

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Katja BARLE

**PROUČEVANJE PROTEOMA LISTOV KROMPIRJA
(*Solanum tuberosum* L.) KOT ORODJA ZA
OCENJEVANJE VARNOSTI TRANSGENIH
RASTLIN**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Katja BARLE

**PROUČEVANJE PROTEOMA LISTOV KROMPIRJA (*Solanum
tuberosum* L.) KOT ORODJA ZA OCENJEVANJE VARNOSTI
TRANSGENIH RASTLIN**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**STUDY OF PROTEOME OF POTATO LEAVES (*Solanum tuberosum*
L.) AS TOOL TO ASSESS SAFETY OF TRANSGENIC PLANTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani na Oddelku za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo in na Biotehniški fakulteti v Ljubljani na Oddelku za živilsko tehnologijo na Katedri za biotehnologijo.

Študijska komisija dodiplomskega študija biologije je na seji dne 16.6.2006 za mentorico dela imenovala prof. dr. Kristino Gruden in za recenzenta prof. dr. Gregorja Anderluha.

Mentorica: doc. dr. Kristina Gruden
Recenzent: prof. dr. Gregor Anderluh

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentorica: doc. dr. Kristina Gruden
Nacionalnem inštitutu za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo

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

Datum zagovora: 30.8.2007

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

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katja Barle

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

DK UDK 577.2: 582.951 (043.2) = 863

KG varnost transgenih rastlin / proteomika / krompir / dvodimenzionalna elektroforeza

AV BARLE, Katja

SA GRUDEN, Kristina (ment.)

KZ SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2007

IN PROUČEVANJE PROTEOMA LISTOV KROMPIRJA (*Solanum tuberosum* L.)
KOT ORODJA ZA OCENJEVANJE VARNOSTI TRANSGENIH RASTLIN

TD diplomska naloga (univerzitetni študij)

OP IX, 41 str., 3 pregl., 13 sl., 1 pril., 19 vir.

IJ sl

JI sl / en

AI S tem delom smo skušali ugotoviti, ali je proteomika uporabno orodje za ocenjevanje varnosti gensko spremenjenih (GS) rastlin. Proteomika omogoča, da naenkrat dobimo profil mnogih proteinov, ki se v danem trenutku izražajo, brez predhodnega poznavanja tarčnih proteinov. S proučevanjem proteoma lahko lažje detektiramo neželene učinke, ki bi jih lahko povzročila genska modifikacija. Dvo-dimenzionalna elektroforeza (2-DE) lahko loči več tisoč proteinov glede na njihove izoelektrične točke (izoelektrično fokusiranje) in glede na njihove molekulske mase (SDS-PAGE). S pomočjo 2-DE lahko zaznamo spremembe v proteomu kot so nov protein, fuzijski protein, post-translacijska modifikacija ali kakršnakoli sprememba, ki vpliva na izoelektrično točko, molekulsko maso ali pa na količino proteina. Analizirali smo proteom listov ne-GS in GS krompirja (Igor odporen proti krompirjevemu virusu Y). Primerjali smo proteom v listih med različnimi sortami krompirja (Igor, Sante, Desiree) in med biološkimi ponovitvami, da bi ocenili naravno variabilnost v ekspresiji proteinov. Z izbrano metodologijo smo zanesljivo določili 46 identičnih lis med geli. Za ocenitev variabilnosti metode same smo izračunali koeficiente variabilnosti (CV) znotraj tehničnih ponovitev. Naravno variabilnost med biološkimi ponovitvami pri sortah in pri transgenih linijah smo prav tako ocenili s CV-ji. Da pa bi ocenili variabilnost med sortami in med transgeno in netransgeno sorto krompirja, smo naredili različne statistične analize rezultatov in ugotovili, da variabilnost transgenih rastlin ne presega variabilnosti med sortami, lahko pa presega variabilnost med biološkimi ponovitvami znotraj sorte. Proteinsko profiliranje torej lahko predstavlja dopolnitev k tarčnim metodam za oceno tveganja GS rastlin.

KEY WORDS DOKUMENTATION

DN Dn

DC UDC 577.2: 582.951 (043.2) = 863

CX safety of transgenic plants/proteomics/potato/two-dimensional electrophoresis

AU BARLE, Katja

AA GRUDEN, Kristina (supervisor)/ANDERLUH, Gregor (reviewer)

PP SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology

PY 2007

TI STUDY OF PROTEOME OF POTATO LEAVES (*Solanum tuberosum* L.) AS
TOOL TO ASSESS SAFETY OF TRANSGENIC PLANTS

DT Graduation Thesis (University Studies)

NO IX, 41 p., 3 tab., 13 fig., 1 ann., 19 ref.

LA sl

AL sl / en

AB We tried to find out, if proteomics is a useful tool to assess safety of genetically modified (GM) plants. Proteomics allows the simultaneous screening of many expressed proteins without prior identification of target proteins. Unintended effects as a result of genetic modification can be detected by studying plant proteom. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) can separate thousands of proteins according to their isoelectric points (isoelectric focusing) and their molecular masses (SDS-PAGE). With 2-DE we can detect proteome alternations such as a novel protein, fusion protein, post-translational modifications or any other change that affects molecular mass, isoelectric point or quantity of a protein. In this work leave proteome of non-GM and GM potato (Igor resistant to potato virus Y) was analysed. Proteome of different potato varieties (Igor, Sante, Desiree) and among biological samples was compared to assess natural variability of protein expression. 46 identical spots among gels were reliably defined with selected methodology. To assess variability of method itself and to assess natural variability among biological samples average coefficients of variation (CV) were calculated. To assess variability among varieties and between transgenic and non-transgenic variety of potato, different statistical analysis of results were carried out. We found out, that variability of transgenic plants did not overcome variability among varieties, but it might overcome variability among biological samples within variety. Beside target methods proteom profiling can be additional method to evaluate safety of GM plants.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOKUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV.....	IX
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN DELA.....	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1. GS RASTLINE IN NJIHOVA VARNOST	2
2.2 TARČNE ANALIZE VARNOSTI GSO.....	2
2.3 NETARČNE ANALIZE VARNOSTI GSO	3
2.3.1 Opis profilnih metod	4
2.3.1.1 Raven DNA	4
2.3.1.2 Raven mRNA	4
2.3.1.3 Proteinska raven	4
2.3.1.3.1 Dvodimenzionalna elektroforeza (2-DE)	5
2.3.1.3.2 Druge metode	6
2.3.1.4 Raven metabolitov	7
2.3.2 Uporabnost profilnih metod	7
2.4 PRIMERI UPORABE PROTEOMIKE ZA DOLOČANJE VARNOSTI TRANSGENIH RASTLIN.....	7
2.4.1 Ocenjevanje variabilnosti 2-DE	7
2.4.2 Proteom listov GS paradižnika	8
2.4.3 Proteom gomoljev GS krompirja v primerjavi z medsortno variabilnostjo.....	8
2.4.4 Proteom GS <i>Arabidopsis thaliana</i> in njegovih ekotipov	9

3 MATERIAL IN METODE	10
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	10
3.2. KEMIKALIJE	11
3.3 HOMOGENIZACIJA POBRANIH VZORCEV	11
3.4 EKSTRAKCIJA PROTEINOV	11
3.4.1 Ekstrakcija s trikloroocetno kislino (TCA)	11
3.4.2 Ekstrakcija s pufrom Tris/CHAPS (Jamnik in sod., 2006)	11
3.5 MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV	12
3.6 ČIŠČENJE PROTEINOV V EKSTRAKTU Z UPORABO KOMPLETA ZA ČIŠČENJE PROTEINSKIH EKSTRAKTOV ("2-D CLEAN UP KIT").....	13
3.7 REHIDRACIJA IPG-TRAKOV	13
3.7.1 Priprava rehidracijskega pufra	13
3.7.2 Rehidracija IPG-trakov	13
3.8 IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE - IEF (PRVA DIMENZIJA-1D):	14
3.9 URAVNOTEŽENJE IPG-TRAKOV pred SDS-PAGE.....	14
3.9.1 Priprava pufra za uravnoveženje trakov	14
3.9.2 Uravnoveženje trakov	15
3.9.2.1 Prva stopnja uravnoveženja.....	15
3.9.2.2 Druga stopnja uravnoveženja	15
3.10 SDS-PAGE	15
3.10.1 Sestavljanje nosilcev za gel	15
3.10.2 Priprava poliakrilamidnega gela	15
3.10.3 Predpriprava na SDS-PAGE	16
3.10.3.1 Marker velikosti molekul	16
3.10.3.2 Agarozna raztopina.....	16
3.10.3.3 Nanos IPG-trakov na gel	16
3.10.3.4 Priprava 1X SDS elektroforeznega pufra za SDS-PAGE	16
3.10.4 SDS-PAGE	17
3.11 BARVANJE GELOV	17
3.11.1 Fiksacija	17
3.11.2 Barvanje	17
3.11.3 Razbarvanje	18
3.11.4 Spiranje	18
3.12 SLIKANJE GELOV	18
3.13 ANALIZA SLIKE	18

3.14 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV	18
4 REZULTATI.....	20
4.1 OPTIMIZACIJA ANALIZE PROFILA PROTEINOV V LISTIH KROMPIRJA.....	20
4.2 PROTEINSKI PROFILI PO 2-DE	20
4.3 OCENA VARIABILNOSTI DOBLJENIH REZULTATOV ZARADI VARIABILNOSTI V IZVEDBI EKSPERIMENTA IN ZARADI VARIABILNOSTI BIOLOŠKEGA MATERIALA	25
4.4 PRIMERJAVA PROFILA PROTEINOV PRI RAZLIČNIH SORTAH KROMPIRJA, GS LINIJAH IGORJA IN NETRANSFORMIRANEM IGORJU	28
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	34
5.1 RAZPRAVA.....	34
5.1.1 Optimizacija metodologije analize profila proteinov v listih krompirja.....	34
5.1.2 Ponovljivost vzpostavljene metodologije	35
5.1.3 Ovrednotenje variabilnosti med biološkimi ponovitvami in pri različni starosti rastline	36
5.1.4 Ocena varnosti analiziranih GS linij preko proteinskega profiliranja	36
5.2 SKLEPI.....	37
6 POVZETEK	38
7 VIRI	40
ZAHVALA	
PRILOGA	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Lastnosti transformiranih linij Igorja, ki smo jih uporabili v eksperimentih.....	10
Pregl. 2: Oznake vzorcev analiziranih z 2-DE.	20
Pregl. 3: Variabilnost v zastopanosti proteinov v tehničnih ponovitvah eksperimenta in v bioloških ponovitvah eksperimenta, CV-koeficient variabilnosti	27

KAZALO SLIK

Sl. 1: Umeritvena krivulja za merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu.....	12
Sl. 2: 2-DE gel: Primer analize profila proteinov v listih krompirja sorta Desiree (D3).....	21
Sl. 3: 2-DE gel: Primer analize profila proteinov v listih krompirja sorta Igor (I1).....	22
Sl. 4: Prikaz razporeditve normaliziranih volumnov vseh lis pri posameznem eksperimentu.	23
Sl. 5: Analiza slike gela Igor 35bT, s katerim smo primerjali vse ostale gele.	24
Sl. 6: Hierarhično razvrščanje vzorcev in proteinskih lis.....	26
Sl. 7: Primerjava med nespremenjenim Igorjem (povprečno velika rastlina) in GS kloni Igorja (povprečno velika rastlina).	28
Sl.8: PCA.....	30
Sl. 9: Profil pojavljanja lise 109 pri analiziranih vzorcih.....	31
Sl. 10 : Profil pojavljanja lise 212 pri analiziranih vzorcih.....	31
Sl. 11: Profil pojavljanja lise 181 pri analiziranih vzorcih.....	32
Sl. 12: Profil pojavljanja lise 146 pri analiziranih vzorcih.....	32
Sl. 13: ANOVA (Analiza variance).....	33

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

APS: amonijev persulfat

2-DE: dvo-dimenzionalna elektroforeza

BSA: goveji serumski albumin

CBB: Coomassie Brilliant Blue

DTT: ditiotreitol

GS: gensko spremenjen

GSO: gensko spremenjen organizem

HCL: hierarhična razvrstitev

IEF: izoelektrično fokusiranje

IPG: imobiliziran pH gradient

JAA: jodoacetamid

MALDI-TOF: ionizacija tripsinskih fragmentov v matriksu z desorpcijo z laserjem in masnim analizatorjem na čas preleta ionov

MS: masna spektrometrija

PCA: analiza glavnih komponent

pI: izoelektrična točka

PTM: post-translacijske modifikacije

SDS: natrijev dodecil sulfat

SDS-PAGE: NaDS poliakrilamidna gelska elektroforeza

TCA: trikloroocetna kislina

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin

TRIS HCl: 2-Amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propanediol, hidroklorid

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Uporaba in trženje transgenih rastlin za prehrano in krmo danes v svetu močno narašča. Razviti so sistemi za ocenjevanje varnosti take hrane, ki pa temeljijo na analizi nekaterih znanih rastlinskih komponent in analizi samega vstavljenega gena in njegovih produktov. Ključne sestavine kot so makronutrienti, mikronutrienti, antinutrienti, naravni toksini in potencialni alergeni primerjajo s ključnimi sestavinami v netransformirani rastlini. Tak pristop pa ne zajame vseh možnih neželenih učinkov transformacije. Za ta namen bi se lahko uporabljala orodja systemske biologije kot so proučevanje transkriptoma, proteoma ali metaboloma v netransgenih napram transgenim rastlinam.

Pri tem delu bomo skušali ugotoviti razlike v proteomu med transgenimi in netransgenimi listi krompirja sorte Igor. Proteom je set proteinov v tkivu, ki je prisoten v določenem času in pod določenimi pogoji. To so vsi PROTEini, ki jih v danem trenutku izraža genOM.

Pri takih raziskavah je pomembno, da upoštevamo tudi naravno variabilnost proteoma med sortami, ekotipi rastline in biološkimi ponovitvami, saj lahko spremembe v proteomu med transgeno in netransgeno rastlino padejo znotraj območja naravne variabilnosti. Tako lahko potrdimo varnost transgene rastline. Zato bomo pri tem delu primerjali med seboj tudi proteome listov različnih sort krompirja (Sante, Desiree, Igor) in znotraj njih proteome bioloških ponovitev.

1.2 NAMEN DELA

Namen dela je:

- Vzpostaviti sistem za proteomske analize vzorcev krompirja.
- Oceniti uporabnost dvodimenzionalne elektroforeze (2-DE) za določanje razlik v proteomu med transgenimi in netransgenimi listi krompirja in razlik med sortami.
- Spremljati sestavo in dognati razlike v proteomu v ekstraktih listov krompirja (*Solanum tuberosum* L.) pri različnih sortah krompirja in pri transformiranem in netransformiranem krompirju in s tem ugotoviti, kako transformacija vpliva na proteom listov krompirja in če padejo spremembe znotraj naravne variabilnosti.
- Oceniti uporabnost proteomike kot orodja za ocenjevanje varnosti transgenih rastlin v hrani.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da bomo s pomočjo proteomike našli kvantitativne ali kvalitativne spremembe proteoma tako zaradi sortne specifičnosti, kot zaradi biološke raznovrstnosti, možne pa so tudi spremembe zaradi same genske modifikacije. Verjetno bomo zaznali večje razlike v proteomu med sortami, kot pa znotraj njih (biološke ponovitve). Prav tako

bodo verjetno večje razlike med sortami, kot pa med transformirano in netransformirano rastlino. Proteine, katerih izražanje bi pri gensko spremenjenih rastlinah odstopalo, bomo dodatno analizirali.

2 PREGLED OBJAV

2.1. GS RASTLINE IN NJIHOVA VARNOST

GS rastline so rezultat uporabe novejšega molekularno biološkega znanja v žlahtnjenju kmetijskih rastlin. Skupna značilnost GS organizmov (GSO) je ta, da imajo v svojem dednem materialu vključene gene s pomočjo metod genskega inženiringa in ti novi geni imajo zapis za nove proteine, ki pogojujejo neko izboljšano lastnost organizma. Druga skupna lastnost GSO je mednarodno dogovorjena zahteva o obvezni presoji tveganja njihove uporabe, ker je gensko spreminjanje lastnosti relativno nov pristop v vzgoji izboljšanih organizmov in ker zaenkrat razpolagamo le z omejenimi izkušnjami pri uporabi takšnih organizmov. Presoje tveganja eventualnih škodljivih vplivov GSO na zdravje ljudi in na okolje so osrednji predmet mednarodnih sporazumov in nacionalnih predpisov, ki urejajo njihovo uporabo v kmetijstvu, prehrani ter zdravstvu in tako se zagotavlja njihova varna uporaba (Bohanec in sod., 2004).

Pri prvi generaciji transgenih rastlin so se preizkušale predvsem agronomsko pomembne lastnosti, povezane z zmanjševanjem velikih izgub pridelkov zaradi škodljivcev, bolezni, plevelov (toleranca za herbicide, odpornost proti virusom, glivičnim boleznim). V današnjem času vedno bolj spreminjajo tudi nekatere lastnosti pomembne za kakovost pridelkov (druga generacija transgenih rastlin). Dobro poznavanje biokemijskih in genetskih mehanizmov metabolnih poti je omogočilo gensko spremembo upočasnjenega mehčanja plodov (paradižnik), spremembo strukture škroba (krompir) in spremembo razmerja maščobnih kislin v rastlinskih oljih (oljna ogrščica, soja). GSO se uporabljajo tudi za pridelavo posamičnih snovi, ki jih potem uporabljajo v najrazličnejše namene v farmaciji, kozmetiki, industriji. Med novimi lastnostmi, ki jih prinaša tretja generacija transgenih poljščin, omenjajo zlasti odpornost proti mrazu, suši, slanim tlem, izboljšano asimilacijo hranil, izboljšano fotokemično učinkovitost, itd (Bohanec in sod., 2004).

2.2 TARČNE ANALIZE VARNOSTI GSO

Ocenjevanje biološke varnosti gensko spremenjene (GS) hrane temelji na primerjavi GS rastline s tradicionalno gojeno rastlino. Običajno se najprej primerja GS rastlino s starševsko linijo, iz katere je bila vzgojena GS rastlina, in potem še z ostalimi tradicionalno gojenimi sortami ali pa sorodnimi vrstami. Ker so skozi desetletja gojili in se prehranjevali z določenimi rastlinami in ni bilo opaznih negativnih posledic, jih smatrajo kot varna živila sama po sebi (Kok in Kuiper, 2003). Kuiper in sod. (2002a) pa opozarjajo, da tudi tradicionalni produkt lahko vsebuje antinutriente in toksične substance. Antinutrienti so sestavine, ki negativno vplivajo na prebavo makronutrientov ali pa inhibirajo privzem esencijskih elementov iz gastro-intestinalnega trakta v kri (Kuiper in sod., 2003).

Ta princip primerjave GSO z ne-GSO imenujemo Princip stvarne enakovrednosti (Principle of substantial equivalence). Primerjamo ključne sestavine kot so makronutrienti (maščobe, ogljikovi hidrati, proteini), mikronutrienti (vitamini, minerali), antinutrienti, naravni toksini (glikoalkaloidi v krompirju) in potencialni alergeni. Analiziramo tudi komponente za katere vemo, da se zaradi genske manipulacije lahko spremenijo. Npr. poleg zelene proizvodnje nekega produkta, se proizvaja v večji količini še en produkt metabolne poti, ki pa je npr. antinutrient. Preverjamo tudi, če je možen prenos določenih genov iz GS hrane na mikroorganizme v človeškem in živalskem gastro-intestinalnem traktu. Moramo pa se zavedati, da je ta princip primerjave GSO z ne-GSO le začetna in ne končna točka v ocenjevanju varnosti GS hrane. Če ugotovimo razlike v kompoziciji, so potrebne nadaljnje študije. Če je potrebno (opazne mnoge razlike), naredimo dodatne toksikološke teste vse hrane (Kok in Kuiper, 2003).

Če hočemo primerjati GSO z ne-GSO, ju moramo gojiti pod enakimi okoljskimi pogoji (Kok in Kuiper, 2003). Analizirane rastline naj bi rasle na različnih lokacijah in skozi več rastnih sezon, da bi zanesljivo lahko ugotovili spremembe v metabolnih poteh, ki so posledica okolja in GS (Kuiper in sod., 2002a).

2.3 NETARČNE ANALIZE VARNOSTI GSO

S klasično primerjalno analizo posameznih komponent (tarčna analiza) pa ne identificiramo nepričakovanih učinkov GS, saj analiziramo le specifične sestavine in tiste neželene učinke, na katere lahko sklepamo iz predznanja. S klasično primerjavo ne zaznamo in tako ne analiziramo nam nepoznanih antinutrientov ali naravnih toksinov, še posebno, če rastlina ni dobro poznana (Kuiper in sod, 2002a) Ob obsežni genski spremembi lahko pride do indukcije nove metabolne poti (Kuiper in sod., 2000).

Potrebno je narediti splošno, neusmerjeno analizo, da lahko ugotovimo spremembe v obsežni fiziologiji rastline. To je še posebej pomembno pri ocenjevanju varnosti GS rastlin, ki imajo vstavljene multiple gene (Kok in Kuiper, 2003). To so predvsem tiste rastline, ki so jim izboljšali hranilne vrednosti ali pa lastnosti, ki so našemu zdravju koristne (Kuiper in sod., 2003). Kuiper in sod. (2002a) pa poudarjajo, da ti nenačrtovani efekti niso znani le pri uporabi rekombinantnih DNA tehnik, ampak se tudi množično pojavljajo v konvencionalnem gojenju. Pojavljajo se s točkovnimi mutacijami (žarčenje), kot tudi zaradi kromosomskih rekombinacijskih mehanizmov (Kuiper in sod., 2003). Rekombinacijski mehanizmi, homologni in ne homologni, so stalno prisotni v rastlinah. Ti zagotavljajo rastlini novo genetsko variabilnost. Torej omogočajo zelene in neželene spremembe pri gojenju rastlin (Cellini in sod., 2004).

Neželeni efekti pri transformirani rastlini so lahko napovedljivi, če poznamo mesto integracije DNA v gostitelja in funkcijo novega gena v metabolni poti, lahko pa so nenapovedljivi, če teh informacij ne poznamo (Kuiper in sod, 2002a). Stranski efekti genske spremembe ni nujno, da ogrožajo naše zdravje, če se prehranjujemo z GS hrano, a kljub temu jih ne smemo prezreti, ko ocenjujemo tveganje (Cellini in sod., 2004).

Da bi detektirali nenačrtovane efekte pri procesu transformacije, so začeli razvijati nove tehnike. Te tehnike lahko na enkrat analizirajo mnogo večje število komponent, kot tarčne

tehnike. V tem primeru prej ne določimo, katere komponente (npr. le določeni proteini) bomo analizirali. Detektiramo tudi komponente, ki jih ne poznamo (npr. proteine oz. gene z neznano funkcijo) in prav te so lahko pomembna sprememba zaradi genske manipulacije. Te tehnike temeljijo na raziskavi različnih celičnih intergracijskih ravni. Spremembe lahko raziskujemo na ravni genoma (genomika), na ravni genske ekspresije (mRNA) (transkriptomika), na ravni proteinov (proteomika) ali na ravni metabolitov (metabolomika). Končnica »omika« pomeni, da skušajo v raziskavo zajeti celoten set elementov, ki se v določenem času pod določenimi pogoji nahajajo v celici, tkivu, organu. Ker je to trenutno tehnično neizvedljivo, je cilj raziskovalca, da jih zajame v raziskavo čim več. To so profilne (profiling) tehnike, saj na enkrat pokažejo cel profil mRNA, proteinov, itd. Zajamejo velik del biološkega sistema in raziskovalcu pomagajo razumeti, kako sprememba v enem delu sistema vpliva na druge dele sistema in končno na ves sistem (Cellini in sod., 2004).

Pri tarčnih in netarčnih tehnikah preiskujemo naprej le, če obstajajo signifikantne razlike med GSO in ne-GSO, ki segajo izven območja naravne variabilnosti. Pomembno je torej poznati naravno variabilnost komponent znotraj rastlinskih vrst.

2.3.1 Opis profilnih metod

2.3.1.1 Raven DNA

Z analizo insercijskega mesta novega gena v genomu rastline, lahko predvidevamo stranske efekte, ki se pojavijo zaradi vgraditve novega tujega gena v regulatorno ali gensko zaporedje endogenega gena in zmotijo prepis gena (Kok in Kuiper, 2003). V bližnji prihodnosti se bo gotovo tveganje zaradi nenamernih stranskih učinkov genske spremembe zmanjšalo ob uporabi insercije na točno določeno mesto s pomočjo homolognih zaporedij (Kuiper in sod., 2002a).

2.3.1.2 Raven mRNA

Z mikromrežami lahko naenkrat analiziramo ekspresijo velikega števila genov (Kok in Kuiper, 2003). Tehnika temelji na hibridizaciji mRNA na mreže z imobiliziranimi tarčnimi zaporedji, med katerimi vsako odgovarja specifičnemu genu (Kuiper in sod., 2002b).

2.3.1.3 Proteinska raven

Drugačna genska ekspresija (mRNA) zaradi genske spremembe ni nujno, da se odraža v spremembi na proteinskem nivoju. Kuiper in sod. (2000) opozarjajo, da korelacija med mRNA ekspresijo in proteini ni popolna, ker se stopnje pretvorbe individualnih mRNA in proteinov razlikujejo.

Najbolj direktna metoda za proučevanje sprememb pri proteinih je analiza proteoma določenega tkiva. Proteomika je študija celotnega seta proteinov prisotnega v celici, organizmu ali tkivu pod definiranimi pogoji in v določenem času (Kuiper in sod., 2003). Za razliko od genoma, se proteom stalno spreminja in je odvisen od celičnega cikla, okoljskih vplivov in tipa tkiva (Ruebelt in sod., 2006a). Analiza proteoma omogoči detekcijo novih

proteinov ali pa spremembe v koncentraciji obstoječih proteinov (Kuiper in sod., 2002a). S pomočjo proteomike ugotavljamo tudi post-translacijske modifikacije (PTM) v vzorcih, ki so bili GS ali pa so bili izpostavljeni vplivom različnih okoljskih dejavnikov (Kuiper in sod., 2003). Glikozilacija in fosforilacija vstavljenega genskega produkta lahko povzročita drugačno aktivnost ali stabilnost proteinov. Lahko celo vplivata na alergeni potencial proteinov (Kuiper in sod., 2000).

Encimi kontrolirajo nastanek celičnih metabolitov (maščobe, ogljikovi hidrati...) in komponent, ki so esencialne, koristne ali celo škodljive za naše zdravje. S pomočjo proteomike lahko ugotovimo, kateri encimi se bolj ali manj izražajo v GSO in iz tega sklepamo, kako to vpliva na produkte njihovih reakcij (Cellini in sod., 2004). Proteini so lahko vpleteni v sintezo toksinov ali antinutrientov ali pa so sami toksini, antinutrienti ali pa alergeni. Torej, če genska sprememba vpliva na genom (inercialna mutacija) ali pa na regulacijo genov (pleiotropični efekt) v rastlini, lahko pride do spremembe metabolne poti ali pa se producira nov protein (vstavljen genski produkt, fuzija proteinov, aktivacija tihega gena) in tako to spremembo opazimo na proteomu rastline (Ruebelt in sod., 2006a).

Na nivoju proteomike lahko s pomočjo proteinskih čipov proučujemo tudi protein-protein interakcije, kar nam da dodatno informacijo o funkciji (Hirano in sod., 2004). Lahko pa kombiniramo analizo proteinov z uporabo protiteles ter tako lažje detektiramo in identificiramo specifične proteine iz proteoma (ang. "immunoblotting"). To je pomembno za detekcijo alergenov (v hrani, cvetni prah) z uporabo bolnikovega antiseruma (Callini in sod., 2004). Proteomika je bila uspešno uporabljena v medicini, predvsem v onkologiji (Kuiper in sod., 2000).

2.3.1.3.1 Dvodimenzionalna elektroforeza (2-DE)

Najbolj uporabna metoda za ločevanje proteinov je 2-DE, ki na enkrat lahko loči veliko število proteinov glede na izoelektrično točko (1.dimenzija) in molekulsko maso (2. dimenzija). Možna je separacija proteinov z molekulsko maso od 10 do 300 kDa. Iz gela izrežemo proteinske lise, ki nas zanimajo (npr. tiste, ki se močneje izražajo pri GS rastlini). Sledi razgradnja le teh v fragmente s specifičnimi proteazami. Te fragmente analiziramo z masno spektrometrijo (MS) in jih identificiramo s pomočjo podatkovnih baz (Kuiper in sod., 2003).

Problem predstavlja kvantifikacija proteinov, saj z 2-DE lahko detektiramo le močneje izražene proteine (barvanje z Coomassie brilliant blue, najmanj 100 ng). Omejeno je tudi linearno območje kvantifikacije proteinov (barvanje s srebrovim nitratom) (Kuiper in sod., 2003). Uporaba fluorescentnih barvil pa je detekcijo izboljšala, saj ta barvila zaznajo majhne količine proteinov (1-10 ng) in imajo široko linearno območje za kvantifikacijo, v obsegu treh velikostnih razredov (Cellini in sod., 2004). Nekatera izmed fluorescentnih barvil pobarvajo vse proteine, lahko pa uporabljamo fluorescentna barvila, ki se vežejo le na fosfo- ali gliko-proteine. S tem dobimo boljši vpogled v PTM.

Problem je tudi v tem, da dva replikata 2-D gelov nista nikoli identična (priprava vzorca, potek elektroforeze). Kljub temu, da uporabljamo program za lažjo analizo slike, je točno ujemanje lis med dvema geloma težavno. Diferencialna gelska elektroforeza je nekoliko

boljša, saj lahko dva vzorca, ki sta označena z različnimi fluorescenčnimi barvili, istočasno ločimo na enem gelu (Cellini in sod., 2004).

Proteine lahko identificiramo z ujemanjem 2-DE slik z obstoječimi 2-DE podatkovnimi bazami. Predpogoj je seveda, da so metode in protokoli (npr. izolacija proteinov) standardizirani. Na žalost je javno dostopnih le majhno število 2-DE podatkovnih baz za proteom rastlin (Cellini in sod., 2004).

Glavna metoda za identifikacijo proteinov ločenih z 2-DE je ionizacija tripsinskih fragmentov v matriksu z desorpcijo z laserjem (MALDI) in masnim analizatorjem na čas preleta ionov (TOF). S to metodo tudi lažje zaznamo PTM. Z MALDI-TOF lahko določimo mase peptidov, ki smo jih dobili z razgradnjo posameznega proteina izoliranega iz gela. Peptide glede na maso lahko identificiramo s pomočjo proteinskih podatkovnih baz, ki so jih raziskovalci pripravili iz eksperimentalnih podatkov na proteinih ali pa teoretično iz zaporedij genoma (Cellini in sod., 2004).

Detekcija razlik med GSO in ne-GSO je lahko težavna, saj delamo z zelo velikim številom proteinov, ki v večini niso povezani s spremembami zaradi genske manipulacije. Ob analizi bi bilo potrebno poznati proteinske profile, ki se razlikujejo zaradi naravne variabilnosti, zaradi različnih okoljskih pogojev. To znanje je omejeno. Morda bi bilo uporabno, da se osredotočimo na proteine vpletene v pomembne metabolne poti. Zanimive možnosti ponuja kombinacija imunoprenosa (ang. "immunoblotting") in proteinskih mikromrež (Kuiper in sod., 2003).

Z 2-DE so raziskovalci ločili na enem gelu do 10.000 različnih proteinov, kar je po količini podobno ocenjenemu številu proteinov, ki se izražajo v evkariontski celici. Kljub temu, da z 2-DE lahko ločimo veliko število proteinov, je za določene vzorce in optimalno identifikacijo proteinov potrebno proteom danega vzorca razdeliti v subproteome. Proteine lahko ekstrahiramo iz specifičnih subceličnih kompartmentov ali pa glede na njihovo topnost. Subcelične frakcije pokažejo kvalitativne in kvantitativne razlike v njihovih proteinih in tudi olajšajo izolacijo (Cellini in sod., 2004).

Kako popolna bo ekstrakcija proteinov, je odvisno iz česa ekstrahiramo (rastlina, tkivo, celični kompartment, proteinske strukture). Običajno se izgubijo hidrofobni in zelo veliki/majhni ter zelo bazični/kisli proteini (Cellini in sod., 2004).

Pri uporabi proteomike je pomembna standardizacija za pripravo vzorca, potek elektroforeze (npr. količina nanosa vzorca), saj že zelo majhne variacije v tem postopku z mnogimi koraki lahko močno vplivajo na dobljen proteinski vzorec. Na proteinske profile vpliva mnogo dejavnikov, ki otežujejo primerjave, ponovljivost in detekcijo neželenih efektov v GSO. Ti dejavniki so razvojni proces, genetski, agronomski in okoljski faktorji ali režimi shranjevanja (Cellini in sod., 2004).

2.2.1.3.2 Druge metode

Razvijajo se še alternativne metode za kvantifikacijo proteinov na osnovi izotopskega označevanja in direktne analize – ločevanja, kvantifikacije in identifikacije z masno

spektrometijo. V razvoju je tudi multidimenzionalna tekočinska kromatografija združena z tandemsko MS (Kuiper in sod., 2003). Napredki so vidni tudi pri izdelavi in uporabi proteinskih mikromrež, ki naj bi bila komplementarna metoda 2-DE.

2.3.1.4 Raven metabolitov

Spremembe v fiziologiji celice lahko analiziramo tudi na ravni metabolitov. Analiziramo primarne in sekundarne metabolite. Uporabljamo plinske in tekočinske kromatografije v kombinaciji z MS ali pa nuklearno magnetno resonanco (Kok in Kuiper, 2003).

2.3.2 Uporabnost profilnih metod

Profilne metode še niso dosegle statusa rutinske uporabe. Potrebna je standardizacija priprave vzorca, validacija metod in uspešna interpretacija velikih setov dobljenih podatkov (Kuiper in sod., 2002a). Analiza profilov med GSO in ne-GSO mora bazirati na vseh potencialnih razlikah med njima. Zato uporabljamo multivariantne tehnike, kot je analiza glavnih komponent (PCA). Potrebno je urediti podatkovne baze, ki vsebujejo mRNA, proteinske profile in profile metabolitov, ki odsevajo različne razvojne stopnje in različne okoljske razmere. Potrebno je poenotenje med laboratoriji (Kuiper in sod., 2003).

2.4 PRIMERI UPORABE PROTEOMIKE ZA DOLOČANJE VARNOSTI TRANSGENIH RASTLIN

2.4.1 Ocenjevanje variabilnosti 2-DE

V študiji na semenih *Arabidopsis thaliana* so najprej ocenili vpliv posameznih faz postopka analize profila proteinov z 2-DE. Ugotovili so, da 2-DE loči proteine z izoelektrično točko (pI) med 4 in 9 in molekulsko maso od 6 do 120 kDa in je dovolj občutljiva, da z njo detektiramo koncentracije proteinov v nanogramih. Ločba proteinov je zanesljiva z majhno relativno pozicijsko variacijo 1,7 % za pI in 1,1 % za molekulsko maso (Ruebelt in sod. 2006a).

Variabilnost v številu lis med geli je večja kot pa med ekstrakti. Večja variabilnost se torej pojavi zaradi 2-DE same in ne toliko zaradi priprave vzorca. Pri 2-DE se namreč pojavljajo problemi pri fokusiranju (črte ne pike), efekti robov (deformiran vzorec) in šibke lise na robu meje detekcije. To so lise za katere ne vemo, če so morda le neuporabno ozadje. Povprečni koeficient variabilnosti v kvantiteti med 254 enakimi lisami med geli je bil 24,8 % po analizi istega ekstrakta z različnimi 2-DE in le 1,4 % po analizi neodvisno pripravljenih ekstraktov (Ruebelt in sod., 2006a).

Linearni odnos med količino proteina in volumnom lise sega čez 100-kratno količino za večino izbranih proteinov. Vsi proučevani proteini pa so imeli linearni odgovor vsaj do 25-krat večje količine (barvanje z coloidnim Coomassie brilliant blue) (Ruebelt in sod., 2006a).

2.4.2 Proteom listov GS paradižnika

Ko so primerjali 2-DE gele GS paradižnika in ne-GS paradižnika niso opazili kvalitativnih razlik. Ni se pojavila nova lisa, nobena lisa ni bila odsotna in nobena ni spremenila svojega položaja. Na gelu pobarvanim s Coomassie brilliant blue (CBB) so 40-im lisam izmerili količino proteinov. Niso opazili statistično značilnih razlik v količini proteinov med GSO in ne-GSO (Corpillo in sod., 2004).

Med 40 proteini so lahko iz podatkovne baze identificirali 15 proteinov. Večino proteinov, ki so jih identificirali je bilo vpletenih v energetske procese celice. Ker so se izražali v enaki meri v GS in ne-GS rastlini, ekspresija tujega gena očitno ni spremenila energetskih potreb rastline. Zaznali so tudi razpotegnjeno liso, ki naj bi predstavljala protein RuBisCO, ki se močno izraža v listih in se tako pojavlja kot široka razpotegnjena črta in ne kot lisa (Corpillo in sod., 2004).

Ugotovili so tudi, da se s tako preprosto tehniko nekatere razlike ne zaznajo. Namreč na gelu s proteini iz GSO niso opazili lise, ki naj bi predstavljala NPT II protein, katerega gen je bil vnesen za selekcijo GSO. Očitno 2-DE ni dovolj občutljiva metoda, da bi zaznala nekatere manj zastopane proteine (Corpillo in sod., 2004).

2.4.3 Proteom gomoljev GS krompirja v primerjavi z medsortno variabilnostjo

Pri tej analizi so skupaj detektirali 1932 različnih proteinov. Opazili so jasne kvalitativne in kvantitativne razlike v proteinskih profilih med genotipi. Najbolj značilne razlike so se pojavile pri proteinih z Mr med 40000 do 45000 in pI med 4.5 do 5.5. To so proteini, ki predstavljajo različne izoforme patatina, ki je glavni založni protein v gomolju krompirja. Med vsemi genotipi se je po kvantiteti razlikovalo kar 1077 od 1111 skupnih proteinov pri vseh genotipih. Približno 600 proteinov pa se je izrazilo le v enem ali pa malo genotipih. Te niso preiskovali naprej (Lehesranta in sod., 2005).

Na 393 lisah so naredili analizo glavnih komponent (PCA) in ugotovili, da lahko razlikujejo genotipe, ni pa možno ločiti med transgenima linijama in kontrolnim Desiree-jem. S tem so ponovno potrdili večjo variabilnost med ne-GS genotipi kot pa med GS linijami in kontrolami. Še posebej so bile opazne razlike med sortami *Solanum tuberosum* napram trem *Solanum phureja* genotipom. Z MS so identificirali 77 proteinov. Večino teh identificiranih proteinov je bilo na 2-DE gelih prisotnih v veliki količini in mnoge so klasificirali v funkcionalne skupine (energetski metabolizem, zaloga, bolezenski/obrambni odgovori). Razlike v koncentraciji proteinov povezanih z obrambo so lahko bile posledica okoljskih pogojev pri poljskem poskusu (Lehesranta in sod., 2005).

Profili med GSO in ne-GSO se kvalitativno niso razlikovali. Kvantitativno se je razlikovalo le 9 lis od 730. 7 od teh so identificirali. To so bili proteini povezani z obrambo, založni proteini in nekateri z neznano funkcijo (Lehesranta in sod., 2005).

Preseneča jih, da niso opazili večjih sprememb v proteinskem vzorcu GS rastlin, ker so nekatere linije vsebovale slabotne rastline z nizkim pridelkom gomoljev. Ugotovili so 9 proteinov z izražanjem v drugačni meri, kar je malo. Potrebno bi bilo opazovanje skozi več

let in pod različnimi klimatskimi pogoji, da bi lahko potrdili prisotnost teh nenačrtovanih efektov (Lehesranta in sod., 2005).

2.4.4 Proteom GS *Arabidopsis thaliana* in njegovih ekotipov

V vseh 12 ekotipih so ločili 931 različnih proteinskih lis (od 573 do 653 na vsak ekotip). 36 % od vseh lis je bilo prisotnih pri vseh ekotipih, 64 % pa jih je variiralo. To pomeni, da so bile odsotne vsaj v enem ekotipu. 27 % od vseh lis je bilo specifičnih. To so tiste lise, ki so se pojavile le v enem izmed 12 ekotipov, ali pa so bile odsotne le v enem izmed 12 ekotipov. Opazili so tudi premike določenih lis v izoelektrični točki med različnimi ekotipi. 95 % lis, ki so bile prisotne pri vseh ekotipih, se je razlikovalo v kvantiteti (2 do 53-krat večja količina) (Ruebelt in sod., 2006b).

Proteom semen GS linij so primerjali s proteomom starševske linije in tudi s proteomi 12 ekotipov *Arabidopsis thaliana*. Ugotovili so, da genske modifikacije niso povzročile nenačrtovanih sprememb na proteomu. Razlike v kvantiteti proteinov med transgeno in netransgeno linijo so bile znotraj vrednosti naravne variabilnosti pri 12 ekotipih ali pa so bile povezane z vstavljenim genskim produktom (Ruebelt in sod., 2006c).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Krompirjev virus Y NTN izolat (PVY^{NTN}) povzroči obročkasto nekrozo gomoljev krompirja (Stanič Racman in sod., 2001). Za poskusu smo uporabili sorte: Desiree, Sante, Igor. Desiree je sorta krompirja, ki je dovzetna za PVY^{NTN}, vendar ne kaže izrazitih simptomov okužbe. Sante je sorta krompirja, ki ima gen za rezistenco na PVY. Ta gen so vnesli v vrsto *Solanum tuberosum* iz sorodne vrste *Solanum stoloniferum* s križanjem. Igor je dovzetan za krompirjev virus Y in kaže izrazite simptome okužbe.

Rezistenco se lahko vnese tudi z genskim inženiringom. Sorto Igor so na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) transformirali z genom plaščnega proteina PVY^{NTN}. Gen so vnesli s pomočjo *Agrobacterium tumefaciens*. S transformacijo je Igor postal odporen proti temu virusu. Rezistenca se izraža na ravni mRNA. Gre za fenomen post-transkripcijskega utišanja genov (Stanič Racman in sod., 2001). Zaradi izražanja mRNA vstavljenega plaščnega proteina virusa, se sproži mehanizem rastlinske obrambe proti tuji mRNA in ta mehanizem razgradi virusno mRNA. Če torej okuži rastlino nov virus, se njegova mRNA razgradi (Bohanec in sod., 2004).

Transformirane linije, ki smo jih izbrali za študijo se razlikujejo po številu insercij gena v genom, po količini transkripta trangenina in po fenotipu.

Preglednica 1: Lastnosti transformiranih linij Igorja, ki smo jih uporabili v eksperimentih.

Št. linije	35	27
Št. insertov	3	1
Količina mRNA (glede na referenčno linijo*)	5 %	0 %
Lastnosti	rezistenten	občutljiv

*Referenčna linija: mRNA vstavljenega gena se izraža v največji količini (100%).

Različne sorte krompirja in GS linije Igor-ja so bile vzgojene v tkivni kulturi v pogojih konstantne svetlobe in temperature. Eno rastlino vsake sorte in transformirane linije so namnožili v 12 rastlin v tkivni kulturi. Iz nje so bile rastline presajene v lončke z zemljo in prenešene v rastlinjak. Vsako sorto in vsako GS linijo je torej predstavljalo 12 rastlin krompirja, od katerih smo za poizkus izbrali 9 rastlin.

Pri sortah Desiree, Sante, Igor smo pobirali tri tedne stare rastline. Pri sorti Desiree in Sante smo naredili tri biološke ponovitve (trije vzorci). Eno biološko ponovitev so predstavljali trije sredinski listi, pobrani pri treh rastlinah. Igor pa je imel le eno biološko ponovitev. Rastline smo slikali s fotoaparatom.

Transgene linije Igorja in dodatne biološke ponovitve netransgenega Igor-ja smo pobirali po štirih tednih rasti v rastlinjaku. Vsak klon in netransgena linija Igor-ja je imela 3

biološke ponovitve (trije vzorci). Eno biološko ponovitev so predstavljali trije sredinski listi, pobrani pri treh rastlinah. Rastline smo slikali s fotoaparatom.

3.2. KEMIKALIJE

Proizvajalec vseh kemikalij je Sigma, razen če je ob imenu kemikalije naveden drug proizvajalec.

3.3 HOMOGENIZACIJA POBRANIH VZORCEV

Za vsak vzorec smo stehali količino materiala. Material smo homogenizirali v terilnici s tekočim dušikom. Homogenizirane vzorce smo spravili v epruvetah v zmrzovalnik na -80°C .

3.4 EKSTRAKCIJA PROTEINOV

3.4.1 Ekstrakcija s trikloroacetno kislino (TCA)

Priprava ekstrakcijskega pufra s TCA:

20 % (m/v) TCA 0,2 % DTT Aceton

Postopek ekstrakcije:

K 150 mg homogeniziranega materiala vzorca smo dodali 1200 μl pufra s TCA in 150 μl ekstrakcijskega pufra Tris/CHAPS (Jamnik in sod., 2006). Čez noč smo shranili na -20°C . Naslednji dan smo centrifugirali 30 min pri 14.500 obr/min. Nato smo pelet proteinov 2-krat spirali, da smo iz vzorca odstranili TCA: supernatant smo odstranili in peletu dodali 1 ml acetona z 0,2 % DTT- jem. Nato smo na vrtinčniku mešali 1 min, počakali 1 min, odstranili raztopino acetona in DTT-ja, ponovno dodali 1 ml iste raztopine, vrtinčili 1 min in odstranili raztopino. Sledilo je kratko centrifugiranje, da smo odstranili ostanke raztopine. Mikrocentrifugirko s peletom smo pustili nekaj časa odprto, da se je pelet posušil. Nato smo dodali 100 μl bidestilirane vode (ddH_2O) in vrtinčili, da bi se pelet raztopil. Ker se pelet ni raztopil smo dodali še 100 μl ekstrakcijskega pufra Tris/CHAPS (Jamnik in sod., 2006) in vrtinčili 20 min. Pelet se kljub temu ni dokončno raztopil.

3.4.2 Ekstrakcija s pufrom Tris/CHAPS (Jamnik in sod., 2006)

Priprava ekstrakcijskega pufra (Jamnik in sod., 2006):

40 mM Tris HCl pH 8 2 % (m/v) CHAPS 65 mM DTT ddH_2O

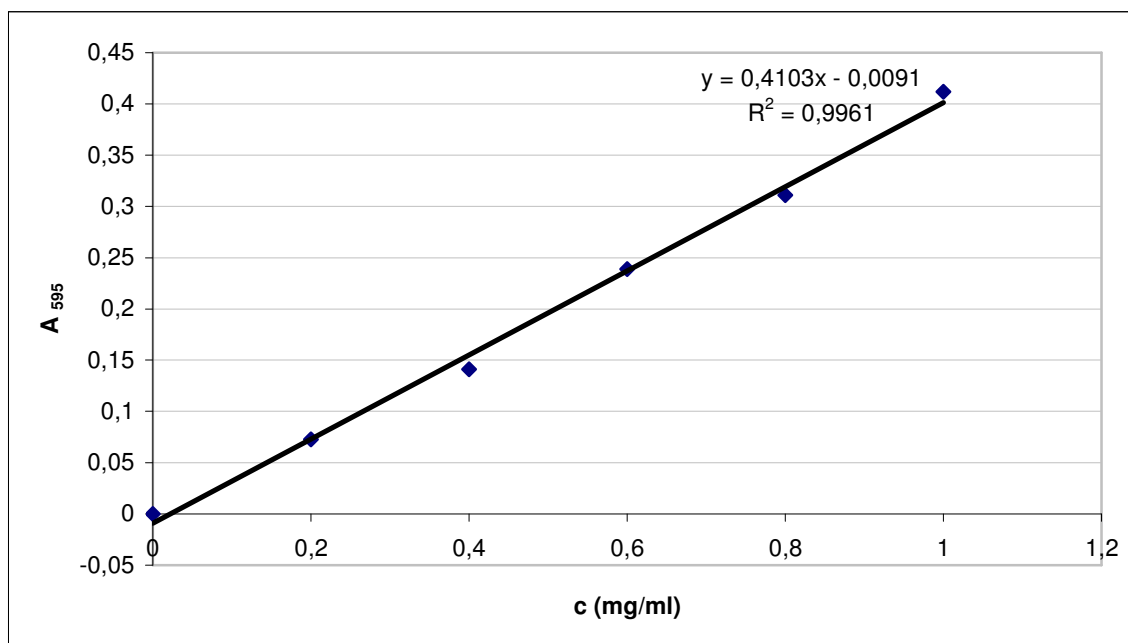
Postopek ekstrakcije:

V mikrocentrifugirko smo zatehtali 250 mg homogeniziranega materiala vzorca, dodali 500 μ l ekstrakcijskega pufra, vrtnčili 30 s, centrifugirali 10 min pri 14.500 obr/min, odpipetirali supernatant v novo mikrocentrifugirko, sediment zavrgli. Supernatant smo še enkrat centrifugirali za 2 min, da so se usedli delčki rastline, ki smo jih prej pomotoma odpipetirali s supernatantom. Po drugem centrifugiranju smo supernatant ponovno odpipetirali v novo mikrocentrifugirko, sediment pa zavrgli.

3.5 MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV

Koncentracijo proteinov smo merili po Bradfordu (Quick start Bradford protein assay. Bio-Rad. 2000).

Naredili smo umeritveno krivuljo koncentracije BSA : 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/ml. 5 μ l vsake raztopine z različno koncentracijo BSA smo odpipetirali v vdolbinico v mikrotitrski ploščici (ravno dno, transparentna) (Greiner). Barvilo (Coomassie brilliant blue G-250) smo 5-krat redčili z 0.15 M NaCl in ga po 250 μ l dodali k vsaki redčitvi. Ekstrate vzorcev smo 5-krat redčili, da so absorpcije padle v območje umeritvene krivulje. Nato smo v vdolbinice na mikrotitrski ploščici odpipetirali 5 μ l redčenega ekstrakta in 250 μ l redčenega barvila. Slepri vzorec je predstavljal 5-krat redčen pufer. Absorpcijo smo izmerili na spektrofotometru (TECAN) pri valovni dolžini 595 nm. Narisali smo umeritveno krivuljo in po enačbi umeritvene krivulje izračunali koncentracijo proteinov v ekstraktu.



Slika 1: Umeritvena krivulja za merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu. BSA je bil uporabljen kot standard.

3.6 ČIŠČENJE PROTEINOV V EKSTRAKTU Z UPORABO KOMPLETA ZA ČIŠČENJE PROTEINSKIH EKSTRAKTOV ("2-D CLEAN UP KIT") (Amersham Pharmacia Biotech)) (Stasyk in sod., 2001)

Ekstrakt smo redčili z ekstrakcijskim pufrom Tris/CHAPS tako, da smo dobili koncentracijo proteinov 1 g/l. 200 μ l redčenega ekstrakta smo dali v 2-ml mikrocentrifugirko (vsebnost proteinov: 200 μ g). Dodali smo 3-kratni volumen precipitanta (600 μ l), premešali na vrtničniku, inkubirali 15 min na ledu. Nato smo dodali 3-kratni volumen ko-precipitanta (600 μ l), premešali na vrtničniku in centrifugirali pri 10.000 g 10 min in 4 °C. Odstranili smo supernatant, dodali 80 μ l ko-precipitanta in inkubirali 5 min na ledu. Nato smo centrifugirali pri 10000 g 10 min in 4 °C. Odstranili smo supernatant, dodali 50 μ l ddH₂O, premešali na vrtničniku, da se je sediment resuspendiral. Dodali smo 1 ml pufru za izpiranje (hlajen pri temperaturi – 20 °C) in 5 μ l aditiva, premešali na vrtničniku. Inkubirali smo 30 min pri temperaturi – 20 °C. Vsakih 10 min smo vzorec premešali na vrtničniku. Centrifugirali smo pri 10000 g 10 min in 4 °C. Odstranili smo supernatant. Bel sediment smo sušili na zraku največ 5 min. Ker smo potrebovali za rehidracijo trakov z imobiliziranim pH gradientom (IPG-trakov) 150 μ g proteinov v 250 μ l rehidracijskega pufru, smo raztopili sediment (200 μ g proteinov) v 333 μ l rehidracijskega pufru in mešali na vrtničniku, da se je sediment popolnoma raztopil. Na sobni temperaturi smo pustili stati 2 min. Centrifugirali smo pri 10000 g 10 min pri 20 °C. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, če smo opazili sediment.

3.7 REHIDRACIJA IPG-TRAKOV

3.7.1 Priprava rehidracijskega pufru

7 M urea 2 M tiourea 2 % (m/v) CHAPS 2 % (v/v) IPG-pufer pH 3-10 (100%) bromofenol modro ddH ₂ O
--

25 ml rehidracijskega pufru smo razdelili v 12 alikvotov po 2 ml v mikrocentrifugirke in jih shranili na – 20 °C.

18 mM DTT

DTT smo dodali tik pred uporabo rehidracijskega pufru v 2 ml mikrocentrifugirko.

V rehidracijskem pufru so proteini popolnoma raztopljeni, denaturirani in v reduciranem stanju, kar omogoči najboljše izoelektrično fokusiranje.

3.7.2 Rehidracija IPG-trakov

V režo na plošči za rehidracijo (Amersham Pharmacia Biotech) smo nanесли 250 μ l rehidracijskega pufru z raztopljenimi proteini. Zmrznjenemu IPG-traku (pH 3-10, dolžina 13 cm) smo odstranili folijo z gela in položili trak z gelom navzdol v režo na rehidracijski

pufu. Pufu je moral biti enakomerno porazdeljen pod trakom. V režo na trak smo nanesti 3 ml mineralnega olja, ki je preprečil kristalizacijo ureje in evaporacijo vode v rehidracijskem pufu. Pokrili smo s pokrovom in pustili, da se trakovi čez noč rehidrirali.

3.8 IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE - IEF (PRVA DIMENZIJA-1D):

Uporabljali smo elektroforetsko enoto Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech). IEF loči proteine po njihovih izoelektričnih točkah (pI). Proteini s pozitivnim nabojem potujejo proti katodi (negativno nabita). Postajajo vedno manj pozitivno nabiti, ko se premikajo skozi imobiliziran pH gradient. Ustavijo se pri svojih pI, ko je njihov neto naboj nič. Negativno nabiti proteini pa potujejo proti anodi (pozitivno nabita) in se prav tako ustavijo pri svojih pI (Berkelman in Stenstedt, 1998).

Na ploščo, ki zagotavlja konstantno temperaturo 20 °C med potekom IEF, smo nanesti 4-krat po 1 ml mineralnega olja v vertikalnih črtah. Na to ploščo z oljem smo položili steklen podstavek z elektrodnimi priključki, kamor smo vlili 10 ml mineralnega olja in vanj položili plastično ploščo z vdolbinami. S traku smo z ddH₂O sprali proteine, ki niso vstopili v gel. Trak smo popivnali na brisači in ga z gelom navzgor položili v vdolbino na plošči. Označeni plus konec traku smo obrnili proti anodni strani (zgoraj). Odrezali smo dva okrog 4 cm dolga elektrodna trakova, ju omočili z ddH₂O in popivnali na brisači. En elektrodni trak smo položili na plus in enega na minus konec gela na rehidriranem traku. Na sredino elektrodnih trakov smo vpeli elektrode (zgoraj anoda, spodaj katoda), ki so bile tako preko elektrodnih trakov povezane z gelom na traku. Trakove smo prelili s 150 ml mineralnega olja in pokrili s pokrovom.

Povezali smo z usmernikom EPS 3501 XL (Amersham Pharmacia Biotech), na katerem smo nastavili 3 faze:

1. faza: 300 V, 5 mA, 5 W, 1 min;
2. faza: 3500 V, 5 mA, 5 W, 1 ura 30 min;
3. faza: 3500 V, 5 mA, 5 W, 4 ure.

Ko je električni tok tekkel čez trakove, je barvilo bromofenol modro, ki je v rehidracijskem pufu, potovalo proti anodi. Po končanem IEF, smo trakove zavarili v prozorno mapo in jih spravili na – 80 °C.

3.9 URAVNOTEŽENJE IPG-TRAKOV pred SDS-PAGE

3.9.1 Priprava pufra za uravnoteženje trakov

6 M urea
2 % (m/v) SDS
30 % (v/v) glicerol
75 mM Tris HCl, pH 8,8
bromofenol modro
ddH ₂ O

100 ml pufru za uravnoteženje zadošča za 4 trakove.

*SDS je anionski detergent, ki s proteini tvori komplekse, ki so negativno nabiti. Količina vezanega SDS na proteine je premosorazmerna masi proteina (Berkelman in Stenstedt, 1998).

3.9.2 Uravnoteženje trakov

3.9.2.1 Prva stopnja uravnoteženja

V epruveto smo zatehtali 0,2 g DTT in dodali 20 ml pufru za uravnoteženje. To smo razdelili v dve epruveti po 10 ml. Vzeli smo 2 trakova iz zmrzovalnika (dva na enkrat lahko damo na SDS-PAGE), ju vsakega dali v svojo epruveto s pufrom za uravnoteženje z DTT in zatesnili z zamaškom. Uravnoteženje je potekalo 15 min med stalnim mešanjem.

3.9.2.2 Druga stopnja uravnoteženja

V novo epruveto smo zatehtali 0,96 g jodacetamida (JAA), dodali 20 ml pufru za uravnoteženje, dobro premešali, razdelili po 10 ml v dve epruveti in dali trakova po prvi stopnji uravnoteženja še v pufer z JAA za 15 min.

3.10 SDS-PAGE

3.10.1 Sestavljanje nosilcev za gel

Med dve stekleni plošči smo dali na levo in desno stran distančnika. Stekleni plošči smo vpeli v nosilca z vijaki in jih zatesnili. S stiščki smo to vpeli v spodnji nosilec. Enako smo pripravili za drugi gel.

3.10.2 Priprava 12 % poliakrilamidnega gela (debelina 1 mm, velikost: 14×15 cm)

Za pripravo dveh gelov potrebujemo:

1.5 M raztopina Tris HCl, pH 8,8	9,8 ml
raztopina akrilamida / bisakrilamida (30 % / 0,8%)	15,7 ml
ddH ₂ O	13 ml
10 % (m/v) raztopina SDS	0,4 ml

Raztopino smo zmešali in dali za 10 min v ultrazvočno kopel (Sonis-Pio), da se je raztopina odzračila. Nato smo dodali raztopino APS in TEMED:

10 % (m/v) APS raztopina	195 µl
TEMED	13 µl

Raztopino smo previdno zmešali.

Med stekleni plošči smo vlili 19 ml gela, na vrh gela dolili ddH₂O do 1 cm pod vrhom steklenih plošč. Enako smo naredili za drugi gel. Pustili smo, da sta oba gela dokončno polimerizirala (vsaj 2 uri). Nato smo z vrha gela odlili vodo in s sušilnikom posušili ostanke vode.

Z 12 % gelom lahko ločimo proteine z molekulsko maso med 14 in 116 kDa.

3.10.3 Predpriprava na SDS-PAGE

3.10.3.1 Marker velikosti molekul – raztopina proteinov znanih molekulskih mas za SDS-PAGE (14,4 kDa-116 kDa) (Fermentas).

Marker smo vzeli iz zmrzovalnika (– 20 °C), ga segreli v roki in ga 5 µl odpipetirali na filter papir (5 x 5 mm). Ker smo delali dva gela hkrati, smo nanegli marker na filter papir še za drugi gel. Marker smo nanegli na levo stran gela.

3.10.3.2 Agarozna raztopina

Pripravili smo 0,5 % agarozno raztopino:

agarozna 1X SDS pufer bromofenol modro
--

Segreli smo v mikrovalovni pečici, da se je agarozna raztopila, nalili v epruvete (cca. 11 ml) in spravili na sobni temperaturi za kasnejšo uporabo.

Za dva gela smo porabili 1 epruveto z agarozno raztopino: V mikrovalovni pečici smo jo segreli in jo nanegli na oba gela do roba steklenih plošč. Do nanosa smo dali epruveto s segreto raztopino na 80 °C v termokopel, da se agarozna raztopina ni strdila.

3.10.3.3 Nanos IPG-trakov na gel

Uravnotežena trakova smo vzeli iz epruвет, jima odrezali končne plastične dele in ju položili na gela. Z injekcijsko iglo smo si pomagali potisniti trak skozi agarozno raztopino do gela. Počakali smo, da se je agarozna raztopina strdila.

Na vrhu steklenih plošč smo odstranili odvečno strjeno agarozno raztopino in vpeli zgornjo posodo za SDS-PAGE (po gumi jo namažemo z mazivnim gelom, da bolje tesni) in odstranili spodnji nosilec.

3.10.3.4 Priprava 1X SDS elektroforeznega pufera za SDS-PAGE

Pripravili smo 5X SDS elektroforezni pufer:

1,5 % (m/v) Tris baza 7,2 % (m/v) glicin

0,5 % (m/v) SDS
ddH₂O

5X SDS elektroforezni pufer smo redčili 5-krat tako, da smo dobili 4 l 1X SDS pufra (800 ml 5X SDS pufra + 3200 ml ddH₂O). Pripravili smo ga v spodnji posodi za SDS-PAGE. Isti pufer smo lahko uporabili za tri elektroforeze. Iz preostalih 200 ml 5X SDS pufra pa smo pripravili 1000 ml 1X SDS pufra.

V spodnjo posodo smo vstavili zgornjo posodo z geli in vanjo vlili 1X SDS pufer (cca. 700 ml).

3.10.4 SDS-PAGE

Uporabili smo vertikalni diskontinuirani elektroforetski sistem SE 600 (Hoeffer Scientific Instruments).

SDS-PAGE loči proteine po molekulski masi.

Na usmerniku EPS 3501 XL (Amersham Pharmacia Biotech) smo nastavili 2 fazi:

1. faza: 300 V, 40 mA, 120 W, 15 min
2. faza: 1000 V, 80 mA, 120 W, 3 ure

Usmernik smo povezali z elektroforetskim sistemom. Elektroforezo smo ustavili, ko je črta bromofenol modrega pripotovala da konca obeh gelov (cca. 1 ura 35 min). Gela smo vzeli iz stekel, odstranili trakova in označili plus konec.

3.11 BARVANJE GELOV

3.11.1 Fiksacija

Priprava fiksacijske raztopine:

50 % (v/v) metanol
7 % (v/v) očetna kislina
ddH₂O

V dve modri posodi smo vlili po 200 ml fiksacijske raztopine in v vsako položili po en gel. Fiksirali smo 2-krat po 30 min na plošči na vrtinčniku (se meša). Vmes smo fiksacijsko raztopino odlili in prilili novo.

3.11.2 Barvanje

Delali smo v temi, ker je fluorescentno barvilo Sypro ruby (Invitrogen) občutljivo na svetlobo. V modri posodi z geloma smo nalili po 200 ml barvila. Posodi smo pokrili s folijo. Barvali smo čez noč na plošči na vrtinčniku, da se je mešalo.

3.11.3 Razbarvanje

Priprava raztopine za razbarvanje (ozadja):

10 % (v/v) metanol
7 % (v/v) očetna kislina
ddH₂O

Delali smo v temi. V novi dve beli posodi smo nalili po 200 ml raztopine za razbarvanje in v vsako dali po en gel iz modrih posod. Pustili smo, da se je 30 min mešalo na plošči na vrtničniku. Po končanem razbarvanju smo raztopino odlili.

3.11.4 Spiranje

Spirali smo 2-krat po 5 min z 200 ml ddH₂O na gel. Spirali smo v belih posodah.

3.12 SLIKANJE GELOV

Gele smo slikali s sistemom za dokumentacijo gelov G-BOX:HR (Syngene).

Barvilo Sypro rubi ima ekscitacijsko valovno dolžino pri 280 nm in emisijsko valovno dolžino pri 610 nm. Stalni parametri pri slikanju so bili : fokus - minimum, zaslonka - maksimalno odprta, čas osvetlitve - 60 ms, zoom kamere - minimum.

3.13 ANALIZA SLIKE

Slike gelov smo analizirali z računalniškim programom Dymension 2-D analysis software (verzija 2,02) (Syngene).

S tem programom lahko med sabo primerjamo več gelov. Enega izmed njih postavimo kot kontrolo (1. gel), na katerega se ostali primerjajo. Program določi točno pozicijo individualnih lis (jih obkroži) in kvantitativno ovrednoti vsako liso iz njene oblike in intenzitete. Sledi ujemanje in primerjava identičnih lis med geli (Cellini in sod., 2004). Skupne lise vsem gelom program obkroži s temno modro obrobo. Tako dobimo preglednico, ki izpiše številke lis, ki predstavljajo isto liso na vseh gelih in njihovo razmerje normaliziranih volumnov glede na 1. gel (relativne vrednosti). Normaliziran volumen je razmerje med volumnom ene lise napram celokupnemu volumnu vseh lis na gelu. Upoštevali smo privzete nastavitve merjenja ozadja in identifikacije lis glede na razmerje intenzitete in šuma. Vse poravnave proteinov smo preverili z ročnim pregledovanjem slike.

3.14 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Za statistično obdelavo smo uporabili absolutne vrednosti normaliziranih volumnov (V_N) posameznih lis. Te smo poiskali iz preglednic, ko smo vedeli, katere številke lis pri

posameznem gelu pripadajo isti lisi med geli. Med veliko množico lis smo izbrali 46 lis, ki jih je program pravilno izbral. Analizirali smo na podlagi teh 46 izbranih in preverjenih lis.

Za ugotavljanje variabilnosti med tehničnima ponovitvama in med biološkimi ponovitvami smo izračunali koeficiente variabilnosti (CV) za vsako liso:

$$CV = SD / \text{povprečje } V_N$$

Nato smo izračunali povprečje CV-jev 46-ih lis pri vsaki sorti in vsaki GS liniji.

Za ugotavljanje variabilnosti med sortami ter med transgenim in netransgenim Igor-jem smo naredili analizo glavnih komponent (PCA). Vse vzorce smo primerjali na povprečje vseh netransformiranih Igorjev.

Naredili smo tudi hierarhično razvrščanje vzorcev (HCL) in statistični test ANOVA (analiza variance). Ta nam z 99% verjetnostjo najde proteine, ki se statistično značilno razlikujejo med izbranimi skupinami.

4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA ANALIZE PROFILA PROTEINOV V LISTIH KROMPIRJA

V okviru diplomskega dela smo najprej optimizirali postopek ekstrakcije in čiščenja proteinov iz listov krompirja.

Poskušali smo ekstrahirati proteine s TCA in acetonom, a se pelet ni hotel dokončno raztopiti. Delali smo po članku Carpentier in sod. (2005), le da smo na koncu pelet želeli raztopiti v ddH₂O in ekstrakcijskem pufru Tris/CHAPS (Jamnik in sod., 2006). Ker se pelet ni raztopil, smo ponovno dodali ekstrakcijski pufer Tris/CHAPS (2/3 začetnega volumna). V pufru je bil detergent, a kljub temu se pelet ni dokončno raztopil po 20-ih min vrtinčenja.

Za uspešno metodo priprave vzorca proteinov se je izkazala ekstrakcija proteinov s samim ekstrakcijskim pufrom Tris/CHAPS (Jamnik in sod., 2006). Za čiščenje in koncentriranje proteinov smo uporabili komplet za čiščenje proteinskih ekstraktov ("2-D clean up kit"). Po obarjanju se je pelet dobro raztopil v rehidracijskem pufru.

4.2 PROTEINSKI PROFILI PO 2-DE

Z 2-DE smo analizirali skupno 18 vzorcev (preglednica 2).

Preglednica 2: Oznake vzorcev analiziranih z 2-DE.

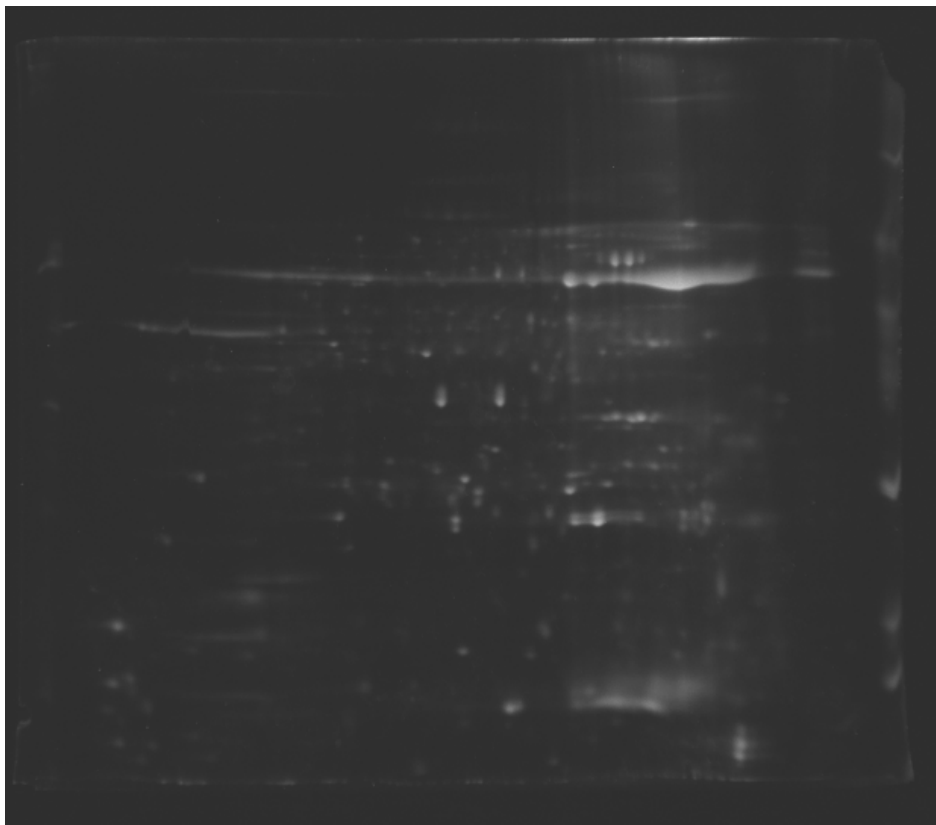
Desiree	Sante	Igor- netransformiran	Igor-transformiran, klon 35, odporen	Igor-transformiran, klon 27, občutljiv
D1 (1.biol. ponov.)	S1 (1.biol. ponov.)	I1 (1.biol. ponov.)	I35a (1.biol. ponov.)	I27a (1.biol. ponov.)
D1T (teh. ponov.)	S2 (2.biol. ponov.)	I2 (2.biol. ponov.)	I35b (2.biol. ponov.)	I27b (2.biol. ponov.)
D2 (2.biol.ponov.)*	S3 (3.biol. ponov.)	I3 (3.biol. ponov.)	I35bT (teh. ponov.)	I27c (3.biol. ponov.)
D3 (3.biol. ponov.)		I0 (pobran s sortami)	I35c (3.biol. ponov.)	

* D2 smo izustili iz nadaljnjih analiz, zaradi težav v izvedbi.

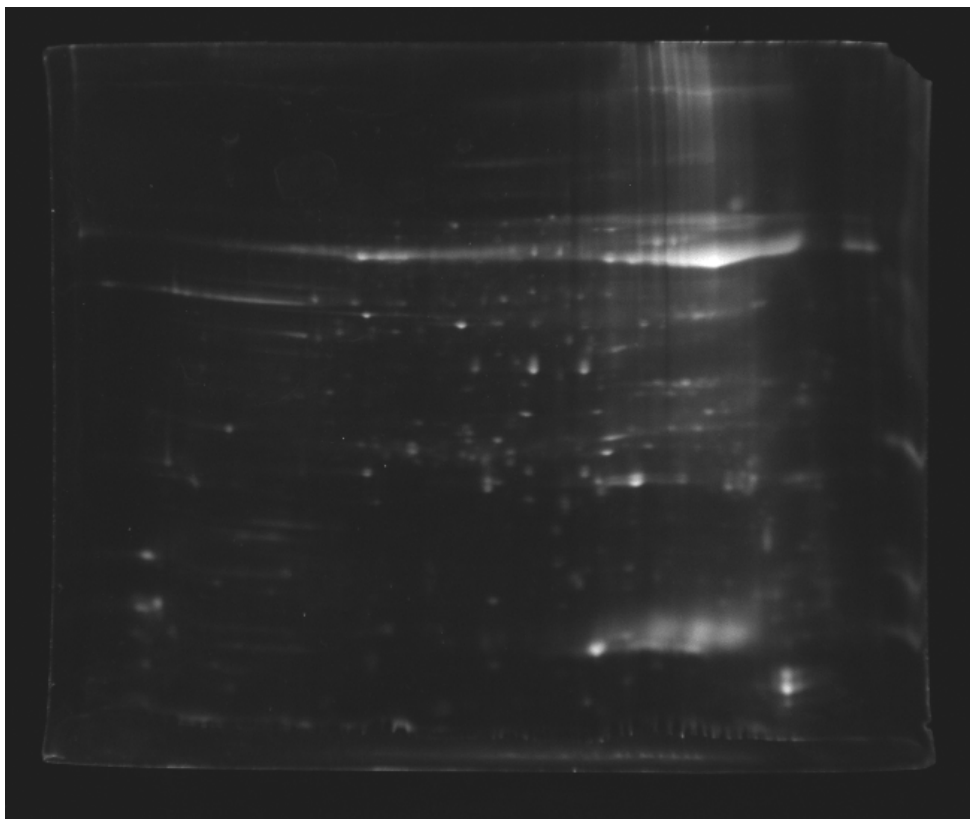
Rezultate 2-DE vzorca D2 smo izključili iz nadaljnjih analiz. Ta gel je bil eden izmed prvih narejenih in je bil eden izmed slabših (manj lis in nekatere dodatne, ki so ovirale prekrivanje in so bile prisotne le na tej biološki ponovitvi). Prav tako smo opazili težave

med čiščenjem vzorca: Pelet je po predzadnjem centrifugiranju v postopku čiščenja razpadal.

Največje razlike v določenem proteinskem profilu so se na oko le delno pokazale med različnimi sortami (slika 2 in 3).



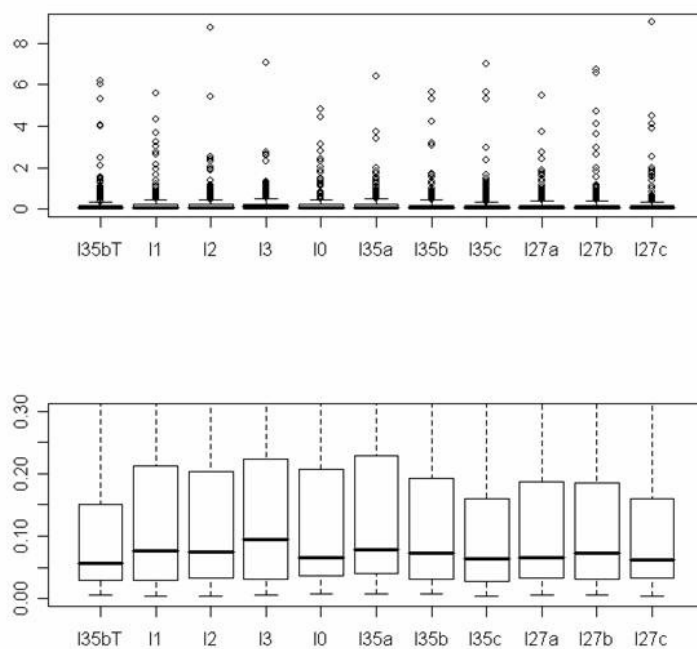
Slika 2: 2-DE gel: Primer analize profila proteinov v listih krompirja sorta Desiree (D3).



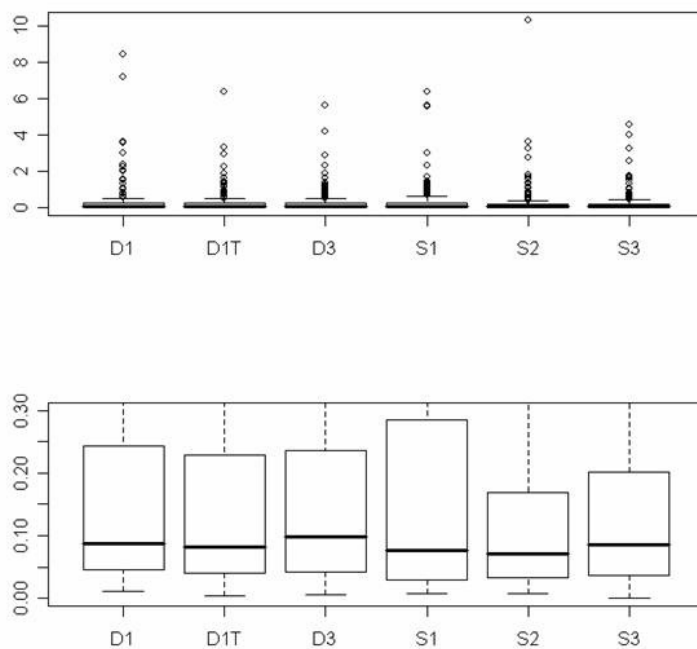
Slika 3: 2-DE gel: Primer analize profila proteinov v listih krompirja sorta Igor (I1).

Vse eksperimente smo primerjali na eksperiment I35bT (slika 5). Zaradi premajhne zmogljivosti programske opreme, smo podatke razdelili na dve skupini – skupina sorte in skupina GS linije. Obe skupini sta vključevali 2-DE rezultate I35bT (kot referenčni gel). Podatke o normaliziranih volumnih vseh identificiranih lis na vsakem gelu smo primerjali, da smo vizualno ocenili kvaliteto posamezne 2-DE (slika 4).

4a

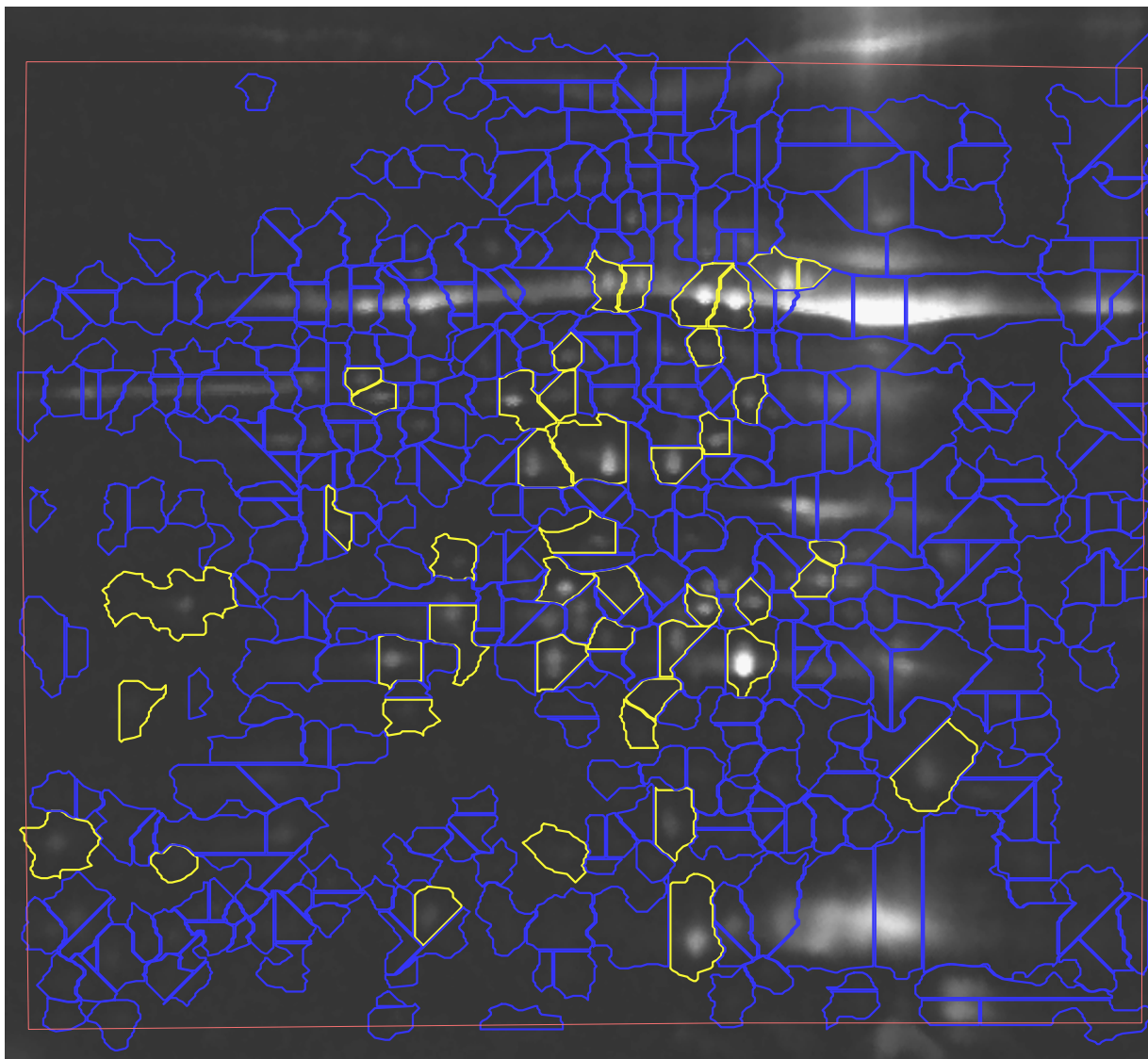


4b



Slika 4: Prikaz razporeditve normaliziranih volumnov vseh lis pri posameznem eksperimentu. A) primerjava vzorcev GS linij in netransformiranega Igorja, B) primerjava vzorcev različnih sort. Oznake vzorcev so podane v preglednici 2. Velikost normaliziranega volumna posamezne lise je prikazana na ordinati.

Razporeditev velikosti normaliziranih volumnov je pri vseh eksperimentih primerljiva: Povprečja normaliziranih volumnov znotraj eksperimentov so podobna med eksperimenti (od 0,05 do 010). Dodatna normalizacija rezultatov med eksperimenti ni nujno potrebna.



Slika 5: Analiza slike gela Igor 35bT, s katerim smo primerjali vse ostale gele. Rumeno obkrožene so lise, ki so bile primerljive na vseh gelih in zato primerne za statistično obdelavo.

Program je zaznal 478 skupnih lis med vsemi geli (modro obkrožene lise na sliki 5). Lise so zelo različne. Nekatere celo tvorijo nekakšne grebene, ker se v 2-DE niso povsem ločile. To ovira program pri natančnem določanju mej posamezne lise. Najboljše za statistično obdelavo so lise, ki se nahajajo posamezno in v 3D postavitvi izgledajo kot stožec (imajo špičasti vrh). Te program dobro zazna in jih lepo obkroži. Problematične so lise, ki se razširjajo po večji površini in nimajo izrazitega vrha. Zato smo naredili selekcijo lis in izbrali najbolj zanesljive, katere smo statistično obdelali (46 lis). Skušali smo izbrati take

lise, ki so bile izrazite na vseh 17-ih gelih in jih je glede na to program povsod pravilno izbral.

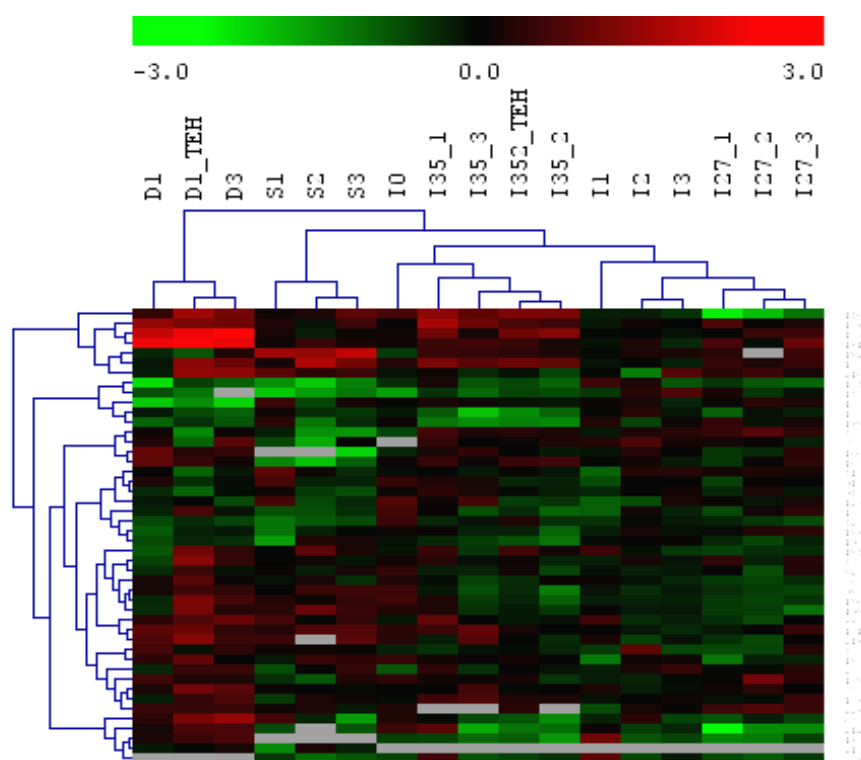
Kljub temu, da smo naredili selekcijo 46 lis, so bila pri nekaterih lisah potrebna dodatna ročna popravila. Če je bila lisa na nekaterih gelih prelomljena na pol (obkrožena, kot da sta dve lisi), na nekaterih gelih pa je bila ta ista lisa obkrožena kot ena lisa, smo to na vseh gelih poenotili. V nekaterih primerih pa je program določil območje lise precej okrog glavnega vrha. Tudi to smo poenotili med geli. Običajno smo zmanjšali obkroženo območje. Takih popravkov smo se sicer izogibali, a približno 27 lis izmed vseh izbranih lis na vseh gelih smo morali popraviti.

Če se lise na posameznem gelu ni dalo dobro določiti, smo tak podatek izpustili in računali variabilnost le med ostalima dvema biološkima ponovitvama. Nekatero lise smo izpustili tudi pri vseh treh bioloških ponovitvah določenega vzorca, če jih je program na vseh treh gelih drugače izbral ali pa pri vsaki biološki ponovitvi precej drugače obkrožil, ker niso bile čisto enake oblike na vseh treh gelih.

Za vse nadaljnje statistične analize smo izhajali iz normaliziranih volumnov izbranih 46 lis kot so prikazani v preglednici v prilogi.

4.3 OCENA VARIABILNOSTI DOBLJENIH REZULTATOV ZARADI VARIABILNOSTI V IZVEDBI EKSPERIMENTA IN ZARADI VARIABILNOSTI BIOLOŠKEGA MATERIALA

Iz diagrama hierarhičnega razvrščanja (slika 6) je razvidno, da so si biološke ponovitve znotraj posameznih sort bolj podobne kot pa sorte med sabo. Sante je glede na izbrane lise bolj podoben Igor-ju kot pa Desiree-ju. Lahko opazimo, da je variabilnost med biološkimi ponovitvami pri transformiranih rastlinah manjša kot med transformiranimi in netransformiranimi rastlinami. Variabilnost med biološkimi ponovitvami pri netransformiranem Igorj-u je večja kot pa med transformiranimi Igor-ji klon 27 in netransformiranimi Igor-ji. Od pričakovanih rezultatov odstopa le analiza vzorca IO, ki se razvršča nekoliko stran od vzorcev Igor-ja, ki so bili pobrani 1 teden kasneje. Razlike v profilu so lahko posledica različne starosti rastlin. Ne moremo pa izključiti tehničnih težav pri analizi vzorca IO, ker smo tak tip vzorca analizirali le enkrat.



Slika 6: Hierarhično razvrščanje vzorcev (horizontala) in proteinskih lis (vertikala). Skala predstavlja intenziteto lis (\log_2 ratio). Ratio: razmerje glede na povprečje vseh netransformiranih Igor-jev.

Tehnična ponovitev predstavlja ponovno izvajanje postopkov od homogeniziranega materiala enega vzorca naprej.

Tehnična ponovitev pri Desiree-ju je slaba, saj sta si biološki ponovitvi bolj podobni kot tehnični ponovitvi. Tehnična ponovitev pri Igor-ju klon 35 pa je dobra, saj sta si tehnični ponovitvi bolj podobni kot biološke ponovitve.

Preglednica 3: Variabilnost v zastopanosti proteinov v tehničnih ponovitvah eksperimenta in v bioloških ponovitvah eksperimenta, CV-koeficient variabilnosti

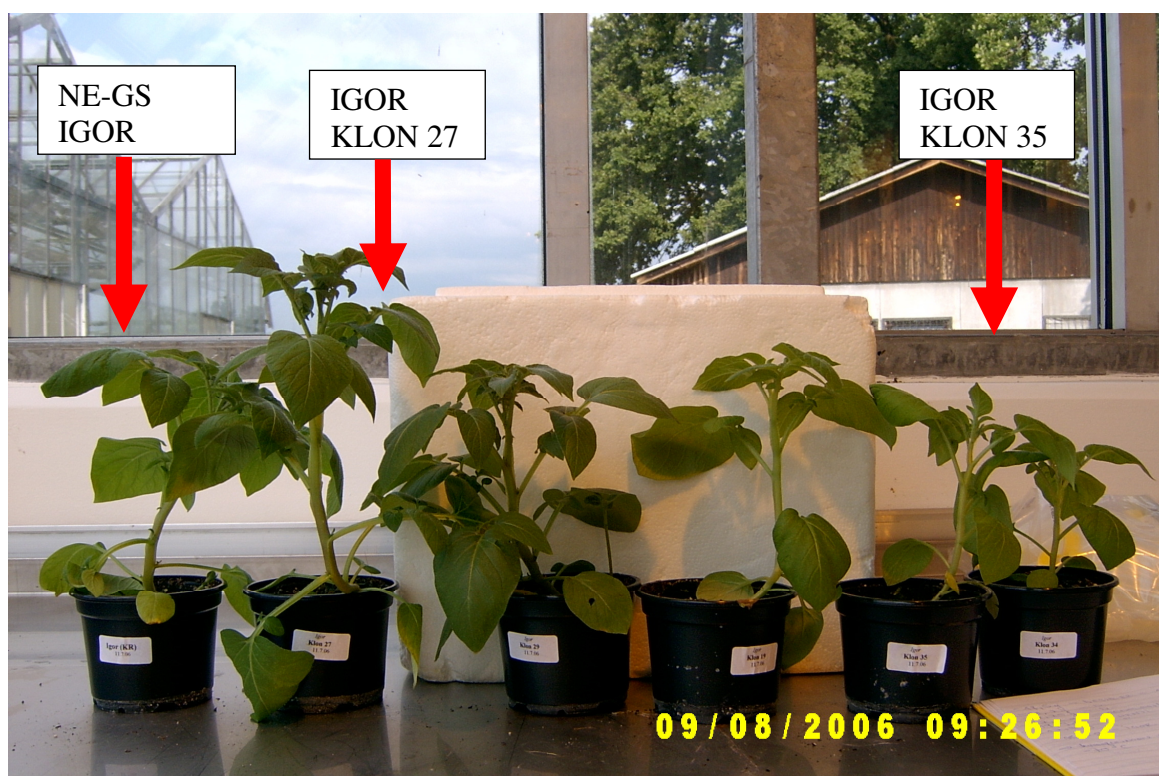
ŠTEVILKA LISE	CV TEHNIČNIH PONOVITEV		CV BIOLOŠKIH PONOVITEV PRI SORTAH				CV BIOLOŠKIH PONOVITEV PRI TRANSF. IGORJU	
	DESIREE	IGOR 35	DESIREE	SANTE	IGOR različne starosti	IGOR iste starosti	IGOR 35	IGOR 27
40	0,63	0,07	0,61	0,49	0,28	0,18	0,13	0,14
41	0,43	0,11	0,34	0,43	0,35	0,42	0,07	0,04
42	0,14	0,33	0,12	0,14	0,29#	0,13#	0,10	0,13
43	0,36	0,11	0,25	0,03	0,55	0,62	0,12	0,43
47	0,80	0,19	0,39	0,10	0,14	0,15	0,17	0,25
52	0,43	0,36	0,31	0,16	0,24#	0,06#	0,03	0,32
67	0,37	0,25	0,14	0,64	0,30	0,35	0,34	0,19
70	0,55	0,09	0,76	0,51	0,20*	0,20	0,15	0,14
76	0,31	0,20	0,36	0,21	0,17	0,14	0,18	0,09
77	0,40	0,03	0,13	0,04	0,14	0,17	0,25	0,13
88	0,18	0,05	0,12	0,22	0,33	0,38	0,43	0,24
91	0,31	0,03	0,16	0,39	0,31	0,24	0,19	0,23
94	0,28	0,10	0,40	0,31	0,14	0,16	0,18	0,20
95	0,18	0,38	0,06	0,19	0,31#	0,09#	0,21	0,08
104	0,69	0,13	0,16	0,25	0,40	0,42	0,41	0,16
107	0,27	0,02	0,33	0,36	0,13	0,16	0,12	0,10
108	0,13	0,07	0,05	0,22	0,09	0,11	0,32	0,24
109	0,20	0,12	0,22	0,15	0,07	0,05	0,33	0,21
129	0,11	0,05	0,33	0,49	0,53	0,44	0,36	0,12
133	0,44	0,27	0,38	0,14	0,41	0,33	0,30	0,34
137	0,24	0,19	0,10	0,24	0,17	0,18	0,34	0,26
138	0,32	0,02	0,12	0,25	0,07	0,08	0,15	0,24
143	0,16	0,03	***	0,26	0,58#	0,39#	0,18	0,23
146	0,50	0,02	0,22	0,29	0,38#	0,08#	0,15	0,43
152	0,22	0,07	0,49	0,16	0,22	0,11	0,06	0,11*
153	0,25	0,05	0,41	0,24	0,38	0,41	0,03	0,29
154	0,78	0,22	0,30	0,33	0,31	0,37	0,32	0,09
156	0,66	0,27	0,25	0,12	0,33#	0,01#	0,33	0,04
158	0,27	0,31	0,04	0,34	0,13	0,15	0,21	0,15
166	0,30	0,10	0,07	***	0,19	0,16	0,18	0,34
167	0,19	0,06	0,16	0,32	0,10	0,12	0,16	0,29
170	0,65	0,07	0,13	0,48	0,17	0,10	0,10	0,09
171	0,05	0,09	0,27	0,18	0,23	0,12	0,29	0,24
175	0,16	0,31	0,00	0,38	0,24#	0,09#	0,09	0,39
180	0,14	0,28	0,09	**	0,72	0,76	0,18	0,26
181	0,24	0,04	0,10	0,47	0,24	0,30	0,08	0,19
185	0,07	0,15	0,17	0,15	0,18	0,21	0,07	0,35
190	0,18	0,16	0,05	0,52	0,05	0,05	0,19	0,13
195	0,66	0,13	0,39	0,25	0,16	0,09	0,26	0,19
203	0,38	0,09	0,02	0,37	0,36	0,24	0,28	0,15
210	0,07	**	0,12	0,47	**	**	**	**
212	0,24	0,03	0,00	0,04*	0,33	0,22	0,91	0,37
216	0,71	0,23	0,03	0,17	0,51	0,60	0,19	0,12
218	0,26	0,16	0,35	0,13*	0,26	0,27	0,41	0,24
228	0,01	***	0,03	0,15	0,26	0,29	***	0,11
238	**	0,07	**	0,20	0,55	0,55	0,51	0,10
POVP CV	0,33	0,14	0,22	0,27	0,28	0,24	0,23	0,20

- * Ene biološke ponovitve ne upoštevamo, ker program lise ni pravilno izbral. Iz ostalih izračunamo CV.
- ** Ne upoštevamo te lise, ker jo program različno izbere na različnih gelih.
- *** Ne računamo CV, ker samo en podatek. Le v eni biološki ponovitvi lisa prisotna v drugih pa ne.
- # Velika razlika v CV-ju ,če vključimo Igor pobran en teden pred ostalimi biološkimi ponovitvami.

Podobno povejo o kvaliteti tehničnih ponovitev tudi povprečni CV (preglednica 3). Povprečni CV med tehničnima ponovitvama pri Desiree-ju je visok, ker je bila izvedba tega poskusa slaba. Tehnične ponovitve analize vzorca I35b kažeta večjo ponovljivost – povprečni CV le 14%. Variabilnost podatkov med biološkimi ponovitvami je v enakem območju pri vseh poskusih – 20 do 28%. Nekoliko nižji povprečni CV pri Desiree-ju, je lahko posledica računanja CV-jev le iz dveh bioloških ponovitev. Če v analizah biološke variabilnosti sorte Igor izvzamemo vzorec, ki je pobran 1 teden pred ostalimi, se območje variabilnosti še nekoliko zmanjša.

4.4 PRIMERJAVA PROFILA PROTEINOV PRI RAZLIČNIH SORTAH KROMPIRJA, GS LINIJAH IGORJA IN NETRANSFORMIRANEM IGOR-JU

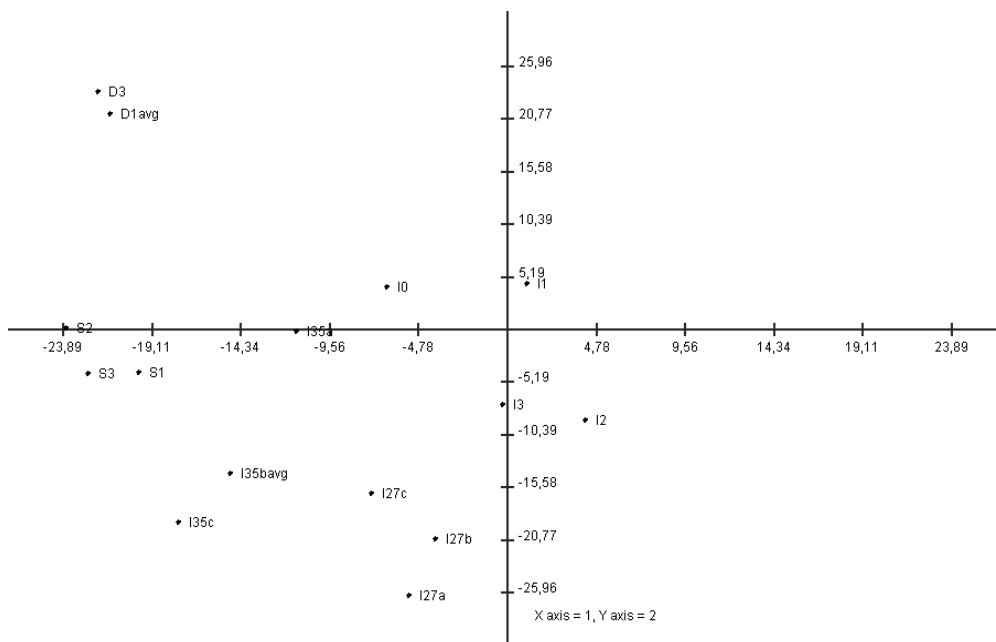
Pri sami rasti različnih tipov rastlin so se pokazale razlike v fenotipu med transformiranimi in netransformiranimi rastlinami sorte Igor (slika 7). Rezistenten klon 35 je zaostajal v rasti. Klon 27 (vstavljen gen, vendar se ne izraža) pa je zrasel višje kot netransformirani Igor. Same sorte Desiree, Sante in Igor se v hitrosti rasti niso bistveno razlikovale.



Slika 7: Primerjava med nespremenjenim Igor-jem (povprečno velika rastlina) in GS kloni Igor-ja (povprečno velika rastlina). 1. iz leve: ne-GM Igor; 2. iz leve: Igor klon 27 (občutljiv); 2. iz desne: Igor klon 35 (rezistenten). Neoznačene rastline so kloni Igor-jev, ki jih nismo vključili v diplomsko delo.

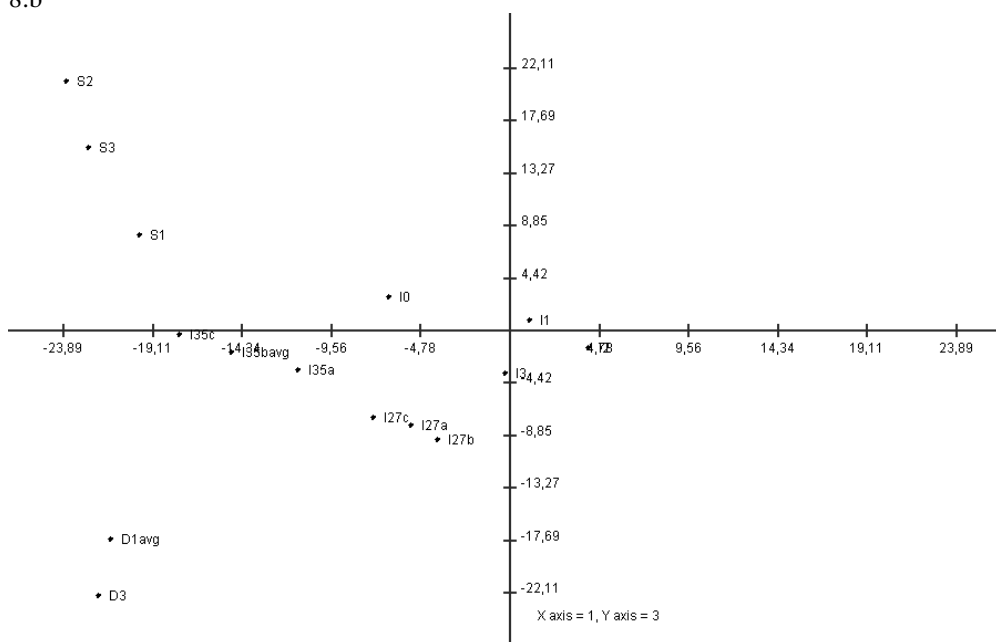
Matematično smo razlike ovrednotili z analizo glavnih komponent (PCA), kar predstavlja slika 8.

8.a



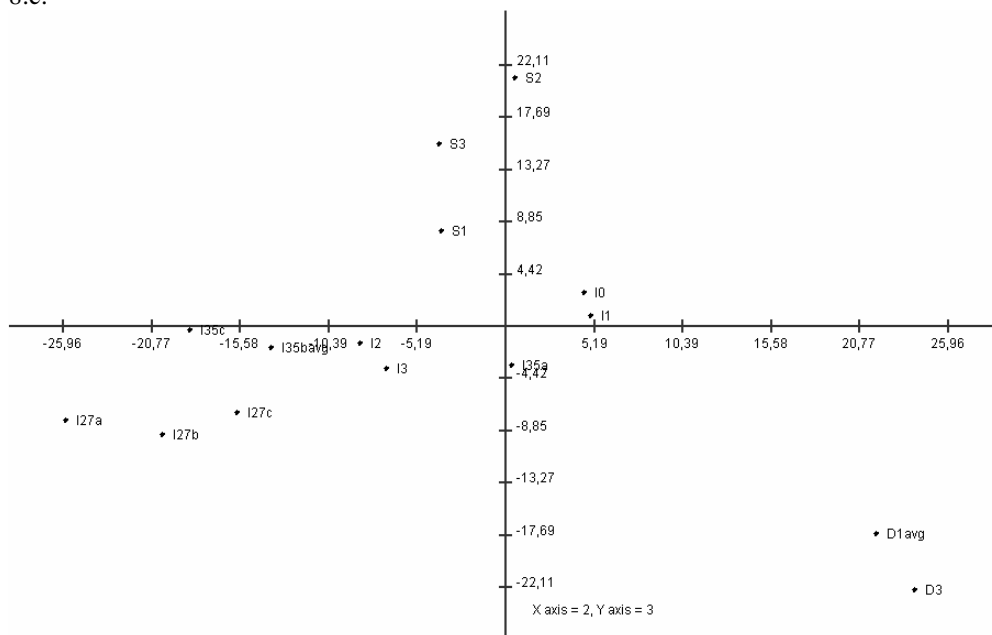
A) Razvrstitev eksperimentov glede na 1. in 2. komponento PCA

8.b



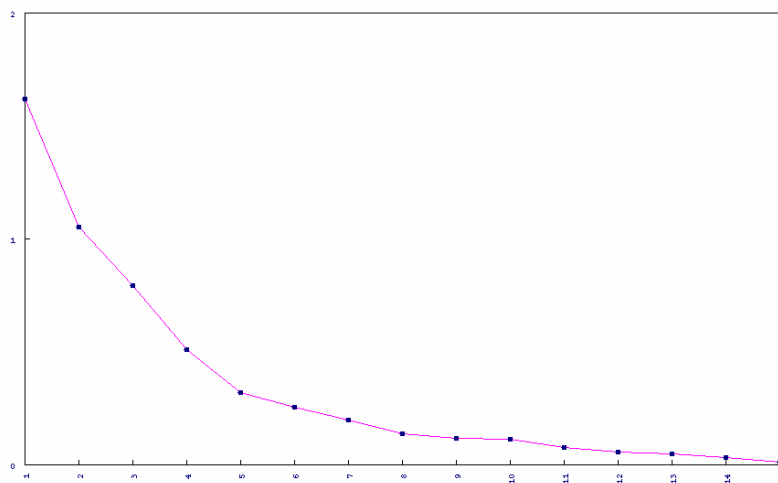
B) Razvrstitev eksperimentov glede na 1. in 3. komponento PCA.

8.c:



C) Razvrstitev eksperimentov glede na 2. in 3. komponento PCA.

8.d



D) Prispevek posameznih PCA komponent k variabilnosti. Os y: odstotki prispevanja posamezne komponente, os x: številke posameznih komponent PCA.

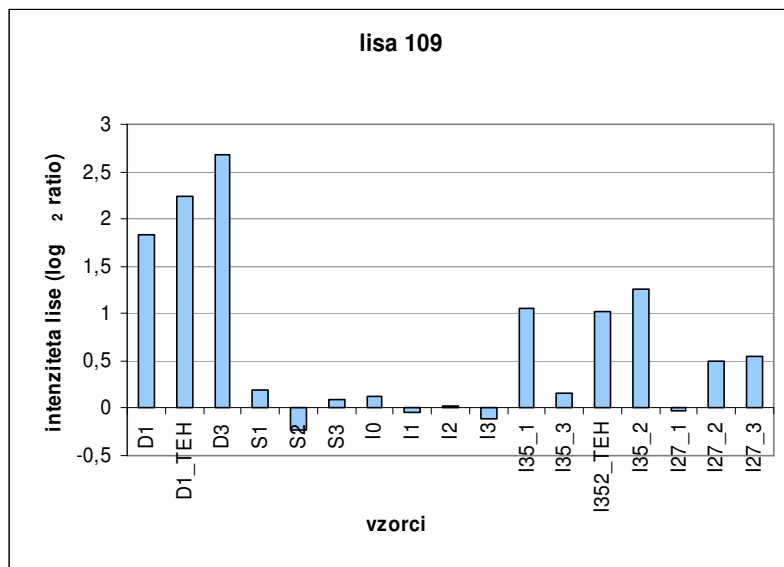
Slika 8: PCA

Iz rezultatov PCA je razvidno, da se sorte med sabo ločijo na podlagi 46 izbranih lis. Znotraj sorte Igor opazimo združevanje bioloških ponovitev netransformiranega Igorja in obeh transformiranih klonov Igorja, vendar le te niso izrazite.

Razlika med biološkimi ponovitvami pri Igorju je lahko večja ali manjša kot razlika med transformiranim in netransformiranim Igorjem. Jasno pa je razvidno, da je variabilnost

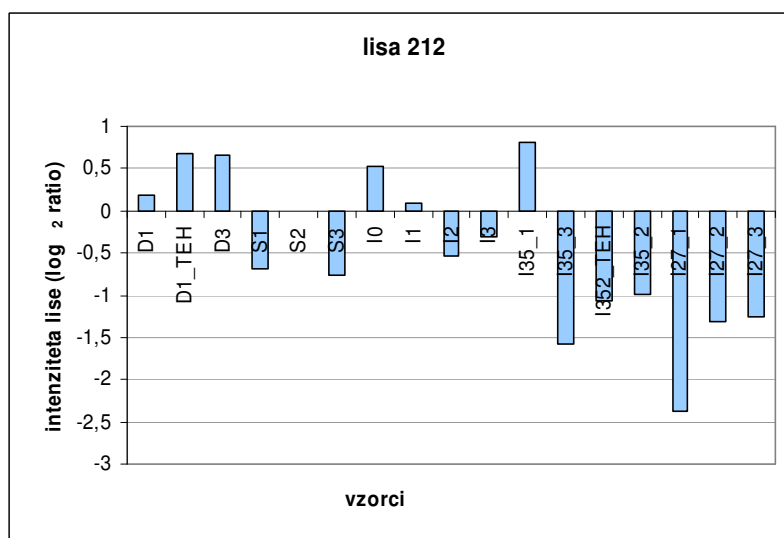
med ne-transformiranim in transformiranim Igorjem manjša kot pa variabilnost med vsemi tremi sortami.

K veliki variabilnosti pri 1. komponenti PCA so doprinesle predvsem lise 104, 109, 143, 170, pri 2. komponenti PCA lise 146, 180, 181, 212, pri 3. komponenti PCA lise 109, 167, 181 pri 4. komponenti lise 146, 167, 181, pri 5. komponenti lise 129, 143, pri 6. komponenti lise 133, 153, 238, pri 7. komponenti lise 67, 166, zato smo si njihove profile podrobneje ogledali (slike 9, 10, 11, 12).



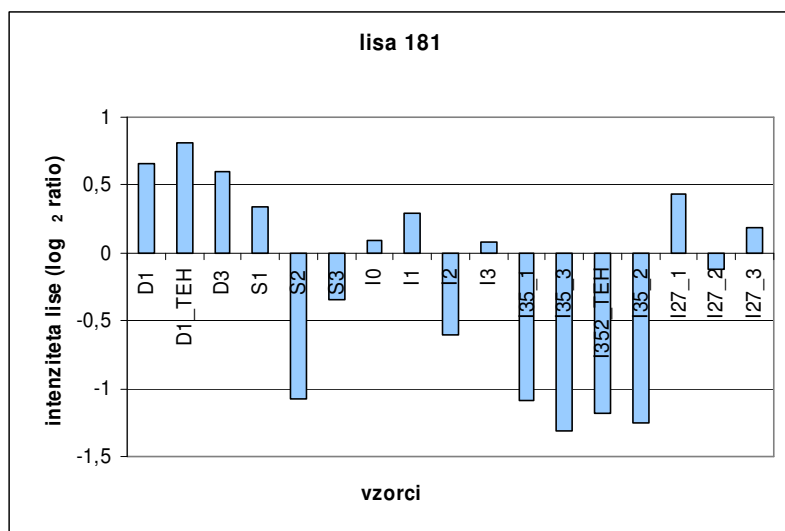
Slika 9: Profil pojavljanja lise 109 pri analiziranih vzorcih.

K variabilnosti lise 109 prispevajo predvsem Desiree-ji, saj se pri njih ta protein mnogo bolj izraža.



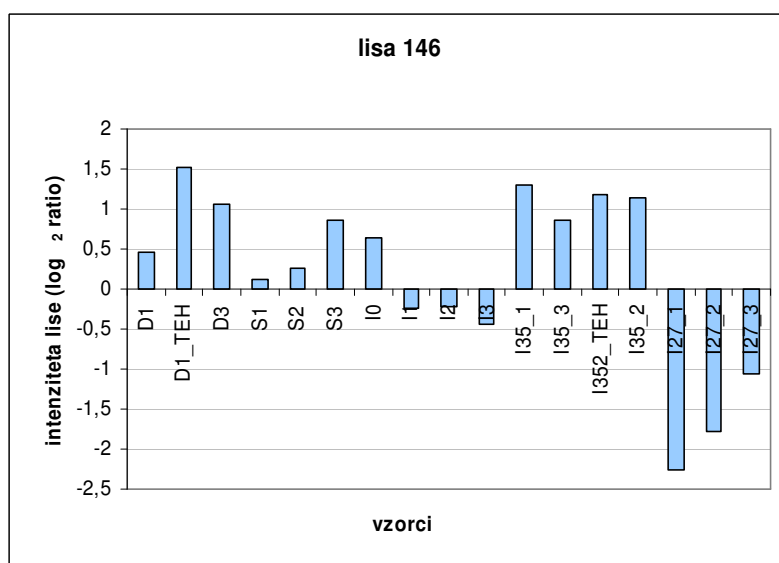
Slika 10 : Profil pojavljanja lise 212 pri analiziranih vzorcih.

K variabilnosti lise 212 prispevajo predvsem transformirani Igor-ji, pri katerih se protein manj izraža.



Slika 11: Profil pojavljanja lise 181 pri analiziranih vzorcih.

.K variabilnosti lise 181 prispevajo predvsem transformirani Igor-ji klon 35 in tudi Desiree-ji.



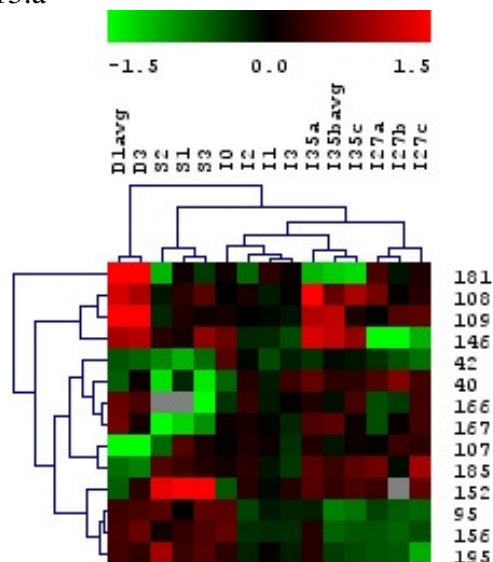
Slika 12: Profil pojavljanja lise 146 pri analiziranih vzorcih.

K variabilnosti lise 146 prispevajo predvsem transformiran Igor klon 27, pri katerem se ta protein manj izraža in transformiran Igor klon 35, pri katerem se ta protein močneje izraža. Močnejše se izraža tudi pri Desiree-ju.

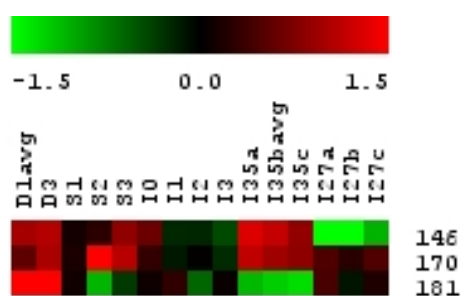
Naredili smo še PCA (komponenta 1., 2., 3.) vseh 46 lis in ugotovili, da k variabilnosti največ doprinesejo lise 40, 104, 107, 143, 146, 152, 170, 180, 181, 212.

Naredili smo statistični test ANOVA. Ta nam z 99% verjetnostjo najde proteine, ki se statistično značilno razlikujejo med skupinami (slika 13).

13.a



13.b



Slika 13: ANOVA (Analiza variance) A) Proteini, ki se statistično značilno razlikujejo med skupinami (skupine: Desiree, Sante, netransformiran Igor, transformiran Igor klon 27 in transformiran Igor klon 35). B) Proteini, ki se statistično značilno razlikujejo med transformiranimi Igor-ji in netransformiranimi Igor-ji. Skala predstavlja intenziteto (\log_2 ratio). Ratio: razmerje glede na povprečje vseh netransformiranih Igor-jev.

Razvidno je, da se le trije proteini statistično značilno razlikujejo med GS in ne-GS Igor-jem. Večje izražanje dveh proteinov (lisa 146 in 170) pri GS Igor-ju je v območju izražanja proteinov pri drugih dveh sortah. Torej spremembe zaradi transformacije padejo v območje naravne variabilnosti.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Optimizacija metodologije analize profila proteinov v listih krompirja

Tkivo za ekstrakcijo proteinov je potrebno učinkovito homogenizirati. Homogenizacija mora biti takšna, da povzroči čim manj proteolize. V našem primeru smo uporabili trenje s tekočim dušikom in shranjevanje vzorcev na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Izogibali smo se večkratnemu odtajanju vzorcev. Vzorce smo med procesom ekstrakcije in čiščenja shranjevali na ledu. Lahko bi v ekstrakcijski pufer dodali še set proteaznih inhibitorjev, vendar pri rezultatih 2-DE problemov povezanih z razgradnjo proteinov ni bilo opaziti. Če bi prišlo do proteolize, bi bilo zelo malo lis prisotnih v zgornjem delu gela, kjer se nahajajo proteini z večjo molekulsko maso (Berkelman in Stenstedt, 1998).

Najbolj pomemben korak za učinkovito separacijo in identifikacijo proteinov je priprava vzorca. Ta vključuje ekstrakcijo proteinov iz tkiva v čim večjih količinah in v čim bolj čisti obliki. Najbolj pogosta metoda, ki jo uporabljajo za pripravo vzorca rastlinskih tkiv je obarjanje s TCA in acetonom. Z obarjanjem ločimo proteine od nečistoč kot so soli, detergenti, nukleinske kisline, lipidi. Te bi drugače vplivale na ločevanje v 2-DE. Z obarjanjem tudi koncentriramo proteinski vzorec iz vira kot je npr. rastlinsko tkivo. Priprava vzorca z obarjanjem s TCA je pogosto povezana s težavnim raztapljanjem peleta proteinov (Agrawal in sod., 2004), kar se je zgodilo tudi v primeru ekstrakcije proteinov iz listov krompirja. Uporabna naj bi bila tudi priprava vzorca z raztapljanjem proteinov v fenolu in nadaljnjim obarjanjem z metanolom in amonijevim acetatom (Agrawal in sod., 2004). Splošno je pomembno, da je priprava vzorca enostavna, saj se tako izognemo večjim izgubam. To je pomembno takrat, ko želimo dobiti čim več proteinov.

Za uspešno metodo priprave vzorca proteinov se je pri našem poskusu izkazala ekstrakcija proteinov z ekstrakcijskim pufrom Tris/CHAPS (Jamnik in sod., 2006) in čiščenje s komercialno dostopnim kompletom za čiščenje protenskih ekstraktov ("2-DE clean up kit"). Pri postopku čiščenja proteinov smo imeli nekaj težav, ki so verjetno vplivale na ponovljivost rezultatov. Pelet z oborjenimi proteini je razpadal po predzadnjem centrifugiranju v postopku čiščenja. Možnost je torej, da se niso vsi proteini zbrali v peletu in izgube niso bile ponovljive. Kljub povečanju centrifugalne sile iz 8000 g na 10000 g in podaljšanju časa centrifugiranja pri kritični stopnji čiščenja iz 5 na 10 min, pelet ni vedno postal bolj kompakten. Očitno je to odvisno od posameznega vzorca in ne toliko od tehnike dela. Metodologijo čiščenja proteinov bi morda lahko še izboljšali s podaljševanjem časa in povečevanjem pospeška centrifugiranja, dokler ne bi zaznali problemov s topnostjo oborine. S tem bi povečali ponovljivost metode.

Analiza slike s programom "Dymension 2-D analysis software" je bila naslednja kritična točka v eksperimentu. Nastopile so težave pri prekrivanju slik zaradi relativno različnih vzorcev, ki smo jih primerjali (različne sorte). Kritična je bila izbira gela na katerega smo primerjali ostale gele (referenčni gel). Gel se je lahko napačno prekril z drugim gelom in s tem identičnost proteinov pri različnih gelih ni bila zagotovljena. Včasih so bile razlike

med geloma za program preveč velike, da bi naredil prekrivanje na podlagi ostalih skupnih lis.

Za referenčni gel smo postavili I35bT. Izbrali smo ga zato, ker se z njim ni prekrival le en izmed gelov (D2), pri katerem izvedba postopka ni bila primerna. Kljub temu, da so se ostali geli z referenčnim gelom na oko dobro prekrili, smo pri ročnem pregledovanju gelov našli nekatere napačno identificirane proteine. Očitno je stopnja razvoja uporabljene programske opreme za analizo slike še premajhna in je potrebno vse rezultate še ročno pregledati.

5.1.2 Ponovljivost vzpostavljene metodologije

Vsekakor je pomembno, da ob vzpostavitvi sistema za analizo nekega novega tipa vzorcev, naredimo čim več tehničnih ponovitev, da ugotovimo koliko k raznolikosti prispeva sama tehnika in koliko naravna variabilnost. V našem poskusu smo naredili dve tehnični ponovitvi, eno za Desiree, 1. biološka ponovitev in eno za Igor klon 35, 2. biološka ponovitev. Tehnični ponovitvi pri Desiree-ju sta se precej razlikovali. Sklepamo da zato, ker je bil gel Desiree, 1. biološka ponovitev, prvi narejen v našem poskusu, ko tehnika še ni bila optimizirana. Prišlo je tudi do precejšnjega razpadanja peleta pri čiščenju, kar pomeni, da se nekateri proteini morda niso oborili in smo jih izgubili. Tehnična ponovitev le tega je bila narejena kasneje, gel je imel več lis, saj je tudi pelet pri čiščenju manj razpadal. Povprečen koeficient variabilnosti (CV) med njima na podlagi 46-ih lis je bil 33 % in je celo presegal povprečen CV med biološkima ponovitvama pri Desiree-ju (Desiree, 1. in 3. biološka ponovitev), kot tudi pri ostalih sortah. Tako sklepamo, da je izvedba tega poskusa slaba. Mnogo boljša tehnična ponovitev je bila pri vzorcu Igor klon 35, 2. biološka ponovitev. Povprečen CV med njima je bil 14 % in v nobenem primeru ni presegal povprečne CV-je med biološkimi ponovitvami pri vseh sortah. Kljub temu, pa sta se tehnični ponovitvi razlikovali v nekaj izbranih lisah. Povprečni CV je manjši pri Igor-ju kot pri Desiree-ju morda tudi zato, ker smo vzorca za tehnično ponovitev pri Igor-ju delali vzporedno pri Desiree-ju pa ne. Pri Igor-ju smo namreč oba vzorca istočasno ekstrahirali, rehidrirali, dali na 1D in na 2D. Za temeljito analizo vzpostavljenega sistema bi bilo potrebno narediti vsaj še eno tehnično ponovitev in to tako, da bi se vsi postopki pri obeh vzorcih neodvisno ponovili.

Ruebelt (2006) je prav tako ugotavljal variabilnost med geli zaradi tehnike 2-DE in ugotovil, da je povprečni CV med geli 25 %, kar je blizu našim rezultatom. Ugotovil je, da glavni vir variacij izvira iz metode 2-DE same in ne toliko iz postopka ekstrakcije. Kritični koraki pri 2-DE so bili rehidracija IPG-trakov, prenos proteinov s traku v SDS-PAGE gel in postopek barvanja. Bolj podrobno so pogledali 7 % lis, ki so imele povprečne CV-je nad 50 % in ugotovili, da so te lise vsebovale tudi ozadje, efekte robov, so bile horizontalno ali pa vertikalno razpotegnjene (ne lisa, ampak črta) ali pa so bile k njim dodane sosednje lise. S podobnim problemom smo se soočili tudi mi, a smo take lise izključili iz analize ali pa smo ustrezno popravili območje lise (ožanje območja na glavni vrh, ločevanje ali pa združevanje sosednjih lis, da je bilo na vseh gelih enotno).

Rossignol (2006) pravi, da moramo za dobro interpretacijo rezultatov narediti vsaj tri biološke ponovitve za ocenitev naravne variabilnosti in vsaj tri gele pri vsaki biološki

ponovitvi za ocenitev ponovljivosti metode. Pri našem poizkusu, bi morali narediti pri vsaki biološki ponovitvi vsaj tri tehnične ponovitve, da bi lahko zanesljivo ocenili, kaj je posledica biološke in kaj tehnične variabilnosti. Iz tega vsega lahko sklepamo, da se rezultati 2-DE precej razlikujejo med geli že zaradi tehnike same. Rešitev je tudi drug program, ki bi bil sposoben učinkovitejše normalizacije gelov in identifikacije lis.

5.1.3 Ovrednotenje variabilnosti med biološkimi ponovitvami in pri različni starosti rastline

Pomembno je, da pri vsakem poskusu spremljamo tudi vpliv variabilnosti znotraj posamezne proučevane skupine. K tej variabilnosti lahko doprinesejo individualne razlike med rastlinami ali pa minimalne razlike v okolju, v katerem posamezne rastline gojimo. K variabilnosti znotraj posamezne skupine pa lahko doprinesejo tudi minimalne razlike v vzorčenju – nekateri vzorci so lahko vsebovali več žilnega tkiva, drugi več listne lamine. V našem primeru so povprečni CV-ji biološke variabilnosti vedno pod 30 %, kar kaže na splošno neodvisnost dobljenih rezultatov od sekundarnih vplivov. Nekateri proteini pa so znotraj bioloških ponovitev kar precej nihali ($CV > 50\%$), torej so bolj odvisni od zunanjih dejavnikov okolja, genotipa rastline ali tipa tkiva.

Zanimiva je tudi primerjava variabilnosti proteinskega profila sorte Igor, ki je bil vzorčen v dveh stopnjah razvoja. Če upoštevamo le variabilnost med tremi biološkimi ponovitvami Igorja, ki smo jih pobrali istočasno, je povprečni CV za 1,16-krat manjši, kot če dodamo zraven še eno biološko ponovitev Igorja, ki je bil pobran en teden prej. Količina proteinov se v Igorju pobranem en teden prej precej razlikuje napram količinam pri treh bioloških ponovitvah pobranih skupaj en teden kasneje. Te tri biološke ponovitve so si veliko bolj enotne in je zato CV nekaterih lis tudi do 32-krat manjši (lisa 156) kot če gledamo variabilnost vključno z Igor-jem druge starosti. Vzrok za to je lahko v različnih starostih rastline, vendar tega ne moremo trditi, saj imamo le eno biološko ponovitev Igor-ja pobranega s sortami (en teden pred ostalimi).

5.1.4 Ocena varnosti analiziranih GS linij preko proteinskega profiliranja

Variabilnost med sortami krompirja presega variabilnost med biološkimi ponovitvami ter med transformiranim in netransformiranim Igorjem ne glede na tip uporabljene statistične analize. Torej variabilnost zaradi transformacije ostane znotraj območja naravne variabilnosti. Izmed proteinov, ki so se pokazali statistično različni pri GS Igorjih v primerjavi z netransformirani Igorjem, le dva kažeta povišane količine. Te pa so v primerljivih količinah tudi v sorti Sante ali pa Desiree. Vseeno bi bilo zanimivo te proteine identificirati z masno spektroskopijo. Statistične analize pa smo naredili le na 46 proteinskih lisah, kar predstavlja relativno majhen delež celotnega listnega proteoma. Za bolj zanesljivo oceno varnosti bi bilo nujno razviti metodologijo za spremljanje bistveno večjega števila proteinov. Za to bi potrebovali program, ki bi bil sposoben učinkovitejše identifikacije enakih lis med geli. Lahko pa bi tudi uporabili drugo metodo, ki ne bi sama po sebi prispevala toliko k variabilnosti proteinskih profilov. Vseeno pa tudi tako profiliranje predstavlja dopolnitev k tarčnim metodam za oceno tveganja GS rastlin.

5.2 SKLEPI

- Vzpostavili smo sistem za analizo profila proteinov v listih krompirja, ki omogoča identifikacijo približno 450 proteinov.
- Tako variabilnost tehnike same (2-DE) kot tudi variabilnost biološkega materiala je precejšnja, tako da je v skladu s tem nujno tudi načrtovati poskuse. Variabilnost pa je še vedno v območju drugih profilnih analiz, kot na primer analize transkriptoma s pomočjo DNA mikromrež.
- Program "Dymension 2-D analysis software" za obdelavo tako velike biološke raznovrstnosti v proteomu ni najbolj primeren.
- Med sortami so se pokazale največje razlike po vseh statističnih analizah.
- Ker transformacija ne presega naravne variabilnosti med sortami bi lahko sklepali, da je ta preiskovana genska sprememba na krompirju varna. Ker pa to sklepamo na podlagi le 46 lis, je trditev manj zanesljiva.

6 POVZETEK

Za preverjanje varnosti transgenih rastlin v prehrani lahko uporabljamo tarčne ali pa netarčne tehnike. V današnjem času sistematsko uporabljajo tarčne tehnike, pri katerih analizirajo ključne sestavine kot so makronutrienti (maščobe, ogljikovi hidrati, proteini), mikronutrienti (vitamini, minerali), antinutrienti, naravni toksini in potencialni alergeni. Ugotavljajo, če je v njihovi kvantiteti ali kvaliteti kakršnakoli razlika napram netransformirani rastlini.

Problem take analize je, da se osredotoči le na določene, znane sestavine. Pri netarčnih tehnikah pa je prednost v tem, da skušamo dobiti celoten profil določenih komponent v rastlini. Lahko raziskujemo na različnih integracijskih nivojih v celici. Lahko se osredotočimo na mRNA, na proteine ali pa na metabolite in skušamo dobiti čim bolj popolno zastopanost le teh v tkivu. Ker elementi za preiskavo v tem primeru niso v naprej določeni, lahko odkrijemo nov element (npr. nov protein) ali pa ugotovimo razliko v kvantiteti nekega elementa na katerega prej nismo bili pozorni.

Pri tem delu smo skušali oceniti uporabnost proteomike za ocenjevanje varnosti transgenih rastlin za prehrano. Proteomika je ena izmed netarčnih tehnik, ki skuša zajeti v proučevanje vse proteine, ki so se pod določenimi pogoji in v določenem času izrazili v celici, tkivu ali organizmu. Mi smo se ukvarjali s proteomom listov krompirja *Solanum tuberosum*. Skušali smo primerjati proteome med transformiranim (odpornost na krompirjev virus Y) in netransformiranim krompirjem ter med različnimi sortami krompirja (Sante, Desiree in Igor). Med sortami smo primerjali zato, da bi ugotovili naravno variabilnost v proteomu listov krompirja. Tudi tri biološke ponovitve znotraj sort in transgenih linij smo naredili z enakim namenom. Pomembno je, da upoštevamo naravno variabilnost proteoma med sortami in biološkimi ponovitvami, saj lahko spremembe v proteomu med transgeno in netransgeno rastlino padejo znotraj območja naravne variabilnosti. Tako lahko potrdimo varnost transgene rastline in ni potrebnih nadaljnjih raziskav. Za ločevanje proteinov smo uporabili 2-DE, ki na enkrat lahko loči veliko število proteinov glede na izoelektrično točko (1.dimenzija) in molekulsko maso (2. dimenzija).

Z vzpostavljeno metodologijo smo zaznali skupaj 478 proteinskih lis. Tehnični problemi so se pojavili predvsem pri analizi slike. Program "Dymension 2-D analysis software" je gele včasih narobe prekril. Odločili smo se, da bomo poskušali povečati zanesljivost dobljenih rezultatov, čeprav smo zato zmanjšali občutljivost metode. Tako smo za nadaljnjo obdelavo izbrali 46 lis. Večino od teh je program pravilno prepoznal na vseh gelih. Pri nekaterih lisah pa smo naredili še ročne popravke tako, da smo poenotili izbiro lis med geli.

Za ocenitev variabilnosti tehnike same smo naredili dve tehnični ponovitvi in izračunali povprečni CV na podlagi 46-ih izbranih lis. Tehnična ponovitev pri Igor-ju, klon 35, 2. biološka ponovitev, je bila izvedena brez tehničnih napak. Povprečni CV je bil 14 %. Vendar to ni popolnoma realna ocena tehnične variabilnosti, ker smo v tem primeru oba vzorca delali istočasno. Variabilnosti med biološkimi ponovitvami je bila po pričakovanjih nekoliko večja. Povprečni CV-ji so segali od 20 % do 28 %.

Z različnimi statističnimi metodami smo ocenili razlike med sortami in med netransgenim in transgenim Igorjem. Vse analize so pokazale, da se najbolj razlikujejo proteomi med različnimi sortami. Variabilnost med netransformiranim in transformiranim Igorjem ne presega variabilnosti med sortami, lahko pa je večja kot med biološkimi ponovitvami znotraj sort. Analiza variance je identificirala tri proteine, ki so v GS Igor-ju v statistično signifikantnih različnih količinah napram netransformiranemu Igor-ju. Eden od teh je prisoten v rezistentnem Igor-ju klon 35 v nižjih količinah kot v netransformiranem Igorju in torej ne predstavlja nevarnosti za zdravje. Dva pa sta prisotna v višjih količinah, vendar v območju količin izmerjenih tudi za sorto Desiree ali pa Sante. Tako profiliranje torej lahko predstavlja dopolnitev k tarčnim metodam za oceno tveganja GS rastlin.

7 VIRI

- 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, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 815(1-2): 109-23.
- Berkelman T., Stenstedt T. 1998. 2-D electrophoresis (using immobilized pH gradients). Principles and methods. Amersham biosciences. Technical university of Munich
- Bohanec B., Javornik B., Strel B. 2004. Gensko spremenjena hrana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 30 str., 55 str., 70str., 75str.
- Carpentier S.C., Witters E., Laukens K., Deckers P., Swennen R., Panis B. 2005. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 5, 2497-2507
- Cellini F., Chesson A., Colquhoun I., Constable A., Davies H.V., Engel K.H., Gatehouse A.M., Karenlampi S., Kok E.J., Leguay J.J., Lehesranta S., Noteborn H.P., Pedersen J., Smith M. 2004. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food and chemical toxicology*, 42: 1089-1125
- Corpillo D., Gardini G., Vaira A.M., Basso M., Aime S., Accotto G.P., Fasano M. 2004. Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: The case of virus-resistant tomato. *Proteomics*, 4, 193-200
- Hirano H., Islam N., Kawasaki H. 2004. Technical aspects of functional proteomics in plants. *Phytochemistry*, 65(11): 1487-1498.
- <http://bio.ijs.si/SBD/terminologija.html>
- Jamnik P., Radišek S., Javornik B., Raspor P. 2006. 2-D separation of *Verticillium albo-atrum* proteins. *Acta agriculturae Slovenica*, 87 - 2
- Kok E.J., Kuiper H.A. 2003. Comparative safety assessment for biotech crops. *Trends in biotechnology*, 21, 10
- Kuiper H.A., Kleter G.A., Noteborn H.P., Kok E.J. 2002a. Substantial equivalence-an appropriate paradigm for the safety assessment of genetically modified foods? *Toxicology*, 181-182: 427-431
- Kuiper H.A., Kok E.J., Engel K.H. 2003. Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment. *Current opinion in biotechnology*, 14: 238-243

- Kuiper H.A., Kok E.J., Noteborn H.P. 2000. Topic 5: Profiling techniques to identify differences between foods derived from biotechnology and their counterparts. FAO/WHO expert consultation on foods derived from biotechnology, Headquarters of the World health organization
- Kuiper H.A., Noteborn H.P., Kok E.J., Kleter G.A. 2002b. Safety aspects of novel foods. *Food research international*, 35: 267-271
- Lehesranta S.J., Davies H.V., Shepherd L.V., Nunan N., McNicol J.W., Auriola S., Koistinen K.M., Suomalainen S., Kokko H.I., Karenlampi S.O. 2005. Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines. *Plant physiology*, 138: 1690-1699
- Protokol: Quick start Bradford protein assay, instruction manual. 2000. Bio-Rad
- Rossignol M., Peltier J.B., Mock H.P., Matros A., Maldonado A.M., Jorrín J.V. 2006. Plant proteome analysis: a 2004-2006 update. *Proteomics*, 6 (20): 5529-5548.
- Ruebelt M.C., Leimgruber N.K., Lipp M., Reynolds T.L., Nemeth M.A., Astwood J.D., Engel K.H., Jany K.D. 2006a. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 1. Assessing analytical validation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54: 2154-2161
- Ruebelt M.C., Lipp M., Reynolds T.L., Astwood J.D., Engel K.H., Jany K.D. 2006b. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 2. Assessing natural variability. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54: 2162-2168
- Ruebelt M.C., Lipp M., Reynolds T.L., Schmuke J.J., Astwood J.D., DellaPenna D., Engel K.H., Jany K.D. 2006c. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 3. Assessing unintended effects. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54: 2169-2177
- Stanič Racman D., Mcgeachy K., Reavy B., Štrukelj B., Žel J., Barker H. 2001. Strong resistance to potato tuber necrotic ringspot disease in potato induced by transformation with coat protein gene sequences from an NTN isolate of *potato virus Y*. *The Annals applied biology*, 139: 269-275

ZAHVALA

Največja zahvala gre moji mentorici doc. dr. Kristini Gruden in asis. dr. Poloni Jamnik, da sta mojemu delu posvetili veliko časa. Doc. dr. Kristini Gruden hvala predvsem za vedno nove nasvete in ideje tekom raziskovanja in hiter pregled diplomskega dela. Naučila me je, kako zasnovati poskus in kako pravilno interpretirati svoje delo. Asis. dr. Poloni Jamnik hvala za stalno pomoč pri delu v laboratoriju in za pripravljenost odgovarjati na vprašanja, ki so se pojavila tekom dela. Hvala tudi za vse vzpodbudne besede.

Prav tako se zahvaljujem mojemu recenzentu prof. dr. Gregorju Anderluhu in moji predsednici doc. dr. Marjanci Starčič Erjavec, ki sta hitro in učinkovito pregledala mojo diplomsko nalogo.

Zahvala gre tudi mladi raziskovalki Ani Rotter, ki mi je pomagala pri statističnih analizah rezultatov.

Hvala za podporo moji družini in mojemu fantu Primožu.

PRILOGA

Normalizirani volumni 46-ih izbranih lis pri vseh vzorcih. * Lise ni bilo prisotne na gelu. Prazna celica - liso smo vzeli iz analize, ker jo program ni izbral pravilno na vseh gelih. Št. lise pomeni številko le te na referenčnem gelu (I35bT).

ŠT. LISE	NORMALIZIRANI VOLUMNI VSEH VZORCEV																
	D1	D1T	D3	S1	S2	S3	I0	I1	I2	I3	I35a	I35b	I35bT	I35c	I27a	I27b	I27c
40	0,52	0,20	0,50	0,41	0,19	0,18	0,32	0,42	0,56	0,61	0,72	0,55	0,61	0,57	0,66	0,82	0,63
41	0,55	0,29	0,47	0,96	0,57	0,42	0,51	0,28	0,67	0,67	0,54	0,48	0,55	0,47	0,60	0,64	0,60
42	0,66	0,81	0,68	0,50	0,59	0,66	1,45	0,76	1,00	0,91	0,83	0,78	1,25	0,94	0,85	0,74	0,65
43	0,99	0,59	0,84	0,70	0,70	0,66	0,53	0,45	1,16	0,41	0,47	0,52	0,61	0,59	0,41	0,41	0,82
47	0,82	2,93	1,66	1,22	1,34	1,10	1,34	1,04	1,38	1,11	1,52	1,00	1,31	1,15	1,66	1,01	1,52
52	1,00	1,89	1,20	1,38	1,11	1,51	1,78	1,22	1,09	1,15	1,11	0,85	1,44	1,07	1,33	0,80	1,57
67	0,32	0,55	0,67	0,38	0,21	0,09	0,31	0,21	0,33	0,17	0,24	0,10	0,15	0,16	0,15	0,21	0,17
70	0,14	0,06	0,21	0,08	0,04	0,12		0,14	0,19	0,13	0,16	0,14	0,12	0,12	0,13	0,12	0,10
76	0,24	0,38	0,23	0,20	0,25	0,16	0,26	0,23	0,20	0,17	0,21	0,23	0,17	0,15	0,15	0,14	0,17
77	0,13	0,23	0,20	0,12	0,11	0,11	0,12	0,13	0,09	0,11	0,11	0,11	0,11	0,17	0,12	0,15	0,11
88	0,19	0,24	0,29	0,23	0,14	0,20	0,13	0,22	0,11	0,13	0,28	0,14	0,13	0,15	0,11	0,10	0,15
91	0,23	0,15	0,19	0,30	0,16	0,16	0,27	0,12	0,19	0,19	0,23	0,16	0,15	0,22	0,13	0,20	0,19
94	0,23	0,16	0,28	0,32	0,21	0,18	0,32	0,24	0,29	0,33	0,38	0,25	0,28	0,34	0,23	0,34	0,26
95	0,26	0,33	0,30	0,23	0,32	0,33	0,33	0,20	0,17	0,20	0,20	0,10	0,18	0,14	0,17	0,15	0,15
104	0,08	0,24	0,19	0,14	0,09	0,16	0,27	0,52	0,42	0,21	0,40	0,19	0,23	0,21	0,26	0,21	0,19
107	0,11	0,16	0,10	0,56	0,26	0,44	0,39	0,42	0,44	0,32	0,45	0,35	0,36	0,42	0,41	0,50	0,47
108	1,33	1,11	1,03	0,61	0,47	0,74	0,50	0,45	0,57	0,51	1,48	0,74	0,82	1,03	0,83	0,53	0,60
109	0,62	0,82	1,12	0,20	0,15	0,19	0,19	0,17	0,18	0,16	0,36	0,42	0,35	0,19	0,17	0,25	0,25
129	0,06	0,07	0,04	0,10	0,04	0,05	0,11	0,04	0,04	0,08	0,07	0,05	0,05	0,10	0,07	0,06	0,08
133	0,13	0,25	0,15	0,10	0,10	0,12	0,24	0,09	0,18	0,13	0,17	0,09	0,13	0,10	0,10	0,18	0,21
137	0,33	0,23	0,20	0,41	0,29	0,27	0,33	0,36	0,46	0,33	0,22	0,20	0,15	0,10	0,20	0,35	0,31
138	0,05	0,07	0,09	0,04	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,08	0,06	0,06	0,09	0,05	0,05	0,08
143	0,39	0,31	*	0,18	0,23	0,30	0,23	0,46	0,81	1,06	0,47	0,40	0,42	0,33	0,74	0,46	0,59
146	0,20	0,42	0,31	0,16	0,18	0,27	0,23	0,12	0,13	0,11	0,36	0,33	0,34	0,27	0,03	0,04	0,07
152	0,08	0,06	0,12	0,28	0,26	0,34	0,07	0,09	0,11	0,11	0,14	0,12	0,13	0,13	0,12		0,14
153	0,27	0,39	0,22	0,19	0,30	0,28	0,29	0,10	0,23	0,23	0,24	0,22	0,24	0,22	0,10	0,18	0,17
154	0,09	0,30	0,19	0,14	0,26	0,17	0,13	0,21	0,14	0,11	0,20	0,16	0,22	0,11	0,10	0,11	0,11
156	0,28	0,77	0,54	0,44	0,38	0,48	0,52	0,30	0,29	0,29	0,41	0,19	0,29	0,25	0,25	0,24	0,26
158	0,19	0,29	0,30	0,17	0,29	0,34	0,37	0,30	0,39	0,32	0,36	0,19	0,29	0,28	0,33	0,42	0,45
166	0,17	0,11	0,12	*	*	0,02	0,07	0,08	0,11	0,09	0,11	0,08	0,09	0,12	0,07	0,07	0,12
167	0,40	0,30	0,24	0,09	0,06	0,12	0,23	0,21	0,24	0,19	0,30	0,33	0,30	0,23	0,16	0,23	0,28
170	0,13	0,35	0,29	0,16	0,47	0,31	0,18	0,13	0,15	0,12	0,32	0,27	0,29	0,26	0,20	0,17	0,20
171	0,62	0,67	0,45	0,41	0,57	0,57	0,45	0,34	0,30	0,27	0,49	0,34	0,39	0,65	0,30	0,35	0,48
175	2,05	1,63	1,63	1,05	0,80	1,65	1,86	1,19	1,13	1,34	1,54	1,00	1,57	1,47	1,41	2,95	1,77
180	0,08	0,10	0,12				0,05	0,15	0,04	0,05	0,05	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,05
181	0,14	0,16	0,14	0,12	0,04	0,07	0,10	0,11	0,06	0,10	0,04	0,04	0,04	0,04	0,12	0,08	0,10
185	0,05	0,07	0,05	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04	0,02	0,04	0,03	0,04	0,04	0,05	0,03	0,06
190	0,03	0,04	0,04	0,02	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,02	0,03	0,04	0,04	0,03	0,04
195	0,33	0,91	0,52	0,53	0,84	0,59	0,51	0,43	0,37	0,37	0,49	0,30	0,36	0,31	0,30	0,29	0,21
203	0,14	0,24	0,24	0,11	0,18	0,23	0,10	0,15	0,20	0,24	0,22	0,16	0,18	0,13	0,17	0,17	0,21
210	0,16	0,17	0,21	0,07	0,21	0,15											
212	0,38	0,53	0,53	0,21		0,20	0,48	0,35	0,23	0,27	0,58	0,17	0,16	0,11	0,06	0,13	0,14
216	0,06	0,19	0,18	0,13	0,09	0,10	0,06	0,07	0,03	0,12	0,08	0,05	0,07	0,06	0,09	0,10	0,08
218	0,06	0,09	0,05	0,05		0,07	0,05	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,06	0,03	0,02	0,04
228	0,16	0,16	0,16	0,13	0,14	0,10	0,14	0,07	0,13	0,12	0,13		0,15		0,16	0,19	0,16
238				0,86	0,59	0,69	0,77	2,14	0,76	1,04	1,71	0,87	0,79	0,70	0,75	0,67	0,83

