

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA POTOČNIK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA POTOČNIK

**IZOLACIJA SFINGOLIPIDOV IZ KVASOVKE  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN TOBAKA (*NICOTIANA  
TABACUM*) TER ŠTUDIJ NJIHOVIH INTERAKCIJ Z  
NEKROZA IN ETILEN-INDUCIRAJOČEM PEPTIDU 1  
PODOBNIMI PROTEINI**

**ISOLATION OF SPHINGOLIPIDS FROM THE YEAST  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AND TOBACCO  
(*NICOTIANA TABACUM*) AND STUDY OF THEIR  
INTERACTIONS WITH NECROSIS AND ETHYLENE  
INDUCING PEPTIDE 1 LIKE PROTEINS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravila na biotehniški fakulteti pod mentorstvomizr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm., in somentorstvom prof. dr. Gregorja Anderluha.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju in somentorju za strokovno pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu in pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi uni. dipl. biolog. Vesni Hodnik za vsestransko pomoč in nasvete pri praktični izvedbi poskusov ter vsem v laboratoriju na Katedri za biokemijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, ki so mi z veseljem pomagali.

Hvala moji družini, še posebej mami in očetu, ki sta mi omogočila študij, mojim prijateljem in fantu Tomislavu za vso podporo tekom študija in motivacijo pri delu in pisanju magistrske naloge.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvomizr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm., in somentorstvom prof. dr. Gregorja Anderluha.

# VSEBINA

I. POVZETEK .....	I
II. ABSTRACT .....	II
III. SEZNAM OKRAJŠAV .....	III
1. UVOD .....	1
1.1. SFINGOLIPIDI .....	1
1.1.1. Raznolikost sfingolipidov .....	2
1.1.2. Sfingolipidi v tobaku ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) .....	3
1.2. PROTEINI NLP .....	4
1.2.1. Mehanizem delovanja proteinov NLP .....	4
1.2.2. Strukturne značilnosti proteinov NLP .....	4
1.3. METODE ZA ANALIZO BIOLOŠKIH MOLEKUL IN VREDNOTENJE VEZAVE MED MOLEKULAMI .....	5
1.3.1. Enodimenzionalna tankoplastna kromatografija .....	5
1.3.2. Dvodimenzionalna TLC .....	7
1.3.3. Barvanje spojin po ločitvi s TLC .....	7
1.3.4. Prenos lipidov na PVDF membrano .....	8
1.3.5. Elektroforeza .....	8
1.3.6. Površinska plazmonska resonanca .....	9
2. NAMEN DELA .....	12
3. MATERIALI IN METODE .....	13
3.1. REAGENTI .....	13
3.2. BIOLOŠKI MATERIAL .....	13
3.3. OPREMA .....	14
3.4. IZOLACIJA SFINGOLIPIDOV IZ PEKOVSKEGA KVASA .....	14
3.4.1. Mešanice topil, raztopine in gojišča .....	14
3.4.2. Postopek izolacije sfingolipidov .....	15
3.5. IZOLACIJA SFINGOLIPIDOV IZ KVASOVK <i>S. CEREVISIAE</i> BY4747 IN MYY89 .....	16
3.5.1. Mešanice topil, raztopine in gojišča .....	16
3.5.2. Postopek izolacije sfingolipidov .....	16
3.6. IZOLACIJA SFINGOLIPIDOV IZ TOBAKA ( <i>NICOTIANA TABACUM</i> ) .....	17
3.6.1. Pufri, raztopine in mešanice topil .....	17
3.6.2. Postopek izolacije sfingolipidov .....	17

3.7. ANALIZA SFINGOLIPIDOV S POMOČJO TLC .....	18
3.7.1. Mešanice topil, raztopine.....	18
3.7.2. Postopek izvedbe TLC.....	19
3.7.2.1. Barvanje s primulinom .....	19
3.7.2.2. Barvanje z 20 % raztopino amonijevega sulfata .....	19
3.7.2.3. Barvanje z mešanico 10 % bakrovega sulfata in 8 % fosforne kisline .....	19
3.8. DVODIMENZIONALNA KROMATOGRAFIJA.....	19
3.9. EKSTRAKCIJA ŽELENIH SFINGOLIPIDOV IZ SILIKAGELA .....	19
3.10. DOLOČANJE MASE LIPIDOV .....	20
3.11. PRIPRAVA MULTILAMELARNIH (MLV) IN MAJHNIH UNILAMELARNIH VEZIKOV (SUV) .....	20
3.11.1. Pufri in raztopine .....	20
3.11.2. Postopek priprave veziklov .....	20
3.12. VREDNOTENJE VEZAVE SFINGOLIPIDOV IN PROTEINOV NLP – SPR .....	21
3.12.1. Raztopine in pufri .....	21
3.12.2. Postopek izvedbe SPR .....	21
3.13. VREDNOTENJE VEZAVE SFINGOLIPIDOV IN PROTEINOV NLP – ELEKTROFOREZA .....	22
3.13.1. Raztopina, geli in pufri.....	22
3.13.2. Postopek izvedbe elektroforeze.....	22
3.13.2.1. Spiranje gela.....	23
3.13.2.2. Barvanje gela.....	23
3.13.2.3. Razbarvanje gela .....	23
3.14. VREDNOTENJE VEZAVE SFINGOLIPIDOV IN PROTEINOV NLP–PRENOS LIPIDOV NA PVDF MEMBRANO .....	23
3.14.1. Mešanice topil, raztopine.....	23
3.14.2. Postopek prenosa lipidov na PVDF membrano.....	24
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	25
4.1. REZULTATI TLC.....	26
4.1.1. Sfingolipidi iz pekovskega kvasa.....	26
4.1.2. Sfingolipidi iz kvasovk <i>S. Cerevisiae</i> BY4747 IN MYY89.....	30
4.1.3. Sfingolipidi iz tobaka .....	33
4.1.4. Priprava sfingolipidov iz tobaka, ki smo jih uporabili za vrednotenje z SPR .....	34
4.1.5. Sfingolipidi iz tobaka, ki smo jih uporabili za elektroforezo.....	37
4.1.6. Sfingolipidi iz tobaka, ki smo jih uporabili pri metodi prenosa lipidov na PVDF membrano.....	38

4.2. PREIZKUS STABILNOSTI LIPIDOV IZ TOBAKA Z DVODIMENZIONALNO KROMATOGRFIJO ..	39
4.3. METODA PRENOSA LIPIDOV NA PVDF MEMBRANO .....	40
4.4. POVRŠINSKA PLAZMONSKA REZONANCA .....	42
4.5. ELEKTROFOREZA.....	46
5. SKLEP .....	53
6. LITERATURA.....	55

## KAZALO SLIK:

Slika 1: Zgradbe različnih skupin sfingolipidov v rastlinah.....	2
Slika 2: Shematski prikaz merjenja interakcij na osnovi SPR (levo) in primer senzorgrama (desno). .....	11
Slika 3: Ločitev vzorca po frakcijah na gradientu Percoll po centrifugiranju pri 6500 rpm	18
Slika 4: Primerjava zdrave rastline tobaka (levo) in rastline po izpostavitvi proteinu Nep1 iz <i>Fusarium oxysporum</i> (desno).. .....	25
Slika 5: TLC ploščica po prvi izolaciji sfingolipidov iz pekovskega kvasa.....	27
Slika 6: TLC ploščica po drugi izolaciji sfingolipidov iz pekovskega kvasa.....	27
Slika 7: TLC po prvi (levo) in drugi (desno) izolaciji sfingolipidov iz pekovskega kvasa po barvanju z mešanico 10 % bakrovega sulfata in 8 % fosforne kisline. ....	28
Slika 8: TLC ploščica po nanosu 22 $\mu$ L vzorca izolacije 1(levo) in 22 $\mu$ L vzorca izolacije 2 (desno) po barvanju z mešanico 10% bakrovega sulfata in 8% fosforne kisline .....	28
Slika 9: TLC ploščica po nanosu 15 $\mu$ L vzorca izolacije 1 in 2, 50 $\mu$ g lipidnih standardov in barvanju z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline. ....	29
Slika 10: Sintezna pot kompleksnih sfingolipidov.....	30
Slika 11: TLC ploščica po nanosu 30 $\mu$ L vzorca BY4747 (levo) in enakega volumna vzorca MYY89 (desno). .....	31
Slika 12: TLC ploščica po nanosu 10 $\mu$ L vzorca posamezne frakcije po izolaciji sfingolipidov iz tobaka. ....	34
Slika 13: TLC ploščica po nanosu 20 $\mu$ L vzorca posamezne frakcije iz tobaka, 30 $\mu$ L vzorcev BY4747, MYY89 in 30 $\mu$ L 1. izolacije iz pekovskega kvasa.. .....	34
Slika 14: 1. izolacija sfingolipidov iz tobaka za SPR.....	35
Slika 15: 2. izolacija sfingolipidov iz tobaka za SPR.....	35
Slika 16: 3. izolacija sfingolipidov iz tobaka za SPR.....	35
Slika 17: Odrezani in pobarvani deli TLC ploščic po razvijanju 9 x 40 $\mu$ L vsake frakcije od A do F za SPR. ....	36
Slika 18: TLC ploščica po nanosu 30 $\mu$ L vzorca ekstrahiranih lis iz frakcij od A do F ter 50 $\mu$ L združenih frakcij A–F za SPR. ....	36
Slika 19: TLC ploščica po nanosu posamezne frakcije A–F 1. in 2. izolacije iz tobaka za elektroforezo.....	37

Slika 20: TLC ploščica po ekstrakciji zelenih sfingolipidov za elektroforezo.....	37
Slika 21: TLC ploščica po nanosu posamezne frakcije A–F po izolaciji iz tobaka za metodo prenosa lipidov na PVDF membrano. ....	38
Slika 22: TLC ploščica po ekstrakciji zelenih sfingolipidov za metodo prenosa lipidov na PVDF membrano. ....	38
Slika 23: TLC ploščica po nanosu 60 $\mu$ L frakcije F izolacije iz tobaka in razvijanju v dveh dimenzijah (levo) in TLC ploščica po nanosu 30 $\mu$ L ekstrahiranih zelenih sfingolipidov in 30 $\mu$ L lipidov združenih frakcij A–F (desno). ....	39
Slika 24: TLC ploščica po prvem prenosu lipidov na PVDF membrano .....	40
Slika 25: TLC ploščica po drugem prenosu lipidov na PVDF membrano .....	41
Slika 26: Prvi prenos lipidov na PVDF membrano).....	42
Slika 27: Drugi prenos lipidov na PVDF membrano. ....	42
Slika 28: Senzorgram. ....	43
Slika 29: Nanos veziklov POPC (levo) in POPC/sfingolipidi (desno) na čip L1.....	44
Slika 30: Vezava proteina NPP1 na vezikle POPC (levo) in POPC/sfingolipidi (desno)...	45
Slika 31: Razlika v odzivu in hitrosti disociacije po vezavi proteina NPP1(5 $\mu$ M) na vezikle s POPC (črna krivulja) in POPC/sfingolipidi (rdeča krivulja).....	45
Slika 32: Gel po barvanju s coomasie brilliant blue po inkubaciji veziklov POPC s proteini NLP.....	48
Slika 33: Gel po barvanju s coomasie brilliant blue po inkubaciji veziklov POPC/sfingolipidi s proteini NLP.. ....	49
Slika 34: Gel po barvanju s coomasie brilliant blue po inkubaciji veziklov POPC s proteini NLP – usedlina .....	49
Slika 35: Gel po barvanju s coomasie brilliant blue po inkubaciji veziklov POPC s proteini NLP – supernatant .....	50
Slika 36: Gel po barvanju s coomasie brilliant blue po inkubaciji veziklov POPC/sfingolipidi s proteini NLP – usedlina.....	50
Slika 37: Gel po barvanju s coomasie brilliant blue po inkubaciji veziklov POPC/sfingolipidi s proteini NLP – supernatant.....	51

## I.POVZETEK

Sfingolipidi so lipidi, ki skupaj s fosfolipidi in holesterolom predstavljajo pomembne sestavine večine bioloških membran. Gre za biološko aktivne komponente, vključene v veliko pomembnih bioloških procesov, kot so rast in razvoj celic, prepoznavanje celic, celično signaliziranje in celična smrt. Zaradi tega so lahko potencialna tarča nekroza in etilen- inducirajočem peptidu 1 podobnih proteinov (NLP proteinov), ki po prodiranju v zunajcelični prostor dvokaličnic sprožijo številne procese, kot sta proizvodnja etilena in nekroza celic. Mehanizem delovanja proteinov NLP še ni v celoti znan, vendar domnevajo, da je celična smrt najverjetneje povzročena s stimulacijo imunskega sistema ali z direktno toksičnostjo zaradi poškodbe plazemske membrane. Da bi razumeli, zakaj pride do takšnega delovanja proteinov NLP na dvokaličnice, je pomembno poznati mehanizem delovanja in tarčo proteinov.

V okviru magistrske naloge smo preučevali vezavo proteinov NLP na sfingolipide, s čimer bi lahko nakazali, da so sfingolipidi tarče proteinov NLP. Sfingolipide smo izolirali iz kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in tobaka (*Nicotiana tabacum*). Kvasovka *S. cerevisiae* vsebuje tri skupine sfingolipidov: inozitol fosfoceramid, manozilinozitol fosfoceramid in manozildiinozitol fosfoceramid. V listih tobaka prevladujejo glikozil inozitol fosfoceramidi, katerih glukozaminski del je lahko acetiliran in kateri imajo v različnih razmerjih vezane sladkorje arabinozo, galaktozo in manozo. Uporabili smo različne proteine NLP, od katerih NIP, NPP1 in Panie delujejo citolitično in povzročajo nekrozo. Ostale variante (NIP D104A, NIP H101A, NPP1 D104A in NPP1 H101A) zaradi zamenjave aminokislinskih ostankov, pomembnih za citolitično delovanje (histidin na mestu 101 in asparaginska kislina na mestu 104), z alaninom ne delujejo citolitično. Izolirane sfingolipide smo ločili s tankoplastno kromatografijo in ekstrahirali zelene sfingolipide iz silikagela. Vezavo proteinov NLP na sfingolipide smo testirali z metodo površinske plazmonske resonance, z elektroforezo in prenosom lipidov na PVDF membrano. Z metodo SPR smo dobili rezultate, ki nakazujejo na vezavo proteinov NLP na sfingolipide, medtem ko z metodo prenosa lipidov na PVDF membrano in elektroforezo nismo dokazali vezave.

Ključne besede: sfingolipidi, proteini NLP, TLC, površinska plazmonska resonanca, elektroforeza



## II.ABSTRACT

Sphingolipids are class of lipids that are important components of the majority of biological membranes, along with phospholipids and cholesterol. They are biologically active components involved in many important biological processes such as growth and development of cells, identification of cells, cell signaling and cell death. Due to this, sphingolipids can be potential targets of necrosis and ethylene- inducing peptide 1 like proteins (NLP proteins), which after penetration into the extracellular space of dicotyledonous plants, trigger number of processes such as the production of ethylene and necrosis. The mechanism of action of NLP proteins is not yet fully understood. The cell death can be caused by the stimulation of immune system, or by direct toxicity due to damage of the plasma membrane. For understanding why NLP proteins act like that it is important to know the mechanism of action and what's the target of NLP proteins.

In the context of the master's thesis, we studied the binding of NLP proteins on sphingolipids as our aim was to establish whether sphingolipids are the targets of NLP proteins. Sphingolipids were isolated from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and tobacco (*Nicotiana tabacum*). *S. cerevisiae* contains three classes of sphingolipids: inositolphosphorylceramide, mannosylinositolphosphorylceramide and mannosyldiinositolphosphorylceramide. Glycosyl inositol fosfoceramids are the biggest class of sphingolipids present in tobacco leafs. They contain glucosamine moiety that can be acetylated and glycosilated with: arabinose, galactose and mannose in different ratios. In our laboratory work, we used different NLP proteins, from which NIP, NPP1 and Panie have cytolytic function and cause necrosis. Other proteins (NIP D104A, NIP H101A, NPP1 D104 and NPP1 H101A) due to replacement of amino acid residues, important for the cytolytic function (histidine at the site 101 and aspartic acid at position 104), with alanine do not have cytolytic function. Isolated sphingolipids were separated by thin-layer chromatography, and extracted from silica gel. We used surface plasmon resonance, electrophoresis, and transfer of lipids on the PVDF membrane for testing the binding of NLP proteins on the sphingolipids. Surface plasmon resonance gave the results that indicate a possible binding of NLP proteins on isolated sphingolipids, while the method of lipid transfer to PVDF membrane and electrophoresis did not reveal any binding.

Key words: sphingolipids, NLP proteins, TLC, surface plasmon resonance, electrophoresis

### III. SEZNAM OKRAJŠAV

AK	aminokislina
APS	amonijev persulfat
Ara	arabinoza
BSA	goveji serumski albumin (ang. <i>bovine serum albumin</i> )
Cer	ceramid
Cer-1-P	ceramid-1-fosfat
CIB	pufer za izolacijo kloroplastov (ang. <i>chloroplast isolation buffer</i> )
Co-A	koencim A
CSM	mešanica aminokislin (ang. <i>complete supplement mixture</i> )
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
DTT	ditiotretitol
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EGTA	etilenglikol tetraocetna kislina (ang. <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i> )
Gal	galaktoza
GIPC	glikozil inozitol fosfoceramid
GSL	glikozilceramid
HEPES	N-[2-hidroksietil ]piperazin-N'-[2-etansulfonska kislina ]
IPC	inozitol fosfoceramid
LCB	aminoalkohol z dolgoverižno osnovo (ang. <i>long chain base</i> )
LC-MS	tekočinska kromatografija v povezavi z masno spektrometrijo (ang. <i>liquid chromatography–mass spectrometry</i> )
Man	manoza
MAP	mitogen aktivni protein
MES	2-morfolinoetansulfonska kislina
MIPC	manozilinozitol fosfoceramid
M(IP) <sub>2</sub> C	manozildiinozitol fosfoceramid
MLV	multilamelarni vezikel (ang. <i>multilamellar vesicles</i> )
MPLC	tekočinska kromatografija pri srednjih pritiskih (ang. <i>medium-pressure liquid chromatography</i> )
MS	masna spektrometrija
NaDS	natrijev lavrilsulfat (ang. <i>sodium dodecyl sulfat</i> )

NEP1	nekroza in etilen-inducirajoči peptid 1(ang. <i>necrosis and ethylene inducing peptide 1</i> )
NLP	proteini, ki so podobni NEP1 (ang. <i>NEP1-like protein</i> )
NO	dušikov monoksid
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	fosfatni pufer (ang. <i>phosphate buffered saline</i> )
POPC	ang. <i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
PSL	fosfosfingolipid
PVDF	poliviniliden fluorid
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	obrati na minuto (ang. <i>rounds per minute</i> )
RU	odzivna enota (ang. <i>response unit</i> )
SPR	površinska plazmonska rezonanca (ang. <i>surface plasmon resonance</i> )
SUV	majhni unilamelarni vezikli (ang. <i>small unilamellar vesicles</i> )
TBS	tris pufer s soljo (ang. <i>tris-buffered saline</i> )
TCA	triklor očetna kislina (ang. <i>trichloroacetic acid</i> )
Temed	tetrametiletilendiamin
TLC	tankoplastna kromatografija (ang. <i>thin-layer chromatography</i> )
UV	ultravijolična svetloba
YNB	gojišče za kvasovke (ang. <i>yeast nitrogen base</i> )
YPD	hranjivo gojišče za rast kvasovk (ang. <i>yeast peptone dextrose</i> )

# 1. UVOD

## 1.1. SFINGOLIPIDI

Celične membrane so lipidni dvosloji, ki večinoma vsebujejo enega od skupin membranskih lipidov, kot so holesterol, fosfolipidi in sfingolipidi. Sfingolipidi so raznolika skupina spojin, ki jih uvrščamo k lipidom in se nahajajo v vseh evkariontskih organizmih ter v nekaterih prokariotnih organizmih in virusih.

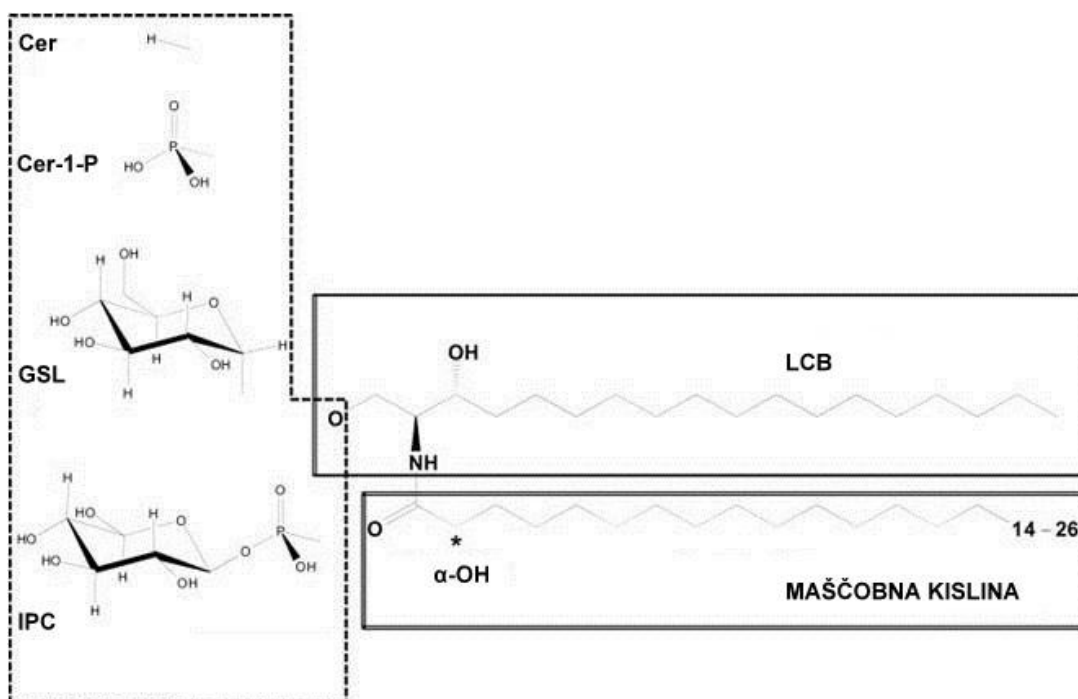
Osnovni gradnik sfingolipidov je aminoalkohol z različno dolgo alifatsko verigo (LCB, ang. *long chain base*), na katerega so z amidno vezjo vezane maščobne kisline (slika 1). Nadaljnje modifikacije vključujejo spremembe v dolžini verige, metilacije, hidroksilacije, nasičenosti pri aminoalkoholu in/ali maščobnih kislinah, kovalentne vezave proteinov ter konjugacije primarnih hidroksilnih skupin LCB s polarnimi skupinami, kot so fosfatne skupine, ogljikovi hidrati, inozitol fosfatne skupine itn.

Sfingolipidi so pri sesalcih bolj kompleksni kot pri rastlinah in kvasovkah. Razlikujejo se tako med posameznimi organizmi, kot tudi med tkivi in organi znotraj enega organizma (1,2). Gre za biološko aktivne komponente, ki so vključene v prepoznavanje celic, opredelitev strukturnih lastnosti membran ter v veliko bioloških funkcij, kot so rast in razvoj celic, celična smrt in podobno. Njihovi derivati se pojavljajo kot intermedijati v metabolizmu sfingolipidov in celičnem signaliziranju, njihovo nastajanje je povezano z odgovori na stres, povišani pa so pri motnjah metabolizma in različnih boleznih. Sfingolipidi so predvsem zaradi strukturne raznolikosti vpleteni v številne različne funkcije (2,3).

Glikosfingolipidi so amfifilne molekule, sestavljene iz hidrofobnega ceramidnega jedra in polarne glave (ogljikohidratni del). Polarno glavo tvorijo oligosaharidi, ki so z glikozidno vezjo povezani s primarno hidroksilno skupino LCB, se razširjajo v vodno okolje na celični površini in so lahko zaradi omenjenega odlični kandidati za prepoznavne molekule. Glikosfingolipidi so možne tarče vezavnih proteinov virusov, protiteles, bakterijskih toksinov, lektinov itd., ki lahko po vezavi na površino celice vplivajo na celično aktivnost (2).

### 1.1.1. Raznolikost sfingolipidov

Zaradi razlik v zgradbi LCB, maščobnih kislin in skupin, vezanih na LCB, se lahko sfingolipidi v rastlinah razdelijo na glikozil inozitol fosfoceramide (GIPC), glikozilceramide (GSL), ceramide in proste LCB (slika 1). Posledično se razlikujejo tudi v polarnosti, od česar je odvisna učinkovitost ekstrakcije z določenimi topili iz želenega tkiva. V preglednici I so našteve najpogostejše sfingolipidne osnove in opisane funkcije posamezne skupine sfingolipidov v rastlinah, kvasovkah in sesalcih. Rastlinski sfingolipidi so glavne sestavine plazemske membrane, tonoplasta ter ostalih notranjih membran rastlinskih celic. Najbolj zastopan razred je GIPC, katerega je tudi najtežje ekstrahirati zaradi njegove velike polarnosti. GSL se sintetizirajo v endoplazemskem retikulumu in plazemski membrani, GIPC pa v Golgijevem aparatu. Ceramidi in proste LCB nastanejo pri procesih tvorbe sfingolipidov po obeh poteh. Prva pot se imenuje »de novo« in se začne s kondenzacijo serina z acil-CoA, druga pa je pot razgradnje, kjer ceramidi in proste LCB nastanejo z razgradnjo kompleksnih sfingolipidov (1,4).



**Slika 1:** Zgradbe različnih skupin sfingolipidov v rastlinah. Sfingolipidi imajo na hidrofolbno jedro vezane različne skupine: fosfatno skupino (Cer-1-P), ogljikohidrate (GSL) in inozitol fosfatno skupino (IPC), ki se lahko glikozilira z različnimi sladkorji (GIPC). Prirejeno po (1).

**Preglednica I:** Najpogostejše LCB pri rastlinah, kvasovkah in sesalcih ter funkcije posamezne skupine sfingolipidov (1,5).

Organizem	Najpogostejši LCB	Funkcije posamezne skupine sfingolipidov			
		GIPC	GSL	Ceramid	LCB
<b>Rastline</b>	-pogosto: nenasičeni $\Delta 8$ <i>cis</i> ali <i>trans</i> izomeri LCB, ki so lahko $\Delta 4$ <i>trans</i> nasičeni ali nenasičeni -manj pogosto: dihidrosfingozin d18:0 fitosfingozin t18:0	-vpliv na celično signalizacijo, komunikacijo med celicami, usmerjanje proteinov	-vpliv na stabilnost in permeabilnost membran	-vpliv na programirano celično smrt	- posredovanje celičnih procesov - vpliv na celično smrt
<b>Kvasovke</b>	-dihidrosfingozin (d18:0, d20:0) -fitosfingozin (t18:0, t20:0)				
<b>Sesalci</b>	-sfingozin (d18:1 <sup><math>\Delta 4</math> <i>trans</i></sup> )	/ GIPC- oblika edinstvena za organizme, ki imajo celično steno			

### 1.1.2. Sfingolipidi v tobaku (*Nicotiana tabacum*)

V listih tobaka prevladujejo glikozil inozitol fosfoceramidi. Glede na to, ali je glukozaminski del skupine, pripete na ceramidno jedro, acetiliran, se delijo na dva razreda: PSL I in PSL II.

PSL I (N-acetilglukozamin ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) glukuronska kislina ( $\alpha 1 \rightarrow 2$ ) -mio-inozitol-1-O-P ) je acetiliran fosfosfingolipid, na katerega so lahko pripeti naslednji ogljikovi hidrati: (Ara<sub>2</sub>Gal<sub>2</sub>), (Ara<sub>3</sub>Gal<sub>2</sub>) ali (Ara<sub>4</sub>Gal<sub>2</sub>).

PSL II (glukozamin-glukuronska kislina-inozitol-P) nima acetiliranega glukozaminskega dela, nanj pa so lahko pripeti naslednji oligosaharidi: (Ara<sub>3</sub>Gal), (Ara<sub>2</sub> ali <sub>3</sub>Gal<sub>2</sub>) ali (Ara<sub>2</sub>Gal<sub>2</sub>Man) (1,5).

## **1.2. PROTEINI NLP**

Patogeni, ki napadajo rastline, so bakterije, glive in oomicete. Nekateri patogeni izločajo toksine, ki povečajo virulenco mikroorganizma in spodbujajo razvoj bolezni ter povzročajo celično smrt pri rastlinah. Sproščajo lahko tudi spojine, kot so proteini, glikoproteini ali oligosaharidi, ki sprožijo različne odzive rastlinskega imunskega sistema in omogočajo patogenom, da zavrejo ali se izognejo delovanju rastlinske obrambe. Obramba se začne s prepoznavanjem molekularskih vzorcev, ki so značilni za posamezne mikroorganizme, ali s poškodbo rastlinske celice (7,8).

### **1.2.1. Mehanizem delovanja proteinov NLP**

Proteini NLP so družina proteinov, ki po prodiranju v zunajcelični prostor dvokaličnic sprožijo številne procese, kot so proizvodnja etilena, aktivacija MAP kinaz, proizvodnja NO in ROS, sinteza fitoaleksinov in nekroza. Od odkritja Nep-1 iz *Fusarium oxysporum* so identificirali še veliko drugih proteinov NLP iz različnih bakterij, gliv in oomicet, ki se razlikujejo v sposobnosti sprožanja celične smrti (9,10).

Mehanizem delovanja proteinov NLP na rastlinske celice še ni znan v celoti. Domnevajo, da lahko proteini NLP povzročijo celično smrt na dva načina: a) s spodbujanjem rastlinskega imunskega sistema in b) z direktno toksičnostjo zaradi poškodbe plazemske membrane (9). Proteini NLP pri dvokaličnicah delujejo citotoksično, pri enokaličnicah pa ne. Vzrok temu je lahko, da v enokaličnicah niso prisotne oziroma dostopne molekule, ki so odgovorne za prepoznavanje ali vezavo proteinov NLP, lahko pa je odziv imunskega sistema enokaličnic na njih drugačen kot pri dvokaličnicah (11).

### **1.2.2. Strukturne značilnosti proteinov NLP**

Za povzročitev povečane prepustnosti plazemske membrane, razpada celic in celične smrti ter za ponovno vzpostavljanje virulence patogena je pomembno, da je zgradba proteina ohranjena in da so prisotne določene strukturne značilnosti. Ta proces je zelo odvisen tudi od temperature (pri višjih temperaturah se zmanjša aktivnost proteina) in svetlobe ter zahteva interakcije s tarčnim mestom, ki je edinstveno za zunanjo površino plazemske membrane (7,10).

Kristalna zgradba NLP<sub>pya</sub> sestoji iz ene domene, ki ima na sredini  $\beta$  sendvič, sestavljen iz treh trakov v prvi ravnini in pet antiparalelnih trakov v drugi ravnini. Na zgornji strani se nahajajo tri vijačnice, ki tvorijo ravno površino. Tri široke zanke (L1, L2 in L3), ki tvorijo neravno površino, se nahajajo na spodnji strani polipeptida. Za pritrditev zanke L1 na osrednji del je pomemben disulfidni most med dvema cisteinskima ostankoma, ki se nahajata znotraj molekule. Nad zankama (L2 in L3) se nahaja vdolbina z negativnim nabojem, ki je namenjena vezavi dvovalentnega kationa (7).

Najmočnejše ohranjen del zgradbe pri proteinih NLP, izoliranih iz različnih vrst, je osrednji heptapeptid (GHRHDWE – AK ostanki 100–106), za katerega menijo, da ima ključno vlogo pri biološki aktivnosti proteinov NLP in je del vdolbine z negativnim nabojem. Heptapeptid sestavljajo K92, D93, H101, R102, H103, D104, E106 in S126, od katerih so D93, H101, D104 in E106 pomembni za vzdrževanje pravilne lege dvovalentnega kationa in citolitično aktivnost (7,8). Strukturne analize so pokazale, da se citolitična aktivnost proteinov NLP izrazi zaradi vzdrževanja pravilne lege dvovalentnega kationa v vdolbini ali zaradi tvorbe zanke, primerne za interakcije s specifičnimi komponentami, ki so izpostavljene na površini plazemske membrane rastlinske celice (12). Strukturni del, ki ga vsebuje večina proteinov NLP in je pomemben za aktivnost, je N-končni signalni peptid, ki kaže na to, da se protein izloča in deluje zunajcelično. Pomembni so tudi cisteinski ostanki, ki tvorijo disulfidni most znotraj molekule. Proteini NLP lahko vsebujejo dva, štiri ali šest cisteinskih ostankov, odvisno od tipa proteina (8,9).

### **1.3. METODE ZA ANALIZO BIOLOŠKIH MOLEKUL IN VREDNOTENJE VEZAVE MED MOLEKULAMI**

#### **1.3.1. Enodimenzionalna tankoplastna kromatografija**

Tankoplastna kromatografija (TLC, ang. *thin-layer chromatography*) je kromatografska metoda, ki se uporablja za ločevanje in analizo zmesi. Lahko jo uporabimo za določitev števila spojin v vzorcu, identiteto spojin in čistost posamezne spojine ali kot preparativni korak za nadaljnje analize z drugimi tehnikami, kot so plinska kromatografija ali masna spektrometrija v povezavi s plinsko kromatografijo (13).



Najpogosteje uporabljana stacionarna faza pri analizi lipidov je silikagel, ki je v tanki plasti nanesen na nosilno ploščo. Izbira mobilne faze je odvisna od lastnosti spojin, ki se nahajajo v vzorcu (14).

Ločitev spojin pri TLC temelji na različni afiniteti spojin do mobilne in stacionarne faze, ki je odvisna od lastnosti obeh faz in topljencev. Pri tem pride do nenehne izmenjave molekul topljenca med dvema fazama. Spojine se premikajo pod vplivom potovanja topila navzgor po ploščici, medtem ko afiniteta topljenca do stacionarne faze upočasnuje premik spojin vzorca. Izvedba TLC sestoji iz treh stopenj: nanašanja vzorca ter razvijanja in detekcije spojin. Po pridobitvi primerne vzorca tega raztopimo v hlapnem topilu, nato pa določen volumen raztopljenega vzorca v obliki točke ali tanke črtice naneseemo na označeno mesto na enem koncu ploščice. Po nanosu vzorca ploščico posušimo, da topilo, v katerem je vzorec raztopljen, izhlapi. V komoro za razvijanje TLC nalijemo določen volumen mobilne faze. Komoro zapremo, da se v njej vzpostavi enakomeren parcialni tlak topila. Nasičenost komore je pomemben dejavnik pri razvijanju. Pomembno je, da so vse komponente topila v ravnotežju z vsemi conami plinskega prostora pred in med razvijanjem. Po določenem času pripravljeno ploščico prenesemo v komoro s topilom, tako da je del stacionarne faze, na kateri je nanesen vzorec, nad gladino topila. Zaradi delovanja kapilarnih sil topilo potuje navzgor po ploščici. S potovanjem topila potujejo tudi spojine, ki so v vzorcu. Spojina, ki ima večjo afiniteto do mobilne faze, bo prepotovala daljšo pot kot spojina, ki ima večjo afiniteto do stacionarne faze. Za kvantifikacijo premika spojine uporabljamo retencijski faktor. To je razmerje med razdaljo, ki jo je prepotovala posamezna spojina vzorca, in potjo mobilne faze, ki se meri od linije nanašanja do fronte topila. Identifikacija spojin temelji na primerjavi vrednosti retencijskega faktorja spojine z retencijskim faktorjem referenčnega standarda. Potrditev identifikacije lahko pridobimo z eluiranjem analita, kateremu sledi primerna spektrometrična metoda, če je na voljo zadostna količina spojine. Preden topilo doseže vrh ploščice, ploščico vzamemo iz komore, pustimo, da se ploščica v digestoriju suši, da topilo izhlapi. Položaj posamezne spojine ugotovimo na vidni svetlobi ali pod UV svetlobo z (lahko tudi brez) uporabo orositvenih reagentov. Detekcija je najbolj enostavna, če so spojine obarvane same po sebi, ker jih vidimo s prostim očesom takoj po razvijanju, ali če fluorescirajo oziroma absorbirajo UV svetlobo. Za večino spojin je potrebna uporaba orositvenega reagenta, ki je specifičen za določeno skupino spojin. Ploščico lahko potopimo ali orosimo z orositvenim reagentom ter

po potrebi segrejemo. Gretje ploščice je občasno potrebno, da bi pospešili reakcijo ali da bi ta sploh stekla. Segrevanje ploščice 5–10 minut na 120–180 °C pogosto omogoči, da reakcija steče v popolnosti, vendar so v določenih primerih potrebne temperature višje od 180 °C (14,15).

### **1.3.2. Dvodimenzionalna TLC**

Dvodimenzionalna TLC je različica tankoplastne kromatografije, pri kateri razvijanje ploščice izvedemo v dveh smereh. Na začetku testa vzorec nanese v en kot TLC ploščice, da se razvije v izbranem topilu. Po razvijanju, ko se ploščica posuši, jo obrnemo za 90 ° in razvijamo v istem topilu še v drugi smeri. Če spojine med razvijanjem ne razpadejo, se bodo po drugem razvijanju nahajale na diagonali. Tiste spojine, ki so nestabilne in so se v času ločitve kemijsko spremenile, se bodo nahajale stran od diagonale. Ta metoda je zelo uporabna pri določitvi stabilnosti spojin, katerih stabilnost je vprašljiva zaradi pogojev, pod katerimi se izvaja ločitev (16). Dvodimenzionalna TLC ima zaradi večje difuzije med dvema razvojem slabšo ponovljivost in detekcijsko občutljivost kot enodimenzionalna TLC (15).

### **1.3.3. Barvanje spojin po ločitvi s TLC**

Za detekcijo lipidov lahko uporabimo veliko različnih reagentov različne specifičnosti in občutljivosti.

Za vizualizacijo sfingolipidov najpogosteje uporabljamo primulin ter mešanico 10 % bakrovega sulfata in 8 % fosforne kisline. Barvanje s primulinom je nedestruktivna in zelo občutljiva metoda vizualizacije. Ploščico poškopimo z raztopino primulina, jo posušimo in pogledamo pod UV lučjo. Lipide vidimo kot svetle cone na temnem ozadju. S tem postopkom se lahko detektirajo zelo nizke količine lipidov (nanogramske količine). Ena od metod, ki da najboljše rezultate za vizualizacijo sfingolipidov, je uporaba mešanice 10 % bakrovega sulfata in 8 % fosforne kisline. Ploščico poškopimo z omenjeno mešanico, jo posušimo ter do 15 minut segrevamo na temperaturi 150–180 °C. Sfingolipidi se na belem ozadju obarvajo rjavo. S to metodo se rjavo obarvajo tudi holesterol in fosfolipidi. Pomanjkljivost omenjene metode je ta, da se spojine v vzorcu uničijo med vizualizacijo (2,13).

#### **1.3.4. Prenos lipidov na PVDF membrano**

Za preizkušanje vezave proteinov na lipide lahko uporabimo imunokemijske reakcije. Zaradi težav pri detekciji spojin direktno na TLC ploščici, ki nastanejo zaradi zdrsa silikagela s steklene ploščice pri procesu stresanja s protitelesi in pri izpiranju, je bolje, da spojine po ločitvi na TLC ploščici prenesemo na PVDF membrano in jih nato detektiramo z različnimi reagenti. Metoda je uporabna za vse hidrofobne molekule, ki se lahko ločijo na TLC ploščici (sfingolipidi, steroli, fosfolipidi itd.).

PVDF membrana ima veliko prednosti: obstojna je pri višjih temperaturah ter pri uporabi kislih raztopin in različnih organskih topil. Ima veliko vezavno kapaciteto za amfilne molekule, ki se verjetno na membrano vežejo s hidrofobnimi interakcijami, medtem ko so hidrofilni deli prenesenih lipidov obrnjeni v zunanje okolje (2).

Pri imunokemijskih metodah uporabljamo protitelesa, ki specifično vežejo posamezne molekule. Metoda je zelo občutljiva, zato je dovolj že prisotnost majhne količine analita, ki ga želimo analizirati. Pri uporabi neoznačenih protiteles se po vezavi protitelesa na analit spremenijo fizikalno-kemijske lastnosti slednjega, kar izkoristimo za detekcijo.

Uporabljajo se lahko tudi protitelesa, ki so fluorescenčno, radioaktivno ali luminiscenčno označena ali imajo vezan encim. Po vezavi na analit in spiranju nevezanih protiteles lahko s pomočjo določitve količine vezanega protitelesa posredno določimo količino analita. Pogosto v enem poskusu uporabimo tako primarna kot tudi sekundarna protitelesa. Primarna protitelesa so specifična za posamezno molekulo in se nanjo vežejo. Vezana primarna protitelesa se potem detektirajo s sekundarnimi protitelesi, ki so označena (17).

#### **1.3.5. Elektroforeza**

Elektroforeza je metoda, pri kateri ločitev molekul temelji na različni hitrosti potovanja molekul po izpostavitvi električnemu polju. Hitrost potovanja je odvisna od naboja proteina, moči električnega polja, kateremu je molekula izpostavljena, in zavernega koeficienta. Na zavorni koeficient vplivajo oblika in velikost delca, viskoznost elektrolita in poroznost medija.

Za ločitev proteinov najpogosteje uporabljamo poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE), ki jo lahko izvajamo brez (nativna PAGE) ali z dodano površinsko aktivno snovjo (npr. NaDS PAGE). Princip ločevanja proteinov pri nativni PAGE temelji na osnovi

velikosti in naboja proteina, pri NaDS PAGE pa na osnovi mase, pri čemer se manjše molekule gibljejo hitreje kot velike.

Pri NaDS PAGE kot površinsko aktivno snov uporabljamo natrijev lavrilsulfat, ki se veže na proteine, jih denaturira in jim da negativen naboj. Razmerje med nabojem in dolžino verige takega kompleksa je enako za vse proteine, zato je ločitev odvisna od relativne molekulske mase proteina.

PAGE poteka v gelu, ki nastane s polimerizacijo akrilamida in N,N'-metilenbisakrilamida med dvema ploščama. Uporabljamo dva gela, ki se razlikujeta glede na stopnjo zamreženosti. Koncentracijski gel se nahaja nad separacijskim gelom, je manj zamrežen in v njem ne poteka ločitev. Zgornji in spodnji del gela sta ves čas elektroforeze v stiku z elektroforeznim pufrom. Ko nanese vzorec, se sistem priključi na napetost, s tem pa omogoči potovanje ionov. Anioni potujejo proti anodi, kationi pa proti katodi. Pri potovanju ionov skozi koncentracijski gel se proteini skoncentrirajo v ozkem pasu, po prehodu v separacijski gel pa se začne ločevanje na osnovi razlik v naboju ali velikosti.

Po ločitvi na gelu se proteini vizualizirajo. Metodi barvanja, ki ju najpogosteje uporabljamo pri tem, sta barvanje s srebrovimi solmi in uporaba coomasie brilliant blue, aminotriarilmetanskega barvila, ki tvori kompleks s pozitivno nabitimi aaminskimi skupinami z van der Waalsovimi in elektrostatskimi interakcijami. Barvanje s srebrovimi solmi je bolj občutljivo kot barvanje s coomasie brilliant blue, je pa tudi bolj zahtevno, zato je barvanje s slednjim bolj razširjeno. Pri omenjenem barvanju se poliakrilamidni gel potopi v raztopino barvila, s čemer se proteini fiksirajo v gelski matriks ter obarvajo. Za odstranitev nevezane količine barvila, po določenem času stresanja izvedemo razbarvanje z raztopino očetne kisline in primerne alkohola (etanol, metanol) (17).

### **1.3.6. Površinska plazmonska resonanca**

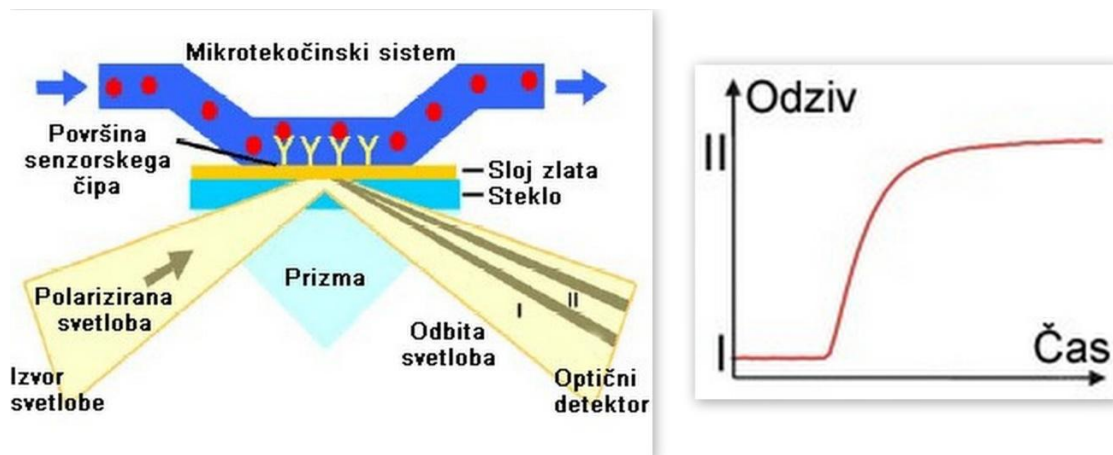
Površinska plazmonska resonanca (SPR, ang. *surface plasmon resonance*) je metoda s katero lahko preučujemo interakcije med biološkimi makromolekulami v realnem času. Omogoča merjenje afinitete in kinetike interakcij, zadostujejo že majhne količine vzorca, molekul pa ni potrebno označevati, ker je odziv pri SPR povezan s spremembo masne koncentracije na površini senzorskega čipa in lahko potek vezave spremljamo direktno. Ker lahko preučujemo skoraj vse interakcije med molekulami, je metoda uporabna tudi za preučevanje vezave proteinov in membranskih lipidov (v našem primeru sfingolipidov).

Pomembno pri tem je, da proteini ohranijo svojo prvotno zgradbo in aktivnost, da lahko omogočijo zelene interakcije.

Pri SPR uporabljamo sistem, ki sestoji iz senzorskega čipa, na katerega pritrdimo receptorske molekule (ligande), detektorja, ki meri spremembo kota, in mikrotekočinskega sistema, ki privede molekule do receptorskih molekul.

Senzorski čip je steklena ploščica, ki je prevlečena s tanko plastjo zlata. Na površini čipa so prisotne različne kemijske skupine, ki omogočajo vezavo receptorske molekule. Pri SPR najpogosteje uporabljamo Biacore tehnologijo in Biacore senzorska čipa HPA in L1. HPA čip ima na površini zlata s kovalentno vezjo vezano plast alkanov, ki omogočajo tvorbo lipidnega monosloja. L1 čip ima na površini zlata plast karboksimetiliranega dekstrana, na katerega so pripete lipofilne alkanske skupine, kar omogoča tvorbo lipidnega dvosloja in vezavo nepoškodovanih liposomov. Na dekstran se sicer lahko pripnejo tudi različne funkcionalne skupine (karboksilna, amino skupina ipd.) ali sekundarne molekule (protitelesa), preko katerih se biološke molekule lažje vežejo na površino čipa.

Ko se zelena molekula veže na senzorski čip, vbrizgamo analitsko molekulo s pomočjo mikrotekočinskega sistema, da ta teče preko čipa. Za spremljanje poteka vezave med molekulami uporabljamo optične metode, ki merijo spremembo lomnega količnika na površini senzorskega čipa. Ko gre žarek polarizirane svetlobe skozi medij z visokim lomnim količnikom in pride do sloja zlata, ki je na meji z medijem z nizkim lomnim količnikom, se del energije absorbira, kar se kaže kot zmanjšanje intenzitete odbite svetlobe. Lomni količnik se spremeni, posledično pa tudi kot, pri katerem pride do SPR, in sicer takrat, ko pride do vezave med molekulami, kar se na sensorgramu vidi kot povečanje intenzitete signala (slika 2). Sensorgram predstavlja odvisnost spremembe kota, pri katerem pride do SPR v odvisnosti od časa. Za opis povečanja intenzitete signala uporabljamo enoto RU (ang. *response unit*, odzivna enota), ki ustreza spremembi kota  $10^{-4}^\circ$  (18,19).



**Slika 2:** Shematski prikaz merjenja interakcij na osnovi SPR (levo) in primer senzograma (desno). Prirejeno po (20).

## 2. NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je testiranje vezave proteinov NLP na sfingolipide, izolirane iz kvasovke *S. cerevisiae* in tobaka.

Da bomo lahko izvedli želeno delo, bomo:

- a) izolirali sfingolipide iz pekovskega kvasa, kvasovk *S. cerevisiae* BY4747 in MYY89 ter tobaka;
- b) izolirane lipide ločili s pomočjo TLC;
- c) po ločevanju lipidov s TLC določili najbolj optimalno metodo za njihovo vizualizacijo;
- d) zelene sfingolipide ekstrahirali iz silikagela in
- e) testirali vezavo proteinov NLP na sfingolipide.

Proteine NLP smo za svoje študije pridobili iz ZMBP (Center for Plant Molecular Biology, Plant Biochemistry), Univerza v Tübingenu, Nemčija. Uporabili bomo različne proteine, od katerih proteini NPP1 H101A, NPP1 D104A, NIP H101A in NIP D104A ne delujejo citolitično, medtem ko NIP, NPP1 in Panie povzročajo nekrozo pri dvokaličnicah.

Da bi ovrednotili vezavo proteinov NLP na sfingolipide, bomo uporabili tri metode:

- prenos lipidov, ki jih bomo na TLC ploščici ločili, na PVDF membrano;
- površinsko plazmonsko resonanco in
- elektroforezo.

Na podlagi rezultatov bomo ocenili, ali se proteini NLP vežejo na izolirane sfingolipide.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. REAGENTI

Anorganski in organski reagenti ter topila, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu magistrske naloge, so kupljeni pri proizvajalcih Carlo erba, J. T. Baker, Merck in Sigma ter so izključno kakovosti za analizo (*pro analisi*).

#### 3.2. BIOLOŠKI MATERIAL

Biološki materiali, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu:

- pekovski kvas: Mercator, Ljubljana;
- *Saccharomyces Cerevisiae* BY4747 in MYY89: Dr. Kihara s Hokkaido University, Japonska;
- 4-hidroksisfinganin(*Saccharomyces Cerevisiae*):Avanti Polar Lipids, Inc., kataloška številka: 860499P;
- sfingomielin (Brain, Porcine): Avanti Polar Lipids, Inc., kataloška številka: 860062P;
- 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoholin: Avanti Polar Lipids, Inc., kataloška številka: 850457P;
- tobak (*Nicotiana tabacum*): Nacionalni inštitutu za biologijo (NIB), Ljubljana, rastline stare 6–8 tednov;
- goveji albumin (BSA, ang. *bovine serum albumin*): Merck, Nemčija;
- Panie (Tea) 50  $\mu$ M: Tea Lenarčič, Kemijski inštitut, Ljubljana;
- proteini NLP\*(navedenispodaj): ZMBP – Center for Plant Molecular Biology, Plant Biochemistry, University of Tübingen, Nemčija
  - \*NIP 26,5  $\mu$ M
  - \*NIP H101A 25,6  $\mu$ M
  - \*NIP D104A 23,7  $\mu$ M
  - \*NPP1 H101A 13  $\mu$ M
  - \*NPP1 D104A 15  $\mu$ M
  - \*NPP1 HD 4.4.12 40  $\mu$ M;
- primarna kunčja protitelesa in sekundarna anti-kunčja protitelesa: ZMBP – Center for Plant Molecular Biology, Plant Biochemistry, University of Tübingen, Nemčija.



Posamezni rekombinantni proteini NLP so pridobljeni v heterolognem sistemu za izražanje *Pichia pastoris*.

### **3.3. OPREMA**

Oprema, ki smo jo uporabili pri eksperimentalnem delu:

- avtoklav A-63C (Kambič, Slovenija);
- analitska tehtnica (Sartorius, Nemčija);
- atresalnik Innova 44 (New Brunswick Scientific, ZDA);
- vibracijski mešalnik (Tehtnica, Slovenija);
- centrifuga Rotanta 460 R (Hettich, Nemčija);
- grelec (Beckman Coulter, ZDA);
- centrifuga Sigma 3-30 KS (Sigma, ZDA);
- rotavapor (Büchi, Švica);
- centrifuga Centric 322 A (Tehtnica, Slovenija);
- centrifuga L8-70M ultracentrifuge (Beckman Coulter, ZDA);
- ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra, Slovenija) in
- pH meter SevenMulti (Mettler Toledo, Švica).

### **3.4. IZOLACIJA SFINGOLIPIDOV IZ PEKOVSKEGA KVASA**

#### **3.4.1. Mešanice topil, raztopine in gojišča**

- YPD gojišče: 10 g ekstrakta kvasa, 20 g peptona, 40 g glukoze, dH<sub>2</sub>O do 1 L
- Tris-EDTA: 25 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid v dH<sub>2</sub>O
- topilo 1: klorofom : metanol : voda : piridin (60:30:6:1)
- topilo 2: klorofom : metanol : voda (16:16:5)
- 0,2 M metanolni NaOH: 2 g NaOH, dH<sub>2</sub>O do 250 mL
- 0,5 % Na<sub>2</sub>EDTA: 1,25 g Na<sub>2</sub>EDTA, dH<sub>2</sub>O do 250 mL
- topilo 3: kloroform : metanol : voda (24:12:1)

- topilo 4: kloroform : metanol : voda (6:4:1)
- topilo 5: kloroform : metanol : 0,4 M NH<sub>3</sub> (16:16:5)

### 3.4.2. Postopek izolacije sfingolipidov

Gojili smo približno 50 g pekovskega kvasa v 1 L YPD medija 2 uri na stresalniku pri 160 rpm (obratih na minuto, ang. *rounds per minute*) na 37 °C. Po končanem stresanju smo gojišče s celicami 20 minut centrifugirali pri 4400 rpm na 4 °C. Odstranili smo supernatant, sprali celice s fiziološko raztopino ter centrifugirali 10 minut pri 10000 x g na 4 °C. Celice smo suspendirali v 175 mL Tris-EDTA, centrifugirali suspenzijo 10 minut pri 3500 x g na 4 °C ter odstranili usedlino. Supernatant smo centrifugirali 20 minut pri 20000 x g na 4 °C. Dobljeno usedlino smo 16 ur ekstrahirali z 0,5 L topila 1 pri 57 °C. Po filtriranju (filter papir z velikostjo por 0,45 µm) smo ekstrakt posušili na rotavaporju (50 mbar) in ga suspendirali v 125 mL topila 2. Da se znebimo glicerofosfolipidov, smo izvedli alkalno hidrolizo, ki je potekala 1 uro pri 30 °C s 125 mL metanolnega NaOH. Po dodatku 125 mL 0,5 % Na<sub>2</sub>EDTA smo zmes nevtralizirali z 1 M očetno kislino do pH-ja 7,4 ter jo ekstrahirali z 125 mL kloroforma 1 uro pri 30 °C. Ekstrakt smo posušili na rotavaporju ter ga raztopili v 10 mL topila 2. Uravnovežili smo kolono (Sep-Pak Silica 20 cc Vac Cartridge, Waters, velikost por 125 µm) s 50 mL topila 3, nanесли ekstrakt, raztopljen v topilu 2, in eluirali sterole in proste maščobne kisline z 100 mL topila 3 in 50 mL topila 4. Iz kolone smo odstranili silikagel in trikrat ekstrahirali lipide z 100 mL topila 5 1 uro pri 57 °C. Po končani ekstrakciji smo dobljeni ekstrakt filtrirali (filter papir z velikostjo por 0,45 µm) in posušili na rotavaporju.

Pri drugi izolaciji sfingolipidov iz pekovskega kvasa smo po suspendiranju celic v 175 mL Tris-EDTA izvedli mehansko dezintegracijo celic s soniciranjem vzorca dvakrat po 3 minute na ledu (AMP=30 %, Pulse on: 20 s, Pulse off: 40 s) ter nadaljevali kot pri prvi izolaciji. Prirejeno po (6).

### **3.5. IZOLACIJA SFINGOLIPIDOV IZ KVASOVK *S. CEREVISIAE* BY4747 IN MYY89**

#### **3.5.1. Mešanice topil, raztopine in gojišča**

- gojišče za kvasovke: 1,7 g YNB, 5 g amonijevega sulfata, 20 g glukoze, 0,8 g CSM, dH<sub>2</sub>O do 1 L, pH = 6,0 (z NaOH)
- 5 % TCA: 10 % TCA : dH<sub>2</sub>O (1:1)
- ekstrakcijska mešanica: 45 mL etanola, 15 mL dietil etra, 3 mL piridina, 0,21 mL 25 % NH<sub>3</sub>, 44,4 mL dH<sub>2</sub>O
- 0,1 N KOH – MeOH: 0,28 g KOH, metanol do 50 mL

#### **3.5.2. Postopek izolacije sfingolipidov**

Nacepili smo kvasovke v 3 mL gojišča za kvasovke ter jih gojili 44 ur pri 180 rpm na 23 °C. Prenesli smo jih v 250 mL gojišča za kvasovke ter stresali 22 ur pri 180 rpm na 23 °C. Po centrifugiranju gojišča s celicami 11 minut pri 4000 rpm na 4 °C smo odstranili supernatant, dodali 33 mL hladne Milli Q ter zopet centrifugirali 10 minut pod enakimi pogoji. Supernatant smo odstranili, dodali 40 mL hladne 5 % TCA, pustili na ledu 20 minut in nato centrifugirali še 10 minut pri 4000 rpm na 4 °C. Po odstranitvi supernatanta smo usedlini dodali 24 mL ekstrakcijske mešanice ter inkubirali 15 minut na 60 °C. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri 4000 rpm. Supernatant smo prelili v stekleno centrifugirko. Usedlino smo znova ekstrahirali z 6 mL ekstrakcijske mešanice, premešali, inkubirali 15 minut na 60 °C v ultrazvočni kopeli, da smo razbili usedlino, nato pa centrifugirali še 10 minut pri 4000 rpm. Usedlino smo zavrgli, supernatant pa smo združili s prejšnjim supernatantom in ga uporabili v nadaljnjem delu.

5 mL supernatanta smo uporabili, da bi na vzorcu naredili alkalno metanolizo, preostanek smo uporabili za pripravo lipidov iz kvasovk, brez da bi odstranili fosfolipide. Da smo se znebili fosfolipidov, smo s 5 mL supernatanta izvedli alkalno metanolizo: 5 mL supernatanta smo posušili na rotavaporju (zaradi prisotnega dietil etra smo ga prvih 5 minut sušili pri 800 mbar ter nato znižali tlak na 50 mbar), dodali 1 mL 0,1 N KOH-MeOH in inkubirali 2 uri na 40 °C. Dodali smo 150 µL 1 N HCl, 1,5 mL heksana, 3 kapljice Milli Q ter zmešali. Zmes smo centrifugirali 5 minut pri 2000 rpm. Spodnjo fazo smo prenesli v 10 mL bučko, preostanku dodali 1,5 mL heksana in zmešali. Zmes smo centrifugirali 5

minut pri 2000 rpm. Spodnjo fazo smo zbrali, jo dodali k prejšnjemu ekstraktu in vse skupaj posušili na rotavaporju.

Naredili smo ločitev po Folchu: posušenemu ekstraktu smo dodali 2 mL kloroforma, 1 mL metanola in 750  $\mu$ L Milli Q, zmešali, centrifugirali 5 minut pri 2000 rpm ter spodnjo fazo posušili na rotavaporju.

Nadaljnja priprava lipidov iz kvasovk je potekla, ne da bi se znebili fosfolipidov. Preostanek smo posušili na rotavaporju, dodali 10 mL 0,1 N KOH-MeOH, zmešali in inkubirali 2 uri na 40 °C. Po inkubaciji smo zmesi dodali 1 mL 1 M HCl, 10 mL heksana in 200  $\mu$ L Milli Q, zmešali in zmes centrifugirali 5 minut pri 2000 rpm. Odstranili smo zgornjo fazo. Spodnji fazi smo dodali 10 mL heksana, centrifugirali 5 minut pri 2000 rpm ter spodnjo fazo posušili na rotavaporju. Naredili smo ločitev po Folchu, centrifugirali 5 minut pri 2000 rpm in spodnjo fazo posušili na rotavaporju. Prirejeno po (21).

### **3.6. IZOLACIJA SFINGOLIPIDOV IZ TOBAKA (*NICOTIANA TABACUM*)**

#### **3.6.1. Pufri, raztopine in mešanice topil**

- 2 x CIB: 0,6 M sorbitol, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 40 mM HEPES, 20 mM NaHCO<sub>3</sub> v dH<sub>2</sub>O, pH = 8,0 (s KOH)
- 1 x CIB: 2 x CIB : dH<sub>2</sub>O (1:1)
- gradient Percoll: 40 mL Percoll, 40 mL 2 x CIB, 15,4 mg glutationa
- topilo 6: kloroform : metanol (2:1)

#### **3.6.2. Postopek izolacije sfingolipidov**

Pripravili smo 2 x CIB pufer in gradient Percoll. Gradient Percoll smo razdelili v dve centrifugirki ter centrifugirali 30 minut na 4 °C pri 15500 rpm. Celotno izolacijo smo izvedli na ledu in s pufrom, ohlajenim na 4 °C. Določeno količino listov tobaka smo narezali, dali v terilnico, dolili 50–100 mL 1 x CIB pufera (odvisno od količine listov, ki smo jih uporabili – za približno 100 g listov smo uporabili 100 mL 1 x CIB pufera) ter liste strli. Homogenat smo preko nekaj plasti gaze prefiltrirali ter centrifugirali 5 minut na 4 °C pri 1000 x g. Odlili smo večino supernatanta (pustili smo ga približno 1–2 mL) in usedlino resuspendirali v preostalem supernatantu. Homogenat smo prenesli na gradient Percoll in

centrifugirali 12 minut na 4 °C pri 6500 rpm. Zgornjo temno zeleno frakcijo (X) smo zavrgli, ostale frakcije (A-F) pa smo zbrali v steklene vialle (4 mL posamezne frakcije), dodali enak volumen topila 6 in ekstrahirali čez noč v hladni sobi (slika 3). Po ekstrakciji smo spodnjo fazo prenesli v bučko in sušili 4 ure na rotavaporju. Preostanek smo raztopili v 700  $\mu$ L topila 6. Prirejeno po (22).



**Slika 3:** Ločitev vzorca po frakcijah na gradientu Percoll po centrifugiranju pri 6500 rpm

### 3.7. ANALIZA SFINGOLIPIDOV S POMOČJO TLC

#### 3.7.1. Mešanice topil, raztopine

- mobilna faza 1: kloroform : metanol : voda (12:8:2)
- mobilna faza 2: kloroform : metanol : 4,2 M  $\text{NH}_3$  (9:7:2)
- raztopina za barvanje 1: 5 g primulina, 20 mL acetona, 80 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
- raztopina za barvanje 2: 20 % raztopina amonijevega sulfata v  $\text{dH}_2\text{O}$
- raztopina za barvanje 3: mešanica 10% bakrovega sulfata in 8% fosforne kisline v  $\text{dH}_2\text{O}$

### **3.7.2. Postopek izvedbe TLC**

Ploščico s silikagelom smo 30 minut greli na 120 °C. V kadičko za izvedbo TLC smo dali približno 150 mL mobilne faze, nato smo jo pokrili in pustili vsaj 30 minut. Po aktivaciji ploščice smo nanесли določeno količino posameznega vzorca in ploščico razvili v komori, da ločimo lipide. Po končanem razvijanju smo ploščico posušili in obarvali, da bi detektirali ločene lipide.

#### **3.7.2.1. Barvanje s primulinom**

Posušeno ploščico smo poškopili s 5% raztopino primulina, jo posušili in pogledali pod UV lučko.

#### **3.7.2.2. Barvanje z 20 % raztopino amonijevega sulfata**

Posušeno ploščico smo poškopili z 20 % raztopino amonijevega sulfata in segrevali 45–60 minut na 180 °C.

#### **3.7.2.3. Barvanje z mešanico 10 % bakrovega sulfata in 8 % fosforne kisline**

Posušeno ploščico smo poškopili z mešanico 10 % bakrovega sulfata in 8 % fosforne kisline in segrevali 10–20 min na 180 °C.

## **3.8. DVODIMENZIONALNA KROMATOGRFIJA**

Stekleno TLC ploščico, velikosti 10 x 10 cm, smo aktivirali s 30-minutnim gretjem na 120 °C. V spodnji levi kot, 2 cm od dna in levega roba ploščice, smo nanесли 60 µL frakcije F izolacije iz tobaka. Ploščico smo razvili v mobilni fazi kloroform: metanol: 4,2 M NH<sub>3</sub> (9:7:2), jo sušili 1 uro na sobni temperaturi v digestoriju, obrnili za 90 ° ter znova razvili v isti mobilni fazi. Po sušenju smo ploščico pobarvali z mešanico 10 % bakrovega sulfata in 8 % fosforne kisline in greli 10 minut na 180 °C.

## **3.9. EKSTRAKCIJA ŽELENIH SFINGOLIPIDOV IZ SILIKAGELA**

Po izvedeni TLC smo en del ploščice odrezali in ga obarvali. Glede na položaj lis na obarvanem delu ploščice smo določili položaj zelenih lipidov na njenem neobarvanem

delu. S pomočjo rezila smo postrgali silikagel s ploščice in ga prenesli v stekleno vialo. Dodali smo 0,625 mL Milli Q, 2 mL metanola in 2 mL kloroforma ter stresali na vibracijskem mešalniku približno 15 minut (1 minuto stresanja, 1 minuto mirovanja na pultu). Po stresanju smo suspenzijo centrifugirali 5 minut pri 2000 rpm, zbrali spodnjo fazo in jo sušili na rotavaporju 4 ure. Posušen preostanek smo raztopili v 300  $\mu$ L mešanice kloroform : metanol (2:1).

### **3.10. DOLOČANJE MASE LIPIDOV**

15  $\mu$ L vzorca izoliranega lipida, lipidi raztopljeni v mešanici kloroform: metanol (2:1), smo prenesli v posodice, narejene iz aluminijске folije, ter ga sušili 1 uro v eksikatorju. Maso lipidov smo določili iz razlike mase aluminijastih posodic z vzorcem po sušenju in praznih aluminijastih posodic.

### **3.11. PRIPRAVA MULTILAMELARNIH (MLV) IN MAJHNIH UNILAMELARNIH VEZIKOV (SUV)**

#### **3.11.1. Pufri in raztopine**

- pufer SUV: 140 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 mM EDTA v dH<sub>2</sub>O, pH = 8,0
- pufer MES: 20 mM MES, 140 mM NaCl v dH<sub>2</sub>O, pH = 5,8
- topilo 6: kloroform : metanol (2:1)

#### **3.11.2. Postopek priprave veziklov**

MLV vezikli

V 10 mL bučko smo dali 600  $\mu$ L raztopine izoliranih sfingolipidov (600  $\mu$ g) in 48  $\mu$ L raztopine POPC (2,4 mg) v kloroformu ter dodali 6–3 mL topila. V drugo 10 mL bučko smo dali 60  $\mu$ L raztopine POPC v kloroformu in 6–3 mL topila. Vsebino obeh bučk smo sušili 4 ure na rotavaporju, dodali 300  $\mu$ L pufra MES in 1/3 žličke steklenih kroglic ter stresali na vibracijskem mešalniku, dokler se vsi lipidi niso ločili od stene. Suspenzijo

lipidov smo prenesli v kriovialo in jo 6-krat zmrznili v tekočem dušiku ter odtalili v vodi s temperaturo 40–50 °C.

#### SUV vezikli

Pripravili smo raztopino POPC v kloroformu s koncentracijo 50 mg/mL. V 10 mL bučko smo odmerili 0,1 mL raztopine POPC (5 mg POPC) in sušili na rotavaporju 4 ure. V drugo 10 mL bučko smo odmerili 1,5 mg izoliranih sfingolipidov in dodali 3,5 mg POPC v kloroformu ter sušili na rotavaporju 4 ure. Po sušenju smo v bučke dodali 0,5 mL pufra SUV in 1/3 žličke steklenih kroglic, stresali na vibracijskem mešalniku, dokler se vsi lipidi niso ločili od stene, nato pa vse skupaj prenesli v mikrocentrifugirko. Suspenzijo lipidov smo potem 15 minut sonicirali na ledu z 10 sekundnimi pulzi in s tem dobili majhne unilamelarne vezikle. Suspenzijo SUV smo dali za 30 minut na vodno kopel s temperaturo 40 °C, centrifugirali 5 minut pri 6000 rpm ter vse skupaj prenesli v svežo mikrocentrifugirko.

### **3.12. VREDNOTENJE VEZAVE SFINGOLIPIDOV IN PROTEINOV NLP – SPR**

#### **3.12.1. Raztopine in pufri**

- detergenti: - 0,5 % NaDS  
- 40 mM oktil glukopiranozid
- pufer MES: 20 mM MES, 140 mM NaCl v dH<sub>2</sub>O, pH = 5,8

#### **3.12.2. Postopek izvedbe SPR**

Za študijo interakcij s SPR smo uporabili refraktometer Biacore T100, program Biacore T100 Control Software in senzorski čip L1. Čip L1 smo sprali s pufrom MES ter nanegli vezikle s koncentracijo 1 mg/mL (vezikle, ki vsebujejo samo POPC, in vezikle, ki vsebujejo zmes POPC in sfingolipidov iz tobaka) na površino čipa s pomočjo mikrotekočinskega sistema, 10 minut pri pretoku 2 µL/min. Proteine NPP1 koncentracije 0,313–5,000 µM smo 2 minuti vbrizgavali preko vezanih lipidov s pretokom 10 µL/min.



Disociacijo smo spremljali 10 minut. Po vsaki koncentraciji proteina smo površino čipa sprali z regeneracijskimi raztopinami: 0,5 % NaDS in 40 mM oktil glukopiranozidom.

Regeneracijske raztopine smo vbrizgavali 60 sekund pri pretoku 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

### **3.13. VREDNOTENJE VEZAVE SFINGOLIPIDOV IN PROTEINOV NLP – ELEKTROFOREZA**

#### **3.13.1. Raztopina, geli in pufri**

- 12 % NaDS gel: 1,8 mL akrilamida, 3,104 dH<sub>2</sub>O, 0,75 mL 3 M Tris pufra, 40  $\mu\text{L}$  10 % NaDS, 300  $\mu\text{L}$  1,5 % APS, 6  $\mu\text{L}$  Temeda
- nanašalni gel: 0,5 mL akrilamida, 2,945 mL dH<sub>2</sub>O, 1,25 mL 0,5 M Tris pufra, 50  $\mu\text{L}$  10 % NaDS, 250  $\mu\text{L}$  1,5 % APS, 5  $\mu\text{L}$  Temeda
- 10 x pufer NaDS: 10 g NaDS, 30,3 g Tris, 144 g glicina, 8 dL dH<sub>2</sub>O
- 1 x pufer NaDS: 1 dL 10 x pufer NaDS, 9 dL dH<sub>2</sub>O
- nanašalni pufer: 5 x nanašalni pufer + 0,05 M DTT
- 5x nanašalni pufer: 300 mM tris-HCl, 0,5 % coomassie blue, 25 % glicerol, 10 % NaDS, pH 8,8 v dH<sub>2</sub>O
- raztopina za barvanje coomasie brilliant blue: 2,5 g coomasie brilliant blue, 500 mL dH<sub>2</sub>O, 400 mL metanola, 100 ml očetne kisline
- raztopina za razbarvanje: 75 mL metanola, 50 mL očetne kisline, 375 mL dH<sub>2</sub>O

#### **3.13.2. Postopek izvedbe elektroforeze**

Odpipetirali smo ustrezen volumen MLV v 1,5 mL mikrocentrifugirko in jim dodali 5  $\mu\text{g}$  ustreznega proteina. Zmes smo inkubirali na stresalniku 1 uro na 25 °C pri 500 rpm in centrifugirali 1 uro na 4 °C pri 30000 rpm. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in mu dodali ustrezno količino nanašalnega pufra. Usedlini smo dodali pufer MES in ustrezno količino nanašalnega pufra. Po pripravi mešanice za 12 % NaDS gel smo 2 mL mešanice ulili med stekla za izdelavo gelov, ki smo jih prehodno pripravili. Dodali smo destilirano vodo (dH<sub>2</sub>O) in počakali približno 1 uro, da se je gel strdil. Po 1 uri smo odlili dH<sub>2</sub>O in dodali mešanico za nanašalni gel. Na vrh smo dali glavniček 1 mm debeline z 10 jamicami in pustili, da se je gel strdil. Po pripravi sistema za elektroforezo

smo vzorce nanесли v jamice in izvedli elektroforezo (150 V, 0,01 A, 2 W, 70 min). Po koncu smo gel 3-krat sprali, pobarvali z barvilom coomasie brilliant blue ter po določenem času razbarvali.

#### **3.13.2.1. Spiranje gela**

Gel smo prenesli v kadičko, ki je vsebovala 100 mL dH<sub>2</sub>O, nato pa kadičko z gelom prenesli v mikrovalovko za 1 minuto. Po 1 minuti smo jo prestavili na stresalnik, na katerem smo jo stresali 4 minute. Po končanem stresanju smo staro dH<sub>2</sub>O zavrgli in dodali svežo. Postopek smo ponovili 3-krat.

#### **3.13.2.2. Barvanje gela**

Gelu smo dodali 20 mL raztopine za barvanje coomasie brilliant blue ter kadičko z gelom in barvilom prenesli v mikrovalovko za 30 sekund. Po 30 sekundah smo kadičko prestavili na stresalnik, na katerem smo jo stresali 20 minut. Po končanem stresanju smo zavrgli preostanek barvila.

#### **3.13.2.3. Razbarvanje gela**

Gelu smo dodali 100 mL raztopine za razbarvanje ter kadičko z gelom prenesli v mikrovalovko za 30 sekund. Po 30 sekundah smo kadičko prestavili na stresalnik, na katerem smo jo stresali 20 minut.

### **3.14. VREDNOTENJE VEZAVE SFINGOLIPIDOV IN PROTEINOV NLP-PRENOS LIPIDOV NA PVDF MEMBRANO**

#### **3.14.1. Mešanice topil, raztopine**

- mobilna faza 1: kloroform: metanol: 4,2 M NH<sub>3</sub> (9:7:2)
- aktivacijska mešanica: 53 mg CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 20 mL dH<sub>2</sub>O, 7 mL MeOH in 40 mL 2-propanola
- PBS: 67 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,14 M NaCl, pH=7,4
- 5 % BSA v PBS: 1,25 g BSA, do 25 mL PBS

- TBS: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, dH<sub>2</sub>O do 1 L, pH=7,4
- pufer za razvijanje: 3 g Tris, 8 g NaCl, 0,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O do 1 L
- peroksidazni substrat: 15 mg 4-Cl-1-naftola, 5 mL metanola, 25 mL pufera za razvijanje

### **3.14.2. Postopek prenosa lipidov na PVDF membrano**

Na TLC ploščico smo nanegli vzorce, razvili TLC v mobilni fazi 1 ter sušili ploščico 10 minut s fenom in 1 uro v eksikatorju. PVDF membrano smo aktivirali v aktivacijski mešanici 30 sekund. Na steklen filter smo položili posušeno TLC ploščico, nanjo pa smo pazljivo položili aktivirano PVDF membrano in steklen filter. Likalnik smo nastavili na najvišjo temperaturo ter ga za 30 sekund močno pritisnili na steklen filter. S tem smo prenesli lipide na PVDF membrano. Po prenosu smo PVDF membrano prestavili v kadičko s 5 % BSA v PBS in stresali čez noč na 4 °C. TLC ploščico, s katere smo prenesli lipide, smo pobarvali z mešanico 10 % bakrovega sulfata in 8 % fosforne kisline in gredli 10 min na 180 °C. Membrani smo dodali 10 µg proteina NPP1 40 µM v 5 mL 5 % BSA v PBS in stresali 2 uri na sobni temperaturi. Po stresanju smo membrano 3-krat po 10 minut spirali s TBS. Membrani smo dodali 5 µL primarnega protitelesa v 5 mL 5 % BSA v PBS in stresali 1 uro na sobni temperaturi. Po stresanju smo membrano 3-krat po 10 minut spirali s TBS, ji dodali 5 µL sekundarnega protitelesa v 5 mL 5 % BSA v PBS in stresali 1 uro na sobni temperaturi. Membrano smo zopet 3-krat po 10 minut spirali s TBS. Da bi detektirali vezavo proteinov, smo pripravili peroksidazni substrat, mu dodali 50 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ter ga takoj polili čez PVDF membrano. Po določenem času smo reakcijo ustavili s prenosom membrane v dH<sub>2</sub>O.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Po vbrizgavanju proteina Nep1 iz *Fusarium oxysporum* v liste tobaka so Jennings in ostali zaznali različne odgovore. Interakcije med rastlino in patogenom povzročajo hipersenzitivni odgovor pri rastlinah, ki vključuje porast zunajceličnega pH, zvečanje koncentracije kalijevih ionov in nastanek ROS. V nekaj minutah po izpostavitvi proteinu Nep1 pride do proizvodnje etilena, ki je odvisna od količine proteina. Nekroza tkiva in celična smrt postaneta vidni v nekaj dneh in sta odvisni od količine proteina Nep1. V tem času izpostavljeni deli rastline porjavijo in se posušijo (slika 4) (23).



**Slika 4:** Primerjava zdrave rastline tobaka (levo) in rastline po izpostavitvi proteinu Nep1 iz *Fusarium oxysporum* (desno). Prirejeno po (23).

Za preprečitev takšnega delovanja proteinov NLP na dvokaličnice je nujno, da sta poznana mehanizem delovanja in tarča proteinov. Ena od potencialnih tarč proteinov NLP so sfingolipidi, katerih vezavo s proteini NLP smo preučevali v okviru laboratorijskega dela magistrske naloge.

Sfingolipide smo izolirali iz pekovskega kvasa kvasovk *S. cerevisiae* BY4747 in MYY89 ter tobaka. Vezavo sfingolipidov in proteinov NLP smo testirali z metodo SPR, elektroforezo in prenosom lipidov na PVDF membrano.

## 4.1. REZULTATI TLC

Za ločevanje sfingolipidov smo uporabili normalnofazno TLC, pri kateri je stacionarna faza (silikagel) polarna, mobilna faza pa precej nepolarna. Ta metoda je uporabna pri ločitvi sfingolipidov zaradi razlik v polarnosti skupin, ki so vezane na LCB. Kot mobilne faze se lahko v različnih razmerjih uporabijo mešanice kloroforma, metanola in vode, ker tvorijo enofazni sistem in se lahko razmerja komponent spreminjajo odvisno od lastnosti lipidov, ki jih želimo ločiti. Dodatek amoniaka k mobilni fazi vpliva na retencijski faktor spojin, ki jih želimo ločiti. Bazične spojine na TLC ploščici potujejo dlje, če je mobilna faza bolj bazična v primerjavi z nevtralno mobilno fazo. S spreminjanjem polarnosti mobilne faze vplivamo tudi na retencijski faktor. S povečanjem polarnosti mobilne faze se povečuje retencijski faktor polarnih spojin in zmanjšuje retencijski faktor manj polarnih spojin (24,25).

### 4.1.1. Sfingolipidi iz pekovskega kvasa

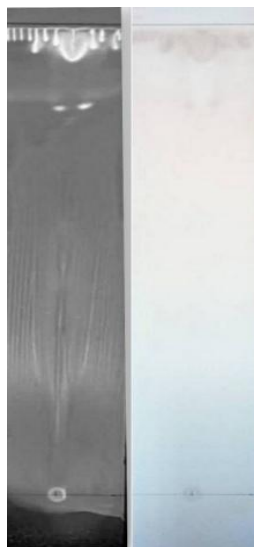
Sfingolipide iz pekovskega kvasa smo izolirali 2-krat. Da bi določili število lipidov v zmesi, smo izolirane lipide iz pekovskega kvasa ločili s TLC in jih obarvali. Mase lipidov nismo določali, prav tako lipide nismo uporabili v nadaljnjih testiranjih vezave s proteini NLP.

Po uporabi različnih orositvenih reagentov za vizualizacijo lipidov smo prišli do zaključka, da je mešanica 10 % bakrovega sulfata in 8 % fosforne kisline bolj ustrezna metoda barvanja kot barvanje s primulinom ali raztopino 20 % amonijevega sulfata. Na slikah 5 (prva izolacija) in 6 (druga izolacija) sta TLC ploščici po barvanju s primulinom (levo) in po naknadnem barvanju z 20 % raztopino amonijevega sulfata (desno). Uporabljena je bila TLC ploščica, velikosti 20x10 cm, mobilna faza kloroform: metanol: voda (12:8:2), nanesenih pa je bilo 18  $\mu$ L vzorca (masa lipidov ni znana).

Na sliki 7 so TLC ploščice prve (levo) in druge (desno) izolacije, katere smo po razvijanju pobarvali z mešanico 10 % bakrovega sulfata in 8 % fosforne kisline ter gredli 20 minut na 180 °C . Velikost ploščice in mobilna faza sta enaki kot na slikah 5 in 6. Nanesenih je bilo 12  $\mu$ L vzorca.



**Slika 5:** TLC ploščica po prvi izolaciji sfingolipidov iz pekovskega kvasa. Barvanje s primulinom (levo) in 20 % raztopino amonijevega sulfata (desno).



**Slika 6:** TLC ploščica po drugi izolaciji sfingolipidov iz pekovskega kvasa. Barvanje s primulinom (levo) in 20 % raztopino amonijevega sulfata (desno).

Barvanje z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline je bolj občutljivo kot barvanje s primulinom ali 20 % raztopino amonijevega sulfata, zato smo jo uporabljali pri nadaljnjih poskusih. Prednost primulina pred ostalima dvema metodama barvanja je v tem, da lipidi po barvanju ostanejo nepoškodovani in jih lahko še naprej uporabljamo za poskuse, medtem ko ostali dve metodi lipide uničita.

Pri prejšnjih TLC smo uporabili 12 in 18  $\mu\text{L}$  vzorca. Ker so bili vidni samo lipidi v bližini fronte mobilne faze, smo želeli preveriti, ali so v zmesi prisotni še kakšni lipidi. Na sliki 8 je TLC ploščica, velikosti 10x10 cm, po barvanju z bakrovim sulfatom in fosforno kislino ter 10-minutnem gretju na 180 °C, ki je bila razvita v mobilni fazi kloroform: metanol: voda (12:8:2). Nanesenih je bilo 22  $\mu\text{L}$  vzorca izolacije 1 (levo) in 22  $\mu\text{L}$  vzorca izolacije 2 (desno).



**Slika 7:** TLC po prvi (levo) in drugi (desno) izolaciji sfingolipidov iz pekovskega kvasa po barvanju z mešanico 10 % bakrovega sulfata in 8 % fosforne kisline.



**Slika 8:** TLC ploščica po nanosu 22  $\mu\text{L}$  vzorca izolacije 1 (levo) in 22  $\mu\text{L}$  vzorca izolacije 2 (desno) po barvanju z mešanico 10% bakrovega sulfata in 8% fosforne kisline

Po nanosu večjega volumna vzorca smo opazili še dodatne lipide, ki niso bili vidni pri nanosu manjšega volumna. Zaradi pokanja plasti silikagela pri izolaciji 1 nismo mogli določiti, ali so na mestu poka prisotni lipidi. Do pokanja plasti silikagela je prišlo, ko smo po razvijanju ploščico pobarvali z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline in jo še mokro položili na grelec pri 180 °C. V nadaljnjih poskusih smo ugotovili, da je pomembno, da ploščico po barvanju posušimo s fenom, preden jo položimo na grelec, da ne bi prišlo do pokanja plasti silikagela.

Kot lipidne standarde smo uporabili 4-hidroksisfinganin (*Saccharomyces cerevisiae*) in sfingomielin. Na TLC ploščico smo nanесли 50 µg lipidnih standardov. Uporabili smo ploščico, velikosti 10x10 cm, ki smo jo razvili v mobilni fazi kloroform: metanol: 4,2 M NH<sub>3</sub> (9:7:2) in jo pobarvali z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline ter greli 15 minut na 180 °C. Volumen vzorca, ki smo ga nanесли, je bil 15 µL (slika 9).



**Slika 9:** TLC ploščica po nanosu 15 µL vzorca izolacije 1 in 2, 50 µg lipidnih standardov in barvanju z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline. **1**-izolacija 1, **4** - izolacija 2, **5**- 4 - hidroksisfinganin, **6** - sfingomielin.

Želeli smo izolirati vsak lipid posebej, vendar nam to ni uspelo. Vedno so bile prisotne primesi in nismo uspeli izolirati čistega lipida. Po več neuspešnih poskusih z namenom, da



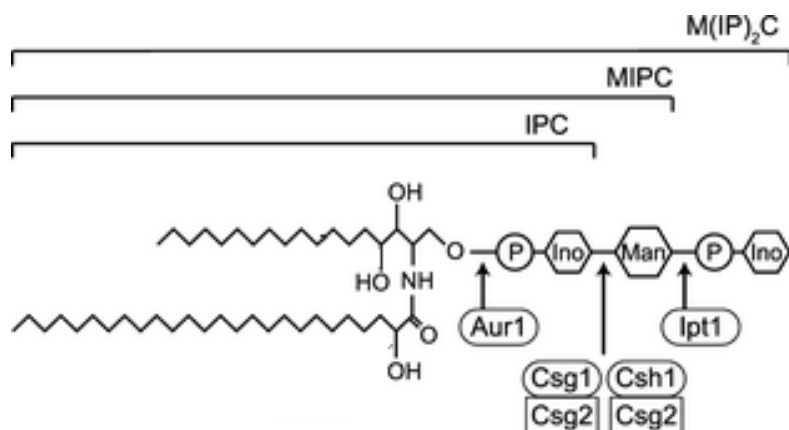
bi izolirali čiste lipide, nam je zmanjkalo vzorcev. Nadaljnjih raziskav z izoliranimi sfingolipidi iz pekovskega kvasa nismo izvajali.

#### 4.1.2. Sfingolipidi iz kvasovk *S. Cerevisiae* BY4747 IN MYY89

Kvasovka *S. cerevisiae* je evkariontski sistem, ki ga največkrat uporabljamo pri preučevanju mutiranih fenotipov po manipulaciji genov. Za molekularno biološke študije *S. cerevisiae* najpogosteje uporabljamo potomce seva S288C. Serija FY je nastala z ustvarjanjem genetsko označenih sevov po direktni manipulaciji S288C, z nadaljnjimi izbrisi označenih genov pa je nastala serija BY (26).

V laboratorijskem delu smo uporabili *S. cerevisiae* BY4747 (MAT  $\alpha$ : *ura3* $\Delta$  0; *leu2* $\Delta$  0; *his3* $\Delta$  1).

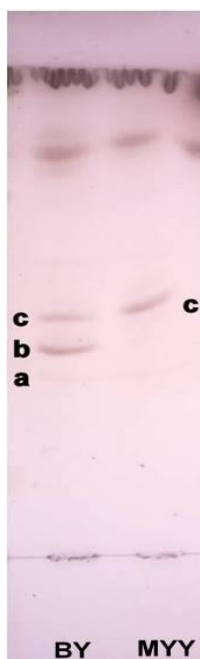
V *S. cerevisiae* so prisotni trije razredi sfingolipidov: IPC, MIPC in M(IP)<sub>2</sub>C. MIPC se sintetizira iz IPC z MIPC sintazama Csg1 in Csh1, z M(IP)<sub>2</sub>C sintazo se sintetizira M(IP)<sub>2</sub>C. Posledica izbrisa gena CSG1 je močno zmanjšana sinteza MIPC, medtem ko izbris gena CSH1 nima takega učinka. Izbris obeh genov povzroča popolno zavoro sinteze MIPC (27). Na sliki 10 je prikazana sintezna pot kompleksnih sfingolipidov iz kvasovke *S. cerevisiae*, naštetih pa so tudi encimi, ki katalizirajo posamezno stopnjo sinteze.



**Slika 10:** Sinteza pot kompleksnih sfingolipidov. IPC sintaza (Aur1) katalizira nastanek IPC s povezavo ceramidnega dela z inozitol fosfatom. Z vezavo manoze na IPC nastane MIPC. To stopnjo katalizirajo MIPC sintaze (Csg1/Csg2 in Csh1/Csh2). M(IP)<sub>2</sub>C nastane z vezavo inozitol fosfata na MIPC s M(IP)<sub>2</sub>C sintazo (Ipt1). Pri sevih, ki imajo izbris genov, ki kodirajo MIPC sintazo, ne pride do nastanka MIPC. Prirejeno po (27).

V našem delu smo uporabili *S. cerevisiae* MYY89 (csg1 $\Delta$ ; csh1 $\Delta$ ).

Po izolaciji sfingolipidov iz BY4747 in MYY89 smo nanесли vzorec volumna 30  $\mu$ L na TLC ploščico, to razvili v mobilni fazi: kloroform : metanol : 4,2 M NH<sub>3</sub> (9:7:2), jo pobarvali z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline in greli 20 minut na 180 °C. Na sliki 11 je TLC ploščica po barvanju. Opazili smo, da lahko na srednjem delu ploščice pri BY4747 ločimo tri različne lipide, medtem ko pri MYY89 samo enega. Ker je silikagel polaren in mobilna faza precej nepolarna, bodo bolj polarne spojine prepotovale krajšo pot kot manj polarne. Lahko predpostavimo, da je lipid a najbolj polaren, lipid c pa najmanj polaren med naštetimi lipidi.



**Slika 11:** TLC ploščica po nanosu 30  $\mu$ L vzorca BY4747 (levo) in enakega volumna vzorca MYY89 (desno).

Hechtberger in sodelavci so leta 1994 med drugim podali tudi rezultate ločitve sfingolipidov s TLC (6). Na TLC ploščico so nanесли izolirane sfingolipide iz *S. cerevisiae* in standarde IPC, MIPC in M(IP)<sub>2</sub>C ter jih razvili v sistemu topil kloroform: metanol: 4,2

M NH<sub>3</sub> (9:7:2). Po ustreznem barvanju so določili retencijske faktorje (Rf vrednosti) posameznega sfingolipida:

- IPC: 0,59
- MIPC: 0,52
- M(IP)<sub>2</sub>C: 0,27 (6).

Po vizualizaciji lipidov smo izračunali Rf vrednosti posameznega lipida:

- lipid a: 0,36
- lipid b: 0,41
- lipid c: 0,48.

Naše izračunane Rf vrednosti se razlikujejo od Rf vrednosti, ki so jih Hechtberger in sodelavci dobili 1994. Ker je ponovljivost rezultatov TLC odvisna od več faktorjev, obstaja velika možnost, da se bodo rezultati med laboratoriji razlikovali. TLC ploščice različnih proizvajalcev se lahko razlikujejo v lastnostih, kot so debelina nanosa adsorbenta, velikost delcev itn. Lahko pride tudi do razlik med serijami ploščic istega proizvajalca, kar vpliva na učinkovitost in selektivnost ločbe. Pri nanosu vzorca lahko pride do vezave vode iz zraka in s tem do spremenjene aktivnosti adsorbenta. Če naneseemo preveliko količino vzorca, se kromatografski sistem preobremeni in lise se raztegnejo. Rf vrednosti so lahko drugačne, kot če bi nanесли manjše količine vzorca. Rezultati so odvisni tudi od tipa in velikosti kadičke ter stopnje nasičenosti v njej. Zaradi več sestavin v mobilni fazi lahko pride do različne stopnje izhlapevanja sestavin in neravnotežja med plinsko in tekočo fazo v kadički, pa tudi do absorpcije sestavine v adsorbent, s čimer se spremeni sestava mobilne faze. Temperaturne razlike do 5 °C ne vplivajo znatno na vrednost Rf. Spremembe v vrednosti Rf so pri tako majhnih razlikah temperature znotraj območja normalne eksperimentalne napake. Pri temperaturnih razlikah, večjih od 5 °C, lahko pride do odstopanj vrednosti Rf za 0,5 enote. Veliko faktorjev vpliva na ponovljivost rezultatov TLC, od teh ima največji vpliv različna vsebnost vode v adsorbentu, vzorcu in mobilni fazi (28).

Glede na to, da so bile prisotne razlike pri izvedbi TLC v laboratoriju Hechtbergerja in sodelavcev ter našega laboratorija, so pričakovana tudi odstopanja pri Rf vrednosti spojin.

Če je slaba ponovljivost vzrok razlikam v vrednosti  $R_f$ , potem lahko predvidevamo, da je lipid a v našem primeru  $M(IP)_2C$ , lipid b MIPC in lipid c IPC. Polarnost molekule narašča s številom polarnih skupin v spojini, s tem pa se  $R_f$  zmanjšuje. Zaradi dodanih skupin na LCB je  $M(IP)_2C$  bolj polarna od MIPC, MIPC pa je bolj polarna od IPC.

Naš rezultat je v skladu s pričakovanji. Pri sevu *S. cerevisiae* MYY89 niso prisotni sfingolipidi MIPC in  $M(IP)_2C$ , ker so okvarjeni encimi za sintezo. Sev BY4747 nima izbranih genov, ki kodirajo encime za sintezo, zaradi česar ni prišlo do motnje pri sintezi MIPC in  $M(IP)_2C$ .

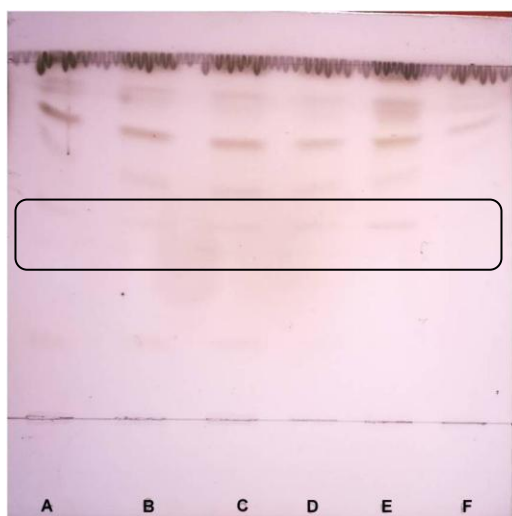
#### 4.1.3. Sfingolipidi iz tobaka

Po izolaciji sfingolipidov iz tobaka smo izolirane sfingolipide ločili s TLC. Uporabili smo TLC ploščico, velikosti 10x10 cm, na katero smo nanegli 10  $\mu$ L posamezne frakcije od A do F, jo razvili v mobilni fazi kloroform: metanol: 4,2 M  $NH_3$  (9:7:2), pobarvali z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline ter gredli 20 minut na 180 °C (slika 12).

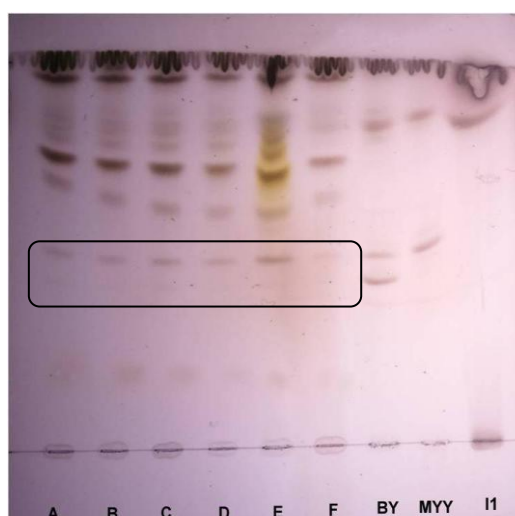
Ker so bile lise lipidov slabo vidne, smo ponovili TLC z 20  $\mu$ L posamezne frakcije. Na isto ploščico smo nanegli še 30  $\mu$ L vzorca BY (*S. cerevisiae* BY4747), 30  $\mu$ L MYY (*S. cerevisiae* MYY89) in 30  $\mu$ L 1. izolacije sfingolipidov iz pekovskega kvasa. Mobilna faza in metoda barvanja sta enaki kot pri prejšnji TLC (slika 13).

Na TLC ploščicah (sliki 12 in 13) lahko opazimo, da ni večjih razlik v lipidni sestavi med frakcijami A–F. Močno obarvana lisa pri fronti mobilne faze vseh frakcij iz tobaka je najverjetneje klorofil. Z gradientnim centrifugiranjem na gradientu Percoll smo se znebili večjega deleža klorofila, manjši delež pa je ostal v vzorcu. Po nanosu vzorcev iz tobaka na TLC ploščico in pri razvijanju smo opazili potovanje zelene lise z mobilno fazo. Ker je klorofil nepolarna molekula, se ne zadržuje na polarnem silikagelu in potuje naprej z mobilno fazo.

Na slikah 12 in 13 sta obkrožena dva razreda lipidov. Spodnji razred se na sliki vidi slabše kot na TLC ploščici. Za enega od teh dveh razredov menimo, da so sfingolipidi, ki so možne tarče proteinov NLP. Naredili smo ekstrakcijo omenjenih sfingolipidov, da bi jih uporabili v nadaljnjih poskusih vezave proteinov NLP.



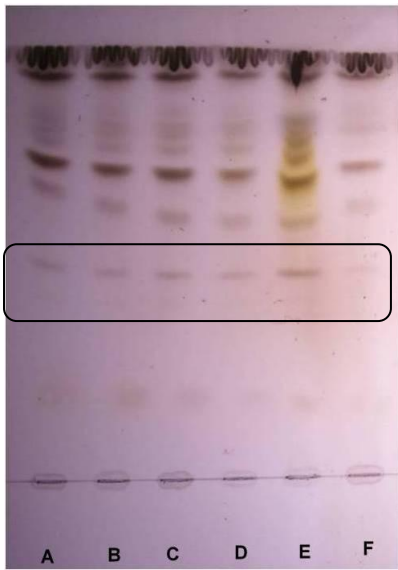
**Slika 12:** TLC ploščica po nanosu 10  $\mu\text{L}$  vzorca posamezne frakcije po izolaciji sfingolipidov iz tobaka. A-frakcija A, B-frakcija B, C-frakcija C, D-frakcija D, E-frakcija E, F-frakcija F.



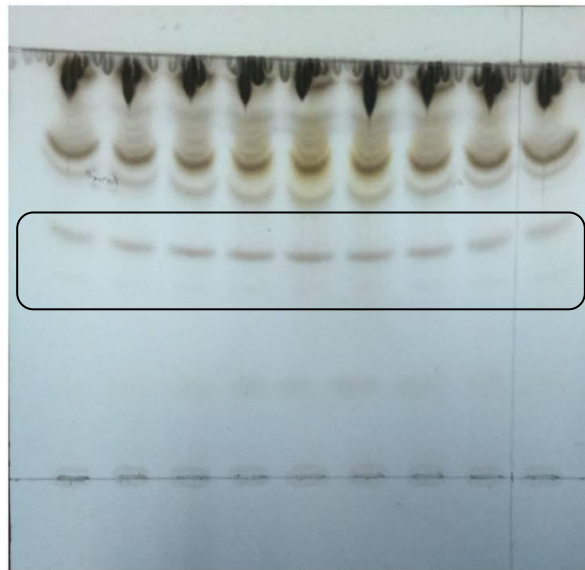
**Slika 13:** TLC ploščica po nanosu 20  $\mu\text{L}$  vzorca posamezne frakcije iz tobaka, 30  $\mu\text{L}$  vzorcev BY4747, MYY89 in 30  $\mu\text{L}$  1. izolacije iz pekovskega kvasa. A-frakcija A, B-frakcija B, C-frakcija C, D-frakcija D, E-frakcija E, F-frakcija F, BY- *S. Cerevisiae* BY4747, MYY- *S. Cerevisiae* MYY89, I1- 1. izolacija lipidov iz pekovskega kvasa.

#### 4.1.4. Priprava sfingolipidov iz tobaka, ki smo jih uporabili za vrednotenje z SPR

Za metodo SPR smo sfingolipide iz tobaka izolirali 3-krat. Po njihovi izolaciji iz tobaka smo posušen ekstrakt raztopili v 700  $\mu\text{L}$  mešanice kloroform: metanol (2:1). Na ploščico, velikosti 10x10 cm, smo nanесли 30  $\mu\text{L}$  vzorca, jo razvili v mobilni fazi kloroform: metanol: 4,2M  $\text{NH}_3$  (9:7:2), obarvali z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline in gredli 15 minut na 180  $^\circ\text{C}$ . Na slikah 14–16 so TLC ploščice posameznih izolacij. Obkroženi so sfingolipidi, ki smo jih želeli ekstrahirati. Pri izolaciji 2 smo vse frakcije združili, medtem ko smo pri 1. in 3. izolaciji uporabili vsako frakcijo od A do F posebej.



**Slika 14:** 1. izolacija sfingolipidov iz tobaka za SPR. A-frakcija A, B-frakcija B, C-frakcija C, D-frakcija D, E-frakcija E, F-frakcija F.



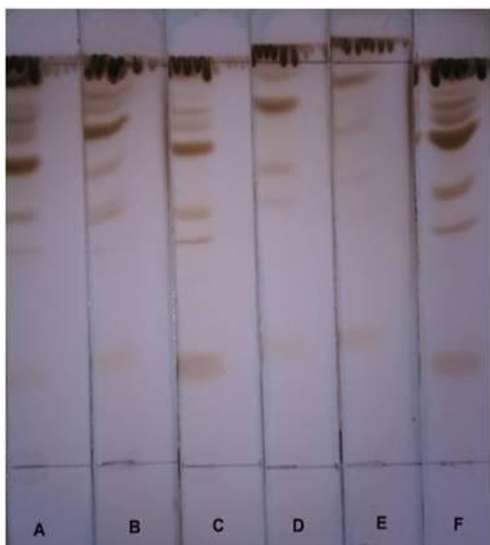
**Slika 15:** 2. izolacija sfingolipidov iz tobaka za SPR. 9-krat nanešena frakcija E.



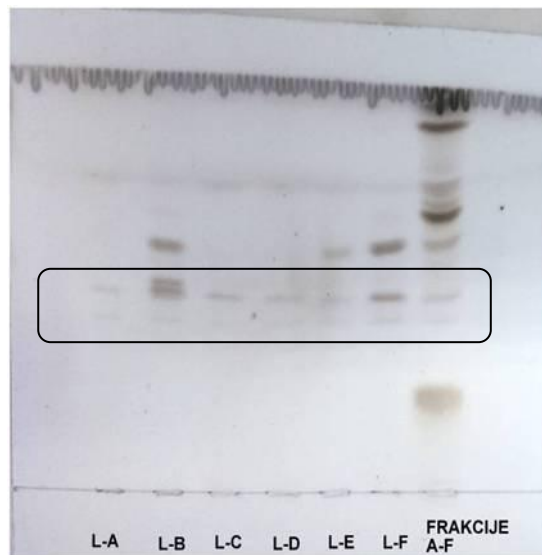
**Slika 16:** 3. izolacija sfingolipidov iz tobaka za SPR. A-frakcija A, B-frakcija B, C-frakcija C, D-frakcija D, E-frakcija E, F-frakcija F.

Na TLC ploščico, velikosti 10x10 cm, smo nanegli 9 x 40  $\mu\text{L}$  posamezne frakcije in jo razvili v mobilni fazi kloroform: metanol: 4,2 M  $\text{NH}_3$  (9:7:2). 1/9 ploščice smo odrezali, pobarvali z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline in grelji 15 minut na 180  $^\circ\text{C}$ . Na sliki 17 so pobarvani deli TLC ploščic. Glede na položaj lis na obarvanem delu ploščice, smo določili položaj zelenih lis na neobarvanem delu ter le-te ekstrahirali. Po ekstrakciji in sušenju smo ekstrakt vsake lise raztopili v 300  $\mu\text{L}$  mešanice kloroform: metanol (2:1). Na TLC ploščico velikosti 10x10 cm smo nanegli 30  $\mu\text{L}$  vzorca ekstrahiranih lis frakcij od A do F ter 50  $\mu\text{L}$  združenih frakcij od A do F za primerjavo. Po razvijanju v mobilni fazi kloroform: metanol: 4,2 M  $\text{NH}_3$  (9:7:2) smo lipide pobarvali z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline in grelji 15 minut na 180  $^\circ\text{C}$  (slika 18).

Z izolacijo lis zelenih sfingolipidov (obkroženi so na sliki 18) smo se znebili velikega deleža ostalih lipidov. Določili smo maso izoliranih lipidov frakcij od A do F, tako da smo 2 x 15  $\mu\text{L}$  vsakega vzorca prenesli v posodice, narejene iz aluminija in jih sušili v eksikatorju 1 uro. Skupna masa izoliranih lipidov, ki smo uporabili za metodo SPR, je 1,5 mg.



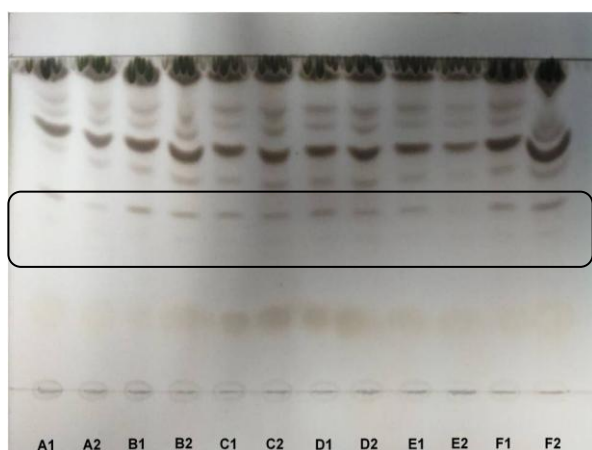
**Slika 17:** Odrezani in pobarvani deli TLC ploščic po razvijanju 9 x 40  $\mu\text{L}$  vsake frakcije od A do F za SPR. Vsako frakcijo smo ločili na svoji TLC ploščici.



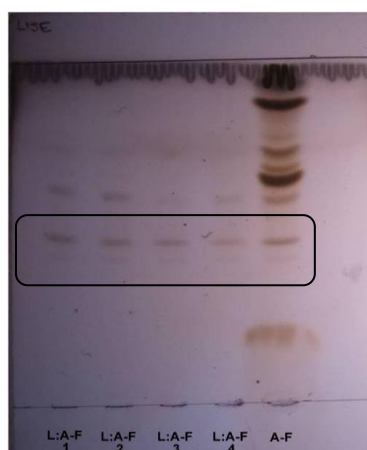
**Slika 18:** TLC ploščica po nanosu 30  $\mu\text{L}$  vzorca ekstrahiranih lis iz frakcij od A do F ter 50  $\mu\text{L}$  združenih frakcij A–F za SPR.

#### 4.1.5. Sfingolipidi iz tobaka, ki smo jih uporabili za elektroforezo

Za vrednotenje z elektroforezo smo sfingolipide iz tobaka izolirali 2-krat. Po izolaciji sfingolipidov iz tobaka smo posušen ekstrakt raztopili v 700  $\mu\text{L}$  mešanice kloroform:metanol (2:1). Na ploščico, velikosti 10x10 cm, smo nanесли 40  $\mu\text{L}$  posamezne frakcije A–F izolacije 1 in 50  $\mu\text{L}$  posamezne frakcije A–F izolacije 2, jo razvili v mobilni fazi kloroform: metanol: 4,2M  $\text{NH}_3$  (9:7:2), obarvali z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline in greli 15 minut na 180  $^\circ\text{C}$  (slika 19).



**Slika 19:** TLC ploščica po nanosu posamezne frakcije A–F 1. in 2. izolacije iz tobaka za elektroforezo.



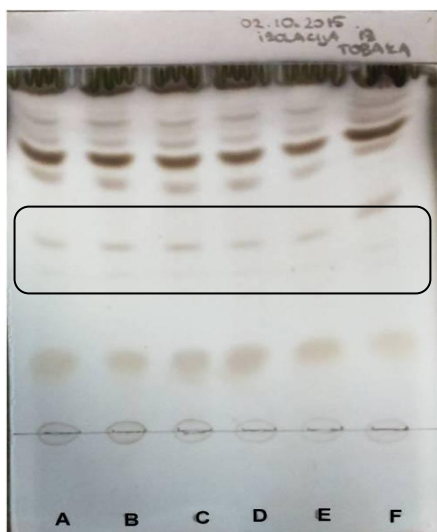
**Slika 20:** TLC ploščica po ekstrakciji zelenih sfingolipidov za elektroforezo.

Na sliki 19 lahko vidimo, da frakcije obeh izolacij vsebujejo iste lipide, zato smo frakcije združili in ekstrahirali lise zelenih sfingolipidov. Želeni sfingolipidi so obkroženi na slikah 19 in 20. Po ekstrakciji lis smo vzorec posušili in raztopili v 300  $\mu\text{L}$  mešanice kloroform: metanol (2:1). Na TLC ploščico, velikosti 10x10 cm, smo nanесли 30  $\mu\text{L}$  vzorca ekstrahiranih lis in 50  $\mu\text{L}$  združenih frakcij A–F, jo razvili v mobilni fazi kloroform: metanol: 4,2M  $\text{NH}_3$  (9:7:2), obarvali z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline in greli 15 minut na 180 $^\circ\text{C}$  (slika 20). Na sliki 20 vidimo, da nismo ekstrahirali samo zelenih sfingolipidov, ampak smo se znebili velikega deleža ostalih lipidov. Določili smo maso lipidov, ki je znašala 2,16 mg, in koncentracijo lipidov, ki je bila 1 mg/mL.

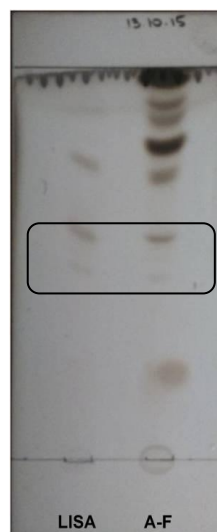


#### 4.1.6. Sfingolipidi iz tobaka, ki smo jih uporabili pri metodi prenosa lipidov na PVDF membrano

Po izolaciji sfingolipidov iz tobaka smo posušen ekstrakt raztopili v 700  $\mu\text{L}$  mešanice kloroform:metanol (2:1). Na TLC ploščico, velikosti 10x10 cm, smo nanegli 30  $\mu\text{L}$  posamezne frakcije, jo razvili v mobilni fazi kloroform: metanol: 4,2M  $\text{NH}_3$  (9:7:2), obarvali z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline in greli 15 min na 180  $^\circ\text{C}$  (slika 21). Ker vse frakcije vsebujejo iste lipide, smo frakcije združili in ekstrahirali zelene sfingolipide. Po ekstrakciji lis smo vzorec posušili in raztopili v 300  $\mu\text{L}$  mešanice kloroform: metanol (2:1). Na TLC ploščico, velikosti 10x10 cm, smo nanegli 30  $\mu\text{L}$  vzorca ekstrahiranih lis in 50  $\mu\text{L}$  združenih frakcij A–F, jo razvili v mobilni fazi kloroform : metanol: 4,2M  $\text{NH}_3$  (9:7:2), obarvali z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline in greli 15 min na 180  $^\circ\text{C}$  (slika 22). Zopet nismo izolirali samo zelenih sfingolipidov. Želeni sfingolipidi so obkroženi na slikah 21 in 22.



**Slika 21:** TLC ploščica po nanosu posamezne frakcije A–F po izolaciji iz tobaka za metodo prenosa lipidov na PVDF membrano.

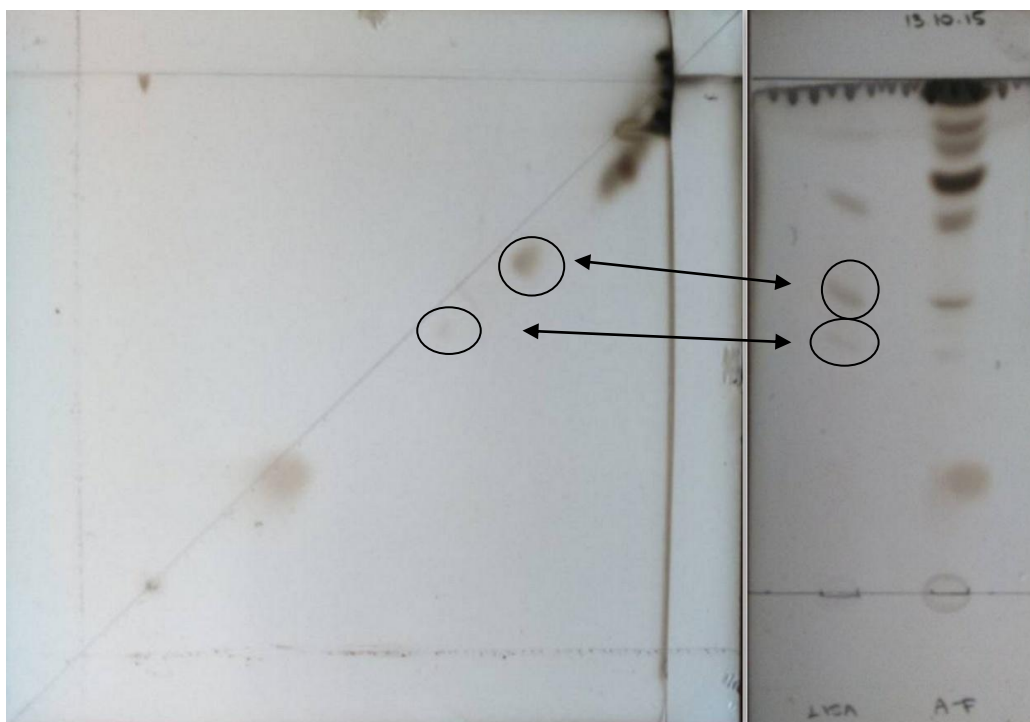


**Slika 22:** TLC ploščica po ekstrakciji zelenih sfingolipidov za metodo prenosa lipidov na PVDF membrano.

Pri veliko izvedenih TLC smo opazili, da ima enaka spojina na TLC ploščici na robovih višji retencijski faktor kot na sredini ploščice. Ta neželen pojav se imenuje »robni efekt« in se pojavi zaradi neenakomernega nasičenja s hlapi topila v kadički. Veliko težavo predstavljajo mobilne faze, ki so sestavljene iz več topil z različno polarnostjo in različnim parnim tlakom, kar vpliva na ravnotežje med tekočo in plinsko fazo. TLC ploščica predstavlja pregrado v kadički, zato topilo hitreje izhlapeva na robovih ploščice kot na sredini. Temu pojavu se lahko izognemo z enakomernim nasičenjem kadičke in z nanašanjem vzorca stran od roba ploščice (29).

## 4.2. PREIZKUS STABILNOSTI LIPIDOV IZ TOBAKA Z DVODIMENZIONALNO KROMATOGRFIJO

Za testiranje stabilnosti sfingolipidov na silikagelu smo uporabili dvodimenzionalno TLC. Na ploščico smo nanесли 60  $\mu\text{L}$  frakcije F izolacije iz tobaka ter jo razvili v dveh dimenzijah. Po razvijanju smo ploščico pobarvali z mešanico 10 % bakrovega sulfata in 8 % fosforne kisline in gredli 10 minut na 180  $^{\circ}\text{C}$  (slika 23).



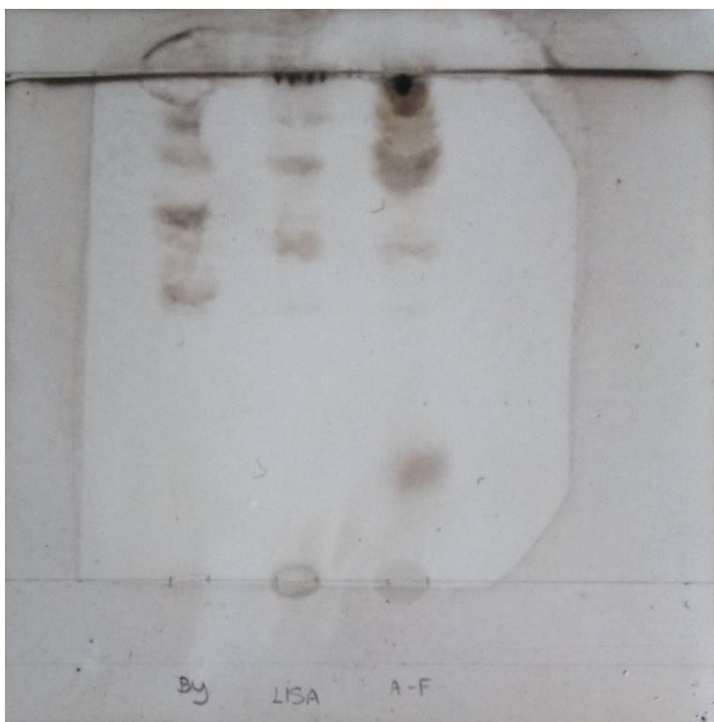
**Slika 23:** TLC ploščica po nanosu 60  $\mu\text{L}$  frakcije F izolacije iz tobaka in razvijanju v dveh dimenzijah (levo) in TLC ploščica po nanosu 30  $\mu\text{L}$  ekstrahiranih zelenih sfingolipidov in 30  $\mu\text{L}$  lipidov združenih frakcij A–F (desno).

Če predpostavimo, da pripadajo obkrožene lise na TLC ploščici po dvodimenzionalni TLC želenim sfingolipidom, lahko zaključimo, da so sfingolipidi stabilni na silikagelu pod pogoji, katerim so izpostavljeni tekom ločbe in barvanja.

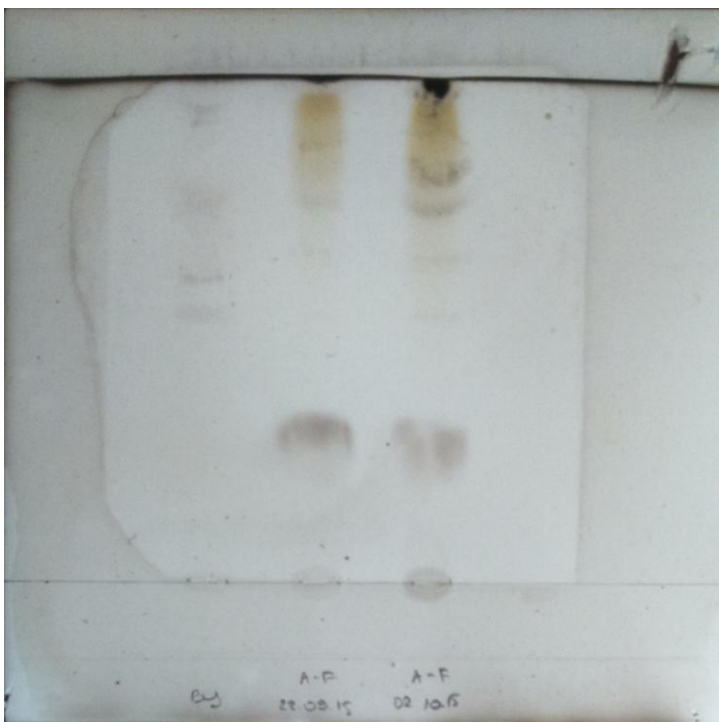
### 4.3. METODA PRENOSA LIPIDOV NA PVDF MEMBRANO

Za prvi prenos lipidov na PVDF membrano smo nanесли 15  $\mu\text{L}$  vzorca BY4747, 200  $\mu\text{g}$  izoliranih lis želenih sfingolipidov iz tobaka in 400  $\mu\text{g}$  lipidov iz združenih frakcij A–F, medtem ko smo za drugi prenos nanесли 15  $\mu\text{L}$  vzorca BY4747 in dvakrat 400  $\mu\text{g}$  lipidov tobaka iz združenih frakcij A–F. TLC ploščico smo razvili v mobilni fazi kloroform: metanol: 4,2 M  $\text{NH}_3$  (9:7:2), jo 10 minut sušili s fenom v digestoriju in 1 uro v eksikatorju. Lipide smo prenesli na PVDF membrano in detektirali s peroksidaznim substratom, kateremu smo dodali 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Na sliki 24 in 25 sta TLC ploščici po prvem in drugem prenosu lipidov na PVDF membrano, in sicer po barvanju z mešanico bakrovega sulfata in fosforne kisline.



**Slika 24:** TLC ploščica po prvem prenosu lipidov na PVDF membrano  
1- BY4747 (15  $\mu\text{L}$ ), 2- izolirane lise želenih sfingolipidov (200  $\mu\text{g}$ ), 3 - lipidi  
združenih frakcij A–F (400  $\mu\text{g}$ ).

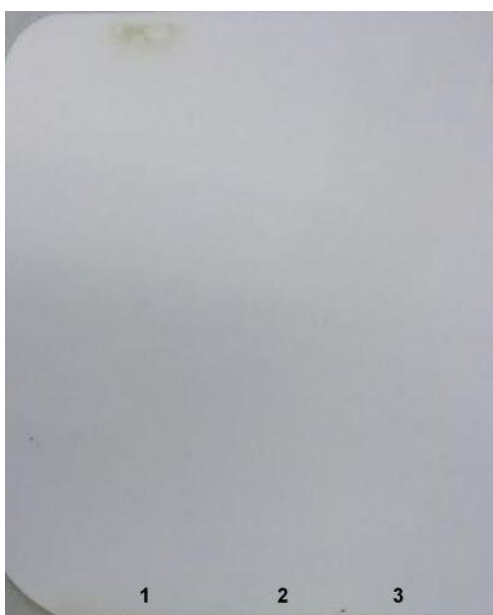


**Slika 25:** TLC ploščica po drugem prenosu lipidov na PVDF membrano  
1- BY4747 (15  $\mu$ L), 2, 3 - lipidi združenih frakcij A-F (400  $\mu$ g).

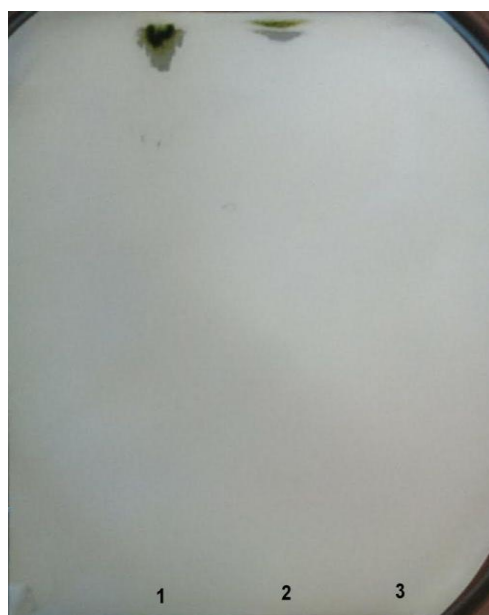
Na slikah 24 in 25 lahko opazimo, da je veliko lipidov ostalo na TLC ploščici. Na voljo nismo imeli namenske aparature za prenos lipidov na PVDF membrano, zato smo kot vir toplote pod tlakom uporabili kar likalnik. Mogoče je to razlog, da je veliko lipidov ostalo na TLC ploščici in se niso prenesli na membrano.

Ko smo lipide prenesli na PVDF membrano, smo jih inkubirali s proteinom NPP1. Za ugotavljanje prisotnosti proteina, vezanega na lipide na membrani, smo membrano stresali s primarnim protitelesom in nato sekundarnim protitelesom ter uporabili peroksidazni substrat. Ker v 2 minutah ni prišlo do pojava temnih lis, smo dodali še 50  $\mu$ L  $H_2O_2$  in počakali 5 minut. Opaziti ni bilo nobene spremembe (sliki 26 in 27).

Rezultati prenosa lipidov na PVDF membrano nakazujejo, da se proteini NLP pod opisanimi eksperimentalnimi pogoji ne vežejo na lipide, izolirane iz tobaka in kvasovke *S. cerevisiae* BY4747 ali pa je prenos lipidov na PVDF membrano bil neuspešen.



**Slika 26:** Prvi prenos lipidov na PVDF membrano; 1 - lipidi združenih frakcij A–F (400 µg), 2- izolirane lise zelenih sfingolipidov (200 µg), 3- BY4747 (15 µL).



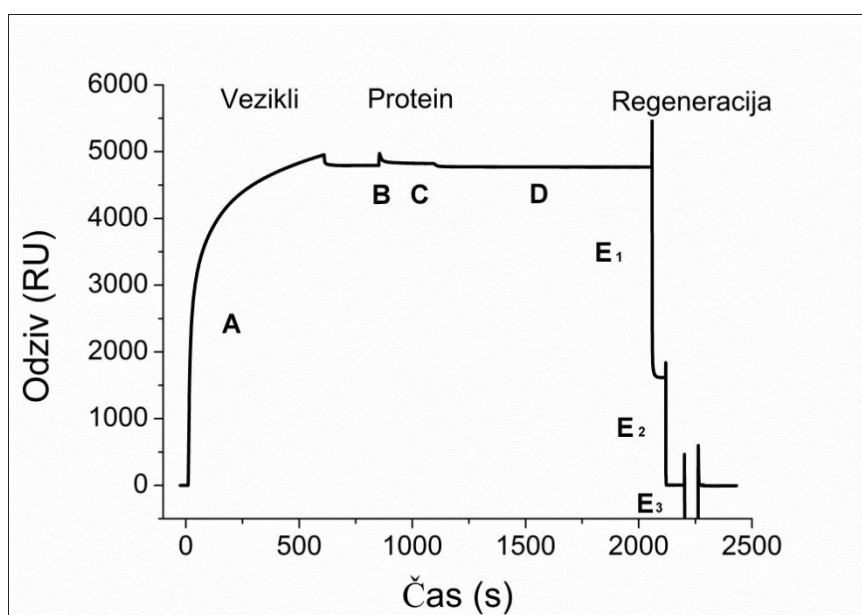
**Slika 27:** Drugi prenos lipidov na PVDF membrano; 1,2 - lipidi združenih frakcij A–F (400 µg), 3- BY4747 (15 µL).

#### 4.4. POVRŠINSKA PLAZMONSKA REZONANCA

Pripravili smo SUV vezikle, ki vsebujejo zmes POPC in izoliranih sfingolipidov iz tobaka, (POPC/sfingolipidi) in vezikle, ki vsebujejo samo POPC. Vezikle, ki vsebujejo samo POPC, smo pripravili, da bi lahko določili razlike v vezavi proteina NPP1 na vezikle brez in s sfingolipidi. Iz te razlike lahko določimo delež vezave proteina NPP1 na izolirane sfingolipide.

Na sliki 28 je senzogram, ki ponazarja grafično predstavitev poteka eksperimenta. En cikel meritve je sestavljen iz več faz. Uporabljali smo refraktometer Biacore T100 in senzorski čip Series S sensor chip L1 (GE Healthcare). S pomočjo mikrotekočinskega sistema smo nanесли vezikle na senzorski čip L1, kar spada v fazo A. Vezikle smo nanašali 10 minut pri pretoku 2 µL/min. Koncentracija lipidov je bila 1 mg/mL. Po končanem nanosu smo preko vezanih lipidov za 2 minuti vbrizgali 5 µM protein NPP1 pri pretoku 10 µL/min. Z vezavo proteinov na lipide se začne faza B ali faza asociacije. Ko pride v fazi

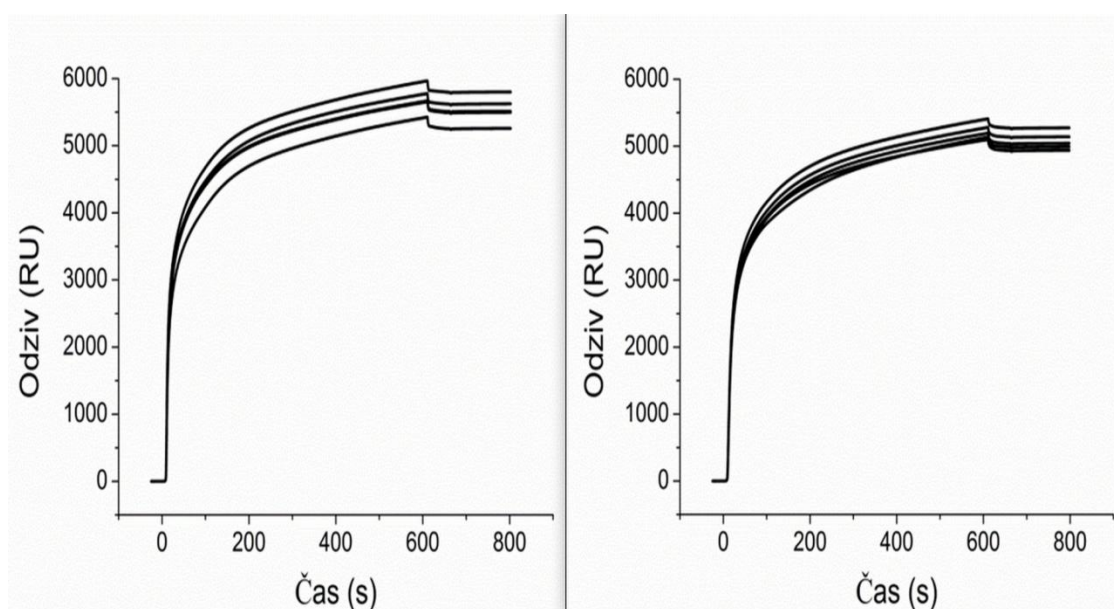
asociacije do vezave, raste signal na sensorgramu. Naklon krivulje lahko uporabimo za izračun hitrosti asociacije. Najvišja vrednost odziva, ki jo lahko doseže, je odvisna od števila vezavnih mest in se nanaša na koncentracijo vezanih veziklov in proteina NPP1. Ko so zasedena vsa vezavna mesta, odziv na sensorgramu preneha rasti in se ustali pri določeni vrednosti, takrat nastopi faza C ali faza ravnotežja. To lahko uporabimo za določanje afinitete vezave med proteinom in lipidi. Po prenehanju vbrizgavanja proteina nastopi faza D ali faza disociacije. V tej fazi se molekule proteina izplavljajo z veziklov in vezavna mesta postanejo nezasedena. Obliko krivulje v tej fazi lahko uporabimo za določanje hitrosti disociacije. Po končanem poskusu lahko površino senzorskega čipa regeneriramo in ponovno zaženemo poskus. Ta del imenujemo faza E ali faza regeneracije. V tej fazi se sperejo vse vezane molekule, sensorgram pa se vrne na začetno vrednost. Čip regeneriramo z regeneracijskimi raztopinami. V našem poskusu smo čip regenerirali z 40 mM oktil glukopiranozidom (E<sub>1</sub>) in 2x z 0,5 % NaDS (E<sub>2</sub> in E<sub>3</sub>) (18).



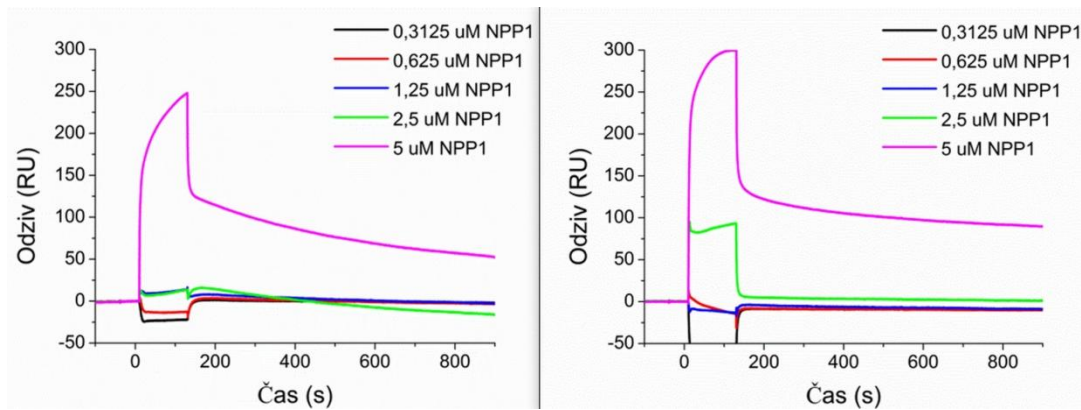
**Slika 28:** Sensorgram. Cikel meritve je začel z nanašanjem veziklov. Vezikle smo nanašali 10 min pri pretoku 2  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Po končanem nanosu smo preko vezanih lipidov za 2 min vbrizgali 5  $\mu\text{M}$  protein NPP1 pri pretoku 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Disociacijo smo spremljali 15 minut (od 20 do 35 minute meritve) in potem regenerirali čip z 40 mM oktil glukopiranozidom in 2x z 0,5 % NaDS. Regeneracijske raztopine smo začeli nanašati pri 35 minuti meritve. Vsako raztopino smo vbrizgavali 60 sekund pri pretoku 10  $\mu\text{L}/\text{min}$

Koncentracije lipidov, ki smo jih uporabili za testiranje ponovljivosti metode, so bile od 0,063 do 0,500 mg/mL. Na sliki 29 so prikazani nanosi veziklov s POPC (levo) in POPC/sfingolipidi 2,3:1 (m:m) (desno). Opazimo lahko, da smo za vse koncentracije lipidov dobili enako obliko krivulje in imeli približno enak nanos lipidov na senzorski čip. Iz tega lahko sklepamo, da je nanos veziklov z lipidi pri SPR ponovljiv proces. Opazimo lahko razliko v najvišji vrednosti odziva med vezikli s POPC in POPC/sfingolipidi, kar lahko kaže na to, da se pri nanosu veže manjše število veziklov s POPC/sfingolipidi v primerjavi z vezavo veziklov, ki vsebujejo samo POPC (slika 29).

Za določitev vezave proteina NPP1 na vezikle smo uporabili vezikle s koncentracijo lipidov 1 mg/mL in protein NPP1 v koncentracijah od 0,313 do 5,000  $\mu$ M. Vezikli POPC/sfingolipidi so vsebovali 3,5 mg POPC in 1,5 mg izoliranih sfingolipidov iz tobaka, medtem ko so vezikli POPC vsebovali 5 mg POPC. Spremljali smo vezavo proteina NPP1 na oboje vezikle, da bi lahko določili razliko v vezavi. Krivulji vezave in najvišji vrednosti odziva po vbrizganju proteina NPP1 na vezane vezikle sta bili v obeh primerih zelo podobni. Pri veziklih POPC/sfingolipidi je bil odziv malo višji. Po prenehanju vbrizgavanja proteina je nastopila faza disociacije, ki je bila pri veziklih POPC/sfingolipidi počasnejša kot pri veziklih POPC (slika 30).

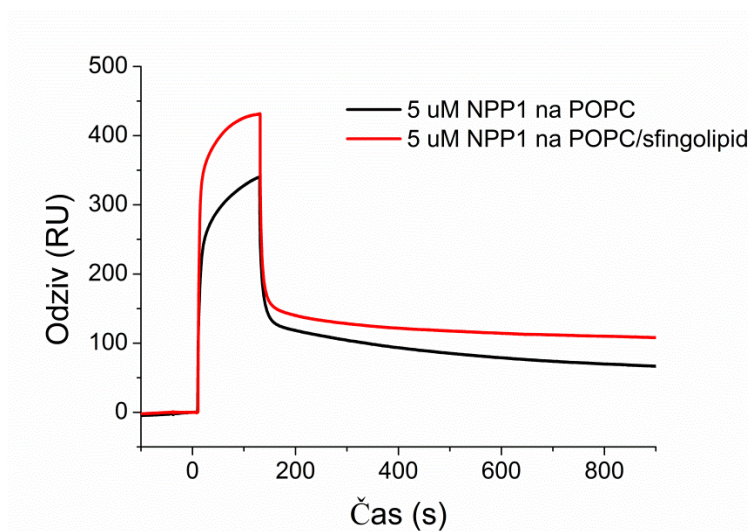


**Slika 29:** Nanos veziklov POPC (levo) in POPC/sfingolipidi (desno) na čip L1



**Slika 30:** Vezava proteina NPP1 na vezikle POPC (levo) in POPC/sfingolipidi (desno)

Pri koncentraciji proteina NPP1 5  $\mu\text{M}$  je ta razlika najbolj vidna. Po 15 minutah disociacije je ostalo 18 % proteina NPP1, vezanega na veziklih POPC, in 25 % proteina, vezanega na veziklih POPC/sfingolipidi (slika 31).



**Slika 31:** Razlika v odzivu in hitrosti disociacije po vezavi proteina NPP1(5  $\mu\text{M}$ ) na vezikle s POPC (črna krivulja) in POPC/sfingolipidi (rdeča krivulja)



Pri ponovljenih testih smo dobili podobne rezultate. Ne moremo z gotovostjo trditi, ali je prišlo do izboljšane vezave proteina NPP1 na vezikle POPC/sfingolipidi v primerjavi z vezikli POPC, vendar počasnejša disociacija pri vezikih POPC/sfingolipidi morda nakazuje na močnejšo interakcijo proteina NPP1 z membranami, če so v njih prisotni še sfingolipidi.

#### **4.5. ELEKTROFOREZA**

Pripravili smo multilamelarne vezikle, ki vsebujejo zmes POPC in izoliranih sfingolipidov iz tobaka (POPC/sfingolipidi 4:1 (m:m)), ter vezikle, ki vsebujejo samo POPC. Vezikle s POPC smo uporabili, da bi določili razliko v vezavi na oboje vezikle in iz tega določili, ali je prišlo do izboljšane vezave proteinov NLP na vezikle, ki vsebujejo tudi sfingolipide.

Uporabili smo več različnih proteinov NLP:

- NIP 26,5  $\mu$ M
- NIP H101A 25,6  $\mu$ M
- NIP D104A 23,7  $\mu$ M
- NPP1 H101A 13  $\mu$ M
- NPP1 D104A 15  $\mu$ M
- NPP HD 4.4.12 40  $\mu$ M
- PaNIE(Tea) 50  $\mu$ M.

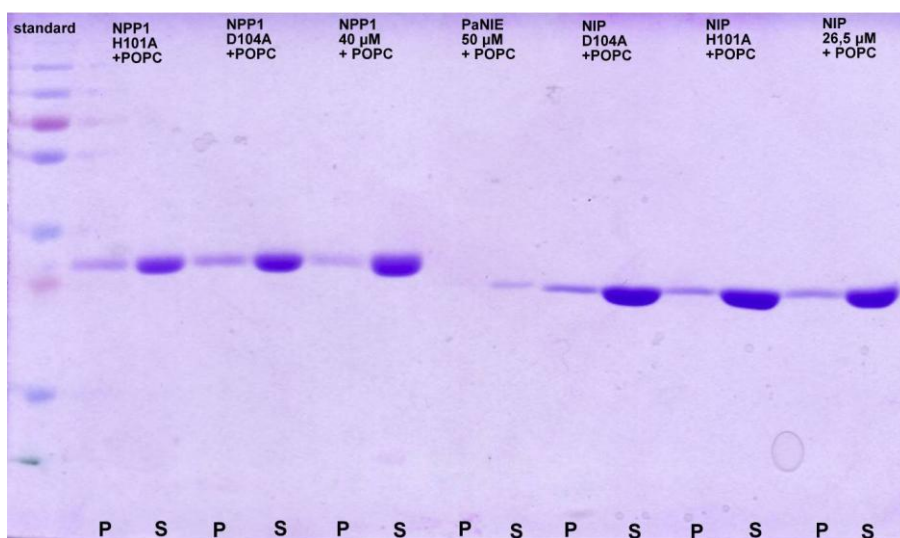
Proteini NIP H101A in D104A ter NPP1 H101A in D104A so mutante proteinov NIP in NPP1, ki nimajo citolitične aktivnosti in ne povzročajo nekroze pri dvokaličnicah. Pri mutantih H101A je histidin na mestu 101 zamenjan z alaninom, medtem ko je pri D104A asparaginska kislina na mestu 104 zamenjana z alaninom. Pri teh proteinih, kot je omenjeno že v uvodu, ima ključno vlogo pri biološki aktivnosti proteinov NLP osrednji heptapeptid, ki sestoji iz K92, D93, H101, R102, H103, D104, E106 in S126, od katerih so D93, H101, D104 in E106 pomembni za vzdrževanje pravilne lege dvovalentnega kationa in citolitično aktivnost. Pri poskusu zamenjave enega od slednjih štirih AK ostankov z alaninom so prišli do zaključka, da mutante ne povzročajo sproščanja kalceina iz veziklov iz plazemske membrane tobaka in nekroze listov (7).

Med metodami sta opisana postopek inkubacije veziklov s proteini NLP ter izvedba elektroforeze in vizualizacije. V preglednici II so navedene količine nanašalnega pufra in pufra MES, ki smo ju dodali supernatantu po inkubaciji veziklov s posameznim proteinom NLP pri elektroforezi. Usedlini smo dodali 12  $\mu\text{L}$  pufra MES in 3  $\mu\text{L}$  nanašalnega pufra. Nanašalni pufer vsebuje glicerol, ki poveča gostoto vzorca in s tem olajša njegov nanos, ker je omogočeno posedanje v žepke elektroforeznega gela. Vsebuje tudi barvilo coomassie blue, ki je indikator za hitrost elektroforezne fronte.

**Preglednica II:** Količine nanašalnega pufra in pufra MES, ki smo ju dodali supernatantu po inkubaciji veziklov s posameznim proteinom NLP

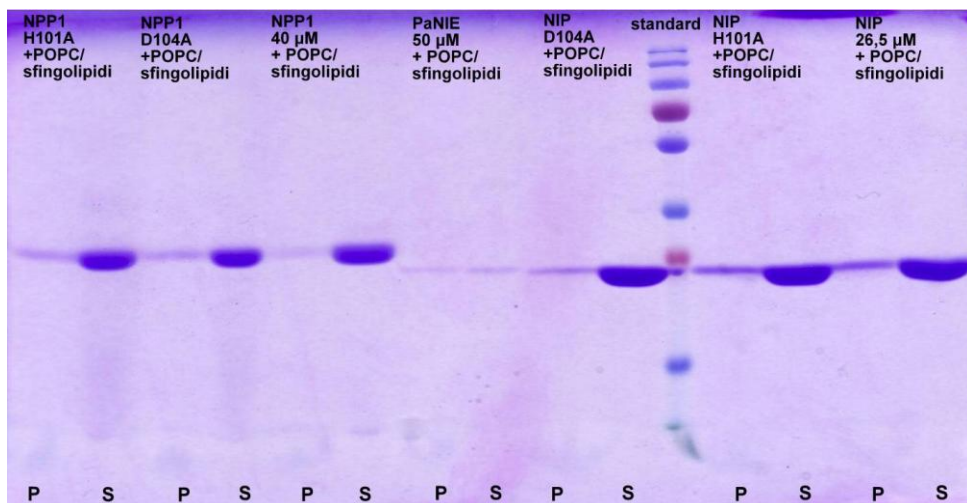
Protein NLP	Elektroforeza 1 -10 $\mu\text{L}$ POPC in POPC + sfingolipidi		Elektroforeza 2 – 25 $\mu\text{L}$ POPC in POPC + sfingolipidi	
	V (pufer MES) [ $\mu\text{L}$ ]	V (nanašalni pufer) [ $\mu\text{L}$ ]	V (pufer MES) [ $\mu\text{L}$ ]	V (nanašalni gel) [ $\mu\text{L}$ ]
NIP 26,5 $\mu\text{M}$	2,9	5	7,9	10
NIP H101A 25,6 $\mu\text{M}$	2,6	5	7,6	10
NIP D104A 23,7 $\mu\text{M}$	2	5	7	10
NPP1 H101A 13 $\mu\text{M}$	1,6	7	2,6	11
NPP1 D104A 15 $\mu\text{M}$	3,8	7	4,8	11
NPP1 HD 4.4.12 40 $\mu\text{M}$	4,7	5	9,7	10
PaNIE(Tea) 50 $\mu\text{M}$	5,7	5	10,7	10

Na sliki 32 je gel po barvanju z barvilom coomasie brilliant blue, na katerega smo nanegli vezikle s POPC po inkubaciji s proteini NLP, na sliki 33 pa je gel po barvanju, na katerega smo nanegli vezikle POPC/sfingolipidi. Oznaka P na dnu označuje usedlino, oznaka S pa pomeni supernatant. Na gelu, kjer se nahajajo modro obarvane lise lahko predpostavimo, da so prisotni proteini. V primeru vezave proteinov NLP s sfingolipidi so proteini prisotni v usedlini. Če ne pride do vezave, so proteini prisotni v supernatantu. Z elektroforezo smo želeli preveriti, v katerem delu so prisotni proteini.

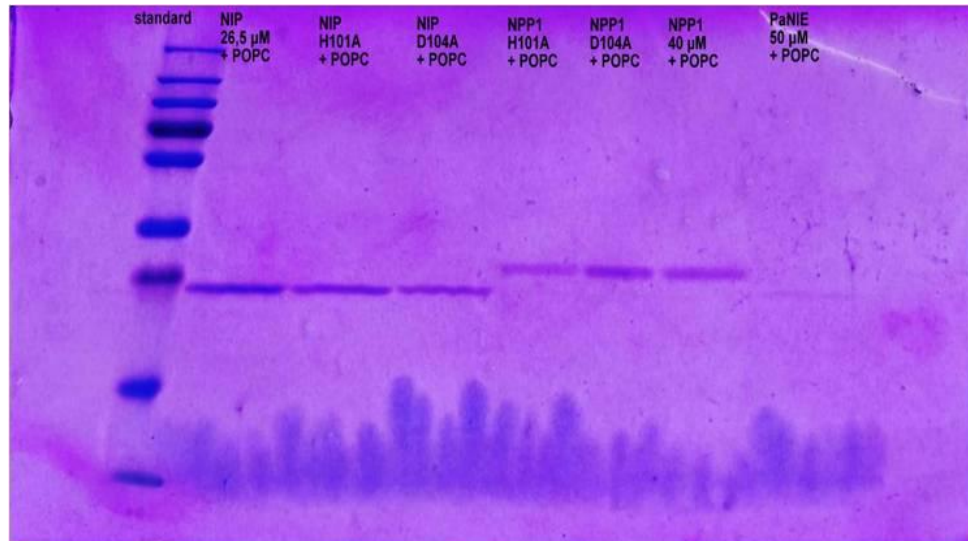


**Slika 32:** Gel po barvanju s coomasie brilliant blue po inkubaciji veziklov POPC s proteini NLP. Oznaka P na dnu označuje usedlino, oznaka S pa pomeni supernatant.

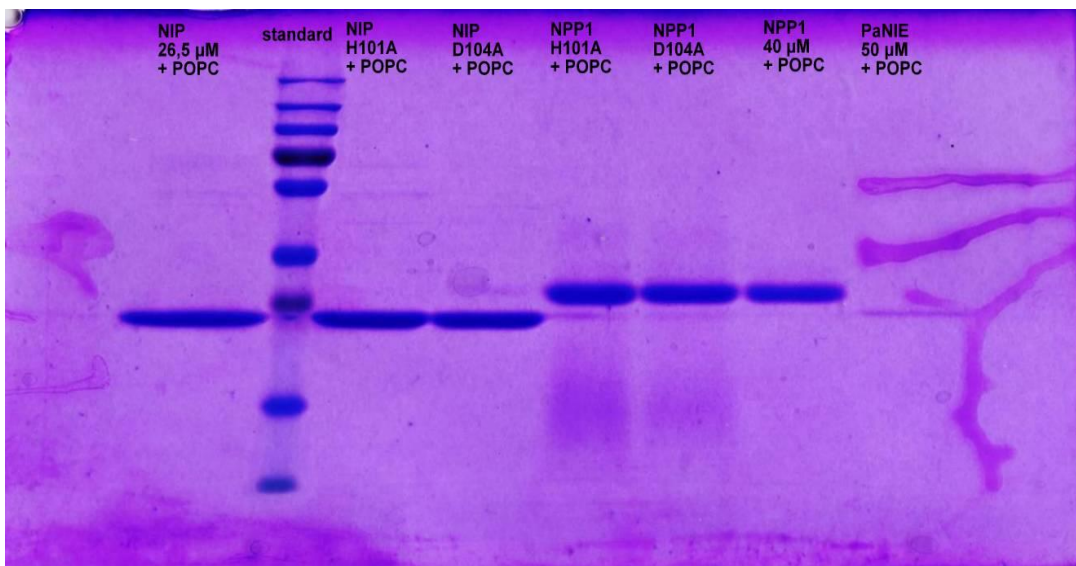
Poskus smo ponovili ter vzorec usedline in supernatanta nanegli na ločene gele. Na slikah 34 in 35 sta gela po barvanju s coomasie brilliant blue, na katera smo nanegli vzorce usedline (slika 34) in supernatanta (slika 35) po inkubaciji veziklov POPC s proteini NLP.



**Slika 33:** Gel po barvanju s coomasie brilliant blue po inkubaciji veziklov POPC/sfingolipidi s proteini NLP. Oznaka P na dnu označuje usedlino, oznaka S pa pomeni supernatant.

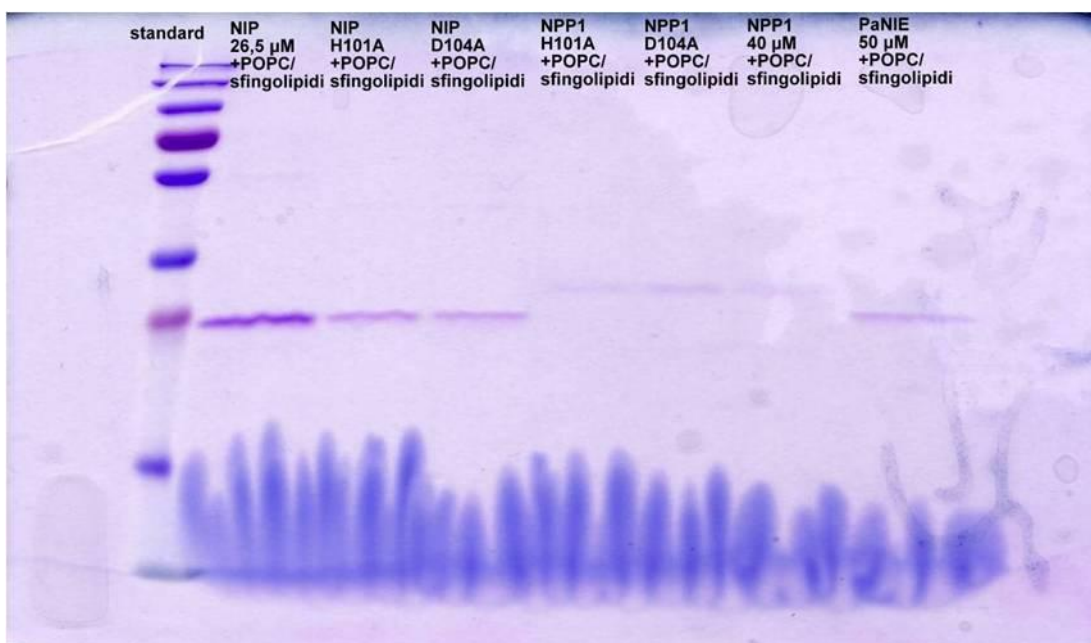


**Slika 34:** Gel po barvanju s coomasie brilliant blue po inkubaciji veziklov POPC s proteini NLP – usedlina

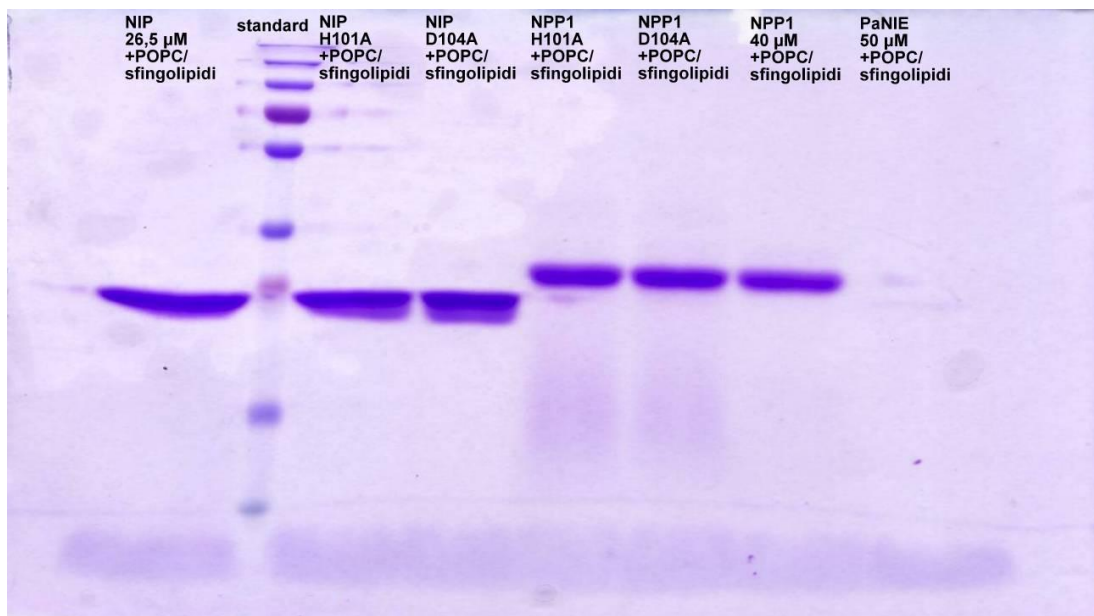


**Slika 35:** Gel po barvanju s coomasie brilliant blue po inkubaciji veziklov POPC s proteini NLP – supernatant

Na slikah 36 in 37 sta gela po barvanju s coomasie brilliant blue, na katera smo nanesli vzorce usedline (slika 36) in supernatanta (slika 37) po inkubaciji veziklov POPC/sfingolipidi s proteini NLP.



**Slika 36:** Gel po barvanju s coomasie brilliant blue po inkubaciji veziklov POPC/sfingolipidi s proteini NLP – usedlina



**Slika 37:** Gel po barvanju s coomasie brilliant blue po inkubaciji veziklov POPC/sfingolipidi s proteini NLP – supernatant

Na slikah 32–37 lahko opazimo, da so proteini prisotni tako v usedlini kot tudi v supernatantu, vendar je v usedlini prisotna veliko nižja količina proteinov NLP. Obstaja tudi možnost, da supernatant nismo popolnoma ločili od usedline ter, da je majhna količina supernatanta, v kateri je bil prisoten protein, ostala v usedlini in se obarvala z barvilom. Če primerjamo gela po barvanju s coomasie brilliant blue po inkubaciji veziklov POPC s proteini NLP in veziklov POPC/sfingolipidi s proteini NLP lahko opazimo, da ni razlik med geloma, kar nakazuje na to, da se proteini NLP ne vežejo bolj na vezikle, v katerih so prisotni sfingolipidi.

Rezultati metode prenosa lipidov na PVDF membrano nakazujejo na to, da ni prišlo do vezave proteinov NLP na sfingolipide ali, da je prenos lipidov na PVDF membrano bil neuspešen. Pri elektroforezi ni razlik v vezavi proteinov NLP na vezikle, ki vsebujejo zmes POPC in sfingolipidov in vezikle, ki vsebujejo samo POPC. Z metodo SPR nismo dobili rezultatov, na podlagi katerih bi lahko z gotovostjo zaključili, ali je prišlo do vezave, vendar nakazujejo mogočo vezavo proteinov NLP na izolirane sfingolipide.

Pri nekaterih spojinah, kot so proteini, lahko večkratno zamrzovanje in odtajanje v vodnem okolju vpliva na stabilnost spojine in na rezultate nadaljnjih analiz (30). Proteini, ki smo jih uporabili v laboratorijskem delu magistrske naloge, so bili velikokrat zamrznjeni in

odtajani. Mogoče je pri tem prišlo do denaturacije proteinov, kar je vplivalo na končne rezultate testiranja.

Postopek bi lahko optimizirali z uporabo nekaterih drugih kromatografskih metod, kot so tekočinska kromatografija pri srednjih pritiskih, TLC v povezavi z MS ali LC-MS. Z omenjenimi metodami bi mogoče dobili bolj zanesljive rezultate in podatke o strukturi spojin.

## 5. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo želeli določiti, ali se proteini NLP vežejo na sfingolipide, ki smo jih izolirali iz kvasovke *S. cerevisiae* in listov tobaka. Sfingolipide smo ločili s tankoplastno kromatografijo in jih ekstrahirali iz silikagela. Vezavo proteinov NLP na sfingolipide smo preverjali s površinsko plazmnsko resonanco, elektroforezo in prenosom lipidov na PVDF membrano.

Pri ločevanju sfingolipidov, izoliranih iz kvasovke *S. cerevisiae* s tankoplastno kromatografijo, smo TLC ploščico po razvijanju barvali s primulinom, 20 % raztopino amonijevega sulfata ter mešanico 10 % bakrovega sulfata in 8 % fosforne kisline, od katerih je slednja pokazala največjo občutljivost. Zaradi tega smo to mešanico uporabljali pri nadaljnjem barvanju TLC ploščic po razvijanju.

Pri površinski plazmnski resonanci smo uporabljali vezikle, ki vsebujejo zmes POPC in sfingolipidov ter vezikle, ki vsebujejo samo POPC, da bi lahko določili razlike v vezavi proteina NPP1 na vezikle brez in s sfingolipidi. Krivulji in najvišji vrednosti odziva po vbrizganju proteina NPP1 na vezane vezikle sta bili v obeh primerih zelo podobni, medtem ko je bila disociacija pri veziklih POPC/sfingolipidi počasnejša, kar morda nakazuje na močnejšo interakcijo proteina NPP1 z vezikli, v katerih so bili prisotni sfingolipidi.

Pri elektroforezi smo uporabljali tudi vezikle, ki vsebujejo zmes POPC in sfingolipidov ter vezikle, ki vsebujejo samo POPC. Uporabili smo več različnih proteinov NLP, od katerih NIP, NPP1 in Panie delujejo citolitično, medtem ko NPP1 D104A, H101A, NIP D104A in H101A nimajo citolitične aktivnosti. Po končani elektroforezi in vizualizaciji proteinov NLP smo opazili, da ni razlik v vezavi proteinov NLP na vezikle, ki vsebujejo zmes POPC in sfingolipidov in vezikle, ki vsebujejo samo POPC, kar nakazuje na to, da se proteini NLP ne vežejo bolj na vezikle, v katerih so prisotni sfingolipidi.

Pri prenosu lipidov na PVDF membrano smo lipide ločili s TLC, jih prenesli na PVDF membrano, dodali protein NPP1 ter inkubirali s primarnimi in sekundarnimi protitelesi. Za detekcijo smo uporabili peroksidazni substrat. Testirali smo vezavo proteina NPP1 na sfingolipide iz kvasovke *S.cerevisiae* BY4747, ekstrahirane zelene sfingolipide in lipide združenih frakcij A–F, izolirane iz listov tobaka. Po uporabi peroksidaznega substrata ni prišlo do nastanka potemnelih lis na PVDF membrani, kar nakazuje na to, da se protein



NPP1 ni vezal na sfingolipide ali pa je bila količina prenesenih lipidov s TLC ploščice na PVDF membrano premajhna.

Stabilnost proteinov je odvisna od veliko dejavnikov. Proteini NLP, uporabljeni v laboratorijskem delu naše raziskave, so bili velikokrat odtajani in znova zamrznjeni. Pri pogostem zamrzovanju in odtajanju proteinov v vodnem okolju lahko pride do porušanja zgradbe proteinov. Ena od možnih razlogov, zakaj nismo mogli dokazati vezave proteinov NLP na izolirane sfingolipide, je porušena zgradba proteinov.

Predlagamo ponovne teste z novimi proteini NLP, ki bodo pokazali, ali pride do vezave proteinov NLP na sfingolipide iz tobaka.

## 6. LITERATURA

- 1 Pata M. O, Hannun Y. A, Ng C. K: Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *NewPhytol*2010; 185: 611–30.
- 2 Merrill A.H, Hannun Y.A: *Sphingolipid Metabolism and Cell Signaling, Part B*, 1st Edition, Academic Press, San Diego, 2000.
- 3 Takao Taki: Bio-recognition and functional lipidomics by glycosphingolipid transfer technology. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2013; 89: 302–320.
- 4 Markham JE, Li J, Cahoon EB, Jaworski JG: Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem* 2006; 281: 22684–94.
- 5 Spassieva S, Hille J: Plant Sphingolipids Today - Are They Still Enigmatic? *Plant Biol* 2003; 5: 125–136.
- 6 Hechtberger P, Zinser E, Saf R, Hummel K, Paltauf F, Daum G: Characterization, quantification and subcellular localization of inositol-containing sphingolipids of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 1994; 225: 641–9.
- 7 Ottmann C., Luberacki B., Kűfner I., Koch W., Brunner F., Weyand M., Mattinen C., Pirhonen M., Anderluh G., Seitz H., Nürnberg T., Oecking C: A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *Proc Natl Acad SciUSA* 2009; 25: 10359–10364.
- 8 Feng B.Z, Zhu X.P, Fu L, Lv R.F, Storey D, Tooley P, Zhang X.G: Characterization of necrosis-inducing NLP proteins in *Phytophthora capsici*. *BMC Plant Biology* 2014; 14: 126.
- 9 Oome S, Van den Ackerveken G: Comparative and functional analysis of the widely occurring family of Nep1-like proteins. *Mol Plant Microbe Interact* 2014; 27: 1081–94.
- 10 Qutob D, Kemmerling B, Brunner F, Kűfner I, Engelhardt S, Gust A.A, Luberacki B, Seitz H.U, Stahl D, Rauhut T, Glawischnig E, Schween G, Lacombe B, Watanabe N, Lam E, Schlichting R, Scheel D, Nau K, Dodt G, Hubert D, Gijzen M, Nürnberger T: Phytotoxicity and Innate Immune Responses Induced by Nep1-Like Proteins. *Plant Cell* 2006; 18: 3721–3744.
- 11 Pemberton CL, Salmond GP: The Nep1-like proteins-a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Mol Plant Pathol* 2004; 5: 353–9.

- 12 Kűfner I, Ottmann C, Oecking C, Nűrnberger T: Cytolytic toxins as triggers of plant immune response. *Plant Signal Behav* 2009; 4: 977–979.
- 13 Fried B, Sherma J: *Practical Thin-Layer Chromatography: A Multidisciplinary Approach*, CRC Press, New York, 1996.
- 14 Deinstrop E.H : *Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.
- 15 Sherma J, Fried B: *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2003.
- 16 Spangenberg B, Poole C.F, Weins C: *Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey*, Springer, New York, 2011.
- 17 Štrukelj B, Kos J, *Biološka zdravila: Od gena do učinkovine*, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007.
- 18 Patching SG: Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1838: 43–55.
- 19 Besenicar M, Macek P, Lakey JH, Anderluh G: Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chem Phys Lipids* 2006; 141: 169–78.
- 20 <http://web.bf.uni-lj.si/bi/sprcenter/Tehnologija.html> (dostopno marca 2016).
- 21 Momoi M, Tanoue D, Sun Y, Takematsu H, Suzuki Y, Suzuki M, Suzuki A, Fujita T, Kozutsumi Y : SLI1 (YGR212W) is a major gene conferring resistance to the sphingolipid biosynthesis inhibitor ISP-1, and encodes an ISP-1 N-acetyltransferase in yeast. *Biochem J.* 2004; 381: 321–328.
- 22 Kubis S.E, Lilley K.S, Jarvis P : Isolation and Preparation of Chloroplasts from *Arabidopsis thaliana* Plants. *Methods in Molecular Biology* 2008; 425: 171–186.
- 23 Jennings J.C, Apel-Birkhold P.C, Mock N.M, Baker C.J, Anderson J.D, Bailey B.A: Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*. *Plant Sci* 2001; 161: 891–899.
- 24 Fuchs B, Sűss R, Teuber K, Eibisch M, Schiller J: Lipid analysis by thin-layer chromatography--a review of the current state. *J Chromatogr A.* 2011; 1218: 2754–74.
- 25 Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: *Farmaceutvska kemija III, Vaje in seminarji*, FFA, Ljubljana, 2010.

- 26 Tomlin GC, Wixon JL, Bolotin-Fukuhara M, Oliver SG: A new family of yeast vectors and S288C-derived strains for the systematic analysis of gene function. *Yeast*. 2001; 18 : 563–675.
- 27 Yamagata M, Obara K, Kihara A: Unperverted synthesis of complex sphingolipids is essential for cell survival under nitrogen starvation. *Genes Cells*. 2013; 18: 650–9.
- 28 Fried B, Sherma J: *Thin-Layer Chromatography, Revised And Expanded*, 4. izdaja, Marcel Dekker, New York, 1999: 223–31.
- 29 Bolliger H.R, Brenner M, Gänshirt H, Mangold H.K, Seiler H, Stahl E, Waldi D: *Thin-Layer Chromatography: a Laboratory Handbook*, Springer – Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 1965: 15–16.
- 30 Cao E, Chen Y, Cui Z, Foster PR: Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol Bioeng* 2003; 82: 684–90.