UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tanja ZADRAŽNIK

# PROTEOMSKA ANALIZA ODZIVA NA SUŠNI STRES PRI IZBRANIH KULTIVARJIH NAVADNEGA FIŽOLA (*Phaseolus vulgaris* L.)

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tanja ZADRAŽNIK

# PROTEOMSKA ANALIZA ODZIVA NA SUŠNI STRES PRI IZBRANIH KULTIVARJIH NAVADNEGA FIŽOLA (Phaseolus vulgaris L.)

DOKTORSKA DISERTACIJA

# PROTEOMIC ANALYSIS OF DROUGHT STRESS RESPONSE IN SELECTED CULTIVARS OF COMMON BEAN (Phaseolus vulgaris L.)

DOCTORAL DISSERTATION

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 19. seje Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 6. 7. 2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja biotehnologije in da se sprejme tema disertacije z naslovom Proteomska analiza odziva na sušni stres pri izbranih kultivarjih navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.). Za mentorico je bila imenovana izr. prof. dr. Jelka Šuštar-Vozlič.

Doktorska disertacija je bila opravljena na Oddelku za poljedelstvo in semenarstvo Kmetijskega inštituta Slovenije, na inštitutu Nofima (Ås, Norveška) ter na Oddelku za molekularne bioznanosti na Univerzi v Oslu (Oslo, Norveška).

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Branka Javornik
	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
Član:	prof. dr. Marjana Regvar
	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član:	izr. prof. dr. Vladimir Meglič
	Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za poljedeljstvo, genetiko, vrtnarstvo
	in žlahtnjenje

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Tanja Zadražnik

#### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

- DK UDK 576.32/.36:632.11:636.652(043)=163.6
- KG proteomika/proteini/sušni stres/suša/navadni fižol/*Phaseolus vulgaris*/metabolizem/ toleranca
- AV ZADRAŽNIK, Tanja
- SA ŠUŠTAR-VOZLIČ, Jelka (mentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biotehnologije
- LI 2014
- IN PROTEOMSKA ANALIZA ODZIVA NA SUŠNI STRES PRI IZBRANIH KULTIVARJIH NAVADNEGA FIŽOLA (*Phaseolus vulgaris* L.)
- TD Doktorska disertacija
- OP XIII, 124 str., 8 pregl., 28 sl., 14 pril., 206 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Sušni stres pri rastlinah povzroča spremembe v vsebnosti proteinov. Proteomika predstavlja enega izmed načinov njihovega preučevanja. Za identifikacijo proteinov povezanih s sušo pri navadnem fižolu (Phaseolus vulgaris L.) smo uporabili dvodimenzionalno diferenčno elektroforezo in enodimenzionalno poliakrilamidno gelsko elektroforezo v kombinaciji z masno spektrometrijo. Analizirali smo odziv na sušo na ravni celokupnih proteinov in glikoproteinov v fižolovih listih in steblih. Spremembe v vsebnosti celokupnih proteinov v listih smo analizirali pri dveh kultivarjih, Tiber in Starozagorski čern, ki se razlikujeta v toleranci na sušni stres. Ugotovili smo, da suša najbolj negativno vpliva na vsebnosti proteinov, ki so ključni za fotosintezo, kot so Rubisco, karbonska anhidraza, proteine vključene v oksidacijo vode ter druge. Pri teh proteinih smo tudi zaznali najbolj izrazite razlike v vsebnosti med dvema kultivarjema. Pri Starozagorskem, ki je na sušo bolj občutljiv, se je vsebnost vseh proteinov tega tipa zmanjšala, pri Tibru pa se je vsebnost nekaterih proteinov, kot sta karbonska anhidraza in Rubisco, zmanjšala, pri drugih, kot so proteini vključeni v oksidacijo vode, pa povečala. Ugotovili smo tudi, da suša vpliva na vsebnost proteinov, ki so povezani z energijskim metabolizmom, stresom, sintezo, proteolizo in zvijanjem proteinov. Kvantitativna analiza izotopsko označenih proteinov iz stebel pri Tibru v suši je omogočila razvrstitev proteinov, na katere vpliva suša, v številne funkcionalne skupine, kot so procesi energijskega metabolizma, fotosinteza, proteoliza, sinteza proteinov ter proteini povezani z reaktivnimi kisikovimi spojinami, obrambo in stresom. Rezultati tega dela raziskave omogočajo osnovni vpogled v regulatorni mehanizem, v katerega so vključeni proteini stebel pri navadnem fižolu v suši. Na podlagi kvantifikacije N-glikoproteinov iz stebel in listov pri Tibru v suši, ki je bila opravljena na osnovi kvantifikacije brez označevalcev, lahko sklepamo, da ima sušni stres velik vpliv na biokemijski metabolizem v celičnih stenah. Zasledili smo visokomanozne, kompleksne in hibridne tipe Nglikanov. Na podlagi rezultatov sklepamo, da lahko določene proteine uporabimo kot markerje v selekcijskem procesu tolerance na sušo pri navadnem fižolu. Za ta namen so najbolj primerni proteini, katerih vsebnost se med kultivarjema razlikuje. Med njimi lahko izpostavimo proteine vključene v oksidacijo vode.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

#### DN Dd

- DC UDC 576.32/.36:632.11:636.652(043)=163.6
- CX proteomics/proteins/drought stress/drought/common bean/*Phaseolus vulgaris*/ metabolism/tolerance
- AU ZADRAŽNIK, Tanja
- AA ŠUŠTAR-VOZLIČ, Jelka (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljani, Biotechnical Faculty, Postgraduate study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biotechnology
- PY 2014
- TI PROTEOMIC ANALYSIS OF DROUGHT STRESS RESPONSE IN SELECTED CULTIVARS OF COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)
- DT Doctoral Dissertation
- NO XIII, 124 p., 8 tab., 28 fig., 14 ann., 206 ref.
- LA sl
- AL sl/en

AB Proteomics is one of the approaches to study the influence of drought stress on changes in the level of proteins in plants. Two-dimensional differential in-gel electrophoresis and one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis in combination with mass spectrometry were used to identify drought-responsive proteins in common bean (Phaseolus vulgaris L.). The analysis was performed on total proteins and gylcoproteins in leaves and stems of common bean. Changes in the abundance of total proteins were analyzed in two cultivars differing in their response to drought, Tiber and Starozagorski. Drought had the most negative effect on the abundance of proteins involved in photosynthesis, such as Rubisco, carbonic anhydrase, oxygen-evolving enhancer proteins and others. In these proteins, the most outstanding differences in abundance profiles of proteins between cultivars were observed. The decreased abundance of proteins involved in photosynthesis was observed in more sensitive Starozagorski, wheareas decreased abundance of carbonic anhydrase and Rubsico and increased abundance of oxygen-evolving enhancer proteins were observed in Tiber. The abundance of proteins involved in energy metabolism, stress, synthesis, proteolysis and folding were influenced by drought. A quantitative analysis of isotopic labeled proteins from stems of cultivar Tiber under drought revealed main proteins influenced by stress. These proteins were grouped into several main functional groups: energy metabolism, photosynthesis, proteolysis, synthesis and proteins related to reactive oxygen species, defence and stress. The results of this part of the research provided the basic insight into the molecular regulatory mechanism of stem proteins in common bean under drought. Results of the quantification of N-glycoproteins from stems and leaves of cultivar Tiber with a label free quantification approach suggested, that drought affected the biochemical metabolism in the cell wall. Structures of high mannose, complex and hybrid types of N-glycans were found. Based on our results, certain identified proteins could be used as markers in the selection process for drought tolerance in common bean. The most suitable proteins would be those, exhibiting contrasting abundance patterns between cultivars, such as oxygen evolving enhancer proteins.

# KAZALO VSEBINE

Ključna Key Wo Kazalo v Kazalo v Kazalo s Kazalo j Okrajšav	dokumentacijska informacija (KDI) ords Documentation (KWD) vsebine oreglednic V slik prilog ve in simboli X	III IV V III IX XI KII
1	UVOD	1
1	PRECIED ORIAN	1
2 2 1	NAVADNI FIŽOJ	3
2.1	MEUANIZMI ODZIVA NA SUŠNI STDES DDI DASTI INAU	5
2.2 2.2.1	NIEMANIZIVII ODZIVA NA SUSNI SI KES PKI KASILINAM	) 10
<b>4.4.1</b>	ANALIZA DOTEOMA IN ODZIVINA SUŠNI STDES	10
2.5	ANALIZA PROTEOMA IN ODZIV NA SUSNI STRES	12
2.3.1	CLIVOZILA CILA DEOTENIOV	15
2.4	GLIKUZILACIJA PROTEINUV	10
2.4.1	Posttranslacijske modilikacije in stres pri rastilnan	19
2.5	METODOLOSKI PRISTOPI V PROTEOMIKI	19
2.5.1	Masna spektrometrija	19
2.5.2	»Snotgun« proteomika	20
2.5.3	Identilikacija proteinov	21
2.5.4	Kvantifikacija proteinov označenih s stabilnimi izotopi v proteomiki	23
2.5.5	Analiza glikoproteinov	25
2.5.6	Baze podatkov in interakcijske mreze proteinov	26
3	MATERIALI IN METODE	28
3.1	POTEK POSKUSA	28
3.1.1	Rastlinski material	29
3.1.2	Priprava rastlinskega materiala	29
3.1.3	Določanje relativne vsebnosti vode v listih in vsebnosti vode v substratu	30
3.2	EKSPERIMENTALNO DELO	30
3.2.1	Analiza celokupnih proteinov v listih kultivarjev Tiber, Starozagorski čern	
	in BAT 477 z 2D-DIGE	30
3.2.1.1	Priprava proteinskih ekstraktov iz listov kultivarjev Tiber, Starozagorski čern in BAT 477	30
3.2.1.2	2D-DIGE proteinskih ekstraktov iz listov kultivarjev Tiber, Starozagorski čern	27
2212	III DAT 4//	32
3.2.1.3	Tiber Storozogorski čern in PAT 477	21
2 2 1 1	Hontifikacija proteinov je listov kultivarjev Tihen in Stanogogoraki černe z mesere	54
3.2.1.4	identifikacija proteinov iz listov kultivarjev 110er in Starozagorski cern z masno	21
2015	spektrometrijo	<b>3</b> 4
3.2.1.3	iskanje proteinov iz listov kultivarjev Tiber in Starozagorski cern po bazi podatkov	35

3.2.1.6	Bioinformatska obdelava podatkov za proteine listov kultivarja Tiber in	
	Starozagorski čern	36
3.2.2	Analiza celokupnih proteinov stebel kultivarja Tiber	37
3.2.2.1	Priprava proteinskih ekstraktov stebel kultivarja Tiber	37
3.2.2.2	Ločitev proteinov stebel kultivarja Tiber na NaDS-PAGE in izotopsko	
	označevanje proteinov	38
3.2.2.3	Identifikacija proteinov stebel kultivarja Tiber z masno spektrometrijo	39
3.2.2.4	Obdelava podatkov za proteine stebel kultivarja Tiber	40
3.2.3	Analiza N-glikoproteinov iz listov in stebel kultivarja Tiber	41
3.2.3.1	Priprava proteinskih ekstraktov iz listov in stebel kultivarja Tiber	41
3.2.3.2	Ločitev glikoproteinov iz listov in stebel kultivarja Tiber z lektinsko	
	kromatografijo	41
3.2.3.3	Ločitev glikoproteinov listov in stebel kultivarja Tiber na NaDS-PAGE	42
3.2.3.4	Identifikacija glikoproteinov listov in stebel kultivarja Tiber z masno	
	spektrometrijo	43
3.2.3.5	Analiza spektrov glikoproteinov listov in stebel kultivarja Tiber	43
4	REZULTATI	46
4.1	VPLIV POMANJKANJA VODE NA RASTLINE	46
4.2	ANALIZA CELOKUPNIH PROTEINOV IZ LISTOV KULTIVARJEV	
	TIBER, STAROZAGORSKI ČERN IN BAT 477 Z 2D-DIGE	50
4.2.1	Analiza slik gelov proteinskih ekstraktov iz listov kultivarjev Tiber,	
	Starozagorski čern in BAT 477	50
4.2.2	Identifikacija proteinov iz listov kultivarjev Tiber in Starozagorski čern z	
	masno spektrometrijo	55
4.2.3	Bioinformatska analiza proteinov iz listov kultivarjev Tiber in	
	Starozagorski čern	65
4.3	ANALIZA CELOKUPNIH PROTEINOV STEBEL KULTIVARJA TIBER	67
4.3.1	Analiza slik gelov proteinskih ekstraktov iz stebel kultivarja Tiber	67
4.3.2	Identifikacija proteinov iz stebel kultivarja Tiber z masno spektrometrijo	68
4.4	ANALIZA N-GLIKOPROTEINOV IZ STEBEL IN LISTOV KULTIVARJA	
	TIBER	73
4.4.1	Lektinska kromatografija proteinov iz stebel in listov kultivarja Tiber	73
4.4.2	Masna spektrometrija in obdelava podatkov za N-glikoproteine iz stebel in	l
	listov kultivarja Tiber	75
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	84
5.1	RAZPRAVA	84
5.1.1	Primerjava proteoma listov kultivarja Tiber in kultivarja Starozagorski	
	čern v sušnem stresu	84
5.1.1.1		05
	Proteini listov udeleženi pri fotosintezi	05
5.1.1.2	Proteini listov udeleženi pri fotosintezi Proteini listov povezani z energijskim metabolizmom	85 86
5.1.1.2 5.1.1.3	Proteini listov udeleženi pri fotosintezi Proteini listov povezani z energijskim metabolizmom Proteini listov povezani s stresom	85 86 87
5.1.1.2 5.1.1.3 5.1.1.4	Proteini listov udeleženi pri fotosintezi Proteini listov povezani z energijskim metabolizmom Proteini listov povezani s stresom Proteini listov udeleženi pri ATP pretvorbi	83 86 87 88
5.1.1.2 5.1.1.3 5.1.1.4 5.1.1.5	Proteini listov udeleženi pri fotosintezi Proteini listov povezani z energijskim metabolizmom Proteini listov povezani s stresom Proteini listov udeleženi pri ATP pretvorbi Proteini listov povezani s proteolizo, sintezo in zvijanjem proteinov	83 86 87 88 89
5.1.1.2 5.1.1.3 5.1.1.4 5.1.1.5 5.1.1.6	Proteini listov udeleženi pri fotosintezi Proteini listov povezani z energijskim metabolizmom Proteini listov povezani s stresom Proteini listov udeleženi pri ATP pretvorbi Proteini listov povezani s proteolizo, sintezo in zvijanjem proteinov Ostale skupine proteinov listov	83 86 87 88 89 90
5.1.1.2 5.1.1.3 5.1.1.4 5.1.1.5 5.1.1.6 <b>5.1.2</b>	Proteini listov udeleženi pri fotosintezi Proteini listov povezani z energijskim metabolizmom Proteini listov povezani s stresom Proteini listov udeleženi pri ATP pretvorbi Proteini listov povezani s proteolizo, sintezo in zvijanjem proteinov Ostale skupine proteinov listov <b>Analiza celokupnih proteinov stebel kultivarja Tiber</b>	83 86 87 88 89 90 90
5.1.1.2 5.1.1.3 5.1.1.4 5.1.1.5 5.1.1.6 <b>5.1.2</b> 5.1.2.1	Proteini listov udeleženi pri fotosintezi Proteini listov povezani z energijskim metabolizmom Proteini listov povezani s stresom Proteini listov udeleženi pri ATP pretvorbi Proteini listov povezani s proteolizo, sintezo in zvijanjem proteinov Ostale skupine proteinov listov <b>Analiza celokupnih proteinov stebel kultivarja Tiber</b> Proteini stebel povezani z energijskim metabolizmom	83 86 87 88 89 90 90 90

Proteini stebel povezani s stresom	92
Proteini stebel povezani s sintezo, zvijanjem in proteolizo	92
Proteini stebel udeleženi pri ATP pretvorbi	93
Ostale skupine proteinov stebel	93
Analiza N-glikoproteinov iz stebel in listov kultivarja Tiber	95
SKLEPI	99
POVZETEK (SUMMARY)	102
POVZETEK	102
SUMMARY	104
VIRI	106
ZAHVALA	
PRILOGE	
	Proteini stebel povezani s stresom Proteini stebel povezani s sintezo, zvijanjem in proteolizo Proteini stebel udeleženi pri ATP pretvorbi Ostale skupine proteinov stebel Analiza N-glikoproteinov iz stebel in listov kultivarja Tiber SKLEPI POVZETEK (SUMMARY) POVZETEK SUMMARY VIRI ZAHVALA PRILOGE

# KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Poskus sušnega stresa pri izbranih kultivarjih navadnega fižola	29
Preglednica 2: Vsebnosti (%) vode v loncih za kultivarje Tiber, BAT 477 in	
Starozagorski	50
Preglednica 3: Seznam identificiranih proteinov v listih pri kultivarjih Tiber in	
Starozagorski v sušnem stresu	59
Preglednica 4: Homologni proteini neznanih in hipotetičnih proteinov iz preglednice 3	65
Preglednica 5: Seznam identificiranih skupin proteinov iz stebel kultivarja Tiber	70
Preglednica 6: Število identificiranih glikoproteinov v steblih (A) in listih (B) kultivarja	
Tiber	76
Preglednica 7: Kvantifikacija glikoproteinov v steblih kultivarja Tiber s programom	
MaxQuant	80
Preglednica 8: Kvantifikacija glikoproteinov v listih kultivarja Tiber s programom	
MaxQuant	81

#### KAZALO SLIK

Slika 1: Fiziološki, biokemijski odziv ter odziv na nivoju genov na sušni stres pri	
rastlinah (Ramachandra Reddy in sod., 2004: 1198)	6
Slika 2: Vpliv izgube vode na strukturo rastlinske celične stene (Moore in sod., 2008:	
239)	8
Slika 3: Fotosinteza v povezavi s sušnim stresom ter mehanizmi, ki vodijo do	
zmanjšanja fotosintetske aktivnosti (Farooq in sod., 2009: 189)	9
Slika 4: Vrste N-glikanov pri rastlinah (Etzler in Mohnen, 2009)	17
Slika 5: N-glikozilacija pri rastlinah in sesalcih (Song W. in sod., 2011: 1464)	18
Slika 6: Primerjava tehnike 2D gelske elektroforeze in »shotgun« proteomike z uporabo	
več-dimenzionalne MudPIT (Weckwerth, 2008: 179)	21
Slika 7: Prikaz nastanka fragmentov peptidnih ionov in njihove oznake (Aebersold in	
Goodlett, 2001: 277)	23
Slika 8: Osnovni princip za kvantifikacijo proteinov pri proteomiki, ki ne temelji na	
gelih (Zhu in sod., 2010: 2)	24
Slika 9: Shematski prikaz eksperimenta od priprave rastlinskega materiala do poteka	
proteomskih analiz	28
Slika 10: Rastline kultivarja Starozagorski v suši 2 in pripadajoče kontrolne rastline	
(kontrola 2)	46
Slika 11: Rastline kultivarja Starozagorski v suši 3 in pripadajoče kontrolne rastline	
(kontrola 3)	47
Slika 12: Sveža (A) in suha (B) masa listov kultivarjev BAT 477, Tiber in	
Starozagorski	48
Slika 13: Relativna vsebnost vode (RVV) v listih kultivarjev BAT 477, Tiber in	
Starozagorski	49
Slika 14: NaDS-PAGE proteinskih ekstraktov iz listov kultivarjev BAT 477 (A),	
Starozagorski (B) in Tiber (C)	51
Slika 15: Preliminarna ločitev proteinskih ekstraktov iz listov kultivarja Tiber z	
2D-PAGE v pH območju 3-10, barvano s Coomassie G-250	51
Slika 16: Analiza PCA za BAT 477 (A), Starozagorski (B) in Tiber (C): razvrstitev	
proteinskih lis različno vzorčenih rastlin glede na 1. in 2. komponento PCA	53
Slika 17: 2D-PAGE proteinskih ekstraktov listov kultivarja Starozagorski (A) in	
Tiber (B)	56
Slika 18: Primerjava proteinskih lis v 2D pogledu s programom Progenesis Samespot	57

Slika 19: Razvrstitev identificiranih proteinov listov s spremenjenimi vsebnostmi v	
suši v skupine glede na njihove biološke funkcije pri kultivarjih Tiber (A) in	
Starozagorski (B)	58
Slika 20: Analiza PPI mreže s programom STRING (Szklarczyk in sod., 2011) za	
kultivar Tiber	66
Slika 21: Prikaz mreže bioloških poti (A) in molekulskih funkcij (B) s programom	
BiNGO (Maere in sod., 2005) za kultivar Tiber	67
Slika 22: Ločitev proteinskih ekstraktov iz stebel kultivarja Tiber z NaDS-PAGE	68
Slika 23: Primer izotopsko označenega peptidnega para, ki ne kaže relativne	
spremembe signala glede na ostale peptide na relativni intenzitetni skali	69
Slika 24: Shematski prikaz izpisa iz programa MaxQuant na primeru hsp70 za kultivar	
Tiber	72
Slika 25: Razvrstitev identificiranih skupin proteinov stebel s spremenjenimi vsebnostmi	i
v suši v skupine glede na njihove biološke funkcije za kultivar Tiber	73
Slika 26: Ločitev glikoproteinov iz lektinske kromatografije z NaDS-PAGE za kultivar	
Tiber	74
Slika 27: Primer spektrov glikopeptida za kultivar Tiber	79
Slika 28: Razvrstitev identificiranih glikoproteinov s spremenjenimi vsebnostmi v suši	
iz stebel (A) in listov (B) v skupine glede na njihove biološke funkcije za	
kultivar Tiber	83

#### KAZALO PRILOG

- Priloga A: Homologni proteini identificiranih proteinov z uporabo TAIR10 (2012) proteinske baze
- Priloga A1: Homologni proteini identificiranih proteinov v listih za kultivar Starozagorski z uporabo TAIR10 (2012) proteinske baze
- Priloga A2: Homologni proteini identificiranih proteinov v listih za kultivar Tiber z uporabo TAIR10 (2012) proteinske baze
- Priloga B: Dodatni podatki o identificiranih proteinih v listih kultivarja Tiber in Starozagorski
- Prilogi C: Seznam bioloških poti in molekulskih funkcij iz programa BiNGO (Maere in sod., 2005) za identificirane proteine v listih za kultivarja Tiber in Starozagorski
- Priloga C1: Seznam bioloških poti iz programa BiNGO (Maere in sod., 2005) za identificirane proteine v listih za kultivarja Tiber in Starozagorski
- Priloga C2: Seznam molekulskih funkcij iz programa BiNGO (Maere in sod., 2005) za identificirane proteine v listih za kultivarja Tiber in Starozagorski
- Priloga D: Mreža bioloških poti (A) in molekulskih funkcij (B) narejena s programom BiNGO (Maere in sod., 2005). Prikaz protein-protein interakcijske mreže s programom STRING (C; Szklarczyk in sod., 2011)
- Prilogi E: Analiza glikopeptidov iz spektrov pri steblih in listih za kultivar Tiber
- Priloga E1: Analiza glikopeptidov iz spektrov pri steblih za kultivar Tiber
- Priloga E2: Analiza glikopeptidov iz spektrov pri listih za kultivar Tiber
- Prilogi F: Homologni proteini neznanih in hipotetičnih glikoproteinov
- Priloga F1: Homologni proteini neznanih in hipotetičnih glikoproteinov iz stebel za kultivar Tiber z uporabo algoritma BLASTP (2012)
- Priloga F2: Homologni proteini neznanih in hipotetičnih glikoproteinov iz listov za kultivar Tiber z uporabo algoritma BLASTP (2012)

# OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2D-DIGE	dvodimenzionalna diferenčna elektroforeza
2D-PAGE	dvodimenzionalna poliakrilamidna elektroforeza
ABA	abscizinska kislina
ABRE	element DNA odziven na abscizinsko kislino
APS	amonijev persulfat
ATP	adenozintrifosfat
BCA	bikinkonska kislina (ang. bicinchoninic acid)
BSA	goveji serumski albumin
CBB	coomassie brilliant blue
CHAPS	3-[(3-holamidopropil)dimetilamonijev]-1-propansulfonat
CID	s trkom povzročena disociacija (ang. collision-induced
	dissociation)
ConA	konkavalin A
DDRT-PCR	metoda diferencialnega prikaza z obratno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DRE	element DNA odziven na dehidracijo
DTT	ditiotreitol
E vrednost	pričakovana vrednost (ang. expected value)
ESI	elektrosprej ionizacija
EST	oznaka izraženega zaporedja (ang. expressed sequence tag)
FDR	stopnja napačnega zadetka (ang. false discovery rate)
Fuc	fukoza
Glc	glukoza
GlcNAc	N-acetilglukozamin
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
H/L	razmerje med težko in lahko skupino označevalca
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
HRGP	glikoproteini bogati s hidroksiprolinom
hsp	protein vročinskega šoka
IPG	imobiliziran pH-gradient (ang. immobilized pH gradient)
LC-MS	tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo
LEA	proteini pozne embriogeneze
LFQ	kvantifikacija proteinov brez predhodnega označevanja
	(ang. label free quantification)
MALDI	ionizacija tripsinskih fragmentov v matriksu z desorpcijo z
	laserjem
Man	manoza
ME	elucija z alfa-metilmanoznim piranozidom
MOPS	3-(N-morfolin)propansulfonska kislina
MS	masna spektrometrija

MS/MS	tandemska masna spektrometrija
MudPIT	večdimenzionalne tehnike za identifikacijo proteinov
Mw	molekulska masa
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti NaDS-a
OEE	protein vključen v oksidacijo vode (ang. oxygen-evolving enhancer protein)
PBS	fosfatni pufer (ang. phosphate buffered saline)
PC	glavna komponenta
PCA	analiza glavnih komponent
PEP	verjetnost napačnega zadetka peptida (ang. posterior error probability)
pI	izoelektrična točka
PLS	metoda delnih najmanjših kvadratov
PPI	protein-protein interakcije
PTM	posttranslacijske modifikacije
ROS	reaktivne kisikove spojine
Rubisco	ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza
RVV	relativna vsebnost vode
SE	elucija s sialično kislino
TAIR	baza podatkov za navadni repnjakovec (ang. the <i>Arabidopsis</i> information resource)
TCA	trikloroocetna kislina
TEMED	tetrametiletilendiamin
TOF	masni detektor na čas preleta ionov
VVS	vsebnost vode v substratu
Xyl	ksiloza
WGA	aglutinin iz pšeničnih kalčkov (ang. wheat germ agglutinin)

#### 1 UVOD

Rastline so pogosto izpostavljene neugodnim pogojem iz okolja, ki vplivajo na njihovo rast, razvoj in pridelek. Poleg biotskega stresa, ki ga povzročajo bolezni in škodljivci, k zmanjšanju količine in kakovosti pridelka kmetijskih rastlin v veliki meri prispeva tudi abiotski stres. Med abiotskimi stresi je najbolj razširjen sušni stres, ki se pojavlja v povezavi z manjšo količino padavin in povišanimi temperaturami. Vpliva na pridelovanje agronomsko pomembnih rastlin, med katere prištevamo tudi stročnice, in med njimi navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Navadni fižol zavzema pomembno mesto v prehrani številnih ljudi po svetu, predvsem zaradi svoje visoke hranilne vrednosti, vsebnosti proteinov, dietnih vlaken in mineralov (Tharanathan in Mahadevamma, 2003). Rezultati opazovanja na polju, v rastlinjaku in poskusi v nadzorovanem okolju so pokazali, da je v primerjavi z drugimi zrnatimi stročnicami razmeroma občutljiv na sušo (Costa Franca in sod., 2006). V svetovnem merilu kar 60 % navadnega fižola pridelajo v razmerah pomanjkljive oskrbe z vodo, suša pa v nekaterih regijah povzroči tudi do 80 % izgube pridelka (Cuellar Ortiz in sod., 2008). Tudi v Sloveniji, kjer imamo dolgo tradicijo pridelovanja fižola, se v zadnjih letih sušna obdobja pojavljajo zelo pogosto (Kajfež -Bogataj, 2005). Razvoj kultivarjev s toleranco na sušni stres je zato primarni cilj mnogih programov žlahtnjenja fižola po svetu (Miklas in sod., 2006). Za izbor in vzgojo kultivarjev, tolerantnih na sušo je potrebno poznati fiziološke, morfološke in biokemijske lastnosti, ki določen kultivar opredeljujejo kot toleranten (Lizana in sod., 2006). Področje abiotskega stresa je pri navadnem fižolu veliko manj raziskano kot področje biotskega stresa. Natančni mehanizmi tolerance in odziva na sušni stres še niso pojasnjeni, zato sta potrebna nadgradnja znanja in upoštevanje že znanih mehanizmov pri drugih rastlinskih vrstah.

Pri odzivu rastline na stresne razmere se sprožijo celično in tkivno specifični fiziološki in molekularni mehanizmi, ki vključujejo izražanje specifičnih genov in spremembe v vsebnosti določenih proteinov, ki igrajo pomembno vlogo med stresom (Ramachandra Reddy in sod., 2004). Proteini so osnovni nosilci funkcij v celici, mnogi med njimi so po sintezi tudi posttranslacijsko modificirani. Glikozilacija je najbolj pogosta in hkrati zelo kompleksna posttranslacijska modifikacija (PTM) proteinov. Pri rastlinah je veliko proteinov ekstracelularnega matriksa in endomembranskega sistema N-glikoziliranih (Komatsu in sod., 2009). N-glikozilacija vpliva na fizikalno-kemijske lastnosti in biološke funkcije proteinov ter je zelo pomembna za odziv na sušni stres, vendar so za zdaj raziskave glikozilacije in tudi drugih PTM v povezavi s sušnim stresom pri rastlinah zelo redke. Glikozilacija proteinov pri sušnem stresu pri navadnem fižolu še ni

proučena. To pa je za proučevanje kompleksnih procesov, kot sta tudi odziv na sušni stres oziroma mehanizem tolerance na sušo pri navadnem fižolu, zelo pomembno.

Proteomska analiza je učinkovit pristop za identifikacijo in določanje vsebnosti proteinov, udeleženih v odzivu rastlin na stresne razmere v določenem tkivu in v določenem trenutku (Abreu in sod., 2013). Analize proteoma in analize PTM, kot je N-glikozilacja, prispevajo k nadgradnji raziskav in ugotavljanju mehanizmov odziva in tolerance navadnega fižola na sušni stres. To je še posebej pomembno pri žlahtniteljskem procesu, katerega glavni cilj je pridobivanje novih kultivarjev z izboljšano toleranco na stresne dejavnike, nižjim tveganjem izgube pridelka ter izboljšano stabilnostjo pridelave v različnih, tudi neugodnih, okoljskih razmerah.

Cilji doktorske naloge so:

- določiti razlike na proteinskem nivoju v listih med kontrolnimi rastlinami in rastlinami v sušnem stresu za dva kultivarja navadnega fižola – Tiber in Starozagorski čern (Starozagorski);
- določiti razlike na proteinskem nivoju v steblih med kontrolnimi rastlinami in rastlinami v sušnem stresu za izbrani kultivar navadnega fižola;
- ločiti glikoproteine od drugih proteinov in določiti razlike med glikoproteini kontrolnih rastlin in rastlin v sušnem stresu za izbrani kultivar;
- določiti strukturo N-glikanov iz spektrov pri identificiranih glikoproteinih.

# Raziskovalne hipoteze

V doktorskem delu predpostavljamo, da:

- so v listih in steblih navadnega fižola proteini, ki so vključeni v odziv rastlin na sušni stres ter da bomo s primerjavo celokupnih proteinov iz listov in stebel kontrolnih rastlin in rastlin v stresu določili razlike;
- so v listih navadnega fižola proteini, ki potencialno prispevajo k večji toleranci navadnega fižola na sušo;
- obstajajo razlike v vsebnosti glikoproteinov med kontrolnimi rastlinami in rastlinami navadnega fižola v sušnem stresu ter da bomo z identifikacijo glikoproteinov iz listov in stebel obravnavanih rastlin dobili dodaten vpogled v odziv navadnega fižola na sušo;
- bomo z identifikacijo proteinov, pri katerih bomo zasledili različne vsebnosti med kontrolnimi rastlinami in rastlinami v sušnem stresu, nadgradili poznavanje mehanizma odziva navadnega fižola na sušni stres.

# 2 PREGLED OBJAV

#### 2.1 NAVADNI FIŽOL

Navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.) po botanični klasifikaciji uvrščamo v rod *Phaseolus*, ki pripada družini metuljic (Fabaceae), redu stročnic (Fabales), razredu dvokaličnic (Dicotyledonae), pododdelku kritosemenk (Angiospermae) in oddelku semenovk (Spermatophyta) (Černe, 1997). Rod *Phaseolus* obsega 50 do 60 vrst, med katerimi je pet kultiviranih, poleg *P. vulgaris* še *P. coccineus* L. (turški fižol), *P. lunatus* L. (limski fižol), *P. polyanthus* Greenm. in *P. acutifolius* A. Gray.(Debouck, 1999). Fižol izvira iz Srednje in Južne Amerike, v 16. in 17 stoletju se je razširil tudi na druge kontinente. Pridelava navadnega fižola v svetu predstavlja danes eno tretjino pridelave vseh stročnic, največ ga pridelajo v Latinski Ameriki in osrednji Afriki (FAOSTAT, 2007; Broughton in sod., 2003). Med stročnicami, ki so namenjene pridelavi hrane, je navadni fižol na tretjem mestu, takoj za sojo in arašidi (Lin in sod., 2008).

Navadni fižol predstavlja bogat vir proteinov, ki imajo pomembno vlogo v naši prehrani. Za razliko od večine drugih rastlinskih proteinov vsebujejo esencialne aminokisline, ki jih ljudje ne moremo sintetizirati in jih običajno vnesemo z mesom, zato je fižol pomembna nadomestitev za meso. Zrnje fižola vsebuje med 20 in 25 % proteinov, glavna založna beljakovina fižola pa je fazeolin (Broughton in sod., 2003). Poleg vira energije in proteinov, vsebuje fižol tudi flavonole in njihove glikozide, antocianine, proantocianidine, isoflavone in fenolne kisline, ki zaradi svojega antioksidativnega delovanja prispevajo k zmanjšanju tveganja za nastanek določenih bolezni (Duranti, 2006). Je pomemben vir mineralov, kot so železo, fosfor, magnezij, mangan, v manjših količinah pa še cink, baker in kalcij. Med vitamini vsebuje tiamin, riboflavin, niacin, vitamin B<sub>6</sub> in folno kislino (Lin in sod., 2008; Kutoš in sod., 2002). Uživanje fižola zato zmanjšuje tudi tveganje za nekatera srčna in črevesna obolenja (Tharanathan in Mahadevamma, 2003; Doria in sod., 2012).

Glavna korenina pri fižolu je bolj slabo razvita glede na stranske korenine, kjer so gomoljčki z nitrifikacijskimi bakterijam, ki so videti kot izrastki na korenini. Steblo fižola je tanko, okroglo in šesterorobo. Po višini stebla razdelimo kultivarje v nizke (30 do 50 cm), srednje visoke (50 do 130 cm) in visoke (150 do 600 cm). Na steblu so izmenično razporejeni listi s prilisti. Po vzniku se najprej razvijeta dva srčasta in celoroba lista, vsi naslednji listi pa so trojni. Cvetovi so dvospolni, izraščajo iz nodijev in so lahko beli, rumeni, bledorožnati, rdeči ali vijolični. Fižol je večinoma samooprašna rastlina, vendar je možno tudi opraševanje s tujim cvetnim prahom, ki ga prenašajo žuželke. Plod je nitast ali breznitni strok, dolg 10 do 30 cm in širok 2 do 3 cm.

Lahko je zeleno, rumeno ali pisano obarvan, raven ali ukrivljen, na prerezu pa okrogel ali ploščat (Černe, 1997).

Za svojo rast zahteva fižol toplo, vlažno podnebje, zlasti slabo prenaša sušo in vročino. Predvsem v začetku rasti zahteva veliko svetlobe, sicer so rastline pretegnjene. Med kalitvijo zahteva veliko toplote, zato ga na prosto sejemo šele maja, ko se temperatura tal dvigne na 10 do 15 °C. Optimalna temperatura za razvoj fižola je 18 do 25 °C, medtem ko se pri temperaturah pod 15 °C količina pridelka zmanjša. Neugodno delujejo tudi temperature nad 35 °C. Fižol zahteva veliko vlage v tleh, kajti že ob kalitvi zrno vsrka 105 % vlage od teže suhega fižola, zato hitro in enakomerno vznikne samo v vlažni zemlji. Optimalna talna vlaga je 60 do 75 % poljske kapacitete tal za vlago. Poleg vlage v tleh zahteva tudi visoko zračno vlago. Optimalna zračna vlažnost za fižol znaša od 65 do 80 % relativne vlage zraka. Prevelika zračna in talna vlaga vplivata na podaljšanje rastne dobe, pri preveliki zračni vlagi in visokih temperaturah pa rastlinam odpadajo cvetovi in postanejo občutljive za napad bolezni. Neugodno pa deluje tudi preobilica vode v povezavi z nizkimi temperaturami. Fižol zelo dobro uspeva na peščeno-ilovnatih tleh oz. tleh, ki dobro zadržujejo vodo, imajo srednje visok nivo podtalnice, v zemlji pa dovolj kalcija. Optimalni pH tal je od 6,5 do 7,8, zelo slabo pa uspeva v tleh s pH pod 5,5, ker se ne morejo tvoriti nitrifikacijske bakterije, ki živijo na fižolovih koreninah (Černe, 1997).

V okviru Slovenske rastlinske genske banke pri Kmetijskem inštitutu Slovenije hranimo 1035 genskih virov fižola, ki so bili v zadnjih 25 letih zbrani na območju Slovenije (Šuštar-Vozlič in sod., 2012). Večino virov predstavlja navadni fižol, katerega pridelovanje je najbolj razširjeno v Sloveniji, manjši del pa je turškega fižola. V zbirki imamo tudi 61 genskih virov fižola, ki smo jih pridobili v okviru sodelovanja v mednarodnih ekspedicijah v tujini ter 39 virov, ki smo jih za potrebe raziskovalnega dela pridobili iz drugih genskih bank v Evropi in svetu. Del zbirke je bil podrobneje ovrednoten z uporabo morfoloških, biokemijskih in molekulskih markerjev. Maras (2007) je v analizo genetske variabilnosti genskih virov navadnega fižola vključil 100 slovenskih in 39 referenčnih genotipov. Pri proučevanju morfoloških značilnosti je pri slovenskih genotipih opazil vse morfotipe, prisotne pri referenčnih genotipih, kar kaže na veliko fenotipsko pestrost slovenskega navadnega fižola. Z analizi fazeolina je ugotovil, da slovenski genotipi navadnega fižola vsebujejo vse tri tipe fazeolina, ki so značilni za mediteranski prostor, C-, T- in S-tip. Z namenom dodatno pojasniti variabilnost slovenske zbirke navadnega fižola in jo umestiti v skupni genski fond fižola so 139 genskih virov fižola analizirali tudi z molekulskimi markerji (polimorfizmom dolžin pomnoženih restrikcijskih fragmentov oz. AFLP) (Šuštar-Vozlič in sod., 2006; Maras, 2007). Pri večini (85) slovenskih genotipov so ugotovili andsko poreklo, v

veliko manjšem številu (15) pa srednjeameriško, kar kaže na močnejšo zastopanost andskega genskega sklada znotraj slovenske dednine navadnega fižola. Maras in sod. (2008) so preučevali tudi učinkovitost AFLP in SSR (kratka ponovljiva zaporedja) markerjev pri vrednotenju genetske raznolikosti in klasifikaciji navadnega fižola glede na poreklo. Rezultati raziskave kažejo, da sta markerska sistema SSR in AFLP podobno uspešna pri vrednotenju genetske raznolikosti navadnega fižola in njegovi klasifikaciji glede na poreklo. Genetsko variabilnost in populacijsko strukturo akcesij razdeljenih na skupine, glede na različno geografsko poreklo (Slovenija in Avstrija) in časovni okvir so preučevali z markerji SSR (Maras in sod., 2006; Maras in sod., 2013). Največ akcesij iz posamezne skupine so uvrstili v andski genski sklad. Velika zastopanost andskega genskega sklada uvršča slovenske genotipe k genotipom mediteranskih držav, kot sta Španija in Italija. Pri avstrijskih genotipih pa so ugotovili zastopanost srednjeameriškega porekla, kar je verjetno povezano z vnosom genotipov iz zahodnega in severnega dela Evrope na začetku prejšnjega stoletja.

# 2.2 MEHANIZMI ODZIVA NA SUŠNI STRES PRI RASTLINAH

Razumevanje odziva rastlin na sušo je ključnega pomena za vzpostavitev pogojev, ki omogočajo potrebne prilagoditve za pridelovanje v neugodnih razmerah in vodijo k večji zmožnosti preživetja rastlin, njihovi izboljšani rasti in razvoju ter zagotavljajo večji in kakovostnejši pridelek. Pomanjkanje vode za rastlino se ne pojavi samo ob sušnem stresu, temveč tudi ob stresu zaradi mraza, povišanih temperatur ali pa ob visoki slanosti. Zato rastline pri odzivu na te stresorje v določeni meri uporabljajo enake mehanizme (Chaves in sod., 2003).

Usoda rastlinskih celic je odvisna od intenzitete in trajanja izpostavljenosti stresu in od zaščitnih mehanizmov rastline. Splošni odziv rastlin na sušne razmere vključuje fiziološke in molekularne procese, od katerih so nekateri pogosto škodljiva posledica stresa, drugi pa pomagajo rastlini pri obrambi proti stresu (Ramachandra Reddy in sod., 2003; slika 1).

Rastline v sušnem stresu, glede na sposobnost prilagoditve, vzpostavljajo različne mehanizme, ki jim pomagajo preživeti. Dva takšna mehanizma sta izogib stresu in toleranca. Izogib sušnem stresu je sposobnost rastline, da vzdržuje visok vodni potencial tudi v sušnih razmerah. To doseže z morfološkimi spremembami, kot so zmanjšana prevodnost listov za CO<sub>2</sub>, zmanjšana listna površina in povečana gostota ali globina korenin. Toleranca na sušo pa je zmožnost rastline, da vzdržuje normalne celične funkcije pri nizkem vodnem potencialu v tkivih. Toleranco rastlina vzpostavi s celičnimi in tkivno specifičnimi fiziološkimi in molekularnimi mehanizmi. Ti mehanizmi vključujejo spremembe v izražanju specifičnih genov in kopičenje določenih

proteinov, ki imajo pomembno vlogo med sušnim stresom, ali pa zmanjšanje vsebnosti tistih proteinov, ki jih rastlina takrat ne potrebuje in so lahko celo škodljivi (Chaves in sod., 2003; Ramachandra Reddy in sod., 2004; Khan in sod., 2010).



Slika 1: Fiziološki, biokemijski odziv ter odziv na nivoju genov na sušni stres pri rastlinah (Ramachandra Reddy in sod., 2004: 1198)

Figure 1: Physiological, biochemical response and response at gene level to drought stress in plants (Ramachandra Reddy et al., 2004: 1198)

Rastline občutijo sušo, ko je oskrba korenin z vodo močno zmanjšana ali pa ko se transpiracija močno poveča. Pri tem se v rastlinah tvori hormon abscizinska kislina (ABA), ki ima pomembno vlogo pri odzivu in vzpostavljanju tolerance na sušo, vpliva pa tudi na dormanco semen in zakasnelo kalitev. Povečana koncentracija ABA v sušnih pogojih vpliva na razvoj in rast rastline, tako da se spremeni razmerje rasti med koreninami in steblom/poganjki, korenine rastejo v globino, zmanjša se rast listov. ABA povzroča zaprtje listnih rež skupaj z drugimi dejavniki, kot so zmanjšanje turgorskega tlaka v listih in zmanjšanje vodnega potenciala. Pri zaprtih listnih režah ne pride več do asimilacije CO<sub>2</sub>, zato se znotrajcelična količina CO<sub>2</sub> zniža in zmanjša se aktivnost fotosintetskega sistema. Za proučevanje vloge ABA v sušnem stresu so pripravili številne mutante, s katerimi so ugotovili, da sta prisotna dva sistema regulacije izražanja genov, od ABA odvisni in od ABA neodvisni (Ramachandra Reddy in sod., 2004; Farooq in sod., 2009). Na osnovi genetskih analiz so ugotovili, da ni jasne meje med

ABA odvisnimi in ABA neodvisnimi regulatornimi potmi. Tudi za molekule, ki so običajno povezane z enim ali drugim regulatornim sistemom, velja, da pogosto medsebojno vplivajo pri signalnih poteh. Pri medsebojnem signaliziranju običajno sodeluje kalcij, ki služi kot sekundarni prenašalec pri številnih stresih (Mahajan in Tuteja, 2005). Promotorji genov, ki se izražajo ob suši, visoki slanosti in mrazu, imajo dva *cis*-delujoča elementa - element DNA odziven na ABA (ABRE) in element DNA odziven na dehidracijo (DRE). Od ABA odvisno izražanje genov je povezano z ABRE, DRE element pa ABA ne uravnava (Bray, 1993; Shinozaki in Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Signalne poti aktivirajo številne gene, katerih produkti vplivajo na vzdrževanje celične homeostaze in omogočajo preživetje ob sušnem stresu. Pomemben element odziva so proteini, kot so akvaporini in ionski prenašalci, ki so vpleteni v prevzem in prenos ionov (Rodriguez in sod., 2005). Med bistvenimi so tudi geni, ki kodirajo encime, ključne za detoksifikacijo reaktivnih kisikovih spojin (ROS), kot so superoksid dismutaza, katalaza, askorbat peroksidaza, peroksidaza, glutation reduktaza in monodehidroaskorbatna reduktaza. V stresu se poveča tudi vsebnost spojin, kot so flavonoli, antocianini, karotenoidi in askorbinska kislina, ki sodelujejo v obrambi proti ROS (Farooq in sod., 2009). ROS vključujejo superoksidne anionske radikale  $(O_2^{-1})$ , singletni kisik ( $^{1}O_{2}$ ), vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in hidroksilne radikale ( $\cdot$ OH), tvorijo pa se zaradi neravnovesja med razpoložljivo svetlobo in njenim koriščenjem v procesih fotosinteze, ki ga povzroči pomanjkanje vode. To vodi do spremenjenega ravnotežja med tvorbo in porabo elektronov v svetlobni reakciji fotosinteze in sinteze ROS (Ramachandra Reddy in sod., 2004). ROS oksidirajo različne biomolekule, jih poškodujejo in s tem onemogočijo njihovo delovanje.

Funkcionalnost poškodovanih molekul se lahko povrne s popravljalnimi mehanizmi, lahko pa poteče biosinteza novih molekul, ki nadomestijo poškodovane. Le-ti celici niso več potrebni in so lahko celo škodljivi. V tem primeru je pomembno delovanje proteaz, ki take proteine razgradijo in s tem tudi sprostijo aminokisline, ki jih celica uporabi za sintezo potrebnih proteinov (Vaseva in sod., 2011). Vendar v pogojih hudega stresa in pri velikem številu poškodovanih molekul pride do okvare celičnih funkcij in nazadnje do smrti celice. Zato so pomemben element odziva genski produkti, ki neposredno ščitijo celice, kot so proteini pozne embriogeneze (LEA), šaperoni in osmoprotektanti (Rodriguez in sod., 2005). Zaščitni proteini stabilizirajo celične membrane in mnoge proteine, ki bi jih pomanjkanje vode poškodovalo ali pa povzročilo njihovo agregacijo (Vaseva in sod., 2011). Osmoprotektanti ali osmoliti so majhne molekule, katerih kopičenje prepreči izgubo vode iz celice in omogoča vzdrževanje celičnega turgorja. Pomembni so za osmotsko prilagajanje ali osmoregulacijo, kjer pride do akumulacije ionov, npr. K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> in Cl<sup>-</sup> (Chaves in sod., 2003; Farooq in sod., 2009). Kopičijo se tudi organske spojine, kot so prolin, glutamat in druge aminokisline, poliamini, polioli, alkoholi (pinitol, manitol, sorbitol), sladkorji (trehaloza, saharoza), oligosaharidi in kvarterne amonijeve substance (glicin betain). Prisotnost osmolitov poleg osmoregulacije prispeva tudi pri stabilizaciji celičnih membran in zaščiti pred ROS ter pripomore k vzdrževanju pravilne konformacije proteinov (Mahajan in Tuteja, 2005). Hidroksilne skupine alkoholov lahko namreč nadomestijo hidroksilno skupino vode in preko hidrofilnih interakcij z membranskimi lipidi in proteini pripomorejo k vzdrževanju strukturne integritete membran.

Zaščitne spojine so pomembne tudi zato, ker ima stres zaradi pomanjkanja vode velik vpliv na celično steno. Le-ta je sestavljena iz celuloznega in hemiceluloznega ogrodja, znotraj katerega je matriks iz pektina in proteinov. Izguba vode iz matriksa lahko zaradi nastanka ireverzibilnih vezi med polimeri vodi do velikih sprememb v njegovi strukturi (slika 2) in pripelje do spremenjenih biofizikalnih lastnosti celične stene (Moore in sod., 2008). Ob sušnem stresu ne pride samo do reorganizacije struktur v celični steni, ampak tudi do porušenja struktur v membrani. Pride do prerazporeditve membranskih proteinov, kar vpliva na porušenje integritete in selektivnosti membrane, celičnih struktur ter na izgubo aktivnosti membranskih encimov (Mahajan in Tuteja, 2005).



Slika 2: Vpliv izgube vode na strukturo rastlinske celične stene (Moore in sod., 2008: 239) A) Hidrirana celična stena; B) dehidrirana celična stena.

Figure 2: A model representing the effect of water loss on plant cell wall structure (Moore et al., 2008: 239)

A) Hydrated plant cell wall; B) dehydrated cell wall.

Zaradi sušnega stresa se velikokrat zmanjšata fotosintetska aktivnost in aktivacija respiracije, listne reže pa se zapirajo (Farooq in sod., 2009). Predvidevajo, da pride do zmanjšanja fotosintetske aktivnosti na dva načina, preko zaprtja listnih rež ali zmanjšanja metabolne aktivnosti. Premikanje listnih rež je dinamičen proces, ki vključuje kompleksno regulacijo s številnimi okoljskimi faktorji. Odziv na sušni stres

vključuje tudi preureditev metabolizma. Zmanjšanje metabolne aktivnosti je povezano s spremembami v celičnem metabolizmu ogljika, ki se pojavi na začetku dehidracijskega procesa, saj suša zmanjša sposobnost celic za asimilacijo in porabo ogljika. Aktivnost fotosinteze je odvisna od aktivnosti ribuloze-1,5- difosfat karboksilaze/oksigenaze (Rubisco) ter od sinteze ribuloza-1,5- difosfata. V sušnih pogojih se na Rubisco vežejo inhibitorji, kot je CA1P, kar katalitsko aktivnost tega encima zelo zmanjša, lahko pa pride tudi do njegove popolne inhibicije (Ramachandra Reddy in sod., 2004). V nestresnih okoliščinah ima interakcija inhibitorjev z Rubisco tudi prednosti, ker prepreči njegovo proteolitično degradacijo. Za sprostitev inhibitorjev iz vezavnih mest na Rubisco in posledično aktivacijo tega encima sta potrebna Rubisco aktivaza in hidroliza ATP. V sušnih razmerah sta zmanjšani tako aktivnost Rubisco aktivaze kot koncentracija razpoložljivega ATP, zaradi česar ostanejo inhibitorji vezani na Rubisco in s tem onemogočijo njegovo aktivacijo (slika 3). Sušni stres povzroči zmanjšanje aktivnosti tudi mnogih drugih encimov, kot sta fruktoza-1,6- difosfataza in saharoza fosfat sintaza, kar posledično vodi do zmanjšanja količin končnih produktov fotosinteze - saharoze in škroba (Shinozaki in Yamaguchi-Shinozaki, 2007).



Slika 3: Fotosinteza v povezavi s sušnim stresom ter mehanizmi, ki vodijo do zmanjšanja fotosintetske aktivnosti (Farooq in sod., 2009: 189)

Figure 3: Photosynthesis under drought stress and mechanisms in which photosynthesis is reduced under stress (Farooq et al., 2009: 189)

Z metodami molekularne biologije so identificirali številne gene, ki se inducirajo v sušnih razmerah ter transkripcijske faktorje, ki regulirajo gensko izražanje povezano s

stresom. Produkti genov induciranih ob suši imajo vlogo tako pri začetnem odzivu na stres kot tudi pri vzpostavljanju tolerance.

#### 2.2.1 Sušni stres pri fižolu

Pri navadnem fižolu so identificirali številne gene, ki se izražajo v sušnih razmerah. Colmenero-Flores in sod. (1999) so opisali gen *Pvlea*-18, katerega produkt spada med LEA proteine, ki se kopičijo v vegetativnih tkivih pri odzivu na sušni stres. Kasneje so Cruz de Carvalho in sod. (2001) poročali o povečanem izražanju gena za aspartatno proteazo v sušnem stresu. Pri koreninah navadnega fižola so Torres in sod. (2003) opisali gen *PvOCT1*, ki v rastlinah kodira organski kationski transporter. Torres in sod. (2006) so z metodo diferencialnega prikaza z obratno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo (DDRT-PCR) v koreninah fižola identificirali 24 genov povezanih s proteini, ki imajo vlogo pri signalizaciji, obnavljanju proteinov, translokaciji in regulaciji rasti korenin.

Rodriguez-Uribe in O'Connell (2006) sta objavila raziskavo osredotočeno na specifični transkripcijski faktor bZip, povezan s sušo pri koreninah fižola *P. acutifolius*. Ugotovili so, da imajo produkti gena 64 % podobnost z bZIP proteinom iz soje ter da je med bZIP proteinom iz *P. acutifolius* in navadnega fižola razlika v treh aminokislinah. Micheletto in sod. (2007) so analizirali tudi korenine fižola. S pomočjo cDNA knjižnic navadnega fižola in mikromrež so primerjali profile genskih transkriptov v sušnem stresu pri navadnem fižolu in *P. acutifolius*. Pri navadnem fižolu so zasledili samo 64 genov s spremenjenim izražanjem v suši, medtem ko so pri *P. acutifolius* poročali o 488 genih. Večino genov identificiranih v suši so pri navadnem fižolu uvrstili v funkcijsko skupino, povezano s stresom, pri *P. acutifolius* pa so zasledili veliko število genov, katerih produkti so pomembni za celično rast in metabolizem.

Podobno kot Torres in sod. (2006) so tudi Kavar in sod. (2008) na Kmetijskem inštitutu Slovenije s tehniko DDRT-PCR identificirali gene, povezane z odzivom listov navadnega fižola na sušni stres. V rastni komori in rastlinjaku so vzgojili rastline štirih različno odpornih kultivarjev navadnega fižola (Tiber, Starozagorski čern, Zorin in Češnjevec). Ugotovili so, da se je pri vseh kultivarjih 15 genov statistično značilno razlikovalo med rastlinami v suši in kontrolnimi rastlinami. Odkrili so gene s povečanim izražanjem, ki kodirajo transkripcijske faktorje, osmoprotektante, LEA proteine, protein kinaze, aldehid dehidrogenaze ter proteine vključene v metabolizem ogljikovih hidratov. Pet genov z zmanjšanim izražanjem v stresu so uvrstili v funkcionalno skupino fotosinteze. Identificirani geni pri koreninah (Torres in sod., 2006) so se razlikovali od genov, ki so jih identificirali Kavar in sod. (2008) pri listih. Kavar in sod. (2008) so ugotovili, da je pri koreninah prišlo tudi do bistveno manjše in hitrejše akumulacije genov, pri katerih je prišlo do sprememb v izražanju glede na liste. Raziskavo izražanja genov, udeleženih v odziv na sušni stres, so na Kmetijskem inštitutu Slovenije z navadnega fižola razširili na tri druge vrste iz rodu *Phaseolus: P. coccineus, P. lunatus* in *P.acutifolius* (Kavar in sod., 2011). Z metodo kvantitativnega PCR v realnem času so ovrednotili raven izražanja 13 transkriptov, za katere so v predhodni študiji (Kavar in sod., 2008) ugotovili, da se v odvisnosti od vodnega statusa rastlin navadnega fižola diferencialno izražajo. Pri obravnavanih vrstah so ugotovili enak vzorec izražanja pri vseh transkriptih. Rezultati nakazujejo, da analizirani transkripti pripadajo skupini genov, ki so odgovorni za splošen odziv vrst iz rodu *Phaseolus* na sušni stres in utegnejo pomembno prispevati k odkrivanju in pojasnjevanju molekulskih mehanizmov, odgovornih za specifičen odziv posamezne proučevane vrste iz rodu *Phaseolus* na sušni stres.

Müller in sod. (2014) so analizirali transkriptom listov pri dveh kultivarjih navadnega fižola v sušnem stresu. Identificirali so gene, udeležene pri odzivu na sušo, katerih produkti spadajo med protein kinaze, šaperone, ubikvitin-konjugacijske encime, ubikvinon oksidoreduktaze, izocitrat dehidrogenaze, kalmodulinu podobne proteine ter s hipersenzitivnostjo inducirane proteine. Na osnovi analize korenin navadnega fižola v suši so Recchia in sod. (2013) pridobili sekvence DNA, katerih produkti spadajo med transkripcijske faktorje, metabolizem ogljikovih hidratov, akvaporine, šaperone in ubikvitine. Pri večini analiziranih transkriptov so zasledili povečano izražanje v hudi suši pri kultivarju odpornem na sušo, medtem ko so pri genih, ki kodirajo kalmodulinu podobno kinazo, trehalozo 6-fosfat sintazo, fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat, zasledili zmanjšano izražanje v stresu.

Odziv navadnega fižola na sušo na nivoju proteaz je relativno dobro raziskan v primerjavi z drugimi stročnicami. Poročali so o različnih proteazah, ki so jih preučevali na nivoju izražanja genov (Torres in sod., 2003) in proteolitične aktivnosti (Cruz de Carvalho, 2001; Hieng in sod., 2004; Contour-Ansel in sod. 2010). Cruz de Carvalho (2001) so preučevali proteolitsko aktivnost pri kultivarjih navadnega fižola, ki so različno občutljivi na sušo. Ugotovili so, da se v suši poveča endoproteolitična aktivnost, ki je višja pri bolj občutljivem kultivarju kot pri tolerantnem. Hieng in sod. (2004) so v raziskavo aktivnosti proteaz vključili tri kultivarje navadnega fižola, Tiber, Zorin in Starozagorski čern. Poročali so o spremembi aktivnosti dveh serinskih proteaz v sušnem stresu. Aktivnost serinske proteinaze z molekulsko maso okoli 65 kDa se je povečala v suši pri najbolj občutljivem kultivarju (Starozagorski), pri tolerantnem kultivarju (Tiber) pa se je aktivnost zmanjšala. Identificirali so tri serinske endopeptidaze in pet serinskih aminopeptidaz, katerih aktivnosti so odvisne od starosti listov in se spreminjajo pod vplivom vodnega stresa (Budič, 2009). Razvili so tudi cimografsko analizo, ki omogoča boljšo ločljivost teh encimov in kvantitativno določanje njihovih aktivnosti v rastlinskih vzorcih (Budič in sod., 2009). Na osnovi rezultatov so nekatere od proteaz očistili in okarakterizirali. Budič in sod. (2013) so iz listov navadnega fižola kultivarja Zorin identificirali dve novi subtilazi (*PvSLP1* in *PvSLP2*). Izražanje obeh transkriptov se v sušnem stresu ni spremenilo, povečala pa se je proteolitična aktivnost *PvSLP2* v listih, kar je bilo odvisno od starosti in položaja listov. Na podlagi stopnje aktivnosti proteaz v listih so sklepali na njihovo specifično vlogo pri odzivu na sušo in senescenco. Contour-Ansel in sod. (2010) so na osnovi aktivnosti aspartatnih proteaz, ki se inducirajo v suši, karakterizirali encim PvAP1. Prekurzorska sekvenca encima ima vse karakteristike tipičnih rastlinskih aspartatnih proteaz, fitepsinov. Ugotovili so, da je izražanje gena *PvAP1* regulirano s sušnim stresom. Pri šibkem stresu je prišlo do povečanja izražanja gena pri kultivarju občutljivem na sušo, pri močnejšem stresu pa pri kultivarju tolerantnem na sušo.

#### 2.3 ANALIZA PROTEOMA IN ODZIV NA SUŠNI STRES

Rastlina v obrambo proti sušnemu stresu vključuje veliko število proteinov, kar je razvidno že iz predhodnega pregleda mehanizmov odziva. Čeprav so bili z eksperimentalnimi prostopi, ki so jih uporabljali do nedavnega, identificirani mnogi med njimi, je razvoj novih metod v zadnjem desetletju omogočil velik napredek. Med te metode, t. i. »omike«, uvrščamo poleg genomike, transkriptomike, metabolomike in še nekaterih klasičnih biokemijskih tehnik in tehnik celične biologije tudi proteomiko (Komatsu in sod., 2013; Ibáñez in sod., 2013). Proteomika obravnava celokupni nabor proteinov v določeni celici, tkivu ali organizmu, ki ga imenujemo proteom, obsega pa metode, ki omogočajo določitev in identifikacijo velikega števila proteinov prisotnih pod določenimi pogoji in v določenem času. S pomočjo proteomike lahko dobimo širok vir informacij o bioloških sistemih, kot so podatki o koncentracijah, interakcijah, funkcijah in katalitskih aktivnostih proteinov (Mitulovic in Mechtler, 2006).

Kljub hitremu napredku tehnik in metod, ki pokrivajo področje proteomike, so do sedaj identificirali samo majhen delež celičnega proteoma. To je uspelo samo pri najbolj preučevanih organizmih (človek, vinska mušica (*Drosophila melanogaster*), navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*), riž (*Oryza sativa*)). Vendar celo pri naštetih organizmih ostaja funkcija velikega števila proteinov nepojasnjena (Jorrín-Novo in sod., 2009). Določen protein ima lahko povsem drugačno funkcijo v različnih tkivih in celo v isti celici. Funkcija proteinov je v določeni meri odvisna od lokalizacije proteinov znotraj celice in od njihove dejanske aktivnosti. Znotraj celice so proteini glede na njihove funkcije porazdeljeni neenakomerno, saj je mnogo večje število proteinov vključenih v celično homeostazo, metabolizem in strukturo celice, kot pa tistih, ki imajo vlogo v procesih signaliziranja. Zato je določitev in kvantifikacija proteinov, ki v

celicah niso prisotni v velikem številu, mnogo težja od določitve proteinov, katerih vsebnosti so večje (Zhang in sod., 2009; Corthals in Rose, 2007)

Objavljene so številne raziskave sušnega stresa na proteomskem nivoju pri različnih rastlinskih vrstah, kot so riž (Salekdeh in sod., 2002a), sladkorna pesa (*Beta vulgaris*) (Hajheidari in sod., 2005), koruza (*Zea mays*) (Vincent in sod., 2005), pšenica (*Triticum durum*) (Caruso in sod., 2009) ter druge. V nadaljevanju je podan pregled proteoma pri stročnicah v suši.

#### 2.3.1 Proteomika in sušni stres pri stročnicah in fižolu

Pri stročnicah so raziskave proteoma povezanega s sušnim stresom opravljene večinoma na modelnem organizmu trnate meteljke (*Medicago truncatula*) in soji (*Glycine max*) (Yamaguchi in sod. 2010; Mohammadi in sod., 2012), čičeriki (*Cicer arietinum*) (Pandey in sod., 2008; Bhushan in sod., 2011) ter arašidih (*Arachis hypogaea*) (Kottapalli in sod., 2009 in 2013).

Med stročnicami se je trnata meteljka uveljavila kot modelni organizem zlasti pri študijah simbiotskih interakcij med rastlino in mikrobi ter tudi na drugih področjih rastlinske biologije (Lei in sod., 2007). Med bolj obsežne proteomske študije na stročnicah spada publikacija o analizi proteoma trnate meteljke v normalnih rastnih pogojih (Watson in sod., 2003). Identificirali so proteine, ki so jih izolirali iz listov, stebel, korenin, semen, cvetov in celičnih suspenzij. Največje število proteinov je bilo pri listih, steblih in cvetovih povezanih z energijskim metabolizmom, pri suspenziji celic z energijskim metabolizmom in skladiščenjem, pri koreninah z obrambnimi procesi ter pri semenih s skladiščenjem. Larrainzar in sod. (2007) so preučevali vpliv simbiotskih interakcij med noduli trnate meteljke in bakterijami Sinorhizobium meliloti v povezavi s sušnim stresom. Ločena izolacija rastlinskih in bakterijskih proteinskih frakcij je omogočila neodvisno analizo odziva na stres obeh simbiotskih udeležencev. Največ proteinov, ki so jih identificirali, je bilo udeleženih v metabolizmu aminokislin ter pri sintezi ali razgradnji proteinov. Zasledili so encime, ki so udeleženi pri asimilaciji dušika v nodulih, ter proteine, ki imajo vlogo pri biosintezi aminokislin, ki vsebujejo žveplo. Ugotovili so, da imajo pomembno vlogo tudi proteini, udeleženi pri obrambnih reakcijah proti stresu, signalizaciji in procesih metabolizma. Poleg omenjene raziskave so Larrainzar in sod. (2009) objavili raziskavo o povezavi med metabolizmom ogljika in dušika v nodulih ter simbiotsko fiksacijo dušika pri rastlinah trnate meteljke v sušnem stresu. Predvidevajo, da je inhibicija simbiotske fiksacije dušika pri rastlinah v sušnem stresu povezana z oslabljenim metabolizmom bakterij in sposobnostjo fiksiranja N<sub>2</sub>.

Sušni stres na koreninah so proučevali tudi pri soji, kjer so bili identificirani proteini v glavnem udeleženi v mehanizmu tolerance na sušni stres (Yamaguchi in sod., 2010). Proteine so povezali z vlogo pri kontroli mehanizma ROS, biosintezi isoflavonoidov, kontroli celične smrti in kontroli razgradnje proteinov. Proteomsko analizo korenin pri soji v sušnem stresu so opravili tudi Alam in sod. (2010). Prisotnost proteina feritina in dehidrina so zasledili samo pri vzorcih v sušnem stresu, čeprav so identificirali še 26 proteinov z različnimi celičnimi funkcijami, kot so metabolizem ogljikovih hidratov in dušika, signalna transdukcija, obramba celic in programirana celična smrt. Proteomske raziskave soje v sušnem stresu niso omejene samo na korenine, temveč tudi na nadzemna zelena tkiva. Mohammadi in sod. (2012) so analizirali spremembe pri mladih kalečih rastlinah soje podvržene suši ali osmotskemu stresu s polietilen glikolom. Analizirali so proteine iz listov, hipokotila in korenin. Korenine so bile izmed vseh treh analiziranih tkiv, organ z največjim številom proteinov, katerih izražanje se je spremenilo v stresnih razmerah. Pri listih so se v stresnih razmerah povečale vsebnosti proteinov, povezanih z metabolizmom, vsebnost proteinov, povezanih z energijskimi reakcijami in sintezo proteinov pa se je zmanjšala. Ugotovili so, da se je v vseh treh organih rastlin v sušnem stresu zmanjšala vsebnost metionin sintaze. Na tej osnovi ter na osnovi rezultatov izražanja mRNA pri rastlinah v stresu zaradi suše, slanosti in vročine so sklepali, da je izražanje metionin sintaze povezano z odzivom na sušo. Podobno kot Mohammadi in sod. (2012) so tudi Nouri in Komatsu (2010) za analizo proteinov plazmaleme uporabili mlade kaleče rastline soje v osmotskem stresu induciranem s polietilen glikolom. Poseben poudarek so avtorji namenili proteinu kalneksinu, ki se v osmotskem stresu nalaga v plazmalemi in proteinu H<sup>+</sup>-ATPazi. Pri obeh so opazili povečano izražanje v stresnih razmerah.

Pandey in sod. (2008) so analizirali jedrni proteom čičerike v povezavi s sušo. Med proteini, ki so jih določili, jih je največ vpletenih v gensko transkripcijo in replikacijo, celično signaliziranje ter remodeliranje kromatina. Bhushan in sod. (2007 in 2011) so objavili dve raziskavi o izražanju proteinov pri čičeriki v sušnih razmerah. Najprej so objavili proteomsko analizo proteinov, ki se različno izražajo v zunajceličnem matriksu rastlin v suši (Bhushan in sod., 2007). Identificirali so 134 proteinov, ki so v glavnem udeleženi v funkcije signalne transdukcije, modifikacije celične stene, metabolizma ter celične obrambe. Avtorji so sklepali tudi na morebitno vlogo obravnavanih proteinov na toleranco proti dehidraciji. Kasneje so analizirali proteom zunajceličnega matriksa čičerike v sušnem stresu pri kultivarju, občutljivem na sušo, in kultivarju, ki je toleranten na sušo (Bhushan in sod., 2011). Ugotovili so, da je različno izražanje določenih proteinov povezano z različnim genotipom. Podobno študijo s tremi različnimi genotipi arašidov v sušnem stresu so preučevali Kottapalli in sod. (2009). S proteomsko analizo listov so identificirali proteine, ki so jih glede na funkcije razvrstili

v deset skupin. Največja skupina proteinov je povezana s funkcijami fotosinteze, lektini, signalne transdukcije in vodnega stresa. Predvidevajo, da so določeni proteini udeleženi pri mehanizmu tolerance na sušo pri arašidih. Novejša študija, ki so jo opravili Kottapalli in sod. (2013), pa se osredotoča na proteomsko analizo semen arašidov izpostavljenih suši. Identificirali so 93 proteinov, ki so se različno izražali v suši. Ugotovili so, da ima suša največji vpliv na proteine udeležene pri glikolizi, metabolizmu saharoze in škroba ter metabolizmu maščobnih kislin. Omenjena študija naj bi prispevala k dopolnitvi znanja za izboljšavo količine in kakovosti pridelka.

Navadni fižol na proteomskem nivoju še ni bil veliko raziskan, objav je malo, še posebno v povezavi s sušo. Večina raziskav je bila narejena na semenih in listih navadnega fižola, vendar ne v povezavi s sušo. De la Fuente in sod. (2011) so objavili rezultate proteomske analize fižolovih semen, kjer so primerjali tri različne postopke izolacije proteinov iz semen. Pri ekstrakcijskih metodah, ki sta vključevali triklorocetno kislino v kombinaciji z acetonom in komercialni komplet za ekstrakcijo, so ekstrahirali največje število založnih proteinov in proteinov, ki sodelujejo pri obrambi. Pri ekstrakcijskem postopku, ki je vključeval fenol, pa je bilo največ proteinov povezanih z metabolizmom ogljikovih hidratov. Marsolais in sod. (2010) so analizirali proteom semen, ki so imeli zmanjšano vsebnost fazeolina, ki je glavni založni protein semena fižola. Zmanjšana vsebnost fazeolina pripomore k izboljšani kvaliteti semen, saj pride do povečane vsebnosti proteinov, ki vsebujejo aminokislini metionin ali cistein, ki sta pomembni pri prehrani ljudi in živali. S pristopi transkriptomike, proteomike in metabolomike so Mensack in sod. (2010) primerjali genetske razlike med akcesijami in kultivarji navadnega fižola na nivoju semen. Analiza je pokazala, da so pristopi »omik« uspešni pri ločevanju in klasifikaciji kultivarjev glede na poreklo. To potrjuje hipotezo, da med kultivarji, ki pripadajo različnim genskim skladom, obstajajo razlike v genski transkripciji, izražanju proteinov ter sintezi in metabolizmom majhnih molekul. Lee J. in sod. (2009) so analizirali proteom listov navadnega fižola, okuženega z rjo, z namenom, da bi določili razlike na nivoju proteoma pri infekciji z rjo. Ugotovili so, da imajo pri obrambnem mehanizmu proti infekciji veliko vlogo proteini za odpornost proti patogenom, ki jih kodirajo geni za odpornost proti škodljivim organizmom oz. Rgeni.

V povezavi s sušo so Sengupta in sod. (2011) objavili rezultate proteomske analize korenin mungo fižola (*Vigna radiata*) izpostavljenega različnim stopnjam sušnega stresa. Identificirali so proteine, ki sodelujejo pri detoksifikaciji povezani z ROS, metabolizmu žvepla, morfologiji korenin, sintezi proteinov/energijskem metabolizmu in celičnem signaliziranju (Sengupta in Reddy, 2011). Na začetni stopnji sušnega stresa so zaznali zmanjšane vsebnosti proteinov povezanih s citoskeletom, vendar se je njihova

vsebnost povečala pri daljši izpostavljenosti stresu. Pri glikoproteinih, kot so lektini, pa so povečano vsebnost zaznali tako pri kratkotrajni kot tudi pri daljši izpostavljenosti stresu, kar nakazuje na njihovo pomembno vlogo pri odzivu na sušo pri stročnicah. V stresu so opazili tudi povečano vsebnost proteinov, povezanih z oksidativnim stresom, kot so Cu/Zn superoksidna dismutaza, oksidoreduktaza in aldehid reduktaza (Sengupta in sod., 2011).

Mehanizem tolerance in odziv navadnega fižola na sušo še ni natančno opredeljen, zato smo se v doktorski nalogi osredotočili na analizo proteoma v sušnem stresu v listih in steblih.

#### 2.4 GLIKOZILACIJA PROTEINOV

Posttranslacijske modifikacije (PTM) igrajo pomembno vlogo pri številnih celičnih procesih, kot so encimska regulacija, signalna transdukcija, vplivajo na lokalizacijo proteinov, interakcije med njimi in njihovo stabilnost. Proteomske metode med drugim omogočajo tudi uspešno analizo modificiranih proteinov in peptidov. Veliko število različnih modifikacij, ki pogosto spremenijo fizikalno-kemijske lastnosti proteinov, je samo eden od izzivov proteomike. Proteinske modifikacije, ki otežujejo analizo, so pogosto samo začasno prisotne, časovno in mestno specifične (Reinders in Sickmann, 2007). V literaturi poročajo o okoli 300 PTM, med katerimi sta najbolj preučevani glikozilacija in fosforilacija (Johnson in Eyers, 2010). Mnoge celične funkcije pa temeljijo tudi na drugih PTM, kot so acetilacija, metilacija, sulfatacija, ubikvitinacija in druge (Mann in Jensen, 2003). Obširna analiza različnih PTM hkrati običajno ni možna, zato so analize usmerjene predvsem na posamezne proteine oz. majhno število proteinov, ali pa so usmerjene v analizo točno določene spremembe. Pri našem delu smo preučevali glikoproteine in glikozilacijo, zato se bomo v nadaljevanju osredotočili na podrobnejši pregled glikozilacije.

Glikozilacija je ena izmed najbolj pomembnih in pogostih oblik posttranslacijskih modifikacij proteinov. Tako pri rastlinah kot tudi pri drugih evkariontih so najpogosteje glikozilirani sekrecijski proteini. Določene oblike glikozilacije pa se pojavljajo tudi na številnih citosolnih in jedrnih proteinih (Fitchette in sod., 2007).

Najbolj sta razširjena dva tipa glikozilacije: N- in O-glikozilacija. O-glikozilacija je povezana s prisotnostjo oligosaharidov na hidroksilnem kisiku na stranski verigi serina, treonina ali hidroksiprolina. Najbolj pogosti O-glikani pri rastlinah so s hidroksiprolinom bogati glikoproteini, ki so večinoma prisotni na celičnih stenah ali plazmalemi in jih lahko razdelimo na tri skupine: ekstenzini, s prolinom/hidroksiprolinom bogati glikoproteini ter arabinogalaktani. Prvi dve skupini

imata pomembno strukturno vlogo v celični steni. Ranjeno tkivo in napad škodljivcev na rastlinska tkiva spodbudi sintezo določenih proteinov skupine ekstenzinov in s prolinom/hidroksiprolinom bogatih glikoproteinov. Arabinogalaktani pa imajo vlogo pri signaliziranju, razvoju in širjenju celic, celični proliferaciji in somatski embriogenezi. V skupino s hidroksiprolinom bogati O-glikozilirani glikoproteini spadajo tudi lektini iz družine razhudnikovk (*Solanaceae*), ki vsebujejo neglikozilirano ogljikohidratno domeno bogato s cisteini in glicini ter glikozilirano domeno bogato s hidroksiprolinom. Omenjeni lektini so prisotni v vakuolah rastlin razhudnikovk, kjer predvidevajo, da imajo vlogo pri obrambi patogenov (Fitchette in sod., 2007; Etzler in Mohnen, 2009).

Mnogo bolj kot O-glikozilacija je pri rastlinah raziskana N-glikozilacija, ki je povezana z modifikacijo asparagina v zaporedju Asn-X-Ser/Thr (X je lahko katerakoli aminokislina, razen prolina). Rastlinske N-glikane lahko razdelimo na štiri tipe: visokomanozne (oligomanozne), kompleksne, hibridne ter paucimanozne tipe (slika 4; Etzler in Mohnen, 2009).



Slika 4: Vrste N-glikanov pri rastlinah (Etzler in Mohnen, 2009) Figure 4: Types of N-glycans found in plants (Etzler and Mohnen, 2009)

Začetna sinteza N-glikanov pri rastlinah in sesalcih je enaka, kasnejše modifikacije Nglikanov v golgijevem aparatu pa se razlikujejo. Sam proces N-glikozilacije se prične na citosolni strani endoplazemskega retikuluma z dolihol oligosaharidnim prekurzorjem (slika 5, Song W. in sod., 2011). Sledi preskok oligosaharidnega prekurzorja na lumensko stran endoplazemskega retikuluma, kjer se sinteza nadaljuje do strukture Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (Glc: glukoza; Man: manoza; GlcNAc: N-acetilglukozamin). Ta struktura je povezana s proteinsko verigo preko asparaginskega ostanka v zaporedju Asn-X-Ser/Thr. Predvidevajo, da je okoli 70 % vseh Asn-X-Ser/Thr mest na sekrecijskih proteinih glikoziliranih. To nakazuje, da je učinkovitost glikozilacije odvisna od številnih dejavnikov, kot so vrsta aminokislin znotraj in poleg glikozilacijskega mesta, položaj slednjega znotraj peptidne verige, hitrost zvijanja proteinov in dostopnost dolihol prekurzorjev. Znotraj endoplazemskega retikuluma se terminalne glukoze ter eden ali dva manozna ostanka odcepijo od Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Nato sledi prenos glikoproteina v golgijev aparat, kjer  $\alpha$  1,2-manozidaza odstrani do štiri manozne ostanke, da nastane struktura Man<sub>5-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Na tej stopnji so strukture Man<sub>5-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> opredeljene kot glikani oligomanoznega tipa. Za sintezo kompleksnih glikanov je potreben dodatek N-acetilglukozaminskega ostanka na manozni ostanek z N-acetilglukozamin transferazo I. N-glikani se po prehodu glikoproteina preko sekrecijske poti nadalje modificirajo z glikozidazami in glikoziltransferazami. Pri kompleksnih glikanih je lahko  $\alpha$ -1,3 fukoza vezana na GlcNAc in  $\beta$ -1,2 ksiloza povezana s centralnim manoznim ostankom (Song W. in sod., 2011).



Glc (glukoza); GlcNAc (N-acetilglukozamin); Man (manoza); Gal (galaktoza); Fuc (fukoza); NeuAc (N-acetilneuraminska kislina); Xyl (ksiloza)

Slika 5: N-glikozilacija pri rastlinah in sesalcih (Song W. in sod., 2011: 1464)Do razlik v glikozilaciji med rastlinami in sesalci pride v golgijevem aparatu.Figure 5: N-glycosylation in plants and mammals (Song W. et al., 2011: 1464)Differences in glycosylation pattern between plants and mammals appear in the Golgi apparatus.

Pri rastlinah in živalih imajo kompleksni glikani prisoten t. i. Lewis a epitop. Pri Lewis a strukturi sta lahko oba ali pa samo en GlcNAc ostanka povezana z  $\alpha$ -1,4 fukozo in  $\beta$ -1,3 galaktozo, tako da se tvori bi- oz. mono-antenarna Lewis a struktura. Lewis a epitopi so ponavadi prisotni na glikokonjugatih na celični površinah pri sesalcih in imajo vlogo pri prepoznavanju in adhezijskih procesih. Pri rastlinah so tudi prisotni na celičnih površinah, kjer predvidevajo, da imajo vlogo pri komunikacijah med celicami (Fitchette-Laine in sod., 1997).

#### 2.4.1 Posttranslacijske modifikacije in stres pri rastlinah

Objavljenih je zelo malo usmerjenih raziskav o analizah PTM proteoma pri rastlinah v abiotskem stresu. Med objavami, ki obravnavajo analize PTM, so največ poročali o fosforilaciji. Pri abiotskem stresu ima fosforilacija pomembno vlogo pri signalni transdukciji in uravnavanju funkcij številnih encimov (Kosova in sod., 2011). Največ raziskav o fosforilaciji proteoma v povezavi z abiotskim stresom so objavili na rižu. Khan in sod. (2005) so preučevali spremembe pri fosforilaciji proteinov v koreninah in listih mladih kalečih rastlin riža, ki so bile izpostavljene stresu z ABA, NaCl in nizkim temperaturam. Izpostavitev stresu je povzročila fosforilacijo kalretikulina, ki je udeležen pri signalizaciji. Stres je povzročil fosforilacijo tudi pri citoplazemski malat dehidrogenazi pri stresu zaradi ABA in NaCl, družini proteinov s cinkovimi prsti pri stresu zaradi ABA ter gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazi in proteinu podobnemu kalmodulinu pri stresu zaradi nizkih temperatur. Avtorji so zaključili, da sta metabolizem glikolize in signalni procesi povezani s kalcijem tesno povezana s fosforilacijskimi kaskadami pri rižu v omenjenih stresnih pogojih. Chitteti in Peng (2007) sta preučevala spremembe v fosfoproteomu riža v pogojih slanosti. Poročala sta o fosforilaciji v stresu pri ribosomalnem proteinu, proteinu vročinskega šoka (hsp70), gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazi, endo-β-1, 3-glukozidazi in drugih. Ke in sod. (2009) so poročali o fosfoproteinih pri rižu v sušnem stresu. Identificirali so deset fosfoproteinov, kot so NAD-malat dehidrogenaza, ribosomski protein, germinu podoben protein, proteini inducirani ob stresu, prisotnosti ABA in etilenu ter druge. Omenjeni proteini prispevajo k nadgradnji znanja o regulatornem mehanizmu v povezavi s proteini induciranimi pri rižu v suši.

Na rižu so preučevali tudi vpliv nizkih temperatur na spremembe v vsebnosti glikoproteinov (Komatsu in sod., 2009). Ugotovili so, da nizke temperature vplivajo na spremenjene vsebnosti 12 glikoproteinov, ki so veliki meri udeleženi v procese energijskega metabolizma. Med glikoproteini so identificirali tudi kalretikulin, pri katerem so ugotovili, da je v stresnih razmerah tudi fosforiliran.

#### 2.5 METODOLOŠKI PRISTOPI V PROTEOMIKI

#### 2.5.1 Masna spektrometrija

Tehnike, ki temeljijo na masni spektrometriji (MS), so zelo pomembne in najbolj uporabljene pri identifikaciji proteinov, ki se ločijo z 2D gelsko elektroforezo ali direktno iz mešanice peptidov. MS analizira molekule glede na njihovo razmerje med maso in nabojem. Masni spektrometer je sestavljen iz treh glavnih delov: ionizatorja, masnega analizatorja in ionskega detektorja. Ionizator pretvori molekule analita v

ionizirano obliko, v masnem analizatorju se ioni ločijo glede na razmerje med maso in nabojem (m/z), detektor pa izmeri ionski tok pri posamezni vrednosti m/z (Canas in sod., 2006).

Ionizacijske tehnike, ki so bile na voljo za delo s proteini, so v preteklosti vključevale ionizacijo s hitrimi atomi, desorpcijo v plazmi in ionizacijo s termosprejem. Spadajo med »mehke« ionizacijske tehnike, ki pretvorijo velike molekule v plinsko fazo, brez porušenja integritete molekul. Pri omenjenih metodah je največji problem povezan z občutljivostjo, saj so za analizo potrebne velike količine vzorca, kar je tudi glavni razlog, da omenjene ionizacijske tehnike niso bile primerne za rutinsko identifikacijo proteinov. Danes se za potrebe protemskih raziskav največ uporabljata ionizacija v nosilcu z lasersko desorpcijo (MALDI) ter elektrosprej ionizacija (ESI). Pri ionizaciji z elektrosprejem se tvorijo majhne kapljice topila, ki vsebujejo preiskovane molekule analita. Topilo se odstrani s toploto ali drugimi viri energije (energijska kolizija), ko kapljice vstopijo v masni spektrometer. Pri tej tehniki se običajno ohranijo nekovalentne vezi, kot so protein-protein interakcije (Yates, 2000; Feng in sod., 2008).

Ioni iz ionizatorja potujejo do masnega analizatorja, kjer se ločijo glede na razmerje med maso in nabojem (m/z). Uporablja se več vrst masnih analizatojev, kot so magnetni sektorski analizator, analizator na čas preleta ionov (TOF), kvadropolni analizator (Q) in še nekateri. Zelo se uporablja tudi Orbitrap masni analizator. Pri orbitrapu se ioni ujamejo v elektrostatično polje, ki se tvori z dvema elektrodama. Elektrodi omogočata potovanje ionov, ki potujejo različno, glede na različno razmerje med maso in nabojem. Ključne prednosti tega analizatorja sta visoka ločljivost in zmožnost določitve natančne mase (Hu in sod., 2005; Scigelova in Makarov, 2006).

MS tehnike lahko vključujejo različne kombinacije ionizatorjev in detektorjev ter tandemske masne spektrometre (MS/MS), ki so sestavljeni iz več enot masnih analizatorjev, ki so med sabo sklopljeni (Agrawal in sod., 2005; Canas in sod., 2006).

# 2.5.2 »Shotgun« proteomika

Po razvoju in nadgradnji tehnik kromatografije, masne spektrometrije in proteomske bioinformatike, se je uveljavila »shotgun« proteomika, ki predstavlja pomembno orodje pri analizi kompleksnih proteinskih vzorcev, kot so tkiva, celice, organeli in drugi proteinski kompleksi. Tehnika ne temelji na uporabi gelov, temveč na ločitvi peptidne mešanice s tekočinsko kromatografijo (LC), ki je sklopljena z MS (LC-MS) (Swanson in Washburn, 2005).

Običajno so proteinski vzorci preveč kompleksni, da bi zagotovili njihovo uspešno ločitev s t. i. »eno-dimenzionalno« separacijsko tehniko, kot je LC. Vzorci proteinov se običajno razgradijo z encimsko razgradnjo v mešanico peptidov, ki se nato ločijo s t. i. večdimenzionalnimi tehnikami za identifikacijo proteinov (multidimensional protein identification technology, MudPIT). V primeru zelo kompleksnih proteinskih mešanic je potrebna frakcionacija proteinov pred njihovo karakterizacijo. Za ta namen se uporablja ionsko-izmenjevalna, afinitetna kromatografija in kromatografija na osnovi hidrofobnih interakcij. Po frakcionaciji vzorcev se izbrane frakcije analizirajo z LC-MS (slika 6; Weckwerth, 2008).



Slika 6: Primerjava tehnike 2D gelske elektroforeze in »shotgun« proteomike z uporabo večdimenzionalne MudPIT (Weckwerth, 2008: 179)

Figure 6: Comparison of shotgun proteomics using MudPIT technology with 2D electrophoresis (Weckwerth, 2008: 179)

#### 2.5.3 Identifikacija proteinov

Za identifikacijo proteinov z MS sta se uveljavila dva pristopa proteomske analize: od »zgoraj navzdol« (top-down) in od »spodaj navzgor« (bottom-up). Pristop analize proteinov od »spodaj navzgor« temelji na encimski razgradnji proteinskega vzorca na manjše peptide, ki se analizirajo z MS. Uporablja se še proteomika od »zgoraj navzdol«. V nasprotju z eksperimenti od »spodaj navzgor«, se tu analizirajo intaktni proteini, ne pa encimsko razgrajeni. V obeh primerih se za identifikacijo proteinov običajno uporablja tandemski masni spektrometer (Han in sod., 2008).

Pri pristopu od »spodaj navzgor« se največ uporabljata peptidno mapiranje in »de novo« sekvenciranje proteinov. Pri peptidnem mapiranju proteine oz. proteinske lise, ki nas zanimajo, izrežemo in razgradimo na fragmente. V ta namen se uporabljajo proteaze, kot sta tripsin ali endoproteinaza LysC. Nastale proteolitične peptide analiziramo z MS, kjer dobimo masni spekter za posamezen protein. Identifikacijo proteina izvedemo s pomočjo primerjave masnega spektra z bazami podatkov, ki temeljijo na teoretičnih masah proteina ali pa eksperimentalno določenih masah fragmentiranih proteinov. Za analizo dobljenih masnih spektrov proteinov so na voljo različni računalniški programi (MASCOT, PROFOUND,...), ki so prosto dostopni prek internetnega spleta (Canas in sod., 2006; Nesvizhskii in sod., 2007).

»*De novo*« sekvenciranje proteinov je povezano s tandemskim masnim spektrometrom, ki fragmentira peptide in zabeleži spekter fragmentnih ionov. Za fragmentacijo ionov se največkrat uporablja fragmentacija s pomočjo kolizijske celice (CID – s trkom povzročena disociacija), kjer ioni molekul interagirajo z molekulami inertnega plina ter se razbijejo na manjše delce. Pride do fragmentacije peptidne vezi, ki je tudi najšibkejša med ostalimi kovalentnimi vezmi v peptidu. Tu se tvorita dva fragmenta, glede na pozicijo pozitivnega naboja, ki ostane na peptidu. Če ostane pozitivni naboj na Nterminalnem koncu peptida, dobimo fragmente ionov, imenovane b ioni. V primeru, da ostane pozitivni naboj na C-terminalnem koncu, pa dobimo y ione (slika 7). Ob cepitvi vezi med  $C_a$  in karbonilno skupino nastanejo ioni a in ioni x, ob cepitvi vezi med  $C_a$  in dušikovim atomom, pa nastanejo ioni c ter ioni z. Na koncu identificiramo aminokislinsko zaporedje z odštevanjem mas sosednjih ionov in zaporedje primerjamo z bazami podatkov ter določimo, kateremu proteinu določeno zaporedje pripada (Aebersold in Goodlett, 2001; Chen, 2008).


Slika 7: Prikaz nastanka fragmentov peptidnih ionov in njihove oznake (Aebersold in Goodlett, 2001: 277)

Figure 7: Presentation of peptide ion fragmentation and its nomenclature (Aebersold in Goodlett, 2001: 277)

#### 2.5.4 Kvantifikacija proteinov označenih s stabilnimi izotopi v proteomiki

V preteklosti so proteomske raziskave temeljile na identifikaciji in karakterizaciji proteinov, danes pa so zlasti usmerjene h kvantitativnim in primerjalnim analizam. K temu je pripomogel hiter razvoj na področju kromatografskih tehnik, masne spektrometrije in bioinformatike. S kvantitativno proteomsko analizo lahko določimo razlike v izražanju proteinov, prisotnih v različnih stanjih. Razlike v izražanju lahko določimo z analizo gelov po gelski elektroforezi in z analizo rezultatov metod, ki temeljijo na »shotgun« proteomiki. Pri kvantifikaciji proteinov ločimo absolutno in relativno kvantifikacijo. Absolutna kvantifikacija določa koncentracijo določenega proteina v celici ter večinoma temelji na metodah MS, ki omogočajo kvantifikacijo s stabilnimi izotopi. Relativna kvantifikacija pa je povezana s količino proteina, ki jo primerjamo pri različnih eksperimentalnih pogojih. Podatki o kvantifikaciji proteinov so lahko pri uporabi različnih metod in v različnih laboratorijih različni, zato je potrebno rezultate kvantifikacije je smiselno v izračun vključiti številne biološke in tehniške ponovitve (Baginsky, 2009; Corthals in Rose, 2007).

Za kvantifikacijo proteinov, ki ne temelji na gelski elektroforezi, je najbolj v uporabi označevanje proteinov s stabilnimi izotopi. Za ta namen se uporabljajo stabilni, neradioaktivni izotopi, kot so <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N in <sup>18</sup>O. Za vključitev stabilnih izotopov v peptidne in proteinske verige so se v največji meri uveljavili trije pristopi – s kemijsko

reakcijo, encimski način in označevanje z aminokislinami v gojišču (Canas in sod., 2006).

Pristop in kvantifikacija s stabilnimi izotopi ima nekaj omejitev, ki so povezane s kompleksno in dolgo pripravo vzorcev, potrebo po visoki koncentraciji vzorcev, visokimi stroški reagentov, nepopolnim označevanjem in potrebo po specifični programski opremi za kvantifikacijo. Zaradi teh omenjenih omejitev se je razvila potreba po proteomskih tehnikah, ki bi omogočale kvantifikacijo brez označevanja proteinov (label free quantification – LFQ) in dosegle hitrejšo, cenejšo in enostavnejšo kvantifikacijo rezultatov. Pri postopku z izotopskim označevanjem proteinov se različni proteinski vzorci po končanem označevanju združijo, mešanica različno označenih proteinov pa se pripravi za analizo s tekočinsko kromatografijo sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Pri LFQ proteomiki pa se vsak vzorec ločeno pripravi in analizira z LC-MS/MS (slika 8; Zhu in sod., 2010).



Slika 8: Osnovni princip za kvantifikacijo proteinov pri proteomiki, ki ne temelji na gelih (Zhu in sod., 2010: 2)

A) Potek analize proteinov označenih s stabilnimi izotopi; B) potek analize neoznačenih proteinov.

Figure 8: General approaches for quantification of proteins for non-gel based proteomics (Zhu et al. 2010: 2)

A) Isotope labeling method; B) label-free quantitative proteomics.

### 2.5.5 Analiza glikoproteinov

Glikoproteomika in glikomika sta nepogrešljivi orodji za preučevanje glikoproteinov (An in sod., 2009). Glikoproteomika je povezana z identifikacijo glikoproteinov iz kompleksnih mešanic proteinov in z informacijo o lokalizaciji glikozilacijskih mest. Določitev strukture glikanov pa je opredeljena z glikomiko.

Izolacija glikoproteinov večinoma temelji na afinitetnih metodah, ki so povezane z uporabo lektinov. Lektini so skupina proteinov ali glikoproteinov s specifično afiniteto vezave na ogljikove hidrate, ki so prisotni na proteinih ali lipidih (Etzler in Mohnen, 2009). Lektini se reverzibilno vežejo na mono- ali oligosaharide, vendar nimajo katalitske aktivnosti. Pri lektinski afinitetni kromatografiji se na lektine določenega tipa, ki so imobilizirani na trdnem nosilcu, vežejo glikoproteini preko sladkorne enote, nevezani proteini se sperejo, adsorbirani glikoproteini pa se eluirajo s specifičnim elucijskim pufrom (West in Goldring, 2004). Eden izmed najbolj uporabljenih lektinov je konkavalin A (ConA) iz stročnice *Canavalia ensiformis*, ki se veže na visokomanozne in hibridne tipe N-glikanov. Nekateri lektini se lahko vežejo tudi na Oglikoproteine. Pri tem je potrebno omeniti aglutinin iz pšeničnih kalčkov (WGA), ki veže glikoproteine s terminalnim N-acetilglukozaminom (GlcNAc) na N-glikanih ter tudi določene O-glikane, kot je O-GlcNAc.

Izolirane frakcije glikoproteinov lahko v nadaljevanju ločimo na poliakrilamidni elektroforezi v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE) ali dvodimenzionalni poliakrilamidni elektroforezi (2D-PAGE), potem pa lise proteinov, ki nas zanimajo, analiziramo z MS. Lahko pa glikoproteine analiziramo direktno z MS brez predhodne ločitve na PAGE. Kljub napredku tehnik za analizo proteoma z MS se pri glikoproteomiki znanost še vedno srečuje s številnimi izzivi pri vrednotenju spektrov (Chen in Pramanik, 2009).

Glikomika je povezana z določitvijo strukture glikanov, ki v glavnem temelji na analizi z uporabo tehnik MS. S pomočjo PNGaze A se s proteinov sprostijo N-glikani, katerih strukturo lahko na podlagi podatkov iz MS določimo s specifičnimi programi. Poleg PNGaze A lahko proteine razgradimo s tripsinom, analiziramo z MS, ter tako določimo maso glikopeptidov ter glikanov (Song W. in sod., 2011).

Napredek pri analizi glikoproteinov je v zadnjih desetletjih zelo razviden, zlasti zaradi napredka instrumentov v MS ter razvoja kemijskih in biokemijskih strategij, ki se ukvarjajo s kompleksnimi problemi v glikoproteomiki (Tissot in sod., 2009).

#### 2.5.6 Baze podatkov in interakcijske mreže proteinov

Do sedaj je v celoti sekvenciranih le nekaj genomov višjih rastlin, kot so navadni repnjakovec, soja, trnata meteljka, riž, topol (*Populus trichocarpa*), sirek (*Sorghum bicolor*), vinska trta (*Vitis vinifera*), koruza ter genom modelne trave *Brachypodium distachyon* (Remmerie in sod., 2011). Vendar niti eden od naštetih rastlinskih genomov ni dokončno določen (anotiran). Tudi v primeru najbolj raziskane modelne rastline navadnega repnjakovca, katere genom so sekvencirali pred desetimi leti, vsebuje zadnja izpopolnjena baza podatkov TAIR10 (2012), 12 % nedoločenega genoma in 30 % genoma povezanega z neznano molekulsko funkcijo. Podobno je v primeru razvrstitve genskih produktov glede na biološke procese (12 % nedoločeno in 34 % neznano) in celične komponente (20 % nedoločeno in 26 % neznano) (Lamesch in sod., 2012). V primeru, da ima določen organizem sekvenciran genom, vendar njegov genom v celoti ni določen, je informacija o funkcijah proteinov vezana na homologne proteine.

Večina eksperimentov v proteomiki temelji na identifikaciji velikega števila proteinov iz celičnih, tkivnih ekstraktov ali lizatov iz organelov. Pri tem tvorijo identificirani proteini, ki so prisotni v določeni življenjski dobi v celici, kompleksne interakcije s številnimi drugimi proteini. Kot pri drugih organizmih so tudi pri rastlinah interakcije med proteini zelo pomembne, saj sodelujejo pri številnih fizioloških procesih, kot so fotosinteza, rast celičnih sten, odziv na stres ter drugih. Zato je določitev protein-protein interakcij (PPI) bistvenega pomena, da bi dobili vpogled v kompleksno sestavo bioloških procesov (Remmerie in sod., 2011).

Baze podatkov za PPI vsebujejo tako eksperimentalne kot tudi teoretične podatke o PPI. Za rastline je podatkov o PPI zelo malo v primerjavi z drugimi organizmi, kot so kvasovke in modelni organizmi za živali. Navadni repnjakovec in riž pa sta se uveljavila kot modelna sistema za rastlinske PPI. Dostopnih je nekaj baz podatkov, ki vsebujejo informacije o PPI za številne živalske in rastlinske vrste. Prva baza podatkov o teoretičnih interakcijah za navadni repnjakovec na osnovi ortologije je bila objavljena leta 2007. Vsebovala je informacije o interakcijah ortologov iz kvasovk, gliste *Caenorhabditis elegans*, vinske mušice in človeka (Geisler-Lee in sod., 2007). Kasneje so vzpostavili bazo podatkov IntAct, ki vsebuje največje število eksperimentalno pridobljenih interakcij v rastlinah (večina jih je od navadnega repnjakovca). IntAct vsebuje 8000 podatkov o interakcijah za navadni repnjakovec, kar je vseeno malo v primerjavi s 70000 interakcijami pri kvasovkah, več kot 40000 pri človeku, okoli 30000 pri mušici ter okoli 10000 pri nematodi *C. elegans* in miši (Kerrien in sod., 2012). Poleg IntAct vsebuje spletna podatkovna baza podatkov STRING eksperimentalne in teoretične informacije o interakcijah z določeno oceno zaupanja (Szklarczyk in sod.,

2011). STRING deluje na osnovi algoritmov, ki temeljijo na PPI in predvidevajo, da imajo proteini, ki interagirajo med sabo, večjo verjetnost, da imajo podobno biološko funkcijo kot pa proteini brez medsebojnih interakcij. Predhodno omenjena baza podatkov TAIR vključuje poleg informacij o genskih družinah, strukturah in funkcijah genov, raznih laboratorijskih protokolih in metabolnih poteh, tudi informacije o PPI (Lamesch in sod., 2012). Mnoge od baz podatkov za PPI imajo možnost grafične ponazoritve medsebojnih interakcij v obliki povezanih vozlov. Eden izmed programov za vizualizacijo, modeliranje in analizo molekulskih in genetskih interakcijskih mrež je program Cytoscape (Cline in sod., 2007). Cytoscape dopušča možnost uporabe drugih programov, kot je npr. BiNGO (Maere in sod., 2005), znotraj programa. BiNGO določi, katere ontologije genov so statistično značilno zastopane v izbrani skupini genov oz. proteinov. Program ima zmožnost, da uvrsti želene proteine v določene kategorije na osnovi njihovih specifičnih celičnih in molekulskih funkcij ter bioloških procesov (Maere in sod., 2005).

Podatki, ki jih pridobimo iz interakcijskih mrež z uporabo določenih baz podatkov in grafičnih orodij, prispevajo k boljšemu razumevanju funkcij posameznih proteinov, PPI in specifičnih poti v kompleksnih sistemih.

#### **3 MATERIALI IN METODE**

#### 3.1 POTEK POSKUSA

Na sliki 9 je prikazan potek celotnega poskusa, ki je v nadaljevanju podrobno razložen po posameznih fazah.



Slika 9: Shematski prikaz eksperimenta od priprave rastlinskega materiala do poteka proteomskih analiz Figure 9: Schematic overview of the workflow of plant material preparation and proteomic analysis

#### 3.1.1 Rastlinski material

V poskus smo vključili dva kultivarja navadnega fižola, ki sta se v predhodnih raziskavah (Hieng in sod., 2004; Kavar in sod., 2008) razlikovala v toleranci na sušo, Starozagorski (Semenarna Ljubljana, Slovenija) ter tolerantnejši Tiber (Clause Semences, Francija). Iz tuje genske banke (Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Kolumbija) smo pridobili seme kultivarja BAT 477, ki je po podatkih iz literature toleranten na sušo (Miklas in sod., 2006).

#### 3.1.2 Priprava rastlinskega materiala

Poskus smo izvedli v plastenjaku poskusnega centra Kmetijskega inštituta Slovenije v Jabljah pri Trzinu v pogojih naravne svetlobe, temperature in vlage. Poskus je potekal od konca marca do sredine maja 2010. Semena smo posadili v mešanico substrata (Klasmann, Nemčija) in vermikulita (1:1, v/v), in sicer po tri semena v 40 loncev za posamezen kultivar. Deset dni po kalitvi smo zmanjšali število rastlin na eno rastlino na lonec. Rastline smo redno zalivali z enakim volumnom vode. Po petih tednih rasti smo polovico rastlin prenehali zalivati, drugo polovico rastlin pa smo normalno zalivali in so služile kot kontrolne rastline. Rastline smo vzorčili 7. (blagi stres), 12. (zmeren stres) in 17. dan (močan stres) po prenehanju zalivanja (preglednica 1). Po sedemnajstih dneh izpostavljanja sušnim razmeram smo preostanek rastlin v stresu ponovno zalili in jih redno zalivali še naslednjih sedem dni, nato pa izvedli vzorčenje. Z regeneracijo rastlin smo hoteli preveriti, ali so bile rastline ob ponovnem zalitju sposobne premagati stres. Pri vsakem vzorčenju smo vzorčili rastline v suši ter kontrolne rastline. Tako so bile rastline pri posameznem vzorčenju v enaki fazi rasti, kar je za proteomsko primerjalno analizo kontrolnih rastlin in rastlin v suši zelo pomembno. Pri vsaki od treh obravnavanj sušnih razmer in eno fazo regeneracije smo pridobili pet rastlin, ki so bile izpostavljene suši in pet kontrolnih rastlin. Skupno smo pridobili 40 vzorcev za posamezen kultivar.

Preglednica 1: Poskus sušnega stresa pri izbranih kultivarjih navadnega fižola Vzorčili smo pet rastlin v stresu in pet kontrolnih rastlin pri vsakem obravnavanju. Table 1: Experiment of drought stress in selected cultivars of common bean Five stressed and five control plants were harvested at each treatment.

Obravnavanje	Vzorčenje rastlin po prenehanju zalivanja
suša 1 / kontrola 1	7. dan
suša 2 / kontrola 2	12. dan
suša 3 / kontrola 3	17. dan
regeneracija rastlin v suši / kontrola 4	7. dan po začetku zalivanja rastlin v suši

Za analizo celokupnih proteinskih ekstraktov iz listov z dvodimenzionalno diferenčno elektroforezo (2D-DIGE) pri vseh treh kultivarjih smo vzorčili tretji (gledano od spodaj navzgor) sestavljen list, srednji listič zavili v folijo in takoj zamrznili v tekočem dušiku. Enega od stranskih lističev smo uporabili za določanje relativne vsebnosti vode. Za analizo glikoproteinov smo pri kultivarju Tiber vzorčili celoten drugi sestavljen list. Za proteomsko analizo stebel smo pri Tibru vzorčili še stebla, in sicer tri internodije od prvega pravega do tretjega sestavljenega lista. Vse vzorce smo shranili na -80 °C do nadaljnjih analiz.

#### 3.1.3 Določanje relativne vsebnosti vode v listih in vsebnosti vode v substratu

Vodni status rastline smo opredelili z relativno vsebnostjo vode (RVV) v stranskem lističu tretjega sestavljenega lista. List smo takoj po odvzemu zaprli v stehtano plastično epruveto z zamaškom, ga stehtali in tako določili svežo maso (m<sub>1</sub>). Nato smo list položili v plastično petrijevko na filter papir, ki smo ga predhodno namočili z destilirano vodo. Pustili smo 24 ur, da se je list nasitil z vodo, ga stehtali in tako določili nasičeno maso (m<sub>nas</sub>). Listu smo nato določili še suho maso (m<sub>2</sub>) s sušenjem do konstantne mase na 80 °C. RVV smo izračunali po enačbi 1:

RVV (%) = 
$$\frac{m_1 - m_2}{m_{nas} - m_2} \times 100$$
 ... (1)

Pri rastlinah v sušnem stresu smo določili tudi vsebnost vode v substratu (VVS). Vzorec substrata smo vzeli iz notranjosti lonca, ga stehtali in tako določili svežo maso ( $m_1$ ). Substrat smo nato sušili na 105 °C za 24 ur in določili suho maso ( $m_2$ ). VVS smo izračunali po enačbi 2:

VVS (%) = 
$$\frac{m_1 - m_2}{m_2} \times 100$$
 ... (2)

#### 3.2 EKSPERIMENTALNO DELO

# 3.2.1 Analiza celokupnih proteinov v listih kultivarjev Tiber, Starozagorski čern in BAT 477 z 2D-DIGE

3.2.1.1 Priprava proteinskih ekstraktov iz listov kultivarjev Tiber, Starozagorski čern in BAT 477

Glede na rezultate RVV v listih smo se odločili, da naredimo analizo celokupnih proteinskih ekstraktov le pri obravnavanjih suša 2/kontrola 2 in suša 3/kontrola 3. Pri

tem smo v analizo vključili štiri biološke ponovitve za vsako obravnavanje pri vseh treh kultivarjih. Proteinske ekstrakte iz listov smo pripravili po naslednjem postopku:

- zamrznjene liste smo prenesli v terilnico napolnjeno s tekočim dušikom, nato pa s pestilom ustvarili droben prah, ki smo ga razdelili v mikrocentrifugirke (2 ml);
- k 150 mg zdrobljenega prahu smo dodali 10 % TCA, 1 % DTT v acetonu;
- vsebino smo premešali na vibracijskem mešalniku ter inkubirali 2h na -20 °C;
- vsebino smo centrifugirali 15 min pri 13000 g in 4 °C ter odstranili supernatant;
- oborino smo sprali z 1 % DTT v acetonu, centrifugirali 15 min pri 13000 g in 4
  °C ter odstranili supernatant;
- spiranje oborine smo ponovili še dvakrat oz. dokler oborina ni postala bledo rumene barve;
- oborino smo posušili na zraku;
- oborini smo dodali 0,5 ml solubilizacijskega pufra (7 M urea, 2 M tiourea, 4 % CHAPS, 30 mM Tris, pH = 8,5);
- za zagotavljanje učinkovite solubilizacije smo vsebino mešali na vibracijskem mešalniku 20 min pri sobni temperaturi;
- vsebino smo centrifugirali 15 min pri 13000 g in 20 °C ter supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko;
- supernatant smo ponovno centrifugirali 15 min pri 13000 g in 20 °C ter supernatant prenesli v mikrocentrifugirko;
- proteinskem ekstraktom smo določili pH s pH papirčki ter z 0,5 M NaOH uravnali pH na približno 8,5;
- proteinske ekstrakte smo shranili na -80 °C do nadaljnje uporabe.

Zaradi nekompatibilnosti pufra v proteinskih ekstraktih z reagenti v kompletu RC DC Protein Assay (BioRad) nismo uspeli določiti koncentracije, zato smo za oceno vsebnosti proteinov uporabili NaDS-PAGE. K enakim volumnom proteinskih ekstraktov smo dodali 2x nanašalni pufer za NaDS-PAGE (125 mM Tris-HCl pH = 6,8, 4 % SDS, 20 % glicerol, 10 % 2-merkaptoetanol, 0,04 % bromfenolmodro). Tako pripravljene vzorce smo nanesli na predhodno pripravljene gele (4-12 % Bis-Tris Gel, Invitrogen), elektroforezno kadičko (XCell SureLock Mini Cell, Invitrogen) pa napolnili z 1x MOPS NaDS pufrom (Invitrogen). Elektroforeza je potekala pri 200 V, dokler barvilo ni zapustilo dna gela. Gele smo nato eno uro barvali z raztopino Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250), ki je vsebovala 50 % metanol, 7 % ocetne kisline in 0,1 % CBB R-250. Sledilo je razbarvanje gelov z 20 % metanolom in 7 % ocetno kislino za dve uri. Slike gelov smo zajeli s čitalcem Epson.

3.2.1.2 2D-DIGE proteinskih ekstraktov iz listov kultivarjev Tiber, Starozagorski čern in BAT 477

Šestnajst proteinskih ekstraktov pri vsakem kultivarju smo označili s fluorescentnimi barvili (NH DyeAGNOSTICS) po naslednjem postopku:

- približno 50 µg posameznega vzorca smo označili z 1 µl raztopine barvila G-Dye200 ali G-Dye300 s koncentracijo 400 pmol. Polovico vzorcev smo označili z G-Dye200, drugo polovico z G-Dye300;
- interni standard smo označili z G-Dye100. Interni standard je predstavljal mešanico vseh 16 vzorcev po 25 µg proteinov;
- vzorce z barvili smo inkubirali na ledu in v temi 30 min;
- reakcije smo prekinili z dodatkom 1 µl raztopine za prekinitev reakcije ter inkubirali na ledu in v temi dodatnih 10 min ter tako končali reakcije označevanja.

Nadaljevali smo z združevanjem vzorcev za nanos na trakove z imobiliziranim pH gradientom (IPG; 24 cm, pH 5-8, Bio-Rad). Vzorec, označen z G-Dye200, smo združili z vzorcem označenim z G-Dye300 ter z določenim volumnom internega standarda označenega z G-Dye100. Združenim vzorcem smo dodali rehidracijski pufer (7 M urea, 2 M tiourea, 4 % CHAPS, 0,5 % IPG pufer 3-10, 0,2 % DTT, 0,002 % bromfenol modro) do volumna 450 µl, ki je določen kot maksimalen volumen za uporabljene trakove. Tako pripravljene vzorce smo razporedili v reže rehidracijskega pladnja, na vzorce položili trakove z IPG, nanesli posebno olje (DryStrip Cover fluid, GE Healthcare), ki preprečuje izhlapevanje vzorca, pokrili z aluminijasto folijo ter pustili inkubirati čez noč pri sobni temperaturi.

Naslednji dan smo trakove prenesli v pladenj za izoelektrično fokusiranje, ki je potekalo po protokolu:

- 200 V 1 h;
- 500 V 1 h;
- 1000 V 1 h;
- gradient do 8000 V 30 min;
- 8000 V 9 h;
- gradient 100 V 30 min;
- 100 V 6 h.

Trakove smo sprali z destilirano vodo in jih položili v posode za uravnoteženje trakov, ki je potekalo 20 min v 10 ml pufru za uravnoteženje (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30 % glicerol (87 %), 2 % NaDS) z 1 % DTT. Pufer smo nato odlili ter ponovili

20 min inkubacijo v pufru za uravnotežnje, ki je namesto DTT-ja vseboval 5 % jodoacetamid. Uravnoteženje trakov je potekalo na stresalniku ob rahlem stresanju.

Za ločevanje proteinov v drugi dimenziji smo pripravili poliakrilamidne gele velikega formata (20 x 25 cm) v sistemu, ki omogoča pripravo 14 gelov (DALTtwelve Gel Caster, GE Healthcare). Gelsko raztopino (12,5 % akrilamid/bisakrilamid, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % NaDS, 0,04 % APS, 0,019 % TEMED) smo vlili v kasetni sistem, spodnji del sistema pa napolnili z nadomestno raztopino (0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 50% glicerol, bromophenol modro), ki je izpodrinila gelsko raztopino, in tako preprečili polimerizacijo gelske raztopine v spodnjem delu sistema. Gelsko raztopino smo prekrili z 0,1 % NaDS, po dveh urah nalili shranjevalno raztopino (0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % NaDS) ter pustili čez noč na sobni temperaturi. Nato smo shranjevalno raztopino odlili, na površino gelov namestili trakove ter jih prekrili s toplo raztopino agaroze (1x MOPS NaDS pufer (Invitrogen), 0,5 % agaroza, 0,2 % bromfenol modro). Sistem za elektroforezo smo napolnili s 750 ml 10x elektroforeznega pufra (250 mM Trizma base, 1,92 M glicin, 1 % NaDS), dodali dH<sub>2</sub>O do 7,5 l ter namestili gele s strnjeno agarozo v sistem za elektroforezo (Ettan Dalt twelve, GE Healthcare). Z geli napolnjeno elektroforezno komoro smo prelili z 2 l 2x elektroforeznega pufra ter priklopili vodno črpalko, ki je premešala elektroforezni pufer.

Elektroforeza je potekala pod naslednjimi pogoji:

- 2,5 W / gel 45 min;
- 25 W / gel 4 h.

Na koncu smo pridobili tri sete po osem gelov s fluorescentno označenimi proteini iz treh kultivarjev navadnega fižola. Gele s fluorescentno označenimi proteini smo uporabili za obdelavo gelov, ki je vsebovala primerjavo proteinskih lis med geli. Za identifikacijo izbranih proteinskih lis, ki smo jih izrezali iz gelov, pa smo pripravili preparativne gele po zgoraj opisanem postopku, le da v tem primeru proteinov nismo fluorescentno označili, rehidracija trakov z IPG in nadaljnja ločba proteinov pa je potekala z okoli 250 µg celokupnih proteinov. Po ločbi proteinov z 2D gelsko elektroforezo smo gele barvali z raztopino CBB R-250 po postopku opisanem pod 3.2.1.1. Gele smo sprali z destilirano vodo ter jih pustili v destilirani vodi čez noč, nato pa jih shranili v plastične folije pri 4 °C. Tako smo pridobili gele, ki so vsebovali zadostno količino proteinov iz posameznih proteinskih lis, ki smo jih izrezali in identificirali.

3.2.1.3 Slikanje gelov in analiza slik gelov proteinskih ekstraktov iz listov kultivarjev Tiber, Starozagorski čern in BAT 477

Gele s fluorescentno označenimi proteini smo zajeli s čitalcem Ettan DIGE Imager (GE Healthcare), pri specifični valovni dolžini ekscitacije in emisije za posamezno barvilo, ki je določena s strani proizvajalca fluorescentnih barvil. Slike gelov smo obdelali s programom Progenesis SameSpot, verzija 4.1 (Nonlinear Dynamics). S programom smo določili proteinske lise, izvedli prileganje gelov in statistično analizo proteinskih lis. Za posamezen kultivar smo naredili ločeno analizo slik gelov. Program je izvedel prileganje posamezne slike gelov z internim standardom na gelu, nato pa še prileganje posamezne slike internega standarda z izbranim referenčnim vzorcem. Interni standard je tako služil za normalizacijo podatkov pri analizi obravnavanih vzorcev. Prileganje gelov je program izvedel avtomatsko, nato pa smo ujemanje posameznih lis med geli ročno preverili in po potrebi prileganje popravili. Kot rezultat smo dobili normalizirane volumne lis, ki smo jih uporabili za vnos v program Unscrambler verzija 10.0.1 (CAMO) za dodatne statistične analize. Z omenjenim programom smo izvedli analizo glavnih komponent (PCA) in regresijo delnih najmanjših kvadratov (PLS). Izbira proteinskih lis za analizo z MS je temeljila na osnovi rezultatov analize gelov iz Progenesis SameSpot, kjer smo pridobili informacijo o faktorju razlike, ki je določen glede na povprečje normaliziranih volumnov med vzorci rastlin v stresu in kontrolnih rastlin oz. obratno (faktor razlike > 1,3) ter p- in q- vrednosti testa ANOVA (p < 0,05 in q < 0,05). Dodatno smo upoštevali še analizo PLS, analizo PCA pa smo uporabili za matematični prikaz grupiranja obravnavanih vzorcev.

3.2.1.4 Identifikacija proteinov iz listov kultivarjev Tiber in Starozagorski čern z masno spektrometrijo

Iz preparativnih gelov barvanih s CBB R-250 smo izbrali proteinske lise, ki so se statistično značilno razlikovale glede na normalizirani volumen med rastlinami v stresu in kontrolnimi rastlinami. Te proteinske lise smo ročno izrezali z uporabo nastavka za pipetiranje in proteine pripravili za analizo z MS z encimsko razgradnjo proteinov s tripsinom (Shevchenko in sod., 2007):

- delce gelov s proteini smo sprali s 50 % acetonitrilom za odstranitev barvila CBB R-250 in nečistoč (NaDS);
- sledila je inkubacija 1 h na 55 °C ter odstranitev raztopine;
- brezbarvne delce gelov smo izsušili s 100 % acetonitrilom ter inkubirali pri sobni temperaturi 15 min;
- raztopino smo odstranili ter gelom dodali raztopino tripsina (Promega) v 50 mM amonijevem karbonatu;

- vzorce smo inkubirali 30 min na ledu, odstranili odvečno raztopino tripsina ter dodali 50 mM amonijev karbonat;
- vzorce gelov smo inkubirali čez noč na 37 °C, nato smo peptide ekstrahirali s 5 % mravljično kislino in 100 % acetonitrilom (1:1 (v/v)) ter inkubirali 20 min na 37 °C;
- raztopino s peptidi smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko ter ponovili ekstrakcijo peptidov z zgornjo raztopino ter nazadnje s 100 % acetonitrilom;
- raztopine peptidov smo posušili s pomočjo vakuumskega sušilca in nato oborini dodali 0,1 % mravljično kislino;
- vzorce smo takoj analizirali z MS ali jih shranili na -80 °C do analize z MS.

LC-MS/MS analizo peptidov razgrajenih s tripsinom smo izvedli na sistemu visokotlačne tekočinske kromatografije (HPLC; Agilent 1200) sklopljene z LTQ-Orbitrap XL masnim spektrometrom (Thermo Fisher Scientific, Nemčija). HPLC sistem Agilent 1200 je sestavljen iz binarne črpalke (nano in kapilarna črpalka), avtomatskega podajalnika vzorcev, termostata za kolono in integriranega preklopnega ventila. V povprečju smo injicirali 6 µl vzorca na ekstrakcijsko kolono, napolnjeno z 0,5 µm velikimi delci Zorbax 300 SC-C18 (Agilent). Z mobilno fazo sestavljeno iz 97 % vode, 0,1 % mravljične kisline in 3 % acetonitrila smo dosegli pretok vzorcev skozi kolono. Hitrost pretoka je zagotavljala kapilarna črpalka in je znašala 4 µ/min. Po aktivaciji integriranega preklopnega ventila so se peptidi eluirali iz ekstrakcijske kolone na kolono C18 (GlycoproSIL C18-80Å, Glycopromass, Nemčija), 3  $\mu$ m, 150  $\times$  0,075 mm. Kromatografska ločitev je potekala s pomočjo binarnega gradienta od 5 do 55 % acetonitrila v vodi, pri 0,2 µl hitrosti pretoka z nano-črpalko. HPLC sistem je bil sklopljen preko nano elektrospreja z masnim spektrometrom. Peptidni vzorci so bili podvrženi fragmentaciji pri visoki energiji (HCD - high energy collision energy) v razponu m/z 300 – 2000. Analiza MS/MS je potekala v enoti Orbitrap.

3.2.1.5 Iskanje proteinov iz listov kultivarjev Tiber in Starozagorski čern po bazi podatkov

Z LC-MS/MS smo dobili datoteke vzorcev \*.raw, ki so nastali s pomočjo programa Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, Nemčija), ki je bil povezan z LC-MS/MS. S programom BioWorks 3.2 smo pretvorili datoteke \*.raw v datoteke \*.mgf, s katerimi smo lahko izvedli iskanje proteinov v iskalniku MASCOT znotraj spletnega strežnika Matrix Science (Perkins in sod., 1999). Parametre iskanja smo nastavili na iskanje preko proteinske baze podatkov NCBInr (»National Center for Biotechnology Information's non-redundant database«), taksonomska opredelitev – zelene rastline, dovoljeno eno zgrešeno mesto cepitve z encimom tripsinom, MS toleranca 10 ppm, MS/MS toleranca 0,05 Da, naboj peptidov 2+, 3+ in 4+ ter karbamidometilacija cisteina in oksidacija metionina kot fiksna in variabilna modifikacija. MASCOT vrednost, število peptidnih zadetkov, pokritost proteinskega zaporedja, pI in molekulsko maso smo uporabili pri upoštevanju rezultatov iskanja. Masne spektre pridobljene iz proteinskih lis smo naknadno ročno preverili, z namenom, da bi potrdili rezultate MASCOT iskanja. Pri tem smo bili posebno pozorni na tiste proteine, pri katerih je identifikacija temeljila samo na enem ali dveh peptidnih zaporedjih. Dodatno smo rezultate prvotnega iskanja potrdili še z MASCOT iskanjem preko rastlinske EST baze podatkov z enakimi parametri kot predhodno navedeno. Omenjeno dodatno iskanje smo izvedli, ker so proteinske baze podatkov za fižol zelo pomanjkljive, saj genom navadnega fižola še ni sekvenciran, zato smo v določenih primerih dobili dvoumne rezultate iskanja, ki so vključevali različne rastlinske vrste. Z iskanjem znotraj rastlinske EST baze podatkov smo običajno dobili nedvoumne zadetke in zadetke z najvišjimi MASCOT vrednostmi, ki so bili vezani na navadni fižol. Sekvence proteinov, ki smo jih identificirali kot neznane ali hipotetične proteine, smo uporabili pri iskanju homolognih proteinov z uporabo algoritma BLASTP (2012), kjer smo izvedli iskanje znotraj baze zelenih rastlin.

3.2.1.6 Bioinformatska obdelava podatkov za proteine listov kultivarja Tiber in Starozagorski čern

Funkcije identificiranih proteinov smo določili po opisih in podatkih iz literature ter s pomočjo Uniprot (Activities at the Universal Protein Resource, 2014) baze proteinov, kjer so opisane funkcije za posamezne proteine. Z namenom, da bi bolje razumeli funkcije in interakcije identificiranih proteinov med seboj, smo proteine z bioinformatskimi orodji povezali v PPI mreže. Ker je identifikacija proteinov temeljila na različnih rastlinskih vrstah, navedenih v podatkovni NCBInr rastlinski bazi proteinov, smo identificiranim proteinom poiskali homologne proteine (priloga A) v proteinski bazi navadnega repnjakovca (TAIR10, 2012). Na ta način smo dobili homologne proteine primerne za vnos v PPI orodja, saj morajo biti za določitev interakcijskih mrež o proteinih na voljo informacije o interakciji z ostalimi proteini. Rezultate z najvišjimi vrednostmi iskanja in najnižjimi pričakovanimi vrednostmi (E vrednosti) smo obravnavali kot primerne pri posameznem proteinu. PPI mrežo smo določili s pomočjo orodja STRING 9.0 (Szklarczyk in sod., 2011), biološke procese in molekulske funkcije pa s programom BiNGO 2.44 (Maere in sod., 2005) znotraj programa Cytoscape (Cline in sod., 2007). V programu BiNGO smo uporabili naslednje parametre: hipergeometrični test z Benjamini in Hochbergovimi popravki, p- vrednost 0.001 ter navadni repnjakovec kot preiskovani organizem.

Priprava proteinskih ekstraktov, 2D-DIGE analiza in analiza slik gelov so potekale na inštitutu Nofima (Ås, Norveška), identifikacija proteinov pa na Univerzi v Oslu, Oddelku za molekularne bioznanosti (Oslo, Norveška).

#### 3.2.2 Analiza celokupnih proteinov stebel kultivarja Tiber

Proteomsko analizo listov z 2D gelsko elektroforezo smo dopolnili z analizo izotopsko označenih proteinov iz stebel s pomočjo NaDS-PAGE in LC-MS/MS. Ker je obdelava podatkov iz MS analize dokaj kompleksna, smo izbrali le kultivar Tiber. Pri tem smo se osredotočili na razlike med rastlinami v suši in kontrolnimi rastlinami. Vključili smo rastline v zadnji stopnji sušnega stresa (17 dni izpostavljene sušnemu stresu) in kontrolne rastline v enaki fazi rasti.

#### 3.2.2.1 Priprava proteinskih ekstraktov stebel kultivarja Tiber

Za ekstrakcijo proteinov iz stebel kultivarja Tiber smo rastlinski material prenesli v terilnico napolnjeno s tekočim dušikom, potem pa smo vzorce stebel s pestilom zmleli v fin prah. Štiri vzorce rastlin v stresu smo združili v en vzorec, enako smo naredili za kontrolne vzorce. Vzorcema smo dodali 1x PBS fosfatni pufer (10x PBS pufer: 80 g NaCl, 2 g KCl, 26,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) z 2 % NaDS in proteaznimi inhibitorji (Roche). Vzorce smo dodatno obdelali s homogenizatorjem (Ultra-Turrax T10, Nemčija) štirikrat po 1 min, vmes smo postavili vzorca na led, nato pa sonificirali s sonifikatorjem (UP400S, Hielscher GmbH, Nemčija) štirikrat po 1 min. Vzorca smo centrifugirali 15 min pri 16000 g in 15 °C. Supernatant smo prenesli v novo centrifugirko, ponovili centrifugiranje in preostanek supernatanta združili v novo centrifugirko. Proteinska ekstrakta smo shranili na -80 °C do nadaljnjih analiz.

Koncentracijo vzorcev smo določili s pomočjo BCA kita (BCA protein assay kit, Sigma), ki temelji na nastanku kompleksa  $Cu^{2+}$ -protein v bazični raztopini. Temu sledi redukcija  $Cu^{2+}$  do  $Cu^{1+}$ , stopnja redukcije pa je sorazmerna s količino proteinov. BCA tvori obarvan kompleks s  $Cu^{1+}$  v bazičnih pogojih, kar lahko spremljamo z merjenjem absorbance pri 562 nm. Postopek merjenja koncentracije:

- pripravili smo različne koncentracije standarda (goveji serumski albumin BSA (Sigma)) za izdelavo umeritvene krivulje;
- pripravili smo svežo delovno raztopino: 50 enot reagenta A + 1 enota reagenta B;
- na vdolbinice na 96-mikrotitrski plošči smo nanesli 8 enot delovne raztopine + 1 enoto redčenega proteinskega vzorca ali vzorca standarda;
- plošče smo inkubirali 30 min na 37 °C;
- izmerili smo absorbanco pri 562 nm.

Pred nanosom vzorcev na NaDS-PAGE smo disulfidne vezi v vzorcu reducirali s tributilfosfinom in alkilirali z jodoacetamidom. Postopek:

- vzorca smo reducirali s tributilfosfinom (Sigma) tako, da smo reducent z začetno koncentracijo 200 mM redčili v razmerju 1:40 s proteinskim vzorcem;
- sledila je inkubacija 1 h pri sobni temperaturi;
- vzorca smo alkilirali z jodacetamidom (Sigma), ki smo ga pripravili svežega v koncentraciji 0,5 M ter ga dodali 30 µl na 1 ml proteinskega vzorca;
- vzorca smo inkubirali 1,5 h pri sobni temperaturi;
- sledilo je centrifugiranje vzorcev pri 16000 g, 5 min pri sobni temperaturi.
- 3.2.2.2 Ločitev proteinov stebel kultivarja Tiber na NaDS-PAGE in izotopsko označevanje proteinov

K proteinskima vzorcema enakih koncentracij smo dodali ustrezno količino 4x XT pufra (BioRad), vzorca inkubirali 5 min na 96 °C ter nato še centrifugirali pri 16000 g, 5 min pri sobni temperaturi. Tako pripravljene vzorce smo nanesli na predhodno pripravljen gel (4-12 % Criterion XT NaDS-PAGE geli, BioRad), elektroforezno kadičko (Criterion Cell, BioRad) pa napolnili z 1x MOPS pufrom (BioRad). Elektroforeza je potekala pri 80 V, dokler barvilo ni zapustilo dna gela. Gel smo nato najprej 30 min fiksirali v raztopini 50 % metanola in 10 % ocetne kisline v vodi in potem 30 min barvali s CBB R-250 (50 % metanol, 7 % ocetna kislina, 0,1 % CBB R-250). Sledilo je razbarvanje preko noči v raztopini 20 % metanola in 5 % ocetni kislini v vodi. Slike gelov smo zajeli s čitalcem Epson.

Iz gela smo s skalpelom izrezali proteinske rezine, tako da smo celotno vertikalno »linijo« ločenih proteinov razdelili na 16 rezin, ki so bile podobnih velikosti. Na enak način smo izrezali vzorec v stresu in kontrolni vzorec. Posamezne proteinske rezine smo razrezali na manjše delčke velikosti 1x1 mm. Proteine v gelu smo označili s stabilnimi izotopi po opisanem postopku (Asara in sod., 2006):

- vzorcem v mikrocentrifugirkah smo dodali 50 % propanol;
- vsebino smo inkubirali 45 min na 55 °C, z namenom, da bi odstranili barvilo CBB R-250;
- raztopino obarvanega 50 % propanola smo odstranili ter ponovno dodali 50 % propanol in ponovili inkubiranje;
- postopek zamenjave raztopine in inkubacije smo ponavljali, dokler delci gelov niso postali brezbarvni, nato smo odstranili raztopino propanola;
- vzorcem smo dodali 100 % propanol ter inkubirali 15 min na sobni temperaturi;
- odstranili smo propanol in delce gelov posušili na zraku;
- delce gelov vzorcev v stresu smo označili z 1,2 mg N-acetoksi (D<sub>3</sub>) sukcinimidom, kontrolne vzorce pa z 1,2 mg N-acetoksi (H<sub>3</sub>) sukcinimidom

(omenjena reagenta je po postopku, ki so ga opisali Asara in sod. (2006), pripravil Dr. Wolfgang Egge-Jacobsen, Univerza v Oslu, Norveška);

- vzorcem smo dodali 50 mM HEPES (pH 8,3), 1 min mešali na vibracijskem mešalniku, da bi raztopili čimveč reagenta ter centrifugirali 30 s pri 100 g in sobni temperaturi;
- sledila je inkubacija 3 h na sobni temperaturi;
- odstranili smo raztopino, vzorcem dodali 50 mM amonijevega karbonata (pH 8,3) ter inkubirali 10 min pri sobni temperaturi;
- k raztopini smo dodali 50 % hidroksilamin za prekinitev reakcije in preprečitev stranskih reakcij;
- vzorce smo inkubirali 20 min pri sobni temperaturi;
- raztopino hidroksilamina smo odstranili, vzorcem dodali 50 mM amonijev karbonat (pH 8,3), inkubirali 10 min pri sobni temperaturi ter nato odstranili raztopino;
- spiranje s 50 mM amonijevim karbonatom smo ponovili še dvakrat;
- vzorcem smo dodali 100 % acetonitril, inkubirali 10 min pri sobni temperaturi ter odstranili raztopino;
- vzorce smo posušili na zraku;
- vzorce rastlin v sušnemu stresu in kontrolne vzorce smo združili v novo mikrocentrifugirko;
- gelom smo dodali raztopino tripsina (Sigma) v 50 mM amonijevem karbonatu;
- vzorce smo inkubirali 30 min na ledu, odstranili odvečno raztopino tripsina ter dodali 50 mM amonijev karbonat;
- vzorce gelov smo inkubirali čez noč na 37 °C, nato peptide ekstrahirali s 5 % mravljično kislino in 100 % acetonitrilom (1:1 (v/v)) ter inkubirali 20 min na 37 °C;
- raztopino s peptidi smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko ter ponovili ekstrakcijo peptidov z zgornjo raztopino ter nazadnje s 100 % acetonitrilom;
- raztopine peptidov smo posušili s pomočjo vakuumskega sušilca in nato oborini dodali 0,1 % mravljično kislino;
- vzorce smo takoj analizirali z MS ali jih shranili na -80 °C do analize z MS.

3.2.2.3 Identifikacija proteinov stebel kultivarja Tiber z masno spektrometrijo

Identifikacija proteinov z LC-MS/MS je potekala po protokolu, opisanem pod točko 3.2.1.4.

#### 3.2.2.4 Obdelava podatkov za proteine stebel kultivarja Tiber

Z LC-MS/MS smo pridobili 16 datotek vzorcev \*.raw, ki smo jih pridobili s pomočjo programa Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, Nemčija). Za kvantitativno obdelavo izotopsko označenih proteinov iz vzorcev v sušnemu stresu in kontrolnih vzorcev smo uporabili program MaxQuant (Cox in sod., 2009), ki omogoča analizo velikega števila podatkov pridobljenih z masno spektrometrijo. MaxQuant lahko na podlagi vnesene baze proteinov oz. proteinskih sekvenc izračuna, kateri proteini se različno izražajo med dvema preiskovanima vzorcema, ki sta različno izotopsko označena. V program smo vnesli proteinsko bazo sekvenc (LegProt, »legume specific protein database«, Lei in sod., 2011) zbranih iz sedem različnih vrst stročnic, ki vključujejo sojo, japonsko nokoto, lucerno, trnato meteljko, beli volčji bob, navadni fižol in navadni grah. Poleg baze podatkov stročnic smo vključili še proteinske sekvence navadnega repnjakovca (Duvick in sod., 2008), ki je vključevala 35386 sekvenc. Skupno je baza proteinskih podatkov vsebovala 88096 sekvenc. Proteinsko bazo sekvenc smo razširili s sekvencami iz ostalih organizmov, ker genom navadnega fižola še ni sekvenciran, prav tako še ni določena proteinska baza podatkov za navadni fižol. Parametri, ki smo jih uporabili v programu, so bili naslednji:

- karbomidometilacija kot fiksna modifikacija;
- oksidacija in N-acetilacija kot variabilna modifikacija;
- označevalca na lizinu: N-acetoksi (D<sub>3</sub>) sukcinimid (+45,0106) in N-acetoksi (H<sub>3</sub>) sukcinimid (+42,0106);
- začetna toleranca peptidov: 7 ppm;
- MS/MS toleranca: 0,05 Da;
- minimalna dolžina peptidov: 7 aminokislin;
- peptidni in proteinski FDR (stopnja napačnega zadetka): 0,01;
- vrednost PEP (verjetnost napačnega zadetka pri peptidu): 0,01.

S pomočjo programa smo identificirali skupine proteinov, ki so bile sestavljene iz različnega števila proteinov. Program tvori skupine proteinov na osnovi njihovih peptidnih sekvenc. Kot primer lahko navedemo, da v primeru treh proteinov z enakimi sekvencami program razvrsti te proteine v eno skupino proteinov. Pri identifikaciji proteinov smo upoštevali prisotnost vsaj dveh »edinstvenih« peptidov (»unique peptide«), ki sta bila prisotna v samo eni skupini proteinov, ter razmerje med označevalcema, ki je moralo biti manjše od 0,7 ali večje od 1,3. Identificirane proteine smo tudi ročno preverili s spektri s pomočjo programa Viewer, ki je povezan s programom MaxQuant.

Celotna analiza celokupnih proteinskih ekstraktov iz stebel pri kultivarju Tiber je potekala na Univerzi v Oslu, na Oddelku za molekularne bioznanosti (Oslo, Norveška).

#### 3.2.3 Analiza N-glikoproteinov iz listov in stebel kultivarja Tiber

V analizo N-glikoproteinov smo vključili kultivar Tiber. Pri tem smo se osredotočili na razlike med rastlinami v suši in kontrolnimi rastlinami. Vključili smo rastline v zadnji stopnji sušnega stresa (17 dni izpostavljene sušnemu stresu) in kontrolne rastline v enaki fazi rasti. V analizo smo vključili stebla, kot opisano pod točko 3.1.2 in celoten drugi sestavljen list rastlin. Štiri vzorce rastlin v stresu smo združili v en vzorec, enako smo naredili za kontrolne vzorce.

3.2.3.1 Priprava proteinskih ekstraktov iz listov in stebel kultivarja Tiber

Priprava proteinskih ekstraktov iz listov in stebel rastlin v sušnem stresu in kontrolnih rastlin je potekala po enakem postopku, ki je opisan pod točko 3.2.2.1. Tudi koncentracijo proteinskih vzorcev smo določili s pomočjo BCA kita po predhodno opisanem postopku.

3.2.3.2 Ločitev glikoproteinov iz listov in stebel kultivarja Tiber z lektinsko kromatografijo

Za ločitev glikoproteinov iz proteinskih vzorcev stebel in listov smo uporabili lektinsko afinitetno kromatografijo. V ta namen smo uporabili komercialni komplet za izolacijo celotnih glikoproteinov (Qproteome total glycoprotein kit, Qiagen), ki vsebuje ConA in WGA lektine za ločitev določenih glikoproteinov iz proteinskega vzorca. Pri lektinski afinitetni kromatografiji smo delno sledili postopku proizvajalca, delno pa smo tudi optimizirali postopek za naše vzorce. Postopek je bil naslednji:

- za vsak ml pufra za vezavo smo dodali 10 µl raztopine proteaznih inhibitorjev (100x) in 100 µl raztopine detergenta (prisotno v kompletu). V tako pripravljen pufer za vezavo smo dodali še NaCl v končni koncentraciji 1 M;
- proteinskim vzorcem enakih koncentracij smo dodali trikratno količino pripravljenega pufra za vezavo;
- uporabili smo dve koloni za lektinsko afinitetno kromatografijo (eno za vzorec v stresu, drugo za kontrolni vzorec). Vsako kolono smo uporabili samo enkrat;
- na koloni smo nanesli 500 µl pufra za vezavo, počakali, da je nekaj raztopine prišlo skozi kolono, nato pa centrifugirali 1 min pri 100 g in sobni temperaturi;
- raztopino, ki je prišla skozi kolono, smo zavrgli, nato pa ponovili spiranje kolone še dvakrat po istem postopku;
- na koloni smo nanesli 750 µl ustrezno pripravljenih proteinskih vzorcev, počakali, da je malo raztopine prešlo skozi kolono, nato pa centrifugirali 1 min pri 100 g in sobni temperaturi;

- raztopino, ki je prišla skozi kolono, smo zbrali ter ponovili postopek nanašanja vzorcev za celoten volumen vzorca;
- celotno zbrano raztopino proteinov, ki je prišla skozi kolono, smo ponovno nanesli na kolono ter ponovili zgornji postopek centrifugiranja. S tem smo zagotovili učinkovito vezavo glikoproteinov na kolono;
- raztopino, ki je prišla skozi kolono (oznaka: vezava vzorca na kolono), smo shranili;
- sledilo je spiranje kolone s 750 µl ustrezno pripravljenega pufra za vezavo po enakem postopku;
- spiranje s pufrom za vezavo smo ponovili dvakrat;
- nato smo kolono trikrat spirali z raztopino za spiranje (1x PBS, pH 7,4, 1M NaCl, 0,1 % Triton X-100) po enakem postopku;
- raztopino za spiranje, ki je prišla skozi kolono (oznaka: spiranje po vezavi vzorca), smo shranili za nanos na NaDS-PAGE;
- za elucijo glikoproteinov iz kolone smo uporabili elucijska pufra ME (vsebuje alfa-metilmanozni piranozid) in SE (vsebuje sialično kislino), v katera smo za vsakih 300 µl elucijskega pufra dodali 3 µl raztopine proteaznih inhibitorjev (100x) in 30 µl raztopine detergenta;
- na kolono smo nanesli 100 µl ustrezno pripravljenega elucijskega pufra ME in počakali, da je malo raztopine prišlo skozi kolono, nato pa centifugirali 1 min pri 100 g in sobni temperaturi;
- raztopino, ki je prišla skozi kolono, smo shranili (oznaka: proteini, eluirani s pufrom ME);
- postopek elucije smo ponovili še za ostalih 200 µl elucijskega pufra ME in za elucijo z elucijskim pufrom SE (oznaka: proteini, eluirani s pufrom SE);
- kolono smo nato dvakrat sprali s 500 µl raztopine za spiranje ter raztopino, ki je prišla skozi kolono, shranili (oznaka: spiranje po eluciji);
- vse vzorce, ki smo jih zbrali pri lektinski afinitetni kromatografiji, smo shranili na -80 °C do nadaljnih analiz.

# 3.2.3.3 Ločitev glikoproteinov listov in stebel kultivarja Tiber na NaDS-PAGE

Vzorce eluatov iz lektinske afinitetne kromatografije smo pred nanosom na NaDS-PAGE skoncentrirali na koloni Nanosep 10K (Pall), ki vsebuje membrano s porami, ki ne prepuščajo molekul večjih od 10 kDa. Na kolono za koncentriranje smo nanesli:

- 200 µl vzorca: vzorec-kolona;
- 300 µl vzorca: ME elucija;
- 300 µl vzorca: SE elucija;
- 500 µl vzorca: spiranje po eluciji.

Različne volumne vzorcev smo izbrali glede na predvidene različne koncentracije proteinov v vzorcih (npr. pri vzorcih z oznako spiranje smo želeli čim večji volumen vzorca skoncentrirati, da bi z NaDS-PAGE videli, da v eluatu ni prisotnih proteinov). Vzorce smo centrifugirali okoli 15 min pri 15 °C in 16000 g. Po končanem centrifugiranju je na koloni ostalo okoli 10-20 µl vzorca. Na kolono smo nato nanesli 30 µl štirikratnega XT pufra (BioRad), ki smo mu dodali XT reducent (20x), vsebino na koloni dobro premešali ter jo prenesli v novo mikrocentrifugirko. Vzorce smo inkubirali 5 min na 96 °C ter nato 5 min centrifugirali pri 16000 g in pri sobni temperaturi. Tako pripravljene vzorce proteinov smo ločili na NaDS-PAGE po opisanem postopku pod točko 3.2.2.2, vendar je v primeru ločevanja vzorcev iz lektinske afinitetne kromatografije elektroforeza potekala čez noč pri 25 V.

Po končani elektroforezi in barvanju gelov s CBB R-250 smo iz gela s skalpelom izrezali proteinske rezine, tako da smo vertikalno »linijo« ločenih proteinov razdelili na 10 rezin v primeru ME in SE elucije pri vzorcih listov in 8 rezin pri vzorcih stebel. Na enak način smo izrezali vzorce v stresu in kontrolne vzorce. Posamezne proteinske rezine smo razrezali na manjše delčke okvirne velikosti 1x1 mm. Vzorce glikoproteinov smo razgradili s tripsinom (3.2.1.4) ter jih shranili na -80 °C do analize z masno spektrometrijo.

3.2.3.4 Identifikacija glikoproteinov listov in stebel kultivarja Tiber z masno spektrometrijo

Identifikacija proteinov z LC-MS/MS je potekala po protokolu, opisanem pod točko 3.2.1.4.

3.2.3.5 Analiza spektrov glikoproteinov listov in stebel kultivarja Tiber

Z LC-MS/MS smo dobili datoteke vzorcev \*.raw, ki smo jih s programom BioWorks 3.2 pretvorili v datoteke \*.mgf, s katerimi smo lahko izvedli iskanje proteinov v iskalniku MASCOT znotraj spletnega strežnika Matrix Science (3.2.1.5). Parametre iskanja smo nastavili na iskanje preko NCBInr proteinske baze podatkov, taksonomska opredelitev - zelene rastline, dovoljeno eno zgrešeno mesto cepitve z encimom tripsinom, MS toleranca 7 ppm, MS/MS toleranca 0,05 Da, naboj peptidov 2+, 3+ in 4+ ter oksidacija metionina kot variabilna modifikacija. Ker je bilo v posameznih izrezanih proteinskih rezinah prisotnih več proteinov, smo zadetke proteinov omejili le na najbolj verjetne zadetke (»ion score cut off« nastavljen na vrednost 0,05). Pri zadetkih s samo enim peptidom s signifikantnim rezultatom smo upoštevali MASCOT vrednost nad 100. Zaradi kompleksne analize glikoproteinov smo se v nadaljevanju omejili le na preučevanje N-glikoproteinov. Za posamezno proteinsko rezino kontrolnega vzorca in

vzorca v suši smo ustvarili bazo proteinskih sekvenc. Z namenom, da bi preverili, ali identificirani proteini vsebujejo N-terminalni signalni peptid za endoplazemski retikulum, smo proteine analizirali s programom SignalP 4.1 (Petersen in sod., 2011). S pomočjo programa TargetP 1.1 smo proteinom določili najbolj verjetno lokacijo znotraj celice (Emanuelsson in sod., 2000). Program NetGlyc smo uporabili za preverjanje prisotnosti mesta N-glikozilacije (Gasteiger in sod., 2003). Bazo proteinskih sekvenc za posamezno proteinsko rezino smo omejili le na tiste proteine, ki so vsebovali signalni peptid in mesto za N-glikozilacijo. Veliko proteinov smo identificirali kot hipotetične in neznane proteine, zato smo sekvence teh proteinov uporabili pri iskanju homolognih proteinov z uporabo algoritma BLASTP (2012), kjer smo izvedli iskanje znotraj baze zelenih rastlin. Tako smo za hipotetične in neznane proteine pridobili informacijo o njihovih homolognih proteinih z znano funkcijo.

Za identifikacijo glikopeptidov z N-acetilglukozaminskimi (GlcNAc) ostanki smo vsak spekter ročno pregledali in iskali specifični reporterski ion pri m/z 204,086, saj imajo N-glikopeptidi, ki vsebujejo GlcNAc, pri HCD fragmentaciji značilen signal za oksonijev ion. Ustrezne peptidne mase pri signalu 204,086 smo zabeležili in uporabili za iskanje po proteinski bazi podatkov s programom Peptide Mass Tool v. 1.1 (zasebni program narejen za dr. Wolfganga Egge-Jacobsena). Program omogoča iskanje vnesene monoizotopske mase M+H<sup>+</sup> z določenimi modifikacijami, ki so v našem primeru vključevali dodaten Na<sup>+</sup>, oksidacijo metionina in acetilacijo N-terminalnega dela. MS toleranco smo nastavili na 10 ppm. Peptide, ki so se ujemali z bazo proteinskih sekvenc posameznih rezin, smo zbrali v dokumentu Excel, nato pa izbrali tiste, ki so ustrezali cepitvi s tripsinom in so vsebovali zaporedje aminokislin N-X-S/T (X je katerakoli aminokislina, razen prolina). Strukturo N-glikanov smo določili iz analize spektrov ter s pomočjo programa GlycoMod. GlycoMod določi strukturo glikana iz eksperimentalnih mas glikopeptidov v določeni proteinski sekvenci (Cooper in sod., 2001).

Kvantifikacije N-glikopeptidov iz spektrov ni bilo možno natančno opraviti, zato smo za kvantitativno obdelavo vzorcev uporabili program MaxQuant. Z MaxQuantom lahko izvedemo kvantifikacijo neoznačenih vzorcev, ki smo jih z LC-MS/MS analizirali posamezno. V programu smo uporabili skupno bazo sekvenc, ki smo jo pridobili iz posameznih proteinskih rezin, iz katerih smo odstranili podvojene proteine. Parametri, ki smo jih uporabili v programu, so bili naslednji:

- karbomidometilacija cisteina kot fiksna modifikacija;
- oksidacija metionina in N-acetilacija kot variabilna modifikacija;
- začetna toleranca peptidov: 7 ppm;
- MS/MS toleranca: 0,05 Da;
- minimalna dolžina peptidov: 7 aminokislin;

- peptidni in proteinski FDR: 0,01;
- PEP vrednost: 0,01;
- kvantifikacija LFQ.

Pri identifikaciji N-glikoproteinov smo upoštevali vrednost LFQ intenzitete Nglikoproteinov v sušnem stresu in kontrolnih vzorcev. LFQ algoritem upošteva intenzitete peptidov, ki so povezane s posameznim proteinom in izračuna eno LFQ intenziteto za vsak protein v posameznem vzorcu. LFQ intenziteta je nato podana kot normalizirana vrednost proteinov, ki tvorijo določeno skupino proteinov. Razmerje intenzitet skupin proteinov smo izračunali iz LFQ intenzitete proteinov pri vzorcu v stresu in LFQ intenzitete proteinov kontrolnega vzorca. Pri kvantifikaciji Nglikoproteinov smo upoštevali prisotnost vsaj dveh »edinstvenih peptidov« ter razmerje intenzitet LFQ med kontrolnimi vzorci in vzorci v stresu, ki je moralo biti manjše od 0,7 ali večje od 1,3.

Kvantificirane N-glikoproteine, ki smo jih določili kot neznane ali hipotetične proteine z ustreznim razmerjem intenzitet LFQ med kontrolnimi in vzorci v stresu, smo uporabili pri iskanju homolognih proteinov z uporabo algoritma BLASTP (2012), kjer smo izvedli iskanje znotraj baze zelenih rastlin.

Analiza glikoproteinov z masno spektrometrijo je potekala na Univerzi v Oslu, na Oddelku za molekularne bioznanosti (Oslo, Norveška).

### 4 REZULTATI

#### 4.1 VPLIV POMANJKANJA VODE NA RASTLINE

Rastline navadnega fižola smo izpostavili trem stopnjam suše, hkrati pa smo imeli v poskus vključene tudi kontrolne rastline. Pri vseh kultivarjih smo pri rastlinah v sušnem stresu, pri katerih je vzorčenje potekalo 7. (suša 1) in 12. (suša 2) dan po prenehanju zalivanja, opazili rahlo ovenele liste od prvega do četrtega sestavljenega lista ter popolnoma rumene in po večini suhe prve prave liste (slika 10 in 11). Šele pri rastlinah, ki smo jih vzorčili 17. dan (suša 3) po prenehanju zalivanja, smo opazili rumenenje in večjo ovenelost sestavljenih listov. Listi kontrolnih rastlin v enaki fazi rasti (kontrola 3) so bili temno zelene barve, prvi pravi listi pa so zaradi staranja pričeli rahlo rumeneti.

Suša 2



Kontrola 2



Slika 10: Rastline kultivarja Starozagorski v suši 2 in pripadajoče kontrolne rastline (kontrola 2) Liste štirih rastlin smo uporabili za ekstrakcijo proteinov in analizo z 2D-DIGE. Figure 10: Plants of cultivar Starozagorski in drought 2 and corresponding control plants (control 2) Leaves of four plants were used for the extraction of proteins and for 2D-DIGE analysis. Suša 3



Slika 11: Rastline kultivarja Starozagorski v suši 3 in pripadajoče kontrolne rastline (kontrola 3) Liste štirih rastlin smo uporabili za ekstrakcijo proteinov in analizo z 2D-DIGE. Figure 11: Plants of cultivar Starozagorski in drought 3 and corresponding control plants (control 3) Leaves of four plants were used for the extraction of proteins and for 2D-DIGE analysis.

Rastlinam v sušnem stresu pri vsaki stopnji suše in kontrolnim rastlinam v enaki fazi rasti smo določili svežo in suho maso listov, RVV v listih, rastlinam v sušnem stresu pa še VVS. Pri rastlinah v sušnem stresu ter pri kontrolnih rastlinah smo opazili veliko variabilnost pri vrednostih sveže mase listov (slika 12A). Sveža masa listov se je močno povečala pri rastlinah v kontroli 2 in kontroli 3, zaradi rasti listov. Sveža masa listov se je statistično značilno razlikovala med rastlinami v suši 2 in kontrolnimi rastlinami v enaki fazi rasti v primeru kultivarja BAT 477, te razlike pa pri ostalih dveh kultivarjih niso bile statistično značilne. Pri rastlinah v suši 3 so bile vrednosti sveže mase listov najnižje, vendar se niso statistično značilno razlikovale med posameznimi kultivarji. Statistično značilne razlike smo opazili pri sveži masi listov rastlin v suši 3 glede na kontrole 3 pri vseh treh kultivarjih. Iz sveže mase listov opazimo, da je bila regeneracija rastlin najbolj uspešna pri Tibru, kjer ni bilo statistično značilnih razlik med rastlinami predhodno izpostavljenimi stresu in kontrolnimi rastlinami. Pri ostalih dveh kultivarjih

pa je bila ta razlika statistično značilna. Statistično značilnih razlik v sveži masi listov nismo opazili med kultivarji kontrolnih rastlin pri posameznem obravnavanju in med kultivarji rastlin v suši. Podoben potek rezultatov smo dobili tudi za suhe mase listov (slika 12B).



Slika 12: Sveža (A) in suha (B) masa listov kultivarjev BAT 477, Tiber in Starozagorski Vrednosti so podane v g/list s standardnim odklonom (N=5). Zvezdica označuje statistično značilne razlike (p < 0.05) v vrednosti mas pri rastlinah v stresu glede na pripadajoče kontrolne rastline. Figure 12: Fresh (A) and dry (B) mass of leaves from cultivars Tiber, BAT 477 and Starozagorski Values are the mean (g/leaf) ± standard error (N=5). Asterisks above the bars indicate significant differences (p < 0.05) between the mass values observed in stressed plants relative to those for the corresponding controls.

Iz slike 13 je razvidno, da imajo rastline v suši 1 in suši 2 zelo podobne vrednosti RVV pri vseh treh kultivarjih. Šele pri rastlinah v suši 3 je vrednost RVV padla pod 45 %. Po zalitju rastlin v stresu (regeneracija) so vrednosti RVV dosegle podobne vrednosti kot pri kontrolnih rastlinah. Pri kontrolnih rastlinah so bile vrednosti za RVV zelo podobne pri vseh obravnavanjih ter tudi med kultivarji.





Figure 13: The relative water content (RWC) of leaves from cultivars BAT 477, Tiber and Starozagorski Values are the mean (%)  $\pm$  standard error (N=5). Asterisks above the bars indicate significant differences (p < 0.05) between the RWC observed in stressed plants relative to those for the corresponding controls.

Pri rastlinah v sušnem stresu smo določili VVS, kar je predstavljeno v preglednici 2. Vrednosti VVS padajo z naraščajočo stopnjo suše in so zelo podobne pri Tibru in Starozagorskem, medtem ko so pri BAT-u 477 vrednosti VVS pri suši 3 nekoliko nižje. Kontrolnim rastlinam nismo merili VVS, ker smo jih zalivali do maksimalne retenzijske kapacitete.

Preglednica 2: Vsebnosti (%) vode v loncih za kultivarje Tiber, BAT 477 in Starozagorski Vrednosti so podane v % s standardnim odklonom (N=5).

Table 2: The soil water content (%) in pots for cultivars Tiber, BAT 477 and Starozagorski Values are the mean (%)  $\pm$  standard error (N=5).

Kultivar Obravnavanje	Tiber (%)	Starozagorski (%)	BAT 477 (%)
Suša 1	$41,9 \pm 7,0$	$39,4 \pm 7,2$	$35,9 \pm 4,1$
Suša 2	$29,6\pm4,8$	$25,5 \pm 1,6$	$26,5 \pm 1,1$
Suša 3	$18,3\pm0,7$	$17,5 \pm 1,2$	$14,1\pm0,5$

Glede na vrednosti RVV smo v nadaljnjo proteomsko analizo listov z 2D-DIGE vključili rastline v suši 2 in suši 3 ter kontrolne rastline v isti fazi rasti. Rastlin v suši 1 nismo vključili, ker se vrednosti RVV niso razlikovale glede na sušo 2, ponovno zalite rastline (regeneracija rastlin) pa so služile za indikacijo stopnje stresa. Z regeneracijo rastlin smo hoteli preveriti, ali so rastline prišle do točke, kjer ne bi bile sposobne premagati stresa ob ponovnem zalitju. V analizo stebel z izotopskim označevanjem in analizo glikoproteinov smo vključili rastline v suši 3 in kontrolne rastline v enaki fazi rasti. Pri tem smo se osredotočili samo na razlike v proteinih pri rastlinah v suši in kontrolnih rastlinah kultivarja Tiber.

# 4.2 ANALIZA CELOKUPNIH PROTEINOV IZ LISTOV KULTIVARJEV TIBER, STAROZAGORSKI ČERN IN BAT 477 Z 2D-DIGE

## 4.2.1 Analiza slik gelov proteinskih ekstraktov iz listov kultivarjev Tiber, Starozagorski čern in BAT 477

V proteomsko analizo smo vključili proteinske ekstrakte iz listov s štirimi biološkimi ponovitvami za vsako od dveh obravnavanj. Za oceno vsebnosti proteinov smo enak volumen proteinskih ekstraktov nanesli na NaDS-PAGE. Iz slike 14 je razvidno, da je vsebnost proteinov pri posameznih vzorcih primerljiva glede na intenziteto lis.

Na podlagi preliminarne ločitve proteinskih ekstraktov iz listov z 2D-PAGE v pH območju 3-10 smo ugotovili, da je le majhno število proteinov prisotnih v zelo bazičnem in kislem področju gela (slika 15). Zato smo se odločili, da za nadaljnjo izvedbo ločitve proteinov z 2D-PAGE, uporabimo trakove z IPG v pH območju 5-8.



Slika 14: NaDS-PAGE proteinskih ekstraktov iz listov kultivarjev BAT 477 (A), Starozagorski (B) in Tiber (C)

Figure 14: SDS-PAGE of protein extracts from leaves of cultivars BAT 477 (A), Starozagorski (B) and Tiber (C)





Figure 15: Preliminary separation of protein extracts from leaves with 2D-PAGE in the 3-10 pH range, the gel is stained with Coomassie G-250

Za vsak kultivar smo dobili osem gelov s fluorescentno označenimi proteini, pri čemer so bili na vsakem gelu prisotni interni standard, vzorec sušnega stresa in kontrolni vzorec. Za kvantitativno analizo gelov smo izločili področja gelov s slabo ločljivostjo (robne proteinske lise, regije okoli zelo intenzivnih lis in regije z visoko molekulsko maso). Za nadaljnjo analizo smo izločili en gel pri Tibru, za katerega smo predvidevali, da je prišlo do kontaminacije IPG traka. Skupno se je 543 proteinskih lis ujemalo med vsemi geli pri Starozagorskem, 400 proteinskih lis pri Tibru in 334 pri BAT-u 477. Število proteinskih lis, ki so se ujemale med geli pri posameznih kultivarjih, je različno zaradi fluorescentnega označevanja proteinov, ki je potekalo za vsak kultivar posebej in zaradi nadaljnje ločitve proteinov z 2D-PAGE. Le-ta je potekala na osmih gelih za vsak kultivar posebej, tako da smo na koncu dobili tri sete po osem gelov s fluorescentno označenimi proteini iz treh kultivarjev navadnega fižola. Proteinske lise, ki so se ujemale med vsemi geli, smo vključili v statistično analizo s programom Progenesis SameSpot in v analizo z metodo PCA ter PLS. Metodo PCA smo uporabili za razvrstitev vzorcev glede na posamezne komponente in združevanje vzorcev različnih obravnavanj po skupinah. Pri Tibru je glavna komponenta 1 (PC-1) pojasnila 32 % variabilnosti, pri Starozagorskem 38 % ter pri BAT-u 477 36 % variabilnosti (slika 16). Pri vseh treh kultivarjih je glavna komponenta 1 (PC-1) razvidno ločila vzorce v sušnem stresu in kontrolne vzorce, s tem da je bil pri Tibru in Starozagorskem prisoten po en vzorec (dan 17\_K3 pri Tibru in dan 12\_K3 pri Starozagorskem), ki se ni razvrstil v pripadajočo skupino. PC-2 pa je pojasnila 11 % variabilnosti pri Starozagorskem in BAT-u 477 ter 17 % pri Tibru. Vzdolž PC-2 se vzorci niso najbolje ločili glede na trajanje izpostavljenosti sušnemu stresu (dan 12 in dan 17 na sliki 16). Še najbolje so se vzorci v sušnem stresu (dan 12 in dan 17 na sliki 16A) ločili v primeru BAT-a 477. Iz tega lahko sklepamo, da so razlike pri vzorcih rastlin, ki so bile krajši ali daljši čas izpostavljene suši, bile prisotne, vendar niso tolikšne, da bi jih PC-2 ločila med sabo. Način porazdelitve kontrolnih vzorcev v neenotne skupine je bil pričakovan, saj je bila razlika med skupinama kontrolnih vzorcev le v času rasti.



Slika 16: Analiza PCA za BAT 477 (A), Starozagorski (B) in Tiber (C): razvrstitev proteinskih lis različno vzorčenih rastlin glede na 1. in 2. komponento PCA

-2 0 PC-1 (32%)

2

6 8

12 14

10

-16

-14

-12

-10 -8

-6 -4

Vzorčenje rastlin je potekalo 12. (dan 12) in 17. (dan 17) dan po prenehanju zalivanja. S1, S2, S3 in S4 predstavljajo štiri biološke ponovitve rastlin v stresu. K1, K2, K3 in K4 pa se nanašajo na kontrolne rastline in prav tako predstavljajo štiri biološke ponovitve. Roza kvadrati (dan 12) in rdeči krogi (dan 17) se nanašajo na rastline v stresu, oznake z zelenimi trikotniki (dan 12) in modrimi deltoidi (dan 17) se nanašajo na kontrolne rastline.

Figure 16: PCA score plots of BAT 477 (A), Starozagorski (B) and Tiber (C): clustering of protein spots from different sampling plants on 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> component of PCA

Plants were harvested on days 12 (dan 12) and 17 (dan 17) after the beginning of witholding water. S1, S2, S3 and S4 represent the stressed plants corresponding to the four biological replicates. C1, C2, C3 and C4 refer to control plants, representing four biological replicates. Pink squares (dan 12) and red circles (dan 17) refer to stressed plants, green triangles (dan 12) and blue deltoids (dan 17) refer to control plants.

Na podlagi proteinskih lis, ki so se ujemale med vsemi obravnavanimi geli, nam s pomočio programa Progenesis SameSpot, ki omogoča obdelavo, prileganje gelov ter statistično analizo proteinskih lis, ni uspelo določiti primernega števila proteinskih lis, katerih vsebnost se je spremenila v sušnem stresu. S programom smo namreč dobili preveliko število proteinskih lis s spremenjenimi vsebnostmi v stresnih pogojih, natančen ročni pregled proteinskih lis med vsemi geli v omenjenem programu pa je pokazal, da niso vse proteinske lise primerne za nadaljnjo obravnavo. Zato smo opravili še statistično analizo PLS. Proteinske lise, pri katerih smo zaznali statistično značilne spremembe med kontrolnimi in rastlinami v stresu in smo jih določili z metodo PLS, smo primerjali z rezultati analize s programom Progenesis SameSpot ter jih ponovno ročno pregledali. Tako smo na podlagi faktorja razlike (≥ 1,3), p- in q- vrednosti testa ANOVA (p < 0.05 in q < 0.05) iz Progenesis SameSpot ter PLS analize določili proteinske lise za nadaljnjo analizo z MS. Za analizo z MS smo določili 68 proteinskih lis s spremenjenimi vsebnostmi v stresnih pogojih pri Starozagorskem, 62 pri Tibru in 71 pri BAT-u 477. Pri tem smo tudi upoštevali, da smo vse proteinske lise lahko določili in izrezali iz preparativnih gelov. Izmed 68 proteinskih lis pri Starozagorskem jih je bilo 36 prisotnih s povečano vsebnostjo in 32 z zmanjšano vsebnostjo v sušnem stresu, pri Tibru je bilo 42 lis s povečano in 20 z zmanjšano vsebnostjo, pri BAT-u 477 pa smo določili 43 lis s povečano in 28 lis z zmanjšano vsebnostjo v sušnem stresu.

# 4.2.2 Identifikacija proteinov iz listov kultivarjev Tiber in Starozagorski čern z masno spektrometrijo

Z LC-MS/MS smo analizirali proteinske lise, ki so se statistično značilno razlikovale v vsebnosti med kontrolnimi rastlinami in rastlinami v sušnem stresu pri kultivarjih Tiber in Starozagorski. Kultivarja BAT 477 v to analizo nismo vključili, saj se glede na vrednosti RVV ni bistveno razlikoval od ostalih dveh kultivarjev. Omenjenega kultivarja v Sloveniji tudi ne pridelujemo, saj ni prilagojen našim rastnim razmeram, uvrščen je v srednje–ameriško dednino. Kultivarja Starozagorski in Tiber sta uvrščena v andsko dednino, ki prevladuje pri kultivarjih, ki se pridelujejo pri nas.

Analiza MS spektrov je bila opravljena s programom Mascot, z uporabo podatkovne zbirke NCBInr. Uspelo nam je identificirali 64 proteinov v primeru Starozagorskega ter 58 proteinov pri Tibru (slika 17). Zaradi neuspešne ekstrakcije proteinov iz proteinskih lis, ki so bile prisotne v zelo nizkih količinah na gelu, nam osem proteinov ni uspelo identificirati. Drug razlog za neuspešno identifikacijo pa je povezan z bazami podatkov, kjer nismo našli homolognih peptidnih sekvenc.

Z namenom, da bi ugotovili okvirni vpliv dveh različnih stopenj sušnega stresa na proteom listov, smo primerjali volumne proteinskih lis vzorcev s programom Progenesis SameSpot. Največje razlike v normaliziranih volumnih proteinskih lis med kontrolnimi in vzorci v sušnem stresu so bile pri vzorcih odvzetih 17. dan po prenehanju zalivanja. Normalizirani volumni vzorcev rastlin, ki so bile 12 dni izpostavljene sušnemu stresu, so se v manjši meri razlikovali od pripadajočih kontrolnih vzorcev, kar kaže na zgodnji vpliv stresa na proteom listov (delno grafično prikazano na sliki 18). Samo statistično značilne spremembe v volumnu proteinskih lis med kontrolnimi vzorci v sušnem stresu, ne glede na čas izpostavljenosti stresu, smo v naši raziskavi obravnavali kot primerne.



Slika 17: 2D-PAGE proteinskih ekstraktov listov kultivarja Starozagorski (A) in Tiber (B) Proteinske lise, kjer smo uspešno identificirali proteine, so označene na gelu. Figure 17: 2D-PAGE of protein extracts for cultivars Starozagorski (A) and Tiber (B) Successfully identified protein spots are marked on gels.



Slika 18: Primerjava proteinskih lis v 2D pogledu s programom Progenesis Samespot

A) Primer proteina z zmanjšano vsebnostjo v sušnem stresu: protein vključen v oksidacijo vode. Protein smo identificirali v lisi številka 877 pri Starozagorskem. B) Primer proteina s povečano vsebnostjo v sušnem stresu: acetohidroksikislinska sintaza. Protein smo identificirali v lisi številka 157 pri Starozagorskem.

Figure 18: Comparison of protein spots in 2D view using Progenesis Samespot

A) An example of protein with decreased abundance during drought stress: oxygen evolving enhancer protein. It was identified in spot number 877 in Starozagorski. B) An example of protein with increased abundance during drought stress: acetohydroxyacid synthase. It was identified in spot number 157 in Starozagorski.

Identificirane proteine (preglednica 3 in priloga B) smo glede na njihove biološke funkcije razvrstili v ustrezne skupine (slika 19). Ugotovili smo, da je največje število proteinov udeleženih v procesih fotosinteze in energijskega metabolizma, okvirno ena tretjina identificiranih proteinov pa je udeležena pri ATP pretvorbi, sintezi proteinov, proteolizi ali zvijanju proteinov oziroma imajo zaščitno in detoksifikacijsko vlogo. Medtem ko so omenjene skupine proteinov skupne obema kultivarjema, smo pri Starozagorskem identificirali tudi tri proteine, udeležene pri sekundarnem metabolizmu in signalni transdukciji. V različnih proteinskih lisah smo identificirali iste proteine (npr. ATP sintazo, transketolazo, protein Rubisco in druge), kar je verjetno povezano s prisotnostjo posttranslacijskih modifikacij proteinov, proteinskih izooblik, lahko pa nakazuje tudi na razgradnjo proteinov.





Proteini z nepoznanimi funkcijami predstavljajo 19 % identificiranih proteinov pri Tibru in 25 % pri Starozagorskem. Ker je odstotek proteinov z nepoznanimi funkcijami dokaj visok, smo se odločili, da poiščemo njihove homologne proteine z znanimi funkcijami (preglednica 4). Pri Tibru nam je pri vseh proteinih z nepoznano funkcijo uspelo določiti homologne proteine z znanimi biološkimi funkcijami, pri Starozagorskem pa za pet proteinov nismo dobili informacije o njihovi funkciji. Vsi homologni proteini imajo biološke funkcije povezane s predhodno omenjenimi skupinami.
Preglednica 3: Seznam identificiranih proteinov v listih pri kultivarjih Tiber in Starozagorski v sušnem stresu

Table 3: List of identified proteins in leaves of cultivars Tiber and Starozagorski under drought

Št. lise <sup>a</sup>	Identificirani proteini (vrsta)	Število ujemanj peptidov <sup>b</sup>	Teor. pI/Mw (kDa)	Eksp. pI/Mw (kDa)	Faktor razlike <sup>c</sup>
	ATP pretvorba				
	Tiber				
1098	nukleozid difosfat kinaza [Arabidopsis thaliana]	2	7.0/16.3	7.2/15.9	-3.4
1235	ATP sintaza CF1, alfa podenota [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	20	5.2/55.7	5.4/66.3	3.0
230	ATP sintaza CF1, alfa podenota [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	20	5.2/55.7	5.5/66.0	2.1
231	ATP sintaza CF1, alfa podenota [Phaseolus vulgaris]	19	5.2/55.7	5.6/66.0	3.1
161	V-H(+)-ATPaza, podenota A [ <i>Glycine max</i> ]	14	5.4/69.0	5.6/75.9	1.4
	Starozagorski				
804	nukleozid difosfat kinaza 1 [Pisum sativum]	2	5.9/16.5	7.3/16.4	-2.0
805	nukleozid difosfat kinaza [Arabidopsis thaliana]	3	7.0/16.3	6.7/16.3	-1.5
162	ATP sintaza CF1, alfa podenota [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	14	5.2/55.7	5.5/66.7	1.9
164	ATP sintaza CF1, alfa podenota [Phaseolus vulgaris]	20	5.2/55.7	5.4/66.0	1.5
171	ATPaza podenota 1 [Vigna radiata]	14	6.2/55.6	6.9/62.9	-2.0
	Sinteza proteinov				
	Tiber				
473	glutamin sintetaza PR-2 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	9	5.4/39.4	5.6/42.8	-2.5
619	30S ribosomski protein S5 [Arabidopsis thaliana]	3	9.0/32.7	6.6/36.5	-2.5
	Starozagorski				
343	glutamin sintetaza PR-2 [Phaseolus vulgaris]	9	5.4/39.4	5.5/43.0	-2.7
394	protein podoben cistein sintazi [Glycine max]	10	5.5/34.4	5.7/40.6	-1.3
157	acetohidroksikislinska sintaza [Phaseolus vulgaris]	6	6.8/70.7	6.8/68.8	-2.5
	Energijski metabolizem				
	Tiber				
523	malat dehidrogenaza [Plantago major]	8	6.1/36.0	6.3/41.0	-1.7
536	malat dehidrogenaza [Glycine max]	5	8.2/36.3	7.0/40.4	-1.7
749	domnevna triozafosfat izomeraza [ <i>Ricinus communis</i> ]	4	6.6/34.1	5.6/28.7	-1.9
725	triozafosfat izomeraza [Phaseolus vulgaris var. nanus]	12	5.9/27.4	6.2/30.4	-2.1
1195	plastidna aldolaza NPALDP1 [ <i>Nicotiana paniculata</i> ]	9	6.9/42.8	6.0/42.2	2.6
1213	plastidna aldolaza NPALDP1 [Nicotiana paniculata]	5	6.9/42.8	6.8/41.5	1.8
458	fruktoza-difosfat aldolaza, podobna citoplazmatskemu izoencimu [Glycine max]	11	7.1/38.5	7.5/43.4	-2.3
1193	enolaza [Glycine max]	15	5.3/48.0	5.7/59.2	-2.2

Št. lise <sup>a</sup>	Identificirani proteini (vrsta)	Število ujemanj peptidov <sup>b</sup>	Teor. pI/Mw (kDa)	Eksp. pI/Mw (kDa)	Faktor razlike <sup>c</sup>
136	transketolaza, podobna kloroplastni [ <i>Glycine max</i> ]	10	6.0/80.5	6.0/78.9	2.2
141	transketolaza, podobna kloroplastni [ <i>Glycine max</i> ]	9	6.2/80.7	6.1/78.8	1.8
774	ribuloza-fosfat 3-epimeraza, podobna kloroplastni [ <i>Glycine max</i> ]	5	8.2/30.1	5.8/27.0	1.6
	Starozagorski			=	
885	malat dehidrogenaza [ <i>Glycine max</i> ]	7	8.2/36.3	7.1/40.0	-1.7
546	triozafosfat izomeraza [Phaseolus vulgaris var. nanus]	13	5.9/27.4	6.5/28.8	-1.5
339	fruktoza-difosfat aldolaza, citoplazmatski izoencim 1 [ <i>Pisum sativum</i> ]	6	6.4/38.7	5.9/43.3	2.4
373	fruktoza-difosfat aldolaza 2, podobna kloroplastni [ <i>Glycine max</i> ]	11	8.2/43.1	5.9/42.0	2.1
381	plastidna aldolaza NPALDP1 [ <i>Nicotiana paniculata</i> ]	9	6.9/42.8	6.1/41.8	1.9
347	fruktoza-difosfat aldolaza, podobna citoplazmatskemu izoencimu [ <i>Glycine max</i> ]	6	7.1/38.5	7.4/43.0	-2.3
357	citosolna gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza [Antirrhinum majus]	5	8.3/36.8	7.3/42.4	-1.7
442	domnevna glukoza-6-fosfat 1-epimeraza [Glycine max]	2	5.1/30.7	5.5/37.9	1.7
98	transketolaza, podobna kloroplastni [Glycine max]	10	6.0/80.5	6.1/78.8	1.5
101	transketolaza, podobna kloroplastni [ <i>Glycine max</i> ]	9	6.0/81.1	5.9/78.7	2.5
102	transketolaza, podobna kloroplastni [Glycine max]	10	6.0/80.5	6.0/78.4	2.0
105	transketolaza, podobna kloroplastni [Glycine max]	12	6.0/80.5	6.1/78.3	1.4
573	ribuloza-fosfat 3-epimeraza, podobna kloroplastni [ <i>Glycine max</i> ]	5	7.7/30.1	5.7/27.5	1.6
	Fotosinteza Tibar				
	kloronlastna ribuloza difosfat				
413	karboksilaza/oksigenaza aktivaza	21	8.2/48.3	5.6/44.4	2.3
506	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	6	8.2/48.3	6.2/41.8	1.7
1184	ribuloza difosfat karboksilaza [Phaseolus vulgaris]	6	8.6/15.9	7.2/14.2	2.6
419	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	7	8.2/48.3	5.8/44.4	1.4
350	Rubisco aktivaza [ <i>Glycine max</i> ]	12	5.7/52.7	5.2/50.6	-2.3
187	vezavni protein na Rubisco veliko podenoto, kloroplastna beta podenota [ <i>Glycine max</i> ]	19	5.9/63.1	5.4/72.5	1.9

Št. lise <sup>a</sup>	Identificirani proteini (vrsta)	Število ujemanj peptidov <sup>b</sup>	Teor. pI/Mw (kDa)	Eksp. pI/Mw (kDa)	Faktor razlike <sup>c</sup>
647	protein 1 vključen v oksidacijo vode [Solanum tuberosum]	5	5.8/35.6	5.4/34.6	-1.7
812	protein 2 vključen v oksidacijo vode [ <i>Pisum</i> sativum]	3	8.3/28.2	6.5/25.3	-2.4
644	protein 1 vključen v oksidacijo vode [Zea mays]	6	5.6/34.8	5.3/34.7	-1.7
1197	protein 1 vključen v oksidacijo vode [ <i>Glycine max</i> ]	2	6.7/35.3	5.8/29.8	-1.8
645	protein 1 vključen v oksidacijo vode [ <i>Glycine</i> max]	7	6.7/35.3	5.3/34.6	-1.4
804	protein vključen v oksidacijo vode [ <i>Medicago truncatula</i> ]	3	9.1/29.4	7.3/16.4	-2.0
832	kloroplastni klorofil a-b vezavni protein 6A [Solanum lycopersicum]	4	5.8/26.8	5.7/23.1	-1.6
714	karbonska anhidraza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	11	8.1/35.9	6.6/30.7	-2.2
763	karbonska anhidraza [Phaseolus vulgaris]	5	8.1/35.9	7.0/27.6	1.7
767	karbonska anhidraza [Phaseolus vulgaris]	6	8.1/35.9	6.6/27.3	2.0
784	karbonska anhidraza [Phaseolus vulgaris]	14	8.1/35.9	7.2/26.8	1.3
793	karbonska anhidraza [Phaseolus vulgaris]	11	8.1/35.9	7.7/26.6	-2.0
	Starozagorski				
464	protein 1 vključen v oksidacijo vode [ <i>Glycine</i> max]	13	6.7/35.5	5.2/34.4	2.6
465	protein 1 vključen v oksidacijo vode [ <i>Glycine</i> max]	15	6.7/35.5	5.3/34.4	1.8
877	protein 2 vključen v oksidacijo vode [ <i>Glycine max</i> ]	5	7.7/28.6	5.6/26.9	2.4
890	protein 2 vključen v oksidacijo vode [ <i>Glycine</i> max]	6	7.7/28.6	6.0/26.7	1.9
557	karbonska anhidraza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	4	8.1/35.9	6.2/28.2	1.9
438	kloroplastna feredoksin-NADP+ reduktaza [Pisum sativum]	6	8.6/40.4	6.1/38.1	1.6
302	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	21	8.2/48.3	5.4/46.1	2.9
851	ribuloza difosfat karboksilaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	4	9.2/20.4	7.2/14.2	3.8
919	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	20	8.2/48.3	5.5/45.0	2.7
320	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	13	8.2/48.3	5.7/44.6	1.8
321	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	8	8.2/48.3	5.9/44.6	1.4
325	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	20	8.2/48.3	5.7/44.3	2.2

Št. lise <sup>a</sup>	Identificirani proteini (vrsta)	Število ujemanj peptidov <sup>b</sup>	Teor. pI/Mw (kDa)	Eksp. pI/Mw (kDa)	Faktor razlike <sup>c</sup>
	Proteoliza in zvijanje proteinov				
	Tiber				
815	beta podenota proteasoma	5	5 3/2/1 0	5 5/2/1 8	1.8
015	[Medicago truncatula]	5	5.5/24.9	J.J/24.0	-1.0
867	peptidil-prolil cis-trans izomeraza	3	7 6/28 1	6 0/20 2	-2.8
807	[Medicago truncatula]	5	7.0/20.1	0.0/20.2	-2.0
892	peptidil-prolil cis-trans izomeraza	3	7 6/28 1	6 0/19 5	-22
072	[Medicago truncatula]	5	7.0/20.1	0.0/17.5	2.2
800	kloroplastni šaperonin, 20 kDa [Glycine max]	4	8.6/26.5	5.9/25.9	-1.9
679	prekurzor cisteinske proteinaze	3	6.4/40.4	5.7/33.0	-2.3
	[Phaseolus vulgaris]	_			
672	cisteinska proteinaza CP2	6	6.2/40.4	5.9/33.3	-2.2
	[Phaseolus vulgaris]				
	Starozagorski				
545	alfa podenota (tip 2A) proteasoma	8	5.5/25.6	6.0/28.9	-1.8
	[Glycine max]				
497	[Phasoolus yulgaris]	5	6.4/40.4	5.9/32.4	-1.9
	[Fnuseolus vulgaris]				
499	[Phaseolus yulgaris]	3	6.4/40.4	5.5/32.3	-2.5
	domnevna pentidilprolil izomeraza				
711	[Orvza sativa Isponica Group]	2	9.4/26.7	6.9/21.3	1.5
	Sekundarni metabolizem				
	Starozagorski				
	1-deoksi-D-ksiluloza 5-fosfat				
279	reduktoizomeraza [ <i>Glycine max</i> ]	10	5.9/50.8	5.9/49.4	-1.6
••••••	Signalna transdukcija				
	Starozagorski				
448	aneksinu podoben protein RJ4 [ <i>Glycine max</i> ]	6	7.1/35.8	7.3/37.1	-3.6
	Proteini povezani z ROS, obrambo in				
	stresom				
	Tiber				
404	format dehidrogenaza [Phaseolus vulgaris]	5	6.5/41.5	6.8/44.5	-2.6
020	manganova superoksid dismutaza	2	C 1/15 A	67/220	о <i>г</i>
820	[Glycine max]	Z	0.1/15.4	0.7/23.9	-2.3
720	citosolna askorbat peroksidaza	2	5 6/07 1	5 0/20 0	17
730	[Vigna unguiculata]	3	5.0/27.1	3.9/30.0	-1./
753	citosolna askorbat peroksidaza	0	5 6/27 1	6 0/28 1	15
155	[Vigna unguiculata]	7	5.0/27.1	0.0/20.4	-1.5
959	tioredoksin [Arachis hypogaea]	4	5.6/17.5	5.8/18.3	-1.5
	Starozagorski				
626	manganova superoksid dismutaza	2	6 1/15 /	67/250	-2.4
020	[Glycine max]	<i>ل</i>	5.1/15.7	0.7723.0	<i>∠.</i> .⊤
267	prekurzor peroksidaze 1 [Phaseolus vulgaris]	6	5.8/37.1	6.8/52.3	-4.6
737	mali protein vročinskega šoka, 17.7 kDa	5	6 8/17 7	7 0/20 3	-10.0
	[Vigna unguiculata]	5	0.0/1/./	1.0/20.3	10.0
327	format dehidrogenaza [Phaseolus vulgaris]	15	6.5/41.5	6.8/44.2	-2.1
521	dehidrin [Vigna unguiculata]	2	6.0/26.5	7.0/30.1	-2.6

Št. lise <sup>a</sup>	Identificirani proteini (vrsta)	Število ujemanj peptidov <sup>b</sup>	Teor. pI/Mw (kDa)	Eksp. pI/Mw (kDa)	Faktor razlike <sup>c</sup>
602	domnevna glutation S-transferaza	3	5.6/24.8	6.2/26.6	-1.9
495	hidroksiacilglutation hidrolaza	2	5.5/18.9	6.2/32.5	-2.1
400	[Medicago sativa] kloroplastna kinon oksidoreduktaza podobna	10	0.0/42.0	6 2/40 3	15
400	At1g23740 [ <i>Glycine max</i> ] kloroplastna kinon oksidoreduktaza podobna	-	9.0/42.0	0.2/40.5	1.5
396	At1g23740 [Glycine max]	7	9.0/42.0	5.9/40.5	1.7
	Neopreaeijeni proteini				
101	Tiber		50/450	5 0/44 1	1.0
431	neznan [ <i>Glycine max</i> ]	8	5.9/45.8	5.2/44.1	1.8
794	neznan [ <i>Glycine max</i> ]	3	7.7/28.6	5.4/26.3	2.2
779	neznan [ <i>Glycine max</i> ]	2	8.6/29.8	5.9/26.9	-1.5
809	neznan [Glycine max]	2	5.8/23.5	6.2/25.5	-2.3
831	hipotetični protein VITISV_028610 [Vitis vinifera]	2	6.9/26.9	5.8/23.2	-2.3
673	hipotetični protein LOC100527131 [Glycine max]	2	5.4/27.9	6.2/33.3	-3.0
700	domnevni nekarakteriziran kloroplastni protein, podoben At2g37660 [ <i>Glycine max</i> ]	10	5.7/27.7	5.5/31.4	-1.3
707	domnevni nekarakteriziran kloroplastni protein, podoben At2g37660 [ <i>Glycine max</i> ]	8	5.7/27.7	5.7/31.1	-1.5
888	hipotetični protein LOC100500096 [Glvcine max]	9	8.7/21.3	5.9/19.7	-2.2
1058	hipotetični protein LOC100500093 [Glycine max]	7	5.5/15.3	5.8/16.6	-2.4
1234	neznan [ <i>Glycine max</i> ]	4	6.7/34.5	6.7/39.9	-1.9
	Starozagorski	-	01110 110	011/02/12	
385	neznan [Medicago truncatula]	3	8 8/44 8	6 6/41 5	1.8
390	domnevni nekarakteriziran kloroplastni	4	7.7/42.4	7.0/41.3	1.5
500	protein, podoben Atig09340 [Giveine max]	4	77/20 (	5 2/07 2	25
580	neznan [ <i>Glycine max</i> ]	4	1.1/28.6	5.3/27.3	3.3
612	[ <i>Glycine max</i> ]	7	5.3/25.2	5.5/26.1	-1.4
623	neznan [Medicago truncatula]	5	6.6/31.2	5.4/25.4	1.8
634	neznan [Glycine max]	5	8.6/29.7	7.7/24.8	-2.5
669	neznan [Glycine max]	5	8.4/24.5	7.7/23.5	-2.9
694	hipotetični protein LOC100500096 [Glycine max]	7	8.7/21.3	5.8/21.9	-1.7
746	hipotetični protein LOC100499771 [Glycine max]	6	5.4/17.5	5.7/19.6	-1.5
756	hipotetični protein LOC100500325 [Glycine max]	1	6.0/17.5	6.4/18.7	-4.8
759	neznan [ <i>Glycine max</i> ]	1	6.0/17.5	6.5/18.4	-3.4
781	hipotetični protein LOC100500093 [Glycine max]	3	5.5/15.3	5.7/17.4	-1.7
836	hipotetični protein LOC100526924 [ <i>Glycine max</i> ]	3	9.1/20.1	5.8/14.3	1.5

Št. lise <sup>a</sup>	Identificirani proteini (vrsta)	Število ujemanj peptidov <sup>b</sup>	Teor. pI/Mw (kDa)	Eksp. pI/Mw (kDa)	Faktor razlike <sup>c</sup>
875	g5bf [Arabidopsis thaliana]	5	8.2/42.8	6.8/41.0	2.6
449	neznan [Glycine max]	5	5.4/31.7	5.6/37.0	-2.4
324	neznan [Glycine max]	3	6.5/41.2	6.6/44.5	-1.5

<sup>a</sup> Številke proteinskih lis se nanašajo na sliko 17;

<sup>b</sup> število peptidov identificiranih za posamezen protein;

<sup>c</sup> faktor razlike vključuje normalizirani volumen proteina, ki je določen s programom Progenesis SameSpot (negativne vrednosti predstavljajo faktor povišanja volumna proteina v stresu; pozitivne vrednosti predstavljajo faktor zmanjšanja volumna proteina v stresu).

<sup>a</sup> Number of protein spots refer to the Figure 17;

<sup>b</sup> the number of peptides identified for each protein;

<sup>c</sup> fold change values based on the normalized volume of protein from Progenesis SameSpot (negative values - increased in abundance under drought; positive values - decreased in abundance under drought).

Preglednica 4: Homologni proteini neznanih in hipotetičnih proteinov iz preglednice 3 Za iskanje homolognih proteinov smo uporabili NCBI proteinsko bazo znotraj programa BLASTP (2012).

Table 4: Homologues of the unknown and hypothetical proteins from Table 3

The NCBI non-redundant protein database within BLASTP (2012) was used for search homologous proteins.

Št. lise	Homologni protein (vrsta)	BLASTP vrednost	Podobnost (%)
	Tiber		
431	fosforibulokinaza, podobna kloroplastni [Glycine max]	817	99
794	protein 2 vključen v oksidacijo vode [Glycine max]	523	99
779	kloroplastni klorofil a-b vezavni protein 3 [Glycine max]	469	99
809	glutation transferaza DHAR2 [Populus trichocarpa]	352	82
831	kloroplastni tilakoidni protein, 19kDa [Ricinus communis]	257	85
673	hidroksiacilglutation hidrolaza [Medicago truncatula]	431	83
700	NAD-odvisna epimeraza/dehidrataza [Zea mays]	426	82
707	NAD-odvisna epimeraza/dehidrataza [Zea mays]	426	82
888	mitohondrijski peroksiredoksin [Pisum sativum]	330	83
1058	40S ribosomalni protein S12 [Medicago truncatula]	244	99
1234	kloroplastna kinon oksidoreduktaza podobna At1g23740 [Glycine max]	435	73
	Starozagorski		
580	protein 2 vključen v oksidacijo vode [Glycine max]	523	99
612	proteasom, beta podenota [Glycine max]	447	97
623	klorofil a-b vezavni protein [Ricinus communis]	398	91
634	kloroplastna ATP-odvisna Clp proteaza, proteolitična podenota 6 [ <i>Glycine max</i> ]	511	99
669	2-C-metil-D-eritritol 2 4-ciklodifosfat sintaza [Medicago truncatula]	369	82
694	mitohondrijski peroksiredoksin [Pisum sativum]	330	83
746	peroksiredoksin [Pisum sativum]	305	93
781	40S ribosomski protein S12 [Medicago truncatula]	244	99
836	kloroplastni tioredoksin M4 [Glycine max]	341	92
449	domnevna laktoilglutation liaza [Glycine max]	572	99
324	alkohol dehidrogenaza, razred 3 [Glycine max]	775	99

# 4.2.3 Bioinformatska analiza proteinov iz listov kultivarjev Tiber in Starozagorski čern

Programa STRING (Szklarczyk in sod., 2011) in BiNGO (Maere in sod., 2005) smo uporabili za ponazoritev PPI, bioloških poti in molekulskih funkcij. To nam je služilo kot nadgradnja funkcijske analize proteinov. Z mrežo proteinskih interakcij, ki smo jo dobili s programom STRING (Szklarczyk in sod., 2011), smo dobili vpogled v funkcijske povezave med različnimi proteini. Pri prikazu PPI za Tiber (slika 20), so označeni proteini, ki so razvrščeni v dve funkcionalni skupini (fotosinteza in energijski metabolizem) z največjim številom proteinov. Fruktoza-difosfat aldolaza (AT4G38970) je osrednje jedro celotne interakcijske mreže, zaradi največjega števila interakcij z ostalimi proteini, ki so v celoti udeleženi v procese fotosinteze in energijskega metabolizma. Za ponazoritev statistično pomembnih kategorij bioloških poti in molekulskih funkcij povezanih z odzivom na sušni stres smo uporabili program BiNGO (slika 21; Maere in sod., 2005). Celoten seznam pomembnejših bioloških poti in molekulskih funkcij za identificirane proteine je prikazan v prilogi C. Ena izmed najbolj pomembnih statistično značilnih bioloških poti pri Tibru je povezana z odzivom na abiotski stimulus ( $p=2.90 e^{-13}$ ). Na sliki 21 lahko opazimo še dve pomembni skupini- regulacijo metabolnih procesov in regulacijo fotosinteze. Statistično značilne molekulske funkcije določene s programom BiNGO so povezane s proteini, ki vežejo bakrove ione (p=9,82 e<sup>-08</sup>), imajo katalitsko (p=1,07 e<sup>-05</sup>) ter antioksidacijsko (p=4,01 e<sup>-05</sup>) aktivnost. Podobne interakcijske mreže smo določili za Starozagorskega (priloga D).



Slika 20: Analiza PPI mreže s programom STRING (Szklarczyk in sod., 2011) za kultivar Tiber Prikaz ne temelji direktno na identificiranih proteinih, temveč na homolognih proteinih navadnega repnjakovca. Različne barve povezav med proteini predstavljajo informacijo, iz katerega vira so bile povezave pridobljene (Szklarczyk in sod., 2011). Označeni sta dve skupini proteinov (proteini udeleženi pri fotosintezi in energijskem metabolizmu) z največ PPI.

Figure 20: Analysis of PPI network by programme STRING (Szklarczyk in sod., 2011) for cultivar Tiber Network is not based on the identified proteins, but on their homologous proteins from *Arabidopsis thaliana*. Different line colours represent the types of evidence used in predicting the associations (Szklarczyk in sod., 2011). Two clustres of highly interacting protein nodes are marked with circles and include proteins involved in photosynthesis and energy metabolism.



Slika 21: Prikaz mreže bioloških poti (A) in molekulskih funkcij (B) s programom BiNGO (Maere in sod., 2005) za kultivar Tiber

Prikaz ne temelji direktno na identificiranih proteinih, temveč na homolognih proteinih navadnega repnjakovca. Velikost vozlov je povezana s številom proteinov, barva pa predstavlja statistično značilnost (p-vrednost) posameznega vozla. Podobne mreže z dodatno prikazanimi potmi za sekundarni metabolizem smo dobili za Starozagorskega (priloga D).

Figure 21: Biological pathway (A) and molecular function (B) networks generated by BiNGO (Maere in sod., 2005) for cultivar Tiber

Network is not based on the identified proteins, but on their homologous proteins from *A. thaliana*. The size of the node is related to the number of proteins and the colour represents the p-value for the statistical significance of the node. For Starozagorski, a similar network with the addition of pathways for secundary metabolism was obtained (Supplementary D).

#### 4.3 ANALIZA CELOKUPNIH PROTEINOV STEBEL KULTIVARJA TIBER

#### 4.3.1 Analiza slik gelov proteinskih ekstraktov iz stebel kultivarja Tiber

Koncentracijo proteinskih ekstraktov iz stebel kultivarja Tiber za vzorce v sušnem stresu in kontrolne vzorce smo določili na osnovi umeritvene krivulje z BSA. Za združene kontrolne vzorce smo določili koncentracijo 2,6 mg/ml, za vzorce v sušnem

stresu pa 2,8 mg/ml. Koncentraciji obeh vzorcev smo izenačili in jih nanesli na NaDS-PAGE (slika 22). Iz gela smo izrezali 16 proteinskih rezin za vzorce v sušnem stresu in 16 proteinskih rezin za kontrolne vzorce. Vzorce v suši in kontroli smo označili z izotopskima reagentoma. Uporabili smo sukcinimidne reagente, ki se vežejo na primarne amino skupine lizina in N-terminalne skupine peptidov. Nato smo združili posamezne proteinske rezine kontrolnega vzorca in vzorca v suši, vzorce razgradili s tripsinom ter analizirali z LC-MS/MS.



Slika 22: Ločitev proteinskih ekstraktov iz stebel kultivarja Tiber z NaDS-PAGE

Iz gela smo izrezali 16 proteinskih rezin za vzorce v sušnem stresu (S1-S16) in 16 proteinskih rezin za kontrolne vzorce (K1-K16). Označevanje proteinov s stabilnimi izotopi v gelu je potekalo po postopku opisanem pri Asara in sod. (2006).

Figure 22: SDS-PAGE separation of protein extracts from stems of cultivar Tiber

Sixteen protein slices of drought stress samples (S1-S16) and 16 slices of control samples (K1-K16) were excised from the gel. Procedure for in-gel stable isotope labeling was performed as described by Asara et al. (2006).

#### 4.3.2 Identifikacija proteinov iz stebel kultivarja Tiber z masno spektrometrijo

Po analizi z LC-MS/MS smo proteinske vzorce v sušnem stresu in kontrolne vzorce označene z dvema različnima izotopskima označevalcema analizirali s programom MaxQuant. Analiza je bila opravljena s 16 vzorci naenkrat. Vzorci v sušnem stresu so bili označeni z izotopskim reagentom s težko skupino, kontrolni vzorci pa z reagentom z lahko skupino (spekter izotopsko označenega peptidnega para je prikazan na sliki 23).



Slika 23: Primer izotopsko označenega peptidnega para, ki ne kaže relativne spremembe signala glede na ostale peptide na relativni intenzitetni skali

Figure 23: An example of isotope-labeled peptide pair showing no signal change relative to the background peptides on the relative intensity scale

Z vnesenimi parametri iskanja smo dobili skupno 560 zadetkov skupin proteinov, od katerih je imelo 222 skupin proteinov določeno razmerje med označevalcema (razmerje H/L – razmerje med težko in lahko skupino označevalca). Pri ostalih skupinah proteinih tega razmerja program ni mogel določiti. Od 222 skupin proteinov je imelo 24 skupin proteinov razmerje H/L v območju 0,1-0,7; 61 skupin proteinov pa je imelo razmerje H/L enako ali večje od 1,3. Od 85 zadetkov z razmerjem H/L pod 0,7 in nad 1,3 je bilo 45 skupin proteinov, ki so imeli skupno dva ali več »edinstvenih« peptidov. »Edinstveni« peptidi v programu MaxQuant predstavljajo skupno število peptidov, ki so povezani s samo eno skupino proteinov. V preglednici 5 so prikazani proteini z razmerjem H/L pod 0,7 in nad 1,3 ter z vsaj dvema »edinstvenima« peptidoma. Preglednica vsebuje informacijo o identificiranih skupinah proteinov, pridobljenih iz določene serije peptidov. Posamezno skupino proteinov predstavljajo proteini iz različnih rastlinskih vrst ter tudi neznani in hipotetični proteini. Posamezne skupine proteinov smo poimenovali po proteinih z znanimi funkcijami. Pri dvanajstih skupinah proteinov smo zasledili zmanjšanje njihove vsebnosti v suši, pri ostalih proteinih pa povečanje. Zaradi analize s šestnajstimi vzorci naenkrat, ni podatka, katere skupine proteinov so prisotne v določenih proteinskih rezinah. Zaradi obravnavanja skupin proteinov, ki jih sestavljajo proteini iz različnih rastlinskih vrst, tudi ni informacije o rastlinskih vrstah. Primer izpisa iz MaxQuanta za hsp70 je prikazan na sliki 24.

Preglednica 5: Seznam identificiranih skupin proteinov iz stebel kultivarja Tiber

Predstavljene so skupine proteinov z razmerjem vrednosti H/L pod 0,7 in nad 1,3 ter številom »edinstvenih« peptidov nad 2. Razmerje H/L pod 1 predstavlja zmanjšanje vsebnosti proteinov v suši, razmerje nad 1 pa povečanje.

Table 5: A list of identified protein groups from stem of cultivar Tiber

The protein groups with number of unique peptides over 2 and ratio H/L under 0,7 and over 1,3 are presented. Ratio H/L under 1 represents decrease in abundance in drought, ratio H/L over 1 represents increase in abundance.

Skupina proteinov	Št. proteinov	Št. peptidov	Št. »edinstvenih« peptidov <sup>a</sup>	PEP	Razmerje H/L
Energijski metabolizem					
saharoza sintaza	3	14	9	3.15E-164	0.1
alkohol dehidrogenaza	13	2	2	3.09E-07	0.5
fosfoglicerat kinaza	5	2	2	1.66E-37	0.7
fosfoglukomutaza	6	2	2	3.45E-12	1.3
gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza	16	2	2	1.42E-34	1.3
mitohondrijski dikarboksilat/trikarboksilat transporter*	1	4	4	4.75E-47	1.3
piruvat ortofosfat dikinaza	7	2	2	8.69E-06	1.5
citrat sintaza	4	2	2	2.02E-07	2.0
lipoksigenaza L4	19	9	9	8.46E-77	2.1
lipoksigenaza	4	10	10	4.60E-96	2.3
fosfoenolpiruvat karboksilaza	6	6	5	1.02E-47	2.4
Fotosinteza					
Rubisco aktivaza	7	3	3	7.98E-15	0.6
vezavni protein za Rubisco veliko podenoto*	15	4	2	2.69E-53	0.7
apoprotein A1 fotosistema I P700	22	3	3	3.45E-10	1.3
protein D fotosistema II	18	5	5	9.27E-39	1.3
ribuloza-1.5-difosfat karboksilaza/oksigenaza, velika podenota	113	12	12	8.58E-125	1.4
apoprotein A2 fotosistema I P700	4	3	3	5.04E-45	1.5
Proteini povezani z ROS, obrambo in stresom					
mitohondrijski hsp70	6	3	2	2.00E-12	1.3
hsp90	5	3	3	2.82E-16	1.3
katalaza	47	4	4	1.32E-27	1.6
peroksisomalna glikolat oksidaza	6	5	4	3.25E-54	2.4
hsp70	13	7	5	2.09E-32	5.1
Sinteza proteinov					
evkariontski iniciacijski faktor 4A-III	2	3	2	6.31E-19	1.3
glutamil/glutaminil-tRNA sintetaza	5	2	2	1.56E-07	1.3

Skupina proteinov	Št. proteinov	Št. peptidov	Št. »edinstvenih« peptidov <sup>a</sup>	PEP	Razmerje H/L
40s ribosomalni protein SA	53	5	4	5.93E-154	1.3
ribosomalni protein L4/L1	5	2	2	1.88E-08	1.5
S-metil-5-tioribozna kinaza	3	2	2	7.86E-08	1.8
ATP pretvorba					
AAA-tip ATPaze	63	3	3	3.13E-13	0.5
ADP-glukoza pirofosforilaza	23	7	7	1.87E-81	0.7
ATP sintaza	11	2	2	3.36E-05	1.5
ATP sintaza, beta podenota	26	7	7	1.25E-140	1.6
Proteoliza in zvijanje proteinov					
alfa podenota proteasoma *	4	3	3	3.19E-17	0.7
šaperon ClpB3*	2	7	2	1.12E-37	1.3
aspartatna proteaza*	40	2	2	1.46E-08	1.4
ne-ATPazna regulatorna podenota proteasom 26S*	7	2	2	1.62E-05	1.5
cisteinska peptidaza	1	4	4	4.36E-12	1.6
Regulatorni proteini					
14-3-3 protein*	15	4	2	3.46E-55	0.5
splošni regulatorni faktor	28	2	2	9.09E-08	0.7
DEAD/DEAH box RNA helikaza	12	2	2	2.45E-06	0.7
Transportni proteini					
vakuolna protonska pirofosfataza	5	2	2	8.15E-13	2.3
NADH dehidrogenaza 1, podenota 9*	1	2	2	1.01E-20	1.4
Skladiščenje					
semenski skladiščni protein	3	4	4	4.88E-55	3.3
glutelin tipa A*	1	2	2	6.68E-54	2.4
Signaliziranje					
s hipersenzitivnostjo induciran protein	11	3	3	2.82E-11	1.4
Strukturni proteini					
beta tubulin	27	7	2	5.75E-65	0.6

<sup>a</sup> Število peptidov najdenih samo v imenovani skupini proteinov;

\* homologni proteini neznanih proteinov.

<sup>a</sup> The number of unique peptides associated with the protein group (these peptides are not shared with another protein group);

\* homologous proteins of the unknown proteins.

	Ime skupine proteinov	ļ.	Št. proteinov	Št. peptidov	Št. peptidov na samo v imen skupini prote	ajdenih ovani einov	Pokritost sekvence [%]	PEP	Razmerje H/L		
	protein vročinskega šoka, 70 k	a	13	7	5		17.9	2.09E-32	5.1		
6	-	_		V			~				
1	gi   1771479  emb  CAA67867.1   heat shock protein hsp70 [Pisum sativum] ei 219764958  emb  CAW639321   unnamed		Sekvenca	peptida	Dolžina sekvence peptida	Vod	ilni protein pov peptidom	ezan s	PEP	Vrednost MaxQuant	Razmerje H/L
2	protein product [Pisum sativum] gi[219773917]emb[CAW36974.1] unnamed protein product [Pisum sativum]	1 DN	NLLGKFELTGI	PPAPR	18	gi 177   heat [Pisum	1479 emb CA/ shock protein h ı sativum]	467867.1 sp70	0.007709	66.965	1.0319
4	gi  257307193 emb CBC46421.1  unnamed protein product [Pisum sativum] gi  257344403 emb CBC02859.1  unnamed	2    NE	EPTAAAIAYGL	DKKASR	20	gi   1771479   emb   CAA67867.1 20   heat shock protein hsp70 [Pisum sativum]			1.32E-07	96.544	6.0071
5	protein product [Pisum sativum] gi   562006  gb   AAA82975.1   PsHSP71.2 [Pisum sativum]	3 VEI	VEIIPNDQGNR		11	gi   1771479 emb CAA67867.1   heat shock protein hsp70 [Pisum sativum]		A67867.1 sp70	0.000674	110.53	ni določeno
7	gi   123601 sp   P26413.1   HSP70_SOYBN RecName: Full=Heat shock 70 kDa protein	4 NA	VVTVPAYFND	SQR	15	gi   219764820   emb   CAW6386 3.1   unnamed protein product [Glycine max]		AW6386 product	9.05E-06	96.464	ni določeno
8	gi 18663 emb CAA44620.1  Heat Shock 70kD protein [Glycine max] gi 219766691 emb CAW64017.1  unnamed	5 QA	QATKDAGAISGLNVLR		16	gi 1771479 emb CAA67867.1   heat shock protein hsp70 [Pisum sativum]		467867.1 sp70	3.77E-06	92.935	5.3888
9 10	protein product [Glycine max] gi 219776028 emb CAW37072.1  unnamed protein product [Glycine max]	6 ТТР	SYVAFTDTER		13	gi 219 3.1  ur [Glycin	764820 emb C nnamed protein ie max]	AW6386 product	0.002185	88.187	ni določeno
11	gi 257310542 emb CBC46583.1 unnamed protein product [Glycine max] gi 257345156 emb CBC02944.1 unnamed	7 LIG	DAAKNQVAN	INPQNTVFD/	KR 23	gi 177   heat [Pisum	1479 emb CA/ shock protein h sativum]	467867.1 sp70	4.09E-07	89.353	6.0404
12	AT1G16030.1   Symbols: Hsp70b   heat shock protein 70B   chr1:5502386-5504326 REVERSE										

#### 

LENGTH=647



Slika 24: Shematski prikaz izpisa iz programa MaxQuant na primeru hsp70 za kultivar Tiber Figure 24: Shematic view of input from the MaxQuant on the exaample of hsp70 for cultivar Tiber

Proteine (preglednica 5) smo glede na njihove biološke funkcije razvrstili v ustrezne skupine (slika 25). Največje število skupin proteinov je udeleženih v procesih energijskega metabolizma, fotosinteze, procese povezane z ROS, obrambo in stresom, s sintezo proteinov ter proteolizo.



Slika 25: Razvrstitev identificiranih skupin proteinov stebel s spremenjenimi vsebnostmi v suši v skupine glede na njihove biološke funkcije za kultivar Tiber

Figure 25: Classification of identified stem proteins with changed abundance under drought into functional groups for cultivar Tiber

#### 4.4 ANALIZA N-GLIKOPROTEINOV IZ STEBEL IN LISTOV KULTIVARJA TIBER

#### 4.4.1 Lektinska kromatografija proteinov iz stebel in listov kultivarja Tiber

Proteine smo izolirali iz stebel in listov kultivarja Tiber v sušnem stresu in njihovo vsebnost primerjali z ustreznimi vzorci kontrolnih (zalivanih) rastlin. V analizo smo vključili drugi sestavljen list in steblo kontrolnih rastlin ter rastlin v zadnji stopnji stresa (17. dan). Uporabili smo ekstrakcijo s PBS pufrom. Koncentracijo proteinskih ekstraktov smo določili na osnovi umeritvene krivulje z BSA, kjer smo za kontrolni vzorec stebel izmerili koncentracijo 4,6 mg/ml, za vzorec v sušnem stresu pa 4,5 mg/ml. Za kontrolni vzorec listov smo dobili koncentracijo 16,3 mg/ml, za vzorec v sušnem stresu pa 22,3 mg/ml. Koncentraciji vzorca v sušnem stresu in kontrolnega vzorca smo izenačili z dodatkom pufra, ki smo ga uporabili pri izolaciji proteinov. Vzorca proteinov smo nanesli na lektinsko afinitetno kromatografijo, s katero smo ločili proteine z vezanimi glikani od ostalih proteinov. Po lektinski kromatografiji smo vzorce skoncentrirali na koloni Nanosep ter jih nanesli na NaDS-PAGE (slika 26). Iz gela smo izrezali 10 proteinskih rezin za vzorce v sušnem stresu in 10 proteinskih rezin za kontrolne vzorce pri analizi listov ter 8 proteinskih rezin za vzorce v sušnem stresu in 8 proteinskih rezin za kontrolne vzorce pri analizi stebel. Glikoproteine smo razgradili s tripsinom ter vzorce analizirali z LC-MS/MS.







Slika 26: Ločitev glikoproteinov iz lektinske kromatografije z NaDS-PAGE za kultivar Tiber

Iz gela smo izrezali osem proteinskih rezin za vzorce v sušnem stresu (od ST-S1 do ST-S8) in osem rezin za kontrolne vzorce (od ST-C1do ST-C8) pri analizi stebel (A) ter deset proteinskih rezin za vzorce v sušnem stresu (LS1-LS10) in deset rezin za kontrolne vzorce (LC1-LC10) pri analizi listov (B).

1- vezava vzorca na kolono; 2- spiranje po vezavi vzorca; 3- proteini, eluirani s pufrom ME; 4- proteini, eluirani s pufrom SE; 5- spiranje po eluciji.

Figure 26: SDS-PAGE separation of glycoproteins from lectin cromatography for cultivar Tiber

Eight protein slices of drought stress samples (from ST-S1 to ST-S8) and eight slices of control samples (from ST-C1 to ST-C8) for the analysis of stem were excised from the gel (A). For the analysis of leaves (B), ten protein slices of drought stress samples (LS1-LS10) and ten slices of control samples (LC1-LC10) for the analysis of stem were excised from the gel.

1- sample binding on column; 2- washing after sample binding; 3- ME-elution; 4- SE-elution; 5- washing after elution.

# 4.4.2 Masna spektrometrija in obdelava podatkov za N-glikoproteine iz stebel in listov kultivarja Tiber

Glikoproteine smo identificirali s pomočjo iskalnika MASCOT. Zadetke proteinov smo omejili le na proteine, kjer sta bila prisotna vsaj dva peptida. Pri zadetkih s samo enim peptidom s signifikantnim rezultatom smo upoštevali MASCOT vrednost nad 100. Zaradi kompleksne analize glikoproteinov smo se v nadaljevanju omejili le na analizo N-glikoproteinov. Glikoproteine smo analizirali s programom SignalP, da bi ugotovili, ali imajo prisoten signalni peptid za endoplazemski retikulum. S programom Target P smo določili najbolj verjetno lokacijo glikoproteinov. Število proteinov s signalnim peptidom se je dobro ujemalo s številom sekrecijskih proteinov, kajti sekrecijski proteini so zelo pogosto glikozilirani. S programom NetGlyC pa smo dobili informacijo, če proteini vsebujejo N-glikozilacijsko mesto ter s kakšno verjetnostjo je to mesto glikozilirano (preglednica 6). Samo proteine, ki so vsebovali signalni peptid in Nglikozilacijsko mesto, smo vključili v bazo proteinskih sekvenc pri posamezni proteinski rezini. Tudi Ruiz-May in sod. (2014) so pri analizi N-glikoproteinov iz paradižnika uporabili v bazi podatkov samo glikoproteine s signalnim peptidom. Signalni peptid je potreben za t. i. kotranslacijsko translokacijo nastajajočega proteina v endoplazemski retikulum pred samim procesom N-glikozilacije (Ruiz-May in sod. 2014). Baze posameznih proteinskih rezin smo uporabili pri ročni analizi spektrov, ki je opisana v nadaljevanju, skupno bazo sekvenc, ki smo jo dobili z združitvijo glikoproteinov iz posameznih rezin brez podvojenih glikoproteinov, pa smo uporabili pri kvantifikaciji glikoproteinov s programom MaxQuant. Baza proteinskih sekvenc za posamezne rezine je bila potrebna zaradi uporabe programa Peptide Mass Tool za iskanje N-glikopeptidov, saj smo z manjšo bazo proteinov zelo skrajšali čas iskanja Nglikoproteinov. Skupna baza proteinov je v primeru analize listov vsebovala 154 glikoproteinov z različnimi NCBI številkami, kjer je 81 proteinov vsebovalo signalni peptid. V primeru analize stebel pa je skupna baza vsebovala 144 glikoproteinov, kjer je 82 proteinov vsebovalo signalni peptid.

Preglednica 6: Število identificiranih glikoproteinov v steblih (A) in listih (B) kultivarja Tiber Številke gelov se nanašajo na sliko 26.

Table 6: Number of identified glycoproteins in stems (A) and leaves (B) for cultivar Tiber The numbers of gels are reffering to Figure 26.

А
STEBLO

Št.	Št.		Št.		Skupno št.	Št. proteinov	Št. protein	nov v določen	lokaciji	Št. proteinov	
gela	proteir	iov	podvajanja	s SP	Sekrecija	Mitohondrij	Kloroplast	Ostalo	brez N-X-S/T		
<b>S</b> 1	13	ı	40	25	25	0	1	13	1		
C1	33	ſ	40	25	25	0	1	15	1		
S2	35	ı	41	31	33	4	0	4	0		
C2	14	ſ	71	51	55	-	0	-	Ū		
<b>S</b> 3	24	۱	37	27	30	2	0	5	1		
C3	22	ſ	51	21	50	2	0	5	1		
<b>S</b> 4	25	۱	33	21	22	1	0	10	3		
C4	16	ſ	55	21	22	1	Ū	10	5		
S5	27	۱	31	16	21	1	2	7	4		
C5	10	ſ	51	10	21	1	2	,	·		
<b>S</b> 6	17	۱	22	8	10	0	0	12	3		
C6	8	ſ	22	0	10	0	Ū	12	5		
<b>S</b> 7	8	l	18	7	8	1	0	9	3		
C7	10	ſ	10	7	0	1	Ū	,	5		
<b>S</b> 8	5	l	9	3	4	0	0	5	2		
C8	5	ſ	1	5	•	U U	Ū	5	2		

В

LISTI									
Št.	Št. proteinov		Skupno št. proteinov brez	Št. proteinov	Št. proteinov v določeni subcelični lokaciji				Št. proteinov
gela			podvajanja	s SP	Sekrecija	Mitohondrij	Kloroplast	Ostalo	brez N-X-S/T
<b>S</b> 1	4	ı	29	10	12	n	0	15	2
C1	27	ſ	2)	10	12	2	0	15	2
<b>S</b> 2	16	ι	30	16	16	3	0	11	2
C2	18	ſ	50	10	10	5	Ū	11	2
<b>S</b> 3	22	ļ	41	31	36	2	0	3	1
C3	29	J		01	20	-	Ũ	U	-
<b>S</b> 4	29	ļ	47	29	30	2	0	15	6
C4	31	J		_>	20	-	Ũ	10	0
<b>S</b> 5	18	}	33	21	22	2	0	9	4
C5	27	J				-	Ũ	-	
<b>S</b> 6	14	l	26	13	14	1	0	11	2
C6	16	J	_0			-	2		_

Št.	Št.	p	Skupno št. roteinov brez	Št. proteinov	Št. protein	nov v določen	i subcelični l	okaciji	Št. proteinov
gela	proteinov	P	podvajanja	s SP	Sekrecija	Mitohondrij	Kloroplast	Ostalo	brez N-X-S/T
<b>S</b> 7	10	l	24	7	8	1	1	14	4
C7	21	l	27	,	0	1	1	17	
<b>S</b> 8	11	ļ	32	16	16	3	0	13	4
C8	30	l	52	10	10	5	Ŭ	10	·
<b>S</b> 9	3	ι	14	10	10	0	0	4	2
C9	12	J		10	10	Ũ	Ũ		-
S10	1	ļ	5	5	5	0	0	0	0
C10	4	J	C	ç	U	Ŷ	Ũ	Ũ	Ũ

SP - signalni peptid.

SP - signal peptide.

Z namenom, da bi identificirali N-glikopeptide in določili strukturo N-glikanov, smo vsak spekter posamezne proteinske rezine ročno pregledali in iskali specifične reporterske ione pri m/z 204,08, ki predstavljajo signal za oksonijev ion. Z namenom, da bi določili N-glikozilacijsko mesto in strukture N-glikanov, smo za izračun mase Nglikopeptida uporabili specifični y<sub>1</sub> ion, ki se običajno kaže kot najvišji signal y ionov pri fragmentaciji N-glikopeptida (slika 27). Na osnovi naboja y1 iona smo določili naboj N-glikopeptida. Ustrezne izračunane mase peptidov smo zabeležili in uporabili za iskanje po proteinski bazi podatkov za posamezno proteinsko rezino s programom Peptide Mass Tool. Sekvenca izbranih N-glikopeptidov je morala ustrezati cepitvi s tripsinom in vsebovati zaporedje aminokislin za N-glikozilacijsko mesto. Na podlagi mase in naboja N-glikopeptida smo izračunali tudi maso N-glikanskih struktur. Rezultati analize N-glikopeptidov iz spektrov so predstavljeni v prilogi E. Kljub temu da smo našli veliko MS/MS spektrov N-glikopeptidov, ki so vsebovali signal pri m/z 204,08 ter ostale markerske ione, ki so tipični za N-glikane (npr. m/z 366,13 ter 528,19), smo lahko zelo malo spektrov povezali s peptidnimi sekvencami, zato je tudi število ročno identificiranih N-glikopeptidov relativno majhno. Zasledili smo visokomanozne, hibridne in kompleksne tipe N-glikanov. Pri analizi smo zabeležili samo tiste strukture N-glikanov, katere smo lahko povezali s peptidnimi sekvencami (priloga E).



В





Slika 27: Primer spektrov glikopeptida za kultivar Tiber

A) Iz MS/MS spektra peptida pri m/z 961,40<sup>2+</sup> smo identificirali peptid (FVNESR) od hipotetičnega proteina (NCBI številka: gi|593785175) identificiran iz proteinske rezine ST-S1 in ST-C1. Iz spektrov A, B in C je razvidno, da je na peptid verjetno pripet kompleksni tip N-glikana s sestavo 2 x GlcNAc, 3 x manoza, 1x ksiloza in 1 x fukoza. Spektra ST-C1 (B) in ST-S1 (C) prikazujeta intenziteto vrhov (retenzijski čas: pribl. 18-18,80 min) peptida z glikanskimi strukturami.

Figure 27: An example of spectra for glycopeptide for cultivar Tiber

A) MS/MS spectrum of an m/z 961,40<sup>2+</sup> ion identifying the peptide (FVNESR) from hypothetical protein (NCBI number: gi|593785175) from slices ST-S1 in ST-C1. Spectra A, B and C revealed a complex type N-glycan, most probably representing 2 x GlcNAc, 3 x mannose, 1x xylose in 1 x fucose. Spectra ST-C1 (B) and ST-S1 (C) are showing peptide peak intensities (retension time: appr. 18-18,80 min) with corresponding glycan structures.

Ker N-glikopeptidov iz spektrov ni bilo možno natančno ročno kvantificirati, smo za kvantitativno obdelavo vzorcev uporabili program MaxQuant. Analiza je bila opravljena z 20 vzorci naenkrat v primeru analize listov ter s 16 vzorci v primeru stebel. Pri tem smo v programu določili, kateri vzorci pripadajo stresnim razmeram in kateri kontrolnim. V programu smo določili parametre za LFQ kvantifikacijo. Rezultati kvantifikacije so predstavljeni v preglednicah 7 in 8 in na sliki 28. Prikazani so proteini oz. skupine proteinov z razmerjem LFQ intenzitet med sušo in kontrolo pod 0,7 in nad 1,3 ter z vsaj dvema »edinstvenima« peptidoma. Tu so predstavljeni N-glikoproteini s signalnim peptidom in mestom N-glikozilacije, kar pa ne velja tudi za homologne proteine. Pri kvantifikaciji glikoproteinov iz listov smo dobili 35 skupin glikoproteinov, ki so imeli ustrezno razmerje med vzorci v stresu in kontrolnimi vzorci. Pri analizi stebel pa smo dobili 23 skupin glikoproteinov. Zaradi velikega števila hipotetičnih glikoproteinov smo se odločili, da poiščemo njihove homologne proteine z znanimi funkcijami, ki so predstavljeni v prilogi F. Proteine smo glede na njihovo funkcije razvrstili v osem skupin v primeru analize listov ter šest skupin pri analizi stebel. Pri

analizi listov in stebel smo največ glikoproteinov razvrstili v skupine proteinov, ki so povezane s procesi celičnih sten, obrambo oz. stresom ter proteolizo. Pri tem moramo omeniti, da smo funkcionalne skupine proteinov večinoma določili na osnovi homolognih proteinov, ki so v preglednicah 7 in 8 označeni z zvezdico in so predstavljeni v prilogi F.

NCBI številke proteinov	Proteini	Število proteinov	Št. peptidov stres/kontrola	Razmerje stres/kontrola		
Procesi celičnih sten						
gi 593692034	glicerofosforil diester fosfodiesteraza [Glycine max]*	1	2/3	0.2		
gi 593548919	glicerofosforil diester fosfodiesteraza [Glycine max]*	1	7/6	0.4		
gi 593328652	beta-galaktozidaza, izooblika X1 [ <i>Glycine max</i> ]*	1	5/6	0.5		
gi 593618020	alfa-ksilozidaza [ <i>Glycine max</i> ]*	1	2/3	0.6		
gi 593328660	nevtralna alfa-glukozidaza [Glycine max]*	1	13/10	0.7		
gi 356561171	lizosomska manozidaza [Glycine max]	1	8/8	1.4		
gi 356515517	glukan endo-1,3-beta-glukozidaza [ <i>Glycine max</i> ]	1	2/2	1.6		
gi 38605156	ksiloglukan endotransglukozilaza/hidrolaza [Vigna angularis]	1	7/9	2.4		
gi 593697822	epidermis-specifični sekrecijski glikoprotein [ <i>Glycine max</i> ]*	1	9/12	3.4		
Obramba/stres						
gi 356563668	homolog askorbat oksidaze [Glycine max]	1	4/3	0.2		
gi 593213934 gi 356542812 gi 356517653	homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ]* homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ] homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ]	3	12/15	0.6		
gi 593791168	neaktivni prekurzor kisle fosfataze [Glycine max]*	1	17/15	0.7		
gi 593696454 gi 571450249	bakrova oksidaza [ <i>Glycine max</i> ]* bakrova oksidaza [ <i>Glycine max</i> ]	2	13/10	1.5		
Proteoliza in zv	ijanje proteinov					
gi 593205833	nikalin [ <i>Glycine max</i> ]*	1	11/5	0.3		
gi 543176742	aspartatna proteinaza [Phaseolus vulgaris]	1	7/6	0.4		
gi 2511693	prekurzor cistein proteinaze [Phaseolus vulgaris]	1	3/3	0.6		
gi 593188173	protein disulfid izomeraza, izooblika 1 [ <i>Glycine max</i> ]*	1	9/9	1.4		
Signaliziranje						
gi 593785485	receptor-protein kinaza [Glycine max]*	1	5/2	0.2		
gi 593701877	receptor-protein kinaza [Glycine max]*	1	5/5	1.6		
Energijski meta	Energijski metabolizem					
gi 356562473 gi 255635805	ksiloza izomeraza [ <i>Glycine max</i> ] ksiloza izomeraza [ <i>Glycine max</i> ]*	2	7/7	1.7		

Preglednica 7: Kvantifikacija glikoproteinov v steblih kultivarja Tiber s programom MaxQuant Table 7: Quantification of proteins in stem of cultivar Tiber with MaxQuant

nadaljevanje				
NCBI številke proteinov	Proteini	Število proteinov	Št. peptidov stres/kontrola	Razmerje stres/kontrola
Nedefinirano				
gi 593700219	IAA-aminokislinska hidrolaza [ <i>Glycine max</i> ]*	1	4/3	0.4
gi 593785057	protein HOTHEAD [Glycine max]*	1	7/6	1.5
gi 593328058	protein tolB [Medicago truncatula]*	1	7/9	1.5

\* Proteini homologni neznanim proteinom.

\* Homologous proteins of the unknown proteins.

Preglednica 8: Kvantifikacija glikoproteinov v listih kultivarja Tiber s programom MaxQuant Table 8: Quantification of proteins in leaves of cultivar Tiber with MaxQuant

NCBI številke proteinov	Proteini	Število proteinov	Št. peptidov stres/kontrola	Razmerje stres/kontrola		
Procesi celičnih sten						
gi 561015499	glicerofosforil diester fosfodiesteraza [ <i>Glycine max</i> ]*	1	7/7	0.4		
gi 356515517	glukan endo-1,3-beta-glukozidaza [ <i>Glycine max</i> ]	1	4/2	0.5		
gi 356508869	lizosomska alfa-manozidaza [ <i>Glycine max</i> ]	1	7/7	0.5		
gi 561014278	glukan 1,3-beta-glukozidaza, izooblika X1 [ <i>Glycine max</i> ]*	1	5/5	1.4		
gi 561035469	alfa-L-arabinofuranozidaza, izooblika X1 [ <i>Glycine max</i> ]*	1	18/16	1.8		
gi 356499675	beta-heskozaminidaza [Glycine max]	1	4/3	1.8		
gi 561022341	vicianin hidrolaza [Glycine max]*	1	11/9	2.1		
gi 561027882	glukan endo-1,3-beta-glukozidaza [ <i>Glycine max</i> ]*	1	2/3	2.2		
gi 561012062	beta-D-ksilozidaza [Glycine max]*	1	16/13	2.7		
gi 561020712	lizosomska beta glukozidaza, izooblika X1 [ <i>Glycine max</i> ]*	1	6/7	2.8		
gi 147811579	beta-glukozidaza [Vitis vinifera]*	1	4/3	8.4		
Obramba/stre	S					
gi 561027028	"purple" kisla fosfataza, izooblika X2 [ <i>Glycine max</i> ]*	1	11/12	0.6		
gi 561005533 gi 356542812 gi 356517653	homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ]* homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ] homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ]	3	13/12	1.3		
gi 561020673	retikulin oksidaza [ <i>Glycine max</i> ]*	1	8/8	1.5		
gi 561032038	prekurzor "purple" kisle fosfataze [ <i>Glycine max</i> ]*	1	14/11	1.5		
gi 561011827	brasinosteroid-reguliran protein BRU1 [Glycine max]*	1	6/5	1.7		
gi 561034491	beta-fruktofuranozidaza, netopni izoencim [ <i>Glycine max</i> ]*	1	15/9	2.0		

1	1 *	•
nada	liev	anie

NCBI številke proteinov	Proteini	Število proteinov	Št. peptidov stres/kontrola	Razmerje stres/kontrola
gi 561009224	homolog L-askorbat oksidaze [Glycine max]*	1	14/12	2.9
gi 561021963	protein povezan z odpornostjo na bolezni/prekurzor za LRR protein [ <i>Glycine max</i> ]*	1	7/5	14.6
Proteoliza in z	vijanje proteinov			
gi 561036949	prekurzor proteaze podobne subtilizinu [ <i>Glycine max</i> ]*	1	19/20	0.2
gi 561021742	UDP-glukoza:glikoprotein glukoziltransferaza [ <i>Glycine max</i> ]*	1	3/12	0.3
gi 356539234 gi 508786123	nikalin [ <i>Glycine max</i> ] nikastrin izooblika 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	2	4/5	0.4
gi 2511693	prekurzor cisteinske proteinaze [Phaseolus vulgaris]	1	5/5	0.4
gi 561023891	protein disulfid izomeraza [Glycine max]*	1	9/9	0.6
gi 561005254	protein disulfid izomeraza, izooblika 1 [ <i>Glycine max</i> ]*	1	6/5	1.5
Energijski met	tabolizem			
gi 356562473 gi 255635805 gi 9758328	ksiloza izomeraza [ <i>Glycine max</i> ] ksiloza izomeraza [ <i>Glycine max</i> ]* ksiloza izomeraza [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	3	7/7	3.0
Signaliziranje				
gi 9837280	receptor-protein kinaza povezana s senescenco listov [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	1	5/5	0.1
Sinteza amino	kislin			
gi 561014202	aminoacilaza [ <i>Glycine max</i> ]*	1	8/9	0.6
Skladiščenje				
gi 18007	kanavalin [Canavalia gladiata]	1	10/12	0.6
Nedefinirano				
gi 561023812	IAA-aminokislinska hidrolaza [ <i>Glycine max</i> ]*	1	2/3	0.5
gi 561010543	protein tolB [Medicago truncatula]*	1	13/11	1.3
gi 561028923	protein HOTHEAD [Glycine max]*	1	6/4	2.1
gi 561008641	IAA-aminokislinska hidrolaza [ <i>Glycine max</i> ]*	1	5/5	2.2
gi 561009203	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]	1	9/7	5.4
gi 356552527	nekarakteriziran protein [Glycine max]	1	5/1	6.6

\* Proteini homologni neznanim proteinom.

\* Homologous proteins of the unknown proteins.



Slika 28: Razvrstitev identificiranih skupin glikoproteinov s spremenjenimi vsebnostmi v suši iz stebel (A) in listov (B) v skupine glede na njihove biološke funkcije za kultivar Tiber

Figure 28: Classification of identified glycoproteins groups with changed abundance under drought from stem (A) and leaf (B) into functional groups for cultivar Tiber

### 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

#### 5.1 RAZPRAVA

# 5.1.1 Primerjava proteoma listov kultivarja Tiber in kultivarja Starozagorski čern v sušnem stresu

Namen analize je bil določiti razlike v vsebnosti proteinov med rastlinami v sušnem stresu in kontrolnimi rastlinami v listih navadnega fižola. Na podlagi rezultatov prejšnjih raziskav sušnega stresa smo vključili kultivarja Tiber in Starozagorski, ki sta se razlikovala v odzivu na sušo (Hieng in sod., 2004; Kavar in sod., 2008). Kavar in sod. (2008) so sklepali, da je na osnovi izražanja transkripta povezanega s fotosintezo, fotosinteza pri Tibru inhibirana kasneje kot pri kultivarjih, ki so bolj občutljivi na sušo. Hieng in sod. (2004) so pokazali, da se kultivarja razlikujeta pri odzivu na sušni stres, in sicer glede vodnega potenciala, vsebnosti vode v listih in po integriteti celičnih membran. Na osnovi teh indikatorjev so sklepali, da je Tiber bolj toleranten na sušo od Starozagorskega. Omenjena študija je bila opravljena v rastni komori pri kontroliranih pogojih ter v rastlinjaku od avgusta do oktobra. Naša študija je temeljila samo na poskusu v rastlinjaku v drugem obdobju leta, in sicer od marca do maja. V našem primeru smo uporabili RVV kot indikator stopnje dehidracije tkiva, ki je ključna za optimalno delovanje rastline in za procese rasti. Na nivoju RVV v listih ni bilo statistično značilnih razlik med Tibrom in Starozagorskim pri nobeni stopnji sušnega stresa. To lahko pojasnimo z drugačnimi rastnimi pogoji glede na pogoje rasti v študiji od Hieng in sod. (2004). RVV v listih je bila v naši raziskavi osnova za določitev primernega termina vzorčenja. Na koncu našega eksperimenta so bile rastline vidno ovenele oz. v sušnem stresu, RVV v listih obeh kultivarjev pa je bil približno 45 %. Ob rehidraciji so se rastline regenerirale, kar pomeni, da stres ni bil premočan.

Identificirane proteine, katerih vsebnosti so se razlikovale med rastlinami v stresu in kontrolnimi rastlinami, smo razvrstili v skupine, glede na njihove biološke funkcije. Skupine vključujejo proteine povezane s fotosintezo, energijskim metabolizmom, obrambo oz. stresom, ATP pretvorbo ter proteine povezane s sintezo, zvijanjem in proteolizo. Identificirani proteini so vključeni v različne biološke poti, ki bodisi direktno ali indirektno, pomagajo rastlini pri soočenju s stresom. Okoli ene tretjine identificiranih proteinov smo zasledili v različnih lisah, kar je najverjetneje povezano s prisotnimi izoformnimi oblikami in posttranslacijskimi modifikacijami proteinov. Predstavili smo še interakcijske mreže povezav med proteini, kar je nudilo dodaten vpogled na različne vloge identificiranih proteinov.

#### 5.1.1.1 Proteini listov udeleženi pri fotosintezi

Veliko število v raziskavi identificiranih proteinov s spremenjenimi vsebnostmi v sušnem stresu je povezanih s procesi fotosinteze. Protein Rubisco smo zasledili v različnih lisah, ki so se razlikovale glede na pI in Mw. To so opazili tudi pri analizi drugih rastlinskih vrst v suši, iz česar so sklepali, da prisotnost istega proteina v različnih lisah lahko nakazuje na razgradnjo proteina (Hajheidari in sod., 2005; Durand in sod., 2011). Luo in sod. (2002) so pokazali, da se velika podenota Rubisco lahko cepi v prisotnosti ROS. Identificirali smo tudi fosforibulokinazo, ki je prav tako kot Rubisco udeležena v procesih Kalvinovega cikla. Zaradi zmanjšanja vsebnosti fosforibulokinaze in proteina Rubisco v sušnem stresu sklepamo, da se učinkovitost fiksacije CO<sub>2</sub> v suši zmanjša. Poleg identifikacije proteina Rubisco z veliko in malo podenoto, pri katerih se je vsebnost zmanjšala v suši pri obeh kultivarjih, smo pri Tibru identificirali še Rubisco vezavni protein.

Identificirali smo številne proteine vključene v oksidacijo vode (OEE), ki so zanimivi predvsem zaradi kontrastnih vsebnosti med kultivarjema, ki so se pri Tibru povečale, pri Starozagorskem pa zmanjšale. OEE 1 in OEE 2 sta podenoti kompleksa pri fotosistemu II, ki katalizira fotooksidacijo vode v svetlobni reakciji fotosinteze. OEE 1 je pomemben za zagotavljanje stabilnosti jedra fotosistema II, OEE 2 pa je udeležen pri katalizi razgradnje vode (Yang in sod., 2003; Yi in sod., 2005). Gazanchian in sod. (2007) so poročali o povišanju izražanja OEE 2 pri odzivu na sušo pri pšenični travi, zmanjšanje vsebnosti OEE pri stresu zaradi slanosti pa so opazili pri krompirju (Aghaei in sod., 2008) in pšenici (Gao in sod., 2011).

Pri Tibru smo zasledili povečanje in zmanjšanje vsebnosti karbonske anhidraze, pri Starozagorskem pa zmanjšanje vsebnosti tega proteina. Protein je udeležen pri fiksaciji CO<sub>2</sub> (Tripp in sod., 2001). Kot je razvidno iz naše raziskave, smo isti protein identificirali v različnih lisah, verjetno zaradi prisotnosti različnih izoformnih oblik. To pa nakazuje, da imajo izoformne oblike karbonske anhidraze verjetno kompleksne, prekrivajoče vloge v sušnem stresu. Identificirali smo tudi klorofil a/b vezavne proteine, ki so pomemben sestavni del žetvenega kompleksa za svetlobo (Xu in sod., 2011). Pri Tibru smo zaznali povečanje vsebnosti, pri Starozagorskem pa zmanjšanje vsebnosti proteina v suši. Staneloni in sod. (2008) so poročali, da je prišlo do zmanjšanega izražanja genov za klorofil a/b vezavne proteine pri oksidativnem stresu navadnjega repnjakovca. Zmanjšanje vsebnosti feredoksin NADP-reduktaze smo zasledili samo pri Starozagorskem. Pri študiji navadnega repnjakovca v sušnem stresu pa so poročali o povečanju izražanja genov za omenjeni protein (Lehtimaki in sod., 2010).

Zmanjšanje vsebnosti identificiranih proteinov udeleženih pri fotosintezi pri Starozagorskem in povečanje oz. zmanjšanje vsebnosti proteinov pri Tibru, kaže na negativni vpliv suše na ključne proteine fotosintetskega aparata ter na večji vpliv na proteine pri Starozagorskem. Predhodne raziskave o vplivu suše na izražanje genov pri navadnem fižolu so tudi nakazale na možnost, da je fotosinteza pri Tibru inhibirana kasneje kot pri Starozagorskem (Kavar in sod., 2008). Glede na to, da smo identificirali proteine, ki imajo različne vsebnosti pri Tibru in Starozagorskem v sušnem stresu, bi bilo zanimivo opraviti nadaljnje raziskave, ki bi morale vključevati direktno proteomsko analizo obeh kultivarjev. Tako bi dobili vpogled v potencialne razlike v vsebnosti proteinov med kultivarjema.

#### 5.1.1.2 Proteini listov povezani z energijskim metabolizmom

Rastline se odzivajo na stresne razmere tudi s spremembami v vsebnosti proteinov na ravni energijskega metabolizma. Kot smo pričakovali, je imel sušni stres vpliv na proteine energijskega metabolizma pri obeh kultivarjih. Plastidna in citoplazmatska aldolaza sta bili identificirani pri obeh kultivarjih. Yamada in sod. (2000) so pokazali, da se je pri tobaku povečalo izražanje gena za plastidno aldolazo (ALDP2) v stresu zaradi slanosti, izražanje ALDP1 pa se je zmanjšalo. Pri analizi Starozagorskega smo identificirali še dva proteina, ki sta udeležena pri glikolizi. Gre za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazo in glukoza-6-fosfat 1-epimerazo. Pri Tibru smo zasledili povečanje vsebnosti pri enolazi. Povečanje vsebnosti encimov, npr. triozafosfat izomeraze, gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaze in enolaze je lahko povezano s potrebo celic po dodatni energiji, da lahko kljubujejo stresu in popravljajo poškodbe. Povečanje vsebnosti malat dehidrogenaze smo zasledili pri obeh kultivarjih. Protein je udeležen pri Krebsovem ciklu, ki je pomemben vir energije za celico. Pri obeh kultivarjih smo v sušnem stresu opazili zmanjšanje vsebnosti transketolaze in ribuloze fosfat 3-epimeraze. Omenjena encima katalizirata reakcije Kalvinovega cikla in pentoza fosfatne poti ter s tem neposredno vplivata na produktivnost rastline v sušnem stresu. Datko in sod. (2008) predvidevajo, da ima zmanjšanje vsebnosti transketolaze v listih ječmena v vročinskem stresu vpliv na inhibicijo fotosinteze in metabolizem aromatskih kislin. Poleg omenjenih proteinov, ki so udeleženi pri energijskem metabolizmu, smo identificirali še dva nekarakterizirana proteina v lisah 700 in 707 pri Tibru, ki kažeta podobnost z NAD odvisno epimerazo/dehidratazo. Pri Starozagorskem smo zasledili neznan protein v lisi 324, ki je podoben alkohol dehidrogenazi. Oba proteina sta povezana z metabolizmom ogljikovih hidratov.

Dejstvo, da smo identificirali veliko proteinov energijskega metabolizma s povečanimi in zmanjšanimi vsebnostmi v sušnem stresu, je verjetno posledica velikega števila proteinov, ki so udeleženi pri kompleksnih regulacijah in tvorbi različnih metabolitov znotraj energijskega metabolizma.

#### 5.1.1.3 Proteini listov povezani s stresom

Identificirali smo določene proteine z značilnimi spremembami v vsebnosti, ki so udeleženi pri obrambi proti stresu. Sušni stres povzroča inhibicijo fotosintetske aktivnosti v tkivih, predvsem zaradi neravnovesja med dotokom in izkoriščanjem svetlobe (Ramachandra Reddy in sod., 2004). Pri tem se tvorijo ROS, ki lahko celice poškodujejo. Rastline so razvile obrambne mehanizme za odstranitev ali zmanjšanje količine ROS. Omenjeni obrambni mehanizmi vključujejo aktivnost antioksidativnih enicimov. Tudi pri naši raziskavi smo identificirali encime, ki so udeleženi pri odzivu na oksidativni stres. Pri vseh identificiranih proteinih, ki so udeleženi pri odstranitvi ROS, obrambi in stresu, smo zaznali povečanje vsebnosti proteinov pri Tibru v stresu, pri Starozagorskem pa sta imela samo kinon oksidoreduktaza in tioredoksin zmanjšanje vsebnosti v suši.

Superoksidna dismutaza je zelo učinkovita pri odstranjevanju superoksidnih radikalov (Navrot in sod., 2011). Radikale pretvori v molekularni kisik in vodikov peroksid. Peroksidaza nato reducira vodikov peroksid do vode. Askorbatna peroksidaza je dobro znana po svoji vlogi pri odstranjevanju ROS s pomočjo askorbata kot donorja elektronov (Navrot in sod., 2011). Poleg askorbat peroksidaze, peroksiredoksin tudi katalizira detoksifikacijo vodikovega peroksida in drugih peroksidov. Peroksiredoksini so lahko lokalizirani v različnih celičnih razdelkih (Bhatt in sod., 2011), vendar smo v naši raziskavi zasledili samo mitohondrijske peroksiredoksine. Slednje smo določili preko BLASTP (2012) iskanja neznanih proteinov. Naslednji pomembni antioksidativni encim, ki smo ga identificirali, je tioredoksin. Obstaja več skupin tioredoksinov, na splošno pa velja, da tioredoksini vzdržujejo tiol-redoks ravnovesje preko redoks regulacijskega cikla in imajo vlogo pri regeneraciji oksidiranega peroksiredoksina do njegove aktivne, reducirane oblike (Navrot in sod., 2011). Pri Tibru smo zasledili rahlo povečanje vsebnosti tioredoksina, pri Starozagorskem pa smo določili, da je homologni protein v lisi 836 najverjetneje tioredoksin M4, pri katerem smo zaznali zmanjšano vsebnost v sušnem stresu. Identificirali smo tudi glutation S transferazo, ki katalizira konjugacijo glutationa z različnimi hidrofobnimi in elektrofilnimi spojinami, pri tem pa se tvorijo netoksični peptidni derivati (Dixon in sod., 2010). Povečanje izražanja glutation S transferaze so opazili pri odzivu pšenice na sušo (Bazargani in sod., 2011) in pri rižu v osmotskem stresu (Zang in Komatsu, 2007).

Pri rastlinah v sušnem stresu prihaja poleg povečane tvorbe ROS tudi do povečanega kopičenja citotoksičnega metilglioksala, ki je reguliran preko glioksalaznega sistema.

Glioksalazni sistem sestavljata dva encima, glioksalaza I ali laktoglutation liaza ter glioksalaza II ali hidroksiacilglutation hidrolaza. Glioksalaza I katalizira tvorbo laktoglutation iz metilglioksala in reduciranega glutationa, glikoksalaza II pa katalizira hidrolizo laktoglutationa do laktozne kisline in glutationa (Thornalley, 1990). V obeh kultivarjih smo identificirali tudi format dehidrogenazo, ki spada med NAD-odvisne encime ter katalizira oksidacijo formata do CO<sub>2</sub>. V rastlini format sproži stresne signale, format dehidrogenaza pa pomaga pri detoksifikacijskih procesih v rastlini v stresu (Igamberdiev in sod., 1999). Pri Starozagorskem smo identificirali protein dehidrin in protein vročinskega šoka. Omenjenih dveh proteinov nismo identificirali pri Tibru, čeprav gre za dobro znana proteina, ki sta običajno povezana s stresom (Wang in sod., 2004). Dehidrini tvorijo kompleksno skupino različnih proteinov. Razlog, da smo samo pri Starozagorskem opazili povečane vsebnosti dehidrina, je morda povezan s tem, da pri Tibru dehidrini niso prisotni ali pa da pride do povečanja vsebnosti proteina kasneje. Povečano kopičenje transkriptov za dehidrin so zasledili v raziskavi sušnega stresa pri sončnici (Cellier in sod., 1998), zmanjšano izražanje treh genov za dehidrine pa so opazili pri navadnem fižolu v stresu zaradi mraza (Woronuk in sod., 2010). Proteini vročinskega šoka se inducirajo pri različnih stresnih pogojih (Wang in sod., 2004). Hajheidari in sod. (2005) so poročali o dveh proteinih vročinskega šoka pri sladkorni pesi v suši, o indukciji malih proteinov vročinskega šoka pa so poročali tudi pri analizi rdeče in bele detelje v sušnem stresu (Vaseva in sod., 2011).

Identificirali smo tudi kinon oksidoreduktazo, kjer smo pri Tibru opazili povečanje vsebnosti v sušnem stresu, pri Starozagorskem pa zmanjšanje vsebnosti proteina. Encim je udeležen pri obrambi proti oksidativnem stresu, kot so pokazali pri proteomski analizi riža v stresu zaradi slanosti (Nohzadeh Malakshah in sod., 2007). Sobhanian in sod. (2010) so poročali o zmanjšani vsebnosti encima pri soji v pogojih slanosti, vendar encima ne povezujejo z odpornostjo proti slanosti. Glede na različne spremembe vsebnosti proteina med kultivarjema v sušnem stresu, tudi pri naši analizi ne moremo sklepati, da ima kinon oksidoreduktaza vlogo pri toleranci na sušo pri navadnem fižolu.

#### 5.1.1.4 Proteini listov udeleženi pri ATP pretvorbi

Pri obeh kultivarjih smo v sušnem stresu zasledili spremenjene vsebnosti nukleozid difosfat kinaze in ATP sintaze. Nukleozid difosfat kinaza ima vzdrževalno vlogo pri zagotavljanju ravnovesja med celičnim ATP-jem in ostalimi NTP-ji. O spremenjenem izražanju proteina so poročali pri odzivu na vročino (Escobar Galvis in sod., 2001), oksidativni stres (Moon in sod., 2003), zmrzal (Imin in sod., 2004), slanost (Dooki in sod., 2006) ter sušo (Salekdeh in sod., 2002b). Pri naši raziskavi smo opazili povečanje vsebnosti nukleozid difosfat kinaze v suši, kar je verjetno povezano s splošnim mehanizmom odziva na stres. Zmanjšanje vsebnosti ATP sintaze CF1, alfa podenote

smo opazili pri obeh kultivarjih, za ATPazo podenoto 1 iz mitohondrija pa smo zasledili povečanje vsebnosti proteina v suši pri Starozagorskem. ATP sintaza je povezana z energijskim metabolizmom preko sinteze ATP-ja, ki se potem porabi pri reakcijah fotosinteze. Tako je zmanjšanje vsebnosti proteina v stresu v skladu z manjšo aktivnostjo fotosinteze in manjšo porabo ATP-ja (Ramachandra Reddy in sod., 2004). Podobno je pri transportu protonov v vakuolo z vakuolnimi H<sup>+</sup>-ATPazami, kjer se transport protonov zmanjša zaradi slabšega delovanja energijskega metabolizma. Različne spremembe v vsebnosti ATP sintaz in ATPaz so lahko povezane z razlikami med proteini iz kloroplastov in mitohondrijev ter z njihovim okoljem, kar je lahko povezano z različnim odzivom fotosinteze in respiracije na stresne razmere (Tezara in sod., 1999).

#### 5.1.1.5 Proteini listov povezani s proteolizo, sintezo in zvijanjem proteinov

Pri proteinih, udeleženih pri sintezi proteinov, kot so glutamin sintetaza, ribosomski protein, cistein sintetaza in acetohidroksi kislinska sintaza, smo zasledili povečanje vsebnosti v suši pri obeh kultivarjih. Glutamin sintetaza je potrebna za asimilacijo amoniaka in za biosintezo glutamina, cistein sintetaza pa je ključni encim pri sintezi cisteina, ki je potreben za biosintezo glutationa, ki ima vlogo pri obrambi rastline proti stresu (Belenky in sod., 2012). Vsi omenjeni proteini skupaj z ribosomskimi proteini sodelujejo pri sintezi obrambih in ostalih proteinov, ki pripomorejo k zagotavljanju obrambe celic proti stresu.

Proteini povezani s proteolizo so potrebni pri vzdrževanju celične homeostaze. Tudi pri teh proteinih smo zasledili povečanje vsebnosti v sušnem stresu pri obeh kultivarjih. Identificirali smo prekurzorje cistein proteinaze in alfa ter beta podenote proteasoma. Proteasomi in proteolitični encimi sodelujejo pri razgradnji proteinov, ki so bili poškodovani zaradi stresa in njegovih posledic v celici (Kurepa in sod., 2009). Pri našem delu smo identificirali tudi protein šaperonin, ki usmerja pravilno zvijanje predhodno nepravilno zvitih proteinov. Šaperoni in šaperonini imajo ključno vlogo pri obrambi rastlin pred stresom preko zagotavljanja tiste konformacije proteinov, ki je v celici funkcionalna (Wang in sod., 2004). Protein peptidil-prolil cis-trans izomeraza ali ciklofilin je tudi udeležen pri zvijanju proteinov. V naši raziskavi smo pri rastlinah v stresu zasledili povečanje vsebnosti tega proteina pri Tibru ter zmanjšanje njegove vsebnosti pri Starozagorskem. Sharma in Singh (2003) so poročali o vplivu sušnega stresa na aktivnost peptidil-prolil cis-trans izomeraze pri dveh kultivarjih krmnega sirka, in ugotovili, da so razlike v aktivnostih tega encima med kultivarjema neodvisne od vodnega potenciala. Zato so sklepali, da je ta razlika povezana z razlikami v regulatornih poteh pri kultivarjih.

#### 5.1.1.6 Ostale skupine proteinov listov

Poleg zgoraj opisanih skupin proteinov smo pri Starozagorskem identificirali še tri pomembne proteine, ki smo jih uvrstili v skupino sekundarnega metabolizma ter signalne transdukcije. Protein 1-deoksi ksiluloza 5-fosfat reduktoizomeraza in protein v lisi 669, ki je homologen 2-C-metil eritritol 2 4-ciklodifosfat sintazi, sta udeležena pri 2-C-metil eritritol 2 4-ciklodifosfat nih poteh pri biosintezi izoprenoidov (Lichtenthaler, 1999). Znano je, da so izoprenoidne spojine udeleležene pri odzivu na različne stresne razmere, pri tem pa imajo različne vloge, ki vključujejo antioksidativne funkcije in zaščito membran ter fotosintetskega aparata pred ROS (Gill in Tuteja, 2010; Loyola in sod., 2012). Na podlagi dejstva, da smo proteine udeležene pri sintezi izoprenoidov identificirali samo pri Starozagorskem, pa še ne moremo potrditi povezave med biosintezo izoprenoidov in toleranco na sušo. Prav tako lahko samo sklepamo na spremembe v biosintezi izoprenoidov pri Starozagorskem.

Povečanje vsebnosti proteina, ki je podoben aneksinu, smo zasledili samo pri Starozagorskem v suši. Aneksin ima vlogo pri vzdrževanju integritete celičnih membran ter signalnih poti v celici, poročali pa so tudi o njegovi povezavi s toleranco na sušo in slanost. Sobhanian in sod. (2010) so zasledili povečano izražanje aneksina pri soji gojeni pod pogoji povečane slanosti. Konopka-Postupolska in sod. (2009) pa so preučevali vlogo aneksina in toleranco na sušo pri navadnjem repnjakovcu in ugotovili, da je aneksin 1 pomemben del odziva na stres, induciranega z ABA, ter da ima obrambno vlogo pri preživetju rastline v suši. Na podlagi rezultatov v naši študiji ne moremo sklepati, da je povečana vsebnost aneksina povezana s tolerantnimi rastlinami. Za tak sklep bi bilo potrebno opraviti dodatne raziskave.

#### 5.1.2 Analiza celokupnih proteinov stebel kultivarja Tiber

S proteomsko analizo izotopsko označenih proteinov iz stebel smo določili spremembe v vsebnosti proteinov v suši pri kultivarju Tiber. Koncentracija izoliranih celokupnih proteinov iz stebel je bila dokaj nizka, kar je verjetno posledica prevelikega dodatka PBS pufra pri izolaciji proteinov. Vendar nizka koncentracija ni vplivala na nadaljnje delo. Po kvantifikaciji proteinov smo proteine s spremenjenimi vsebnostmi razvrstili v enajst skupin, glede na njihove funkcije. Tako kot pri listih je bilo tudi pri steblih v suši največ proteinov s spremenjenimi vsebnostmi povezanih z energijskim metabolizmom in fotosintezo, kar nakazuje na podoben vpliv sušnega stresa na liste in steblo.

#### 5.1.2.1 Proteini stebel povezani z energijskim metabolizmom

Pri proteinih energijskega metabolizma smo alkohol dehidrogenazo in gliceraldehid 3fosfat dehidrogenazo identificirali tako v listih kot tudi v steblih. Zasledili smo zmanjšanje vsebnosti saharoze sintaze, ki ne katalizira samo tvorbe UDP-glukoze in fruktoze iz saharoze in UDP, temveč tudi reverzibilno reakcijo ter omogoča mobilizacijo saharoze v številne poti, ki so udeležene pri metabolnih in strukturnih funkcijah ter pri skladiščenju (Subbaiah in sod., 2007). Pri procesih tvorbe in porabe saharoze sodeluje tudi fosfoglukomutaza, ki katalizira pretvorbo glukoze 1-fosfata in glukoze 6-fosfata, ki je pomemben intermediat pri številnih procesih, kot so glikoliza, glukoneogeneza in pot pentoze fosfata. Zasledili smo povečanje vsebnosti fosfoglukomutaze v suši, povečanje izražanje proteina pa so zasledili tudi Ali in Komatsu (2006) pri proteomski analizi riža v sušnem stresu. V poskusu smo opazili povečanje vsebnosti piruvat ortofosfat dikinaze, ki sodeluje pri tvorbi fosfoenolpiruvata, ki je primarni akceptor za CO<sub>2</sub>. Lee D.G. in sod. (2009) so sklepali o vlogi tega proteina pri metabolnem odzivu na različne abiotske strese in občutljivost na osmotsko neravnovesje ali oksidativni stres. Pri citrat sintazi, lipoksigenazi in fosfoenolpiruvat kinazi je prišlo vsaj do dvakratnega povečanja vsebnosti proteinov v sušnem stresu. Citrat sintaza je eden izmed ključnih encimov Krebsovega cikla. Povečanje vsebnosti encima vpliva na pospešeno delovanje energijskega metabolizma in s tem najverjetneje zagotavlja zadostne količine energije pri odzivu na stres. Lipoksigenaza je udeležena pri biosintezi jasmonske kisline ter drugih sekundarnih metabolitov in antioksidantov, ki imajo specifične vloge pri odzivu na stres (Porta in sod., 1999; Heidarvand in Maali-Amiri, 2013). Udeležena je tudi pri procesih razvoja in staranja, stimulira rast mladih kalečih rastlin, poveča odpornost na stres ter obrambne reakcije povezane s stresom pri rastlinah soje (Qin in sod., 2013). Fosfoenolpiruvat karboksilaza je encim, ki spada med karboksi liaze ter katalizira dodatek bikarbonata na fosfoenol piruvat. Pri tem nastane oksalacetat in fosfat (Wang in sod., 2012). Sanchez in sod. (2006) so na podlagi povečanega izražanja genov, ki kodirajo družino proteinov za fosfoenolpiruvat karboksilaze, sklepali na njihovo vlogo pri prilagoditvi rastlin navadnega repnjakovca na sušo in slanost. V naši raziskavi smo zasledili tudi rahlo povečanje vsebnosti mitohondrijskega dikarboksilat/trikarboksilat transporterja, ki spada v t.i. družino mitohondrijskih prenašalcev in je zadolžen za transport metabolitov, kot so di- in trikarboksilati (Picault in sod. 2002). O povečanju izražanja omenjenega proteina so v proteomski analizi soje pri odzivu na poplavo poročali Komatsu in sod. (2011).

#### 5.1.2.2 Proteini stebel udeleženi pri fotosintezi

Pri fotosintetskih proteinih smo zasledili rahlo zmanjšanje vsebnosti Rubisco aktivaze in vezavnega proteina za Rubisco ter povečanje vsebnosti apoproteina A1 in A2, proteina D in proteina Rubisco. Funkcija Rubisco aktivaze je povezana z zagotavljanjem katalitske aktivnosti Rubisco, vezavni protein za Rubisco je vključen v združitev podenot Rubisco, protein D pa je pomemben za zduževanje in zagotavljanje stabilnosti komponent fotosistema I (Parry in sod., 2008). Povečane vsebnosti proteina Rubisco ter ostalih proteinov povezanih z reakcijami fotosinteze niso bile v skladu z našimi pričakovanji. Možno je, da fotosintetski proteini s povečanimi vsebnostmi v stresu zagotavljajo zadostno količino energije za ostale procese, ki so pomembni pri odzivu na stres.

#### 5.1.2.3 Proteini stebel povezani s stresom

V povezavi s proteini povezanimi z ROS, obrambo in stresom smo identificirali proteine vročinskega šoka, katalazo in peroksisomalno glikolat oksidazo. Pri vseh smo zasledili povečanje vsebnosti v sušnem stresu. Izmed vseh proteinov, ki smo jih identificirali pri odzivu na sušo v steblih, smo pri proteinu vročinskega šoka, z maso 70 kDa, zasledili največje povečanje v suši, in sicer kar petkratno. Tudi pri proteomski analizi listov pri Starozagorskem smo identificirali mali protein vročinskega šoka, 17 kDa, z desetkratnim povečanjem vsebnosti v suši. Proteini vročinskega šoka, skupaj s šaperoni, sodelujejo pri zvijanju in združevanju proteinov, translokaciji in degradaciji proteinov pri številnih celičnih procesih, stabilizaciji proteinov in membran ter tudi pomagajo pri zvijanju proteinov v stresnih pogojih. Imajo ključno vlogo pri zaščiti rastlin proti stresu preko zagotavljanja normalne konformacije proteinov in celične homeostaze (Wang in sod., 2004). Zasledili smo tudi povečanje encima glikolat oksidaze, ki se običajno inducira pri sušnem stresu (Ali in Komatsu, 2006). Encim tvori vodikov peroksid in tako vpliva na povečanje endogene količine peroksida. Poleg tega da protein povzroča oksidativni stres, sodeluje tudi pri fotorespiraciji in preprečuje akumulacijo toksičnega glikolata (Durand in sod., 2012). V povezavi s peroksisomi in peroksidom smo zasledili povečanje vsebnosti katalaze, ki se običajno nahaja v peroksisomih in mitohondriju, kjer opravlja funkcijo detoksifikacije vodikovega peroksida v kisik in vodo. Povečanje vsebnosti katalaze so zasledili pri odzivu pšenice na sušni stres (Ge in sod., 2012) ter pri rižu v pogojih slanosti (Li in sod., 2010). Abreu in sod. (2013) so na podlagi dosedanjih podatkov iz literature sklepali, da protein ne vpliva na izboljšanje odpornosti rastlin na stresne razmere.

#### 5.1.2.4 Proteini stebel povezani s sintezo, zvijanjem in proteolizo

Tako kot pri analizi proteoma listov smo tudi pri analizi stebel zasledili povečanje vsebnosti proteinov, ki sodelujejo pri sintezi proteinov. Glutamil/glutaminil-tRNA sintetaza spada med aminoacil-tRNA sintetaze, ki katalizirajo povezavo med aminokislino in ustreznimi prenašalnimi RNA (Freist in sod., 1997), metiltioribozna

kinaza pa sodeluje pri sintezi metionina. Znano je, da so evkariontski iniciacijski faktorji 4A in ribosomalni proteini udeleženi pri odzivu na različne abiotske strese (Vashisht in Tuteja, 2006). Povečana stopnja sinteze proteinov je pomembna za obnavljanje poškodovanih proteinov, ki so potrebni za vzpostavitev normalnih celičnih metabolnih aktivnosti in rast rastline, kajti sušni stres povzroča poškodbe in razgradnjo proteinov, zaradi oksidativnih poškodb ali aktivnosti proteolitičnih encimov (Ngara in sod., 2012).

Tako kot pri listih, smo tudi v steblih identificirali proteine, ki so povezani s proteolizo in zvijanjem proteinov. Identificirali smo šaperon, proteasomska proteina ter dve proteazi. Ugotovili smo, da se je njihova vsebnost v sušnem stresu povečala, razen v primeru alfa podenote proteasoma, katere vsebnost se je rahlo zmanjšala. To je bilo nasprotno od pričakovanega, saj smo v listih zasledili povečanje vsebnosti tega proteina.

#### 5.1.2.5 Proteini stebel udeleženi pri ATP pretvorbi

Identificirali smo štiri proteine povezane s pretvorbo ATP: dve ATP sintazi s povečanjem vsebnosti v stresu in AAA-tip ATPaze ter ADP-glukoza pirofosforilazo z rahlo zmanjšano vsebnostjo v stresu. V poglavju 5.1.1.4 smo v zvezi s proteomom lista že omenili funkcije ATP sintaze oz. ATPaze. V proteomu stebel pa smo identificirali še ATPaze povezane z različnimi celičnimi aktivnostmi - AAA-tip ATPaze (ATPases Associated with diverse cellular Activities). Shahriari in sod. (2010) so poročali, da rastlinske AAA-ATPaze sodelujejo pri transportu v vakuolah in regulaciji celičnega cikla. Ker smo pri listih zasledili zmanjšanje vsebnosti ATP sintaz, sklepamo, da so različne spremembe vsebnosti proteinov v suši povezane z njihovo lokacijo v steblih oz. listih, kjer pride lahko do različnega odziva proteinov na stres. Identificirali smo še ADP-glukoza pirofosforilazo, ki sodeluje pri sintezi škroba, tako da katalizira pretvorbo glukoze-fosfata in ATP do pirofosfata in ADP-glukoze, ki je substrat za sintezo škroba (Weigelt in sod., 2009).

5.1.2.6 Ostale skupine proteinov stebel

V skupino transportnih proteinov smo uvrstili protein beta tubulin, v skupino signalizacije pa s hipersensitivnostjo induciran protein. Protein povezan s hipersenzitivnostjo so identificirali tudi Choudhary in sod. (2009) pri proteomski analizi riža v suši. Identificirali smo beta tubulin, ki velja za osnovni protein povezan s citoskeletom. Identifikacija beta tubulina, pri katerem je prišlo do zmanjšanja vsebnosti v sušnem stresu, ni nepričakovana, kajti ena izmed strategij celice pri soočenju z osmotskim stresom vključuje tudi zmanjšano rast celic, vpliv na celične delitve ter s tem tudi prilagoditev velikosti celice preko reorganizacije mikrotubulov, ki so zgrajeni iz

alfa in beta tubulinskih heterodimerov (Sheoran in sod., 2014). O zmanjšanju vsebnosti beta tubulina v osmotskem stresu pri navadnjem repnjakovcu so poročali tudi Ndimba in sod. (2005).

Med regulatornimi proteini smo identificirali 14-3-3 protein, ki spada med zelo hidrofilne proteine in ima vlogo pri številnih regulatornih in metabolnih procesih v rastlinah. Sodeluje pri odzivu na stres preko regulacije tarčnih molekul, kajti 14-3-3 proteini se lahko vežejo na signalne proteine, kot so kinaze, fosfataze in transmembranski receptorji ter tako vplivajo na signalizacijske procese, aktivacijo transkripcije ali obrambne procese. Ti proteini se tudi inducirajo pri odzivu na stresne razmere, kot sta slanost in suša (Bazargani in sod., 2011). V skupino regulatornih proteinov smo uvrstili še splošni regulatorni faktor ter DEAD box RNA helikazo. Omenjena helikaza sodeluje pri reorganiziranju sekundarne strukture RNA ali pri združitvi/razdružitvi kompleksa RNA-protein. DEAD box RNA helikaze so po poročanju Kanta in sod. (2007) vključene pri odzivu na stres pri navadnem repnjakovcu. Pri vseh regulatornih proteinih smo zasledili zmanjšanje vsebnosti v sušnem stresu.

Identificirali smo še dva transprotna proteina ter dva proteina, ki imata vlogo pri skladiščenju. Pri vseh štirih proteinih smo zaznali povečano vsebnost v sušnem stresu. NADH dehidrogeneza 1 podenota 9 je del mitohondrijske membranske NADH dehidrogenaze, ki sodeluje pri transportu elektronov iz NADH do respiratorne verige. Sobhanian in sod. (2010) so poročali o spremenjenem izražanju proteina pri soji v pogojih slanosti. Identificirali smo tudi vakuolno protonsko pirofosfatazo, za katero je znano, da se ji aktivnost spremeni v stresnih razmerah (Maeshima, 2000).

Primarna vloga listov je usmerjena v tvorbo energije preko fotosinteze, steblo pa delno podpira vlogo listov, zato je bilo pričakovano, da bomo tako v listih kot tudi v steblih v sušnem stresu identificirali podobne proteine. Tudi pri objavah, kjer so direktno primerjali proteine iz različnih tkiv, kot so npr. listi, steblo in korenine, so ugotovili, da je veliko proteinov prisotnih v vseh tkivih, čeprav se količina proteinov med tkivi močno razlikuje (Watson in sod., 2003; Albertin in sod., 2009). Ugotovili so, da je prisotnost enakih proteinov v analiziranih vegetativnih organih verjetno povezana z njihovimi vzdrževalnimi funkcijami. Vendar pa direktna primerjava proteinov identificiranih v listih in steblih pri kultivarju Tiber v sušnem stresu, ni smiselna, zaradi drugačnega načina ločbe proteinov in drugačne določitve spremembe vsebnosti proteinov.
### 5.1.3 Analiza N-glikoproteinov iz stebel in listov kultivarja Tiber

Pri rastlinah je endoplazemski retikulum glavna tarča stresa, kajti proteasomski in detoksifikacijski sistem, ki sta povezana z endoplazemskim retikulumom, sta zelo pomembna pri odzivu na stres (Komatsu in sod., 2009). Večina proteinov zunajceličnega prostora in endomembranskega sistema je glikoziliranih z N-vezanimi oligosaharidi. Znano je, da posttranslacijske modifikacije, kot je glikozilacija, spremenijo lastnosti in funkcije proteinov. N-glikani vezani na proteinov pri rastlinah. Predhodne objave Komatsu in sod. (2009) kažejo na pomembnost glikozilacije za optimalno delovanje proteinov, ki so udeleženi pri odzivu na stresne razmere.

Z namenom, da bi določili spremembe v vsebnosti N-glikoproteinov in preučili strukturo N-glikanov v sušnem stresu pri navadnem fižolu, smo najprej izolirali celokupne proteine iz listov in stebel. Koncentracija proteinov med listi in stebli se je zelo razlikovala, kajti v listih smo določili okoli štirikrat večjo koncentracijo kot v steblih. Vzrok za veliko razliko je verjetno v samem postopku izolacije, kajti stebla je mnogo težje homogenizirati v terilnici s tekočim dušikom, zaradi trdega in kompaktnega tkiva. V nadaljevanju smo proteine ločili z lektinsko kromatografijo, s katero smo dosegli učinkovito ločitev glikoziliranih proteinov. Glikoproteine smo ločili z SDS-PAGE, iz gela izrezali rezine ter opravili analizo z LC-MS/MS. N-glikoproteine smo identificirali, kvantificirali ter ročno pregledali spektre.

Pri ročni analizi spektrov smo zasledili veliko MS/MS spektrov za N-glikopeptide, ki so imeli signal pri m/z 163 (Hex + H)<sup>+</sup>, m/z 204 (HexNAc + H)<sup>+</sup> ali m/z 366 (Hex- $HexNAc + H)^+$ . Vendar smo lahko zelo malo spektrov povezali s peptidnimi sekvencami, zato je število identificiranih N-glikopeptidov iz spektrov dokaj majhno. To je verjetno posledica labilne vezi med glikanom in peptidom, šibkih vezi znotraj glikanov v primerjavi s peptidnimi vezmi med fragmentacijo. Vse to pa vodi do zelo nejasnih ali dvomljivih informacij o peptidnih sekvencah. Problem določitve peptidnih sekvenc pa se še poslabša, zaradi potencialne nizke učinkovitosti ionizacije, velikih mas, strukturne kompleksnosti in nizkih količin N-glikopeptidov. Poleg tega je za biološke vzorce značilna visoka dinamičnost glikoproteinov, kar je povezano z oteženo določitvijo glikoproteinov z nizkimi količinami iz kompleksnih proteinskih vzorcev (Ruiz-May in sod., 2014). Ravno zaradi kompleksne interpretacije spektrov in v določenih primerih slabe kvalitete spektrov je tudi primerjava struktur N-glikanov iz spektrov močno otežena in vprašljiva. Kljub temu smo pri ročni analizi spektrov pri posameznih proteinskih rezinah običajno zasledili veliko istih glikoproteinov z različnimi strukturami N-glikanov, ki so imeli samo dodatne sladkorne komponente.

Kot primer lahko navedemo, da smo pri vzorcu ST-S1, ST-C1 zasledili peptid z maso 1193,59, ki verjetno pripada bakrovi oksidazi, z visokomanoznimi tipi N-glikanov, ki so vsebovali različno število manoznih enot. Poleg tega smo zasledili, da ima lahko isti glikoprotein prisotne različne strukture N-glikanov ter da so določene strukture N-glikanov prisotne na različnih glikoproteinih. Na splošno, iz spektrov smo zasledili, da imajo glikoproteini vezane visokomanozne N-glikane ter tudi hibridne in kompleksne tipe N-glikanov. Zaradi kompleksnosti spektrov nam ni uspelo podati informacije o kvantifikaciji posameznih N-glikopeptidov iz spektrov. Iz istega razloga nam tudi ni uspelo določiti razlike med strukturami N-glikanov med vzorci v suši in kontrolnimi vzorci.

Kvantifikacijo N-glikoproteinov smo izvedli s programom MaxQuant. Pri tem smo uporabili skupno bazo proteinov, sestavljeno iz baze posameznih rezin. Število identificiranih glikoproteinov v posameznih proteinskih rezinah je bilo pričakovano, kajti pri iskanju smo uporabili NCBInr bazo zelenih rastlin, kjer smo pri posamezni rezini identificirali več podobnih glikoproteinov, vendar iz različnih rastlinskih vrst. Tudi število proteinov s signalnim peptidom se je dobro ujemalo s številom sekrecijskih proteinov, kajti sekrecijski proteini so zelo pogosto glikozilirani. Kvantitativna analiza glikoproteinov s programom MaxQuant je bila opravljena z vsemi 16 (vzorci stebel) oz. 20 (vzorci listov) naenkrat, ker bi se pri analizi posameznih proteinskih rezin informacija o kvantifikaciji lahko izgubila. To bi se lahko zgodilo zaradi nepopolnoma enakih proteinskih rezin, kajti iz gela je težko izrezati popolnoma enake rezine v sušnem stresu in kontrolnem vzorcu, kar bi bilo za kvantitativno primerjavo nujno. Tudi potovanje proteinskih molekul v dveh ločenih vzorcih ni nujno, da je popolnoma enako. Tako je možno, da je določen protein prisoten v eni proteinski rezini iz vzorca v stresu, pri kontrolnem vzorcu pa je isti protein lahko prisoten v naslednji rezini.

Pri kvantifikaciji N-glikoproteinov iz listov in stebel smo največje število glikoproteinov s spremenjenimi vsebnostmi v suši uvrstili med proteine, ki so povezani s procesi v celičnih stenah. Med njimi je največ proteinov, ki spadajo med glikozil hidrolaze. V skupino glikozil hidrolaz uvrščamo široko skupino encimov, ki cepijo glikozidne vezi v glikozidih, glikanih in glikokonjugatih. Encimi so glede na podobnost v aminokislinski sekvenci porazdeljeni v številne skupine (Vuong in Wilson, 2010). Pri našem delu smo identificirali glukozidaze, galaktozidazo, ksilozidaze, heksozaminidaze, manozidaze ter arabinofuranozidazo. Večino omenjenih glikozil hidrolaz smo določili kot homologe hipotetičnim proteinom. Omenjeni proteini so večinoma udeleženi pri metabolizmu celičnih sten, npr. ksiloglukan endotransglikozilaza/hidrolaza, ki cepi in ponovno tvori vezi med ksiloglukanskimi verigami ter tako regulira rigidnost celične stene (Kwon in sod., 2005). Samo v steblih smo zasledili povečanje vsebnosti encima v

suši. Tudi Zorb in sod. (2010) so poročali o povečanju izražanja encima pri koruzi v pogojih slanosti. Glukozidaze s povečanimi in zmanjšanimi vsebnostmi v suši smo določili tako v steblih kot v listih. Beta-ksilozidaze, alfa-arabinozidaze in beta-galaktozidaze sodelujejo pri razgradnji velikih polisahardov na manjše podenote, npr. sodelujejo pri razgradnji arabinanskih in galaktanskih stranskih verig pektina (Rejon in sod., 2013). Zmanjšanje vsebnosti beta-galaktozidaze v suši smo zasledili pri analizi stebel, povečanje vsebnosti alfa-arabinofuranozidaze in beta-heksozaminidaze pa pri analizi listov. Poleg spremenjenih vsebnosti glikozil hidrolaz smo v listih in steblih zasledili tudi zmanjšanje vsebnosti glicerofosforil diester fosfodiesteraze, ki hidrolizira fosfolipide do glicerola 3-fosfata in alkoholov ter vicianin hidrolaze, ki spada med glikozidaze, ki hidrolizirajo glikozilne komponente. Na osnovi identifikacije proteinov, ki sodelujejo pri procesih v celičnih stenah, lahko sklepamo, da sušni stres močno vpliva na metabolizem v celičnih stenah.

Identificirali smo tudi glikoproteine povezane z obrambo oz. stresom, med katere smo uvrstili askorbatno in bakrovo oksidazo, retikulin oksidazo, kislo fosfatazo, z brazinosteroidi reguliran protein, fruktofuranozidazo ter protein bogat z levcinskimi ponovitvami. Bakrova in askorbatna oksidaza sta povezani z oksidoredukcijskimi procesi, kjer je npr. askorbat oksidaza udeležena pri askorbat-glutation redoks reakcijah (Foyer in Noctor, 2011). Zanimivo je, da smo v listih zasledili povečanje vsebnosti askorbat oksidaze, v steblih pa zmanjšanje. Povečanje vsebnosti z brazinosteroidi reguliranega proteina smo opazili pri listih. Brazinosteroidi so steroidni hormoni, ki uravnavajo razvojne procese pri rastlinah ter tudi vplivajo na povečano odpornost na stres, kot je vročina, suša in zmrzal (Shigeta in sod., 2011). V listih smo zasledili tudi zmanjšanje in povečanje vsebnosti »purple« kisle fosfataze. Gre za encim, ki katalizira hidrolizo različnih fosfomonoesterskih in amidnih substratov. Ugotovili so, da je pri navadnem repnjakovcu protein induciran z ROS, iz česar so sklepali, da je encim povezan z znotrajcelično tvorbo ROS med celičnimi degenerativnimi procesi in avtolizo (Schenk in sod., 2013).

Poleg aspartatne in cisteinske proteinaze smo od proteinov, ki so vpleteni v proteolizo, identificirali še nikalin ter prekurzor za subtilizinu podobno proteazo. Subtilaze sodelujejo pri cepitvi strukturnih proteinov v celičnih stenah. Pri analizi riža v stresu zaradi slanosti so Song Y. in sod. (2011) zaznali zmanjšanje vsebnosti subtilaz, iz česar so sklepali, da pogoji slanosti inhibirajo razgradnjo proteinov celične stene. Nikalin spada med proteinske komplekse, ki jih imenujemo gama-sekretaze, ki katalizirajo proteolitične cepitve transmembranskih domen številnih proteinov. Pri vseh omenjenih proteinih vpletenih v proteolizo smo zasledili zmanjšanje vsebnosti v stresu, kar je v nasprotju z rezultati proteomske analize listov in stebel, ki so opisane v poglavjih 5.1.1

in 5.1.2, kjer smo zasledili povečanje vsebnosti proteolitičnih encimov v stresu. Da bi pojasnili razloge za spremenjene vsebnosti, bi bile potrebne usmerjene in podrobne raziskave za analizo določenih proteaz.

Identificirali smo tudi dva proteina povezana z zvijanjem proteinov, protein disulfid izomerazo in UDP-glukozo: glikoprotein glukoziltransferazo. Pri protein disulfid izomerazi smo v listih zasledili povečanje in zmanjšanje vsebnosti proteina v suši, v steblih pa povečanje vsebnosti. UDP-glukozo: glikoprotein glukoziltransferazo smo zasledili samo v listih, kjer je prišlo do zmanjšanja vsebnosti proteina v suši. UDPglukoza: glikoprotein glukoziltransferaza specifično prepozna in ponovno glukozilira samo nepopolno zvite proteine (Pattison in Amtmann, 2009). Protein disulfid izomeraza pa ima pomembno vlogo pri zvijanju nastajajočih polipeptidov in pri pravilni tvorbi disulfidnih vezi pri zvitju proteinov (Wilkinson in Gilbert, 2004). Poročali so o povečanju izražanja proteina pri rižu v slanosti in navadnem repnjakovcu pri kratkotrajni izpostavljenosti slanosti, pri daljšem vplivu slanosti pa je prišlo do zmanjšanja vsebnosti proteina (Zhao in sod., 2013).

V povezavi s proteini povezanih s signaliziranjem smo identificirali receptor-protein kinazo, ki sodeluje pri zaznavanju in transdukciji zunajceličnih signalov. V steblih je prišlo do zmanjšanja in povečanja vsebnosti proteina v suši, v listih pa do zmanjšanja vsebnosti. Ko rastline zaznajo signal, kot so npr. suša, slanost, mraz, proteini na plazemski membrani, prenesejo te signale v celico in sprožijo številne procese signalne transdukcije (Liu in sod. 2000).

Pri proteinih udeleženih pri energijskem metabolizmu smo v listih in steblih opazili povečanje vsebnosti ksiloze izomeraze. V povezavi s proteini povezanimi s sintezo aminokislin smo samo v listih identificirali aminoacilazo z zmanjšano vsebnostjo v suši. Prav tako smo samo v listih zasledili zmanjšanje vsebnosti kanavalina, ki ima vlogo pri skladiščenju proteinov.

Rezultati analize glikoproteinov iz stebel in listov navadnega fižola v sušnem stresu so pokazali, da ima sušni stres največji vpliv na procese v celičnih stenah ter na glikoproteine, ki so povezani z obrambo proti stresu, stresom in proteolizo. Iz analize spektrov smo razbrali, da imajo N-glikoproteini vezane visokomanozne, hibridne in kompleksne tipe glikanov. Strukturno analizo N-glikanov je v našem primeru najverjetneje poslabšala kompleksnost spektrov, slabša fragmentacija ter heterogenost kompleksne mešanice glikoproteinov.

# 5.2 SKLEPI

Rezultate doktorske naloge lahko povzamemo v naslednjih sklepih:

- 1. S primerjalno analizo proteoma listov kontrolnih rastlin in rastlin v sušnem stresu pri Tibru in Starozagorskem smo z 2D-DIGE analizo dobili ustrezno število proteinskih lis ter uspešno opravili identifikacijo proteinov.
- 2. V 2D-DIGE analizo proteoma listov kontrolnih rastlin in rastlin v sušnem stresu smo vključili tudi kultivar BAT 477, pri katerem smo dobili 71 proteinskih lis s spremenjenimi vsebnostmi v stresnih pogojih. Teh proteinov nismo identificirali, saj se BAT 477 glede vrednosti sveže in suhe mase listov ter RVV ni bistveno razlikoval od ostalih dveh kultivarjev.
- 3. Z analizo proteoma listov kontrolnih rastlin in rastlin v stresu smo pri kultivarjih Tiber in Starozagorski identificirali proteine, ki ustrezajo splošnemu odzivu rastlin na stresne razmere.
- 4. Na osnovi identificiranih proteinov v listih obeh kultivarjev smo ugotovili, da suša vpliva na vsebnost proteinov, ki so povezani z energijskim metabolizmom, fotosintezo, obrambo proti stresu, ATP pretvorbo ter proteine povezane s sintezo, zvijanjem in proteolizo.
- 5. Sklepamo, da ima suša večji vpliv na zmanjšanje vsebnosti proteinov udeleženih pri fotosintezi pri Starozagorskem kot pa pri Tibru. Pri tem so posebno zanimivi proteini vključeni v oksidacijo vode in proteini, pri katerih smo zasledili povečanje vsebnosti pri Tibru ter zmanjšanje pri Starozagorskem.
- 6. Na podlagi rezultatov sklepamo, da lahko določene proteine uporabimo kot markerje pri selekcijskem procesu tolerance na sušo pri navadnem fižolu. Za ta namen so najbolj primerni proteini, katerih vsebnost se med kultivarjema razlikuje. Med njimi lahko izpostavimo proteine vključene v oksidacijo vode ter proteine, ki smo jih identificirali le v enem izmed kultivarjev.
- 7. Proteomska analiza izotopsko označenih proteinov stebel pri Tibru v sušnem stresu je pokazala, da sušni stres vpliva na spremembe vsebnosti proteinov, ki so v glavnem udeleženi pri energijskem metabolizmu, fotosintezi, obrambi proti stresu, ATP pretvorbi, proteolizi in sintezi proteinov.

- 8. Izmed vseh proteinov, ki smo jih identificirali v steblih pri odzivu na sušo, smo pri proteinu vročinskega šoka, z maso 70 kDa, zasledili največje povečanje vsebnosti proteina v suši, in sicer kar petkratno povečanje.
- 9. Tako kot pri analizi proteoma listov smo tudi pri analizi stebel zasledili povečanje vsebnosti proteinov, ki sodelujejo pri sintezi proteinov. Sklepamo, da je povečana stopnja sinteze proteinov pomembna za obnavljanje poškodovanih proteinov, ki so potrebni za vzpostavitev normalnih celičnih metabolnih aktivnosti in rast rastline.
- 10. Rezultati analize glikoproteinov iz stebel in listov navadnega fižola v sušnem stresu so pokazali, da ima sušni stres največji vpliv na proteine, ki so povezani s procesi v celičnih stenah. Med njimi je največ proteinov, ki spadajo med glikozil hidrolaze.
- 11. Sušni stres ima vpliv na glikoproteine, ki so povezani z obrambo, stresom in proteolizo, kar se sklada s splošnim konceptom odziva rastlin na stres.
- 12. Nismo zasledili bistvenih razlik v identificiranih skupinah glikoproteinov med stebli in listi.
- 13. Analiza spektrov je pokazala, da imajo glikoproteini vezane visokomanozne, hibridne in kompleksne tipe glikanov.

Na podlagi sklepov iz 1. do 9. točke lahko potrdimo hipotezo, da se v listih in steblih navadnega fižola nahajajo proteini, ki so vključeni v odziv rastlin na sušni stres. S primerjavo celokupnih proteinov iz listov in stebel kontrolnih rastlin in rastlin v stresu smo zasledili številne razlike v vsebnosti proteinov.

S sklepom iz 6. točke lahko potrdimo hipotezo, kjer smo predpostavljali, da se v listih navadnega fižola nahajajo proteini, ki potencialno prispevajo k večji toleranci navadnega fižola na sušo.

Z rezultati analize glikoproteinov, katerih sklepi so podani od točke 10. do 13., lahko potrdimo hipotezo, kjer smo predpostavljali, da obstajajo razlike v vsebnosti glikoproteinov med kontrolnimi rastlinami in rastlinami navadnega fižola v sušnem stresu. Z identifikacijo glikoproteinov smo dobili dodaten vpogled v odziv navadnega fižola na sušo.

Z vsemi omenjenimi sklepi te raziskave lahko potrdimo še zadnjo postavljeno hipotezo, kajti rezultati identifikacije proteinov v listih in steblih pri odzivu na sušni stres, so pomembna stopnja k njegovemu razumevanju in osnova za nadaljnje raziskave sušnega stresa pri navadnem fižolu.

#### 6 POVZETEK (SUMMARY)

#### 6.1 POVZETEK

Sušni stres spada med abiotske stresne dejavnike, ki vplivajo na slabši pridelek kmetijsko pomembnih rastlin, kot so stročnice, in med njimi navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.). Odziv navadnega fižola na sušo še ni podrobno raziskan, zato je boljše razumevanje mehanizmov odziva na sušni stres bistveno za razvoj kultivarjev, tolerantnih na sušo. To bi pripomoglo k boljšemu pridelku navadnega fižola, ki velja za pomembno stročnico v prehrani ljudi. Z namenom, da bi dobili širši vpogled v molekularne mehanizme, ki sodelujejo pri odzivu navadnega fižola na sušo, smo analizirali proteom listov in stebel navadnega fižola v sušnem stresu.

V prvem delu raziskave smo uporabili 2D-DIGE pristop za analizo proteinov iz listov pri dveh kultivarjih navadnega fižola v sušnem stresu - Tiber in Starozagorski čern, slednji velja za bolj občutljiv kultivar. Primerjali smo razlike v vsebnosti proteinov med kontrolnimi rastlinami in rastlinami v sušnem stresu. Z LC-MS/MS smo identificirali 58 proteinov s spremenjenimi vsebnostmi pri Tibru in 64 pri Starozagorskem černu. Glede na njihove funkcije smo največ proteinov razvrstili v skupino energijskega metabolizma, fotosinteze, ATP pretvorbe, sinteze proteinov, proteolize ter v skupino proteinov povezanih z obrambo in stresom. Identificirani proteini so vključeni v poznane mehanizme, ki so povezani s splošnim odzivom rastlin na stres, vendar določeni med njimi prispevajo k novim podrobnostim o njihovi vlogi pri odzivu na sušo pri navadnem fižolu. Lahko sklepamo tudi na določene zaključke o mehanizmih tolerance na sušo, ki pa temeljijo samo na rezultatih sušnega stresa na proteomu listov, ne pa tudi na razlikah med kultivarjema. Najbolj izrazita razlika v spremembi vsebnosti proteinov v suši je zmanjšanje vsebnosti proteinov, ki so udeleženi pri fotosintezi pri Starozagorskem ter zmanjšanje in povečanje vsebnosti fotosintetskih proteinov pri Tibru. To nakazuje na negativni vpliv suše na ključne proteine, ki so udeleženi pri fotosintezi ter na večji vpliv suše na fotosintetske proteine pri Starozagorskem. Na podlagi rezultatov sklepamo, da se lahko določeni proteini uporabijo kot markerji pri selekcijskem procesu tolerance na sušo pri navadnem fižolu. Za ta namen pa so najbolj primerni proteini, katerih vsebnost se med kultivarjema razlikuje. Med njimi lahko izpostavimo proteine, vključene v oksidacijo vode ter proteine, ki smo jih identificirali le v enem izmed kultivarjev. Te proteine bi morali potrditi z direktno proteomsko primerjavo obeh kultivarjev. Zanimivo za nadaljnje delo bi bilo tudi raziskati vzroke za različne spremembe v vsebnosti določenih proteinov med kultivarjema Tiber in Starozagorski. Interakcije med identificiranimi proteini smo ponazorili tudi z bioinformatsko analizo, s katero smo dosegli bolj celovit vpogled v biološke poti in molekulske funkcije, na katere ima stres vpliv.

V drugem delu smo izotopsko označene proteine iz stebel pri kultivarju Tiber v suši uporabili za kvantitativno analizo s programom MaxQuant. Proteine iz vzorcev rastlin v stresu in kontrolnih vzorcev smo ločili na NaDS-PAGE ter gel razrezali na rezine. Sledilo je označevanje v gelu s stabilnimi izotopi ter analiza z masno spektrometrijo. Proteine smo glede na njihove biološke funkcije razvrstili v ustrezne skupine. Ugotovili smo, da je največje število proteinov udeleženih v procese energijskega metabolizma, fotosinteze, procese povezane z ROS, obrambo proti stresu, s sintezo proteinov ter proteolizo. Ta del raziskave predstavlja osnovni vpogled v regulatorni mehanizem, v katerega so vključeni proteini stebel pri navadnem fižolu v suši.

Glikozilacija je zelo pomembna za optimalno delovanje proteinov udeleženih pri odzivu na stres. Glikozilacija deluje na nezvite proteine in je udeležena pri kontroli kvalitete glikoproteinov v endoplazemskem retikulumu. Z namenom, da bi preučili pomembnost glikozilacije in glikoproteinov pri navadnem fižolu, smo glikoproteine izolirali iz listov in stebel kultivarja Tiber v suši. Za izolacijo glikoproteinov smo uporabili lektinsko afinitetno kromatografijo, jih ločili na NaDS-PAGE, gel razrezali na rezine ter peptide analizirali z LC-MS/MS. Kvantifikacijo N-glikoproteinov smo opravili s programom MaxQuant, kjer smo uporabili možnost kvantifikacije brez označevalcev. Zasledili smo 35 glikoproteinov s spremenjenimi vsebnostmi v sušnih razmerah pri listih ter 23 glikoproteinov pri steblih. Glikoproteine smo razvrstili v funkcionalne skupine, največ smo jih uvrstili v skupino povezano s procesi v celičnih stenah, proteolizo, stresom in obrambo proti stresu. Ti rezultati se skladajo s splošnim konceptom odziva rastlin na stres in nakazujejo na možnost, da ima sušni stres velik vpliv na biokemijski metabolizem v celičnih stenah. Večjih razlik v identificiranih skupinah proteinov med stebli in listi nismo zasledili. Strukture N-glikanov smo določili z ročno analizo spektrov. Pri tem smo našli visokomanozne, kompleksne in hibridne tipe N-glikanov. Z ročnim pregledovanjem smo zasledili številne MS/MS spektre, ki so ustrezali Nglikopeptidom, vendar nam je uspelo identificirati le manjše število N-glikopeptidov. Previdevamo, da je to povezano z labilno povezavo med glikanom in peptidom ter šibkimi vezmi znotraj glikanov v primerjavi s peptidno vezjo med fragmentacijo, kar vodi do nejasnih informacij glede peptidne sekvence. Strukturna kompleksnost in nizke količine N-glikopeptidov pa analizo še dodatno otežijo.

Ugotovili smo, da so identificirani proteini iz listov in stebel navadnega fižola v sušnem stresu udeleženi pri številnih molekulskih mehanizmih in so verjetno vključeni v odziv na stres. Predstavljeni rezultati so uporabni za nadaljnje razumevanje molekulskih mehanizmov odziva na sušo pri navadnem fižolu.

#### 6.2 SUMMARY

Drought stress is one of the main abiotic stresses limiting production of many important crops such as legumes, including common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The response of common bean to drought stress has not been widely studied, so an improved understanding of drought stress response mechanisms could help in developing drought tolerant cultivars, consequently contributing to higher productivity of this important food legume. To enhance the knowledge of the molecular mechanisms involved in common bean response to drought, a proteomic analysis of common bean leaves and stems under stress conditions was performed.

In the first part of the study, 2D-DIGE was used to analyse drought-responsive proteins in leaves of two cultivars differing in their response to drought, Tiber and more sensitive Starozagorski čern. Differences in protein abundance between control and stressed plants were compared. Fifty-eight proteins whose abundance changed significantly were identified by LC-MS/MS in Tiber and 64 in Starozagorski čern. The majority of identified proteins were classified into functional categories that include energy metabolism, photosynthesis, ATP interconversion, protein synthesis and proteolysis, stress and defence related proteins. These proteins are involved in known mechanisms associated with the general stress response in plants and the results provide new details of their involvement in drought stress in common bean. Our conclusions about the tolerance mechanisms to drought are based on the results of leaf proteome analysis based on water deficit rather than a differences between cultivars. The most outstanding difference in abundance profiles is the decreased abundance of the identified proteins involved in photosynthesis in Starozagorski and their mixed abundance profiles in Tiber. This indicates that drought negatively affects the key proteins of the photosynthetic apparatus and, to a greater extent, those in Starozagorski. The results nevertheless suggest that certain identified proteins could be used as markers in the selection process for drought tolerance in common bean. Of those proteins showing contrasting abundance patterns between cultivars, the most suitable candidates are the oxygen evolving enhancer proteins and proteins that were identified in either of the two cultivars. This needs to be confirmed by a direct proteomic comparison of the two cultivars. The fact that some of the identified proteins show opposite changes in abundance profiles for Tiber and Starozagorski is worthy of further investigation. Interactions between identified proteins were demonstrated by bioinformatics analysis, enabling a more complete insight into biological pathways and molecular functions affected by drought stress.

In the second part of the study, total proteins from the stems of cultivar Tiber under drought were isolated for the quantitative analysis of isotopic labeled proteins using MaxQuant. Proteins of stressed and controled samples were separated by SDS-PAGE and the gel was cut into slices. In-gel stable isotope labeling for relative quantification using mass spectrometry was followed. The quantified proteins were grouped into several main functional groups: energy metabolism, photosynthesis, proteolysis, synthesis and proteins related to ROS, defence and stress. This part of the research provided the basic insight into the molecular regulatory mechanism of stem proteins in common bean under drought.

Glycosylation is very important for the optimal functioning of proteins involved in the plant stress response, since glycosylation act on unfolded proteins and is involved in the quality control of glycoprotein assembly in the endoplasmatic reticulum. To examine the importance of glycosylation and glycoproteins in common bean, glycoproteins from leaves and stems of cultivar Tiber under drought stress were studied in the last part of this work. Total lectin affinity chromatography was used for glycoprotein enrichment. Glycoproteins were separated by SDS-PAGE and gels were cut into slices and analyzed by LC-MS/MS. Quantification of N-glycoproteins was performed using MaxQuant with a label free quantification option. Thirty five glycoproteins were changed in abundance in leaves of common bean under drought and 23 glycoproteins were changed in stems. Glycoproteins were glassified into functional categories where the majority of proteins were grouped into the cluster of cell wall processes, defense/stress related proteins and cluster related to proteolysis. These results fit with the general concept of the stress response in plants and suggest that drought stress might affect biochemical metabolism in the cell wall. No major differences in quantified proteins were determined between leaves and stems. The structures of N-glycans were determined manualy from spectra, where structures of high mannose, complex and hybrid types of N-glycans were found. By manual inspection, many MS/MS spectra for N-gylcopeptides were found, but only a small number of N-glycopeptides was identified. This reflects the labile nature of the glycan-peptide linkage and the fragile internal glycan bonds during fragmentation, compared to peptide bonds, which often results in little or ambiguous information concerning peptide sequence. Moreover, structural complexity and low abundance of Nglycopeptides make the analysis even more challenging.

In a summary, the identified proteins from leaves and stems of common bean under drought are involved in several molecular mechanisms and could be implicated in drought response. These results are useful for further understanding of molecular mechanisms of drought response in common bean.

# 7 VIRI

- Abreu I.A., Farinha A.P., Negrão S., Gonçalves N., Fonseca C., Rodrigues M., Batista R., Saibo N.J., Oliveira M.M. 2013. Coping with abiotic stress: proteome changes for crop improvement. Journal of Proteomics, 93: 145-168
- Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). 2014. Nucleic Acids Research, Database issue, 42: D191-D198, doi: 10.1093/nar/gkt1140: 8 str.
- Aebersold R., Goodlett D.R. 2001. Mass spectrometry in proteomics. Chemical Reviews, 101, 2: 269-296
- Aghaei K., Ehsanpour A.A., Komatsu S. 2008. Proteome analysis of potato under salt stress. Journal of Proteome Research, 7: 4858-4868
- Agrawal G.K., Yonekura M., Iwahashi Y., Iwahashi H., Rakwal R. 2005. System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants: Part I: Technologies in proteome establishment. Journal of Chromatography B, 815, 1-2: 109-123
- Alam I., Sharmin S.A., Kim K-H., Yang J.K., Choi M.S., Lee B-H. 2010. Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. Plant Soil, 333: 491-505
- Albertin W., Langella O., Joets J., Négroni L., Zivy M., Damerval C., Thiellement H. 2009. Comparative proteomics of leaf, stem, and root tissues of synthetic *Brassica napus*. Proteomics, 9, 3: 793-799
- Ali G.M., Komatsu S. 2006. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. Journal of Proteome Research, 5, 2: 396-403
- An H.J., Froehlich J.W., Lebrilla C.B. 2009. Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins. Current Opinion in Chemical Biology, 13, 4: 421-426
- Asara J.M., Zhang X., Zheng B., Maroney L.A., Christofk H.R., Wu N., Cantley L.C. 2006. In-gel stable isotope labeling for relative quantification using mass spectrometry. Nature Protocols 1, 1: 46-51
- Baginsky S. 2009. Plant proteomics: Concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. Mass Spectrometry Reviews, 28, 1: 93-120
- Bazargani M.M., Sarhadi E., Bushehri A.S., Matros A., Mock H-P., Naghavi M.R., Hajihoseini V., Mardi M., Hajirezaei M.R, Moradi F., Ehdaie B., Salekdeh G.H. 2011. A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative

stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. Journal of Proteomics, 74: 1959-1973

- Belenky I., Steinmetz A., Vyazmensky M., Barak Z., Tittmann K., Chipman D.M. 2012. Many of the functional differences between acetohydroxyacid synthase isozyme I and other AHASs are a result of the rapid formation and breakdown of the covalent acetolactate-ThDP adduct in AHAS I. FEBS Journal, 279: 1967-1979
- Bhatt I., Tripathi B.N. 2011. Plant peroxiredoxins: Catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. Biotechnology Advances, 29: 850-859
- Bhushan D., Jaiswal DK., Ray D., Basu D., Datta A., Chakraborty S., Chakraborty N. 2011. Dehydration-responsive reversible and irreversible changes in the extracellular matrix: comparative proteomics of chickpea genotypes with contrasting tolerance. Journal of Proteome Research, 10, 4: 2027-2046
- Bhushan D., Pandey A., Choudhary M.K., Datta A., Chakraborty S., Chakraborty N. 2007. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in chickpea extracellular matrix during dehydration stress. Molecular & Cellular Proteomics, 6, 11: 1868-1884
- BLASTP, basic local alignment search tool searching protein database using a protein query. 2012. Bethesda, National Center for Biotechnology Information http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST (januar 2012)
- Bray E.A. 1993. Molecular responses to water deficit. Plant Physiology, 103, 4: 1035-1040
- Broughton W.J., Hernandez G., Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. Plant and Soil, 252: 55-128
- Budič M. 2009. Proteaze, vpletene v odziv navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) na vodni stres. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 112 str.
- Budič M., Kidrič M., Meglič V., Cigić B. 2009. A quantitative technique for determining proteases and their substrate specificities and pH optima in crude enzyme extracts. Analytical Biochemistry, 388, 1: 56-62, doi: 10.1016/j.ab.2009.01.045: 7 str.
- Budič M., Sabotič J., Meglič V., Kos J., Kidrič M. 2013. Characterization of two novel subtilases from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their responses to drought. Plant Physiology and Biochemistry, 62: 79-87, doi: 10.1016/j.plaphy.2012.10.022: 9 str.

- Canas B., Lopez-Ferrer D., Ramos-Fernandez A., Camafeita E., Calvo E. 2006. Mass spectrometry technologies for proteomics. Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 4, 4: 295-320
- Caruso G., Cavaliere C., Foglia P., Gubbiotti R., Samperi R., Laganà A. 2009. Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. Plant Science, 177, 6: 570-576
- Cellier F., Conéjéro G., Breitler J-C., Casse F. 1998. Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. Plant Physiology, 116: 319-328
- Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S. 2003. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. Functional Plant Biology, 30, 3: 239-264
- Chen C. 2008. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. Analytica Chimica Acta, 624, 1: 16-36
- Chen G., Pramanik B.N. 2009. Application of LC/MS to proteomics studies: current status and future prospects. Drug Discovery Today, 14, 9-10: 465-471
- Chitteti B.R., Peng Z. 2007. Proteome and phosphoproteome differential expression under salinity stress in rice (*Oryza sativa*) roots. Journal of Proteome Research, 6, 5: 1718-1727
- Choudhary M.K., Basu D., Datta A., Chakraborty N., Chakraborty S. 2009. Dehydration-responsive nuclear proteome of rice (*Oryza sativa* L.) illustrates protein network, novel regulators of cellular adaptation, and evolutionary perspective. Molecular & Cellular Proteomics, 8, 7: 1579-1598
- Cline M.S., Smoot M., Cerami E., Kuchinsky A., Landys N., Workman C., Christmas R., Avila-Campilo I., Creech M., Gross B., Hanspers K., Isserlin R., Kelley R., Killcoyne S., Lotia S., Maere S., Morris J., Ono K., Pavlovic V., Pico A.R., Vailaya A., Wang P.L., Adler A., Conklin B.R., Hood L., Kuiper M., Sander C., Schmulevich I., Schwikowski B., Warner G.J., Ideker T., Bader G.D. 2007. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. Nature Protocols, 2, 10: 2366-2382
- Colmenero-Flores J.M., Moreno L.P., Smith C.E., Covarrubias A.A. 1999. Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. Plant Physiology, 120, 1: 93-104
- Contour-Ansel D., Torres-Franklin M.L., Zuily-Fodil Y., de Carvalho M.H. 2010. An aspartic acid protease from common bean is expressed 'on call' during water stress

and early recovery. Journal of Plant Physiology, 167, 18: 1606-1612, doi: 10.1016/j.jplph.2010.06.018: 7 str.

- Cooper C.A., Gasteiger E., Packer N.H. 2001. GlycoMod- a software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. Proteomics, 1, 2: 340-349
- Corthals G.L., Rose K. 2007. Quantitation in proteomics. V: Proteome research: concepts, technology and application. Wilkins M.R., Appel R.D., Williams K.L., Hochstrasser D.F. (eds.). 2<sup>nd</sup> ed. Berlin, Springer: 69-93
- Costa França M.G, Pham Thi A.T., Pimentel C., Pereyra Rossiello R.O., Zuily-Fodil Y., Laffray D. 2000. Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. Environmental and Experimental Botany, 43, 3: 227-237
- Cox J., Matic I., Hilger M., Nagaraj N., Selbach M., Olsen J.V., Mann M. 2009. A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. Nature Protocols, 4, 5: 698-705
- Cruz de Carvalho M.H., Arcy-Lameta A., Roy-Macauley H., Gareil M., El Maarouf H., Pham-Thi A., Zuily-Fodil Y. 2001. Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. FEBS Letters, 492: 242-246
- Cuellar-Ortiz S.M., De La Paz Arrieta-Montiel M., Acosta-Gallegos J., Covarrubias A.A. 2008. Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. Plant, Cell and Environment, 31, 10: 1399-1409, doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01853.x: 11 str.
- Černe M. 1997. Stročnice. Ljubljana, Kmečki glas: 139 str.
- Datko M., Zivcak M., Brestic M. 2008. Proteomic analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves as affected by high temperature treatment. V: Photosynthesis. Energy from the sun. Allen J.F., Gantt E., Golbeck J.H., Osmond B. (eds.). Dordrecht, Springer: 1523-1527
- De La Fuente M., Borrajo A., Bermúdez J., Lores M., Alonso J., López M., Santalla M., De Ron A.M., Zapata C., Alvarez G. 2011. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. Journal of Proteomics, 74, 2: 262-267
- Debouck D. 1999. Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. V: Common bean improvement in the twenty-first century. Singh S. (ed.). Dordrecht/Boston/New York, Kluwer Academic Publishers: 25-52

- Dixon D.P., Skipsey M., Edwards R. 2010. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. Phytochemistry, 71: 338-350
- Dooki A.D., Mayer-Posner F.J., Askari H., Zaiee A., Salekdeh G.H. 2006. Proteomic responses of rice young panicles to salinity. Proteomics, 6: 6498-6507
- Doria E., Campion B., Sparvoli F., Tava A., Nielsen E. 2012. Anti-nutrient components and metabolites with health implications in seeds of 10 common bean (*Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L.) landraces cultivated in southern Italy. Journal of Food Composition and Analysis, 26: 72-80
- Durand T.C., Sergeant K., Carpin S., Label P., Morabito D., Hausman J.F., Renaut J. 2012. Screening for changes in leaf and cambial proteome of *Populus tremula*  $\times$  *P. alba* under different heat constraints. Journal of Plant Physiology, 169, 17: 1698-1718
- Durand T.C., Sergeant K., Renaut J., Planchon S., Hoffmann L., Carpin S., Label P., Morabito D., Hausman J.F. 2011. Poplar under drought: Comparison of leaf and cambial proteomic responses. Journal of Proteomics, 74: 1396-1410
- Duranti M. 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. Fitoterapia, 77: 67-82
- Duvick J., Fu A., Muppirala U., Sabharwal M., Wilkerson M.D., Lawrence C.J., Lushbough C., Brendel V. 2008. PlantGDB: a resource for comparative plant genomics. Nucleic Acids Research, Database issue, 36: D959-D965, doi: 10.1093/nar/gkm1041: 7 str.
- Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., von Heijne G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. Journal of Molecular Biology, 300, 4: 1005-1016
- Escobar Galvis M.L., Marttila S., Håkansson G., Forsberg J., Knorpp C. 2001. Heat stress response in pea involves interaction of mitochondrial nucleoside diphosphate kinase with a novel 86-kilodalton protein. Plant Physiology, 126: 69-77
- Etzler M.E., Mohnen D. 2009. Viridiplantae. Chapter 22. V: Essentials of Glycobiology. Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Freeze H.H., Stanley P., Bertozzi C.R., Hart G.W., Etzler M.E. (eds.). 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 12 str. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1924/ (november 2012)
- FAOSTAT. 2007. Food supply: crop primary equivalent. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations http://www.fao.org/statistics/yearbook/vol\_1\_1 (januar 2011)

- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S.M.A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy for Sustainable Development, 29, 1: 185-212
- Feng X., Liu X., Luo Q., Liu B.F. 2008. Mass spectrometry in systems biology: an overview. Mass Spectrometry, 27, 6: 635-660
- Fitchette A.C., Dinh O.T., Faye L., Bardor M. 2007. Plant proteomics and glycosylation. Methods in Molecular Biology, 355: 317-342
- Fitchette-Lainé A.C., Gomord V., Cabanes M., Michalski J.C., Saint Macary M., Foucher B., Cavelier B., Hawes C., Lerouge P., Faye L. 1997. N-glycans harboring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells. The Plant Journal, 12, 6: 1411-1417
- Foyer C.H., Noctor G. 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox Hub1. Plant Physiology, 155, 1: 2-18
- Freist W., Gauss D.H., Söll D., Lapointe J. 1997. Glutamyl-tRNA sythetase. Biological Chemistry, 378, 11: 1313-1329
- Gao L., Yan X., Li X., Guo G., Hu Y., Ma W., Yan Y. 2011. Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). Phytochemistry, 72: 1180-1191
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Research, 31: 3784-3788
- Gazanchian A., Hajheidari M., Sima N.K., Salekdeh G.H. 2007. Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery. Journal of Experimental Botany, 58: 291-300
- Ge P., Ma C., Wang S., Gao L., Li X., Guo G., Ma W., Yan Y. 2012. Comparative proteomic analysis of grain development in two spring wheat varieties under drought stress. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 402, 3: 1297-1313
- Geisler-Lee J., O'Toole N., Ammar R., Provart N.J., Millar A.H., Geisler M. 2007. A predicted interactome for *Arabidopsis*. Plant Physiololgy, 145, 2: 317-329
- Gill S.S., Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 909-930
- Hajheidari M., Abdollahian-Noghabi M., Askari H., Heidari M., Sadeghian S.Y., Ober E.S., Salekdeh G.H. 2005. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. Proteomics, 5: 950-960

- Han X., Aslanian A., Yates J. 2008. Mass spectrometry for proteomics. Current Opinion in Chemical Biology, 12, 5: 483-490
- Heidarvand L., Maali-Amiri R. 2013. Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. Journal of Plant Physiology, 170, 5: 459-469
- Hieng B., Ugrinović K., Šuštar-Vozlič J., Kidrič M. 2004. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. Journal of Plant Physiology, 161: 519-530
- Hu Q., Noll R.J., Li H., Makarov A., Hardman M., Graham Cooks R. 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. Journal of Mass Spectrometry, 40, 4: 430-443
- Ibáñez C., Simó C., García-Cañas V., Cifuentes A., Castro-Puyana M. 2013. Metabolomics, peptidomics and proteomics applications of capillary electrophoresis-mass spectrometry in foodomics: a review. Analytica Chimica Acta, 802: 1-13
- Igamberdiev A.U., Bykova N.V., Kleczkowski L.A. 1999. Origins and metabolism of formate in higher plants. Plant Physiology and Biochemistry, 37: 503-513
- Imin N., Kerim T., Rolfe B.G., Weinman J.J. 2004. Effect of early cold stress on the maturation of rice anthers. Proteomics, 4: 1873-1882
- Johnson H., Eyers C.E. 2010. Analysis of post-translational modifications by LC-MS/MS. Methods in Molecular Biology, 658: 93-108
- Jorrín-Novo J.V., Maldonado A.M., Echevarría-Zomeño S., Valledor L., Castillejo M.A., Curto M., Valero J., Sghaier B., Donoso G., Redondo I. 2009. Plant proteomics update (2007-2008): second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. Journal of Proteomics, 72, 3: 285-314
- Kajfež-Bogataj L. 2005. Podnebne spremembe in ranljivost kmetijstva. Acta agriculturae Slovenica, 85, 1: 25-40
- Kant P., Kant S., Gordon M., Shaked R., Barak S. 2007. Stress response suppressor 1 and stress response suppressor 2, two DEAD-box RNA helicases that attenuate *Arabidopsis* responses to multiple abiotic stresses. Plant Physiology, 145: 814-830
- Kavar T., Maras M., Kidrič M., Šuštar-Vozlič J., Meglič V. 2008. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. Molecular Breeding, 21: 159-172

- Kavar T., Maras M., Kidrič M., Šuštar-Vozlič J., Meglič V. 2011. The expression profiles of selected genes in different bean species (*Phaseolus* spp.) as response to water deficit. Journal of Central European Agriculture, 12, 4: 557-576
- Ke Y., Han G., He H., Li J. 2009. Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. Biochemical and Biophysical Research Communications, 379, 1: 133-138
- Kerrien S., Aranda B., Breuza L., Bridge A., Broackes-Carter F., Chen C., Duesbury M., Dumousseau M., Feuermann M., Hinz U., Jandrasits C., Jimenez R.C., Khadake J., Mahadevan U., Masson P., Pedruzzi I., Pfeiffenberger E., Porras P., Raghunath A., Roechert B., Orchard S., Hermjakob H. 2012. The IntAct molecular interaction database in 2012. Nucleic Acids Research, 40, Database issue: D841-D846, doi: 10.1093/nar/gkr1088: 6 str.
- Khan H.R., Paull J.G., Siddique K.H.M., Stoddard F.L. 2010. Faba bean breeding for drought-affected environments: a physiological and agronomic perspective. Field Crops Research, 115: 279-286
- Khan M., Takasaki H., Komatsu S. 2005. Comprehensive phosphoproteome analysis in rice and identification of phosphoproteins responsive to different hormones/stresses. Journal of Proteome Research, 4, 5: 1592-1599
- Komatsu S., Shirasaka N., Sakata K. 2013. 'Omics' techniques for identifying floodingresponse mechanisms in soybean. Journal of Proteomics, 93: 169-178
- Komatsu S., Yamada E., Furukawa K. 2009. Cold stress changes the concanavalin Apositive glycosylation pattern of proteins expressed in the basal parts of rice leaf sheaths. Amino Acids, 36, 1: 115-123
- Komatsu S., Yamamoto A., Nakamura T., Nouri M.Z., Nanjo Y., Nishizawa K., Furukawa K. 2011. Comprehensive analysis of mitochondria in roots and hypocotyls of soybean under flooding stress using proteomics and metabolomics techniques. Journal of Proteome Reasearch, 10, 9: 3993-4004
- Konopka-Postupolska D., Clark G., Goch G., Debski J., Floras K., Cantero A., Fijolek B., Roux S., Hennig J. 2009. The role of annexin 1 in drought stress in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 150: 1394-1410
- Kosová K., Vítámvás P., Prásil I.T., Renaut J. 2011. Plant proteome changes under abiotic stress- contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. Journal of Proteomics, 74: 1301-1322
- Kottapalli K.R., Rakwal R., Shibato J., Burow G., Tissue D., Burke J., Puppala N., Burow M., Payton P. 2009. Physiology and proteomics of the water-deficit stress

response in three contrasting peanut genotypes. Plant, Cell & Environment, 32: 380-407

- Kottapalli K.R., Zabet-Moghaddam M., Rowland D., Faircloth W., Mirzaei M., Haynes P.A., Payton P. 2013. Shotgun label-free quantitative proteomics of water-deficitstressed midmature peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed. Journal of Proteome Research, 12, 11: 5048-5057
- Kurepa J., Wang S., Li Y., Smalle J. 2009. Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. Plant Signaling & Behavior, 4: 924-927
- Kutoš T., Golob T., Kač M., Plestenjak A. 2003. Dietary fibre content of dry and processed beans. Food Chemistry, 80, 2: 231-235
- Kwon H.K., Yokoyama R., Nishitani K. 2005. A proteomic approach to apoplastic proteins involved in cell wall regeneration in protoplasts of *Arabidopsis* suspension-cultured cells. Plant and Cell Physiology, 46: 843-857
- Lamesch P., Berardini T.Z., Li D., Swarbreck D., Wilks C., Sasidharan R., Muller R., Dreher K., Alexander D.L., Garcia-Hernandez M., Karthikeyan A.S., Lee C.H., Nelson W.D., Ploetz L., Singh S., Wensel A., Huala E. 2012. The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. Nucleic Acids Research, 40, Database issue: D1202-D1210, doi: 10.1093/nar/gkr1090: 9 str.
- Larrainzar E., Wienkoop S., Scherling C., Kempa S., Ladrera R., Arrese-Igor C., Weckwerth W., González EM. 2009. Carbon metabolism and bacteroid functioning are involved in the regulation of nitrogen fixation in *Medicago truncatula* under drought and recovery. Molecular Plant-Microbe Interactions, 22: 1565-1576
- Larrainzar E., Wienkoop S., Weckwerth W., Ladrera R., Arrese-Igor C., González E. 2007. *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. Plant Physiology, 144: 1495-1507
- Lee D.G., Ahsan N., Lee S.H., Lee J.J., Bahk J.D., Kang K.Y., Lee B.H. 2009. Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots. Journal of Plant Physiology, 166, 1: 1-11
- Lee J., Feng J., Campbell K.B., Scheffler B.E., Garrett W.M., Thibivilliers S., Stacey G., Naiman D.Q., Tucker M.L., Pastor-Corrales M.A., Cooper B. 2009. Quantitative proteomic analysis of bean plants infected by a virulent and avirulent obligate rust fungus. Molecular & Cellular Proteomics, 8, 1: 19-31
- Lehtimäki N., Lintala M., Allahverdiyeva Y., Aro E-M., Mulo P. 2010. Drought stressinduced upregulation of components involved in ferredoxin-dependent cyclic electron transfer. Journal of Plant Physiology, 167: 1018-1022

- Lei Z., Dai X., Watson B.S., Zhao P.X., Sumner L.W. 2011. A legume specific protein database (LegProt) improves the number of identified peptides, confidence scores and overall protein identification success rates for legume proteomics. Phytochemistry, 72, 10: 1020-1027
- Lei Z., Nagaraj S., Watson B., Summer L. 2007. Proteomics of *Medicago truncatula*. V: Plant proteomics. Šamaj J., Thelen J. (eds.). Berlin, Springer: 121-136
- Li X.J., Yang M.F., Chen H., Qu L.Q., Chen F., Shen S.H. 2010. Abscisic acid pretreatment enhances salt tolerance of rice seedlings: proteomic evidence. Biochimica et Biophysica Acta, 1804, 4: 929-940
- Lichtenthaler H.K. 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50: 47-65
- Lin L-Z., Harnly J.M., Pastor-Corrales M.S., Luthria D.L. 2008. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Food Chemistry, 107, 1: 399-410
- Liu Q., Zhang Y., Chen S. 2000. Plant protein kinase genes induced by drought, high salt and cold stresses. Chinese Science Bulletin, 45, 13: 1153-1157
- Lizana C., Wentworth M., Martinez J.P., Villegas D., Meneses R., Murchie E.H., Pastenes C., Lercari B., Vernieri P., Horton P., Pinto M. 2006. Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress. Journal of Experimental Botany, 57, 3: 685-697
- Loyola J., Verdugo I., González E., Casaretto J.A., Ruiz-Lara S. 2012. Plastidic isoprenoid biosynthesis in tomato: physiological and molecular analysis in genotypes resistant and sensitive to drought stress. Plant Biology, 14: 149-156
- Luo S., Ishida H., Makino A., Mae T. 2002. Fe<sup>2+</sup>-catalyzed site-specific cleavage of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase close to the active site. The Journal of Biological Chemistry, 277: 12382-12387
- Maere S., Heymans K., Kuiper M. 2005. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. Bioinformatics, 21, 16: 3448-3449
- Maeshima M. 2000. Vacuolar H(+)-pyrophosphatase. Biochimica et Biophysica Acta, 1465: 37-51
- Mahajan S., Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. Archives of Biochemistry and Biophysics, 444, 2: 139-158

- Mann M., Jensen O.N. 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. Nature Biotechnology, 21, 3: 255-261
- Maras M., Sušnik Bajec S., Šuštar-Vozlič J., Meglič V. 2006. Temporal changes in genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions cultivated between 1800 and 2000. Russian Journal of Genetics, 42, 7: 775-782
- Maras M. 2007. Karakterizacija slovenskih genskih virov navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) z morfološkimi, biokemijskimi in molekulskimi markerji. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 134 str.
- Maras M., Šuštar-Vozlič J., Javornik B., Meglič V. 2008. The efficiency of AFLP and SSR markers in genetic diversity estimation and gene pool classification of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Acta agriculturae Slovenica, 91, 1: 87-96
- Maras M., Šuštar-Vozlič J., Kainz W., Meglič V. 2013. Genetic diversity and dissemination pathways of common bean in Central Europe. Journal of the American Society for Horticultural Science, 138, 4: 297-305
- Marsolais F., Pajak A., Yin F., Taylor M., Gabriel M., Merino DM., Ma V., Kameka A., Vijayan P., Pham H., Huang S., Rivoal J., Bett K., Hernández-Sebastià C., Liu Q., Bertrand A., Chapman R. 2010. Proteomic analysis of common bean seed with storage protein deficiency reveals up-regulation of sulfur-rich proteins and starch and raffinose metabolic enzymes, and down-regulation of the secretory pathway. Journal of Proteomics, 73, 8: 1587-1600
- Mensack M.M., Fitzgerald V.K., Ryan E.P., Lewis M.R., Thompson H.J., Brick M.A. 2010. Evaluation of diversity among common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from two centers of domestication using 'omics' technologies. BMC Genomics, 11: 686, doi: 10.1186/1471-2164-11-686: 11 str.
- Micheletto S., Rodriguez-Uribe L., Hernandez R., Richins R.D., Curry J., O'Connell M.A. 2007. Comparative transcript profiling in roots of *Phaseolus acutifolius* and *P. vulgaris* under water deficit stress. Plant Science, 173: 510-520
- Miklas P.N., Kelly J.D., Beebe S.E., Blair M.W. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. Euphytica, 47: 105-131
- Mitulovic G., Mechtler K. 2006. HPLC techniques for proteomics analysis- a short overview of latest developments. Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 5, 4: 249-260

- Mohammadi P.P., Moieni A., Hiraga S., Komatsu S. 2012. Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. Journal of Proteomics, 75, 6: 1906-1923
- Moon H., Lee B., Choi G., Shin D., Prasad D.T., Lee O., Kwak S-S., Kim D.H., Nam J., Bahk J., Hong J.C., Lee S.Y., Cho M.J., Lim C.O., Yun D-J. 2003. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100: 358-363
- Moore J.P., Vicré-Gibouin M., Farrant J.M., Driouich A. 2008. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. Physiologia Plantarum, 134, 2: 237-245
- Müller B.S.D., Sakamoto T., Silveira R.D.D., Zambussi-Carvalho P.F., Pereira M., Pappas G.J., Costa M.M.D., Guimaraes C.M., Pereira W.J., Brondani C., Vianello-Brondani R.P. 2014. Differentially expressed genes during flowering and grain filling in common bean (*Phaseolus vulgaris*) grown under drought stress conditions. Plant Molecular Biology Reporter, 32, 2: 438-451
- Navrot N., Finnie C., Svensson B., Hägglund P. 2011. Plant redox proteomics. Journal of Proteomics, 74: 1450-1462
- Ndimba B.K., Chivasa S., Simon W.J., Slabas A.R. 2005. Identification of *Arabidopsis* salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. Proteomics, 5, 16: 4185-4196
- Nesvizhskii A., Vitek O., Aebersold R. 2007. Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. Nature Methods, 4: 787-797
- Ngara R., Ndimba R., Borch-Jensen J., Jensen O.N., Ndimba B. 2012. Identification and profiling of salinity stress-responsive proteins in *Sorghum bicolor* seedlings. Journal of Proteomics, 75, 13: 4139-4150
- Nohzadeh Malakshah S., Habibi Rezaei M., Heidari M., Salekdeh G.H. 2007. Proteomics reveals new salt responsive proteins associated with rice plasma membrane. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 71: 2144-2154
- Nouri MZ., Komatsu S. 2010. Comparative analysis of soybean plasma membrane proteins under osmotic stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. Proteomics, 10, 10: 1930-1945
- Pandey A., Chakraborty S., Datta A., Chakraborty N. 2008. Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.). Molecular & Cellular Proteomics, 7: 88-107

- Parry M.A., Keys A.J., Madgwick P.J., Carmo-Silva A.E., Andralojc P.J. 2008. Rubisco regulation: a role for inhibitors. Journal of Experimental Botany, 59, 7: 1569-1580
- Pattison R.J., Amtmann A. 2009. N-glycan production in the endoplasmic reticulum of plants. Trends in Plant Science, 14, 2: 92-99
- Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M., Cottrell J.S. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis, 20, 18: 3551-3567
- Petersen T.N., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nature Methods, 8, 10: 785-786
- Picault N., Palmieri L., Pisano I., Hodges M., Palmieri F. 2002. Identification of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution. The Journal of Biological Chemistry, 227, 27: 24204-24211
- Porta H., Rueda-Benítez P., Campos F., Colmenero-Flores J.M., Colorado J.M., Carmona M.J., Covarrubias A.A., Rocha-Sosa M. 1999. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. Plant and Cell Physiology, 40, 8: 850-858
- Qin J., Gu F., Liu D., Yin C., Zhao S., Chen H., Zhang J., Yang C., Zhan X., Zhang M. 2013. Proteomic analysis of elite soybean Jidou17 and its parents using iTRAQbased quantitative approaches. Proteome Science, 11, 1: 12, doi: 10.1186/1477-5956-11-12: 11 str.
- Ramachandra Reddy A., Chaitanya K.V., Vivekanandan M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology, 161: 1189-1202
- Recchia G.H., Caldas D.G., Beraldo A.L., da Silva M.J., Tsai S.M. 2013. Transcriptional analysis of drought-induced genes in the roots of a tolerant genotype of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). International Journal of Molecular Sciences, 14, 4: 7155-7179, doi: 10.3390/ijms14047155: 25 str.
- Reinders J., Sickmann A. 2007. Modificomics: posttranslational modifications beyond protein phosphorylation and glycosylation. Biomolecular Engineering, 24, 2: 169-177
- Rejón J.D., Delalande F., Schaeffer-Reiss C., Carapito C., Zienkiewicz K., de Dios Alché J., Rodríguez-García M.I., Van Dorsselaer A., Castro A.J. 2013. Proteomics profiling reveals novel proteins and functions of the plant stigma exudate. Journal of Experimental Botany, 64, 18: 5695-5705

- Remmerie N., De Vijlder T., Laukens K., Dang T.H., Lemière F., Mertens I., Valkenborg D., Blust R., Witters E. 2011. Next generation functional proteomics in non-model plants: A survey on techniques and applications for the analysis of protein complexes and post-translational modifications. Phytochemistry, 72, 10: 1192-1218
- Rodríguez M., Canales E., Borrás-Hidalgo O. 2005. Molecular aspects of abiotic stress in plants. Biotechnologia Aplicada, 22, 1: 1-10
- Rodriguez-Uribe L., O'Connell M.A. 2006. A root-specific bZIP transcription factor is responsive to water deficit stress in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*P. vulgaris*). Journal of Experimental Botany, 57: 1391-1398
- Ruiz-May E., Hucko S., Howe K.J., Zhang S., Sherwood R.W., Thannhauser T.W., Rose J.K. 2014. A comparative study of lectin affinity based plant N-glycoproteome profiling using tomato fruit as a model. Molecular & Cellular Proteomics, 13, 2: 566-579
- Salekdeh G.H., Siopongco J., Wade L.J. Ghareyazie B., Bennett J. 2002a. A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responiveness in rice. Field Crops Research, 76: 199-219
- Salekdeh G.H., Siopongco J., Wade L.J., Ghareyazie B., Bennett J. 2002b. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. Proteomics, 2: 1131-1145
- Sánchez R., Flores A., Cejudo F.J. 2006. *Arabidopsis* phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. Planta, 223, 5: 901-909
- Schenk G., Mitić N., Hanson G.R., Comba P. 2013. Purple acid phosphatase: a journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. Coordination Chemistry Reviews, 257, 2: 473-482
- Scigelova M., Makarov A. 2006. Orbitrap mass analyzer-overview and applications in proteomics. Proteomics, 2: 16-21
- Sengupta D., Kannan M., Reddy AR. 2011. A root proteomics-based insight reveals dynamic regulation of root proteins under progressive drought stress and recovery in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Planta, 233, 6: 1111-1127
- Sengupta D., Reddy AR. 2011. Water deficit as a regulatory switch for legume root responses. Plant Signaling & Behavior, 6, 6: 914-917

- Shahriari M., Keshavaiah C., Scheuring D., Sabovljevic A., Pimpl P., Häusler R.E., Hülskamp M., Schellmann S. 2010. The AAA-type ATPase AtSKD1 contributes to vacuolar maintenance of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 64, 1: 71-85
- Sharma A.D., Singh P. 2003. Comparative studies on drought-induced changes in peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity in drought-tolerant and susceptible cultivars of *Sorghum bicolor*. Current Science, 87: 911-918
- Sheoran I.S., Koonjul P., Attieh J., Saini H.S. 2014. Water-stress-induced inhibition of  $\alpha$ -tubulin gene expression during growth, and its implications for reproductive success in rice. Plant Physiology and Biochemistry, 80: 291-299
- Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. 2007. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nature Protocols, 1: 2856-2860
- Shigeta T., Yasuda D., Mori T., Yoshimitsu Y., Nakamura Y., Yoshida S., Asami T., Okamoto S., Matsuo T. 2011. Characterization of brassinosteroid-regulated proteins in a nuclear-enriched fraction of *Arabidopsis* suspension-cultured cells. Plant Physiology and Biochemistry, 49, 9: 985-995
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. Journal of Experimental Botany, 58, 2: 221-227
- Sobhanian H., Razavizadeh R., Nanjo Y., Ehsanpour A.A., Jazii F.R., Motamed N., Komatsu S. 2010. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. Proteome Science, 8: 19, doi: 10.1186/1477-5956-8-19: 15 str.
- Song W., Henquet M.G., Mentink R.A., van Dijk A.J., Cordewener J.H., Bosch D., America A.H., van der Krol A.R. 2011. N-glycoproteomics in plants: perspectives and challenges. Journal of Proteomics, 74, 8: 1463-1474
- Song Y., Zhang C., Ge W., Zhang Y., Burlingame A.L., Guo Y. 2011. Identification of NaCl stress-responsive apoplastic proteins in rice shoot stems by 2D-DIGE. Journal of Proteomics, 74, 7: 1045-1067
- Staneloni R.J., Rodriguez-Batiller M.J., Casal J.J. 2008. Abscisic acid, high-light, and oxidative stress downregulate a photosynthetic gene via a promoter motif not involved in phytochrome-mediated transcriptional regulation. Molecular Plant, 1: 75-83
- Subbaiah C.C., Huber S.C., Sachs M.M., Rhoads D. 2007. Sucrose synthase: expanding protein function. Plant Signaling & Behavior, 2, 1: 28-29

- Swanson S.K., Washburn M.P. 2005. The continuing evolution of shotgun proteomics. Drug Discovery Today, 10, 10: 719-725
- Szklarczyk D., Franceschini A., Kuhn M., Simonovic M., Roth A., Minguez P., Doerks T., Stark M., Muller J., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. 2011. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. Nucleic Acids Research, 39, Database issue: D561-D568, doi: 10.1093/nar/gkq973: 8 str.
- Šuštar-Vozlič J., Maras M., Javornik B., Meglič V. 2006. Genetic diversity and origin of Slovene common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm as revealed by AFLP markers and phaseolin analysis. Journal of the American Society for Horticultural Science, 131, 2: 242-249
- Šuštar-Vozlič J., Maras M., Munda A., Zadražnik T., Meglič V. 2012. Raznolikost fižola v zbirki Kmetijskega inštituta Slovenije. Acta agriculturae Slovenica, 99, 3: 399-411
- Šuštar-Vozlič J., Maras M., Zadražnik T., Kidrič M., Razinger J., Kozjak P., Meglič V. 2013. Raziskave sušnega stresa pri navadnem fižolu (*Phaseolus vulgaris* L.). V: Novi izzivi v agronomiji 2013: zbornik simpozija. Čeh B., Dolničar P., Mihelič R. (ur.). Zreče, Slovensko agronomsko društvo: 86-92
- TAIR10. 2012. Stanford, Carnegie Institution for Sciences http://www.arabidopsis.org/ (januar 2012)
- Tezara W., Mitchell V.J., Driscoll S.D., Lawlor D.W. 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. Nature, 401: 914-917
- Tharanathan R.N., Mahadevamma, S. 2003. Grain legumes-a boon to human nutrition. Trends in Food Science & Technology, 14: 507-518
- Thornalley P.J. 1990. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. Biochemical Journal, 269, 1: 1-11
- Tissot B., North S.J., Ceroni A., Pang P.C., Panico M., Rosati F., Capone A., Haslam S.M., Dell A., Morris HR. 2009. Glycoproteomics: past, present and future. FEBS Letters, 583, 11: 1728-1735
- Torres G.A., Lelandais-Brière C., Besin E., Jubier M.F., Roche O., Mazubert C., Corre-Menguy F., Hartmann C. 2003. Characterization of the expression of *Phaseolus vulgaris* OCT1, a dehydration-regulated gene that encodes a new type of phloem transporter. Plant Molecular Biology, 51, 3: 341-349

- Torres G.A.M., Pflieger S., Corre-Menguy F., Mazubert C., Hartmann C., Lelandais-Brière C. 2006. Identification of novel drought-related mRNAs in common bean roots by differential display RT-PCR. Plant Science, 171: 300–307
- Tripp B.C., Smith K., Ferry J.G. 2001. Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. The Journal of Biological Chemistry, 276: 48615–48618
- Vaseva I., Akiscan Y., Demirevska K., Anders I., Feller U. 2011. Drought stress tolerance of red and white clover–comparative analysis of some chaperonins and dehydrins. Scientia Horticulturae, 130: 653–659
- Vashisht A.A., Tuteja N. 2006. Stress responsive DEAD-box helicases: a new pathway to engineer plant stress tolerance. Journal of Photochemistry and Photobiology B, 84, 2: 150-160
- Vincent D., Lapierre C., Pollet B., Cornic G., Negroni L., Zivy M. 2005. Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. Plant Physiology, 137: 949-960
- Vuong T.V., Wilson D.B. 2010. Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity. Biotechnology and Bioengineering, 107, 2: 195-205
- Wang Q., Yi Q., Hu Q., Zhao Y., Nian H., Li K., Yu Y., Izui K., Chen L. 2012. Simultaneous overexpression of citrate synthase and phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves augments citrate exclusion and Al resistance in transgenic tobacco. Plant Molecular Biology Reporter, 30: 992-1005
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends in Plant Science, 9: 244-252
- Watson B.S., Asirvatham V.S., Wang L., Summer L.W. 2003. Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). Plant Physiology, 131: 1104-1123
- Weckwerth W. 2008. Integration of metabolomics and proteomics in molecular plant physiology-coping with the complexity by data-dimensionality reduction. Physiologia Plantarum, 132, 2: 176-189
- Weigelt K., Küster H., Rutten T., Fait A., Fernie A.R., Miersch O., Wasternack C., Emery R.J., Desel C., Hosein F., Müller M., Saalbach I., Weber H. 2009. ADPglucose pyrophosphorylase-deficient pea embryos reveal specific transcriptional and metabolic changes of carbon-nitrogen metabolism and stress responses. Plant Physiology, 149, 1: 395-411

- West I., Goldring O. 2004. Lectin affinity chromatography. V: Methods in Molecular Biology. Protein purification protocols. Cutler P. (ed.). 2<sup>nd</sup> ed. Totowa, Humana Press: 159-166
- Wilkinson B., Gilbert H.F. 2004. Protein disulfide isomerase. Biochimica et Biophysica Acta, 1699: 35-44
- Woronuk G., Vijayan P., Laberge S., Vandenberg B., Bett K. 2010. Transcriptomic analysis of chilling stress in *Phaseolus* spp. Environmental and Experimental Botany, 69: 95-104
- Xu Y.H., Liu R., Yan L., Liu Z.Q., Jiang S.C., Shen Y.Y., Wang X.F., Zhang D.P. 2011. Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany, 63: 1095-1106
- Yamada S., Komori T., Hashimoto A., Kuwata S., Imaseki H., Kubo T. 2000. Differential expression of plastidic aldolase genes in *Nicotiana* plants under salt stress. Plant Science, 54: 61–69
- Yamaguchi M., Valliyodan B., Zhang J., Lenoble M., Yu O., Rogers E., Nguyen H., Sharp R. 2010. Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolismand control of free iron in the elongation zone. Plant, Cell and Environment, 33: 223–243
- Yang E.J., Oh Y.A., Lee E.S., Park A.R., Cho S.K., Yoo Y.J., Park O.K. 2003. Oxygenevolving enhancer protein 2 is phosphorylated by glycine-rich protein 3/wallassociated kinase 1 in *Arabidopsis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 305: 862–868
- Yates J.R. 2000. Mass spectrometry: from genomics to proteomics. Trends in Genetics, 16, 1: 5-8
- Yi X., McChargue M., Laborde S., Frankel L.K., Bricker T.M. 2005. The manganesestabilizing protein is required for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy in higher plants. The Journal of Biological Chemistry, 280: 16170– 16174
- Zaia J. 2008. Mass spectrometry and the emerging field of glycomics. Chemistry & Biology, 15, 9: 881-892
- Zang X., Komatsu S. 2007. A proteomics approach for identifying osmotic-stressrelated proteins in rice. Phytochemistry, 68: 426-437

- Zhang D., Ye F., Gao L., Liu X., Zhao X., Che Y., Wang H., Wang L., Wu J., Song D., Liu W., Xu H., Jiang B., Zhang W., Wang J., Lee P. 2009. Proteomics, pathway array and signaling network-based medicine in cancer. Cell Division, 4, 1: 20, doi: 10.1186/1747-1028-4-20: 16 str.
- Zhao Q., Zhang H., Wang T., Chen S., Dai S. 2013. Proteomics-based investigation of salt-responsive mechanisms in plant roots. Journal of Proteomics, 82: 230-253
- Zhu W., Smith J.W., Huang C.M. 2010. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010: 840518, doi: 10.1155/2010/840518: 6 str.
- Zörb C., Schmitt S., Mühling K.H. 2010. Proteomic changes in maize roots after shortterm adjustment to saline growth conditions. Proteomics, 10: 4441-4449

# ZAHVALA

Zahvaljujem se dr. Tatjani Kavar, ker me je sprejela za mlado raziskovalko ter me usmerjala ob prihodu na inštitut.

Zahvaljujem se mentorici dr. Jelki Šuštar-Vozlič za pomoč pri pridobitvi štipendije za delo na Norveškem ter za pregled doktorske disertacije, podporo in razumevanje. Vsem članom komisije se zahvaljujem za pregled naloge in koristne predloge.

Najlepše se zahvaljujem dr. Kristin Hollung iz inštituta Nofima ter dr. Wolfgang Egge-Jacobsenu iz Univerze v Oslu, ker sta mi zaupala in mi omogočila samostojno delo v laboratorijih. Hvala za številne nasvete in znanje ki sta mi ga posredovala ter mi vedno znala pomagati, ko ni šlo vse po načrtih. Zahvaljujem se tudi Andersu Moenu za pomoč pri masni spektrometriji.

Posebna zahvala gre dr. Katarini Rudolf-Pilih, ker me je navdušila za odhod na Norveško in mi pomagala pri organizaciji potovanja. Hvala za podporo, bodrenje ter koristne nasvete glede bivanja in dela na Norveškem. Posebej se zahvaljujem poleg Katarine tudi Beti Komatar in Meliti Štrukelj za vse prijetne pogovore in dobro družbo. Hvala tudi sodelavkam, s katerimi sem si delila pisarno in ostalim sodelavcem z našega oddelka za prijetno vzdušje.

Hvala dr. Marjetki Kidrič za skrben pregled naloge in koristne nasvete. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastajanju tega dela.

Na koncu se zahvaljujem še svojim domačim – staršem in Marjanu za vso pomoč, podporo in potrpežljivost ter malemu Nejcu, ki vedno poskrbi za dvig razpoloženja.

# PRILOGI A

Homologni proteini identificiranih proteinov z uporabo TAIR10 (2012) proteinske baze

# PRILOGA A1

Homologni proteini identificiranih proteinov v listih za kultivar Starozagorski z uporabo TAIR10 (2012) proteinske baze

Št.lise	NCBI številka identificiranega proteina	TAIR številka homolognega proteina	Homologni protein		E-vrednost
98	gi 356576867	AT2G45290	transketolaza	80	0,0
101	gi 356576867	AT2G45290	transketolaza	80	0,0
102	gi 356576867	AT2G45290	transketolaza	80	0,0
105	gi 356576867	AT2G45290	transketolaza	80	0,0
157	gi 258618634	AT3G48560	klorsulfuron/imidazolinin odporen 1	76	0,0
162	gi 139387459	ATCG00120	ATP sintaza, podenota alfa	91	0,0
164	gi 139387459	ATCG00120	ATP sintaza, podenota alfa	91	0,0
171	gi 323149044	AT2G07698	ATPaza, F1 kompleks, podenota alfa	92	0,0
267	gi 5002342	AT5G06730	peroksidaza	59	e-109
279	gi 329402648	AT5G62790	1-deoksi-D-ksiluloza 5-fosfat reduktoizomeraza	71	0,0
302	gi 10720248	AT2G39730	Rubisco aktivaza	75	0,0
320	gi 10720248	AT2G39730	Rubisco aktivaza	75	0,0
321	gi 10720248	AT2G39730	Rubisco aktivaza	75	0,0
324	gi 255640955	AT5G43940	GroES cink-vezavna dehidrogenaza	88	0,0
325	gi 10720248	AT2G39730	Rubisco aktivaza	75	0,0
327	gi 270342112	AT5G14780	format dehidrogenaza	81	e-166
339	gi 1168408	AT4G26530	aldolaza	86	e-171
343	gi 121345	AT1G66200	glutamin sintaza, klon F11	83	e-171
347	gi 356500825	AT2G36460	aldolaza	85	0,0
357	gi 120666	AT3G04120	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza C, podenota 1	86	e-168
373	gi 356538694	AT4G38970	fruktoza-bisfosfat aldolaza 2	85	0,0
381	gi 4827251	AT4G38970	fruktoza-bisfosfat aldolaza 2	85	0,0
385	gi 217072508	AT4G35250	NAD(P)-vezavni protein iz družine Rossmann	92	e-178
390	gi 356572914	AT1G09340	kloroplast RNA vezavni protein	83	0,0
394	gi 356573072	AT3G04940	cistein sintaza D1	71	e-105
396	gi 356567630	AT1G23740	oksidoreduktaza, cink-vezavna dehidroganazna družina proteinov	72	e-121

# Zadražnik T. Proteomska analiza ... pri izbranih kultivarjih navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.). Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2014

se nadaljuje

Zadražnik T. Proteomska analiza	pri izbranih	kultivarjih navadr	nega fižola (	Phaseolus	vulgaris L.).
Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ	. v Ljubljani,	Biotehniška faku	lteta, 2014		

nadaljevanje					
Št.lise	NCBI številka identificiranega proteina	TAIR številka homolognega proteina	Homologni protein	Podobnost	E-vrednost
400	gi 356567630	AT1G23740	oksidoreduktaza, cink-vezavna dehidroganazna družina proteinov	72	e-121
438	gi 141448056	AT5G66190	feredoksin-NADP(+)-oksidoreduktaza 1	81	e-164
442	gi 356540771	AT5G66530	galaktoza mutarotaza	74	e-120
448	gi 356556839	AT5G12380	aneksin 8	56	e-102
464	gi 356559442	AT3G50820	fotosistem II, podenota O-2	75	e-132
465	gi 356559442	AT3G50820	fotosistem II, podenota O-2	75	e-132
495	gi 71534880	AT3G10850	metalo-hidrolaza/oksidoreduktaza	78	1.00E-79
497	gi 2511691	AT4G39090	cistein proteaza iz družine papaina	74	e-155
499	gi 2511691	AT4G39090	cistein proteaza iz družine papaina	74	e-155
449	gi 255637721	AT1G11840	homolog glioksalaze I	77	e-131
521	gi 6358640	AT3G50980	dehidrin ksero 1	77	0.025
545	gi 356525754	AT1G16470	proteasomska podenota PAB1	94	e-120
546	gi 57283985	AT3G55440	triozafosfat izomeraza	73	e-100
557	gi 270342124	AT3G01500	karbonska anhidraza 1	71	e-116
573	gi 356562858	AT5G61410	D-ribuloza-5-fosfat-3-epimeraza	88	e-135
580	gi 255635846	AT1G06680	fotosistem II, podenota P-1	73	e-110
602	gi 21217741	AT2G30860	glutation S-transferaza PHI 9	63	2.00E-76
612	gi 351721274	AT4G31300	N-terminalna nukleofil aminohidrolaza (Ntn hidrolaza)	84	e-114
623	gi 217071344	AT3G54890	fotosistem I, svetlobni kompleks, gen 1	88	e-102
626	gi 27526758	AT3G10920	mangan superoksid dismutaza 1	81	7.00E-61
634	gi 255636441	AT1G11750	CLP proteaza, proteolitična podenota 6	67	e-101
669	gi 255628349	AT1G63970	izoprenoid F	78	4.00E-84
694	gi 351722815	AT3G06050	peroksiredoksin IIF	76	1.00E-79
711	gi 46359893	AT5G13120	ciklofilin 20-2	79	9.00E-82
737	gi 154293473	AT3G46230	protein vročinskega šoka 17.4	57	7.00E-35

se nadaljuje

nadaljevanje						
Št.lise	NCBI številka identificiranega proteina	TAIR številka homolognega proteina	Homologni protein	Podobnost	E-vrednost	
746	gi 351724985	AT1G65980	tioredoksin-odvisna peroksidaza 1	77	3.00E-74	
756	gi 351727066	AT1G70890	MLP-podoben protein 43	39	7.00E-21	
759	gi 255630026	AT1G70890	MLP-podoben protein 43	39	7.00E-21	
781	gi 351721369	AT2G32060	ribosomski protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45	75	2.00E-50	
804	gi 1346672	AT4G09320	nukleozid difosfat kinaza	84	2.00E-72	
805	gi 16396	AT4G09320	nukleozid difosfat kinaza	100	3.00E-83	
836	gi 351725393	AT3G15360	tioredoksin M-tip 4	68	1.00E-45	
851	gi 21050	AT5G38430	ribuloza bisfosfat karboksilaza, mala enota	72	1.00E-76	
875	gi 2765081	AT1G09340	kloroplast RNA vezavni protein	97	0,0	
877	gi 356567470	AT1G06680	fotosistem II, podenota P-1	74	e-110	
885	gi 5929964	AT1G53240	laktat/malat dehidrogenaza	74	e-146	
890	gi 356567470	AT1G06680	fotosistem II, podenota P-1	74	e-110	
919	gi 10720248	AT2G39730	Rubisco aktivaza	75	0,0	

Zadražnik T. Proteomska analiza ... pri izbranih kultivarjih navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.). Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2014

# PRILOGA A2

Homologni proteini identificiranih proteinov v listih za kultivar Tiber z uporabo TAIR10 (2012) proteinske baze
Št.lise	NCBI številka identificiranega proteina	TAIR številka homolognega proteina	Homologni protein	Podobnost	E-vrednost
136	gi 356576867	AT2G45290	transketolaza	80	0,0
141	gi 356536526	AT2G45290	transketolaza		0,0
161	gi 156616913	AT1G78900	vakuolna ATP sintaza, podenota A		0,0
187	gi 356525839	AT3G13470	TCP-1/cpn 60 šaperonin	90	0,0
230	gi 139387459	ATCG00120	ATP sintaza, podenota alfa	91	0,0
231	gi 139387459	ATCG00120	ATP sintaza, podenota alfa	91	0,0
350	gi 290766483	AT2G39730	Rubisco aktivaza	79	0,0
404	gi 270342112	AT5G14780	format dehidrogenaza	81	e-166
413	gi 10720248	AT2G39730	Rubisco aktivaza	75	0,0
419	gi 10720248	AT2G39730	Rubisco aktivaza	75	0,0
431	gi 255646270	AT1G32060	fosforibulokinaza	82	0,0
458	gi 356500825	AT2G36460	aldolazni protein	85	0,0
473	gi 121345	AT1G66200	glutamin sintaza, klon F11	83	e-171
506	gi 10720248	AT2G39730	Rubisco aktivaza	75	0,0
523	gi 52851186	AT5G43330	laktat/malat dehidrogenaza	89	e-174
536	gi 5929964	AT1G53240	laktat/malat dehidrogenaza	74	e-146
619	gi 15226167	AT2G33800	ribosomski protein S5	63	7E-80
644	gi 195619530	AT3G50820	fotosistem II, podenota O-2	77	e-150
645	gi 356559442	AT3G50820	fotosistem II, podenota O-2	75	e-132
647	gi 131385	AT5G66570	PSII, protein 1 vključen v oksidacijo vode	78	e-139
672	gi 113208365	AT4G39090	cistein proteaza iz družine papaina	74	e-154
673	gi 351727317	AT3G10850	metalo-hidrolaza/oksidoreduktaza	74	e-112
679	gi 2511691	AT4G39090	cistein proteaza iz družine papaina	74	e-155
700	gi 356567949	AT2G37660	NAD(P)-vezavni protein iz družine Rossmann	81	e-124
707	gi 356567949	AT2G37660	NAD(P)-vezavni protein iz družine Rossmann	81	e-124
714	gi 270342124	AT3G01500	karbonska anhidraza 1	71	e-116

nadaljev	nadaljevanje				
Št.lise	NCBI številka identificiranega proteina	TAIR številka homolognega proteina	Homologni protein	Podobnost	E-vrednost
725	gi 57283985	AT3G55440	triozafosfat izomeraza	73	e-100
730	gi 1420938	AT1G07890	askorbat peroksidaza 1	68	e-101
749	gi 255576721	AT2G21170	triozafosfat izomeraza	80	e-143
753	gi 1420938	AT1G07890	askorbat peroksidaza 1	askorbat peroksidaza 1 68 e-1	
763	gi 270342124	AT3G01500	karbonska anhidraza 1	71	e-116
767	gi 270342124	AT3G01500	karbonska anhidraza 1	71	e-116
774	gi 356511994	AT5G61410	D-ribuloza-5-fosfat-3-epimeraza	88	e-136
779	gi 255640167	AT1G61520	fotosistem I, svetlobni kompleks, gen 3	70	4E-96
784	gi 270342124	AT3G01500	karbonska anhidraza 1	71	e-116
793	gi 270342124	AT3G01500	karbonska anhidraza 1	71	e-116
794	gi 255635846	AT1G06680	fotosistem II, podenota P-1	73	e-110
800	gi 356547960	AT5G20720	šaperonin 20	67	2E-90
804	gi 357494079	AT1G06680	fotosistem II, podenota P-1	75	3E-94
809	gi 255627415	AT1G75270	dehidroaskorbat reduktaza 2	77	7E-93
812	gi 131390	AT1G06680	fotosistem II, podenota P-1	72	e-108
815	gi 357466571	AT4G31300	N-terminalna nukleofil aminohidrolaza (Ntn hidrolaza)	85	e-113
820	gi 27526758	AT3G10920	mangan superoksid dismutaza 1	81	7.00E-61
831	gi 147787657	AT3G63540	Mog1/PsbP/DUF1795-fotosistem II, reakcijski center PsbP	76	4E-60
832	gi 115764	AT3G54890	fotosistem I, svetlobni kompleks, gen 1	85	e-112
867	gi 357511613	AT5G13120	ciklofilin 20-2	57	9E-63
888	gi 351722815	AT3G06050	peroksiredoksin IIF	76	1.00E-79
892	gi 357511613	AT5G13120	ciklofilin 20-2	57	1.00E-62
959	gi 115187464	AT1G65980	tioredoksin-odvisna peroksidaza 1	76	3.00E-71
1058	gi 351721369	AT2G32060	ribosomski protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45	75	2.00E-50
1098	gi 16396	AT4G09320	nukleozid difosfat kinaza	100	3.00E-83

Zadražnik T. Proteomska analiza	pri izbranih kultivarjih	navadnega fižola ( <i>Phaseolus vulgo</i>	aris L.).
Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ.	v Ljubljani, Biotehniš	ka fakulteta, 2014	

nadaljev	vanje				
Št.lise	NCBI številka identificiranega proteina	TAIR številka homolognega proteina	Homologni protein	Podobnost	E-vrednost
1184	gi 809069	AT1G67090	ribuloza bisfosfat karboksilaza, mala enota 1A	76	3E-63
1193	gi 351724891	AT2G36530	enolaza	87	0,0
1195	gi 4827251	AT4G38970	fruktoza-bisfosfat aldolaza 2	85	0,0
1197	gi 356559442	AT3G50820	fotosistem II, podenota O-2	75	e-132
1213	gi 4827251376	AT4G38970	fruktoza-bisfosfat aldolaza 2	85	0,0
1234	gi 255635896	AT1G23740	oksidoreduktaza, cink-vezavna dehidrogenazna družina proteinov	60	e-108
1235	gi 139387459	ATCG00120	ATP sintaza, podenota alfa	91	0,0

# PRILOGA B

Dodatni podatki o identificiranih proteinih v listih kultivarja Tiber in Starozagorski

Št. lise <sup>a</sup>	Identificirani proteini (vrsta)	NCBI številka	Vrednost <sup>b</sup>	% pokritosti <sup>c</sup>
	ATP pretvorba			
	Tiber			
1098	nukleozid difosfat kinaza [Arabidopsis thaliana]	gi 16396	117	9
1235	ATP sintaza CF1, alfa podenota [Phaseolus vulgaris]	gi 139387459	1406	42
230	ATP sintaza CF1, alfa podenota [Phaseolus vulgaris]	gi 139387459	1092	48
231	ATP sintaza CF1, alfa podenota [Phaseolus vulgaris]	gi 139387459	1150	45
161	V-H(+)-ATPaza, podenota A [Glycine max]	gi 156616913	933	32
	Starozagorski			
804	nukleozid difosfat kinaza 1 [Pisum sativum]	gi 1346672	150	11
805	nukleozid difosfat kinaza [Arabidopsis thaliana]	gi 16396	177	18
162	ATP sintaza CF1, alfa podenota [Phaseolus vulgaris]	gi 139387459	940	51
164	ATP sintaza CF1, alfa podenota [Phaseolus vulgaris]	gi 139387459	1247	43
171	ATPaza podenota 1 [Vigna radiata]	gi 323149044	836	33
	Sinteza proteinov			
	Tiber			
473	glutamin sintetaza PR-2 [Phaseolus vulgaris]	gi 121345	478	35
619	30S ribosomski protein S5 [Arabidopsis thaliana]	gi 15226167	172	11
	Starozagorski			
343	glutamin sintetaza PR-2 [Phaseolus vulgaris]	gi 121345	401	28
394	protein podoben cistein sintazi [Glycine max]	gi 356573072	605	37
157	acetohidroksikislinska sintaza [Phaseolus vulgaris]	gi 258618634	358	13
	Energijski metabolizem			
	Tiber			
523	malat dehidrogenaza [Plantago major]	gi 52851186	451	26
536	malat dehidrogenaza [Glycine max]	gi 5929964	240	15
749	domnevna triozafosfat izomeraza [Ricinus communis]	gi 255576721	258	16
725	triozafosfat izomeraza [Phaseolus vulgaris var. nanus]	gi 57283985	829	53
1195	plastidna aldolaza NPALDP1 [Nicotiana paniculata]	gi 4827251	692	20
1213	plastidna aldolaza NPALDP1 [Nicotiana paniculata]	gi 4827251	376	20
458	fruktoza-difosfat aldolaza, podobna citoplazmatskemu izoencimu [ <i>Glycine max</i> ]	gi 356500825	757	32
1193	enolaza [Glycine max]	gi 351724891	939	43
136	transketolaza, podobna kloroplastni [Glycine max]	gi 356576867	510	17
141	transketolaza, podobna kloroplastni [Glycine max]	gi 356536526	581	20

Št. lise <sup>a</sup>	Identificirani proteini (vrsta)	NCBI številka	Vrednost <sup>b</sup>	% pokritosti <sup>c</sup>
774	ribuloza-fosfat 3-epimeraza, podobna kloroplastni [ <i>Glycine max</i> ]	gi 356511994	267	25
	Starozagorski			
885	malat dehidrogenaza [Glycine max]	gi 5929964	368	19
546	triozafosfat izomeraza [Phaseolus vulgaris var. nanus]	gi 57283985	604	54
339	fruktoza-difosfat aldolaza, citoplazmatski izoencim 1 [Pisum sativum]	gi 1168408	532	18
373	fruktoza-difosfat aldolaza 2, podobna kloroplastni [ <i>Glycine max</i> ]	gi 356538694	738	25
381	plastidna aldolaza NPALDP1 [Nicotiana paniculata]	gi 4827251	568	21
347	fruktoza-difosfat aldolaza, podobna citoplazmatskemu izoencimu [ <i>Glycine max</i> ]	gi 356500825	377	19
357	citosolna gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza [Antirrhinum majus]	gi 120666	311	16
442	domnevna glukoza-6-fosfat 1-epimeraza [ <i>Glycine max</i> ]	gi 356540771	84	6
98	transketolaza, podobna kloroplastni [Glycine max]	gi 356576867	503	12
101	transketolaza, podobna kloroplastni [Glycine max]	gi 356576867	489	11
102	transketolaza, podobna kloroplastni [Glycine max]	gi 356576867	533	14
105	transketolaza, podobna kloroplastni [Glycine max]	gi 356576867	664	15
573	ribuloza-fosfat 3-epimeraza, podobna kloroplastni [ <i>Glycine max</i> ]	gi 356562858	315	28
	Fotosinteza	_		
	Tiber			
413	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	gi 10720248	1341	56
506	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	gi 10720248	376	19
1184	ribuloza difosfat karboksilaza [Phaseolus vulgaris]	gi 809069	388	45
419	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	gi 10720248	540	27
350	Rubisco aktivaza [Glycine max]	gi 290766483	725	29
187	vezavni protein na Rubisco veliko podenoto, kloroplastna beta podenota [ <i>Glycine max</i> ]	gi 356525839	1281	39
647	protein 1 vključen v oksidacijo vode [Solanum tuberosum]	gi 131385	339	17
812	protein 2 vključen v oksidacijo vode [Pisum sativum]	gi 131390	164	12
644	protein 1 vključen v oksidacijo vode [Zea mays]	gi 195619530	399	19
1197	protein 1 vključen v oksidacijo vode [Glycine max]	gi 356559442	141	11
645	protein 1 vključen v oksidacijo vode [Glycine max]	gi 356559442	416	25
804	protein vključen v oksidacijo vode [Medicago truncatula]	gi 357494079	268	15

Št. lise <sup>a</sup>	Identificirani proteini (vrsta)	NCBI številka	Vrednost <sup>b</sup>	% pokritosti <sup>c</sup>
832	kloroplastni klorofil a-b vezavni protein 6A [Solanum lycopersicum]	gi 115764	211	17
714	karbonska anhidraza [Phaseolus vulgaris]	gi 270342124	778	46
763	karbonska anhidraza [Phaseolus vulgaris]	gi 270342124	288	26
767	karbonska anhidraza [Phaseolus vulgaris]	gi 270342124	274	24
784	karbonska anhidraza [Phaseolus vulgaris]	gi 270342124	891	49
793	karbonska anhidraza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	gi 270342124	725	45
	Starozagorski			
464	protein 1 vključen v oksidacijo vode [Glycine max]	gi 356559442	799	43
465	protein 1 vključen v oksidacijo vode [Glycine max]	gi 356559442	851	46
877	protein 2 vključen v oksidacijo vode [Glycine max]	gi 356567470	313	20
890	protein 2 vključen v oksidacijo vode [Glycine max]	gi 356567470	374	20
557	karbonska anhidraza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	gi 270342124	215	16
438	kloroplastna feredoksin-NADP+ reduktaza [Pisum sativum]	gi 141448056	407	20
302	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	gi 10720248	1401	52
851	ribuloza difosfat karboksilaza [Phaseolus vulgaris]	gi 21050	213	28
919	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	gi 10720248	1390	54
325	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	gi 10720248	1441	55
320	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	gi 10720248	759	34
321	kloroplastna ribuloza difosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	gi 10720248	578	25
	Proteoliza in zvijanje proteinov			
	Tiber			
815	proteasomska beta podenota [Medicago truncatula]	gi 357466571	265	29
867	peptidil-prolil cis-trans izomeraza [Medicago truncatula]	gi 357511613	146	12
892	peptidil-prolil cis-trans izomeraza [Medicago truncatula]	gi 357511613	152	12
800	kloroplastni šaperonin, 20 kDa [Glycine max]	gi 356547960	221	19
679	prekurzor cisteinske proteinaze [Phaseolus vulgaris]	gi 2511691	152	12
672	cisteinska proteinaza CP2 [Phaseolus vulgaris]	gi 113208365	299	27
	Starozagorski			
545	alfa podenota proteasoma 2A [Glycine max]	gi 356525754	430	35
497	prekurzor cisteinske proteinaze [Phaseolus vulgaris]	gi 2511691	262	16
499	prekurzor cisteinske proteinaze [Phaseolus vulgaris]	gi 2511691	155	10
711	domnevna peptidilprolil izomeraza [ <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	gi 46359893	161	12

Št. lise <sup>a</sup>	Identificirani proteini (vrsta)	NCBI številka	<b>Vrednost</b> <sup>b</sup>	% pokritosti <sup>c</sup>
	Sekundarni metabolizem			
	Starozagorski			
279	1-deoksi-D-ksiluloza 5-fosfat reduktoizomeraza [ <i>Glycine max</i> ]	gi 329402648	615	23
	Signalna transdukcija			
	Starozagorski			
448	aneksinu podoben protein RJ4 [Glycine max]	gi 356556839	280	13
	Proteini povezani z ROS, obrambo in stresom			
	Tiber			
404	format dehidrogenaza [Phaseolus vulgaris]	gi 270342112	261	20
820	manganova superoksid dismutaza [Glycine max]	gi 27526758	130	18
730	citosolna askorbat peroksidaza [Vigna unguiculata]	gi 1420938	203	16
753	citosolna askorbat peroksidaza [Vigna unguiculata]	gi 1420938	655	42
959	tioredoksin [Arachis hypogaea]	gi 115187464	205	18
	Starozagorski			
626	manganova superoksid dismutaza [Glycine max]	gi 27526758	178	18
267	prekurzor peroksidaze 1 [Phaseolus vulgaris]	gi 5002342	421	19
737	mali protein vročinskega šoka, 17.7 kDa [Vigna unguiculata]	gi 154293473	237	39
327	format dehidrogenaza [Phaseolus vulgaris]	gi 270342112	878	67
521	dehidrin [Vigna unguiculata]	gi 6358640	121	16
602	domnevna glutation S-transferaza [ <i>Phaseolus acutifolius</i> ]	gi 21217741	195	23
495	hidroksiacilglutation hidrolaza [Medicago sativa]	gi 71534880	97	11
400	kloroplastna kinon oksidoreduktaza podobna At1g23740 [ <i>Glycine max</i> ]	gi 356567630	631	31
396	kloroplastna kinon oksidoreduktaza podobna At1g23740 [Glycine max]	gi 356567630	423	28
	Neopredeljeni proteini			
	Tiber			
431	neznan [ <i>Glycine max</i> ]	gi 255646270	407	28
794	neznan [ <i>Glycine max</i> ]	gi 255635846	148	17
779	neznan [Glycine max]	gi 255640167	177	32
809	neznan [ <i>Glycine max</i> ]	gi 255627415	120	12
831	hipotetični protein VITISV_028610 [Vitis vinifera]	gi 147787657	112	9
673	hipotetični protein LOC100527131 [Glycine max]	gi 351727317	144	12
700	domnevni nekarakteriziran kloroplastni protein, podoben At2g37660 [ <i>Glycine max</i> ]	gi 356567949	547	36
707	domnevni nekarakteriziran kloroplastni protein, podoben At2g37660 [ <i>Glycine max</i> ]	gi 356567949	450	34

Št. lise <sup>a</sup>	Identificirani proteini (vrsta)	NCBI številka	Vrednost <sup>b</sup>	% pokritosti <sup>c</sup>
888	hipotetični protein LOC100500096 [Glycine max]	gi 351722815	517	49
1058	hipotetični protein LOC100500093 [Glycine max]	gi 351721369	446	50
1234	neznan [Glycine max]	gi 255635896	255	10
	Starozagorski			
385	neznan [Medicago truncatula]	gi 217072508	149	7
390	domnevni nekarakteriziran kloroplastni protein, podoben At1g09340 [Glycine max]	gi 356572914	209	14
580	neznan [Glycine max]	gi 255635846	280	18
612	nekarakteriziran protein LOC100305513 [ <i>Glycine max</i> ]	gi 351721274	400	35
623	neznan [Medicago truncatula]	gi 217071344	242	17
634	neznan [ <i>Glycine max</i> ]	gi 255636441	219	23
669	neznan [ <i>Glycine max</i> ]	gi 255628349	267	26
694	hipotetični protein LOC100500096 [Glycine max]	gi 351722815	368	35
746	hipotetični protein LOC100499771 [Glycine max]	gi 351724985	339	23
756	hipotetični protein LOC100500325 [Glycine max]	gi 351727066	73	8
759	neznan [ <i>Glycine max</i> ]	gi 255630026	72	8
781	hipotetični protein LOC100500093 [Glycine max]	gi 351721369	215	46
836	hipotetični protein LOC100526924 [Glycine max]	gi 351725393	118	17
875	g5bf [Arabidopsis thaliana]	gi 2765081	245	11
449	neznan [ <i>Glycine max</i> ]	gi 255637721	328	19
324	neznan [ <i>Glycine max</i> ]	gi 255640955	108	22

<sup>a</sup> Številke proteinskih lis se nanašajo na sliko 17;

<sup>b</sup> MASCOT vrednost identificiranega proteina iz MS analize;

<sup>c</sup> odstotek aminokislin iz referenčnih proteinov, ki se je ujemali s peptidi iz MS analize.

#### PRILOGI C

Seznam bioloških poti in molekulskih funkcij iz programa BiNGO (Maere in sod., 2005) za identificirane proteine v listih za kultivarja Tiber in Starozagorski

#### PRILOGA C1

Seznam bioloških poti iz programa BiNGO (Maere in sod., 2005) za identificirane proteine v listih za kultivarja Tiber in Starozagorski

GO-ID	p-vrednost	Popravljena p-vrednost	Število proteinov	Opis
Tiber		•	•	
50896	1.31E-15	2.90E-13	27	odziv na stimulus
9628	2.86E-15	2.90E-13	19	odziv na abiotski stimulus
10035	3.68E-15	2.90E-13	14	odziv na anorganske substance
10038	7.11E-15	4.20E-13	13	odziv na kovinske ione
6950	6.41E-14	3.02E-12	21	odziv na stres
46686	6.18E-13	2.43E-11	11	odziv na kadmijeve ione
42742	8.46E-10	2.85E-08	8	obrambni odziv na bakterije
9409	4.87E-09	1.21E-07	8	odziv na mraz
9617	4.87E-09	1.21E-07	8	odziv na bakterije
9266	5.49E-09	1.21E-07	9	odziv na temperaturni stimulus
9651	5.62E-09	1.21E-07	9	odziv na slanost
6970	1.08E-08	2.12E-07	9	odziv na osmotski stres
15979	3.03E-08	5.23E-07	6	fotosinteza
42221	3.25E-08	5.23E-07	15	odziv na kemijski stimulus
6091	3.32E-08	5.23E-07	7	tvorba prekurzorjev metabolitov in energije
19684	6.22E-08	9.17E-07	5	fotosinteza, svetlobne reakcije
46164	9.17E-08	1.27E-06	5	alkoholni katabolni procesi
51707	1.50E-07	1.97E-06	9	odziv na ostale organizme
9607	2.12E-07	2.64E-06	9	odziv na biotski stimulus
44275	7.03E-07	8.30E-06	5	celični procesi povezani s katabolizmom ogljikovih hidratov
16052	1.07E-06	1.20E-05	5	procesi povezani s katabolizmom ogljikovih hidratov
5996	1.33E-06	1.43E-05	5	monosaharidni metabolni procesi
51704	1.48E-06	1.52E-05	9	procesi povezani z organizmi
35304	2.68E-06	2.63E-05	2	regulacija proteinske aminokislinske defosforilacije
6007	3.34E-06	3.11E-05	4	glukozni katabolni procesi
46365	3.56E-06	3.11E-05	4	monosaharidni katabolni procesi
19320	3.56E-06	3.11E-05	4	heksozni katabolni procesi
6006	4.04E-06	3.40E-05	4	glukozni metabolni procesi

GO-ID	p-vrednost	Popravljena p-vrednost	Število proteinov	Opis	
44282	7.07E-06	5.76E-05	5	katabolni procesi povezani z majhnimi molekulami	
6952	7.86E-06	6.11E-05	8	obrambni odziv	
35303	8.02E-06	6.11E-05	2	regulacija defosforilacije	
9056	1.02E-05	7.51E-05	8	katabolni procesi	
19318	1.54E-05	1.10E-04	4	heksozni metabolni procesi	
42549	1.60E-05	1.11E-04	2	stabilizacija fotosistema II	
10043	1.65E-05	1.12E-04	3	odziv na cinkove ione	
6066	1.90E-05	1.25E-04	5	alkoholni metabolni procesi	
8152	7.32E-05	4.63E-04	23	metabolni procesi	
31399	7.45E-05	4.63E-04	2	regulacija proteinske modifikacije	
9416	9.48E-05	5.25E-04	6	odziv na svetlobni stimulus	
43155	9.57E-05	5.25E-04	2	negativna regulacija fotosinteze, svetlobne reakcije	
71704	9.57E-05	5.25E-04	2	metabolni procesi povezani z organskimi substancami	
10205	9.57E-05	5.25E-04	2	fotoinhibicija	
15977	9.57E-05	5.25E-04	2	fiksacija ogljika	
9314	1.15E-04	6.15E-04	6	odziv na sevanje	
10207	1.19E-04	6.27E-04	2	fotosistem II, združevanje	
Starozagorski					
50896	6.71E-19	2.07E-16	33	odziv na stimulus	
10035	3.46E-15	4.69E-13	15	odziv na anorganske substance	
10038	4.56E-15	4.69E-13	14	odziv na kovinske ione	
6950	6.87E-15	5.31E-13	24	odziv na stres	
9628	2.64E-13	1.63E-11	19	odziv na abiotski stimulus	
46686	6.71E-12	3.46E-10	11	odziv na kadmijeve ione	
42221	2.17E-11	9.57E-10	20	odziv na kemijski stimulus	
5996	3.30E-09	1.25E-07	7	monosaharidni metabolni procesi	
10043	3.65E-09	1.25E-07	5	odziv na cinkove ione	
42742	4.45E-09	1.38E-07	8	obrambni odziv na bakterije	
6091	5.67E-09	1.59E-07	8	tvorba prekurzorjev metabolitov in energije	
9617	2.53E-08	6.50E-07	8	odziv na bakterije	
9266	3.49E-08	8.29E-07	9	odziv na temperaturni stimulus	
6081	6.84E-08	1.51E-06	4	celični aldehidni metabolni procesi	
9607	1.13E-07	2.32E-06	10	odziv na biotski stimulus	
8152	1.41E-07	2.59E-06	31	metabolni procesi	
6066	1.43E-07	2.59E-06	7	alkoholni metabolni procesi	
6007	1.58E-07	2.65E-06	5	glukozni katabolni procesi	
46365	1.71E-07	2.65E-06	5	monosaharidni katabolni procesi	

GO-ID	p-vrednost	Popravljena p-vrednost	Število proteinov	Opis
19320	1.71E-07	2.65E-06	5	heksozni katabolni procesi
6006	2.01E-07	2.95E-06	5	glukozni metabolni procesi
46164	2.52E-07	3.54E-06	5	alkoholni katabolni procesi
9651	5.46E-07	7.33E-06	8	odziv na slanost
51707	9.05E-07	1.17E-05	9	odziv na ostale organizme
6970	9.58E-07	1.18E-05	8	odziv na osmotski stres
19318	1.09E-06	1.29E-05	5	heksozni metabolni procesi
44275	1.91E-06	2.19E-05	5	celični procesi povezani s katabolizmom ogljikovih hidratov
5975	2.78E-06	3.07E-05	10	procesi povezani z metabolizmom ogljikovih hidratov
16052	2.91E-06	3.10E-05	5	procesi povezani s katabolizmom ogljikovih hidratov
15979	3.17E-06	3.27E-05	5	fotosinteza
6090	3.43E-06	3.42E-05	3	piruvat metabolni procesi
6952	4.22E-06	4.08E-05	9	obrambni odziv
44281	4.59E-06	4.30E-05	12	metabolni procesi povezani z majhnimi molekulami
9056	5.63E-06	5.11E-05	9	katabolni procesi
19684	7.89E-06	6.97E-05	4	fotosinteza, svetlobne reakcije
51704	8.43E-06	7.15E-05	9	procesi povezani z različnimi organizmi
9409	8.56E-06	7.15E-05	6	odziv na mraz
44282	1.89E-05	1.54E-04	5	katabolni procesi povezani z majhnimi molekulami
44262	2.21E-05	1.75E-04	7	celični metabolni procesi povezani z ogljikovimi hidrati
44237	2.50E-05	1.93E-04	24	celični metabolni procesi
6096	7.20E-05	5.42E-04	3	glikoliza
19288	8.31E-05	6.11E-04	2	izopentenil difosfat biosintetski procesi, od mevalonata neodvisna pot
19682	1.11E-04	7.95E-04	2	gliceraldehid-3-fosfat metabolni procesi
6979	1.36E-04	9.56E-04	5	odziv na oksidativni stres
9408	1.41E-04	9.65E-04	4	odziv na vročino

### PRILOGA C2

Seznam molekulskih funkcij iz programa BiNGO (Maere in sod., 2005) za identificirane proteine v listih za kultivarja Tiber in Starozagorski

GO-ID	p-vrednost	Popravljena p-vrednost	Število proteinov	Opis
Tiber			-	
5507	7.80E-10	9.82E-08	8	vezava bakrovih ionov
3824	1.70E-07	1.07E-05	27	katalitska aktivnost
16209	1.50E-06	4.01E-05	5	antioksidacijska aktivnost
8266	2.14E-06	4.01E-05	3	poli(U) RNA vezava
8187	2.14E-06	4.01E-05	3	poli-pirimidinska vezava
4807	2.23E-06	4.01E-05	2	trioza-fosfat izomerazna aktivnost
10242	2.23E-06	4.01E-05	2	aktivnost povezana s kisikom
16491	2.66E-06	4.18E-05	11	oksidoreduktazna aktivnost
3727	7.18E-06	1.00E-04	3	vezava enoverižne RNA
Staro	zagorski			
3824	3.86E-11	4.75E-09	35	katalitska aktivnost
16829	6.27E-08	3.63E-06	8	liazna aktivnost
5507	8.85E-08	3.63E-06	7	vezava bakrovih ionov
16491	3.56E-07	1.09E-05	13	oksidoreduktazna aktivnost
16209	3.62E-06	6.39E-05	5	antioksidacijska aktivnost
8266	3.64E-06	6.39E-05	3	poli(U) RNA vezava
8187	3.64E-06	6.39E-05	3	poli-pirimidinska vezava
3727	1.22E-05	1.87E-04	3	vezava enoverižne RNA
16830	2.47E-05	3.38E-04	4	ogljik-ogljik liazna aktivnost
4332	6.61E-05	8.13E-04	2	fruktoza-bisfosfat aldolazna aktivnost

#### PRILOGA D

Mreža bioloških poti (A) in molekulskih funkcij (B) narejena s programom BiNGO (Maere in sod., 2005). Prikaz protein-protein interakcijske mreže s programom STRING (C; Szklarczyk in sod., 2011). Vse mreže so predstavljene za kultivar Starozagorski.





# PRILOGI E

Analiza glikopeptidov iz spektrov pri steblih in listih za kultivar Tiber

# PRILOGA E1

Analiza glikopeptidov iz spektrov pri steblih za kultivar Tiber

m/z	Naboj	Eksp. masa peptida	Teor. masa peptida	Peptidno zaporedje	Masa glikana	Struktura glikana	NCBI številka proteina	Ime proteina
ST-S1,	ST-C1							
1165.14	3	2113.9173	2113.9185	NGSYINYYMYHGGTNFGR	1378.52	$N_2M_6$	gi 593328652	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1179.17	3	1830.8989	1830.8994	WNVSASGARPNPQGSFR	1702.64	$N_2M_8$	gi 593785175 gi 225426946 gi 502175770	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] bakrova oksidaza [ <i>Vitis vinifera</i> ] bakrova oksidaza [ <i>Cicer arietinum</i> ]
1016.78	3	1830.8963	1830.8994	WNVSASGARPNPQGSFR	1216.46	$N_2M_5$	gi 593785175 gi 225426946 gi 502175770	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] bakrova oksidaza [ <i>Vitis vinifera</i> ] bakrova oksidaza [ <i>Cicer arietinum</i> ]
1052.12	3	1774.8571	1774.8579	QNTSASGARPNPQGSFR	1378.52	$N_2M_6$	gi 593696454	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1001.78	3	1774.8535	1774.8579	QNTSASGARPNPQGSFR	1227.46	$N_2M_3N_1X_1$	gi 593696454	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1323.12	2	1270.7160	1270.7113	VTSLVPINGTNR	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1$	gi 571450249 gi 593696454 gi 225426946	bakrova oksidaza [ <i>Glycine max</i> ] hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] bakrova oksidaza [ <i>Vitis vinifera</i> ]
1424.65	2	1270.7080	1270.7113	VTSLVPINGTNR	1576.60	$N_2M_3N_2F_1X_1$	gi 571450249 gi 593696454 gi 225426946	bakrova oksidaza [ <i>Glycine max</i> ] hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] bakrova oksidaza [ <i>Vitis vinifera</i> ]
1221.57	2	1270.7058	1270.7113	VTSLVPINGTNR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 571450249 gi 593696454 gi 225426946	bakrova oksidaza [ <i>Glycine max</i> ] hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] bakrova oksidaza [ <i>Vitis vinifera</i> ]
1125.5	2	1224.6245	1224.6219	AETSIINGTYR	1024.38	$N_2M_3X_1$	gi 593785175	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1227.04	2	1224.6243	1224.6219	AETSIINGTYR	1227.46	$N_2M_3N_1X_1$	gi 593785175	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1328.58	2	1224.6223	1224.6219	AETSIINGTYR	1430.54	$N_2M_3N_2X_1$	gi 593785175	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1368.56	2	1194.5881*	1194.6113	VEASVINGSYR	1540.58	$N_2M_7$	gi 502175770	bakrova oksidaza [Cicer arietinum]
1287.04	2	1193.5930	1193.5909	NFTTVVENNR	1378.52	$N_2M_6$	gi 502175770	bakrova oksidaza [Cicer arietinum]

nadalje	vanje							
m/z	Naboj	Eksp. masa peptida	Teor. masa peptida	Peptidno zaporedje	Masa glikana	Struktura glikana	NCBI številka proteina	Ime proteina
1206.01	2	1193.5930	1193.5909	NFTTVVENNR	1216.46	$N_2M_5$	gi 502175770	bakrova oksidaza [Cicer arietinum]
1449.1	2	1193.5924	1193.5909	NFTTVVENNR	1702.64	$N_2M_8$	gi 502175770	bakrova oksidaza [Cicer arietinum]
1263.05	2	1150.5909	1150.5891	FVNESLWQK	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1$	gi 357455879	bakrova oksidaza [Medicago truncatula]
1364.59	2	1150.5888	1150.5891	FVNESLWQK	1576.60	$N_2M_3N_2F_1X_1$	gi 357455879	bakrova oksidaza [Medicago truncatula]
1243.07	2	1105.6384	1105.6364	ILNYLNLSR	1378.52	$N_2M_6$	gi 593785485	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1102.44	2	773.3274*	773.3359	NHTDMR	1430.54	$N_2M_3N_2X_1$	gi 593785175	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1063.44	2	751.3751	751.3733	FVNESR	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1$	gi 593785175	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
961.4	2	751.3720	751.3733	FVNESR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593785175	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
ST-S2,	ST-C2							
1250.92	3	2578.2859	2578.2936	FLSQSSSWESGWGNISLPLV DLR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593791168	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1200.2	3	2061.0241	2061.0228	FFNWNVTYGDIYPLGVR	1535.58	$N_2M_4N_1F_1X_1$	gi 593795138	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1067.18	3	2027.1049	2027.1032	SIFSHNLAINAVINASSIR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593699372 gi 356547157	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] alfa-L-fukozidaza [ <i>Glycine max</i> ]
1016.79	3	1830.8893	1830.8994	WNVSASGARPNPQGSFR	1216.46	$N_2M_5$	gi 593785175	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
998.1	3	1774.8487	1774.8579	QNTSASGARPNPQGSFR	1216.46	$N_2M_5$	gi 593696454	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1194.88	3	1716.9665	1716.9755	ILGRPVNNSTITYLR	1864.70	$N_2M_9$	gi 593697822	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1328.12	2	1483.7897	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593213934	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1531.19	2	1483.7896	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1576.60	$N_2M_3N_2F_1X_1$	gi 593213934	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1612.22	2	1483.7894	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1738.66	$N_2M_4N_2F_1X_1$	gi 593213934	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]

nadalje	vanje							
m/z	Naboj	Eksp. masa peptida	Teor. masa peptida	Peptidno zaporedje	Masa glikana	Struktura glikana	NCBI številka proteina	Ime proteina
1255.08	2	1483.7889	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1024.38	$N_2M_3X_1$	gi 593213934	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1327.62	2	1482.7796	1482.7910	DSAPPNITVTAQLR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593331692	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1228.07	2	1283.7001	1283.7066	SLAVIGPNANATR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 356558612	beta-ksilozidaza/alfa-L-arabinofuranozidaza [ <i>Glycine max</i> ]
1190.04	2	1207.6367	1207.6429	VVNGTTIGYQR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593699372 gi 356547157	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] alfa-L-fukozidaza [ <i>Glycine max</i> ]
1287.04	2	1193.5876	1193.5909	NFTTVVENNR	1378.52	$N_2M_6$	gi 593188173	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1206.02	2	1193.5870	1193.5909	NFTTVVENNR	1216.46	$N_2M_5$	gi 593188173	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1099.48	2	818.4569	818.4618	ILTNETK	1378.52	$N_2M_6$	gi 593699486	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1180.5	2	818.4565	818.4618	ILTNETK	1540.58	$N_2M_7$	gi 593699486	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
899.86	2	773.3540	773.3577	SNYSFR	1024.38	$N_2M_3X_1$	gi 593791168	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1166.99	2	755.3745	755.3795	NHTDLR	1576.60	$N_2M_3N_2F_1X_1$	gi 356517653	homolog L-askorbat oksidaze [Glycine max]
1065.45	2	755.3743	755.3795	NHTDLR	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1\\$	gi 356517653	homolog L-askorbat oksidaze [Glycine max]
1248.01	2	755.3726	755.3795	NHTDLR	1738.66	$N_2M_4N_2F_1X_1$	gi 356517653	homolog L-askorbat oksidaze [Glycine max]
1093.96	2	755.3722	755.3795	NHTDLR	1430.54	$N_2M_3N_2X_1$	gi 356517653 gi 593213934	homolog L-askorbat oksidaze [Glycine max] hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
961.4	2	751.3695	751.3733	FVNESR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593785175	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1338.96	3	2842.4303	2842.4369	NLSDVVITGDNGIIDGQGSV WWDLIR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593689128	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1250.58	3	2578.2837	2578.2936	FLSQSSSWESGWGNISLPLV DLR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593791168	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
								1 1' '

nadaljev	vanje							
<b>m/z</b>	Naboj	Eksp. masa peptida	Teor. masa peptida	Peptidno zaporedje	Masa glikana	Struktura glikana	NCBI številka proteina	Ime proteina
1054.17	3	2135.1155	2135.1284	WLTGSFNLTSHLTLFLER	1024.38	$N_2M_3X_1$	gi 593689128	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1078.49	3	2061.0081	2061.0228	FFNWNVTYGDIYPLGVR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593795138	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1066.85	3	2027.0967	2027.1032	SIFSHNLAINAVINASSIR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593699372 gi 356547157	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] alfa-L-fukozidaza [ <i>Glycine max</i> ]
1032.83	3	1716.9685	1716.9755	ILGRPVNNSTITYLR	1378.52	$N_2M_6$	gi 593697822	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1328.11	2	1483.7833	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593213934	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1327.61	2	1482.7746	1482.7910	DSAPPNITVTAQLR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593331692	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1147.04	2	1283.6983	1283.7066	SLAVIGPNANATR	1008.38	$N_2M_2F_1X_1$	gi 356558612	beta-ksilozidaza/alfa-L-arabinofuranozidaza [ <i>Glycine max</i> ]
899.87	2	773.3522	773.3577	SNYSFR	1024.38	$N_2M_3X_1$	gi 593791168	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
933.9	2	695.3673	695.3722	NGTLYK	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593693860 gi 356533127	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] kanabidiolik kislinska sintaza-izooblika 1 [ <i>Glycine max</i> ]
ST-S3, S'	T-C3							
1067.18	3	2027.1005	2027.1032	SIFSHNLAINAVINASSIR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593699372	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1412.12	2	1651.8040*	1651.8286	TTTDIQNVSFLDAAR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593686792	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1531.19	2	1483.7967	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1576.60	$N_2M_3N_2F_1X_1$	gi 593213934	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1328.11	2	1483.7921	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593213934	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1429.66	2	1483.7896	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1$	gi 593213934	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1190.04	2	1207.6446	1207.6429	VVNGTTIGYQR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593699372	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]

Zadražnik T. Proteomska analiza pri izbranih kultivarjih navadnega fižola (Phaseolus vulgaris L.).
Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2014

m/z	Naboj	Eksp. masa peptida	Teor. masa peptida	Peptidno zaporedje	Masa glikana	Struktura glikana	NCBI številka proteina	Ime proteina
1092.47	2	804.4465	804.4461	ELNLTSK	1378.52	$N_2M_6$	gi 593686792, gi 363807862	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ], nekarakteriziran protein [ <i>Glycine max</i> ]
1173.5	2	804.4464	804.4461	ELNLTSK	1540.58	$N_2M_7$	gi 593686792, gi 363807862	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ], nekarakteriziran protein [ <i>Glycine max</i> ]
1010.94	2	804.4463	804.4461	ELNLTSK	1216.46	$N_2M_5$	gi 593686792, gi 363807862	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ], nekarakteriziran protein [ <i>Glycine max</i> ]
963.4	2	755.3760	755.3795	NHTDLR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 225426946, gi 593213934, gi 356542812	bakrova oksidaza [ <i>Vitis vinifera</i> ], hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ], homolog L-askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ]
ST-S4,	ST-C4							
1080.15	3	2066.9673*	2066.9890	LYNQSGTGRPDPAIDSGYR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593263390	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1412.13	2	1651.8030*	1651.8286	TTTDIQNVSFLDAAR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593686792	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1429.66	2	1483.7906	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1\\$	gi 593213934	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1328.12	2	1483.7905	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 17979	conA prekurzor [Canavalia ensiformis]
1017.46	2	1318.6358	1318.6346	VSSNGSPQGSSVGR	714.27	$N_2M_1F_1$	gi 593789404	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1110.95	2	1049.4653	1049.4646	NWSEATDAR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 356576493	ureidoglikolat hidrolaza [Glycine max]
1487.01	3	3286.5751	3286.5862	GFEAGGPNTPSNIDPWTIIG NESSIIVETDR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593797934	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1080.14	3	2066.9727	2066.9890	LYNQSGTGRPDPAIDSGYR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593263390	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
885.75	3	1483.7947	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593213934	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1328.11	2	1483.7891	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593213934	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]

Zadražnik T. Proteomska analiza	pri izbranih kultiv	varjih navadnega	fižola (Phaseolus	<i>vulgaris</i> L.).
Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ.	v Ljubljani, Biot	ehniška fakulteta	, 2014	

nadalje	vanje							
m/z	Naboj	Eksp. masa peptida	Teor. masa peptida	Peptidno zaporedje	Masa glikana	Struktura glikana	NCBI številka proteina	Ime proteina
1429.65	2	1483.7879	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1$	gi 593213934	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1173.5	2	804.4418	804.4461	ELNLTSK	1540.58	$N_2M_7$	gi 356576493 gi 593686792	ureidoglikolat hidrolaza [ <i>Glycine max</i> ] hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]
ST-S5,	ST-C5							
1066.85	3	2027.0935*	2027.0668	FPGPTINVTTNNNVAVNVR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593785175	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1328.11	2	1483.7766	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 356517653	homolog L-askorbat oksidaze [Glycine max]
1227.04	2	1224.6173	1224.6219	AETSIINGTYR	1227.46	$N_2M_3N_1X_1$	gi 593785175	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1125.5	2	1224.6141	1224.6219	AETSIINGTYR	1024.38	$N_2M_3X_1$	gi 593785175	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1068.97	2	965.4976	965.5050	NLSDTFLR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593795978	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
ST-S6,	ST-C6							
1306.07	2	1439.6938	1439.6947	NATEANLMLSGYR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593705182	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1225.03	2	1439.6907	1439.6947	NATEANLMLSGYR	1008.38	$N_2M_2F_1X_1$	gi 593705182	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1016.96	2	1318.6295	1318.6346	VSSNGSPQGSSVGR	714.27	$N_2M_1F_1$	gi 116912	konkavalin A [Canavalia gladiata]
1082.98	2	1318.6358	1318.6346	VSSNGSPQGSSVGR	846.31	$N_2M_1F_1X_1$	gi 116912	konkavalin A [Canavalia gladiata]
1010.95	2	804.4475	804.4461	ELNLTSK	1216.46	$N_2M_5$	gi 593686792 gi 363807862	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] nekarakteriziran protein [ <i>Glycine max</i> ]
1173.5	2	804.4463	804.4461	ELNLTSK	1540.58	$N_2M_7$	gi 593686792 gi 363807862	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] nekarakteriziran protein [ <i>Glycine max</i> ]
ST-S7,	ST-C7							
1306.07	2	1439.6854	1439.6947	NATEANLMLSGYR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 593705182	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]

nadaljevanje

ST-S8, ST-C8

-

\* Razlika do 20 ppm med eksperimentalno in teoretično maso peptidov, pri ostalih je ta razlika največ 10 ppm. Pri iskanju smo dovolili največ eno zgrešeno mesto cepitve za tripsin.

Oznake: N (N-acetilglukozamin), M (manoza), F (fukoza), X (ksiloza).

# PRILOGA E2

Analiza glikopeptidov iz spektrov pri listih za kultivar Tiber

m/z	Naboj	Eksp. masa peptida	Teor. masa peptida	Peptidno zaporedje	Masa glikana	Struktura glikana	NCBI številka proteina	Ime proteina
LS1,	LC1				_			
1085.82	3	1822.9285	1822.9334	YPNETTSYLVNGVPIR	1430.54	$N_2M_3N_2X_1$	gi 561015500	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1055.48	2	735.4412	735.4399	NLTFIK	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1$	gi 561015500 gi 561015499	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]
LS2,	LC2				-			
1487.02	3	3286.5465*	3286.5862	GFEAGGPNTPSNIDPWTII GNESSIIVETDR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561035469	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1070.80	3	1830.8947	1830.8994	WNVSASGARPNPQGSFR	1378.52	$N_2M_6$	gi 255645267	neznan [Glycine max]
1124.82	3	1830.8945	1831.8994	WNVSASGARPNPQGSFR	1540.58	$N_2M_7$	gi 255645267	neznan [Glycine max]
1178.84	3	1830.8853	1832.8994	WNVSASGARPNPQGSFR	1702.64	$N_2M_8$	gi 255645267	neznan [Glycine max]
1052.12	3	1774.8569	1774.8579	QNTSASGARPNPQGSFR	1378.52	$N_2M_6$	gi 561021973	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1381.09	2	1224.6243	1224.6219	AETSIINGTYR	1535.58	$N_2M_4N_1F_1X_1$	gi 561028982	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1125.50	2	1224.6223	1225.6219	AETSIINGTYR	1024.38	$N_2M_3X_1$	gi 561028982	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1227.04	2	1224.6221	1225.6219	AETSIINGTYR	1227.46	$N_2M_3N_1X_1$	gi 561028982	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1328.58	2	1224.6214	1225.6219	AETSIINGTYR	1430.54	$N_2M_3N_2X_1$	gi 561028982	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1068.47	2	965.5036	965.5050	NLSDTFLR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561034491	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1076.97	2	965.5035	966.5050	NLSDTFLR	1186.44	$N_2M_4X_1$	gi 561034491	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
899.37	2	773.3575	773.3577	SNYSFR	1024.38	$N_2M_3X_1$	gi 561032038	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
961.90	2	751.3736	751.3733	FVNESR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561028982	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
LS3,	LC3							

nadalje	vanje							
m/z	Naboj	Eksp. masa peptida	Teor. masa peptida	Peptidno zaporedje	Masa glikana	Struktura glikana	NCBI številka proteina	Ime proteina
1449.34	3	2965.4823	2965.5027	NLTASGPRPNPQGSYHYG LINTTHTIR	1378.52	$N_2M_6$	gi 478622056	bakrova oksidaza [Citrus maxima]
1250.92	3	2578.2931	2578.2936	FLSQSSSWESGWGNISLPL VDLR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561032038	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1066.85	3	2027.1055	2027.1032	SIFSHNLAINAVINASSIR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561023415	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1233.19	3	1830.8851	1830.8994	WNVSASGARPNPQGSFR	1864.70	$N_2M_9$	gi 561028982	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1418.15	2	1663.8438	1663.8472	FNTCRPLNESLELK	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561023397	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1429.66	2	1483.7894	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1$	gi 561005533	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
885.74	3	1483.7893	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561005533	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1328.12	2	1483.7880	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561005533	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1612.22	2	1483.7838	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1738.66	$N_2M_4N_2F_1X_1$	gi 561005533	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
953.44	3	1483.7829	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1$	gi 561005533	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1313.11	2	1453.7692	1453.7685	FTGTVPASFANLTK	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561021963	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1415.14	2	1453.7675	1453.7685	FTGTVPASFANLTK	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1$	gi 561021963	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1333.59	2	1291.6639	1291.6641	NNFSGGIPASISK	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1$	gi 561021963	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1147.05	2	1283.7021	1283.7066	SLAVIGPNANATR	1008.38	$N_2M_2F_1X_1$	gi 561032495	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1190.05	2	1207.6447	1207.6429	VVNGTTIGYQR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561023415	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1143.98	2	1115.5350	1115.5327	NDSIPVDEAR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561022341	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1245.52	2	1115.5303	1115.5327	NDSIPVDEAR	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1$	gi 561022341	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]

m/zNabojEksp. masa peptidaTeor. masa peptidaPeptidno zaporedjeMasa glikanaStruktura glikanaNCBI stevilka proteina1135.5321098.61701098.6153IPENIGNLTK1170.44N_2M_3F_1X1 gif561021963hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]1237.0621098.61641098.6153IPENIGNLTK1373.52NM3N_F1X1 gif561021963hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]1219.502755.3803755.3795NHTDLR1681.64 $N_2M_3N_1F_1X1$ gif356517653gif356517653 homolog askorbat oksidaze [Glycine ma gif3565176531248.022755.3792755.3795NHTDLR1738.66 $N_2M_4N_2F_1X1$ gif356517653gif356517653 homolog askorbat oksidaze [Glycine ma gif356105533963.402755.3794755.3795NHTDLR1170.44 $N_2M_3F_1X1$ gif356517655gif356517653 homolog askorbat oksidaze [Glycine ma gif35617655963.402755.3774755.3795NHTDLR1024.38 $N_2M_3F_1X1$ gif35617655gif35617655 homolog askorbat oksidaze [Glycine ma gif35617655980.372755.3771 755.3795755.3795NHTDLR1024.38 $N_2M_3F_1X1$ gif356517655gif356517655 homolog askorbat oksidaze [Glycine ma gif3561765531064.952755.3771 755.3795755.3795NHTDLR1373.52 $N_2M_3N_1F_1X1$ gif35617655gif356517655 homolog askorbat oksidaze [Glycine ma gif3561765531064.952755.3771 755.3795755.3795NHTDLR </th <th>nadalje</th> <th>vanje</th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th>	nadalje	vanje							
1135.5321098.61701098.6153IPENIGNLTK1170.44 $N_2M_3F_1X_1$ gi[561021963]hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]1237.0621098.61641098.6153IPENIGNLTK1373.52 $N_2M_3N_1F_1X_1$ gi[561021963]hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]1219.502755.3803755.3795NHTDLR1681.64 $N_2M_3N_1F_1X_1$ gi[356542812]homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine ma</i> gi[356110553]1248.022755.3792755.3795NHTDLR1738.66 $N_2M_4N_2F_1X_1$ gi[356517653]homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine ma</i> gi]561005533]963.402755.3780755.3795NHTDLR1170.44 $N_2M_3F_1X_1$ gi[356542812]homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine ma</i> gi]561005533]963.402755.3774755.3795NHTDLR1170.44 $N_2M_3F_1X_1$ gi[356517653]homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine ma</i> gi]561005533]890.372755.3774755.3795NHTDLR1024.38 $N_2M_3K_1$ gi[356517653]homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine ma</i> gi]561005533]1064.952755.3774755.3795NHTDLR1373.52 $N_2M_3N_1F_1X_1$ gi[356517653]homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine ma</i> gi]561005533]1166.992755.3738755.3795NHTDLR1373.52 $N_2M_3N_1F_1X_1$ gi[356517653]homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine ma</i> gi]561005533]1166.992755.3738755.3795NHTDLR1373.52 $N_2M_3N_1F_1X_1$ gi[35617653]homolog askorbat oksidaze [ <i>G</i>	m/z	Naboj	Eksp. masa peptida	Teor. masa peptida	Peptidno zaporedje	Masa glikana	Struktura glikana	NCBI številka proteina	Ime proteina
1237.06       2       1098.6164       1098.6153       IPENIGNLTK       1373.52 $N_2M_3N_1F_1X_1$ gi[361021963]       hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]         1219.50       2       755.3803       755.3795       NHTDLR $1681.64$ $N_2M_3N_1F_1X_1$ gi[356542812]       homolog askorbat oksidaze [Glycine ma homolog askorbat oksidaze [Glycine ma bipotetični protein [Phaseolus vulgaris]         1248.02       2       755.3792       755.3795       NHTDLR       1738.66 $N_2M_4N_2F_1X_1$ gi[356542812]       homolog askorbat oksidaze [Glycine ma bipotetični protein [Phaseolus vulgaris]         963.40       2       755.3795       NHTDLR       1170.44 $N_2M_4N_2F_1X_1$ gi[356517653]       homolog askorbat oksidaze [Glycine ma bipotetični protein [Phaseolus vulgaris]         963.40       2       755.3795       NHTDLR       1170.44 $N_2M_3F_1X_1$ gi[356517653]       homolog askorbat oksidaze [Glycine ma bipotetični protein [Phaseolus vulgaris]         890.37       2       755.3774       755.3795       NHTDLR       1024.38 $N_2M_3N_1F_1X_1$ gi[356517653]       homolog askorbat oksidaze [Glycine ma bipotetični protein [Phaseolus vulgaris]         1064.95       2       755.3771       755.3795       NHTDLR       1373.52 $N_2M_3N_1F_1X_1$ gi[356517653]       homolog askorbat	1135.53	2	1098.6170	1098.6153	IPENIGNLTK	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561021963	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	1237.06	2	1098.6164	1098.6153	IPENIGNLTK	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1$	gi 561021963	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1248.022755.3792755.3795NHTDLR1738.66 $N_2M_4N_2F_1X_1$ gi 356542812 gi 356517653 gi 356517653 gi 356517653 hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]963.402755.3780755.3795NHTDLR1170.44 $N_2M_3F_1X_1$ $gi 356517653$ gi 356517653 gi 356517653 homolog askorbat oksidaze [Glycine ma gi 356542812 homolog askorbat oksidaze [Glycine ma gi 356517653 homolog askorbat oksidaze [Glycine ma gi 356517653 	1219.50	2	755.3803	755.3795	NHTDLR	1681.64	$\begin{array}{c} N_2M_3N_1F_1X_1\\F_1G_1\end{array}$	gi 356542812 gi 356517653 gi 561005533	homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ] homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ] hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]
963.40       2       755.3780       755.3795       NHTDLR       1170.44       N <sub>2</sub> M <sub>3</sub> F <sub>1</sub> X <sub>1</sub> gi[356542812]       homolog askorbat oksidaze [Glycine main protein]         890.37       2       755.3774       755.3795       NHTDLR       1024.38       N <sub>2</sub> M <sub>3</sub> X <sub>1</sub> gi[356542812]       homolog askorbat oksidaze [Glycine main protein]         890.37       2       755.3774       755.3795       NHTDLR       1024.38       N <sub>2</sub> M <sub>3</sub> X <sub>1</sub> gi[356542812]       homolog askorbat oksidaze [Glycine main protein]         1064.95       2       755.3771       755.3795       NHTDLR       1373.52       N <sub>2</sub> M <sub>3</sub> N <sub>1</sub> F <sub>1</sub> X <sub>1</sub> gi[356542812]       homolog askorbat oksidaze [Glycine main protein]         1064.95       2       755.3771       755.3795       NHTDLR       1373.52       N <sub>2</sub> M <sub>3</sub> N <sub>1</sub> F <sub>1</sub> X <sub>1</sub> gi[356517653]       homolog askorbat oksidaze [Glycine main protein]         1166.99       2       755.3738       755.3795       NHTDLR       1576.60       N <sub>2</sub> M <sub>3</sub> N <sub>2</sub> F <sub>1</sub> X <sub>1</sub> gi[356517653]       homolog askorbat oksidaze [Glycine main protein]       Phaseolus vulgaris]         1166.99       2       755.3738       755.3795       NHTDLR       1576.60       N <sub>2</sub> M <sub>3</sub> N <sub>2</sub> F <sub>1</sub> X <sub>1</sub> gi[356517653]       homolog askorbat oksidaze [Glycine main protein]       Phaseolus vulgaris]       pi[3561005533]	1248.02	2	755.3792	755.3795	NHTDLR	1738.66	$N_2M_4N_2F_1X_1$	gi 356542812 gi 356517653 gi 561005533	homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ] homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ] hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]
890.372755.3774755.3795NHTDLR1024.38 $N_2M_3X_1$ $\begin{array}{c} gi   356542812 \\ gi   356517653 \\ gi   561005533 \end{array}$ homolog askorbat oksidaze [Glycine machina hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]]1064.952755.3771755.3795NHTDLR1373.52 $N_2M_3N_1F_1X_1$ $\begin{array}{c} gi   356542812 \\ gi   356517653 \\ gi   561005533 \end{array}$ homolog askorbat oksidaze [Glycine machina hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]]1064.952755.3771755.3795NHTDLR1373.52 $N_2M_3N_1F_1X_1$ $\begin{array}{c} gi   356542812 \\ gi   356517653 \\ gi   561005533 \end{array}$ homolog askorbat oksidaze [Glycine machina hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]]1166.992755.3738755.3795 \\ 755.3738 \end{array}NHTDLR1576.60 \\ N_2M_3N_2F_1X_1 \end{array} $\begin{array}{c} gi   356517653 \\ gi   561005533 \\ gi   561005533 \end{array}$ homolog askorbat oksidaze [Glycine machina hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]] \\ fi = 0.0000 \\ gi   561005533 \end{array}homolog askorbat oksidaze [Glycine machina hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]] \\ fi = 0.0000 \\ gi   561005533 \end{array}homolog askorbat oksidaze [Glycine machina hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]] \\ fi = 0.0000 \\ gi   561005533 \end{array}homolog askorbat oksidaze [Glycine machina hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]] \\ fi = 0.0000 \\ gi   561005533 \end{array}homolog askorbat oksidaze [Glycine machina hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]] \\ fi = 0.0000 \\ gi   561005533 \end{array}homolog askorbat oksidaze [Glycine machina hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]] \\ fi = 0.0000 \\ gi   561005533 \end{array}homolog askorbat oksidaze [Glycine machina hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]] \\ fi = 0.0000 \\ gi   561005533 \end{array}homolog askorbat oksidaze [Glycine machina hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]] \\ fi = 0.0000 \\	963.40	2	755.3780	755.3795	NHTDLR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 356542812 gi 356517653 gi 561005533	homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ] homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ] hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]
1064.952755.3771755.3795NHTDLR1373.52 $N_2M_3N_1F_1X_1$ $gi 356542812$ gi 356517653 gi 561005533homolog askorbat oksidaze [Glycine mach homolog askorbat oksidaze [Glycine mach hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]1166.992755.3738755.3795NHTDLR1576.60 $N_2M_3N_2F_1X_1$ $gi 356542812$ gi 356517653 gi 561005533homolog askorbat oksidaze [Glycine mach homolog askorbat oksidaze [Glycine mach 	890.37	2	755.3774	755.3795	NHTDLR	1024.38	$N_2M_3X_1$	gi 356542812 	homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ] 
1166.99       2       755.3738       755.3795       NHTDLR       1576.60       N2M3N2F1X1       gi 356542812 gi 356517653       homolog askorbat oksidaze [Glycine mathematication of the secolus vulgaris]         961.90       2       751.3749       751.3733       FVNESR       1170.44       N2M3F1X1       gi 561028982       hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]         LS4, LC4       1	1064.95	2	755.3771	755.3795	NHTDLR	1373.52	$N_2M_3N_1F_1X_1$	gi 356542812 gi 356517653 gi 561005533	homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ] homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ] hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]
961.90         2         751.3749         751.3733         FVNESR         1170.44         N2M3F1X1         gi 561028982         hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]           LS4, LC4	1166.99	2	755.3738	755.3795	NHTDLR	1576.60	$N_2M_3N_2F_1X_1$	gi 356542812 gi 356517653 gi 561005533	homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ] homolog askorbat oksidaze [ <i>Glycine max</i> ] hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]
LS4, LC4	961.90	2	751.3749	751.3733	FVNESR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561028982	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
	LS4,	LC4							
$\frac{1328.12}{2}  \frac{1483.7913}{1483.7903}  \frac{1483.7903}{FTSQVLNATSIFR}  \frac{1170.44}{170.44}  N_2M_3F_1X_1  gi 356517653  homolog askorbat oksidaze [Glycine mathematication of the second s$	1328.12	2	1483.7913	1483.7903	FTSQVLNATSIFR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 356517653	homolog askorbat oksidaze [Glycine max]

nadalje	vanje							
m/z	Naboj	Eksp. masa peptida	Teor. masa peptida	Peptidno zaporedje	Masa glikana	Struktura glikana	NCBI številka proteina	Ime proteina
1272.56	2	1372.6512	1372.6491	YSNIDYNITGGR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561028424	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1272.54	2	1372.6472	1372.6491	YSNIDYNITGGR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561028424	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1272.54	2	1372.6434	1372.6491	YSNIDYNITGGR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561028424	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1368.08	2	1193.5910	1193.5909	NFTTVVENNR	1540.58	$N_2M_7$	gi 561005254	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1449.09	2	1193.5902	1193.5909	NFTTVVENNR	1702.64	$N_2M_8$	gi 561005254	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1110.95	2	1049.4648	1049.4646	NWSEATDAR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561031156	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1010.94	2	804.4447	804.4461	ELNLTSK	1216.46	N2M5	gi 561017257 gi 356576493 gi 363807862	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] ureidoglikolat hidrolaza [ <i>Glycine max</i> ] nekarakteriziran protein [ <i>Glycine max</i> ]
890.37	2	755.3762	755.3795	NHTDLR	1024.38	$N_2M_3X_1$	gi 356517653	homolog askorbat oksidaze [Glycine max]
LS5,	LC5							
1412.13	2	1651.7983*	1651.8286	TTTDIQNVSFLDAAR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561017257	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1272.55	2	1372.6512	1372.6491	YSNIDYNITGGR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561028424	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1199.51	2	1372.6508	1372.6491	YSNIDYNITGGR	1024.38	$N_2M_3X_1$	gi 561028424	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1272.54	2	1372.6500	1372.6491	YSNIDYNITGGR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561028424	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1191.51	2	1210.5831	1210.5851	WDLGSNISYR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 9837280	protein kinaza povezana s senescenco listov [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]
1110.95	2	1049.4627	1049.4646	NWSEATDAR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561031156	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
899.87	2	773.3565	773.3577	SNYSFR	1024.38	$N_2M_3X_1$	gi 561032038	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
LS6,	LC6							
1227.04	2	1224.6223	1224.6219	AETSIINGTYR	1227.46	$N_2M_3N_1X_1$	gi 561028982	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]

nadaljevanje								
m/z	Naboj	Eksp. masa peptida	Teor. masa peptida	Peptidno zaporedje	Masa glikana	Struktura glikana	NCBI številka proteina	Ime proteina
1125.50	2	1224.6190	1224.6219	AETSIINGTYR	1024.38	$N_2M_3X_1$	gi 561028982	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1381.10	2	1224.6163	1224.6219	AETSIINGTYR	1535.58	$N_2M_4N_1F_1X_1$	gi 561028982	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1066.85	3	2027.0983*	2027.0668	FPGPTINVTTNNNVAVNV R	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561028982	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
<b>LS7,</b> ]	LC7				-		•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	
1306.07	2	1439.6900	1439.6947	NATEANLMLSGYR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561026264	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1173.50	2	804.4457	804.4461	ELNLTSK	1540.58	$N_2M_7$	gi 561017257 gi 356576493	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] ureidoglikolat hidrolaza [ <i>Glycine max</i> ]
1010.95	2	804.4446	804.4461	ELNLTSK	1216.46	$N_2M_5$	gi 561017257 gi 356576493	hipotetični protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] ureidoglikolat hidrolaza [ <i>Glycine max</i> ]
<b>LS8,</b> ]	LC8				-		•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	
1306.07	2	1439.6898	1439.6947	NATEANLMLSGYR	1170.44	$N_2M_3F_1X_1$	gi 561026264	hipotetični protein [Phaseolus vulgaris]
1011.45	2	804.4452	804.4461	ELNLTSK	1216.46	$N_2M_5$	gi 561017257 gi 356576493	ureidoglikolat hidrolaza [ <i>Glycine max</i> ] ureidoglikolat hidrolaza [ <i>Glycine max</i> ]
<b>LS9</b> , 1	LC9				-			
-					•		•	
LS10, L	C10				-			

\* Razlika do 20 ppm med eksperimentalno in teoretično maso peptidov, pri ostalih je ta razlika največ 10 ppm. Pri iskanju smo dovolili največ eno zgrešeno mesto cepitve za tripsin.

Oznake: N (N-acetilglukozamin), M (manoza), F (fukoza), X (ksiloza).

### PRILOGI F

Homologni proteini neznanih in hipotetičnih glikoproteinov

# PRILOGA F1

Homologni proteini neznanih in hipotetičnih glikoproteinov iz stebel za kultivar Tiber z uporabo algoritma BLASTP (2012)

Zadražnik T. Proteomska analiza pri izbranih kultivarjih navadnega fižola (Phaseolus vulgaris L.).
Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2014

NCBI številka neznanega proteina	Homologni protein	NCBI številka homolognega proteina	Vrednost	Podobnost
gi 593785485	protein kinaza [Glycine max]	NP_001237688.1	1825	91
gi 593692034	glicerofosforil diester fosfodiesteraza [Glycine max]	XP_003530777.1	1253	82
gi 593205833	nikalin [ <i>Glycine max</i> ]	XP_003538104.1	1074	94
gi 593689054	/			
gi 593548919	glicerofosforil diester fosfodiesteraza [Glycine max]	XP_003519608.1	1233	80
gi 593700219	IAA-aminokislinska hidrolaza [Glycine max]	XP_003543612.1	479	89
gi 593328652	beta-galaktozidaza, izooblika X1 [Glycine max]	XP_003522474.1	1317	87
gi 593699372	alfa-fukozidaza [ <i>Glycine max</i> ]	XP_003541983.1	857	83
gi 593618020	alfa-ksilozidaza [Glycine max]	XP_003536686.1	1677	88
gi 593213934	homolog askorbat oksidaze [Glycine max]	XP_003527501.1	1056	95
gi 593797980	4-alfa-glukanotransferaza [Glycine max]	XP_003554099.1	606	87
gi 593791168	neaktivni prekurzor kisle fosfataze [Glycine max]	NP_001241258.1	1133	84
gi 593328660	neutralna alfa-glukozidaza [Glycine max]	XP_003523210.1	1693	90
gi 593188173	protein disulfid izomeraza, izooblika 1 [Glycine max]	XP_003538207.1	915	87
gi 527197856	fruktokinaza [Genlisea aurea]	EPS68794.1	589	90
gi 593785057	protein HOTHEAD [Glycine max]	XP_003525734.1	1070	88
gi 593696454	bakrova oksidaza [ <i>Glycine max</i> ]	XP_003523887.2	1096	90
gi 593328058	protein tolB [Medicago truncatula]	XP_003630471.1	1055	78
gi 593693844	alfa-glukozidaza [ <i>Glycine max</i> ]	XP_003546284.2	1568	83
gi 593332112	endo-1,3(4)-beta-glukanaza [Glycine max]	XP_003552568.1	1174	87
gi 593701877	protein kinaza [Glycine max]	XP_003543886.1	1375	79
gi 255635805	ksiloza izomeraza [Glycine max]	XP_003549495.1	432	100
gi 593793797	glutamil-tRNA(Gln) amidotransferaza, podenota A [Glycine max]	XP_006580381.1	1053	91
gi 593697822	epidermis-specifični sekrecijski glikoprotein [Glycine max]	XP_003543212.1	827	90
gi 593331692	beta-heksozaminidaza [Glycine max]	XP_003552672.1	981	86

Zadražnik T. Proteomska analiza	. pri izbranih	kultivarjih navadnega	fižola (Phaseolus	vulgaris L.).
Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ	7. v Ljubljani	, Biotehniška fakulteta	, 2014	

nadaljevanje				
NCBI številka neznanega proteina	Homologni protein	NCBI številka homolognega proteina	Vrednost	Podobnost
gi 593795138	homolog askorbat oksidaze [Glycine max]	XP_006596528.1	1008	92
gi 593693860	kanabidiolik kislinska sintaza, izooblika 1 [Glycine max]	XP_003535119.1	1077	94
gi 363807862	ureidoglikolat hidrolaza [Glycine max]	XP_003556365.1	855	93
gi 593686792	ureidoglikolat hidrolaza [Glycine max]	XP_003556365.1	854	92
gi 593263390	peroksidaza [Glycine max]	NP_001276309.1	582	84
gi 593789404	serinska karboksipeptidaza [Glycine max]	XP_003528538.1	485	84
gi 593797934	alfa-L-arabinofuranozidaza, izooblika X1 [Glycine max]	XP_003521095.1	1255	88
gi 593785175	bakrova oksidaza, izooblika X1 [Glycine max]	XP_003549901.1	1105	92
gi 593795978	beta-fruktofuranozidaza [Glycine max]	XP_003544539.1	1070	89
gi 593705182	kisla fosfataza [Glycine max]	XP_003529064.1	394	79
gi 593689128	poligalakturonaza [Glycine max]	XP_003519755.1	786	88
gi 593699486	protein disulfid izomeraza, izooblika 1 [Glycine max]	XP_003543464.1	934	86

### PRILOGA F2

Homologni proteini neznanih in hipotetičnih glikoproteinov iz listov za kultivar Tiber z uporabo algoritma BLASTP (2012)

Zadražnik T. Proteomska analiza	pri izbranih	kultivarjih navadnega	fižola (Phaseolus	<i>vulgaris</i> L.).
Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ	. v Ljubljani	, Biotehniška fakulteta	, 2014	

NCBI številka neznanega proteina	Homologni protein	NCBI številka homolognega proteina	Vrednost	Podobnost
gi 561036949	prekurzor za proteazo podobno subtilizinu [Glycine max]	NP_001237585.1	1203	80
gi 561021742	UDP-glukoza:glikoprotein glukoziltransferaza [Glycine max]	XP_006585488.1	2887	87
gi 561015499	glicerofosforil diester fosfodiesteraza [Glycine max]	XP_003519608.1	1248	82
gi 561023812	IAA-aminokislinska hidrolaza [Glycine max]	XP_003543612.1	479	89
gi 14139	protein D1 fotosistema II [Nicotiana tabacum]	NP_054477.1	712	99
gi 12592	protein D2 fotosistema II [Agrostis stolonifera]	YP_874721.1	712	99
gi 561014202	aminoacilaza [ <i>Glycine max</i> ]	XP_003543794.1	563	81
gi 561023891	protein disulfid izomeraza [Glycine max]	BAH89252.1	927	89
gi 561027028	"purple" kisla fosfataza, izooblika X2 [Glycine max]	XP_006602367.1	1204	92
gi 561032605	malate dehidrogenaza [Medicago truncatula]	XP_003608327.1	666	91
gi 561005533	homolog L-askorbat oksidaze [Glycine max]	XP_003527501.1	1056	95
gi 561010543	protein tolB [Medicago truncatula]	XP_003630471.1	1055	78
gi 561012615	endo-1,3(4)-beta-glukanaza [Glycine max]	XP_003552568.1	1174	87
gi 561014278	glukan 1,3-beta-glukozidaza, izooblika X1 [Glycine max]	XP_003542524.1	894	84
gi 561005254	protein disulfid izomeraza, izooblika 1 [Glycine max]	XP_003538207.1	915	87
gi 561020673	retikulin oksidaza [Glycine max]	XP_003546281.1	915	85
gi 561032038	prekurzor "purple" kisle fosfataze [Glycine max]	NP_001241258.1	1133	84
gi 147795424	homolog L-askorbat oksidaze [Vitis vinifera]	XP_002270831.1	1088	96
gi 561023397	lizosomska Pro-X karboksipeptidaza, izooblika X1 [Glycine max]	XP_003517871.2	701	76
gi 561011827	brasinosteroid-reguliran protein BRU1 [Glycine max]	XP_003533750.1	470	87
gi 561035469	alfa-L-arabinofuranozidaza, izooblika X1 [Glycine max]	XP_003521095.1	1255	88
gi 561020666	alfa-glukozidaza [ <i>Glycine max</i> ]	XP_003546284.2	1568	83
gi 561029469	/			
gi 561023654	DNA-popravljalni protein DRT100 [Glycine max]	NP_001240925.1	644	93
gi 561034491	beta-fruktofuranozidaza, netopni izoencim [Glycine max]	XP_003544539.1	1070	89

Dokt. disertacija. Ljubijana, Univ. v Ljub	ijam, Biolenmska lakulteta, 2014		
nadaljevanje			
NCBI številka neznanega proteina	Homologni protein	NCBI številka homolognega proteina	Vr
gil561028923 protein HOTHEA	D [Glycine max]	XP 003525734 1	1

številka neznanega proteina	Homologni protein	homolognega proteina	Vrednost	Podobnost
gi 561028923	protein HOTHEAD [Glycine max]	XP_003525734.1	1070	88
gi 561022341	vicianin hidrolaza [Glycine max]	XP_003531423.1	874	83
gi 561027882	glukan endo-1,3-beta-glukozidaza [Glycine max]	XP_003541322.1	939	92
gi 561008641	IAA-aminokislinska hidrolaza [Glycine max]	XP_003530016.1	719	81
gi 561029208	subtilizin proteaza, izooblika X1 [Glycine max]	XP_006579930.1	1385	89
gi 561012062	beta-D-ksilozidaza [Glycine max]	XP_003533205.2	1403	89
gi 561020712	lizosomska beta glukozidaza, izooblika X1 [Glycine max]	XP_003546253.1	1291	93
gi 561009224	homolog L-askorbat oksidaze [Glycine max]	XP_003523207.1	1013	92
gi 255635805	ksiloza izomeraza [Glycine max]	XP_003549495.1	432	100
gi 561023393	lizosomska Pro-X karboksipeptidaza, izooblika X2 [Glycine max]	XP_006573176.1	294	65
gi 561009203	/			
gi 356552527	/			
gi 147811579	beta-glukozidaza [Vitis vinifera]	XP_002281407.1	1048	99
gi 561021963	protein povezan z rezistenco na bolezni/prekurzor za LRR protein [Glycine max]	NP_001235526.1	724	77
gi 561015500	glicerofosforil diester fosfodiesteraza [Glycine max]	XP_003519608.1	1233	80
gi 255645267	bakrova oksidaza podobna SKU5, izooblika X1 [Glycine max]	XP_003549901.1	531	100
gi 561021973	bakrova oksidaza podobna SKS1 [Glycine max]	XP_003523887.2	1096	90
gi 561028982	bakrova oksidaza podobna SKU5, izooblika X1 [Glycine max]	XP_003549901.1	1105	92
gi 561023415	alfa-L-fukozidaza [ <i>Glycine max</i> ]	XP_003541983.1	857	83
gi 561032495	beta-ksilozidaza/alfa-L-arabinofuranozidaza [Glycine max]	XP_003531047.1	1439	93
gi 561028424	kisla fosfataza [Lupinus luteus]	CAD30328.1	726	74
gi 561031156	serinska karboksipeptidaza [Glycine max]	XP_003528538.1	485	84
gi 561017257	ureidoglikolat hidrolaza [Glycine max]	XP_003556365.1	854	92

Zadražnik T. Proteomska analiza	. pri izbranih	kultivarjih navadnega	fižola (Phaseolus	vulgaris L.).
Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ	7. v Ljubljani	, Biotehniška fakulteta	, 2014	

nadaljevanje				
NCBI številka neznanega proteina	N Homologni protein h	ICBI številka nomolognega proteina	Vrednost	Podobnost
gi 363807862	ureidoglikolat hidrolaza [Glycine max] XF	P_003556365.1	855	93
gi 561026264	kisla fosfataza [ <i>Glycine max</i> ] XF	P_003529064.1	394	79