

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katja JAZBEC

PROTIGLIVNO DELOVANJE LINUSITINSKIH PROTEINOV

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF LINUSITIN-LIKE PROTEINS

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2007

Univerzitetni študij zaključujem z diplomsko nalogo. Praktično delo je bilo opravljeno na Katedri za botaniko, Katedri za biokemijo in Katedri za biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Oddelku za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije z dne 16.6.2006 ter na osnovi pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Marina Dermastia in za recenzentko prof. dr. Nina Gunde-Cimerman.

Mentorica: prof. dr. Marina Dermastia

Recenzentka: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David Stopar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Marina Dermastia

Nacionalni inštitut za biologijo in

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 547.96:633.854:579.24:582.28(043)=863
- KG linusitinski proteini/ LIN1 / osmotini/ PR-5 proteini/ protiglivno delovanje/
liposomi/ modelne lipidne membrane/ lan
- AV JAZBEC, Katja
- SA DERMASTIA, Marina (mentorica)/ GUNDE-CIMERMAN, Nina (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
- LI 2007
- IN PROTIGLIVNO DELOVANJE LINUSITINSKIH PROTEINOV
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 49 str., 9 sl., 8 pregl., 90 vir.
- IJ sl
- JI sl/en

AI Iz lanu (*Linum usitatissimum*) so izolirali več proteinov, ki sestavljajo družino linusitinov, iz skupine PR-5. Skupna značilnost PR-5 proteinov je protiglivno delovanje, ki je bilo za linusitin pokazano na primeru glive iz rodu *Alternaria*. V naši raziskavi smo želeli določiti protiglivno delovanje izoliranega proteina LIN1 iz družine linusitinov. Postavili smo dve hipotezi. V prvi hipotezi smo na osnovi predhodnih rezultatov z linusitinom na umetnih lipidnih membranah predvidevali, da bo LIN1 deloval podobno proti glivam, katerih celične membrane vsebujejo sterole in da se bo aktivnost razlikovala glede na tip vključenih sterolov. V drugi hipotezi pa smo, glede na razlike v aminokislinskem zaporedju in nekoliko drugačnih biokemijskih parametrov, pričakovali drugačno delovanje LIN1. Slednje bi lahko pomenilo tudi drugo fiziološko vlogo LIN1, kot je predvidena za osmotine. Teste smo izvajali na štirih vrstah gliv katerih celične strukture so dobro znane, vendar pri nobeni vrsti nismo zasledili protiglivnega delovanja. Morebiten vpliv LIN1 iz lanu na prepustnost smo testirali tudi na umetnih membranskih modelih – liposomih z vključenim fluorescentnim barvilom kalceinom. Tudi tokrat aktivnosti LIN1 nismo zaznali, saj se fluorescenca kalceina ni povečala. Ugotovili smo, da je delovanje LIN1 drugačno od linusitina, saj nima niti protiglivne aktivnosti niti ne vpliva na prepustnost liposomov. Potencialna fiziološka vloga LIN1 je verjetno drugačna, kot je predvidena za osmotine.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 547.96:633.854:579.24:582.28(043)=863

CX linusitin-like proteins/ LIN1/ osmotins/ PR-5 proteins/ antifungal activity/ liposoms/
model lipid membrane/ flax

AU JAZBEC, Katja

AA DERMASTIA, Marina (supervisor)/ GUNDE-CIMERMAN, Nina (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology

PY 2007

TI ANTIFUNGAL ACTIVITY OF LINUSITIN-LIKE PROTEINS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO IX, 49 p., 9 fig., 8 pregl., 90 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Quite a few proteins from a PR-5 group, that belong to a linusitin family were isolated from flax (*Linum usitatissimum*). A common feature of PR-5 proteins is their antifungal activity, shown for linusitin family on a case of fungus from *Alternaria* spp. In our research we wanted to determine the actual antifungal activity of an isolated linusitin family protein called LIN1. We made two hypotheses. According to the first hypothesis, based on the preliminary results with linusitin on artificial lipide membranes, we anticipated that LIN1 will function similarly against fungi, which cell membrane contain sterols and that activity will differentiate according to the type of engaged sterols. The second hypothesis was made according to the differences in aminoacid sequence and somewhat different biochemical parameters, where we anticipated a different activity for LIN1. The latter could also mean another potential physiological role of LIN1, as is anticipated for osmotins. Tests were performed on four species of fungi, which cellular structures are well-known, however no antifungal activities were determined. The eventual impact of LIN1 from flax on permeability was also tested on artificial membrane models – liposomes with fluorescent dye calcein. Fluorescence of calcein did not increase and the activity of LIN1 was once again not detected. We found out that LIN1 functions differently than linusitin, because it neither has anti-fungal activity, nor it affects the permeability of liposomes. Potential physiological role of LIN1 is probably different, as the one anticipated for osmotins.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 PROTEINI POVEZANI S PATOGENEZO	2
2.1.1 Sprožitev sinteze in glavne lastnosti PR-proteinov	2
2.1.2 Družina PR-5	3
2.1.3 Osmotini in njim podobni proteini	4
2.1.4 Linusitin in linusitinu podobni proteini	6
2.2 LIPOSOMI	8
2.3 SESTAVA GLIVNIH MEMBRAN	9
2.3.1 <i>Debaryomyces hansenii</i>	9
2.3.2 <i>Hortaea werneckii</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
2.4 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	17
3 MATERIAL IN METODE	18
3.1 PROTEIN LIN1	18
3.2 GLIVNI MATERIAL	18
3.2.1 Glivni sevi in gojitev	18
3.2.2 Priprava gojišč	18
3.2.3 Štetje celic s števno komoro (hemocitometrom)	19
3.2.4 Določanje števila celic, ki tvorijo kolonijo (CFU-Colony forming units)	20
3.2.5 Protoplastiranje kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	20
3.2.6 Protoplastiranje kvasovke <i>H. werneckii</i>	21
3.2.7 Barvanje protoplastov <i>S. cerevisiae</i>	21
3.3 MERJENJE DELOVANJA LIN1 NA LIPOSOME	21
3.3.1 Priprava liposomov	21
3.3.1.1 Multilamelarni vezikli (MLV)	21
3.3.1.2 Veliki unilamelarni vezikli (LUV)	22
3.3.2 Priprava kolon	23
3.3.3 Merjenje aktivnosti proteinov na LUV	23
3.3.3.1 Material	23
3.3.3.2 Postopek	23
3.4 PROTIGLIVNO DELOVANJE	24
4 REZULTATI	25

4.1 DOLOČANJE ŠTEVILA CELIC	25
4.1.1 <i>S. cerevisiae</i> in <i>D. hansenii</i>	25
4.1.2 CFU (Colony Forming Units).....	25
4.2 DELOVANJE PROTEINA NA PROTOPLASTE	26
4.2.1 <i>S. cerevisiae</i>	26
4.2.2 <i>H. werneckii</i>	26
4.2.3 Barvanje protoplastov <i>S. cerevisiae</i> z metilenskim modrilom.....	27
4.3 MERJENJE AKTIVNOSTI PROTEINOV NA LUV	27
4.4 VPLIV PROTEINA NA RAST GLIVE <i>Alternaria alternata</i>	28
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	29
5.1 LIN 1	29
5.1.1 Protiglivno delovanje	29
5.1.2 Delovanje na liposome	32
5.2 SKLEPI	35
6 POVZETEK.....	36
7 VIRI.....	38
ZAHVALA.....	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Nukleotidno zaporedje LIN1 cDNA in izpeljano aminokislinsko zaporedje (Anžlovar in sod., 2006).....	7
Slika 2: Vpliv pH in NaCl na delež membranskih fosfolipidov glive <i>D. hansenii</i> (Tunblad-Johansson, 1987).....	10
Slika 3: Količina sterolov v plazemski membrani glive <i>D. hansenii</i> rastoče pri različnih rastnih razmerah (Turk in sod., 2007).....	12
Slika 4: Profil maščobnih kislin celične membrane glive <i>D. hansenii</i> v odvisnosti od rastnega medija (Turk in sod., 2007).....	12
Slika 5: Celotna količina sterolov v membranah glivnih celic rastočih pri različnih koncentracijah NaCl (Turk in sod., 2004).....	13
Slika 6: Delež membranskih fosfolipidov halofilnih in halotolerantnih melaniziranih kvasovkam podobnih gliv rastočih pri različnih koncentracijah NaCl (Turk in sod., 2004).....	14
Slika 7: Relativni delež fosfolipidnih maščobnih kislin v celični membrani glive <i>H. werneckii</i> rastoče pri različnih koncentracijah NaCl (Turk in sod., 2004).....	15
Slika 8: Relativni delež fosfolipidnih maščobnih kislin v celični membrani glive <i>S. cerevisiae</i> rastoče pri različnih koncentracijah NaCl (Turk in sod., 2004).....	15
Slika 9: Gliva <i>Alternaria alternata</i> po dodatku proteina LIN1 (HPLC frakcije 10, 11, 12,13).....	28

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Delež anionskih fosfolipidov v celični membrani glive <i>D. hansenii</i> rastoči v različnih rastnih razmerah (Tunblad-Johansson, 1987)	11
Preglednica 2: Število celic gliv <i>S. cerevisiae</i> in <i>D. hansenii</i> na mililiter po dvodnevni inkubaciji s proteinom LIN1	25
Preglednica 3: CFU kvasovk <i>S. cerevisiae</i> in <i>D. hansenii</i>	25
Preglednica 4: Število protoplastov <i>S. cerevisiae</i> po 1, 3 in 17 urah inkubacije s proteinom LIN1	26
Preglednica 5: Število protoplastov <i>H. werneckii</i> po 2 in po 16 urah inkubacije s proteinom LIN1	26
Preglednica 6: Število neobarvanih in modro obarvanih protoplastov <i>S. cerevisiae</i> po 1 in 16 urah inkubacije s proteinom LIN1 prisotnim v HPLC frakcijah 11 in 12.....	27
Preglednica 7: Delež nepoškodovanih protoplastov <i>S. cerevisiae</i> (%)	27
Preglednica 8: Stopnja permeabilizacije (P) LUV	28

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AK	aminokislina
BSA	goveji serumski albumin
CBS	Centraalbureau voor schimmelcultures Baarn-Delft
cDNA	komplementarna DNA (complementary DNA)
CL	kardiolipin
EDTA	etilendiamin
GC-MS	plinska kromatografija povezana z masno spektrometrijo (gas chromatography-mass spectrometry)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high performance liquid chromatography)
LUV	veliki enoslojni vezikli (large unilamellar vesicles)
MLV	večslojni vezikli (multilamellar vesicles)
MZKI	Mikrobna zbirka Kemijskega inštituta
OD	optična gostota
PA	fosfatidna kislina
PC	fosfatidilholin
PE	fosfatidiletanolamin
PG	fosfatidilglicerol
PI	fosfatidilinozitol
PR-proteini	proteini, povezani s patogenezo (pathogenesis-related proteins)
PS	fosfatidilserin
PU	fosfatidilinozitol
SP	sfingolipid
TLC	tankoplastna tekočinska kromatografija (thinlayer liquid chromatography)

1 UVOD

Pomemben odgovor rastlin na biotske in abiotske strese je kopičenje proteinov povezanih s patogenezo (t.i. PR proteinov). V okviru raziskav skupine za eksperimentalno botaniko na Oddelku za biologijo so iz lanu (*Linum usitatissimum*) izolirali več proteinov, ki sestavljajo družino linusitinov, iz skupine PR-5. Skupna značilnost PR-5 proteinov je protiglivno delovanje, ki je bilo za linusitin pokazano na primeru gliv iz rodu *Alternaria*. Na umetnih lipidnih membranah, sestavljenih na osnovi predvidene strukture membran potencialnih patogenih gliv iz različnih rodov, je bil za linusitin že pokazan tudi mehanizem delovanja, ki vključuje prepustnost membran. Eden izmed izoliranih proteinov iz družine linusitinov je tudi protein LIN1, katerega biološko delovanje do sedaj še ni bilo raziskano.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROTEINI POVEZANI S PATOGENEZO

(»pathogenesis-related« proteins, PR-proteini)

2.1.1 Sprožitev sinteze in glavne lastnosti PR-proteinov

Različni patogeni stalno ogrožajo rastline, škoda ki pri tem nastane, pa je v veliki meri posledica obrambnih odgovorov rastline. Ti obrambni odgovori so skupek usklajenih in povezanih nizov metabolnih sprememb, ki vključujejo različne, t.i. PR proteine (proteini povezani s patogenezo). Sprožitev genov za proteine PR je posledica neujemanja odpornostnega gena rastline in pripadajočega gena za avirulenco v patogenu. Stalno izražanje enega ali več proteinov PR upočasni razvoj določenih bolezni (Hammond-Kosack in Jones, 1996). Napad mikrobov sproži sintezo proteinov PR prek številnih signalnih poti, ki vključujejo receptorske komponente s proteinskimi domenami, ki so podobne tistim, ki jih srečamo pri živalskih obrambnih sistemih (Martin, 1999; Glazebrook, 2001).

Proteine PR so prvotno izolirali v zgodnjih 70. letih iz listov tobaka, ki so preobčutljivostno reagirali na tobačni mozaični virus (TMV) (Stintzi, 1993). Od takrat so iz različnih rastlinskih vrst izolirali zelo veliko proteinov PR. Na podlagi njihovega aminokislinskega zaporedja, imunološke povezanosti in encimske ali biološke aktivnosti so jih najprej razdelili v pet družin (Boel in sod., 1990; Van Loon in sod., 1994). Danes je priznanih štirinajst družin (Van Loon in Van Strien, 1999). Nekateri proteini PR kodirajo hidrolitične encime β -1,3-glukanazo in hitinazo, ki razgrajujeta celično steno gliv (npr. PR-2, PR-3, nekateri PR-5). Poleg tega sintezo proteinov PR večinoma sprožijo rastlinski patogeni ali abiotski stres in/ali protiglivno delujejo v *in vitro* poskusih (Vigers in sod., 1991; Vigers in sod., 1992; Van Loon in Van Strien, 1999).

2.1.2 Družina PR-5

Proteini PR so znotraj kraljestva rastlin evolucijsko dobro ohranjeni proteini povezani s patogenezo. Izolirali in določili so jih iz najrazličnejših rastlinskih vrst, tako iz enokaličnic kot iz dvokaličnic (Roberts in Selitrennikoff, 1990; Vigers in sod., 1991; Woloshuk in sod., 1991; Huynh in sod., 1992; Vigers in sod., 1992; Borgmeyer in sod., 1992; Leslie in sod., 1993; Rodrigo in sod., 1993; Vu in Huynh, 1994). Proteini PR-5 so večinoma kislo nevtralni ali zelo bazični. Vsi proteini PR-5 so po aminokislinskem zaporedju podobni sladkemu proteinu taumatinu, izoliranemu iz plodov enokaličnice *Thaumatococcus daniellii* Benth (Van der Wel in Loeve, 1972), zato celotno družino imenujemo »taumatini in taumatinu podobni proteini« (TLP – thaumatine-like proteins). Veliko proteinov PR-5 iz tobaka in drugih rastlin v razmerah *in vitro* zavira hifno rast ali kalitev spor različnih gliv. Protiglivno delovanje je specifično za posamezne vrste gliv. Mehanizem inhibicije rasti gliv naj bi bila permeabilizacija glivnih membran (Stintzi in sod., 1993).

Iz razreda proteinov PR-5 je najbolje proučena aktivnost zeamatina izoliranega iz koruze (Roberts in Selitrennikoff 1990). Svetlobna mikroskopija in poskusi z radioaktivnim označevanjem so pokazali, da se v prisotnosti zeamatina glivne hife razpočijo in prelomijo (Roberts in Selitrennikoff 1990). Vendar mehanizem delovanja zeamatina še ni razjasnjen. Roberts in Selitrennikoff (1990) sta sklepala, da molekule tvorijo transmembranske pore, vendar pa se objavljena kristalna struktura zeamatina (Batalia in sod., 1996) ne ujema s tem modelom. Zaradi tega so Batalia in sod. (1996) sklepali, da je zeamatinska aktivnost vezana na elektrostatske interakcije s subapikalnimi strukturami glivnih hif, ki povzročijo dotok vode in ionov preko membran. Do teh interakcij naj bi prišlo med zeaminom in membranskim ionskim kanalom, vodnim kanalom ali osmotskim receptorjem, ki destabilizira osmotski tlak, s katerim gliva uravnava iztezanje hifnega vršička.

2.1.3 Osmotini in njim podobni proteini

Osmotini in njim podobni proteini so bazični proteini iz razreda proteinov PR-5. Osmotin so prvič izolirali iz celic tobaka, prilagojenega na slano okolje (Singh in sod., 1985; 1987a), kasneje pa so sorodne proteine izolirali ali določili njihova nukleotidna zaporedja iz tobaka (Koiwa in sod., 1994; Abad in sod., 1996; Koiwa in sod., 1997), divjega kostanja (Zhu in sod., 1993; Garcia-Casado in sod., 2000), koruze (Roberts in Salitrennikoff, 1990), ječmena (Skadsen in sod., 2000), ovsa (Skadsen in sod., 2000), popra (Hong in sod., 2004), krompirja (Zhu in sod., 1993; 1995), krmne repice (Cheong in sod., 1997a), petunije (Kim in sod., 2002), bučke (Shih in sod., 2001), lanu (Anžlovar in sod., 1998) in mnogih drugih, med seboj nesorodnih družin.

Zreli osmotini so sestavljeni iz 203 do 230 amino kislin (Capelli in sod., 1997; Cheong in sod., 1997a, 1997 b; Koiwa in sod., 1997; Pressey, 1997; Newton in Duman, 2000; Wu in sod., 2001; Anžlovar, 2002; Kim in sod., 2002). Molekulske mase osmotinov so med 22 in 28 kDa (Woloshuk in sod., 1991; Anžlovar in sod., 1998; Koiwa in sod., 1997; Singh in sod., 1987 a; Cheong in sod., 1997 b; Shih in sod., 2001; Cheong in sod., 1997a). Na N-koncu aminokislinskega zaporedja imajo signalno zaporedje, dolgo 20 – 30 aminokislin, ki naj bi bilo odgovorno za transport proteina prek membrane endoplazemskega retikuluma (Cheong in sod., 1997b). Vsi osmotini imajo ohranjenih 16 cisteinskih ostankov, ki med seboj tvorijo 8 disulfidnih vezi (Ogata in sod., 1992; Cheong in sod., 1997b; Garcia-Casado in sod., 2000; Shih in sod., 2001; Anžlovar, 2002; Kim in sod., 2002). Na C-koncu je prisotno signalno zaporedje, ki je nujno za znotrajcelično namestitev proteina (Melchers in sod., 1993). Večina osmotinov ima bazično ali nevtralno izoelektrično točko (pI), je pa tudi nekaj poročil o kisljih izoelektričnih točkah (Hong in sod., 2004; Anžlovar in sod., 2006).

Geni za osmotine ne vsebujejo intronov, ki bi prekinjali kodirajoče zaporedje (Sato in sod., 1996; Zhu in sod., 1995; Shih in sod., 2001; Wu in sod., 2001). Osmotine kodirajo majhne večgenske družine (Rodrigo in sod., 1993; Zhu in sod., 1995; Sato in sod., 1996; Cheong in sod., 1997; Anžlovar in sod., 2006) ali en sam gen (Sato in sod., 1996; Hu in sod., 1997). Izražanje genov je lahko povezano z okoljskimi dejavniki, kot so patogeni, ranitev, obdelava rastline s salicilno kislino, etilenom ali abscizinsko kislino, slano okolje,

mraz in suša (Zhu in sod., 1993; Koiwa in sod., 1994; Zhu in sod., 1995; Kim in sod., 2002). Osmotini se kopičijo tudi v zdravih rastlinah (Capelli in sod., 1997; Anžlovar in sod., 2006; Kim in sod., 2002; Cheong in sod., 1997; Anžlovar in sod., 1998; Shih in sod., 2001; Hong in sod., 2004).

Številne raziskave so pokazale, da lahko izražanje osmotinskih genov izzovejo okužbe z glivami, kar naj bi povečalo odpornost rastlin proti nadaljnim okužbam z glivami (Singh in sod., 1989; Brederobe in sod., 1991; LaRosa in sod., 1992; Nelson in sod., 1992; Liu in sod., 1994; Vleeshouwers in sod., 2000). Poleg tega ima večina izoliranih osmotinov protiglivno delovanje v poskusih *in vitro*. Osmotin iz tobaka inhibira rast glivnih hif iz 18 različnih rodov z različno stopnjo občutljivosti ter povzroča lizo spor in inhibira kalitev 5 vrst gliv (Abad in sod., 1996). Osmotin II iz tobaka povzroča lize sporangijev in inhibira rast pri glivi *Phytophthora infestans* (Woloshuk in sod., 1991). Večina laboratorijskih sevov kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* je odporna proti osmotinu, stopnja odpornosti pa je med sevi različna (Yun in sod., 1996). Po inkubaciji BFTP iz krmne repice in PR-5d iz tobaka z glivo *Neurospora crassa* so opazili razpoke koncev hif in sproščen oblak citoplazme (Cheong in sod., 1997b; Koiwa in sod., 1997). Protein PR-5d močno inhibira razširjanje hif pri glivah *Alternaria solani*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Neurospora crassa* in *Trichoderma reesei* (Koiwa in sod., 1997). Linusitin iz lanu upočasnjuje rast glive *Alternaria alternata* (Anžlovar, 1997).

Natančen mehanizem delovanja in tarče osmotinov in drugih protiglivnih PR-5 proteinov še niso znane. Ker v splošnem osmotini nimajo glukanazne ali hitinazne aktivnosti, obstaja verjetnost, da je tarča teh proteinov plazemska membrana gliv in ne celična stena (Anžlovar in Dermastia, 2003).

2.1.4 Linusitin in linusitinu podobni proteini

Do sedaj so iz lanu izolirali dva proteina, ki ju po njunih biokemijskih lastnostih uvrščamo med osmotine. Linusitin so izolirali iz zdravih semen lanu (Anžlovar in sod., 1998), LIN1 pa iz radikul zdravih kalic (Anžlovar in sod., 2006). Glavna razlika med obema proteinoma je izoelektrična točka. Linusitin je bazičen ($pI = 8,6$), izoelektrična točka LIN1 pa je kislja ($pI = 5,4$) (Anžlovar in sod., 2006).

Linusitin je 25 kDa protein z znanim aminokislinskim zaporedjem le za N-konec (Borgmeyer in sod., 1992). 68 % tega zaporedja je identičnega zeamatinu, poleg tega naj bi bilo protiglivno delovanje podobno, s prepustnostjo membran.

Nukleotidno zaporedje LIN1 je v celoti znano. Dolgo je 964 nukleotidov in vsebuje odprt bralni okvir iz 789 nukleotidov, ki se začne s kodonom ATG na mestu 44 in konča s kodonom TAG na mestu 833. Na 3' koncu je 131 nukleotidov dolga regija, ki se ne prevaja in vsebuje poliadenilacijski signal in poli A rep (Slika 1). Protein LIN1 ima vseh 16 ohranjenih cisteinskih ostankov, ki so značilni za vse PR-5 proteine in so pomembni za protiglivno aktivnost. *LINI* cDNA kodira preprotein, ki se kasneje procesira v zrel protein z odstranitvijo N-terminalnega signalnega peptida. Genska družina *LINI* se v genomu lanu nahaja v nekaj kopijah, geni pa so brez intronov (Anžlovar in sod., 2006).

Protein LIN1 ima N-terminalni signalni peptid iz 24 aminokislinskih ostankov in ojačani C-terminalni signalni peptid iz 30 aminokislinskih ostankov. Napovedana molekulska masa zrelega LIN1 je 23 kDa (Anžlovar in sod., 2006). Primerjava aminokislinskega zaporedja LIN1 z N-terminalnim zaporedjem linusitina iz lanu je pokazala neujemanje 11 od 37 aminokislinah (Borgmeyer in sod., 1992). S primerjavo prvih petih AK N-terminalnega dela LIN1 iz kalčkov in linusitina so Anžlovar in sodelavci (2006) potrdili, da gre za dva različna osmotinska proteina.

Izražanje gena za LIN1 je tkivno specifično. V zdravih koreninah se izraža konstitutivno ne glede na starost rastline, pri mladih rastlinah (~5 dni) pa se izraža tudi v nadzemnih delih. Pri starejših rastlinah izražanja gena *LINI* v nadzemnih delih niso zasledili (Anžlovar in sod., 2006).

[1] aattctcatgagctaaagtatccccttaattactacccaaatcatgaccactttccatt
 (1) M T H F P I
 ttgctcatccccttgttttcctccttgctactttgggtctccatcaccaatgcagctgtg
L L I P L F S S L L L W V S I T N A A V
 attgacatcttcaacaactgtccttacacagctctgggcagcttccacgcccattggtggc
 I D I F N N C P Y T V W A A S T P I G G
 ggtcgtcaactcgaccacggacaaacatggaccatctaccctcccgtggaacttcaatg
 G R Q L D H G Q T W T I Y P P A G T S M
 gcccgcatgtggggccgcccgaattgcaactttgatggcagcggtaggggtggtgcgag
 A R I W G R R N C N F D G S G R G W C E
 actggcgattgtggtgggtcctcaactgtcagggttgggtgtcccgccgaactccta
 T G D C G G V L N C Q G W G V P P N T L
 gctgagtacgcccttaaccaattctcgaatttggacttctacgacatatcgttggtggac
 A E Y A L N Q F S N L D F Y D I S L V D
 gggttcaacattcctatgatcttccccccacggcacaacgtgggttcaggtaactgccag
 G F N I P M I F T P T A N V G S G N C Q
 agcctaacttgacggctgacatcaacacacagtgccctggtgagttgcccggccccgggc
 S L T C T A D I N T Q C P G E L R A P G
 gggtgcaacaacccttgtagcgtgttcaagaccaatgagattgttgactcaggggtac
 G C N N P C T V F K T N E Y C C T Q G Y
 gggacttgccgtccgactggattttcaagattctttaaggataggtgtccgacttcttat
 G T C G P T G F S R F F K D R C P T S Y
 agttaccctcaggacgatccaagcagtagcttccacttgccccggcggtaccaactataga
 S Y P Q D D P S S T F T C P G G T N Y R
 gtggtgttttgcccctatggctctactcatcntgacatcgacaccaacaacaacaacaat
 V V F C P Y G S T H X D I D T N N N N N
 aacaacaagaatgtgacgttggctatgggtgaccgagaagatcaattctgagtagacttat
 N N K N V T L A M V T E K I N S E * (263)
 taaaacaatgtaatgttgtttatgaagaaaaagaaggcgattgcttccagctgtatcaat
 gtgtcaaanagttgatgatgaaatgagaaataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
 aa [964]

Slika 1: Nukleotidno zaporedje LIN1 cDNA in izpeljano aminokislinsko zaporedje (Anžlovar in sod., 2006)

2.2 LIPOSOMI

Liposomi so vezikli, pri katerih je vodni volumen popolnoma obdan z membrano, sestavljeno iz lipidnih molekul (ponavadi fosfolipidov). Liposomi, oziroma skupine veziklov, velike od nekaj deset nanometrov do nekaj deset mikrometrov v premeru, spontano nastajajo, če so lipidne molekule razpršene v vodnem mediju. V notranjost liposomov, kot tudi v njihovo membrano lahko vključimo različne snovi. Pomen liposomov kot modelnih membranskih sistemov izhaja iz dejstva, da lahko liposome sestavimo iz naravnih sestavin, tako da liposomske membrane oblikujejo dvoplastne strukture, ki so načeloma enake lipidnemu delu naravnih celičnih membran. Podobnost med liposomskimi in naravnimi membranami lahko povečamo s kemičnimi spremembami liposomske membrane. Tako spremenjene liposomske membrane lahko uporabljamo na različnih področjih. S posnemanjem obnašanja naravnih membran in njihovega razgrajevanja jih lahko zelo varno in učinkovito uporabljamo v medicini. Liposomi pa so lahko sestavljeni tudi iz popolnoma umetnih sestavin, s katerimi izboljšamo njihove kemične lastnosti (New, 1990; Garrett in Grisham, 1995).

Liposomi so zelo dober sistem za preučevanje spojin, ki permeabilizirajo membrane. Njihova prednost pred naravnimi membranami je v tem, da lahko izbiramo sestavine, ki gradijo liposomsko membrano. Tako lahko preučujemo posamezne dejavnike, od katerih je odvisna prepustnost neke snovi (Anžlovar, 1997).

Naslednja prednost je, da lahko v notranjost liposomov vključimo različne snovi. Lipidne vezikle, napolnjene s fluorescentnim barvilom, tako uporabljamo za preverjanje sposobnosti prepuščanja raznih toksinov, peptidov, proteinov in ostalih spojin (Menestrina, 1988, Forti in Menestrina, 1989, Menestrina in sod., 1989, Pederzoli in sod., 1991, Belmonte in sod., 1993, Matsuzaki in sod., 1995). Liposomi so zelo dober sistem za preverjanje hipotez postavljenih na podlagi rezultatov različnih testov z naravnimi sistemi, kot so npr. protiglivni test ali testi hemolitične aktivnosti. Matsuzaki in sod. (1995) so z izbrano sestavo liposomske membrane dokazali, da je hemolitična neaktivnost protimikrobnega peptida magainina posledica odsotnosti kislih fosfolipidov v zunanem sloju eritrocitne membrane in prisotnosti velike količine holesterola.

Steroli so vključeni v delovanje protiglavnih spojin, vendar pa njihova vloga ni ključna, ampak le modificirajo njihovo aktivnost. Raziskave vpliva linusitina na prepustnost liposomskih membran so pokazale, da je za delovanje tega proteina zelo pomembna vključitev sterolov v membrane, saj vključitev sterolov v liposomske membrane poveča aktivnost proteina (Anžlovar, 1997).

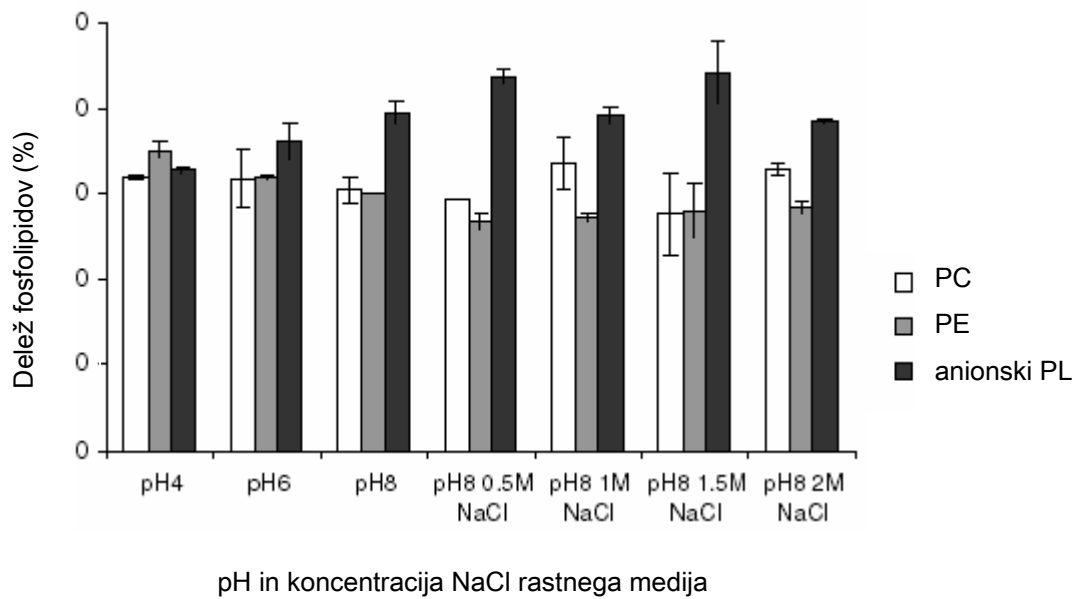
2.3 SESTAVA GLIVNIH MEMBRAN

2.3.1 *Debaryomyces hansenii*

Debaryomyces hansenii je halotolerantna kvasovka, ki živi v morski vodi (Norkrans, 1966; Prista in sod., 1997; Prista in sod., 2005; Thome, 2004; Thome-Oritz in sod., 1998). V morski vodi sta pomembna stresna dejavnika pH in slanost. Ker je *D. hansenii* v stiku s svojim okoljem tudi preko plazemske membrane, sta za njeno rast v slanem okolju pomembna sestava in fluidnost membrane. Na splošno fluidnost bioloških membran regulirajo tipi maščobnih kislin (dolžina, nasičenost in razvejanost), količina sterolov in narava fosfolipidov (Russell, 1989; Russell, 1989). Doslej dobljeni podatki kažejo, da pH in slanost vplivata na lipidno sestavo plazemske membrane kvasovke *D. hansenii*. Medtem ko rast v kislem pH, ki je kot stresni dejavnik redko prisoten v naravnih okoljih *D. hansenii*, povzroča zmanjšanje membranske fluidnosti, bazičen pH in/ali visoka slanost, ki sta značilna za morsko vodo, na fluidnost nimata večjega vpliva (Turk in sod., 2007). Spremembe fluidnosti so posledica sprememb v lipidni strukturi in/ali sestavi membrane (fosfolipidi, steroli in maščobne kisline) (Russell, 1989; Russell in sod., 1995).

Celotne lipide so iz plazemske membrane ekstrahirali z mešanico kloroform-metanol. Fosfolipide so ločili z enodimenzionalno tankoplastno tekočinsko kromatografijo (TLC) in kvantificirali s testi vsebnosti fosforja v ekstraktu (Kates, 1986; Turk in sod., 2004). V plazemski membrani *D. hansenii* sta prevladujoča fosfolipida fosfatidilholin (PC) in fosfatidiletanolamin (PE) v vseh rastnih razmerah (pH, slanost), sledijo jima anionski fosfolipidi fosfatidilinozitol (PI), fosfatidilserin (PS), fosfatidilglicerol (PG) in sfingolipid (SP), deleži katerih pa se spreminjajo s spreminjanjem rastnih razmer (Slika 3 in

Preglednica 1) (Tunblad-Johansson in sod., 1987). pH rastnega medija ima značilen vpliv na vsebnost anionskih fosfolipidov, ki se zmanjšuje in PE, ki narašča s padajočim pH. Po drugi strani pa pH težko vpliva na vsebnost PC. Spremembe pH vplivajo tudi na kemijski status fosfolipidov (Hazel in sod., 1990), razen na PC in PE (Turk in sod. 2004).

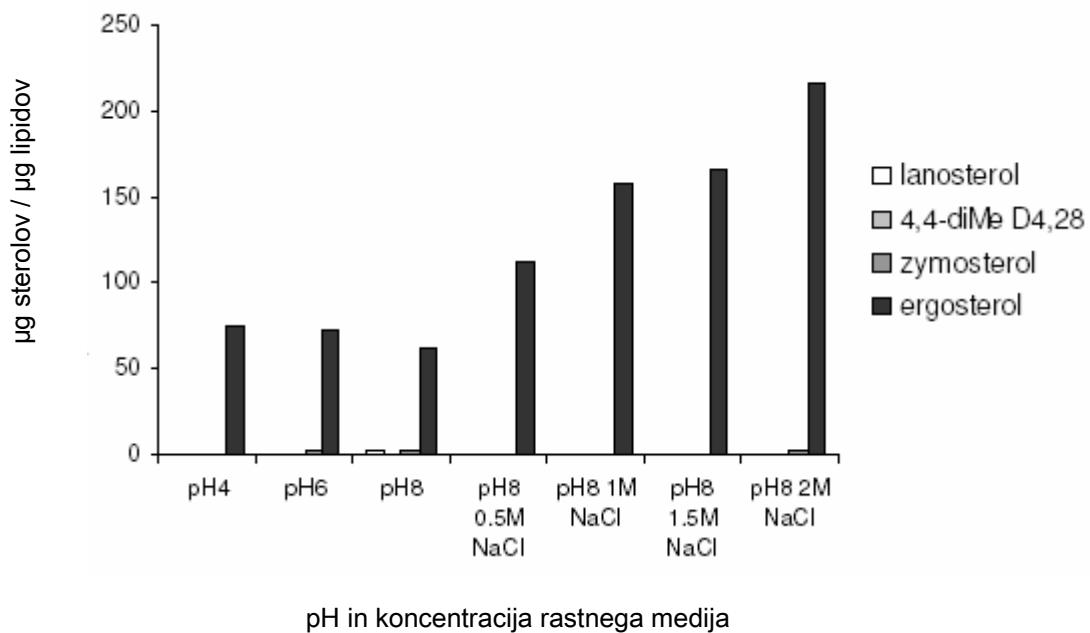


Slika 2: Vpliv pH in NaCl na delež membranskih fosfolipidov glive *D. hansenii* (Tunblad-Johansson, 1987)

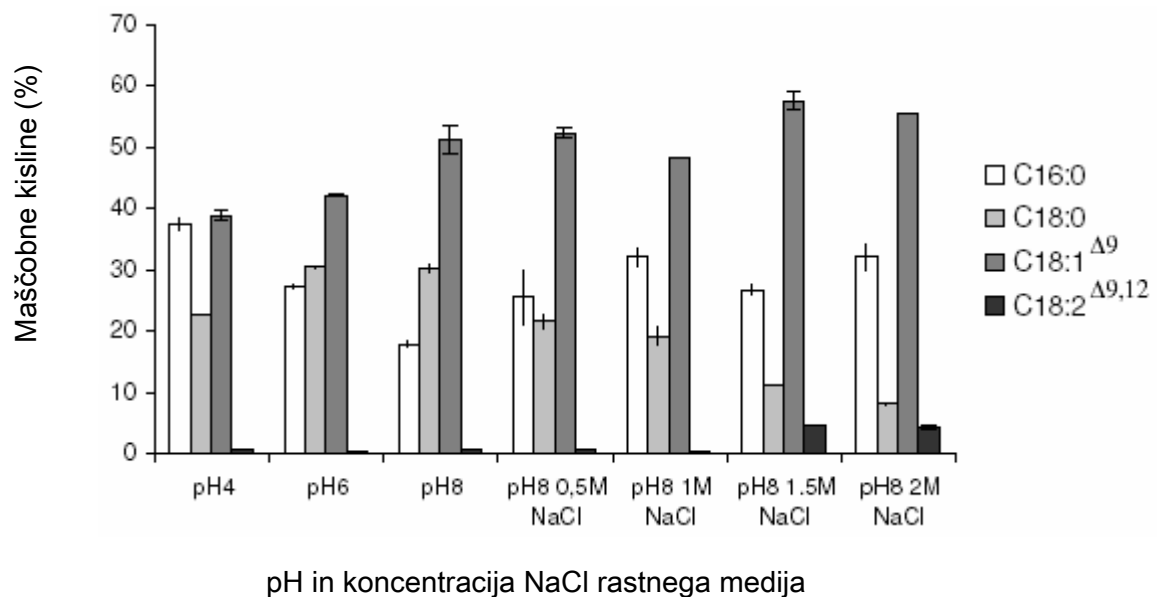
Preglednica 1: Delež anionskih fosfolipidov v celični membrani glive *D. hansenii* rastoči v različnih rastnih razmerah (Tunblad-Johansson, 1987)

Rastni medij	Delež anionskih fosfolipidov (%)			
	SP	PI	PS	PG
pH 4	1.56±0.00	5.47±0.09	3.75±0.14	7.22±0.36
pH 6	2.0±0.24	7.42±0.01	5.68±0.10	5.73±0.06
pH 8	0.91±0.23	9.31±0.13	4.2±0.08	4.03±0.80
pH 8, 0.5 M NaCl	1,32±0.00	8.81±0.03	10.69±0.07	4.69±0.18
pH 8, 1 M NaCl	1.12±0.00	7.11±0.02	10.21±0.03	3.8±0.05
pH 8, 1.5 M NaCl	0.00±0.00	3.8±0.21	3.02±0.90	8.67±0.99
pH 8, 2 M NaCl	0.00±0.00	2.71±0.00	1.82±0.02	11.08±0.01

Sestavo sterolov in maščobnih kislin plazemske membrane so določili in kvantificirali s plinsko kromatografijo povezano z masno spektrometrijo (GC-MS) (Turk in sod., 2004). Glavni sterol je bil ergosterol s sledovi lanosterola, zimosterol in 4,4-dimetilholesta-4,24-dien-3 β -ol (Slika 3.). Količina ergosterola v membranah rahlo narašča s padajočim pH. V evkariontskih organizmih je značilna lastnost plazemske membrane razmerje med sterolom in fosfolipidom. Pri *D. hansenii* padec pH-ja poveča to razmerje. Prav tako imajo spremembe v sestavi membranskih maščobnih kislin velik vpliv na fluidnost bioloških membran (Russell, 1989). Profil maščobnih kislin *D. hansenii* je prikazan na sliki 4. Največ je oleinske (C18:1 Δ^9), palmitinske (C16:0) in stearinske (C18:0) kisline z linoleično (C18:2 $\Delta^9,12$) kislino v majhnih količinah (Tunblad-Johansson, 1987). Nizek pH zmanjša količino maščobnih kislin in rahlo skrajša acilne verige, kar zmanjša fluidnost membrane. *D. hansenii* ni acidofilna kvasovka (Turk in sod., 2007).



Slika 3: Količina sterolov v plazemski membrani glive *D. hansenii* rastoče pri različnih rastnih razmerah (Turk in sod., 2007)



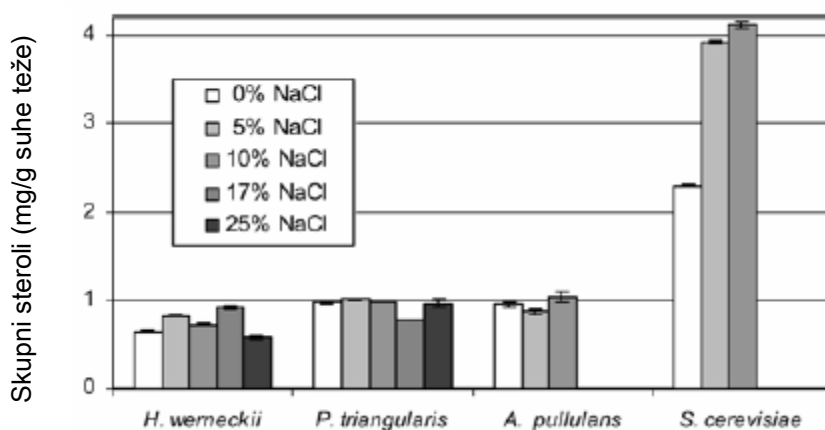
Slika 4: Profil maščobnih kislin celične membrane glive *D. hansenii* v odvisnosti od rastnega medija (Turk in sod., 2007)

2.3.2 *Hortaea werneckii* in *Saccharomyces cerevisiae*

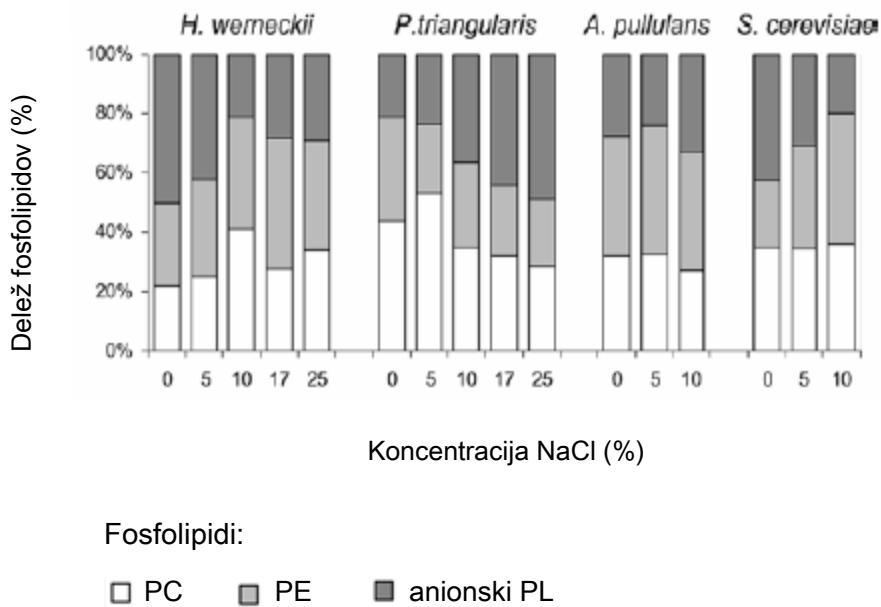
Hortaea werneckii je halofilna melanizirana kvasovkam podobna gliva. Njeno naravno okolje so soline, kjer raste pri koncentracijah NaCl od 0 pa do 32 %.

Turk in sod. (2004) so sterole *H. werneckii* identificirali z GC-MS. Med steroli prevladuje ergosterol, ki predstavlja kar 25 – 61 % vseh sterolov. Poleg njega so identificirali še 23 sterolov, večina med njimi ima metilno substituento na C-24. Njihova skupna količina se pri *H. werneckii* ni spreminjala skladno z naraščajočo koncentracijo NaCl, kar je v nasprotju z na sol občutljivo kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*, ki so jo uporabili kot referenčni sev. Tej kvasovki povečana koncentracija soli pomeni stres, zato močno naraste koncentracija sterolov (Slika 5).

Prevladujoča fosfolipida pri vseh glivah sta (PC) in (PE), sledijo jima anionski fosfolipidi fosfatidilinozitol (PI), PS, kardiolipin (CL), fosfatidna kislina (PA) in PG. V primerjavi s *S. cerevisiae* različne koncentracije soli nimajo večjega vpliva na spremembe fosfolipidne strukture pri melaniziranih kvasovkam podobnih glivah. Pri povečani slanosti pri *H. werneckii* naraste količina PC in PE, pri *S. cerevisiae* pa je pri 10 % NaCl (w/v) delež PE dvakrat večji kot pri 0 % NaCl (w/v) (Turk in sod., 2004).

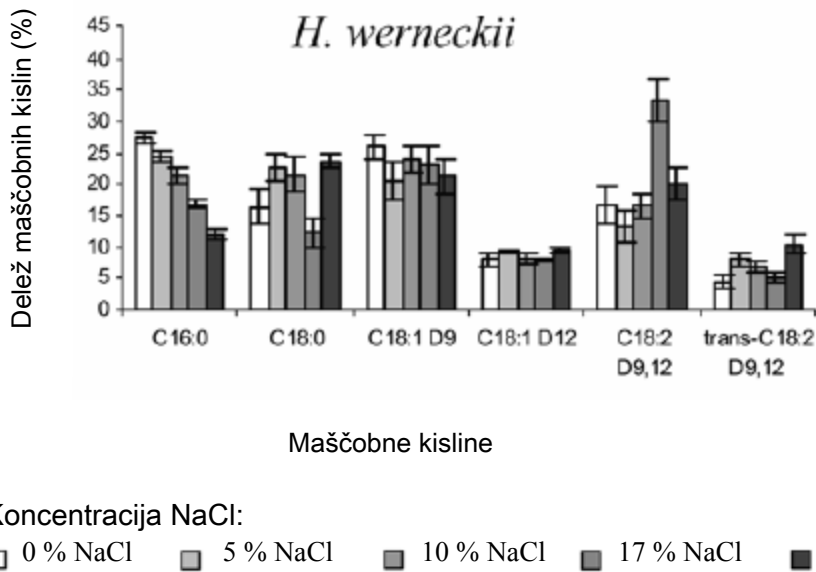


Slika 5: Celotna količina sterolov v membranah glivnih celic rastočih pri različnih koncentracijah NaCl (Turk in sod., 2004)

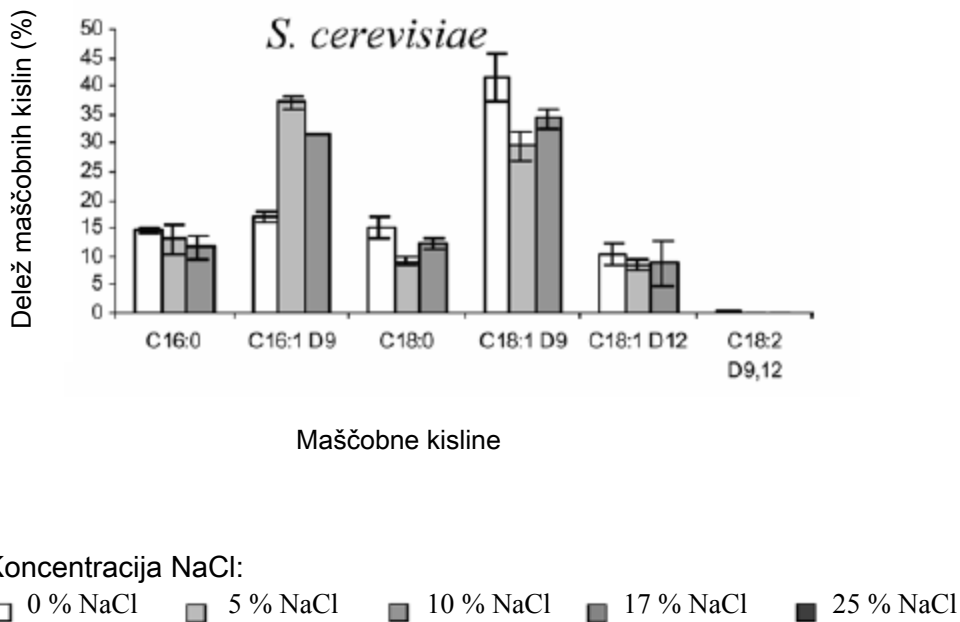


Slika 6: Delež membranskih fosfolipidov halofilnih in halotolerantnih melaniziranih kvasovkam podobnih gliv rastočih pri različnih koncentracijah NaCl (Turk in sod., 2004)

Turk in sod. (2004) so proučevali kako stres na račun povišanih koncentracij NaCl vpliva na spremembo sestave fosfolipidnih maščobnih kislin. Glavne maščobne kisline pri glivah so bile *cis*-heksadekanoična kislina (C16:0), *cis*-oktadekanoična kislina (C18:0), *cis*-9-oktadekanoična kislina (C18:1^{Δ9}), *cis*-12-oktadekanoična kislina (C18:1^{Δ12}), *cis*-9,12-oktadekandienoična kislina (C18:2^{Δ9,12}) in *trans*-9,12-oktadekandienoična kislina (*trans*-C18:2^{Δ9,12}). V referenčnem sevu *S. cerevisiae* so bile *cis*-C18:2^{Δ9,12} prisotne le v sledovih, *trans*-C18:2^{Δ9,12} pa niso zaznali. Stres na račun povišanih koncentracij NaCl vpliva na sestavo fosfolipidnih maščobnih kislin. Pri *H. werneckii* se pri povečani slanosti zmanjša C16:0 hkrati pa se poveča *cis*-C18:2^{Δ9,12}. Pri *S. cerevisiae* pa sol zmanjša delež C18:1^{Δ9} ob hkratnem povečanju C16:1^{Δ9}. Profil maščobnih kislin je prikazan na sliki 7 in 8.



Slika 7: Relativni delež fosfolipidnih maščobnih kislin v celični membrani glive *H. werneckii* rastoče pri različnih koncentracijah NaCl (Turk in sod., 2004)



Slika 8: Relativni delež fosfolipidnih maščobnih kislin v celični membrani glive *S. cerevisiae* rastoče pri različnih koncentracijah NaCl (Turk in sod., 2004)

Vse halofilne glive vzdržujejo razmerje med steroli in fosfolipidi na značilno nižji ravni kot na slanost občutljiva *S. cerevisiae*. Pri *H. werneckii* je plazemska membrana zelo fluidna skozi širok razpon koncentracij NaCl, kar je posledica nizkega razmerja med steroli in fosfolipidi in povečane količine nenasičenih maščobnih kislin. To pomeni, da je *H. werneckii* resnično visoko tolerantna na povišano koncentracijo NaCl, zaradi česar je lahko dominantna v hiperslanih solinskih vodah (Gunde-Cimerman in sod., 2000).

2.4 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Na osnovi rezultatov delovanja linusitina na umetne membrane, glivo *Alternaria alternata* in znanih struktur celičnih membran različnih patogenih gliv, smo preizkusili dejansko protiglivno aktivnost izoliranega proteina LIN1.

V skladu s predhodnimi rezultati z linusitinom na umetnih lipidnih membranah smo predvidevali, da bo LIN1 deloval podobno proti glivam, katerih celične membrane vsebujejo sterole in da se bo aktivnost razlikovala glede na tip vključenih sterolov.

Glede na razlike v aminokislinskem zaporedju in nekoliko drugačnih biokemijskih parametrov, npr. izoelektrični točki, bi bilo delovanje proteina LIN1 lahko tudi povsem drugačno. V tem primeru bi tudi potencialna fiziološka vloga LIN1 lahko bila drugačna, kot je predvidena za osmotine.

Poleg gliv *A. alternata* in *S. cerevisiae* smo izbrali halofilni glivi *H. werneckii* in *D. hansenii* zato, ker je znan, da modificirata celično membrano v odvisnosti od spreminjanja koncentracije soli v rastnem okolju, kar jima omogoča preživetje v slanem okolju.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PROTEIN LIN1

Protein Lin1 so predhodno izolirali v Laboratoriju za eksperimentalno botaniko Katedre za botaniko na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Končno čiščenje so izvedli z gelsko kromatografijo na HPLC. V sledečih poskusih smo testirali njegovo domnevno protiglavno delovanje. Za testiranje smo izbrali 4 kromatografske frakcije (10, 11, 12, 13), za katere so predhodne analize pokazale, da vsebujejo protein LIN1.

3.2 GLIVNI MATERIAL

3.2.1 Glivni sevi in gojitev

Za poskuse smo izbrali glive, ki so shranjene v Mikrobiološki zbirki EX Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Gliva *Saccharomyces cerevisiae* MZKI K86 je dobro raziskana in nam je služila kot kontrola. *Hortaea wernecki* (MZKI B736) je črna kvasovka, izolirana iz slane vode sečoveljskih solin, *Debaryomyces* (EXF-1951) pa je bila pridobljena iz Nizozemske (CBS).

Glive smo najprej precepili na sveže plošče z gojiščem MEA (Malt Extract Agar), jih en teden inkubirali na sobni temperaturi, nato pa pripravili predkulture v 10 ml tekočega gojišča YNB (Yeast Nutrient Broth) in jih inkubirali na stresalniku pri 180 obratih/minuto.

3.2.2 Priprava gojišč

Gojišče YNB – za 100 ml

- 0,67 g (NH₄)₂SO₄ (Q-BIO gene)

- 2 g glukoze
- 100 ml dH₂O
- pH = 7,0

Avtoklaviramo 15 minut pri 121 °C.

Gojišče MEA – za 1000 ml

- 20 g Malt extract (Merck)
- 1 g pepton (Difco)
- 20 g glukoze (J.T.)
- 20 g agarja (Biolife)
- 1000 ml dH₂O

Avtoklaviramo 15 minut pri 121 °C in še vroče razlijemo na plošče in pustimo, da se strdi.

3.2.3 Štetje celic s števno komoro (hemocitometrom)

Po 200 µl predkulture *S. cerevisiae* in *D. hansenii* smo precepili v 10 ml svežega gojišča YNB in inkubirali dva dni na stresalniku pri 180 obratih/minuto. Po inkubaciji smo po 1 ml vsake kulture odpipetirali na male petrijeve plošče in v mikrocentrifugirke. Delali smo v paralelkah, ker nam je po ena plošča oz. mikrocentrifugirka služila kot kontrola (K), v drugo (V) pa smo dodali po 20 µl proteina LIN1 (HPLC frakcija 12) s koncentracijo 200 µg/ml. Vse štiri plošče in mikrocentrifugirke smo inkubirali na stresalniku pri 50 rpm dva dni. Po inkubaciji smo vsak vzorec redčili 10-krat in 100-krat ter celice prešteli s števno komoro (Hemocytometer Bright Line Neubauer). Število celic smo izračunali po formuli:

$$N/ml = \bar{x} + 25 \times 10000 \times \text{faktor redčenja}$$

\bar{x} je povprečno število celic

N je število celic na mililiter

3.2.4 Določanje števila celic, ki tvorijo kolonijo (CFU-Colony forming units)

Celice *S. cerevisiae* iz plošč in mikrocentrifugirk in celice *D. hansenii* iz plošč smo redčili s fiziološko raztopino do 10^{-5} in po 10 μ l redčitve 10^{-4} in 10^{-5} nacepili z razmazovanjem na gojišče MEA.

Vsako redčitev smo nacepili na dve plošči. Plošče smo inkubirali 3 dni v inkubatorju pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije, pri čemer smo upoštevali, da so številne samo tiste plošče na katerih je zraslo od 30 do 300 kolonij.

3.2.5 Protoplastiranje kvasovke *S. cerevisiae*

Celice (100 ml, gojene na YNB pri 28 °C) smo poželi v sredini eksponentialne faze (optična gostota OD=1,5), jim s centrifugiranjem pri 4000 obratih/minuto, temperaturi 25°C, odstranili gojišče in jih še enkrat sprali s pufrom OS (0,05 M jantarna kislina, 1 M NaCl, pH 5,5 uravnan z NaOH). Sledila je priprava protoplastov: 0,51 g celic smo resuspendirali v 8,25 ml pufra OS in dodali 0,75 ml encima Glucanex ter prenesli v 100 ml sterilno erlenmajerico. Ob rahlem stresanju (50 obratih/minuto) smo celice inkubirali 4 ure pri T 25 °C (v stresalniku Innova). Po inkubaciji smo protoplastom dodali 40 ml pufra OS in jih nato sedimentirali s centrifugiranjem pri 2500 obratih /minuto, 10 minut pri temperaturi 4 °C. Po odlitju supernatanta smo jih še enkrat sprali s 40 ml pufra OS in še enkrat centrifugirali. Protoplaste v peletu smo nato resuspendirali v 1,8 ml pufra OS v centrifugirki Falcon in jih prešteli pod mikroskopom. Nato smo po 1 ml protoplastov porazdelili v dve 50 ml erlenmajerici, ena nam je služila kot kontrola, v drugo pa smo dodali 20 μ l proteina LIN1 (HPLC frakcija 12). Inkubirali smo na stresalniku pri 50 obratih/minuto na sobni temperaturi. Po eni, treh in sedemnajstih urah smo vzorce redčili v pufro OS (0,1 ml vzorca in 0,9 ml pufra) in jih prešteli pod mikroskopom.

3.2.6 Protoplastiranje kvasovke *H. werneckii*

Postopek je enak kot pri *S. cerevisiae*, le da smo uporabili dva encima: 0,75 ml encima Glucanex in 20-30 mg Caylase (raztopljene v 1 ml pufra OS). Po inkubaciji smo protoplaste prefiltrirali skozi Miracloth (Calbiochem) v 50 ml Falcon centrifugirko, dodali 40 ml pufra OS in jih nato sedimentirali s centrifugiranjem pri 2500 obratih/minuto, 10 minut pri 4 °C. Po odlitju supernatanta smo jih še enkrat sprali s 40 ml pufra OS, jih še enkrat prefiltrirali preko Miracloth in jih še enkrat sцентрифугirali. Dodali smo 50 µl proteina (HPLC frakcija 12) in domnevno protiglivno delovanje kontrolirali po dveh in po šestnajstih urah.

3.2.7 Barvanje protoplastov *S. cerevisiae*

Protoplaste smo barvali z metilenskim modrilom in jih prešteli pod mikroskopom. Tako smo razlikovali med nepoškodovanimi protoplasti in protoplasti z morebitno poškodovano membrano.

3.3 MERJENJE DELOVANJA LIN1 NA LIPOSOME

3.3.1 Priprava liposomov

Liposome smo pripravili iz fosfolipidov kot glavnih strukturnih elementov bioloških membran. Fosfatidilholin smo uporabili kot osnovni fosfolipid v liposomih. Je nevtralen nabit in kemično inerten. Fosfatidilserin je negativno nabit fosfolipid.

3.3.1.1 Multilamelarni vezikli (MLV)

Uporabili smo že pripravljene MLV z razmerjem fosfatidilholin (DPPC) : fosfatidilserin (DPPS) = 2 : 1.

MW (DPPC) = 734,05

MW (DPPS) = 757,96

Začetna koncentracija fosfolipidov je bila 4 mg/ml.

a) Lipide raztapljamo v hladilniku, da kloroform oz. metanol ne hlapita tako močno. To bi povzročilo napako v razmerju končne mešanice lipidov. Založna raztopina za fosfatidilholin (PC) (lipidi + kloroform) je 20 mg/ml.

Založna raztopina za fosfatidilserin (PS) (lipidi + kloroform + metanol) je 20 mg/ml (kloroform : metanol = 3 : 1); PS se slabo topi le v kloroformu.

b) Odpipetiramo ustrezen volumen obeh založnih raztopin in jih zmešamo v bučki. Posušimo na rotavaporju (3 ure pri sobni temperaturi).

c) V bučko damo pufer in steklene kroglice.

Priprava pufera: 1,24 g kalceina (fluorescentno barvilo) raztopimo v 20 ml deionizirane vode, dodamo 800 μ l 10 M NaOH in dopolnimo z vodo do 25 ml. Mešamo 5-10 min na magnetnem mešalu. Vorteksiramo tako dolgo, da na stenah bučke ni več videti lipidnega filma (~0,5 minut). Vsebino bučke odpipetiramo v svežo mikrocentrifugirko. Preprihano z dušikom, da preprečimo oksidacijo lipidov in shranimo pri -20 °C.

Kalcein je fluorescentno barvilo, ki ga pogosto vključujemo v notranjost liposomov. Fluorescira v nizkih koncentracijah (v pufru), v prevelikih koncentracijah (v liposomih) pa zavira fluorescenco. Pri nevtralnem pH ima negativen naboj, medtem ko je pri pH, nižjem od 3, nevtralen. Njegova relativna fluorescenca je odvisna od pH in koncentracije NaCl.

3.3.1.2 Veliki unilamelarni vezikli (LUV)

— Faza zamrzovanja in odtajanja

Izmenično zamrzujemo MLV v tekočem dušiku 8 x 15 sekund in odtajamo v vroči vodi približno 3 minute.

— Ekstrudiranje:

Iztiskanje MLV-jev skozi membrano s 100 nm velikimi porami (31-krat). S tem določimo velikost veziklov. Vezikle lahko hranimo več mesecev pri 4 °C.

— Odstranitev odvečnega kalceina iz okolice LUV:

Uporabimo minikolono z gelom Sephadex G-50 medium. Odpipetiramo 50 µl LUV s pufrom in centrifugiramo 1 minuto pri 1200 rpm. Čisti LUV se izločijo s prostim volumnom, t.j. volumnom topila med gelskimi kroglicami. Kalcein ostane v minikoloni.

3.3.2 Priprava kolon

Kolono smo napolnili z gelom Sephadex G-50 medium, ga sprali s pufrom (20 mM Na-acetat, pH 5,0), da smo odstranili etanol in dosegli primerno gostoto gela (da se obnaša kot vzmet, kar dosežemo z izmeničnim spiranjem s pufrom in centrifugiranjem 1 minuto pri 1200 obratih/minuto). Običajno je Sephadex v prahu in ga je potrebno namočiti v pufri, da nabrekne, mi pa smo imeli že pripravljenega v etanolu v hladilniku.

3.3.3 Merjenje aktivnosti proteinov na LUV

3.3.3.1 Material

- Črna mikrotitrna plošča s 96 jamicami z ravnim dnom (Costar)
- Spektrofluorometer Tecan (ekscitacijska svetloba – 485 nm, emisijska svetloba 535 nm, program Mageran)
- Puffer (20 mM Na-acetat + 2mM EDTA pH 5,0)
- 0,1 % BSA (goveji serumski albumin)
- 1 % Triton X-100

3.3.3.2 Postopek

V vsako jamico na mikrotitrski plošči smo odpipetirali 250 µl 0,1 % BSA in inkubirali 30

minut pri sobni temperaturi. V tem času se BSA veže popolnoma nespecifično z elektrostatskimi vezmi na stene mikrotitrne plošče in zakrije morebitna nespecifična vezavna mesta za LIN1 in tako prepreči vezavo proteina na stene jamic mikrotitrne plošče. Vmes smo pripravili redčitve LUV (5 μ l LUV + 1 ml pufra) in redčitve vzorcev (20 μ l proteina LIN1 (HPLC frakcija 11 oz. 12) + 80 μ l pufra).

Potrebne meritve fluorescence (končna prostornina v jamici je 205 μ l):

- Meritev začetne fluorescence ($F_{\text{zač}}$)
(LUV v pufru) - 100 μ l
- Meritev max. fluorescence (F_{max})
(100 μ l LUV v pufru + 100 μ l proteina) – 200 μ l
- Meritev končne fluorescence ($F_{\text{konč}}$)
(LUV v pufru + protein v pufru + 5 μ l 1 % Triton X-100) – 205 μ l

Stopnjo permeabilizacije (P) smo izračunali po formuli:

$$P(\%) = (F_{\text{max}} - F_{\text{zač}}) / (F_{\text{konč}} - F_{\text{zač}}) \times 100$$

3.4 PROTIGLIVNO DELOVANJE

Glivo *Alternaria alternata* smo cepili na krompir-glukozni agar (Potato Dextrose agar), ki smo ga avtoklavirali in prelili v petrijevke. Glivo smo cepili na 5 plošč tako, da smo izrezali košček glive skupaj z gojiščem in ga položili na novo ploščo (agar na agar). Inkubirali smo 6 dni v komori pri temperaturi 25 °C. Na dve plošči, kjer je gliva zrasla najbolj lepo v krogu s premerom 5 – 6 cm, smo po inkubaciji položili sterilne okrogle diske namočene (a) s pufrom (20 mM Na-acetat pH 5,0) ali (b) različnimi vzorci proteina LIN1. Plošče smo inkubirali 5-7 dni, v temi, pri temperaturi 25 °C.

Gojišče krompir-glukozni agar (Potato Dextrose agar) – za 200 ml:

- 4 g agarja (Becton Dickinson Microbiology)
- 200 ml dH₂O

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE ŠTEVILA CELIC

4.1.1 *S. cerevisiae* in *D. hansenii*

Pred inkubacijo s proteinom je bilo pri *S. cerevisiae* $3,4 \times 10^7$ celic/ml, pri *D. hansenii* pa $18,5 \times 10^7$ celic/ml. V prisotnosti proteina se število celic ni zmanjšalo (Preglednica 2).

Preglednica 2: Število celic gliv *S. cerevisiae* in *D. hansenii* na mililiter po dvodnevni inkubaciji s proteinom LIN1

	<i>S. cerevisiae</i>		<i>D. hansenii</i>	
	Kontrola	LIN1	Kontrola	LIN1
Plošče	$7,6 \times 10^7$	8×10^7	$2,6 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
Mikrocentrifugirke	$5,4 \times 10^7$	$5,9 \times 10^7$	$2,4 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$

4.1.2 CFU (Colony Forming Units)

V prisotnosti proteina se število nastalih kolonij ni zmanjšalo, v primerjavi s kontrolo (Preglednica 3).

Preglednica 3: CFU kvasovk *S. cerevisiae* in *D. hansenii*

	<i>S. cerevisiae</i>		<i>D. hansenii</i>	
	Kontrola	LIN1	Kontrola	LIN1
Plošče	$6,9 \times 10^6$	$9,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$
Mikrocentrifugirke	$1,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	/	/

4.2 DELOVANJE PROTEINA NA PROTOPLASTE

4.2.1 *S. cerevisiae*

Pred inkubacijo s proteinom je bilo $9,7 \times 10^8$ protoplastov/ml. Število protoplastov se v prisotnosti proteina ni zmanjšalo (Preglednica 4).

Preglednica 4: Število protoplastov *S. cerevisiae* po 1, 3 in 17 urah inkubacije s proteinom LIN1

Inkubacija (h)	Kontrola (št. protopl./ml)	LIN1 (št. protopl./ml)
1 h	$8,8 \times 10^8$	1×10^9
3 h	$4,4 \times 10^8$	8×10^8
17 h	$7,5 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$

4.2.2 *H. werneckii*

Število protoplastov pred inkubacijo s proteinom je bilo 9×10^7 . Število protoplastov se v prisotnosti proteina ni zmanjšalo (Preglednica 5).

Preglednica 5: Število protoplastov *H. werneckii* po 2 in po 16 urah inkubacije s proteinom LIN1

Inkubacija (h)	Kontrola (št. protopl./ml)	LIN1 (št. protopl./ml)
2 h	$1,5 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$
16 h	$4,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$

4.2.3 Barvanje protoplastov *S. cerevisiae* z metilenskim modrilom

Z metilenskim modrilom lahko razlikujemo med poškodovanimi in nepoškodovanimi celicami, ker barvilo prodira le v celice s poškodovano membrano.

Število protoplastov pred inkubacijo s proteinom je bilo $1,2 \times 10^9$. Delež protoplastov se v prisotnosti proteina glede na kontrolo ni zmanjšal (Preglednica 6, 7).

Preglednica 6: Število neobarvanih in modro obarvanih protoplastov *S. cerevisiae* po 1 in 16 urah inkubacije s proteinom LIN1 prisotnim v HPLC frakcijah 11 in 12

Inkubacija (h)	Kontrola		HPLC frakcija 11		HPLC frakcija 12	
	Neobarv.	Obarvani	Neobarv.	Obarvani	Neobarv.	Obarvani
1 h	$2,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^7$	$9,2 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$	$7,2 \times 10^8$	0
16 h	$8,5 \times 10^7$	4×10^8	$2,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$

Preglednica 7: Delež nepoškodovanih protoplastov *S. cerevisiae* (%)

Inkubacija (h)	Kontrola (%)	HPLC frakcija 11 (%)	HPLC frakcija 12 (%)
1 h	94	97,3	100
16 h	17,5	50,6	60,7

4.3 MERJENJE AKTIVNOSTI PROTEINOV NA LUV

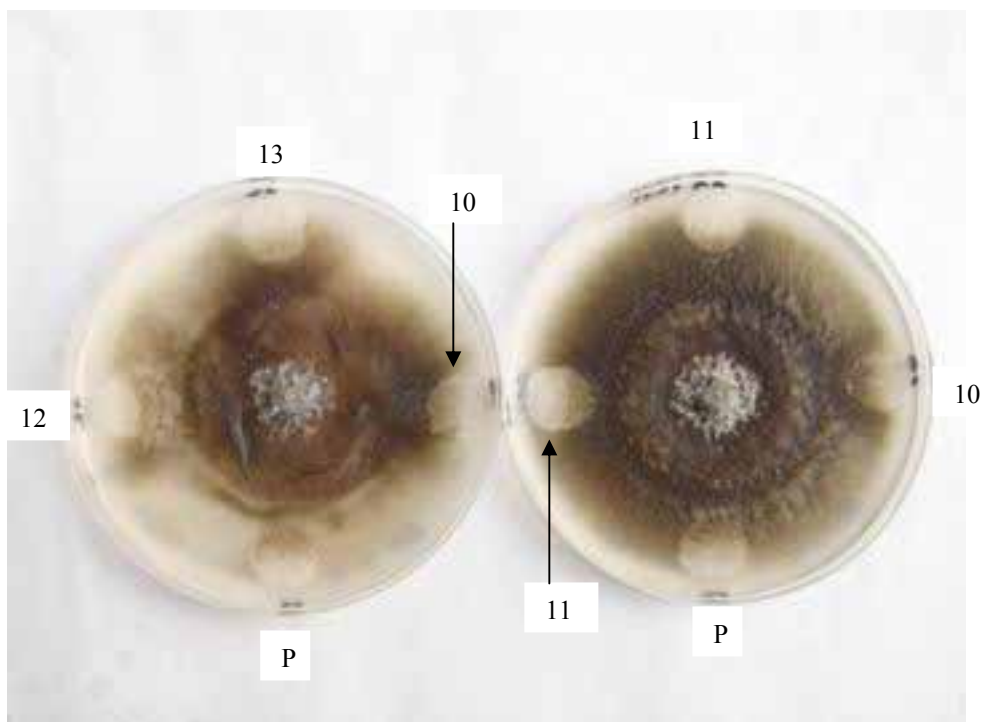
Dodatek proteina LIN1 v pufer, ki je vseboval liposome z vključenim kalceinom, ni povzročil sproščanja barvila iz liposomov, zato nismo zasledili povečane fluorescence (Preglednica 8).

Preglednica 8: Stopnja permeabilizacije (P) LUV

Fluorescenca (F)	Kontrola	HPLC frakcija 11	HPLC frakcija 12
Začetna meritev (nm)	19	275	285
Max. meritev (nm)	25	338	350
Končna meritev (nm)	26	1071	1010
P (%)	86	7	8

4.4 VPLIV PROTEINA NA RAST GLIVE *Alternaria alternata*

V obeh primerih, po dodatku pufra (P) in štirih HPLC frakcij (10, 11, 12, 13) v katerih se je nahajal protein LIN1, je gliva neovirano rasla naprej in prerasla celi plošči (Slika 9).

**Slika 9: Gliva *Alternaria alternata* po dodatku proteina LIN1 (HPLC frakcije 10, 11, 12, 13)**

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 LIN 1

Skupna lastnost PR-5 proteinov je njihovo protiglivno delovanje (Anžlovar in Dermastia 2003). Kristalna struktura številnih PR-5 proteinov je razkrila tiste dele molekul, ki naj bi bili odgovorni za protiglivno aktivnost (Batalia in sod., 1996; Koiwa in sod., 1999; Min in sod., 2004). Vsi PR-5 proteini z dokazanim protiglivnim delovanjem imajo kislno režo iz Glu85, Asp98, Asp103 in Asp186 (Anžlovar in Dermastia 2003). Ti ostanki so ohranjeni tudi v LIN1. Dodatna lastnost osmotinom podobnih proteinov, vključno z LIN1, je hidrofobna površina na robu kisle reže, ki jo tvorita dva fenilalaninska ostanka, Phe91 in Phe96 (Anžlovar in sod., 2006). Ta hidrofobna površina naj bi sodelovala v interakcijah med glivnimi in rastlinskimi celičnimi membranami (Koiwa in sod., 1999). Pri taumatinu, ki ne deluje protiglivno, sta ta dva fenilalaninska ostanka nadomeščena s tirozini (Ogata in sod., 1992; Koiwa in sod., 1999). Prisotnost kislne reže in fenilalaninskih ostankov pri LIN1 bi lahko pomenila, da protein deluje protiglivno. Poravnava aminokislinskega zaporedja LIN1 s sedmimi osmotinu podobnimi proteini je pokazala veliko podobnosti med temi proteini. Identičnost z osmotinu-podobnimi proteini je 72 -65 %, s taumatinom pa 53 %. Zelo visoka stopnja identičnosti (72 %) pa je med LIN1 in bazičnim proteinom OSML13 *Solanum commersonii*. Zaporedje N-terminalnih koncev LIN1 in linusitina iz lanu se razlikujeta v 11 AK od 37, kar daje 70 % identičnost (Anžlovar in sod., 2006). Za linusitin iz lanu so protiglivno delovanje že dokazali (Anžlovar in sod., 1998), zato smo glede na visoko stopnjo identičnosti med linusitinom in LIN1 pričakovali podobne rezultate tudi za LIN1. Izkazalo se je, da je zaradi majhne razlike v aminokislinski strukturi aktivnost teh dveh proteinov različna.

5.1.1 Protiglivno delovanje

Protiglivno delovanje proteina LIN1 smo testirali na štirih vrstah gliv, katerih strukture celičnih membran so dobro znane. Pričakovali smo, da bodo linusitinski proteini aktivnejši proti glivam, katerih celične membrane vsebujejo sterole in da se bo aktivnost

razlikovala glede na tip vključenih sterolov. V nasprotju z našimi pričakovanji, v nobenem primeru nismo zasledili protiglavnega delovanja.

Protiglavno delovanje linusitina je bilo do sedaj preizkušeno na dveh rodovih gliv: *Alternaria* in *Phytophthora* (Borgmeyer in sod., 1992). Rod *Alternaria* je zelo razširjen in vključuje pretežno saprofitske vrste, nekaj pa je tudi zajedalskih (Boedijn, 1978). *A. alternata* in *A. solani* spadata med zajedalce, med katerimi najdemo tudi zelo škodljive vrste za kmetijsko pomembne rastline. Rod *Phytophthora* vključuje pomemben rastlinski patogen, vrsto *P. infestans*, ki povzroča gnitje krompirjevih rastlin in lahko zelo zmanjša pridelek (Boedijn, 1978). Borgmeyer in sodelavci (1992) so testirali delovanje linusitina pri glivah *A. solani* in *P. infestans*. Rast prve glive je linusitin močno oviral, medtem ko na rast druge ni vplival. Anžlovar (1997) je v svoji magistrski nalogi uporabila glivo *A. alternata* in ugotovila, da linusitin zavira njeno rast. Vzrok odpornosti enega in neodpornosti drugega rodu proti delovanju linusitina pa razlaga s prisotnostjo sterolov v sestavi glivnih membran. Razporeditev membranskih sterolov sledi taksonomski razporeditvi gliv. Nižje glive sintetizirajo predvsem holesterol in/ali njegove C-24 alkilne in/ali alkilidenske derivate, ne vsebujejo pa ergosterola. Izjema med nižjimi glivami so oomicete, med katere spada tudi rod *Phytophthora*, ki sploh ne sintetizira sterolov (Hendrix, 1970). Odsotnost sterolov pri rodu *Phytophthora*, bi lahko pojasnila odpornost glive proti delovanju linusitina. Pri višjih glivah v glavnem prevladuje ergosterol, ki ga spremljajo različni C-28 steroli, ki so lahko intermediati v sintezi ergosterola in se razlikujejo le v številu in mestu dvojnih vezi (Weete, 1989).

Protiglavna aktivnost osmotina iz tobaka in zeamatina iz koruze je posledica prepustnosti glivne membrane zaradi interakcije med plazemsko membrano občutljive glive in domeno proteina, ki tvori pore (Roberts in Selitrennikoff, 1990; Abad in sod., 1996; Woloshuk, 1991). Plazemska membrana odpornih glivnih celic je tudi lahko tarča osmotina iz tobaka, ker so sferoplasti pridobljeni iz odpornih kvasnih celic dovzetni za citotoksični vpliv osmotinov tako kot sferoplasti iz občutljivih celic. Vendar pa so sferoplasti kvasovk odporni proti drugim osmotinu-podobnim proteinom, kar pojasni stroga specifičnost med protiglavnim proteinom in njegovo tarčno celico. Te ugotovitve izključujejo možnost, da se osmotin nespecifično vgradi v lipidni dvosloj plazemske membrane glive in vključujejo možnost obstoja membranskega receptorja za osmotin ali olajševalca njegove aktivnosti

(Yun in sod., 1997). Yun in sodelavci (1997) so dokazali aktivnost osmotina iz tobaka proti določenim sevom kvasovke *S. cerevisiae*. Domnevajo, da celična stena kvasovk, ki so odporne proti osmotinu, predstavlja fizično prepreko za osmotin, verjetno z zakrivanjem vezavnih mest za osmotin v plazemski membrani, medtem ko celična stena občutljivih vrst olajša vezavo osmotina in njegovo premestitev v membrano. Model vrstno specifične vezave osmotina je podprt z ugotovitvijo, da se osmotini in osmotinu-podobni proteini iz skupine PR-5 protiglavnih proteinov razlikujejo po svojih učinkovitostih proti specifičnim glivnim patogenom (Yun in sod., 1997; Abad in sod., 1996).

Delovanje proteina LIN1 smo testirali na kvasovkah *S. cerevisiae*, halotolerantni kvasovki *D. hansenii*, halofilni melanizirani kvasovkam podobni glivi *H. werneckii* ter na saprofitski glivi *A. alternata*. Vse te glive spadajo med višje glive, v celični membrani pa imajo prisotne sterole. *S. cerevisiae* je zelo dobro raziskana gliva, zato smo jo uporabili kot kontrolni sev.

Najprej smo morebitno delovanje LIN1 testirali s štetjem celic s števno komoro (hemocitometrom). Uporabili smo samo glivi *S. cerevisiae* in *D. hansenii*, ker smo imeli težave z gojitvijo *H. werneckii*, ker ta raste počasneje, večkrat pa nam tudi ni zrasla. Število celic se pri nobeni glivi ni zmanjšalo. Sestava celične stene *H. werneckii* je verjetno podobna *S. cerevisiae* (Montijn in sod., 1997). Da bi potrdili naš rezultat, smo določili še število celic, ki tvorijo kolonije CFU (Colony Forming Units). Tudi v tem primeru smo dobili enak rezultat. Vzrok za neobčutljivost celic na LIN1 bi lahko bila prisotnost celične stene, zato smo LIN1 testirali še na protoplastih. Odločili smo se za protoplastiranje *S. cerevisiae* in *H. werneckii*. Za *H. werneckii* je pomembno, da so celice v eksponentni fazi rasti, ker takrat še niso melanizirane in so zato bolj občutljive na encime, ki razgrajujejo celično steno. Po inkubaciji s proteinom LIN1 smo protoplaste barvali z metilenskim modrilom, ki omogoča razlikovanje med poškodovanimi in nepoškodovanimi protoplasti. Barvilo lahko prodre le v celice s poškodovano membrano in jih obarva modro, nepoškodovane celice ostanejo prozorne. Število protoplastov se v prisotnosti LIN1 ni zmanjšalo.

Tudi pri poskusu na glivi *A. alternata*, ki je rastlinski patogen, nismo dokazali aktivnosti proteina LIN1. Očitno ta protein ne deluje v smislu obrambe rastline pred patogenimi glivami, ampak je njegova naloga drugačna.

5.1.2 Delovanje na liposome

Morebitno permeabilizacijsko aktivnost LIN1 iz lanu smo testirali na umetnih membranskih modelih – liposomih. Za naš preizkus je sistem liposomov zelo primeren, saj ga lahko sestavimo iz naravnih sestavin, tako da liposomske membrane tvorijo dvoplastne strukture, ki so načeloma enake lipidnemu delu naravnih membran. Dodatek testne snovi v pufer, ki je vseboval liposome z vključenim kalceinom, ni povzročil sproščanja barvila iz liposomov, zato nismo zasledili povečane fluorescence v vzorcu. Če bi bil protein aktiven, bi se fluorescenca povečala za 50 % in več, naše meritve pa so pokazale komaj 7 % povečanje za kromatografsko frakcijo 11 in 8 % povečanje za frakcijo 12, zato lahko trdimo, da protein v tem smislu ni aktiven.

Anžlovar in sodelavci (1998) so testirali permeabilizacijsko delovanje linusitina na liposome. Ugotovili so, da je na permeabilizacijsko delovanje proteina zelo vplivala lipidna sestava veziklov. Protein je slabo ali sploh ni liziral nevtralnih PC veziklov. Z vključitvijo negativno nabitih fosfolipidov v membrano se je premosorazmerno aktivnost proteina povečala. Slaba aktivnost proteina na nevtralne PC vezikle sovpada z ugotovitvijo, da protein ni hemolitično aktiven. Zunanja plast eritrocitne membrane je namreč sestavljena izključno iz nevtralnih fosfolipidov, predvsem PC in sfingomielina (SM), medtem ko se kisli fosfolipidi, kot je PS, nahajajo v notranjem sloju (Verkleij in sod., 1973). Povečano aktivnost proteina na prepustnost membran z naraščanjem vsebnosti negativnega naboja so zasledili pri vseh mešanih lipidnih membranah. Med seboj so primerjali tri različne vezikle z negativno nabitimi fosfolipidi in dobili podobne rezultate, zato sklepajo, da negativen naboj igra ključno vlogo pri interakciji proteina z membrano in s tem vpliva na samo permeabilizacijsko aktivnost proteina. Izvor negativnega naboja oziroma izbor negativno nabitega fosfolipida pa le malo vpliva na litično aktivnost proteina.

Anžlovar (1997) ugotavlja, da je bila za delovanje proteina pomembna vrsta nevtralnega fosfolipida. Protein skoraj ni liziral nevtralnih PC veziklov, medtem ko se je aktivnost povečala pri nevtralnih mešanicah PC:PE veziklih. Vzrok za tako različno občutljivost za različne nevtralne fosfolipide bi lahko bila različna velikost fosfolipidne glave.

Fosfoholinska glava je precej večja od glave molekule PE, kar lahko vpliva na vezavo proteina na membrano (New, 1990).

Različna fosfolipidna sestava glivnih membran bi lahko skupaj z ostalimi dejavniki določala specifično protiglivno delovanje linusitina. Različna občutljivost določene glive na določene protiglivne proteine ali odpornost proti njim je znana (Borgmeyer in sod., 1992; Vigers in sod., 1992, Stintzi in sod., 1993) in bi lahko bila posledica različne sestave glivnih membran.

Rezultati z liposomskimi membranami so pokazali, da je za delovanje linusitina zelo pomembna vključitev sterolov v membrane. Glive, kot vsi ostali evkarionti, potrebujejo sterole za rast in/ali reproduktivni razvoj (Weete, 1989). Glavna vloga sterolov pa je sprememba fluidnosti membranskih lipidov (Demel in de Kruffyff, 1976). Do nje pride zaradi neposrednih interakcij med membranskimi steroli in acilnimi ostanki fosfolipidov ali tudi posredno, prek spremenjenega metabolizma fosfolipidov (dolžine acilne verige in stopnje nenasičenosti), na katerega ravno tako vplivajo steroli (Dahl in sod., 1980; Bloch, 1983). Dodatek holesterola umetnim ali naravnim membranam zmanjša prepustnost različnih topil. Po drugi strani pa so ugotovili, da npr. metilni steroli, kot je lanosterol, ne spremenijo prepustnosti v takem obsegu kot holesterol. Prav tako lahko različna količina ergosterola pri mešanih fosfolipidnih slojih vpliva na selektivnost za anione in katione. Prisotnost ali odsotnost holesterola lahko vpliva na aktivnost membranskih encimov, kot so Na^+ , K^+ -ATPaza in adenilat ciklaza v plazemski membrani in s tem na lateralno mobilnost membranskih proteinov (Weete, 1989).

Vključitev sterolov v liposomske membrane je v primerjavi s kontrolo brez sterolov povečala aktivnost linusitina (Anžlovar, 1997). Anžlovar (1997) je testirala hipotezo, da naj bi bil ergosterol glede na znano protiglivno delovanje linusitina (Borgmeyer in sod., 1992) in hemolitično neaktivnost eden od ključnih dejavnikov pri prepoznavanju glivnih

membran, saj predstavlja kar 15 % membranskih lipidov v membranah višjih gliv (Longley in sod., 1968). Rezultat je bil nepričakovan, saj je bil najučinkovitejši dodatek holesterola, ki se nahaja v živalskih membranah, in stigmasterola, ki se nahaja v rastlinskih membranah.

Podobne rezultate o vplivu različnih sterolov so dobili tudi z drugimi protiglivnimi spojinami. Fitotoksin siringomicin zavira rast mnogih gliv, tudi kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (Zhang in Takemoto, 1986, 1987). Mutanta te glive, ki ji je manjkal ergosterol, je značilno slabše vezala siringomicin. Glede na te rezultate je Julmanop (1993) preučil vpliv od zunaj dodanih sterolov na citotoksičnost siringomicina. Med različnimi steroli je bil najučinkovitejši holesterol, manj stigmasterol in najmanj ergosterol. Steroli so vključeni v delovanje protiglivnih spojin, vendar pa ne igrajo ključne vloge, ampak le modificirajo njihovo aktivnost. Podobno vlogo naj bi imeli steroli tudi pri delovanju linusitina (Anžlovar, 1997).

Proteini so v PR-5 skupino uvrščeni na podlagi podobnosti z aminokislinsko sekvenco taumatina. Velikokrat je ta podobnost omejena le na nekaj deset AK ostankov N-terminalnega dela. Velika podobnost v aminokislinski sekvenci še ne pomeni enakega mehanizma delovanja. Že majhne spremembe v odsotnosti ali zamenjavi določenih aminokislinskih sekvenc lahko povzročijo majhne odseke molekule z različno zgradbo, odgovorno za specifično delovanje posameznih PR-5 proteinov. Razlika le dveh tripeptidnih sekvenc med taumatinom in zeamatinom naj bi bila vzrok za odsotnost sladkosti pri zeamatinu, ene glavnih značilnosti taumatina.

Glede na rezultate naše raziskave lahko potrdimo, da sta linusitin in LIN1 dva funkcionalno različna osmotinska proteina iz skupine PR-5 proteinov, za katera pa še vedno ne vemo dokončno v kolikšni meri se razlikujeta, saj imamo celotno predvideno sekvenco samo za LIN1, za linusitin pa ne. Rezultati, s katerimi nismo pokazali protiglevnega delovanja proteina LIN1, potrjujejo našo hipotezo, da imata LIN1 in linusitin drugačeno biološko delovanje in s tem drugačno vlogo v rastlini.

5.2 SKLEPI

- Protein LIN1 ne vpliva na rast gliv *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Hortaea werneckii* ter *Alternaria alternata*.
- Protein ne deluje na protoplaste testnih kvasovk.
- LIN1 ne lizira umetnih liposomskih membran.
- Z dobljenimi rezultati smo potrdili, da sta linusitin in LIN1 dva funkcionalno različna proteina iz skupine osmotinov.
- Potencialna fiziološka vloga LIN1 je lahko druga, kot je predvidena za osmotine.

6 POVZETEK

Proteina linusitin in LIN1 izolirana iz lanu po njunih biokemijskih lastnostih uvrščamo med osmotine. Za linusitin je že bilo pokazano delovanje na umetne membrane, glivo *Alternaria alternata* in znane strukture celičnih membran različnih patogenih gliv. Na osnovi teh rezultatov smo preizkusili dejansko protiglivno aktivnost izoliranega proteina LIN1. Postavili smo dve hipotezi. Po prvi hipotezi smo predvidevali, da bo protein LIN1 deloval podobno kot linusitin, ker spadata v isto skupino. Po drugi hipotezi pa smo, glede na razlike v aminokislinskem zaporedju in nekoliko drugačnih biokemijskih parametrih (linusitin ima kislo pI, LIN1 ima bazično pI), pričakovali drugačno delovanje LIN1, kar bi lahko pomenilo tudi drugo potencialno fiziološko vlogo LIN1, kot je predvidena za osmotine.

Delovanje proteina LIN1 smo testirali na kvasovkah *S. cerevisiae*, halotolerantni kvasovki *D. hansenii*, halofilni melanizirani kvasovkam podobni glivi *H. werneckii* ter saprofitski glivi *A. alternata*. Vse te glive spadajo med višje glive z različno sestavo sterolov v celični membrani.

Najprej smo morebitno delovanje LIN1 testirali s štetjem celic s števno komoro (hemocitometrom). Uporabili smo glivi *S. cerevisiae* in *D. hansenii*, ki smo ju več ur inkubirali s proteinom LIN1 in v nekaj urnih presledkih šteli celice. Število celic se pri nobeni glivi ni zmanjšalo. Da bi potrdili rezultat, smo določili še CFU (Colony Forming Units). Tudi v tem primeru smo dobili enak rezultat. Vzrok za neobčutljivost celic na LIN1 bi lahko bila celična stena, zato smo LIN1 testirali še na protoplastih *S. cerevisiae* in *H. werneckii*. Po inkubaciji z LIN1 smo z metilenskim modrilom razlikovali med živimi in mrtvimi protoplasti. Število protoplastov se tudi ni zmanjšalo.

Za rastline patogeno glivo *A. alternata* smo gojili na plošči skupaj s štirimi HPLC frakcijami v katerih se je nahajal LIN1. Gliva se je razrasla neovirano po celi plošči. S tem smo potrdili, da protein LIN1 nima protiglivnega delovanja.

Preizkusili smo tudi delovanje LIN1 na liposomih, ki smo jih pripravili iz fosfatidilholina in fosfatidilserina. V notranjost liposomov smo vključili fluorescentno barvilo kalcein, ki

bi povzročilo fluorescenco v primeru, če bi LIN1 poškodoval liposome in bi kalcein stekel v okolje. To se ni zgodilo, zato nismo zasledili povečane fluorescence v vzorcu. V nobenem primeru nismo dokazali protiglivnega ali membranskega delovanja proteina LIN1, s čimer smo potrdili hipotezo o potencialno drugačni vlogi LIN1 v primerjavi s strukturno sorodnim linusitinom.

7 VIRI

Abad L.R., D'Urzo M.P., Lin D., Narasinhham M.L., Renveni M., Zhu J.K., Niu X., Singh N.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1996. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science*, 118, 1: 11-23

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

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

Anžlovar S., Dalla Serra M., Dermastia M., Menestrina G. 1998. Membrane permeabilizing activity of pathogenesis-related protein linusitin from flax seed. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 7: 610-617

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

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

Batalia M.A., Monzingo A.F., Ernst S., Roberts W., Robertus J.D. 1996. The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. *Nature Structural Biology*, 3: 19-23

Belmonte G., Pederzoli C., Maček P., Menestrina G. 1993. Pore formation by the sea anemone cytolysin equinatoxin 2 in red blood cells and model lipid membranes. *Journal of Membrane Biology*, 131: 11-12

Bloch K. 1983. Sterol structure and membrane function. CRC Critical Reviews in Biochemistry, 14: 47-92

Boedijn K.B. 1978. Rastlinski svet 3. del. Steljčnice, mahovi, praprotnice. Ljubljana, Mladinska knjiga: 385 str.

Bol J.F., Linthorst H.J.M., Cornelissen B.J.C. 1990. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. Annual Review of Phytopathology, 28: 113-138

Borgmeyer J.R., Smith C.E., Huynh Q.K. 1992. Isolation and characterization of a 25 kDa antifungal protein from flax seeds. Biochemical and Biophysical Research Communications, 187, 1: 480-487

Brederobe F.T., Linthorst H.J.M., Bol J.F. 1991. Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by viral infection, ethephon treatment, UV light and wounding. Plant Molecular Biology, 17: 1117-1125

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

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

Cheong N.E., Choi Y.O., Kim W.Y., Bae I.S., Cho M.J., Hwang I., Kim J.W., Lee S.Y. 1997a. Purification and characterization of an antifungal PR-5 protein from pumpkin leaves. Molecules and Cells, 7: 214-219

Dahl C., Dahl, J., Bloch K. 1980. Effect of alkyl-substituted precursors of cholesterol on artificial and natural membranes and on the viability of *Mycoplasma capricolum*. Biochemistry, 19: 1462-1467

Demel.R.A., de Kruyff B. 1976. The function of sterols in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 457: 109-132

Forti S., Menestrina G. 1989. Staphylococcal α -toxin increases the permeability of lipid vesicles by cholesterol- and pH-dependent assembly of oligomeric channels. *European Journal of Biochemistry*, 181: 767-773

Garcia-Casado G., Collada C., Allona I., Soto A., Casado R., Rodriguez-Cerezo E., Gomez L., Aragoncillo C. 2000. Characterization of an apoplastic basic thaumatin-like protein from recalcitrant chestnut seeds. *Physiologia Plantarum*, 110, 2: 172-180

Garrett R.H., Grisham C.M. 1995. *Biochemistry*. Orlando, Florida, Saunders College Publishing: 1100 str.

Glazebrook J. 2001. Genes controlling expression of defense responses in arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 301-308

Gunde-Cimerman N., Zalar P., De Hogg S., Plemenitaš A. 2000. Hypersaline waters in salterns: natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 235-240

Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8, 17 773-17 791

Hazel J.R., Williams E.E. 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in Lipid Research*, 29: 167-227

Hendrix J.W. 1970. Sterols in growth and reproduction of fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 8: 111-130

Hong J.K., Jung H.W., Lee B.K., Lee S.C., Lee Y.K., Hwang B.K. 2004. An osmotin-like protein gene, *CAOSMI*, from pepper: differential expression and in situ localization of its

mRNA during pathogen infection and abiotic stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64: 301-310

Hu X., Reddy A.S. 1997. Cloning and expression of a PR-5-like protein from *Arabidopsis*: Inhibition of fungal growth by bacterial expressed protein. *Plant Molecular Biology*, 34: 949-959

Huynh Q.K., Borgmeyer J.R., Zobel J.F. 1992. Isolation and characterization of a 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 182, 1: 1-5

Julmanop C., Takano Y., Takemoto J.Y., Miyakawa T. 1993. Protection by sterols against the cytotoxicity of syringomycin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 139: 2323-2327

Kates M. 1986. *Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids*. Vol. 3. Amsterdam, Elsevier: 100-112

Kim H., Mun J.-H., Byun B.H., Hwang H.-J., Kwon Y.M., Kim S.-G. 2002. Molecular cloning and characterization of the gene encoding osmotin protein in *Petunia hybrida*. *Plant Science*, 162, 5: 745-752

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

Koiwa H., Kato H., Nakatsu T., Oda J., Yamada Y., Sato F. 1999. Crystal structure of tobacco PR-5d protein at 1,8 Å resolution reveals a conserved acidic cleft structure in antifungal thaumatin-like proteins. *Journal of Molecular Biology*, 286: 1137-1145

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

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

Leslie D.J.F., Muthukrishnan S., Sweglw M., Vigers A.J., Selitrennikoff C.P. 1993. Variability in antifungal proteins in the grains of maize, sorghum and wheat. *Physiologia Planarum*, 88: 339-349

Liu D., Raghothama K.G., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1994. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 1888-1892

Longley R.P., Rose A.H., Knights B.A. 1968. Composition of the protoplast membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 108: 401-412

Martin G., Brommonschenkel S.H., Frary A., Ganai M.W., Spivey R., Wu T., Earle E.D., Tanksley S.D. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262: 1432-1436

Martin G.B. 1999. Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 273-279

Matsuzaki K., Sugishita K., Fujii N., Miyajima K. 1995. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry*, 34: 3423-3429

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

Menestrina G. 1988. *Escherichia coli* hemolysin permeabilizes small unilamellar vesicles loaded with calcein by a single-hit mechanism. *FEBS Letters*, 232, 1: 217-220

- Menestrina G., Forti S., Gambale F. 1989. Interactions of tetanus toxin with lipid vesicles. Effect of pH, surface charge, and transmembrane potential on the kinetics of channel formation. *Biophysical Journal*, 55: 393-4
- Min K., Ha S.C., Hasegawa P.M., Bressan R.A., Yun D.-J., Kim K.K. 2004. Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein. *Structure, Function and Bioinformatics*, 54: 170-173
- Montijn R.C., Van Wolven P., De Hoog S., Klis F.M. 1997. Beta-glucosylated proteins in the cell wall of the black yeast *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*. *Microbiology*, 143: 1673-1680
- Nelson D.E., Raghothama K.G., Singh N.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1992. Analysis of an osmotin gene. *Plant Molecular Biology*, 19: 577-588
- New R.R.C. 1990. *Liposomes, a practical approach*. Oxford, Oxford University Press: 320 str.
- Newton S.S., Duman J.G. 2000. An osmotin-like cryoprotective protein from the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. *Plant Molecular Biology*, 44: 581-589
- Norkrans B. 1966. Studies on marine occurring yeast: Growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Archives of Microbiology*, 54: 374-392
- Ogata C.M., Gordon P.F., de Vos A.M., Kim S.H. 1992. Crystal structure of a sweet tasting protein, thaumatin I, at 1,65 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 228, 3: 893-908
- Pederzoli C., Cescatti L., Menestrina G. 1991. Chemical modification of *Staphylococcus aureus* α -toxin by diethylpyrocarbonate: role of histidines in its membrane-damaging properties. *Journal of Membrane Biology*, 119: 41-52

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

Prista C., Almagro A., LoureiroDias M.C., Ramos J. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4005-4009

Prista C., LoureiroDias M.C., Montiel V., Garcia R., Ramos J. 2005. Mechanisms underlying the halotolerant Wax of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 5: 693-701

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

Rodrigo I., Vera P., Tornero P., Hernandez-Yago J., Conejero V. 1993. cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P23. *Plant Physiology*, 102: 939-9345

Russell N.J. 1989. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 21: 93-113

Russell N.J. 1989. Structural and functional role of lipids. Vol. 2. New York, Academic Press: 279-349

Russell N.J., Evans R.I., ter Steeg P.F., Hellemons J., Verheul A., Abee T. 1995. Membranes as a target for stress adaptation. *International Journal of Food Microbiology*, 28: 255-261

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

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

Singh N.K., Bracker C.A., Hasegawa P.M., Handa A.K., Buckel S., Hermodson M.A., Pfankoch E., Regnier F.E., Bressan R.A. 1987a. Characterization of osmotin. *Plant Physiology*, 85: 529-536

Singh N.K., Handa A.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1985. Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiology*, 79:126-137

Singh N.K., Nelson D.E., Kuhn D., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1989. Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. *Plant Physiology*, 90: 1096-1101

Skadsen R.W., Sathish P., Kaeppeler H.F. 2000. Expression of thaumatin-like permantin PR-5 genes switches from the ovary wall to the aleurone in developing barley and oat seeds. *Plant Science*, 156: 11-22

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

Thomé P.E. 2004. Isolation of a GPD gene from the *Debaryomyces hansenii* encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *Yeast*, 21: 119-126

Thomé-Ortiz P.E., Pena A., Ramirez J. 1998. Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast*, 14: 1355-1371

Tunblad-Johansson I., Andre L., Adler L. 1987. The sterol and phospholipid composition of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown at various concentrations of NaCl. *Biochimica et Biophysica Acta*, 921: 116-123

Turk M., Mejanelle L., Šentjurc M., Grimalt J.O., Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. 2004. Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. *Extremophiles*, 8: 53-61

Turk M., Montiel V., Žigon D., Plemenitaš A., Ramos J. 2007. Plasma membrane properties of *Debaryomyces hansenii* as an important factor in the adaptation to pH and external salinity. *Mycrobiology*, (sprejeto v tisk)

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

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

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

Verkleij A.J., Zwaal R.F.A., Roelofsen B., Comfurius P., Kastelijn D., Van Deenen L.L. 1973. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 323: 178-193

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

Vigers A.J., Wiedemann S., Roberts W.K., Legrand M., Selitrennikoff C.P., Fritig B. 1992. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Science*, 83: 155-161

Vleeshouwers V.G.A.A., VanDooijeweert W., Govers F., Kamoun S., Colon L.T. 2000. Does basal PR gene expression in *Solanum* species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57: 35-42

Vu L., Huynh Q.K. 1994. Isolation and characterization of a 27 kDa antifungal protein from the fruits of *Diospyros texana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 202, 2: 666-672

Weete J.D. 1989. Structure and function of sterols in fungi. *Advances in Lipid Research*, 23: 115-167

Woloshuk C.P., Meulenhoff J.S., Sela-Buurlage P.M., Van den Elzen P.J.M., Cornelissen B.J.C. 1991. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*, 3: 619-628

Wu J.K., Khan A.A., Shih C.Y.T., Shih D.S. 2001. Cloning and sequence determination of a gene encoding an osmotin-like protein from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *DNA Sequence*, 12: 447-453

Yun D., Paino D'Urzo M., Abad L., Takeda S., Salzman R., Chen Z., Lee H., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1996. Novel osmotically induced antifungal chitinases and bacterial expression of an active recombinant isoform. *Plant Physiology*, 111: 1219-1225

Yun D.-J., Zhao Y., Pardo J.M., Narasimhan M.L., Damsz B., Lee H., Abad L.R., Paino D'Urzo M., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1997. Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 7082-7087

Zhang L., Takemoto J.Y. 1986. Mechanism of action of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin, syringomycin. Interaction with the plasma membrane of the wild-type and respiratory-deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 861: 201-204

Zhang L., Takemoto J.Y. 1987. Effect of *Pseudomonas syringae* phytotoxin syringomycin on plasma membrane fraction of *Rhodotorula pilimanae*. *Phytopathology*, 77: 297-303

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

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

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Marini Dermastia za usmerjanje tekom praktičnega dela, za vso pomoč in nasvete pri pisanju diplome ter za vso prijaznost, ki mi jo je izkazovala od najinega prvega srečanja.

Dr. Sabini Anžlovar se zahvaljujem za vse nasvete in pomoč, Petri Nikolić pa za tehnično pomoč pri izvajanju praktičnega dela na Katedri za botaniko in Katedri za biokemijo.

Hvala dr. Martini Turk za pomoč pri praktičnem delu na Katedri za biologijo mikroorganizmov.

Prof. dr. Nini Gunde- Cimerman se zahvaljujem za pregled naloge.

Barbara- hvala za pomoč pri izražanju v angleškem jeziku.

Hvala prijateljema Dejanu in Leonu, ker sta mi priskočila na pomoč, ko sem jo potrebovala.

Največjo zahvalo pa dolgujem mojima zlatima staršema- atiju Ivanu in mami Jožici, ker sta mi omogočila študij, me spodbujala in verjala vame. Hvala za vso ljubezen in skrb, ki sta mi jo namenila. Brez vaju mi nikoli ne bi uspelo doseči tega cilja.

Hvala tudi mojemu bratu Bojanu, stari mami Ivani, teti Jelki in stricu Tonetu, ker ste se veselili mojih upehov, mi dvigovali osebno moralo in me spodbujali.

Iskrena hvala vsem, ki ste mi kakorkoli pomagali na poti do tega cilja, pa vas nisem posebej omenila!