v Na-bikarbonatnem pufru in Na-acetatnem pufru. Po 3. obarjanju so v kislem pufru vidne izrazite proteinske lise velikosti okoli 23 kDa, ki pa jih v bazičnem pufru ne zasledimo. Vzorec proteinskih lis se razlikuje tudi po 1. in 2. obarjanju.



Slika 6: SDS-PAGE elektroforeza 5-krat skoncentriranih grobih ekstraktov Na-bikarbonatne ekstrakcije in Na-acetatne ekstrakcije po obarjanju z amonijevim sulfatom - neobdelane rastline (obarvano s srebrovimi nitratoma).

- 1 grobi ekstrakt po 1. obarjanju
- 2 grobi ekstrakt po 2. obarjanju
- 3 grobi ekstrakt po 3. obarjanju
- S standard
- 4 grobi ekstrakt po 3. obarjanju
- 5 grobi ekstrakt po 2. obarjanju
- 6 grobi ekstrakt po 1. obarjanju

4.2 KONCENTRACIJA PROTEINOV

Pred nanosom grobega ekstrakta na kromatografsko kolono smo izmerili koncentracijo proteinov v vseh liofiliziranih grobih ekstraktih, saj smo želeli preveriti v kateri izolaciji in po katerem obarjanju je bil izkoristek proteinov največji.

Preglednica 2: Koncentracija proteinov v grobem ekstraktu po ekstrakciji v
Na-bikarbonatnem pufru pH 8,4

		koncentracija proteinov v 10-krat skoncentriranem grobem ekstraktu (mg/ml)	koncentracija proteinov v grobem ekstraktu (mg/ml)
1. izolacija - N	1	16,6	1,66
	2	17	1,7
	3	3,2	0,32
3. izolacija - E	1	11,4	1,14
	2	14	1,4
	3	3,5	0,35
4. izolacija - N	1	3,7	0,37
	2	5,9	0,59
	3	6,6	0,66
5. izolacija - E	1	4,8	0,48
	2	15	1,5
	3	7,9	0,79

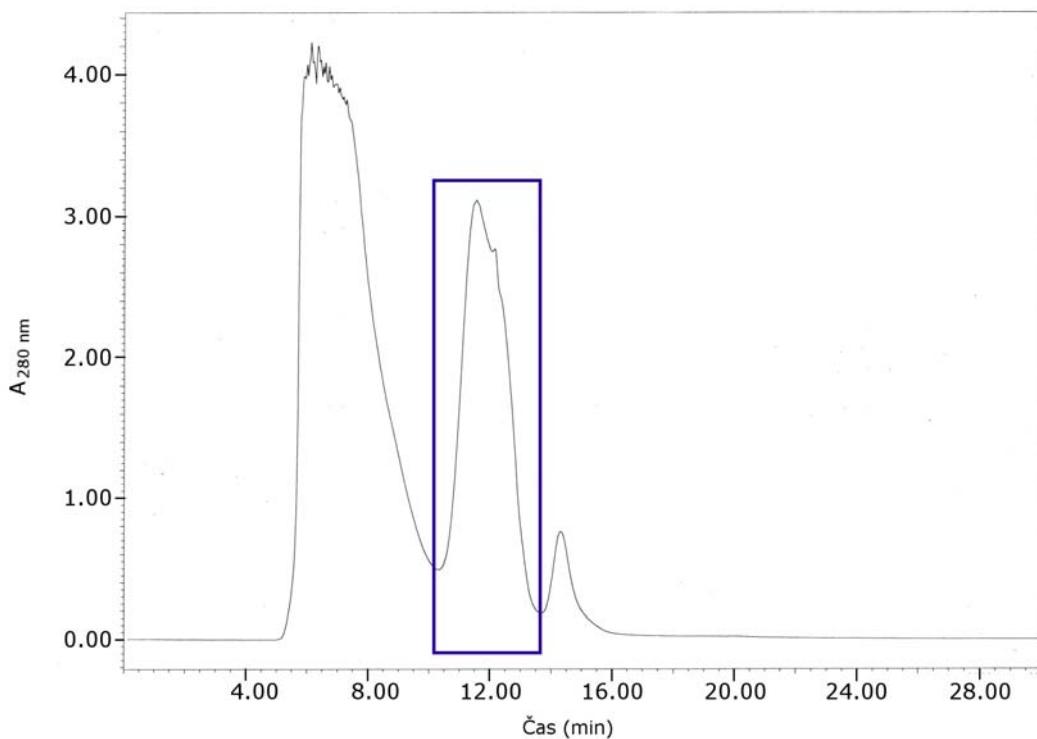
1 grob ekstrakt po 1. obarjanju

2 grob ekstrakt po 2. obarjanju

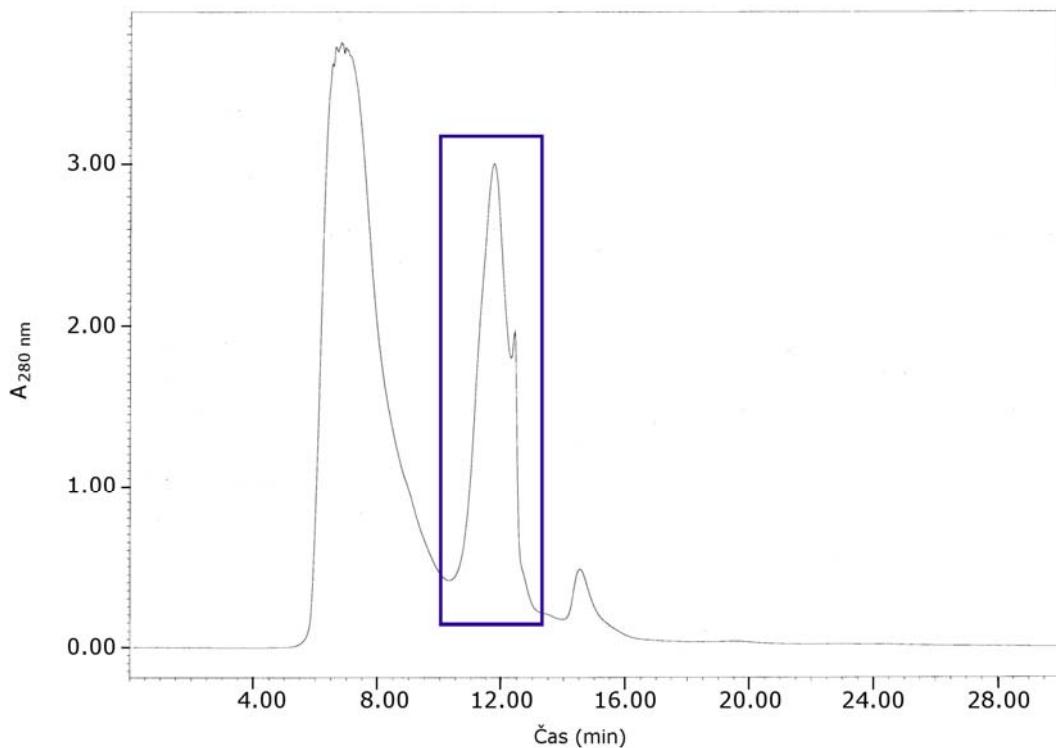
3 grob ekstrakt po 3. obarjanju

4.3 LOČBA PROTEINOV S HPLC

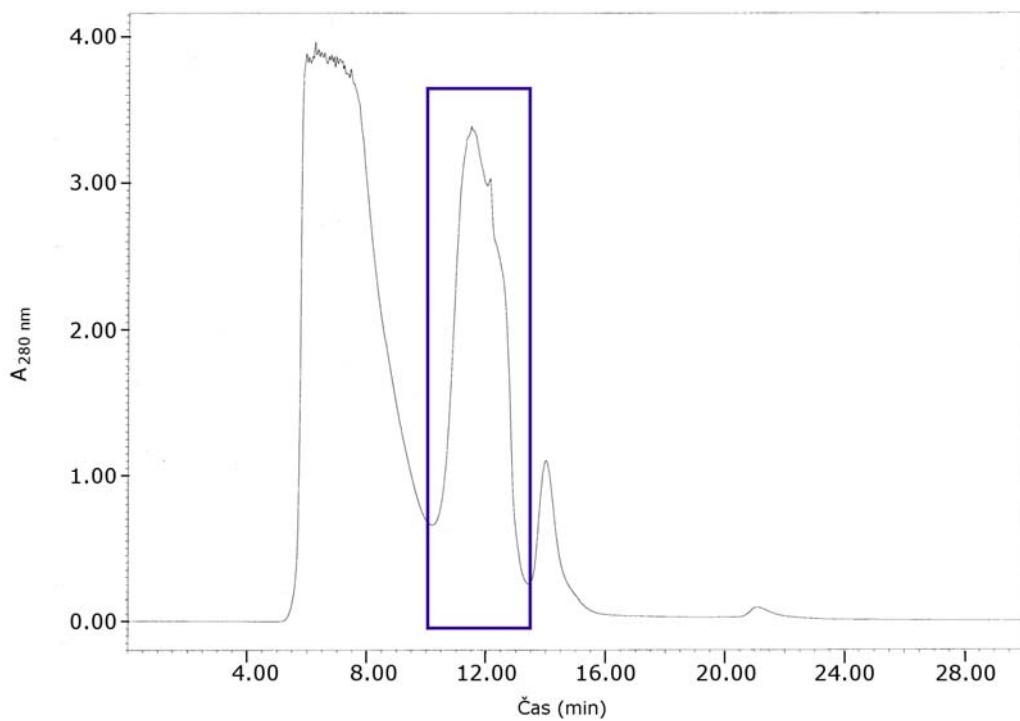
Vsi nanešeni grobi ekstrakti so bili po ekstrakciji 10-krat skoncentrirani z liofilizacijo. Pri ločbi proteinov s HPLC smo kot mobilno fazo uporabili Na-bikarbonatni pufer s pH 8,4. Z okvirjem so označeni vrhovi okoli 12 minute, kjer smo glede na rezultate predhodnih poskusov (Buh, 2004; Klančnik, 2005) pričakovali linusitinske proteine.



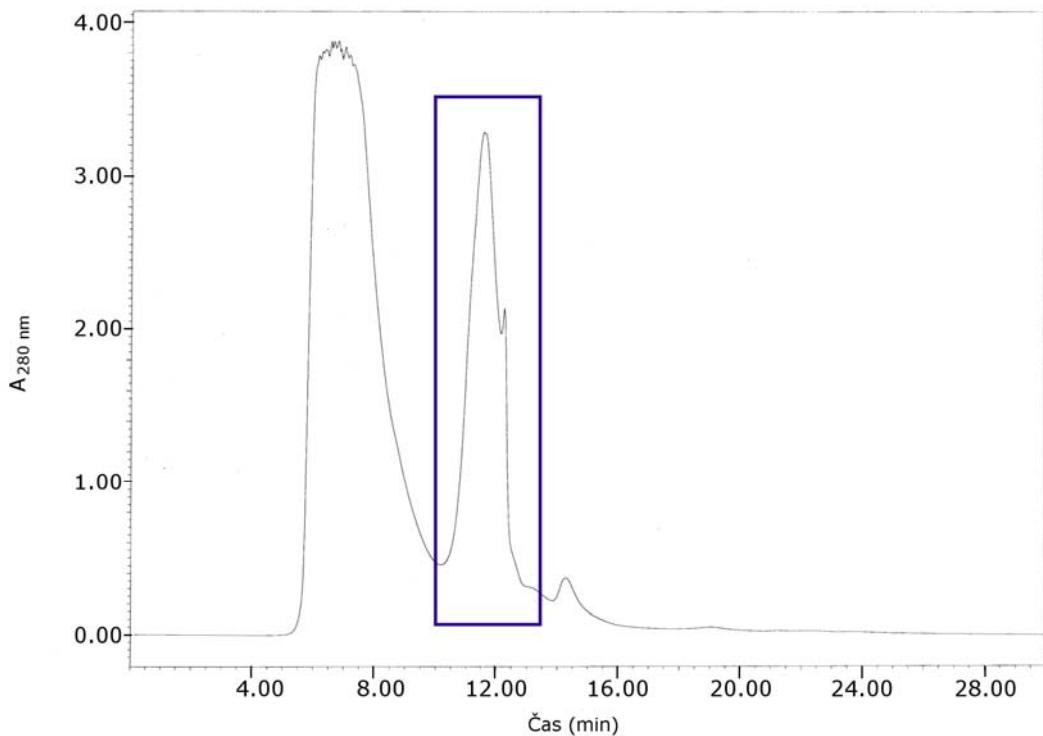
Slika 7: Kromatogram grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po 1. obarjanju z amonijevim sulfatom - neobdelan vzorec. Gelska kolona BioSep SEC S-2000. Pretok mobilne faze 1,0 ml/min.



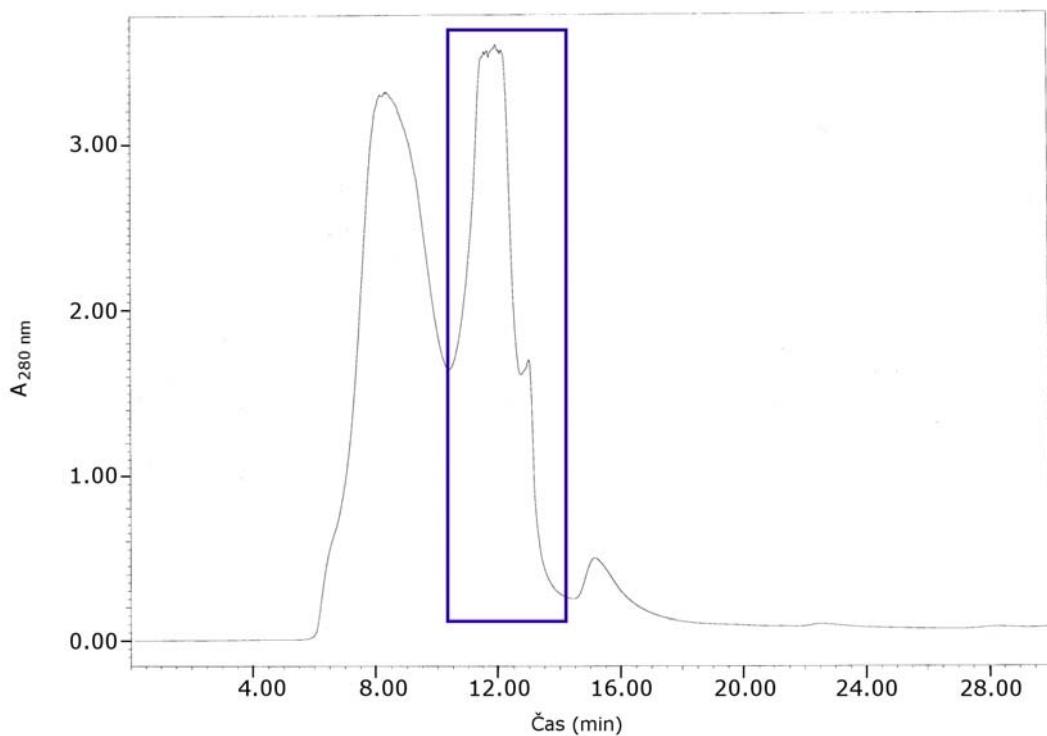
Slika 8: Kromatogram grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po 1. obarjanju z amonijevim sulfatom - vzorec obdelan z etilenom. Gelska kolona BioSep SEC S-2000. Pretok mobilne faze 1,0 ml/min.



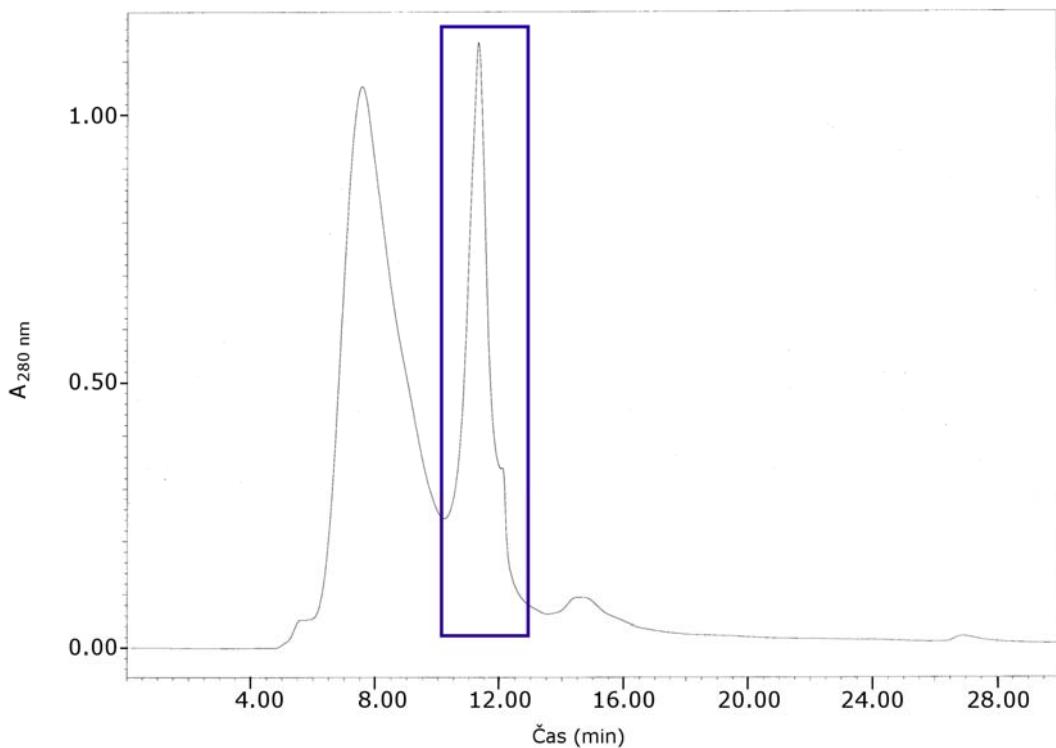
Slika 9: Kromatogram grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po 2. obarjanju z amonijevim sulfatom - neobdelan vzorec. Gelska kolona BioSep SEC S-2000. Pretok mobilne faze 1,0 ml/min.



Slika 10: Kromatogram grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po 2. obarjanju z amonijevim sulfatom - vzorec obdelan z etilenom. Gelska kolona BioSep SEC S-2000. Pretok mobilne faze 1,0 ml/min.



Slika 11: Kromatogram grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po 3. obarjanju z amonijevim sulfatom - neobdelan vzorec. Gelska kolona BioSep SEC S-2000. Pretok mobilne faze 1,0 ml/min.



Slika 12: Kromatogram grobega ekstrakta Na-bikarbonatne ekstrakcije po 3. obarjanju z amonijevim sulfatom - vzorec obdelan z etilenom. Gelska kolona BioSep SEC S-2000. Pretok mobilne faze 1,0 ml/min.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen naše naloge je bilo ugotoviti, ali so vršički poganjka primeren izhodni material za izolacijo proteina LIN1, ki bi ga nato lahko uporabili v drugih raziskavah. Težava s stebelnimi vršički je v njihovi izjemni majhnosti, tako da smo izhodiščni material zbirali iz sadik, ki smo jih gojili pet zaporednih mesecev.

Na osnovi predhodne molekularne analize (Nikolić, 2006; Anžlovar in sod., 2008) smo želeli kot izhodni izolacijski material preizkusiti tudi vršičke tistih rastlin, ki bi jih predhodno obdelali z etilenom v koncentraciji 5 ppm. To naj bi bila koncentracija nad katero se indukcija osmotina ne povečuje (Xu in sod., 1994). Glede na rezultate raziskave izražanja linusitinskih genov z metodo *in situ* hibridizacije (Nikolić, 2006; Anžlovar in sod., 2008) smo sklepali, da naj bi se v vršičkih sintetiziral predvsem protein LIN1, vendar prisotnosti drugih proteinov iz te genske družine nismo mogli izključiti.

Izolacija linusitinov iz semen vključuje obarjanje s polietileniminom in ekstrakcijo s hitinom. S to stopnjo se znebimo velike količine polisaharidne sluzi, ki je prisotna v vlažnih semenih in izjemno otežuje izolacijo (Anžlovar, osebni razgovor). Ker sluzi v poganjkih ni, smo lahko osnovno metodo poenostavili in to stopnjo izpustili.

Ker vse dosedanje raziskave kažejo, da so si proteini iz linusitinske družine zelo podobni po velikosti in aminokislinskem zaporedju, a se razlikujejo po izolelektrični točki (Anžlovar in sod., 1998; Anžlovar in sod 2006; Anžlovar in sod 2008; Anžlovar in Dermastia, 2003), smo za izolacijo uporabili oba že opisana postopka v bazičnem in kislem pufru (Anžlovar in sod., 1998; Buh, 2004; Klančnik, 2005). Primerjava elektroforetskih slik po ekstrakciji v bazičnem in kislem pufru kaže, da je za izolacijo LIN1 iz vršičkov poganjkov verjetno bolj primeren kisel pufer (slika 6). Ker so bili rezultati naših začetnih poskusov dvoumni in so bolj kazali na ustreznost bazičnega ekstraktionskega pufra (slika 3, 4), z acetatnim pufrom nismo ekstrahirali tudi z etilenom obdelanih rastlin.

Izolacija linusitinov iz semen in radikul poteka le v dveh stopnjah, obarjanju do 60 % nasičenosti z amonijevim sulfatom in ločbi grobega ekstrakta na gelski koloni. V postopku optimizacije smo namesto enkratnega obarjanja z amonijevim sulfatom do 60 % nasičenosti izvedli tri obarjanja do 25 %, 50 % in 75 % nasičenosti. Ker so se v prejšnjih poskusih izolacije linusitinski proteini po obarjanju do 60 % nasičenosti nahajali v oborini (Anžlovar, 1997; Buh, 2004), prav tako pa so jih našli tudi v supernatantu (Klančnik, 2005), se najverjetneje obarjajo ravno nekje v območju okoli 60 % nasičenosti z amonijevim sulfatom. Zato smo predvidevali, da jih bomo v našem poskusu izolacije našli v oborini po 3. obarjanju. Uvedba frakcioniranega obarjanja ekstrakta poganjkov se je vsekakor izkazala za koristno. V skladu z našimi predvidevanji so bile koncentracije proteinov v primerjavi s predhodnimi poskusi mnogo višje (preglednica 2). S prvim in drugim obarjanjem smo se tako znebili večje količine proteinov.

Po vsaki posamezni stopnji izolacije smo vzorce koncentrirali z liofilizacijo namesto z ultrafiltracijo. V predhodnih poskusih izolacije linusitina iz kalic in radikul lanu (Buh, 2004) so namreč ugotovili, da se snovi iz grobega ekstrakta vežejo na ultrafiltracijske celulozne membrane in tako se tudi koncentracija proteinov po takšnem postopku koncentriranja bistveno zmanjša. Po liofilizaciji je izoliran protein linusitin ohranil svojo biološko aktivnost (Buh, 2004). Za koncentriranje proteinov so liofilizacijo uporabili tudi pri izolaciji LIN1 iz radikul kalic lanu (Klančnik, 2005).

Proteine v 10-krat koncentriranem grobem ekstraktu smo ločevali s HPLC in uporabo gelske kolone, saj se je predhodna ionska izmenjevalna kromatografija pokazala za neuspešno (Klančnik, 2005). V skladu z rezultati koncentracije proteinov so bile tudi absorpcije pri 280 nm visoke (slike 7-12), v primerjavi s prejšnjimi poskusi izolacije, več kot 10-krat višje. Ker je imel vrh podobno obliko in se je pojavljal v podobnem retensijskem času kot v predhodnih postopkih, smo predvidevali, da so v njem iskani proteini in da je meristem poganjka primernejši izhodni material za izolacijo linusitinov v primerjavi s semeni in radikulo (Anžlovar in sod., 1998, 2006).

Vzorci kromatografskih vrhov se med posameznimi serijami izolacij niso razlikovali. Lepih razlike smo opazili med neobdelanimi vzorci in vzorci obdelanimi z etilenom, kar je bilo v skladu z analizo grobega ekstrakta izoliranega v bikarbonatnem pufru.

Žal so se nam številne zbrane frakcije kot tudi nekateri grobi ekstrakti pred nadaljnji analizami zelo okužili z glivami. Okužba je bila verjeten vzrok za popolno razgradnjo iskanih proteinov in odsotnost končne potrditve večine naših rezultatov. Na prisotnost/odsotnost linusitinskih proteinov v vršičkih poganjka lanu lahko iz naših rezultatov sklepamo le na osnovi analize gelov po posameznih obarjanjih.

Pri vzorcih ekstrahiranih v bikarbonatnem pufru so vidne razlike med neobdelanimi vzorci in vzorci obdelanimi z etilenom (slika 5). Po 3. obarjanju sicer ni opaznih proteinskih lis ustrezne velikosti pri nobenem od vzorcev, so pa razlike opazne po 1. in 2. obarjanju. Rezultati kažejo, da etilenska indukcija vpliva na vzorec izražanja proteinov.

Iz slike 6 je jasno razvidno, da izbira pufra z določenim pH vpliva na vzorec proteinov, ki se v določenem pufru ekstrahirajo. Na elektroforetskem gelu so v vzorcu ekstrahiranem v kislem pufru po 3. obarjanju jasne proteinske lise v velikostnem razredu okoli 23 kDa, ki bi lahko ustrezale LIN1 (slika 6). Te proteine smo izolirali iz rastlin, ki jih nismo obdelali z etilenom. Predhodno so pokazali, da se gen *LIN1* v 22 dni starih neobdelanih rastlinah ne izraža, so pa njegovo izražanje opazili v 6 dni starih kalicah (Nikolić, 2006; Anžlovar in sod., 2008). V tokratnem poskusu smo uporabili 11 do 21 dni stare rastline, kar nakazuje možnost, da je opažena lisa zares povezana z linusitskim proteinom.

Kljud temu, da se v kislem pufru (slika 6) pojavljajo proteinske lise v velikostnem razredu, ki naj bi ustrezal linusitskim proteinom, lahko o njihovi dejanski povezanosti s to družino proteinov le sklepamo. Proteinska lisa ustrezne velikosti na elektroforeznem gelu še ni dokaz prisotnosti iskanega proteina. Proteinske lise v območju med 23 kDa in 26 kDa bi sicer lahko predstavljale linusitin ali LIN1, vendar pa bi morali za potrditev protein popolnoma očistiti in za njegovo dokončno potrditev določiti vsaj prvih 5 aminokislin na N-terminalnem zaporedju in morda tudi preveriti protiglivno delovanje, kot je bilo to

narejeno za ostale proteine iz te družine (Anžlovar in sod., 1998; Buh, 2004; Klančnik, 2005; Jazbec, 2007).

O velikih metodoloških težavah pri izolaciji linusitinskih proteinov sta že poročali Buh (2004) in Klančnik (2005). Največja težava je zagotovo izjemno nizka koncentracija linusitinskih proteinov v rastlinskem tkivu. Prav tako je težaven tudi izhodni rastlinski material zaradi prisotnosti številnih sekundarnih metabolitov, polisaharidov in predvsem pigmentov, ki lahko zelo otežujejo izolacijo. Poleg tega se linusitinski proteini predvideno nahajajo v vakuoli celice in je zato še posebej pomembno, da v prvih stopnjah izolacije dobro razbijemo tako celične stene kot tudi membrane. Upali smo, da bo izbira vršičkov poganjkov v tej raziskavi olajšala predhodno opisane težave, vendar so se žal pojavile nove. Te so bile povezane predvsem z izjemno majhno količino izhodiščnega tkiva in časom, povezanim z njegovim zbiranjem. Vršiček poganjka je vir meristemskih celic, ki so najmanjše v rastlinskem tkivu in imajo namesto ene velike vakuole več majhnih. Prav zato smo morali biti pri homogenizaciji vršičkov še posebej pazljivi, da smo celice popolnoma razdrobili. Kljub temu smo opazili neponovljivost izkoristka proteinov med posameznimi ponovitvami ekstrakcijskega postopka. Pričakovali smo, da bo koncentracija proteinov v grobem ekstraktu po posameznih obarjanjih v obeh neobdelanih in obeh etilenskih ekstrakcijah v primerljiva. Vendar pa smo opazili velike razlike (preglednica 2). Do večjih izgub je večinoma prišlo, ko smo imeli več (50 g) rastlinskega materiala. Kljub neprimerljivosti izkoristka proteinov v posameznih serijah poskusov, pa so bili kromatogrami posameznih serij povsem primerljivi. Koncentracijo proteinov navadno povečamo s koncentriranjem prek membranskih filtrov, a že v predhodni raziskavi (Buh, 2004) se je pokazalo, da se linusitinski proteini irreverzibilno vežejo na membrane. Vzorce smo zato koncentrirali z liofilizacijo. Pri tem je prišlo tudi do koncentriranja pufrske soli, ki je v nadaljevanju motila elektroforezo. V prejšnjih poskusih so liofilizirane vzorčke dializirali in ponovno liofilizirali, pri čemer pa so bile izgube zelo velike (Klančnik, 2005) zato se zaradi izjemno majhne količine našega vzorca nismo odločili za takšen postopek. Največjo težavo pa vidimo v dolgotrajnosti celotnega postopka in zbiranju materiala, zaradi česar je prišlo tudi do popolne okužbe vzorcev in izgube celotnega proteina.

5.2 SKLEPI

Meristem je primernejši izhodiščni material za izolacijo linusitinskih proteinov kot semena in radikule kalic.

Predvidevamo, da bi bila izolacija linusitinskih proteinov uspešnejša s kislim Na-acetatnim pufrom kot z bazičnim Na-bikarbonatnim pufrom.

Domnevamo, da bi izolirali LIN1 po etilenski indukciji in kisli ekstrakciji.

6 POVZETEK

Rastline so razvile številne mehanizme protimikrobne obrambe, ki so tako konstitutivni kot inducibilni. Pomemben del v obrambi rastlin predstavljajo PR-proteini, ki se sintetizirajo kot odgovor na biotski in/ali abiotiski stres. Tkvno specifično in razvojno uravnano izražanje nekaterih PR-proteinov kaže na njihovo vlogo tudi v normalnih razvojnih procesih rastlinskih tkiv.

V peti razred PR-proteinov uvrščamo tudi bazično skupino osmotinov in osmotinupodobnih proteinov, ki združujejo proteine z vlogo pri zaščiti pred osmotskim stresom, permeabilizaciji glivnih in oomicetnih plazemskih membran, toleranci na mraz in razvoju rastline. Ti proteini se v relativno nizki koncentraciji predvideno pojavljajo v vakuoli rastlinske celice.

Iz lanu so do sedaj izolirali proteina linusitin in LIN1, ki ju glede na njune biokemijske in molekulske lastnosti uvrščamo med osmotine. Glavna razlika med njima je v izoelektrični točki, saj ima linusitin bazično, za LIN1 pa so izračunali kislo. Linusitin so izolirali iz semen in radikul zdravih kalic, dokazali pa so tudi njegovo protiglivno delovanje. LIN1, ki so ga izolirali iz radikul zdravih rastlin, pa najverjetneje ne deluje protiglivno in ima morda pomembno vlogo v razvoju rastline. Z *in situ* hibridizacijo so pokazali, da se v mladih rastlinah *LIN1* mRNA izraža tudi v meristemu poganjka, kjer ni izključena tudi prisotnost drugih linusitinskih proteinov. V nekoliko starejših rastlinah se *LIN1* mRNA izrazi v meristemu poganjka pri rastlinah, ki so bile predhodno obdelane z etilenom.

Ker je izolacija linusitinskih proteinov iz semen in radikul zelo težavna, smo nameravali LIN1 izolirati iz vršičkov po predhodni etilenski obdelavi rastlin. Pri poskusu izolacije smo optimizirali predhodno uporabljen metodo za izolacijo linusitinskih proteinov. Uvedli smo frakcioniranoobarjanje, ki se je glede na veliko večji izkoristek proteinov pri ekstrakciji pokazalo za zelo koristno. Proteine smo poskusili izolirati z ekstrakcijo v bazičnem in kislem pufru, vendar nam zaradi metodoloških težav linusitinskih proteinov ni uspelo izolirati v čisti obliki ali drugače dokončno potrditi njihove prisotnosti. Kljub temu

lahko iz rezultatov naloge sklepamo, da je meristem dober vir linusitinskih proteinov in da bi najverjetneje izolirali LIN1 po predhodni etilenski indukciji in ekstrakciji v kislem pufru.

Nova znanja o vsebnosti LIN1 in ostalih linusitinskih proteinih v različnih tkivih in o kritičnih stopnjah izolacijskega postopka bodo vodila v pridobitev večjih količin čistega proteina LIN1, kar bo omogočilo nadaljnje študije nativnega proteina.

7 VIRI

Anžlovar S. 1997. Delovanje (25-kDa) proteina iz semen lanu (*Linum usitatissimum* L.) na prepustnost liposomskih membran. Magistrska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 87 str.

Anžlovar S., Serra M.D., Dermastia M., Menestrina G. 1998. Membrane permeabilizing activity of pathogenesis-related protein linusitin from flax seed. Molecular Plant-Microbe Interactions, 7: 610-617

Anžlovar S. 2002. Analiza gena za PR-5 protein linusitin iz lanu. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 143 str.

Anžlovar S., Dermastia M. 2003. The comparative analysis of osmotins and osmotin-like PR-5 proteins. Plant Biology, 5: 116-124

Anžlovar S., Gruden K., Rogelj B., Štrukelj B., Dermastia M. 2006. Molecular characterization of the linusitin-like gene family from flax. International Journal of Plant Science, 167, 2: 231-238

Anžlovar S., Kladnik A., Kogovšek P., Nikolić P., Gruden K., Brzin J., Dermastia M. 2008. The temporal and spatial expression of PR-5 linusitin-like gene in healthy and ethylene-treated flax plants. International Journal of Plant Science, 169, 6: 701-707

Bonas U., Lahaye T. 2002. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. Current Opinion in Microbiology, 5: 44-50

Borgmeyer J.R., Smith C.E., Huynh Q.K. 1992. Isolation and characterization of a 25kDa antifungal protein from flax seeds. Biochemical and Biophysical Research Communications, 187: 480-487

Bowles D.J. 1990. Defence-related proteins in higher plants. Annual Review of Biochemistry, 59: 873-907

Buh M. 2004. Izolacija protiglivnega proteina iz kalic lanu. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 61 str.

Capelli N., Diogon T., Greppin H., Simon P. 1997. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an osmotin-like protein from *Arabidopsis thaliana*. Gene, 191: 51-56

Cheong N.E., Choi Y.O., Kim W.Y., Kim S.C., Cho M.J., Lee S.Y. 1997. Purification of an antifungal PR-5 protein from flower buds of *Brassica campestris* and cloning of its gene. Physiologia Plantarum, 101: 583-590

Frigerio L., Foresti O., Hernandez Felipe D., Nuehaus J.-M., Vitale A. 2001. The C-terminal tetrapeptide of phaseolin is sufficient to target green fluorescent protein to vacuole. Journal of Plant Physiology, 158: 499-503

Fritig B., Heitz T., Legrand M. 1998. Antimicrobial proteins in induced plant defence. Current Opinion in Immunology, 10: 16-22

Garcia-Casado G., Collada C., Allona I., Soto A., Casado R., Rodriguez-Cerezo E., Gomez L., Aragoncillo C. 2000. Characterization of an apoplastic basic thaumatin-like protein from recalcitrant chestnut seeds. Physiologia Plantarum, 110: 172-180

Grillo S., Leone A., Xu Y., Tucci M., Francione R., Hasegawa P.M., Monti L., Bressan R.A. 1995. Control of osmotin gene expression by ABA and osmotic stress in vegetative tissues of wild-type and ABA-deficient mutants of tomato. Physiologia Plantarum, 93: 498-504

Hammond-Kosack K., Jones J.D.G. 1997. Plant disease resistance genes. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48: 575-607

Hong J.K., Hwang B.K. 2002. Induction by pathogen, salt and drought of a basic class II chitinase mRNA and its *in situ* localization in papper (*Capsicum annum*). Plant Physiology, 114: 549-558

Hong J.K., Jung H.W., Lee B.K., Lee S.C., Lee Y.K., Hwang B.K. 2004. An osmotin-like protein gene, *CAOSM1*, from pepper: differential expression and in situ localization of its mRNA during pathogen infection and abiotic stress. Physiological and Molecular Plant Pathology, 64: 301-310

Hu X., Reddy A.S.N. 1997. Cloning and expression of PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. Plant Molecular Biology, 34: 949-959

Jazbec K. 2007. Protiglivno delovanje linusitinskih proteinov. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 49 str.

Kim H., Mun J.-H., Byun B.H., Hwang H.-J., Kwon Y.M., Kim S.-G. 2002. Molecular cloning and characterization of the gene encoding osmotin protein in *Petunia hybrida*. Plant Science, 162: 745-752

Klančnik P. 2005. Potrditev dveh osmotinskih proteinskih zaporedij v radikulah lanu. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 47 str.

Koiwa H., Sato F., Yamada Y. 1994. Characterization and accumulation of tobacco PR-5 proteins by IEF-immunoblot analysis. Plant and Cell Physiology, 35: 821-827

Koiwa H., Kato H., Nakatsu T., Oda J., Yamada Y., Sato F. 1997. Purification and characterization of tobacco pathogenesis-related protein PR-5d, an antifungal thaumatin-like protein. *Plant and Cell Physiology*, 38: 783-791

Kogovšek P. 2004. Indukcija gena za protiglivni protein iz lanu. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 60 str.

Kuboyama T., Yoshida K.T., Takeda G. 1997. An acidic 39-kDa protein from stigmas of tobacco has amino-terminal motif that is conserved among thaumatin-like proteins. *Plant and Cell Physiology*, 38: 631-645

LaRosa P.C., Handa A.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1985. Abscisic acid accelerates adaptation of cultured cells to salt. *Plant Physiology*, 79: 138-142

LaRosa P.C., Chen Z., Nelson D.E., Singh N.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1992. Osmotin gene expression is posttranscriptionally regulated. *Plant Physiology*, 100: 409-415

Liu D., Rhodes D., Paino D'Urzo M., Xu Y., Narasimhan M.L., Hasegawa P.M., Bressan R.A., Abad L. 1996. *In vivo* and *in vitro* activity of truncated osmotin that is secreted into the extracellular matrix. *Plant Science*, 121: 123-131

Melchers I. S., Sela-Burlage M.B., Vloemans S.A., Woloshuk C.P., Van Roekel J.S.C., Pen J., Van der Elzen P.J.M., Cornelissen B.J.C. 1993. Extracellular targeting of the vacuolar tobacco protein, AP24, chitinase and β -1,3-glucanase in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 21: 583-593

Min K., Chul Ha S., Hasegawa P.M., Bressan R.A., Yun D.J., Kim K.K. 2004. Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 54: 170-173

Neale A.D., Wahleither J.A., Lund M., Bonnett H.T., Kelly A., Meeks-Wagner D.R., Peacock W.J., Dennis E.S. 1990. Chitinase, β -1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. *Plant Cell*, 2: 673-684

Nikolić P. 2006. Optimizacija metode hibridizacije RNA *in situ* na parafinskih tkivnih rezinah lanu. Diplomsko delo. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 91 str.

Pressey R. 1997. Two isoforms of NP24, a thaumatin-like protein in tomato fruit. *Phytochemistry*, 44: 1241-1245

Pujade-Renaud V., Sanier C., Cambillau L., Pappusamy A., James H., Ruengsri N., Tharreau D., Chrestin H., Montoro P., Narangajavana J. 2005. Molecular characterization of new members of the *Hevea brasiliensis* hevein multigene family and analysis of their promoter region in rice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1727: 151-161

Roberts W.K., Selitrennikoff C.P. 1990. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Journal of General Microbiology*, 136:1771-1778

Rodrigo I., Vera P., Tornero P., Hernandez-Yago J., Cornejero V. 1993. cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P23: characterization as a vacuolar antifungal factor. *Plant Physiology*, 102: 939-945

Sato F., Koiwa H., Sakai Y., Kato N., Yamada Y. 1995. Synthesis and secretion of tobacco neutral PR-5 protein by transgenic tobacco and yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221: 909-913

Sato F., Kitajima S., Koyoma T., Yamada Y. 1996. Ethylene-induced gene expression of osmotin-like protein, a neutral isoform of tobacco PR-5, is mediated by the AGCCGCC *cis*-sequence. *Plant and Cell Physiology*, 37, 3: 249-255

Shih C.-Y., Wu J., Jia S., Khan A.A., Ting K.-L., Shih D.S. 2001. Purification of an osmotin-like protein from the seeds of *Benincasa hispida* and cloning of the gene encoding this protein. *Plant Science*, 160: 817-826

Singh N.K., Bracker C.A., Hasegawa P.M., Handa A.K., Buckel S., Hermodson M.A., Pfankoch E., Regnier F.E., Bressan R.A. 1987a. Characterization of osmotin, a thaumatin - like protein associated with osmotic adaptations in plant cells. *Plant Physiology*, 85: 529-536

Singh N.K., LaRosa P.C., Handa A.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1987b. Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 739-743

Skriver K., Mundy J. 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*, 2: 503-512

Stintzi A., Heitz T., Prasad V., Wiedemann-Merdinoglu S., Kaufmann S., Geoffroy P., Legrand M., Fritig B. 1993. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. *Biochemie*, 75, 8: 687-706

Van Loon L.C., Pierpoint W.S., Boller T., Conejaro V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant molecular Biology Reporter*, 12: 245-264

Van Loon L.C., Van Strien E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55: 85-97

Van der Wel H., Loeve K. 1972. Isolation and characterization of Thaumatin 1 and 2, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus danielli* Benth. *European Journal of Biochemistry*, 31: 221-225

Vigers A.J., Roberts W.K., Selitrennikoff C.P. 1991. A new family of plant antifungal proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4: 315-323

Vitale A., Raikhel N.V. 1999. What do proteins need to reach different vacuoles? *Trends in Plant Science*, 4: 149-155

Zhu B., Chen T.H.H., Li P.H. 1993. Expression of an ABA-responsive osmotin-like protein gene during the induction of freezing tolerance in *Solanum commersonii*. *Plant Molecular Biology*, 21: 729-735

Zhu B., Chen T.H.H., Li P.H. 1995a. Expression of three osmotin-like protein genes in response to osmotic stress and fungal infection in potato. *Plant Molecular Biology*, 28: 17-26

Zhu B., Chen T.H.H., Li P.H. 1995b. Activation of two osmotin-like genes by abiotic stimuli and fungal pathogen in transgenic potato plants. *Plant Physiology*, 108: 929-937

Walton D. 1997. Biochemical plant pathology. V: Plant biochemistry. Dey P.M., Harborne J.B. (eds.). London, Academic Press Ltd: 487-502

Wang X., Zafian P., Choudhary M., Lawton M. 1996. The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defence proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* SA, 93: 2598-2602

Xu Y., Chang P., Liu D., Narasimhan M.L., Raghothama K.G., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell*, 6, 8: 1077-1085

Yen H.E., Edwards G.E., Grimes H.D. 1994. Characterization of a salt-responsive 24-kilodalton glycoprotein in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology*, 105: 1179-1187

ZAHVALA

Prof. dr. Marina Dermastia. Hvala, da ste me sprejeli pod svoje okrilje in mi dali priložnost, da pokukam v še do nedavnega skoraj neznani svet rastlin. Hvala za vaš jekleni optimizem tudi, ko se je podiral svet. Resnično in iskreno najlepša hvala.

Dr. Sabina Anžlovar. Sabina, hvala za odstiranje skrivnosti linusitinov. Hvala za razjasnjevanje vseh mojih *zakaj, ne vem in ne razumem*.

Prof. dr. Gregor Anderluh. Hvala, da ste bili takoj pripravljeni sodelovati v naši borbi s časom.

Petra Nikolić. Hvala za pomoč pri uvajanju v laboratorijsko delo in seveda za nekajmesečno skupno uživanje zimskih radosti v hladni sobi.

Katedra za eksperimentalno botaniko. Hvala za izjemno topel sprejem in spodbudo. Aleš, tebi še posebej hvala za skene.

Katedra za biokemijo. Ga. Irena, hvala za uporabo vaših bučk, epic, pipet in nasploh verjetno skoraj vsega kar se najde v laboratoriju. Biserka in oba Andreja, hvala za vse kar ste me naučili (Andrejčitu R. gre še dodatna zahvala za neizmerno pogumno prenašanje Katje v najbolj nadležni obliki).

Družina Rwankuba, Jovi in mama Ani. Hvala, da že ves čas tako zelo verjamete vame.

Elvi. Hvala, da si ob meni že odkar sva opustila dudo.

Špelca. Hvala, da sva ob kavi, v kateri lahko stoji žlica, kampanjsko preživljali študijske noči, rjoveli v luno in razglabljali o smislu življenja.

Nataša, Matejka, Aleško, Boršč in ostala gverilska enota. Hvala, da ste moji prijatelji.

Podmilščakova 16b. Drage cimrce, hvala za razumevanje občasnih transformacij v pošast kot posledice izdelave pričujočega dela. Hvala tudi za spoštovanje svetosti hladilnika.

Petra, *my adorable sister*. Hvala, da sem za namene te naloge lahko zlorabljalna tvoj računalnik in da se nisi preveč jezila name, ko se je vsake toliko malce sesipal.

Keri. Hvala, da si računalniški genij in da si me vedno znova prihajal reševat.

Ljuba starša. Hvala za kvaliteten genom in progresivno vzgojo. Hvala, da me podpirata, mi stojita ob strani in me imata rada.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katja PIRC

**IZOLACIJA PROTIGLIVNIH PROTEINOV IZ
DRUŽINE LINUSITINOV IZ POGANJKA LANU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008