

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katja ISTENIČ

**SPREMEMBE PROTEOMA LISTOV KROMPIRJA
(*Solanum tuberosum* L.) PO OKUŽBI S
KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y^{NTN}**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANJI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katja ISTENIČ

SPREMEMBE PROTEOMA LISTOV KROMPIRJA (*Solanum tuberosum* L.) PO OKUŽBI S KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y^{NTN}

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CHANGES IN THE POTATO (*Solanum tuberosum* L.) LEAVES
PROTEOME INDUCED BY POTATO VIRUS Y^{NTN}**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medodelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo ter na Biotehniški fakulteti v Ljubljani na Oddelku za živilsko tehnologijo na katedri za biotehnologijo.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Majo Ravnikar, za somentorico doc. dr. Polono Jamnik in za recenzentko prof. dr. Marino Dermastio.

Mentorica: prof. dr. Maja Ravnikar

Somentorica: doc. dr. Polona Jamnik

Recenzentka: prof. dr. Marina Dermastia

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Maja Ravnikar

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Članica: doc. dr. Polona Jamnik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Marina Dermastia

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katja Istenič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 581.144.4:633.491:581.2:547.96(043)=163.6
KG	proteom/rastlinsko tkivo/krompir/listi krompirja/zdravi listi krompirja/okuženi listi krompirja/proteinski profil/PVY ^N /PVY ^{NTN} /dvodimenzionalna gelska elektroforeza/izoelektrično fokusiranje/SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza
AV	ISTENIČ, Katja
SA	RAVNIKAR, Maja (mentorica)/JAMNIK, Polona (somentorica)/DERMASTIA, Marina (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	SPREMEMBE PROTEOMA LISTOV KROMPIRJA (<i>Solanum tuberosum L.</i>) PO OKUŽBI S KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y ^{NTN}
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 79 str., 19 pregl., 13 sl., 47 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Analiza proteinskega profila ter posttranslacijskih modifikacij proteinov nam poda največ informacij o dogodkih, ki se odvijajo v rastlinski celici zgodaj po okužbi s povzročiteljem bolezni. Preučevanje kompleksnih mešanic proteinov nam omogoča dvodimenzionalna gelska elektroforeza (2-DE). Z njo lahko analiziramo celotni komplet izraženih proteinov in posttranslacijskih modifikacij v izbranem tkivu v določenem času. V diplomskem delu smo z 2-DE proučevali spremembo proteoma listov krompirja (<i>Solanum tuberosum L.</i>) sorte 'Igor' 30 min in 48 h po okužbi s krompirjevim virusom Y ^N oziroma Y ^{NTN} . Zanimale so nas spremembe profila celokupnih proteinov kot tudi spremembe profila fosfoproteinov. V sklopu priprave vzorca za analizo z 2-DE smo optimizirali postopek ekstrakcije proteinov iz listov krompirja ter postopek čiščenja proteinskega ekstrakta, v katerega smo vključili tudi odstranjevanje visoko zastopenega encima rubisko z imunoafinitetno kromatografijo. Z 2-DE smo ločili do 532 proteinov na gel, za nadaljnjo statistično analizo pa smo uporabili normalizirane vrednosti relativnih volumnov 324 2-D elektroforetskih lis. Rezultati so pokazali, da na proteom rastlin v zgodnjih časih po virusni okužbi močneje vpliva rastna sezona kot pa virusna okužba. Statistično značilne spremembe so bile prisotne pri 14 proteinih; 10 proteinov je kazalo spremembe izražanja glede na čas pobiranja rastlinskega materiala, 4蛋白 pa glede na tip okužbe. Pri analizi fosfoproteinov zaradi raznolikosti proteinskih profilov bioloških ponovitev nismo mogli sklepati, v katerih primerih je fosforilacija lahko posledica odgovora rastline na virusno okužbo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 581.144.4:633.491:581.2:547.96(043)=163.6
CX proteome/plant tissue/potatoes/potato leaves/healthy leaves/infected leaves/protein profile/PVY^N/PVY^{NTN}/two-dimensional gel electrophoresis/isoelectric focusing/SDS polyacrylamide gel electrophoresis
AU ISTE NIČ, Katja
AA RAVNIKAR, Maja (supervisor)/ JAMNIK, Polona (co-advisor)/DERMASTIA, Marina (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2008
TI CHANGES IN THE POTATO (*Solanum tuberosum* L.) LEAVES PROTEOME INDUCED BY POTATO VIRUS Y^{NTN}
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIII, 79 p., 19 tab., 13 fig., 47 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Analysis of protein profile and protein posttranslational modifications profile gives the best information about the events taking place in plant cells early after pathogen infection. Studying complex mixtures of proteins is feasible with two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE), which enables analysis of the whole set of expressed proteins and posttranslational modifications in defined tissue and time. In the graduation thesis we used 2-DE to study changes in potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar 'Igor' leaf proteome 30 min and 48 h post inoculation with potato virus Y^N or Y^{NTN}. We were interested in profile changes of total proteins as well as phosphoproteins. In connection with sample preparation for 2-DE we optimized the procedure of protein extraction from plant leaves and the procedure of cleaning the protein samples which we coupled with immunoaffinity chromatography for removal of high-abundant enzyme rubisco. With 2-DE we separated up to 532 proteins per gel, for further statistical analysis we used normalized values of relative volumes of 324 protein spots. The results showed that in early stages of virus infection the influence of growth season has more effect on plant proteome than virus infection. Statistically significant changes in protein expression were present in 14 proteins; 10 proteins showed changes in expression according to harvesting time and 4 proteins according to type of infection. In the phosphoprotein analysis we could not infer in which case phosphorylation could be the consequence of plant response to virus infection due to differences in biological samples.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
SLOVARČEK.....	XIV

1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI NALOGE.....	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KROMPIR SORTE ‘IGOR’	3
2.2 KROMPIRJEV VIRUS Y.....	3
2.2.1 Krompirjev virus YN.....	4
2.2.2 Krompirjev virus Y ^{NTN}	4
2.3 ODGOVOR RASTLIN KROMPIRJA NA OKUŽBO S PVY	5
2.3.1 Spremembe izražanja genov rastlin krompirja sorte ‘Igor’ po okužbi s PVY ^{NTN}	7
2.3.2 Spremembe v sintezi proteinov po okužbi rastlin krompirja s PVY ^{NTN}	9
2.3.3 Interakcije med rastlinskimi in virusnimi proteini	10
2.3.4 Spremembe proteoma celičnih suspenzij rastlin riža (<i>O. sativa indica</i> in <i>O. sativa japonica</i>) po okužbi z RYMV	11
2.4 METODOLOGIJA SPREMLJANJA INTERAKCIJ MED VIRUSI IN RASTLINAMI NA NIVOJU PROTEOMA	13

2.4.1 Dvodimenzionalna gelska elektroforeza	13
2.4.2 Identifikacija proteinov.....	14
2.4.3 Fosfoproteomika.....	16
2.4.4 Priprava vzorca za 2-DE	17
2.4.4.1 Odstranjevanje visoko zastopanih proteinov iz proteinskih ekstraktov z uporabo imunoafinitetne kromatografije	18
3 MATERIAL IN METODE.....	19
3.1 POTEK DELA.....	19
3.2 MATERIALI	20
3.2.1 Virusi	20
3.2.2 Rastlinski material	20
3.2.3 Reagenti, raztopine	21
3.2.3.1 Ekstrakcija proteinov s TBS/tween 20 in urea/SDS.....	21
3.2.3.2 Ekstrakcija proteinov s pufrom Tris (Vilhar, 1996).....	22
3.2.3.3 Čiščenje proteinskih ekstraktov z uporabo kompleta za odstranjevanje encima rubisko.....	23
3.2.3.4 Koncentriranje proteinskih ekstraktov z uporabo kompleta za koncentriranje	23
3.2.3.5 Določanje koncentracije proteinov v proteinskem ekstraktu	23
3.2.3.6 Čiščenje proteinov v ekstraktu z uporabo kompleta za čiščenje proteinskih ekstraktov	24
3.2.3.7 Obarjanje proteinov v ekstraktu z acetonom	24
3.2.3.8 Obarjanje proteinov v ekstraktu s TCA.....	24
3.2.3.9 Ugotavljanje učinkovitosti ekstrakcije in postopkov čiščenja s SDS- PAGE (mini Protean II elektroforetski sistem)	24
3.2.3.10 Detekcija proteinov na poliakrilamidnem gelu	27
3.2.3.11 Dvodimenzionalna elektroforeza.....	28
3.2.3.12 Detekcija fosfoproteinov na poliakrilamidnem gelu	32
3.2.3.13 Detekcija celokupnih proteinov na poliakrilamidnem gelu.....	32
3.2.4 Aparature in naprave	34

3.2.5 Priprava rastlinskega materiala, mehanska inokulacija rastlin in pobiranje rastlinskega materiala	37
3.2.6 Ekstrakcija proteinov	37
3.2.6.1 Ekstrakcija proteinov s TBS/tween 20 in urea/SDS	37
3.2.6.2 Ekstrakcija proteinov s pufrom Tris (Vilhar, 1996)	37
3.2.7 Čiščenje proteinskih ekstraktov z uporabo kompleta za odstranjevanje encima rubisko	38
3.2.8 Koncentriranje proteinskih ekstraktov z uporabo kompleta za koncentriranje	39
3.2.9 Določanje koncentracije proteinov v proteinskem ekstraktu	39
3.2.10 Čiščenje proteinskih ekstraktov	40
3.2.10.1 Čiščenje proteinov v ekstraktu z uporabo kompleta za čiščenje proteinskih ekstraktov	40
3.2.10.2 Obarjanje proteinov v ekstraktu z acetonom	41
3.2.10.3 Obarjanje proteinov v ekstraktu z 10 % TCA	41
3.2.11 Ugotavljanje učinkovitosti ekstrakcije in postopkov čiščenja s SDS-PAGE (mini Protean II elektroforetski sistem)	41
3.2.11.1 Vlivanje gelov	42
3.2.11.2 Priprava vzorcev in nanos na gel	43
3.2.11.3 Elektroforeza	43
3.2.12 Detekcija proteinov na poliakrilmidnem gelu	43
3.2.13 Dvodimenzionalna elektroforeza	44
3.2.13.1 Prva dimenzija	44
3.2.13.2 Druga dimenzija	46
3.2.14 Detekcija fosfoproteinov na poliakrilmidnem gelu	47
3.2.15 Detekcija celokupnih proteinov na poliakrilmidnem gelu	48
3.2.16 Analiza slike	49
3.2.16.1 Analiza slike fosfoproteinov	49
3.2.16.2 Analiza slike celokupnih proteinov	49
3.2.17 Statistična analiza rezultatov	51
4 REZULTATI.....	52

4.1 OPTIMIZACIJA PRIPRAVE VZORCA ZA DVODIMENZIONALNO ELEKTROFOREZO	52
4.2 PRIMERJAVA PROTEINSKIH PROFILOV V LISTIH KROMPIRJA PRED IN PO OKUŽBI Z VIRUSOM.....	54
4.3 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV.....	57
4.4 DETEKCIJA IN ANALIZA FOSFOPROTEINOV	64
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	67
5.1 RAZPRAVA.....	67
5.1.1 Optimizacija ekstrakcije proteinov ter čiščenja proteinskih ekstraktov	67
5.1.2 Analiza proteinskega profila v listih rastlin krompirja sorte ‘Igor’ po okužbi s PVY ^N in PVY ^{NTN}	68
5.2 SKLEPI.....	71
6 POVZETEK.....	72
7 VIRI	74

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vzorci rastlinskega materiala, ki smo ga uporabili v analizah	21
Preglednica 2: Sestava ekstrakcijskega pufra TBS/tween 20	21
Preglednica 3: Sestava ekstrakcijskega pufra urea/SDS	22
Preglednica 4: Sestava ekstrakcijskega pufra Tris, pH 8,0 (Vilhar, 1996)	23
Preglednica 5: Priprava ločilnega gela z debelino 0,75 mm z 12 % (m/v) koncentracijo akrilamida (Gallagher, 2006)	25
Preglednica 6: Priprava koncentracijskega gela z debelino 0,75 mm s 3,9 % (m/v) koncentracijo akrilamida (Gallagher, 2006)	26
Preglednica 7: Sestava 10 x SDS elektroforetskega pufra (Gallagher, 2006)	26
Preglednica 8: Sestava 4 x SDS vzorčnega pufra (Gallagher, 2006)	27
Preglednica 9: Sestava fiksacijske raztopine (Sasse in Gallagher, 2003)	27
Preglednica 10: Sestava barvila Coomassie briljantno modro (Sasse in Gallagher, 2003)	28
Preglednica 11: Sestava raztopine za razbarvanje (Sasse in Gallagher, 2003)	28
Preglednica 12: Priprava raztopine za rehidracijo trakov	29
Preglednica 13: Sestava pufra za uravnoteženje – osnovni	29
Preglednica 14: Priprava ločilnega gela z debelino 1 mm z 12 % (m/v) koncentracijo akrilamida	30
Preglednica 15: Sestava 5x SDS elektroforetskega pufra	31
Preglednica 16: Sestava 1x SDS elektrofoterskega pufra	31
Preglednica 17: Sestava fiksacijske raztopine	32
Preglednica 18: Sestava razbarvalne raztopine	32
Preglednica 19: Sestava fiksacijske raztopine	33
Preglednica 19: Sestava raztopine za razbarvanje	33

KAZALO SLIK

Slika 1: Kompleksnost signalnih poti, ki omogočajo aktivacijo obrambnih odgovorov (Hammond-Kosack in Jones, 1996: 1784).....	6
Slika 2: Shematski prikaz poteka dela.....	19
Slika 3: Tridimenzionalni pogled proteinske lise na 2-DE gelu odraža njen obliko in volumen, ki se upošteva pri kvantifikaciji lis.....	51
Slika 4: SDS-PAGE: Ocena optimizacije ekstrakcije in čiščenja proteinskih ekstraktov s kompletom za odstranjevanje encima rubisko	53
Slika 5.a: Primer 2-DE gela 3. serije (N 3. s 48 h).....	54
Slika 5.b: Primer 2-DE gela 4. serije (N 4. s 48 h).....	54
Slika 5.c: Primer 2-DE gela 5. serije (N 5. s 48 h).....	55
Slika 6: Primerjava izbrane lise v tridimenzionalni postavitvi med posameznimi geli z vzorci proteinskih ekstraktov listov krompirja.....	56
Slika 7: Hierarhično razvrščanje vzorcev različno obdelanih rastlin krompirja različnih serij (horizontalno) in 2-D elektroforetskih lis (vertikalno)	58
Slika 8.a: Analiza glavnih komponent (PCA): Razvrstitev 2-DE lis različno obdelanih rastlin krompirja različnih serij glede na 1. in 2. komponento PCA.	59
Slika 8.b: Analiza glavnih komponent (PCA): Razvrstitev 2-DE lis različno obdelanih rastlin krompirja različnih serij glede na 1. in 3. komponento PCA.	60
Slika 8.c: Analiza glavnih komponent (PCA): Razvrstitev 2-DE lis različno obdelanih rastlin krompirja različnih serij glede na 2. in 3. komponento PCA.	60
Slika 8.d: Prispevek posameznih komponent PCA k variabilnosti	61
Slika 9: T-test	62
Slika 10.a: Analiza variance (ANOVA): Proteini, ki se statistično značilno razlikujejo glede na čas pobiranja rastlinskega materiala (30 min in 48 h po okužbi).....	63

Slika 10.b: Analiza variance (ANOVA): Proteini, ki se statistično značilno razlikujejo med slepo okuženimi rastlinami, rastlinami, okuženimi s PVY ^N ter rastlinami, okuženimi s PVY ^{NTN}	63
Slika 11: Referenčni 2-DE gel z združenimi proteinskimi ekstrakti rastlin krompirja 4. in 5. serije	64
Slika 12: Primer 2-DE gela fosfoproteinov rastlin krompirja (S 3.s 30 min).....	65
Slika 13: Primer prekrivanja 2-DE gela s celokupnimi proteini (obarvan zeleno) z 2-DE gelom s fosfoproteini (obarvan rožnato)	66

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2-DE	dvodimenzionalna gelska elektroforeza
2-ME	2-merkaptetoanol
ANOVA	analiza variance (ang. analysis of variance)
APS	amonijev persulfat
BSA	goveji serumski albumin
CHAPS	3-[(3-kloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonat
Da	dalton, enota za molekulsko maso
DIGE	diferencialna gelska elektroforeza
ESI	elektrosprej ionizacija
HCL	hierarhično razvrščanje vzorcev (hierarchical clustering)
HR	preobčutljivostna reakcija (ang. hypersensitive reaction)
HSP	stresni protein
IEF	izoelektrično fokusiranje
IgY	imunoglobulin Y
IMAC	afinitetna kromatografija z imobiliziranimi kovinami
IPG	imobiliziran pH gradient
kDa	kilo Da (1000 Da)
LC	tekočinska kromatografija
MALDI	ionizacija tripsinskih fragmentov v matriksu z desorpcijo z laserjem (Matrix-assisted laser desorption/ionization)
MS	masna spektrometrija
MS/MS	tandemska masna spektrometrija
MW	molekulska masa
PCA	analiza glavnih komponent (principal components analysis)
pI	izoelektrična točka
PTGS	post-transkripcijsko utišanje genov (post-transcriptional gene silencing)
PTNRD	obročkasta nekroza gomoljev krompirja (potato tuber necrotic ringspot disease)
PVPP	polivinilpolipirolidon

PVY	krompirjev virus Y (potato virus Y)
PVY ^C	krompirjev virus Y ^C
PVY ^N	krompirjev virus Y ^N
PVY ^{NTN}	nekrotični različek PVY
PVY ^O	krompirjev virus Y ^O
RUBISKO	ribuloza -1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza
RYMV	rižev virus rumene lisavosti (rice yellow mottle virus)
SDS	natrijev dodecil sulfat
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom
TCA	triklorocetna kislina
TEMED	N,N,N',N'- tetrametil etilen diamin
TOF	masni analizator na čas preleta ionov (time of flight)
Tris HCL	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol, hidroklorid

SLOVARČEK

Dvodimenzionalna elektroforeza

tehnika, ki omogoča ločevanje kompleksne mešanice proteinov v dveh dimenzijah. Prvo dimenzijo predstavlja izoelektrično fokusiranje in drugo poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom.

Izoelektrično fokusiranje

ločevanje proteinov glede na njihovo izoelektrično točko (pI).

Poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom

tehnika, ki omogoča ločevanje proteinov glede na njihovo molekulsko maso.

1 UVOD

Krompirjev virus Y (PVY) v Sloveniji od leta 1974 ogroža pridelovanje krompirja. Primarna in sekundarna znamenja okužbe so blaga, navadno se na listih okuženih rastlin pojavi mozaik, ki ga spreminja blago gubanje listne površine in skoraj neopazna kodravost. Rast rastlin večinoma ni prizadeta. Sorte krompirja so različno občutljive za okužbo s PVY, različna bolezenska znamenja pa povzročajo tudi različni različki virusa. Eden izmed njih je krompirjev virus Y^{NTN} (PVY^{NTN}), ki povzroča obročkasto nekrozo gomoljev krompirja (PTNRD – potato tuber necrotic ringspot disease). PVY^{NTN} zmanjšuje pridelek in kakovost krompirja bolj kot ostali različki virusa PVY^N. Virus prenašajo listne uši, zato je širjenje bolezni zelo hitro, poleg tega so za bolezen dovetne skoraj vse sorte krompirja. Na PVY^{NTN} zelo občutljiva sorta krompirja je sorta ‘Igor’, ki je bila v Sloveniji leta 1988 izrinjena iz pridelave (Kus, 1994).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Za iskanje potencialnih tarč za zaščito rastlin je ključno poznavanje odnosa med rastlino in povzročiteljem bolezni. Na to temo je bilo opravljenih že veliko raziskav, toda odgovor rastlin na napad povzročiteljev bolezni, zlasti virusov, še vedno ni v celoti pojasnjen. Zlasti zanimiv je zgodnji odgovor rastline na okužbo, saj je to dejanski obrambni odgovor in ne zgolj patološka reakcija rastline na prisotnost virusa. O dogodkih, ki se odvijajo v rastlinski celici med interakcijo s povzročiteljem bolezni, dobimo največ informacij s pomočjo analize proteinskih profilov in posttranslacijskih modifikacij proteinov (Thurston in sod., 2005).

1.2 CILJI NALOGE

V diplomskem delu smo skušali vzpostaviti optimalni način priprave vzorca rastlinskih listov za analizo proteinov z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo (2-DE). Primerjali

smo različne načine ekstrakcije proteinov in čiščenja proteinskih ekstraktov ter preiskusili učinkovitost kompleta za odstranjevanje encima rubisko. Z 2-DE smo skušali ugotoviti, kako se spremeni profil izražanja proteinov v listih krompirja (*Solanum tuberosum* L.) sorte 'Igor' 30 min in 48 h po okužbi s PVY^N oziroma PVY^{NTN}. Ugotavliali smo spremembo profila celokupnih proteinov kot tudi spremembo profila fosfoproteinov. Zanimala nas je zlasti razlika med spremembo proteinskega profila po okužbi s PVY^N in PVY^{NTN}, saj slednji na rastlinah povzroča znatno hujšo škodo.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Napad virusa povzroči pri rastlini spremembo izražanja večjega števila genov, od katerih se nekateri aktivirajo, drugi zavrejo. Sinteza in aktivnost proteinov sta nadalje odvisni od posttranskripcijskega procesiranja ter posttranslacijskih modifikacij. Z uporabo 2-DE smo opazovali proteine, pri katerih je v zgodnjem odgovoru rastline na virusno okužbo prišlo do spremembe izražanja oziroma do različnih posttranslacijskih modifikacij. Predpostavili smo, da so ti proteini vključeni v odgovor rastline na okužbo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KROMPIR SORTE ‘IGOR’

Srednje pozna belomesna sorta krompirja ‘Igor’ je bila nekoč priljubljena in najbolj razširjena sorta krompirja v Sloveniji. Leta 1962 je bila ena prvih registriranih slovenskih sort. V Sloveniji je bilo vse do leta 1988 s krompirjem sorte ‘Igor’ posajenih 70 % krompirjevih polj, nato pa je bil zaradi širjenja PVY^{NTN} izrinjen iz pridelave. PVY^{NTN} povzroča bolezen, imenovano obročkasta nekroza gomoljev krompirja (PTNRD – potato tuber necrotic ringspot disease), ki v zadnjih letih predstavlja eno najhujših bolezni krompirja na Slovenskem. Sorta ‘Igor’ je za omenjeno bolezen zelo dovetna, bolezenska znamenja pa se na rastlini pojavijo tako na nadzemnem delu kot tudi na gomolju (Kus, 1994).

2.2 KROMPIRJEV VIRUS Y

Krompirjev virus Y (PVY – potato virus Y) spada v rod *Potyvirus* iz družine *Potyviridae*, ki je največja družina rastlinskih virusov. Za potiviruse je značilno, da okužujejo širok spekter rastlin, tako enokaličnice kot dvokaličnice. Pripadniki družine *Potyviridae* v citoplazmi celic okuženih rastlin tvorijo proteinske celične vključke v obliki vetrnic. PVY se v naravi prenaša z listnimi ušmi, prenaša pa se tudi z vegetativnim razmnoževanjem in z dotikom (Pompe Novak, 2002; de Bokx in Huttinga, 1981).

PVY je paličast, rahlo upognjen virus, meri 730 – 740 nm v dolžino in 11 – 12 nm v premer. Je helične simetrije, v sredini ima kanal s premerom 3.4 nm. Virusna RNA je obdana s približno 2000 kopijami plaščnega proteina CP. Virion sestoji iz približno 6 % nukleinske kisline in 94 % proteinov (de Bokx in Huttinga, 1981; Kerlan, 2006).

Organizacija genoma je načeloma pri vseh potivirusih enaka. Virusni genom predstavlja monopartitna, enovijačna pozitivno orientirana RNA, dolga 9700 nukleotidov. Na 3' koncu genoma je poli(A) rep, na 5' koncu pa je na genom vezan protein VPg. Genom se prevede v en sam poliprotein z velikostjo 340 – 370 kDa in molekulsko maso 24000 g/mol, ki se naknadno razreže v do 10 produktov: VPg, protein P1, Hc-Pro, protein P3, 6K1, CI, NIa-pro, NIb in CP (Urcuqui – Inchima in sod., 2001).

Virusi Y imajo mnogo različic in še vedno se pojavljajo novi. PVY delimo v tri skupine: PVY^O, PVY^C in PVY^N. PVY^O in PVY^C se od PVY^N razlikujeta po tem, da v rastlinah krompirja izzoveta preobčutljivostno reakcijo in s tem razvoj sistemsko pridobljene odpornosti v okuženih in neokuženih listih, medtem ko okužba rastlin krompirja s PVY^N navadno ne vodi v razvoj preobčutljivostne reakcije (Kerlan, 2006).

2.2.1 Krompirjev virus YN

PVY^N je bil v Sloveniji prvič odkrit leta 1964 in se je do leta 1974 pojavil le poredkoma. Od tedaj naprej pa se je začel izredno hitro širiti ter ogrožati pridelovanje krompirja. Primarna in sekundarna znamenja okužbe so blaga, pojavijo se pozno in jih težko opazimo. Na listih okuženih rastlin se največkrat pojavi mozaik, ki ga spremlja blago gubanje listne površine in skoraj neopazna kodravost. Rast rastlin ni prizadeta, pri nekaterih sortah so okužene rastline le nekoliko svetlejše od neokuženih. Sorte krompirja so različno dovzetne za okužbo s PVY^N, različna bolezenska znamenja pa povzročajo tudi različni različki tega virusa. PVY^N se prenaša tudi z dotikom, predvsem pa ga širijo listne uši. Zelo dobra prenašalka je siva breskova uš (*Myzus persicae*) (Kus, 1994).

2.2.2 Krompirjev virus Y^{NTN}

PVY^{NTN} povzroča obročkasto nekrozo gomoljev krompirja (PTNRD – potato tuber necrotic ringspot disease). Sorte krompirja so za okužbo s PVY^{NTN} različno občutljive. Na primarno okuženih listih dovzetnih sort se navadno pojavijo klorofilni liki in manjše,

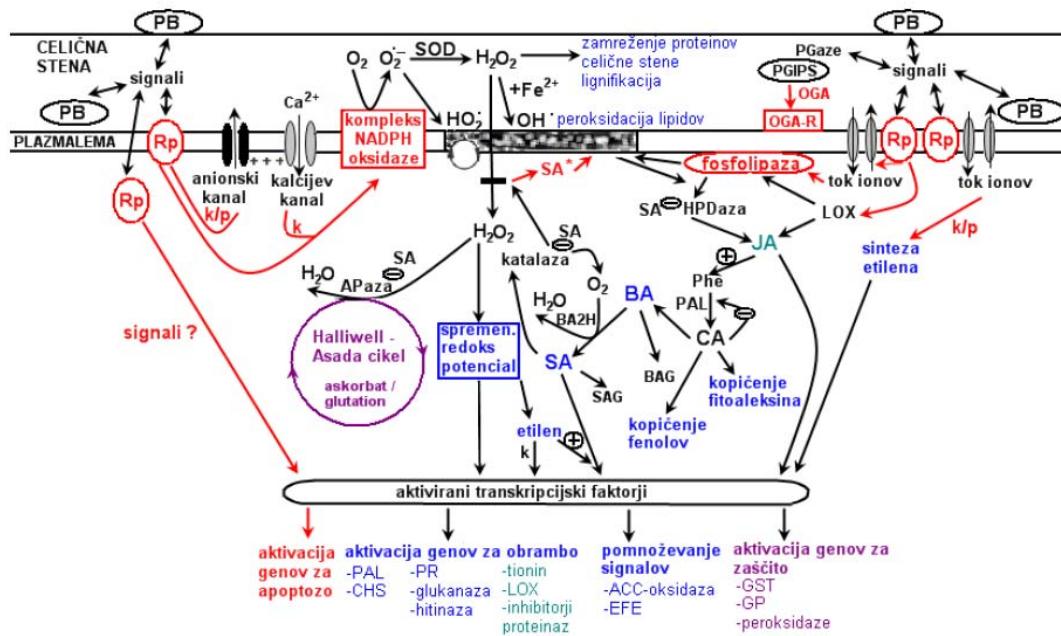
pikam podobne nekroze, na listnih žilah pa črtaste nekroze. Na novih listih, ki se razvijejo nad okuženimi, se pojavi rumen mozaik in gubanje listne površine. Pri občutljivih sortah se črtaste nekroze pojavijo tudi na listnih pecljih in steblu. Listi se posušijo, visijo ob steblu ali odpadejo, steblo pa zaostane v rasti in predčasno odmre. Sekundarno okužene rastline, ki zrastejo iz okuženih gomoljev, kažejo podobna bolezenska znamenja kot primarno okužene rastline, vendar so pri večini sort v nekoliko milejši obliki (Kus, 1994).

Bolezenska znamenja na gomoljih se pojavijo le pri nekaterih sortah, pojavijo se lahko na večini ali pa le na manjšem številu gomoljev. Bolezenska znamenja na gomoljih ne sovpadajo vedno z dozvetnostjo nadzemnega dela rastline za okužbo. Na gomoljih se pojavijo izbočeni obroči ali nabrekline temnejše barve, ki se čez nekaj časa posušijo, vdrejo in postanejo črne. Pod površinskimi nekrozami je plast rjavega odmrlega tkiva, ki se pri bolj občutljivih sortah širi v globlje plasti (Kus, 1994).

2.3 ODGOVOR RASTLIN KROMPIRJA NA OKUŽBO S PVY

Interakcije rastlin s povzročitelji bolezni so zelo raznolike. Imune rastline niso gostitelji za določen virus, v gostiteljskih rastlinah pa se virus lahko razmnožuje. Gostiteljska rastlina v tem primeru lahko omeji virus na lokalna mesta ali pa se virus sistematično širi po rastlini. Pri širjenju virusa po rastlini se lahko izražajo bolezenska znamenja ali pa rastlina ne kaže znamenj okužbe (Matthews, 1992).

Napad povzročitelja bolezni na rastlino lahko sproži obrambni odgovor, ki je zelo kompleksen in vključuje vrsto med seboj prepletenih signalnih poti (slika 1).



Slika 1: Kompleksnost signalnih poti, ki omogočajo aktivacijo obrambnih odgovorov (Hammond-Kosack in Jones, 1996: 1784).

Prikazane so znane komponente in signalne poti (označene z modro) in tiste, za katere se predvideva, da so del obrambnega odgovora (označene z rdečo), komponente in signalne poti, ki jih inducira JA (označene z zeleno) in tiste, ki omogočajo zaščito rastlinske celice (označene z vijolično); (+) – pozitivna interakcija, (-) – negativna interakcija, ACC-oksidaza – 1-aminociklopropan-1-karboksilat-oksidaza, APaza – askorbat peroksidaza, BA – benzojska kislina, BAG – glukozna skupina BA, BA2H – BA-2-hidroksilaza, CA – cimetna kislina, CHS – halkon sintaza, EFE – encim za tvorbo etilena, HO₂[·] - radikal hidroperoksida, HPDaza – hidroksiperoksid-dehidraza, GP – glutation peroksidaza, GST – glutation-S-transferaza, JA – jasmonska kislina, k – kinaza, LOX – lipooksigenaza, O₂[·] - superoksidni anion, OH[·] - hidroksilni radikal, OGA in OGA-R – oligogalakturonidni fragment in receptor, p – fosfataza, PAL – fenilalanin/amonium liaza, PGaze – poligalakturonaze, PGIPS – inhibitorji poligalakturonske kisline, Phe – fenilalanin, PR – s patogenostjo povezani, Rp – receptorji, SA in SAG – salicilna kislina in glukozid-SA, SA* - radikal SA, SOD – superoksid-dismutaza.

Mehanizem odpornosti rastlin proti virusom še ni v celoti pojasnjen. Poznamo dva tipa odpornosti (Soosaar in sod., 2005):

Od R proteinov odvisna odpornost, ki jo sproži neposredna ali posredna interakcija med produktom R gena rastline in produktom Avr gena povzročitelja bolezni. Odgovor je lahko preobčutljivostna reakcija (HR), ki vodi v programirano celično smrt, oksidativni stres,

povišan nivo kalcija, fosforilacija proteinov ali sinteza s patogenostjo povezanih proteinov (Birch in Kamoun, 2000). S patogenostjo povezane proteine so našli v velikem številu rastlinskih vrst. Mednje uvrščamo zelo različne proteine, ki se sintetizirajo po okužbi rastline s povzročiteljem bolezni. Nekateri proteini, ki se v enem delu rastline izražajo izključno v povezavi s patogenezo, so lahko v drugem delu rastline konstitutivno prisotni ali pa se njihovo izražanje spreminja tekom razvoja rastline (Huub in Linthorst, 1991).

Post-transkripcijsko utišanje genov (PTGS). PTGS deluje na osnovi prepoznavanja nukleinskih kislin preko parjenja baz in vodi v specifično razgradnjo homologne RNA. Sprožijo ga lahko virusi, transgeni ali endogeni. Dvovijačna RNA in sparjeni odseki komplementarne RNA, ki nastajajo med podvajanjem virusnega genoma, so glavni sprožilci RNA utišanja genov (Rovere in sod., 2002).

2.3.1 Spremembe izražanja genov rastlin krompirja sorte ‘Igor’ po okužbi s PVY^{NTN}

Pompe-Novak in sod. (2006) so preučevali spremembe izražanja genov v rastlinah krompirja sorte ‘Igor’ po okužbi s PVY^{NTN}. Večino sprememb v izražanju genov so zaznali, ko je rastlina razvila sistemski znake okužbe (14 dni po okužbi). V primarno okuženih rastlinah je večinoma prišlo do negativne regulacije nekaterih genov, medtem ko so bili v sekundarno okuženih rastlinah nekateri geni tudi pozitivno regulirani. V primarno okuženih rastlinah je prišlo tudi do regulacije nekaterih genov, povezanih z obrambnim odgovorom.

V sekundarno okuženih listih krompirja sorte ‘Igor’ so 7 in 14 dni po okužbi zaznali pozitivno regulacijo gena za β -1,3-glukanazo. Povečano izražanje β -1,3-glukanaze v okuženih celicah pospeši razgradnjo kaloze in s tem omogoči hitrejše širjenje virusa. Poleg tega so 7 dni po okužbi zaznali negativno regulacijo dveh genov za stresni protein HSP 70, eden od genov je bil negativno reguliran tudi v listih rastlin, ki so kazale sistemski znake okužbe, in v sekundarno okuženih rastlinah. Stresni protein HSP 70 omogoča hitro dozorevanje in razgradnjo proteinov v kratkem razmnoževalnem ciklu virusa, poleg tega

pa sodeluje pri premikanju virusa iz celice v celico ter na daljše razdalje. Gen za stresni protein HSP 80 je bil v inokuliranih listih 7 dni po okužbi pozitivno reguliran, medtem ko je bil v listih sekundarno okuženih rastlin negativno reguliran. Stresni protein HSP 80 pripada družini stresnih proteinov HSP 90, ki se vežejo na R proteine in imajo pomembno vlogo v obrambnem mehanizmu rastline (Pompe – Novak in sod., 2006).

Izmed genov za encime, ki sodelujejo pri odstranjevanju reaktivnih kisikovih zvrsti, so 14 dni po okužbi zaznali statistično značilno negativno regulacijo gena za citosolno askorbat peroksidazo. Določili so 2 gena za katalazo. V listih s točkastimi nekrozami je bil gen za katalazo 2 pozitivno reguliran, prav tako v listih sekundarno okuženih rastlin. V sistemsko okuženih rastlinah so opazili negativno regulacijo gena za katalazo 1. Negativna regulacija genov za katalazo 1 in citosolno askorbat peroksidazo olajša kopiranje H_2O_2 v peroksisomih in citosolnih kompartimentih. Posledica je lahko nastanek oksidativnega stresa, kar pa je lahko povezano z razvojem bolezenskih znamenj ob virusni okužbi (Pompe – Novak in sod., 2006).

14 dni po okužbi so v listih rastlin krompirja sorte ‘Igor’, ki so kazali sistemski znamenja okužbe, zaznali podoben ekspresijski profil, kot je značilen za proces staranja rastline. Mnogo genov, vpletenih v fotosintezo, je bilo negativno reguliranih, kar je lahko povezano z razvojem sistemskih simptomov na listih. Negativno regulirani so bili tudi geni za ubikvitin in z njim povezane encime, kar je lahko posledica delovanja virusa, ki na ta način prepreči razgradnjo lastnih proteinov (Pompe – Novak in sod., 2006).

Sekundarno okužene rastline krompirja sorte ‘Igor’ na listih niso kazale tako hudih bolezenskih znamenj okužbe kot primarno okužene rastline, kar kaže, da so se do neke mere prilagodile na virusno okužbo. V študiji so zaznali tudi spremembo regulacije številnih genov z doslej še neznano funkcijo. Ti geni so v primarno in sekundarno okuženih rastlinah kazali najbolj raznolik vzorec izražanja (Pompe – Novak in sod., 2006).

2.3.2 Spremembe v sintezi proteinov po okužbi rastlin krompirja s PVY^{NTN}

Gruden in sod. (2000) so primerjali proteinsko sestavo v ekstraktih zdravih rastlin krompirja ter rastlin, okuženih s PVY^{NTN}. Primerjali so naslednje sorte: 'Igor', »Pentland squire«, »Desirée« in »Santé«. Koncentracija proteinov v listih zdravih rastlin je bila približno 60 µg/ml. V okuženih rastlinah sorte 'Igor' je bila celokupna koncentracija proteinov kar trikrat večja (170 µg/ml), medtem ko je bila koncentracija proteinov v okuženih sortah »Pentland squire«, »Desirée« in »Santé« za 30 % večja (90 – 100 µg/ml) kot v zdravih rastlinah. Prve razlike v proteinskem vzorcu so bile vidne četrti dan po okužbi, jasni znaki okužbe pa so bili v proteinskem vzorcu razvidni 14 dni po okužbi.

Reakcija na okužbo je bila najbolj izrazita pri sorti 'Igor', kjer so zaznali povečano ali novo izražanje vsaj devetih proteinov. Izmed novo izraženih proteinov so zaznali dva proteina z molekulsko maso 31 kDa in 31,6 kDa, ki bi lahko ustrezala virusnemu plaščnemu proteinu in proteinu P1, ki imata molekulsko maso približno 30 kDa. Vsi ostali na novo izraženi proteini so bili potemtakem produkti rastlinskih genov. Nekateri proteini so se v okuženi rastlini izrazili v nižjih koncentracijah, kar pomeni, da je ob okužbi prišlo do razgradnje ali do negativne regulacije izražanja teh proteinov (Gruden in sod., 2000).

Nove ali močneje izražene proteine so zaznali tudi pri okuženih rastlinah sort »Desirée« in »Pentland squire«. Pri proti PVY^{NTN} odporni sorti »Santé« med okuženo in neokuženo rastlino ni bilo razlik v izražanju proteinov, zaznali pa so konstitutivno izražanje Na+/K+ ATP-aze v trikrat višjih koncentracijah kot v sorti »Desirée« in v več kot desetkrat višjih koncentracijah kot pri sortah 'Igor' in »Pentland squire«. Podobno koncentracijo omenjenega proteina kot pri sorti »Santé« pa so izmerili tudi pri prav tako proti PVY^{NTN} odporni sorti »Carlingford« (Gruden in sod., 2000).

Milavec in sod. (2001) so preučevali aktivnost topnih, ionsko in kovalentno vezanih peroksidaz v rastlinah krompirja sorte 'Igor' po okužbi s PVY^{NTN}. Peroksidaze so pogosto med prvimi encimi, ki od napadu povzročitelja bolezni kažejo spremembe v aktivnosti. Najbolj so stimulirane v gostiteljih, ki na okužbo odgovorijo s preobčutljivostno reakcijo,

povečano aktivnost pa so zaznali tudi v gostiteljih, ki omogočajo sistemsko okužbo. Peroksidaze igrajo pomembno vlogo pri celjenju ran, virusna okužba stimulira njihovo aktivnost v vseh gostiteljih, pri katerih se razvijejo klorotični ali nekrotični simptomi. 5 dni po inokulaciji rastlin krompirja sorte 'Igor' so v listih s primarnimi bolezenskimi znamenji in v listih brez bolezenskih znamenj zaznali višjo aktivnost ionsko vezanih peroksidaz, medtem ko je bila aktivnost kovalentno vezanih peroksidaz nižja kot v listih zdravih rastlin.

V rastlinah krompirja sorte 'Igor' je okužba s PVY^{NTN} spremenila metabolizem citokininov v koreninah. 4 dni po okužbi je prišlo do sprememb v koncentracijah biološko aktivnih citokininov v prid neaktivnih glikoziliranih citokininov. Spremenba je bila še bolj opazna pri sekundarno okuženih rastlinah, niso pa je opazili pri proti PVY^{NTN} odpornih rastlinah krompirja sorte »Santé« (Dermastia in sod., 1995).

2.3.3 Interakcije med rastlinskimi in virusnimi proteini

Virusni genom kodira majhno število genov, zato so virusi za izpolnitev svojega življenskega cikla popolnoma odvisni od gostitelja. Za vsako stopnjo svojega cikla potrebuje virus določene proteine, ki morajo biti v gostiteljski celici prisotni na pravem mestu ob ustreznem času, v ustrejni koncentraciji in konformaciji (Brizard in sod., 2006).

Brizard in sod. (2006) so preučevali komplekse, ki so nastali med proteini riževega virusa rumene lisavosti (RYMV; rice yellow mottle virus) in proteini rastlin riže (*Oryza sativa*) kot virusnega gostitelja. Uporabili so dve sorte riže: »IR64«, (*O. sativa indica*), ki je dovetna za okužbo z RYMV, ter »Azucena« (*O. sativa japonica*), ki je delno odporna proti okužbi z RYMV. Identificirani gostiteljevi proteini, ki so tvorili komplekse z virusnimi, so pripadali različnim funkcijskim kategorijam. Največ je bilo metabolnih proteinov, vpletenih v glikolizo, fotosintezo ter metabolizem aminokislin, lipidov in celične stene, ki jih virus izkoristi pri pridobivanju energije za replikacijo. Naslednjo kategorijo so predstavljali proteini, vpleteni v translacijo in proteinsko sintezo, vključno s translacijskimi in elongacijskimi faktorji, tRNA sintetazami, protein-disulfid izomerazami,

šaperoni in proteasomi. Te proteine naj bi virus izkoriščal za optimizacijo učinkovitosti translacije takoj ob začetku dekapsidacije. Tretjo skupino so predstavljali obrambni proteini, kot so superoksid dismutaza, fenilalanin-amonijeva liaza, homocistein S-metiltransferaza in lipooksigenaza; proteini, vpleteni v oksidativni stres (tioredoksin, peroksiredoksin in oksidoreduktaza); glutation S-transferaze; ter s patogenezo povezani proteini, kot so peroksidaze in hitinaze. Omenjene proteine lahko virus izkorišča za vzdrževanje oksidoreduktijskega potenciala, ki ustreza virusni replikaciji. Manj zastopani proteini so pripadali transportnim ali transkripcijskim proteinom ali proteinom z neznano funkcijo (Brizard in sod. 2006).

Nekateri proteini so imeli višjo afiniteto za vezavo na RYMV; pri 1 M koncentraciji NaCl so bili še vedno vezani na virusne delce. Predvidevajo, da so ti proteini vezani direktno na površino virusnih delcev. Proteini, ki so jih identificirali pri nižjih koncentracijah soli, imajo lahko nižjo afiniteto do virusne površine ali pa se vežejo na že vezane gostiteljeve proteine (Brizard in sod. 2006).

Nastali proteinski kompleksi so bili v primeru obeh sort riža, »IR64« in »Azucena«, večinoma identični. Proteini, ki so se razlikovali, so lahko odgovorni za pojav tolerance oziroma občutljivosti. Nekateri proteini so bili prisotni pod različnimi eksperimentalnimi pogoji (npr. mitohondrijski šaperonin-60), kar pomeni, da imajo zelo močno afiniteto do virusov ter da igrajo pomembno vlogo v njihovih biološlih procesih (Brizard in sod. 2006).

2.3.4 Spremembe proteoma celičnih suspenzij rastlin riža (*O. sativa indica* in *O. sativa japonica*) po okužbi z RYMV

Ventelon-Debout in sod. (2004) so z 2-DE preučevali odgovor rastlin riža (*O. sativa*) na okužbo z RYMV. V raziskavo so vključili celice na okužbo z RYMV občutljive sorte »IR64« (*O. sativa indica*) ter celice proti RYMV delno odporne sorte »Azucena« (*O. sativa japonica*). Proteinski profil okuženih rastlinskih celic so primerjali s profilom zdravih celic. Izmed vseh proteinov, ki so jih zaznali z 2-DE, je po virusni okužbi kazalo kvantitativne spremembe 40 proteinov pri sorti »IR64« in 24 proteinov pri sorti

»Azucena«. Proteine s spremenjenim izražanjem so identificirali z masno spektrometrijo (MS). V primeru sorte »IR64« so identificirali 19 proteinov, pri sorti »Azucena« pa 13 proteinov. Vsi ostali proteini so bili novi proteini brez ujemanj v bazi podatkov. Identificirane proteine so lahko razvrstili v tri funkcionalne skupine: metabolni encimi, z obrambo povezani proteini in proteini, vpleteni v translacijo in razgradnjo proteinov.

Pri sorti »IR64« so med metabolnimi proteini po okužbi trije spremenili nivo izražanja. Relativna zastopanost proteinov aldolaza C1 in fosfoglicerat dehidrogenaza se je povečala pozno, 5. oziroma 7. dan po okužbi z RYMV. Relativna zastopanost proteina 2,3-bifosfoglicerat-neodvisna fosfoglicerat mutaza se je zmanjšala že 1 h po okužbi z RYMV. Pri sorti »Azucena« se je 7 dni po okužbi povečala relativna zastopanost metabolnega encima gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (Ventelon-Debout in sod., 2004).

Pri sorti »IR64« se je po okužbi z RYMV spremenil nivo izražanja enajstih proteinov, povezanih z obrambo in odgovorom na stres. Med njimi je bil stresni protein HSP70, katerega zastopanost se je 5 dni po okužbi zmanjšala ter 7 dni po okužbi zopet povečala. Spremenil se je tudi nivo izražanja naslednjih proteinov: dehidrin, z ozmolarnim stresom inducirani protein, s patogenezo povezan protein, 10 kDa velik šaperonin, superoksid dismutaza in z etilenom inducirani protein. Pri sorti »Azucena« so 7 dni po okužbi izmed s stresom povezanih proteinov kazali povečan nivo izražanja protein CNP60 ter dva stresna proteina HSP17.9. Izražanje superoksid dismutaze se je povečalo 2 dni po okužbi (Ventelon-Debout in sod., 2004).

Pri sorti »IR64« se je po okužbi z RYMV spremenilo izražanje štirih proteinov, vpletenih v translacijo in proteinsko razgradnjo: relativna zastopanost ribosomske 40S podenote, α -amilaze in ubikvitina se je povečala 2, 5 oziroma 7 dni po okužbi, relativna zastopanost RNA vezavnega proteina se je povečala 1 h po okužbi ter zmanjšala 5 dni po okužbi. Pri sorti »Azucena« se je spremenilo izražanje osmih proteinov, vpletenih v translacijo in proteinsko razgradnjo: izražanje štirih prekurzorjev izocima α -amilaze in RNA vezavnega proteina se je povečalo 7 oziroma 2 dni po okužbi, izražanje elongacijskega faktorja 1- β in ubikvitina se je zmanjšalo 7 dni po okužbi, izražanje iniciacijskega faktorja translacije 5A pa se je povečalo 2 in 7 dni po okužbi (Ventelon-Debout in sod., 2004).

2.4 METODOLOGIJA SPREMLJANJA INTERAKCIJ MED VIRUSI IN RASTLINAMI NA NIVOJU PROTEOMA

Na področju preiskav interakcij med rastlino in povzročiteljem bolezni sta uporaba mikromrež in proteomika trenutno dva najbolj obetavna pristopa. Oba omogočata globalno analizo celične regulacije; mikromreže omogočajo analizo genske ekspresije, proteomika pa spremi akumulacijo proteinov in njihove modifikacije. Čeprav bi na prvi pogled pričakovali od obeh pristopov enake rezultate, pa so številne študije pokazale, da nivo genske ekspresije ne Sovpada vedno z nivojem proteinov v celici (Gygi in sod., 1999). Pri preučevanju fosfoproteinov v *Arabidopsis* po tretiranju s flagelinom, se je izkazalo, da je bilo le nekaj fosfoproteinov reguliranih na nivoju transkripcije (Peck Sc in sod., 2003). Iz tega lahko sklepamo, da analize proteinskih profilov in modifikacij proteinov podajo najboljše indikacije o dogodkih, ki se odvijajo v rastlinski celici med interakcijo s povzročiteljem bolezni (Thurston in sod., 2005).

2.4.1 Dvodimenzionalna gelska elektroforeza

Proteomika je študija celotnega kompleta izraženih proteinov in/ali posttranslacijskih modifikacij v nekem tkivu v določenem času. Ugotavljanje sprememb izražanja proteinov ter identifikacija novih proteinov še vedno v veliki meri temelji na uporabi dvodimenzionalne gelske elektroforeze (2-DE). Ločevanje proteinov z 2-DE vključuje izoelektrično fokusiranje (IEF), ki ločuje proteine glede na njihovo izoelektrično točko, ter poliakrilamidno gelsko elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE), ki ločuje proteine glede na njihovo molekulsko maso v območju od 10 do 300 kDa (Kuiper in sod., 2003). Raziskovalcem je ne enem gelu uspelo ločiti do 10000 različnih proteinov, kar sovpada z oceno števila izraženih proteinov v evkariotski celici (Cellini in sod., 2004). Z modernimi tehnikami 2-DE je mogoče ločiti med sabo proteina, ki se po izoelektrični točki razlikujeta le za 0,001 pH enote, z uporabo fluorescentnih barvil (Sypro) pa se je povečala tudi detekcija proteinov v gelu na 1 – 10 ng proteina (Issaq in Veenstra, 2008).

Z izbiro različnih obsegov pH gradientov določimo obseg ločenih proteinov. Z uporabo pH gradienta s širokim razponom (pH 3 – 12) dobimo vpogled v najbolj zastopane proteine celotnega celičnega ekstrakta. Z uporabo ozkega pH gradienta z razponom 1 – 1,5 pH enot dobimo podrobnejši vpogled v celični ekstrakt in ločimo tudi manj zastopane proteine. Kljub visoki zmogljivosti ločevanja proteinov z 2-DE, je včasih za optimalno identifikacijo proteinov potrebno razdeliti proteom nekega vzorca na subproteome. Proteine lahko izoliramo iz specifičnih celičnih kompartimentov ali pa glede na razliko v njihovi relativni topnosti. Takšni subproteomi kažejo kvalitativne in kvantitativne razlike v proteinski sestavi, poleg tega pa tudi olajšajo izolacijo (Cellini in sod., 2004).

Zaradi variacij v postopku ekstrakcije proteinov in samem poteku 2-DE dva replikata 2-DE gelov nista nikoli identična. Posledično nastajajo težave pri točnem programskem prekrivanju proteinskih lis. Z uporabo diferencilane gelske elekroforeze (DIGE) se omenjenim težavam lahko delno izognemo, saj nam DIGE omogoča ločevanje z 2-DE do treh različnih proteinskih vzorcev hkrati. Pri tipičnem DIGE eksperimentu na gel nanesemo zdrav vzorec, bolezenski vzorec ter interno kontrolo, ki vključuje združeni enaki količini zdravega in bolezenskega vzorca, pri tem pa je vsak izmed vzorcev kovalentno označen z različnim fluorescentnim barvilom (Cellini in sod., 2004; Issaq in Veenstra, 2008).

2.4.2 Identifikacija proteinov

Identifikacija proteinov je možna s prekrivanjem slik 2-DE gelov z obstoječo 2-DE bazo podatkov. V tem primeru moramo uporabljati izključno standardizirane metode in protokole, trenutno pa je na voljo le nizko število 2-DE baz podatkov o rastlinskih proteinih (Corpillo in sod., 2004). Glavna metoda za identifikacijo proteinov je MS. Pri tej metodi se meritve izvajajo z ioniziranimi molekulami v plinski fazi. Glavni sestavnici deli masnega spektrometra so ionizator, masni analizator in detektor. Obstaja več metod za ionizacijo bioloških molekul, najpogosteje pa se uporablja elektrosprej ionizacija (ESI) ter ionizacija tripsinskih fragmentov v nosilcu (matriksu) z lasersko desorpcijo (MALDI). Pri tehniki MALDI peptide fragmente vmešamo v nosilec, ki ga običajno predstavlja

aromatska kislina nizke molekulske mase, ter jih nato ioniziramo z laserskim žarkom. Pri tem se tvorijo v glavnem enkrat protonirani ioni peptidov, ki se v visokem električnem polju pospešijo v smeri masnega analizatorja. Zelo pogosto se ionizacija MALDI uporablja v kombinaciji z analizatorjem na čas preleta ionov (TOF), ki ločuje ione na osnovi razlike v hitrosti njihovega potovanja. Pri tehniki ESI peptidno mešanico v raztopini injiciramo in razpršimo v ionski vir inštrumenta; ta način ionizacije omogoča nastanek ionov tudi z deset in več naboji (protoni), način dovajanja vzorca v ionizator pa omogoča enostavno sklopitev različnih vrst tekočinske kromatografije z MS analizo (LC-MS in LC-MS/MS) (Križaj, 2008).

Tekočinska kromatografija (LC) zaradi možnosti neposredne sklopitev s kapilaro ionizatorja ESI omogoča visoko-pretočno identifikacijo vzorcev ter tako predstavlja idealen način priprave vzorca za MS. Pri LC pogosto predstavlja problem nezadostna resolucija zelo kompleksnih peptidnih zmesi, poleg tega pri takih analizah dobimo ogromno količino podatkov, katerih interpretacija je zamudna in zelo zahtevna. Za poenostavitev priprave vzorcev za analizo z MS se zato razvijajo več dimenzionalne ločevalne tehnike, kot so kombinacija ionske kromatografije na močnem kationskem izmenjevalcu in kromatografije na reverzni fazi (dvodimenzionalni ločevalni postopek) ter kombinacija ionske kromatografije na močnem kationskem izmenjevalcu, afinitetne kromatografije na avidinskem nosilcu in kromatografije na reverzni fazi (tridimenzionalni ločevalni postopek). Pri zelo kompleksnih polipeptidnih vzorcih pa se pogosto pred večdimenzionalno LC izvede tudi predhodna osnovna ločitev proteinov z enodimenzionalno PAGE (Križaj, 2008).

Obstaja več načinov identifikacije proteinov z MS. Peptidno mapiranje se navadno uporablja v povezavi z 2-DE, saj v izhodišču zahteva homogen neznani protein, ki ga lahko izoliramo iz 2-DE gela. Metoda temelji na razgradnji proteina s specifično proteazo, najpogosteje s tripsinsko proteazo ali endoproteinazo Lys-C, ter na masni analizi dobljene peptidne zmesi. Na ta način proteinu priredimo značilni masni spekter ali »prstni odtis« (Križaj, 2008). Protein nato z orodji bioinformatike identificiramo na podlagi mas peptidov in sicer s pomočjo eksperimentalno pridobljenih proteinskih podatkovnih baz ali pa teoretično iz zaporedja genoma (Cellini in sod., 2004). Druge tehnike identificiranja so še

»de novo« sekvenciranje ali tandemska MS (MS/MS) ter metoda »peptidne značke« (Križaj, 2008).

2.4.3 Fosfoproteomika

Z eno ali več kovalentnih modifikacij polipeptidne verige, kot so fosforilacija, glikozilacija, izoprenilacija, acetilacija in druge, lahko nastane mnogo različnih variacij proteina. Izmed različnih možnih modifikacij predstavlja fosforilacija v mnogih organizmih glavni kontrolni mehanizem proteinske aktivnosti, v rastlinah pa je fosforilacija prevladujoča posttranslacijska modifikacija v odgovoru na okužbo s povzročiteljem bolezni. Zlasti pomembno vlogo ima v zgodnjem odgovoru rastline na okužbo, saj v nasprotju z gensko ekspresijo in sintezo novih proteinov poteka zelo hitro (Thurston in sod., 2005).

V mnogih fosfoproteomskeih raziskavah je za boljšo zaznavo potrebna obogatitev fosforiliranih proteinov ali peptidov. V ta namen se uporablja afinitetna kromatografija z imobiliziranimi kovinami (IMAC) kot sta Ga(III) in Fe(III), ki ujameta in na ta način obogatita fosfopeptide. Fosforilirane proteine lahko po prenosu Western iz 2-DE gela zaznamo s pomočjo imunodetekcije. Pri tem pristopu se največkrat uporablja protitelesa proti P-Ser, P-Thr in P-Tyr, ki pa ne prepozna vseh fosforiliranih proteinov. Posledično se analize s prenosom Western pogosto kombinirajo s tehnikami radioaktivnega označevanja, ki podajo točno in popolno sliko fosfoproteoma (Thurston in sod., 2005). Mnogo lažjo detekcijo fosfoproteinov omogoča uporaba fluorescentnega barvila Pro-Q Diamond, ki selektivno zazna fosfoproteine direktno na poliakrilamidnem gelu (Agrwal in sod., 2005). Barvilo Pro-Q Diamond omogoča detekcijo 1 – 16 ng fosfoproteinov/liso, odvisno od fosforilacijskega stanja proteina. V kombinaciji z barvilm za detekcijo celokupnih proteinov Sypro Ruby lahko iz razmerja signala barvila Pro-Q Diamond in signala barvila Sypro Ruby dobimo informacijo o nivoju relativne fosforilacije proteina v vsaki posamezni lisi; obe barvili namreč delujeta kvantitativno (Invitrogen, 2005).

2.4.4 Priprava vzorca za 2-DE

Ključni korak v vseh proteomskeih raziskavah je priprava vzorca. V primerjavi z bakterijami in živalskim tkivom imajo rastline relativno nizko vsebnost proteinov glede na volumen. Večino celične mase namreč zavzemata celična stena in vakuola, citosol predstavlja le 1 - 2 % celotnega volumna celice. Poleg tega rastline vsebujejo tudi veliko snovi, ki ovirajo ponovljivost proteomskeih metod. Najpogosteje so fenolne komponente, proteolitski in oksidacijski encimi, terpeni, pigmenti, organske kisline, inhibitorni ioni in ogljikovi hidrati. Večina protokolov za izolacijo proteinov iz rastlinskega tkiva vključuje precipitacijo proteinov; na ta način se proteini skoncentrirajo in ločijo od motečih komponent. Najpogosteje uporabljeni metoda ekstrakcije rastlinskih proteinov je precipitacija s triklorocetno kislino (TCA) ali acetonom (TCA/aceton). Kljub temu pa pri precepitaciji navadno prihaja do izgub proteinov in težav pri raztapljanju peleta (Carpentier in sod., 2005).

Znano je, da je večina proteinov, ki jih zaznamo z 2-DE, v celicah zastopanih v veliki količini in sicer od 10^5 do 10^6 kopij na celico. Nizko zastopani proteini, zlasti regulacijski faktorji in receptorske molekule, pa so v celicah prisotni v relativno nizkih koncentracijah (navadno cca. 100 molekul na celico) in jih je posledično težko zaznati (Xi in sod., 2006).

Ribuloza -1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza (rubisko) je v rastlinah najbolj zastopan protein in je vpleten v fiksacijo CO₂ v procesu fotosinteze. Pravzaprav predstavlja kar 50 % vseh topnih proteinov v rastlinskih listih. Ima kompleksno strukturo z osmimi identičnimi velikimi podenotami (53 kDa) ter osmimi identičnimi malimi podenotami (14 kDa) (Nelson in Cox, 2004). Zaradi velike zastopanosti rubisko ovira 2-DE na dva načina: 1) ko-migrira skupaj z manj zastopanimi proteini in tako onemogoči njihovo detekcijo ter 2) ker je nanos proteinov na IPG-trakove količinsko omejen, manj zastopani proteini vstopijo v IPG-trak le v majhnih količinah in posledično jih na gelu težko zaznamo (Xi in sod., 2006).

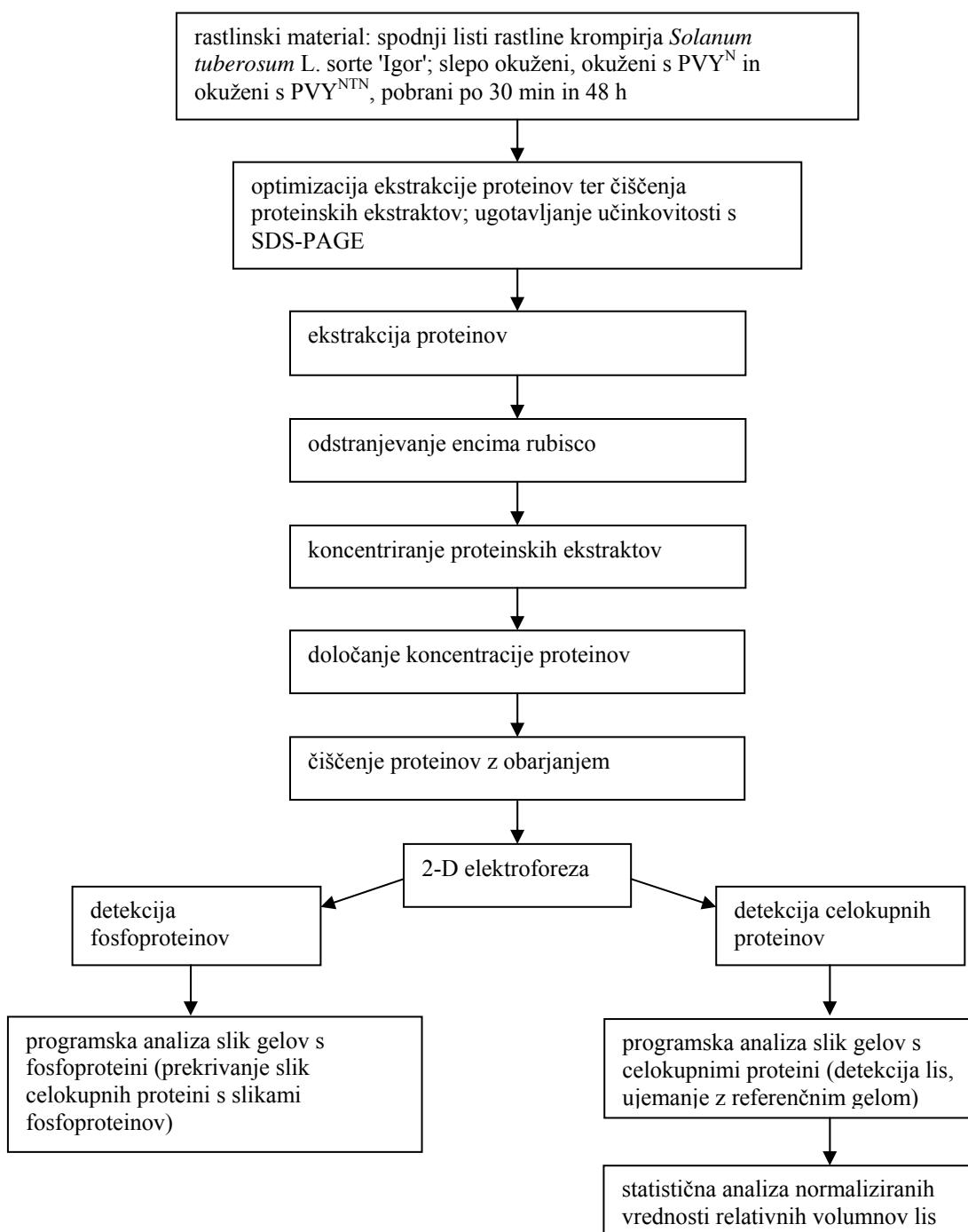
2.4.4.1 Odstranjevanje visoko zastopanih proteinov iz proteinskih ekstraktov z uporabo imunoafinitetne kromatografije

Možna rešitev za izboljšanje detekcije manj zastopanih proteinov je zmanjšanje vsebnosti visoko zastopanih proteinov v proteinskem ekstraktu (Xi in sod., 2006). V ta namen je podjetje GenWay razvilo sistem imunoafinitetne kromatografije, ki temelji na specifičnih ptičjih protitelesih IgY, vezanih na kroglične nosilce v koloni (Seppro). Sistem je zasnovan za odstranjevanje različnih visoko zastopanih proteinov v različnih vzorcih, med drugimi za odstranjevanje encima rubisko iz rastlinskih celičnih ekstraktov.

Študija uporabe imunoafinitetne kromatografije Seppro je bila narejena na primeru ločevanja proteinov v plazmi. Pokazali so, da je ločevanje proteinov s Seppro kolono, ki je pripravljena za odstranjevanje enega tarčnega proteina, visoko selektiven proces, saj lahko specifično odstranimo želen protein, ne da bi zraven vplivali na ostale. V vezanih frakcijah so le v nekaterih izjemah zaznali netarčne proteine, ki so se verjetno ujeli na kolono zaradi njihove tesne povezave s tarčnimi proteini. V prečiščenih frakcijah tarčnih proteinov niso zaznali, izjemoma v nizkih koncentracijah ali v sledeh. Za dva nizko zastopana klinično pomembna proteina so pokazali 100 in 82 % ohranitev po uporabi kolone. Ohranjanje kapacitete in specifičnosti kolon so preverili z dvajsetimi zaporednimi cikli čiščenj enakega vzorca plazme na isti koloni ter ugotovili, da se proteinska sestava prečiščenih ekstraktov v nobenem primeru ni razlikovala (Huang in sod., 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 2: Shematski prikaz poteka dela

3.2 MATERIALI

3.2.1 Virusi

Rastline krompirja so bile okužene z PVY^{NTN} in PVY^N. Izolat PVY^{NTN} je bil izoliran iz krompirja sorte ‘Igor’ gojene v Sloveniji (Kus, 1994). Izolat PVY^N je bil iz zbirke v CSL, York, Velika Britanija.

3.2.2 Rastlinski material

Uporabili smo pripravljen rastlinski material, ki so ga predstavljali v tekočem dušiku homogenizirani spodnji listi rastlin krompirja *Solanum tuberosum* L. sorte ‘Igor’, shranjeni na -80 °C. Rastline so bile vzgojene v petih različnih serijah (bioloških ponovitvah), za analize pa smo uporabili rastlinski material zadnjih treh serij (3., 4. in 5. serije), ki je bil pobran v naslednjih dneh:

3. serija: 1.6.05 ob 12 h (30 min po okužbi) in 3.6.05 ob 9 h (48 h po okužbi)
4. serija: 24.10.05 ob 12 h (30 min po okužbi) in 26.10.05 ob 9 h (48 h po okužbi)
5. serija: 21.11.05 ob 12 h (30 min po okužbi) in 23.11.05 ob 9 h (48 h po okužbi)

Listi vsake serije so bili pobrani s slepo inokuliranih rastlin, rastlin, okuženih s PVY^N in rastlin, okuženih s PVY^{NTN}, in sicer v času 30 min ter 48 h po okužbi.

Rastlinski material smo označili s kraticami, ki so prikazane v preglednici 1.

Preglednica 1: Vzorci rastlinskega materiala, ki smo ga uporabili v analizah

vzorci 3. serije	vzorci 4. serije	vzorci 5. serije
S 3. s 30 min	S 4. s 30 min	S 5. s 30 min
N 3. s 30 min	N 4. s 30 min	N 5. s 30 min
NTN 3. s 30 min	NTN 4. s 30 min	NTN 5. s 30 min
S 3. s 48 h	S 4. s 48 h	S 5. s 48 h
N 3. s 48 h	N 4. s 48 h	N 5. s 48 h
NTN 3. s 48 h	NTN 4. s 48 h	NTN 5. s 48 h

Kratice označujejo: S – slepa inokulacija; N – okužba s PVY^N; NTN – okužba s PVY^{NTN};
3. s – 3. serija, 4. s – 4. serija, 5. s – 5. serija; 30 min – 30 minut po okužbi, 48 h – 48 ur po
okužbi.

3.2.3 Reagenti, raztopine

3.2.3.1 Ekstrakcija proteinov s TBS/tween 20 in urea/SDS

Ekstrakcijski pufer TBS/Tween 20

Preglednica 2: Sestava ekstrakcijskega pufra TBS/tween 20

sestavine	količina	končna koncentracija
10 x TBS (10 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 0,02 % Na- azid) (GenWay Biotech, Inc.)	200 µl	1 x
Tween 20 (Sigma)	1 µl	0,05 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 2 ml		

Ekstracijski pufer smo razdelili v 2 mikrocentrifugirki po 1 ml ter v eno mikrocentrifugirko dodali še 0,01 g PVPP (Sigma) (končna koncentracija 1 % (m/v) PVPP).

Ekstracijski pufer urea/SDS

Preglednica 3: Sestava ekstracijskega pufra urea/SDS

sestavine	količina	končna koncentracija
urea (Sigma)	4,805 g	8 M
SDS (Sigma)	0,1 g	1 % (m/v)
dodamo ddH ₂ O do 10 ml		

3.2.3.2 Ekstrakcija proteinov s puferom Tris (Vilhar, 1996)

Ekstracijski pufer Tris, pH 8 (Vilhar, 1996)

- raztopine za pripravo ekstracijskega pufra

1 M Tris HCl, pH 8,0

Tris-baza (Sigma) 12,1 g

dodamo 70 ml ddH₂O

uravnamo pH na 8,0 s koncentrirano HCl

dodamo ddH₂O do 100 ml

3 M Na-acetat

Na-acetat (Sigma) 24,6 g

dodamo ddH₂O do 100 ml

1 M KCl

KCl (Sigma) 22,4 g

dodamo ddH₂O do 100 ml

Preglednica 4: Sestava ekstrakcijskega pufra Tris, pH 8,0 (Vilhar, 1996)

sestavine	količina	končna koncentracija
1 M Tris HCl, pH 8	5 ml	50 mM
3 M Na-acetat	0,3 ml	10 mM
1M KCl	6 ml	60 mM
dodamo ddH ₂ O do 100 ml		

Ekstrakcijski pufer smo razdelili v 2 epruveti po 50 ml ter v eno epruveto dodali 0,5 g PVPP (Sigma) (končna koncentracija 1 % (m/v)).

3.2.3.3 Čiščenje proteinskih ekstraktov z uporabo kompleta za odstranjevanje encima rubisko

- SepproTM Rubisko IgY Spin Column Kit (GenWay Biotech, Inc.)

Pufri

- Redčitveni pufer: 10x TBS (10 mM Tris HCl, 150 mM NaCl) pH 7,4; z 0,02% Na-azidom
- Odstranevalni pufer: 1 M glicin HCl, pH 2,5
- Nevtralizacijski pufer: 1 M Tris HCl, pH 8,0

3.2.3.4 Koncentriranje proteinskih ekstraktov z uporabo kompleta za koncentriranje

- Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices 3K (Millipore)

3.2.3.5 Določanje koncentracije proteinov v proteinskem ekstraktu

- NaCl (Merck) za pripravo 0,15 M vodne raztopine
- Bradfordov reagent (BioRad)
- Goveji serumski albumin (BSA) (100 %, Sigma)

3.2.3.6 Čiščenje proteinov v ekstraktu z uporabo kompleta za čiščenje proteinskih ekstraktov

- 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare)

3.2.3.7 Obarjanje proteinov v ekstraktu z acetonom

- Aceton (Merck)

3.2.3.8 Obarjanje proteinov v ekstraktu s TCA

- TCA (Sigma) za pripravo 10 % (m/v) vodne raztopine

3.2.3.9 Ugotavljanje učinkovitosti ekstrakcije in postopkov čiščenja s SDS-PAGE (mini Protean II elektroforetski sistem)

- raztopine za pripravo ločilnega in koncentracijskega gela

1,5 M Tris HCl/SDS, pH 8.8

Tris-baza (Sigma)	91,0 g
dodamo 300 ml ddH ₂ O	
uravnamo pH na 8,8 s koncentrirano HCl	
dodamo ddH ₂ O do 500 ml	

SDS (Sigma) 2,0 g

0,5 M Tris HCl/SDS, pH 6.8

Tris-baza (Sigma)	6,05 g
dodamo 40 ml ddH ₂ O	
uravnamo pH na 6,8 s koncentrirano HCl	
dodamo ddH ₂ O do 100 ml	

SDS (Sigma) 0,4 g

10 % (m/v) raztopina SDS

SDS (Sigma) 10,0 g
dodamo ddH₂O do 1000 ml

10 % (m/v) raztopina APS

APS (Sigma) 0,1064 g
dodamo 1,064 ml ddH₂O
alikvotiramo po 205 µl

- ločilni gel

Preglednica 5: Priprava ločilnega gela z debelino 0,75 mm z 12 % (m/v) koncentracijo akrilamida (Gallagher, 2006)

sestavina	količina ^a
raztopina 30 % akrilamid/ 0,8 % bisakrilamid	6 ml
1,5 M Tris HCl/SDS, pH 8,8	3,75 ml
ddH ₂ O	5,25 ml
10 % (m/v) raztopina APS	50 µl
TEMED (Sigma)	10 µl

- koncentracijski gel

Preglednica 6: Priprava koncentracijskega gela z debelino 0,75 mm s 3,9 % (m/v) koncentracijo akrilamida (Gallagher, 2006)

sestavina	količina^a
raztopina 30 % akrilamid/ 0,8 % bisakrilamid	1,3 ml
0,5 M Tris HCl/SDS, pH 6,8	2,5 ml
ddH ₂ O	6,1 ml
10 % (m/v) raztopina APS	50 µl
TEMED (Sigma)	10µl

^aKoličine ustrezajo za pripravo dveh gelov.

- SDS elektroforetski pufer

Preglednica 7: Sestava 10 x SDS elektroforetskega pufra (Gallagher, 2006)

sestavina	količina	končna koncentracija
Tris-baza (Sigma)	30,2 g	0,25 M
glicin (Merck)	144,0 g	1,92 M
SDS (Sigma)	10,0 g	1 % (m/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 ml		

- raztopina za pripravo vzorčnega pufra

0,5 M Tris HCl/SDS, pH6,8

Tris-baza (Sigma) 6,05 g

dodamo 40 ml ddH₂O

uravnamo pH na 6,8 s koncentrirano HCl

dodamo ddH₂O do 100 ml

SDS (Sigma) 0,4 g

- vzorčni pufer

Preglednica 8: Sestava 4 x SDS vzorčnega pufra (Gallagher, 2006)

sestavina	količina	končna koncentracija
0,5 M Tris HCl/SDS, pH 6,8	25 ml	0,25 M
glicerol (Sigma)	20 ml	40 % (v/v)
SDS (Sigma)	4 g	8 % (m/v)
2 – ME (Sigma)	2 ml	4 % (v/v)
bromfenol modro (Sigma)	1 mg	0,002 % (m/v)
dodamo ddH ₂ O do 50 ml		

Pufer smo alikvotirali po 1 ml in shranili na -20 °C.

- raztopina proteinov znanih molekulskih mas za SDS-PAGE velikosti od 6,5 kDa do 200 kDa (BioRad)

3.2.3.10 Detekcija proteinov na poliakrilamidnem gelu

- fiksacijska raztopina

Preglednica 9: Sestava fiksacijske raztopine (Sasse in Gallagher, 2003)

sestavina	količina	končna koncentracija
metanol (Merck)	500 ml	50 % (v/v)
ocetna kislina (Merck)	100 ml	10 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 ml		

- barvilo Coomassie briljantno modro

Preglednica 10: Sestava barvila Coomassie briljantno modro (Sasse in Gallagher, 2003)

sestavina	količina	končna koncentracija
metanol (Merck)	250 ml	50 % (v/v)
Coomassie brilliant blue R-250 (BioRad)	0,25 g	0,05 % (m/v)
ocetna kislina	50 ml	10 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 500 ml		

- raztopina za razbarvanje

Preglednica 11: Sestava raztopine za razbarvanje (Sasse in Gallagher, 2003)

sestavina	količina	končna koncentracija
metanol (Merck)	50 ml	5 % (v/v)
ocetna kislina (Merck)	70 ml	7 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 ml		

3.2.3.11 Dvodimenzionalna elektroforeza

1. dimenzija

- raztopina za rehidracijo trakov

Preglednica 12: Priprava raztopine za rehidracijo trakov

sestavina	količina	končna koncentracija
urea (Sigma)	10,5 g	7 M
tiourea (Sigma)	3,8 g	2 M
CHAPS (GE Healthcare)	0,5 g	2 % (m/v)
IPG – pufer pH 3 – 10 (GE Healthcare)	500 µl	2 % (v/v)
bromfenol modro (Sigma)	0,0005 g	0,002 % (m/v)
dodamo ddH ₂ O do 25 ml		

Rehidracijski pufer alikvotiramo po 2 ml in shranimo na -20 °C. Pred uporabo rehidracijski pufer odtajamo na sobni temperaturi in dodamo 0,02 g DTT/2 ml pufra.

- komercialni trakovi z imobiliziranim pH gradientom dolžine 17 cm, pH 3 – 10 (GE Healthcare)
- mineralno olje (Sigma)

2. dimenzija

- pufer za uravnoteženje – osnovni

Preglednica 13: Sestava pufra za uravnoteženje – osnovni

sestavina	količina	končna koncentracija
urea (Sigma)	36 g	6 M
SDS (Sigma)	2 g	2 % (m/v)
glicerol (Sigma)	5 ml	30 % (v/v)
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH 8,8	30 ml	75 mM
bromfenol modro (Sigma)	0,002 g	0,002 % (m/v)
dodamo ddH ₂ O do 100 ml		

Pufer za uravnoteženje I

DTT (Sigma) 0,4 g

dodamo pufer za uravnoteženje – osnovni do 40 ml

Pufer za uravnoteženje II

jodacetamid (Sigma) 1,92 g

dodamo pufer za uravnoteženje – osnovni do 40 ml

Pufer za uravnoteženje I in II pripravimo tik pred uporabo.

- raztopine za pripravo ločilnega gela

1,5 M raztopina Tris-HCl, pH 8,8 (točka 3.2.3.9)

10 % (m/v) SDS (točka 3.2.3.9)

10 % (m/v) APS (točka 3.2.3.9)

- ločilni gel

Preglednica 14: Priprava ločilnega gela z debelino 1 mm z 12 % (m/v) koncentracijo akrilamida

sestavina	količina ^a
raztopina 30 % akrilamid/0,8 % bisakrilamid (Sigma)	31,4 ml
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH 8,8	19,6 ml
10 % (m/v) raztopina SDS	800 µl
ddH ₂ O	26 ml
10 % (m/v) raztopina APS	390 µl
TEMED (Sigma)	26 µl

Pred dodatkom APS in TEMED smo raztopino (akrilamid/bisakrilamid + raztopina Tris-HCl + raztopina SDS + ddH₂O) razplinili v ultrazvočni kopeli 10 min.

^aKoličine ustrezajo za pripravo štirih gelov.

- 5x SDS elektroforetski pufer

Preglednica 15: Sestava 5x SDS elektroforetskega pufra

sestavina	količina	končna koncentracija
Tris-baza (Sigma)	15,0 g	260 mM
glicin (Merck)	72,0 g	960 mM
SDS (Sigma)	5,0 g	0,5 % (m/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 ml		

- 1x SDS elektroforetski pufer

Preglednica 16: Sestava 1x SDS elektrofoterskega pufra

sestavina	količina	končna koncentracija
Tris-baza (Sigma)	3,0 g	25 mM
glicin (Merck)	14,4 g	192 mM
SDS (Sigma)	1,0 g	0,1 % (m/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 ml		

- agarozna raztopina
 agarosa (Sigma) 0,5 g
 dodamo 1x SDS elektroforetski pufer do 100 ml

Raztopino segrejemo v mikrovalovni pečici, da se agarosa raztopi, nato dodamo kristalček barvila bromfenol modro. Raztopino alikvotiramo v epruvete po cca. 11 ml.

- raztopina proteinov znanih molekulskih mas za SDS-PAGE (10 kDa – 220 kDa)
 (Invitrogen)

3.2.3.12 Detekcija fosfoproteinov na poliakrilamidnem gelu

- fiksacijska raztopina

Preglednica 17: Sestava fiksacijske raztopine

sestavina	količina	končna koncentracija
metanol (merck)	500 ml	50 % (v/v)
ocetna kislina (Merck)	100 ml	10 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 ml		

- barvilo Pro-Q Diamond (Invitrogen)
- 1 M Na-acetat, pH 4,0
 Na-acetat (Sigma) 82,03 g
 dodamo ddH₂O do 500 ml
 uravnamo pH na 4,0 s koncentrirano HCl
 dodamo ddH₂O do 1000 ml
- razbarvalna raztopina

Preglednica 18: Sestava razbarvalne raztopine

sestavina	količina	končna koncentracija
acetonitril (Merck)	200 ml	20 % (v/v)
1 M Na-acetat, pH 4,0	50 ml	50 mM
dodamo ddH ₂ O do 1000 ml		

3.2.3.13 Detekcija celokupnih proteinov na poliakrilamidnem gelu

- fiksacijska raztopina

Preglednica 19: Sestava fiksacijske raztopine

sestavina	količina	končna koncentracija
metanol (merck)	500 ml	50 % (v/v)
ocetna kislina (Merck)	70 ml	7 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 ml		

- barvilo Sypro Ruby (Invitrogen)
- raztopina za razbarvanje

Preglednica 19: Sestava raztopine za razbarvanje

sestavina	količina	končna koncentracija
metanol (Merck)	100 ml	10 % (v/v)
ocetna kislina (Merck)	70 ml	7 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 ml		

3.2.4 Aparature in naprave

Pri delu smo poleg standardne laboratorijske opreme uporabljali tudi naslednje aparature in naprave:

Priprava raztopin

- tehtnica (Sartorius-excellence)
- tehtnica (Sartorius-analytic)
- magnetno mešalo (Tehtnica Železniki 550)
- pH meter (Mettler Toledo SevenMulti)
- mikrovalovna pečica (Sanyo)

Ekstrakcija proteinov in čiščenje proteinskih ekstraktov

- centrifuga (Eppendorf 5417R)
- centrifuga (Eppendorf mini spin plus)
- centrifuga (Sigma laboratory centrifuges 3K18)
- vrtičnik (Tehtnica Železniki EV 100)

Določanje koncentracije proteinov

- čitalec mikrotiterskih plošč Safire 2 (Tecan)
- računalniški programski paket Magellan

SDS-PAGE

- Mini Protean II elektroforetski sistem (BioRad)
- 0,75 mm glavniki
- 0,75 mm distančniki
- steklene plošče
- usmernik (BioRad PowerPac 3000)
- termostat (Kambič)

Dvodimenzionalna elektroforeza

1. dimenzija

- podstavek z režami in pokrovom za rehidracijo stripov (GE Healthcare)
- Multiphor II elektroforetska enota (GE Healthcare)
- steklen podstavek z elektrodnimi priključki (GE Healthcare)
- plastična plošča z vdolbinami (GE Healthcare)
- elektrodni trakovi (GE Healthcare)
- elektrodi: anoda, katoda (GE Healthcare)
- nosilec s plastičnimi vdolbinami za nanos vzorca (GE Healthcare)
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)
- MultiTemp III termostatski cirkulator (GE Healthcare)

2. dimenzija

- vertikalni diskontinuiran elektroforetski sistem SE 600 (Hoffer Scientific Instruments)
- 1 mm distančniki
- steklene plošče
- zgornja in spodnja posoda z elektrodama
- hladilni sistem v obliki pretočnih cevi
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)
- ultrazvočna kopel (Sonis Pio)

Detekcija proteinov na poliakrilamidnem gelu

- plastične banjice
- krožni stresalnik (IKA Labortechnik)
- krožni stresalnik (Tehnica Železniki)
- čitalec Ettan DIGE Imager (GE Healthcare)
- sistem za dokumentacijo gelov G-BOX:HR (Syngene)

Hladilniki in zamrzovalniki za shranjevanje reagentov, raztopin in vzorcev

- hladilnik (Liebher)
- hladilnik (LTH Škofja Loka)

- zamrzovalnik (-20 °C) (LTH Škofja Loka)
- zamrzovalnik (-80 °C) (Heto)

Programska analiza in statistična obdelava podatkov

- program za analizo 2-D elektroforetskih gelov ImageMaster 2D Platinum v6.0 (GE Healthcare)
- program za analizo 2-D elektroforetskih gelov Dymension 2-D analysis software (verzija 2.0.7.8) (Syngene)
- program za statistično obdelavo podatkov MultiExperiment Viewer v4.0 (TM4 Microarray Software Suite) (Seed in sod., 2003), dostopen na <http://www.tm4.org/mev.html>

3.3 METODE

3.2.5 Priprava rastlinskega materiala, mehanska inokulacija rastlin in pobiranje rastlinskega materiala

Priprava rastlinskega materiala, mehanska inokulacija in pobiranje listov je potekalo kot je opisano v Baebler (2006).

3.2.6 Ekstrakcija proteinov

3.2.6.1 Ekstrakcija proteinov s TBS/tween 20 in urea/SDS

V dve ohlajeni mikrocentrifugirki smo zatehtali po 100 mg homogeniziranega rastlinskega materiala ter v eno dodali 500 µl 1x pufra TBS/Tween 20 v drugo pa 500 µl 1x pufra TBS/Tween 20 z 1 % (m/v) PVPP. Vzorca smo premešali na vrtičniku ter dodatno homogenizirali z malim batkom. Centrifugirali smo 10 min pri 15000 g. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, peletu pa dodali 250 µl pufra urea/SDS. Vzorca smo premešali na vrtičniku ter centrifugirali 10 min pri 15000 g. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, pelet pa zavrgli.

3.2.6.2 Ekstrakcija proteinov s pufrom Tris (Vilhar, 1996)

V dve ohlajeni mikrocentrifugirki smo zatehtali po 250 mg homogeniziranega rastlinskega materiala. V eno smo dodali 500 µl pufra Tris HCl (Vilhar, 1996) v drugo pa 500 µl pufra Tris HCl (Vilhar, 1996) z 1 % (m/v) PVPP ter vzorca 15 min inkubirali na ledu; medtem smo vzorca mešali na vrtičniku. Centrifugirali smo 20 min pri 15000 g. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko ter centrifugirali 10 min pri 15000 g, pelet smo zavrgli. Supernatant smo ponovno prenesli v novo mikrocentrifugirko ter pelet zavrgli.

3.2.7 Čiščenje proteinskih ekstraktov z uporabo kompleta za odstranjevanje encima rubisko

Čiščenje proteinskih ekstraktov smo izvedli po navodilih proizvajalca.

Postopek čiščenja proteinskih ekstraktov

Proteinskemu ekstraktu smo dodali 10 % volumna dilucijskega pufra (1x TBS). Pred pričetkom čiščenja smo kolono, ki vsebuje nosilce z vezanimi protitelesi proti encimu rubisko, osušili s centrifugiranjem 30 s pri 2000 obr/min. Na kolono smo takoj nanesli 500 µl vzorca proteinskega ekstrakta ter z obračanjem mešali 15 min. Kolono smo vstavili v priloženo mikrocentrifugirko ter centrifugirali 30 s pri 2000 obr/min. V mikrocentrifugirki smo dobili frakcijo očiščenih proteinov. Na kolono smo nato nanesli 500 µl 1x TBS pufra ter vsebino kolone dobro premešali z obračanjem. Frakcijo smo zbrali s centrifugiranjem 30 s pri 2000 obr/min ter jo združili s prvo frakcijo.

Regeneracija kolone

Nespecifično vezane proteine smo odstranili s kolone s trikratnim spiranjem z 1 x TBS pufrom; vsakič smo dodali 500 µl pufra in vsebino kolone dobro premešali z obračanjem, nato smo kolono osušili s centrifugiranjem 30 s pri 2000 obr/min.

Vezane proteine (rubisko) smo odstranili z 1:4 razredčenim odstranjevalnim pufrom (250 mM glicin HCl, pH 2,5), postopek smo ponovili 4-krat v časovnem obdobju 15 min. Vsakič smo dodali 500 µl odstranjevalnega pufra, premešali vsebino kolone z obračanjem ter inkubirali pri sobni temperaturi 3 min. Kolono smo osušili s centrifugiranjem 30 s pri 2000 obr/min.

Nosilce z vezanimi protitelesi smo navtralizirali s 600 µl 1:4 razredčenega nevtralizacijskega pufra (250 mM Tris HCl, pH 8,0). Vsebino kolone smo temeljito premešali z obračanjem in stresanjem ter inkubirali 5 min pri sobni temperaturi. Kolono

smo osušili s centrifugiranjem 30 s pri 2000 obr/min. Dodali smo 500 µl 1 x TBS pufera ter dobro premešali. Taka kolona je bila primerena za shranjevanje na 4 °C, v primeru nadaljnje uporabe pa smo jo zopet osušili s centrifugiranjem.

3.2.8 Koncentriranje proteinskih ekstraktov z uporabo kompleta za koncentriranje

Uporabili smo pripravo za koncentriranje proteinov Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices 3K s filtrom, ki zadrži proteine z maso, večjo od 3 kDa. V enoto s filtrom smo nanesli celoten volumen vzorca, ki smo ga dobili po čiščenju s kompletom za odstranjevanje encima rubisko. Centrifugirali smo pri 7500 g v kotnem rotorju 10 – 20 minut oziroma tako dolgo, da smo dobili želen volumen koncentrata (približno ¼ začetnega volumna). Koncentrat smo odpipetirali iz enote s filtrom ter shranili v mikrocentrifugirki.

3.2.9 Določanje koncentracije proteinov v proteinskem ekstraktu

Uporabili smo metodo po Bradfordu (1976), ki temelji na vezavi barvila Coomassie briljantno modro G-250 na proteine. Ob vezavi se rdeča barva barvila spremeni v modro, absorbcijski maksimum barvila pa se spremeni iz 465 nm na 595 nm. Vezava barvila poteče v približno dveh minutah, kompleks pa ostane stabilen približno eno uro.

Umeritveno krivuljo smo pripravili z BSA. Naredili smo redčitve BSA v 0,15 M NaCl z naslednjimi koncentracijami BSA: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 in 1 mg/ml. 5 µl posamezne redčitve smo odpipetirali v vdolbinico transparentne mikrotiterske ploščice z ravnim dnom ter k vsaki redčitvi dodali po 250 µl 5-krat Bradfordovega reagenta. Pripravljene proteinske ekstrakte smo 5-krat redčili ter po 5 µl redčenih ekstraktov odpipetirali v vdolbinice na mikrotiterski ploščici. Dodali smo 250 µl 5-krat redčenega Bradfordovega reagenta. Spleti vzorec je predstavljal 5-krat redčen pufer TBS. Absorbanco smo izmerili na spektrofotometru pri valovni dolžini 595 nm. Na podlagi rezultatov smo naredili

umeritveno krivuljo, kateri smo priredili linearno enačbo ter po njej izračunali koncentracijo proteinov v ekstraktih.

3.2.10 Čiščenje proteinskih ekstraktov

3.2.10.1 Čiščenje proteinov v ekstraktu z uporabo kompleta za čiščenje proteinskih ekstraktov

Postopek čiščenja proteinskih ekstraktov s kompletom »2-D Clean-Up Kit« temelji na obarjanju proteinov in odstranjevanju motečih snovi, kot so detergenti, soli, lipidi, fenoli in nukleinske kisline (Stasyk in sod., 2001).

Čiščenje smo izvedli po navodilih proizvajalca.

Ustrezен volumen ekstrakta smo odpipetirali v 2-ml mikrocentrifugirko, tako da je vsebnost proteinov v mikrocentrifugirki znašala 120 µg. Dodali smo pufer Tris HCl (Vilhar, 1996) do volumna 200 µl. Nato smo dodali 3-kraten volumen precepitanta (600 µl), premešali na vrtičniku ter inkubirali 15 min na ledu. Dodali smo 3-kraten volumen ko-precipitanta (600 µl), premešali na vrtičniku ter centrifugirali 10 min pri 10000 g in 4 °C. Odstranili smo supernatant, dodali 80 µl ko-precipitanta in inkubirali 5 min na ledu. Centrifugirali smo 10 min pri 10000 g in 4 °C. Odstranili smo supernatant, dodali 50 µl ddH₂O in mešali na vrtičniku dokler se ni sediment resuspendiral. Nato smo dodali 1 ml pufra za izpiranje, ki smo ga predhodno ohladili na -20 °C, in 5 µl aditiva. Vzorec smo 1 min mešali na vrtičniku nato pa 20 min inkubirali pri -20 °C. Po prvih 10. minutah ter na koncu inkubacije smo vzorec 1 min mešali na vrtičniku. Nato smo centrifugirali 10 min pri 10000 g in 4 °C. Supernatant smo odstranili, pelet pa osušili na zraku največ 5 min. Pelet smo raztopili v 270 µl rehidracijskega pufra. Nato smo centrifugirali 3 min pri 13000 obr/min. V primeru, da smo opazili morebitne neraztopljeni delce, smo supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko.

3.2.10.2 Obarjanje proteinov v ekstraktu z acetonom

Vzorcu smo dodali 4-kraten volumen acetona ter inkubirali 1 h pri -20 °C. Centrifugirali smo 10 min pri 14000 obr/min in 4 °C. Supernatant smo odstranili ter pelet sprali z acetonom, ohlajenim na -20 °C. Centrifugirali smo 5 min pri 14000 obr/min in 4 °C. Supernatant smo odstranili in pelet osušili približno 1 min. Dodali smo rehidracijski pufer ter mešali na vrtičniku, vendar se pelet ni v celoti raztopil, zato smo ponovno centrifugirali 5 min pri 14000 obr/min in 4 °C ter supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko, pelet pa zavrgli.

3.2.10.3 Obarjanje proteinov v ekstraktu z 10 % TCA

Ekstraktu smo dodali 2,5-kraten volumen 10 % TCA ter inkubirali 15 min na ledu. Centrifugirali smo 10 min pri 14000 obr/min in 4 °C. Supernatant smo odstranili in pelet sprali z 10% TCA, ohlajenim na -20 °C. Centrifugirali smo 5 min pri 14000 obr/min in 4 °C. Supernatant smo odstranili ter pelet osušili približno 2 min. Dodali smo rehidracijski pufer ter mešali na vrtičniku. Ker se pelet ni popolnoma raztopil, smo ponovno centrifugirali 5 min pri 14000 obr/min in 4 °C ter supernatant prenesli v nove mikrocentrifugirke, pelet pa zavrgli.

3.2.11 Ugotavljanje učinkovitosti ekstrakcije in postopkov čiščenja s SDS-PAGE (mini Protean II elektroforetski sistem)

SDS-PAGE je metoda za ločevanje proteinov na osnovi njihove molekulske mase. Temelji na uporabi anionskega detergenta SDS, ki se veže na hidrofobne dele proteina, poruši njegovo strukturo in ga tako denaturira. Na 1 g proteina se veže približno 1,4 g SDS. Molekule SDS imajo negativen nabojo, zato imajo tudi vsi kompleksi SDS-polipeptidi negativen nabojo, velikost naboja pa je odvisna od velikosti proteinske molekule. V električnem polju bodo vse molekule potovale proti pozitivni anodi, hitrost njihovega potovanja pa bo obratnosorazmerna z njihovo velikostjo. Pred nanosom na gel vzorcu dodamo vzorčni pufer, ki vsebuje tudi 2-ME ali DTT. Oba imata vlogo reducenta in

reducirata disulfidne vezi, ki stabilizirajo terciarno strukturo proteina (Lodish in sod., 1995; Walker 1996).

Poliakrilmidni gel nastane s polimerizacijo akrilamidnih monomerov v dolge poliakrilmidne verige, med katerimi tvori bisakrilamid kovalentne prečne povezave. Polimerizacija poteče v prisotnosti APS, ki tvori proste radikale, ter katalizatorja TEMED. Lastnosti gela, kot so gostota, elastičnost in velikost por gela, so odraz koncentracije akrilamida, ki določa povprečno dolžino verige polimera, ter koncentracije bisakrilamida, ki določa obseg križnega povezovanja (Walker, 1996).

S spremenjanjem koncentracije akrilamida in bisakrilaminda določamo stopnjo zamreženosti gela, ki jo izberemo glede na velikost molekul, ki jih želimo ločiti.

SDS-PAGE smo izvedli po Laemmlijevi metodi (1970). Uporabili smo diskuntinuiran sistem, ki je sestavljen iz koncentracijskega in ločilnega gela. Odločili smo se za 12 % poliakrilmidni ločilni gel, s katerim ločujemo molekule velikosti od 14 kDa do 116 kDa (Gallagher, 2006).

3.2.11.1 Vlivanje gelov

Med dve stekleni plošči različnih velikosti, ki skupaj z ostalimi sestavnimi deli tvorijo kalup, smo najprej vlili ločilni gel (preglednica 5) do višine 3 cm pod vrhom niže steklene plošče. Na vrh gela smo nato nanesli plast ddH₂O ter tako preprečili stik gela s kisikom in omogočili enakomerno polimerizacijo. Poleg tega plast vode omogoči nastanek ravne stične površine s koncentracijskim gelom. Gel smo pustili polimerizirati 30 minut, nato smo odlili vodo ter ostanke popivnali s filtrirnim papirjem. Na ločitveni gel smo vlili koncentracijski gel (preglednica 6) do vrha steklenih plošč. Med plošče smo v sloj koncentracijskega gela vstavili glavniček, ki je v spojitenem gelu oblikoval 15 jamic za nanos vzorca. Koncentracijski gel smo pustili polimerizirati 30 minut. Gel smo nato iz spodnjega nosilca premestili v elektroforetsko banjico ter banjico napolnili z 1x SDS

elektroforetskim pufrom. Glavniček smo previdno odstranili ter jamice sprali z 1x SDS elektroforetskim pufrom.

3.2.11.2 Priprava vzorcev in nanos na gel

V novo mikrocentrifugirko smo odpipetirali 15 µl vzorca ter dodali 5 µl 4 x SDS vzorčnega pufra (preglednica 8). Za marker smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 5 µl raztopine proteinov znanih molekulskih mas (točka 3.2.3.9) ter dodali 95 µl vzorčnega pufra. Vzorec oziroma marker z vzorčnim pufrom smo zmešali na vrtičniku, 5 min inkubirali pri temperaturi 100 °C in nato kratko centrifugirali. Na gel smo nanesli 20 µl vzorca oziroma markerja. Morebitne prazne jamice smo zapolnili z 20 µl 1 x SDS vzorčnega pufra.

3.2.11.3 Elektroforeza

Usmernik smo povezali z elektroforetskim sistemom. Tok smo nastavili na 20 mA. Ko je linija bromfenol modrega vstopila v ločilni gel, smo tok povečali na 25 mA. Elektroforezo smo ustavili, ko je linija bromfenol modrega pripravovala do konca gela (cca. 1 h).

3.2.12 Detekcija proteinov na poliakrialmidnem gelu

Gele smo barvali z barvilm Coomassie briljantno modro, ki se veže na bazične aminokisline proteinov. Meja detekcije je 0,3 – 1 µg proteina (Merril, 1987).

Po končani elektroforezi smo gel prenesli v plastično banjico ter prilili 5-kratni volumen fiksacijske raztopine (preglednica 9). Na krožnem stresalniku smo stresali 30 min. Nato smo fiksacijsko raztopino odlili ter prilili 5-kraten volumen barvila Coomassie briljantno modro (preglednica 10). Barvali smo na krožnem stresalniku preko noči. Naslednji dan smo barvilo odlili ter gel za kratek čas prelili s cca. 50 ml fiksacijske raztopine. Gel smo razbarvali v 5-kratnem volumnu raztopine za razbarvanje (preglednica 11) 2 uri. Vmes

smo raztopino za razbarvanje zamenjali s svežo. Po končanem razbarvanju smo gel skenirali.

3.2.13 Dvodimenzionalna elektroforeza

Dvodimenzionalna elektroforeza omogoča ločevanje kompleksne mešanice proteinov po dveh lastnostih. V prvi dimenziji gre za ločevanje na podlagi izoelektrične točke proteinov (izoelektrično fokusiranje), v drugi dimenziji pa na podlagi njihove molekulske mase (SDS-PAGE). Na ta način lahko ločimo proteine, ki imajo identične molekulsko maso in različne izoelektrične točke, ter proteine, ki imajo identične izoelektrične točke in različne molekulske mase (Nelson in Cox, 2004).

3.2.13.1 Prva dimenzija

Rehidracija trakov

IPG-trakove z imobiliziranim pH gradientom (3 – 10) dolžine 13 cm, ki smo jih hranili na -20 °C, smo najprej rehidrirali. Podstavek z režami smo postavili v ravnotežno pozicijo ter v režo nanesli 250 µl rehidracijskega pufra (preglednica 12) s proteinskimi ekstraktom (110 µg proteinov). Z IPG-traku smo odstranili zaščitno folijo ter trak z gelom navzdol položili v režo tako, da se je rehidracijski pufer enakomerno porazdelil po celotni dolžini traku. Na trak smo nato nanesli 3 ml mineralnega olja ter s tem preprečili evaporacijo vode in kristalizacijo uree v rehidracijskem pufru. Podstavek z režami smo pokrili s pokrovom ter pustili, da je rehidracija trakov potekala čez noč.

Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje je metoda, ki ločuje proteine glede na njihovo izoelektrično točko (pI). V pH gradientu in pod vplivom električnega polja proteini potujejo proti poziciji, kjer je njihov neto naboj enak nič. Pozitivno nabiti proteini potujejo proti katodi ter postajajo vedno manj pozitivno nabiti. Ustavijo se pri svoji pI, kjer je njihov neto naboj enak nič. Negativno nabiti proteini potujejo proti anodi, njihov neto naboj postaja vedno manj

negativen dokler se prav tako ne ustavijo pri svoji pI. Na ta način koncentriramo proteine pri njihovih vrednostih pI ter jih ločujemo na podlagi zelo majhnih razlik v njihovem neto naboju (GE Healthcare, 2004).

Za izoelektrično fokusiranje smo uporabili elektroforetsko enoto Multiphor II. Naprava je bila povezana z vodno kopeljo, ki je omogočala vzdrževanje konstantne temperature 20 °C tekom izvedbe fokusiranja. Na hladilno ploščo smo v vertikalnih črtah nanesli 4-krat po 1 ml mineralnega olja ter čez položili steklen podstavek z elektrodnimi priključki. V podstavek smo vlili 10 ml mineralnega olja ter vanj položili plastično ploščo z vdolbinami za IPG-trakove. Mineralno olje služi kot topotni prevodnik ter zagotavlja dober termični kontakt med hladilno ploščo ter ploščo z vdolbinami za IPG-trakove. IPG-trak smo vzeli iz podstavka z režami za rehidracijo trakov ter sprali v merilnem valju, napolnjenem z ddH₂O, in nato še s curkom ddH₂O, ki smo ga usmerili vzdolž traku. Na ta način smo odstranili proteine, ki niso vstopili v gel, ter morebitne kristalčke uree. Trak smo popivnali na brisači ter ga z gelom navzgor položili v vdolbino na plastični plošči, pri tem je bil označen plus konec traku na anodni strani. Dva elektrodna trakova smo omočili z ddH₂O, popivnali na brisači ter ju položili na gel na plus in minus konec IPG-traku. Na sredino elektrodnih trakov smo vpeli elektrode (na plus konec gela anodo, na minus konec katodo), ki so bile tako prek elektrodnih trakov povezane z gelom na traku. Trakove smo prelili s 150 ml mineralnega olja ter vse skupaj pokrili s pokrovom.

Elektroforetsko enoto smo povezali z usmernikom ter nastavili naslednje 3 faze (»gradient mode«):

- 300 V, 5 mA, 5 W, 1 min
- 3500 V, 5 mA, 5 W, 1 h 30 min
- 3500 V, 5 mA, 5 W, 4 h

Tekom IEF je čez trakove tekel električni tok in barvilo bromfenol modro, ki je sestavina rehidracijskega pufra, je potovalo proti anodi. Po končanem IEF smo trakove zavarili v plastične mape ter jih shranili na -80 °C.

3.2.13.2 Druga dimenzija

V drugi dimenziji smo proteine ločevali glede na njihovo molekulske maso – princip ločevanja po Laemmlijevi metodi je opisan pod točko 3.2.11.

Vlivanje gelov za SDS-PAGE

Med dve stekleni plošči, ki skupaj z ostalimi sestavnimi deli tvorijo kalup, smo vlili 19 ml ločilnega gela (preglednica 14). Na vrh gela smo nanesli plast ddH₂O. S tem smo preprečili dostop zraka, ki ovira polimerizacijo, in zagotovili ravno površino gela. Gel smo pustili preko noči, da je dokončno polimeriziral. Nato smo s površine gela odlili vodo, preostanke pa posušili s sušilnikom.

Uravnoteženje trakov

IPG-trakove smo vzeli iz zamrzovalnika ter jih prenesli v epruvete s pufrom za uravnoteženje I (točka 3.2.3.11). Epruvete s trakovi smo 15 min inkubirali na stresalniku, tako da se je pufer enakomerno prelival vzdolž traku. Nato smo trakove prestavili v epruvete z 10 ml pufra za uravnoteženje II (točka 3.2.3.11), ter jih prav tako 15 min inkubirali na stresalniku. Po končanem uravnoteženju smo trakove rahlo popivnali na filter papirju ter odrezali skrajne konce trakov.

Nanos markerja

Marker (točka 3.2.3.11) smo odpipetirali na filter papir velikosti 5 x 5 mm, ki smo ga nato vstavili med plošči na levo stran gela.

Prenos traku na ločilni gel

Na površino ločilnega gela smo vlili segreto 0.5 % agarozno raztopino (točka 3.2.3.11) do vrha steklenih plošč. Med plošči smo vstavili IPG-trak ter ga s tanko iglo potisnili skozi agarozno raztopino do poliakrilamidnega gela.

Elektroforeza

Ko se je agaroza strdila, smo kalup vpeli v zgornjo posodo z elektrodama ter vse skupaj namestili v spodnjo posodo. Obe posodi smo napolnili z 1x SDS elektroforetskim pufrom,

ki smo ga pripravili iz 5x SDS elektroforetskega pufra (preglednica 15). Uporabili smo sistem SE 600.

Na ta način smo pripravili dva elektroforetska sistema (4 geli), ki smo ju povezali z usmernikom. Potovanje proteinov je potekalo 15 min pri konstantnem toku 20 mA/gel in nato pri toku 40 mA/gel. Med potekom elektroforeze sta bila elektroforetska sistema povezana s termostatom, ki je v sistemih vzdrževal konstantno temperaturo 20 °C. Elektroforezo smo ustavili, ko je barvilo bromfenol modro pripotovalo do konca gelov. Nosilce gelov smo razdrli ter gele primerno označili.

3.2.14 Detekcija fosfoproteinov na poliakrilamidnem gelu

Fiksacija

Po dva gela skupaj smo fiksirali v eni banjici, v katero smo vlili 300 ml fiksacijske raztopine (preglednica 17). Fiksirali smo 2-krat po 30 min na stresalniku. S tem smo preprečili difuzijo proteinov in iz gela sprali odvečne ione in SDS.

Spiranje

Odlili smo fiksacijsko raztopino ter prilili 300 ml ddH₂O. Gele smo spirali 3-krat po 10 min na stresalniku. Pomembno je, da se iz gela odstranita ves metanol in ocetna kislina, ki bi sicer interagirala s komponentami barvila.

Barvanje z barvilom Pro-Q Diamond

V banjice z geli smo nalili 300 ml barvila ter inkubirali na stresalniku 90 min. Vse nadaljnje postopke smo delali v temi, saj je fluorescentno barvilo Pro-Q Diamond občutljivo na svetlobo. Banjice smo med stresanjem pred svetlobo dodatno zaščitili z aluminijasto folijo.

Razbarvanje

V banjice z geli smo nalili 300 ml raztopine za razbarvanje (preglednica 18) ter inkubirali na stresalniku 30 min. Postopek smo ponovili 4-krat. Razbarvanje je potrebno, da zmanjšamo obarvanost ozadja ter nespecifične signale.

Spiranje

Gele smo spirali 4-krat po 5 min v ddH₂O.

Slikanje

Gele smo slikali s čitalcem Ettan DIGE Imager. Barvilo Pro-Q Diamond ima eksitacijski maksimum pri valovni dolžini ~555 nm, emisijski maksimum pa pri valovni dolžini ~580 nm. Na čitalcu Ettan DIGE Imager smo izbrali kombinacijo eksitacije in emisije Deep purple 1 (eksitacija: 540/25, emisija: 595/25).

3.2.15 Detekcija celokupnih proteinov na poliakrilamidnem gelu

Fiksacija

Po dva gela skupaj smo fiksirali v eni banjici, v katero smo vlili 300 ml fiksacijske raztopine (preglednica 19). Fiksirali smo 2-krat 30 min na stresalniku. V primeru, da smo gele predhodno barvali z barvilo za detekcijo fosfoproteinov, ponovna fiksacija ni bila potrebna in smo gele samo sprali v ddH₂O.

Barvanje

V banjice z dvema geloma smo nalili 300 ml barvila Sypro Ruby ter barvali na stresalniku preko noči. Banjice smo pred svetlobo zaščitili z aluminijasto folijo.

Razbarvanje

Po 2 gela smo iz banjice z barvilo prenesli v nove banjico, v katero smo nalili 300 ml raztopine za razbarvanje (preglednica 19). Razbarvanje je potekalo 2-krat po 30 min na stresalniku v temi.

Spiranje

Spirali smo po dva gela skupaj v 300 ml ddH₂O. Spiranje je potekalo 2-krat po 5 min v temi.

Slikanje

Gele smo slikali s sistemom za dokumentacijo gelov G-BOX:HR. Barvilo Sypro Ruby ima eksitacijski maksimum pri dveh valovnih dolžinah: pri ~280 nm in pri ~450 nm; ter emisijski maksimum blizu 610 nm. Uporabili smo eksitacijsko osvetlitev Transilluminator – medium wave uv ter emisijski filter FiltUV. Pri slikanju smo imeli nastavljene stalne parametre: maksimalno odprta zaslonka, minimalen fokus in minimalna povečava kamere. Čas izpostavitve smo nastavili na 60 ms.

3.2.16 Analiza slike

3.2.16.1 Analiza slike fosfoproteinov

Slike gelov, ki smo jih barvali z barvilom za detekcijo fosfoproteinov ProQ Diamond, smo analizirali v programu Dymension 2-D analysis software. V programu smo primerjali po dve sliki hkrati in sicer sliko gela s celokupnimi proteini ter sliko istega gela s fosfoproteini. Sliko gela s celokupnimi proteini smo postavili kot kontrolo ter jo prekrili s sliko fosfoproteinov. Na ta način smo izmed celokupnih proteinov lahko določili proteine, pri katerih je prišlo do fosforilacije.

3.2.16.2 Analiza slike celokupnih proteinov

Slike gelov, ki smo jih barvali z barvilom za detekcijo celokupnih proteinov Sypro Ruby, smo analizirali v programu ImageMaster 2D Platinum. Sprva smo na vseh slikah odstranili moteče robove gelov ter določili položaj 2-D elektroforetskih lis na posameznem gelu. Pri detekciji lis smo upoštevali privzete programske nastavitev, za nadaljnjo analizo lis pa smo spremenili nastavitev naslednjih dveh parametrov:

- smooth: 2
- saliency: 2,5

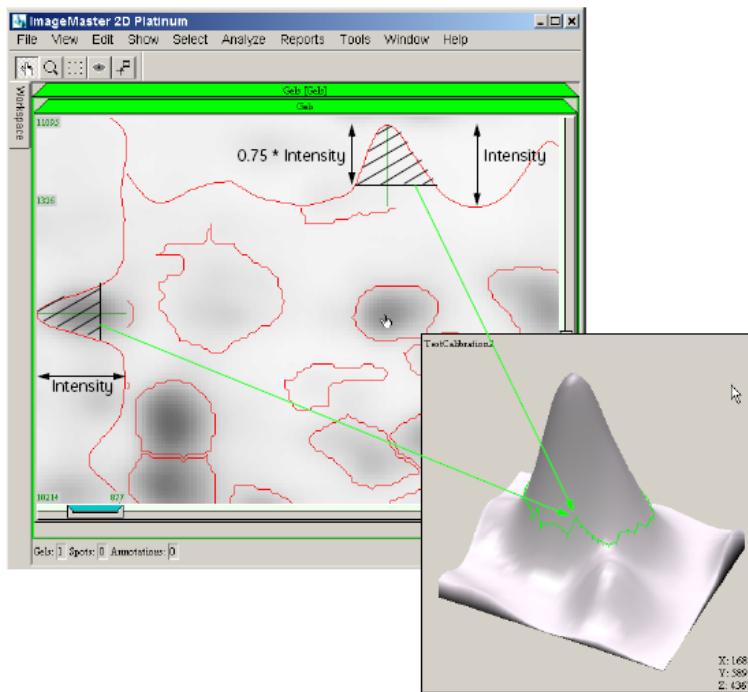
Z optimizacijo parametra »smooth« program zazna vse pravilne lise in pri tem loči čim več prekrivajočih se lis. Parameter »saliency« nam pove, koliko lisa izstopa glede na svoje okolje. Z večanjem omenjenega parametra se znebimo artefaktov in šumov.

Pregledali smo lise, ki jih je program avtomatsko zaznal in obkrožil, ter poiskali liso manjše velikosti in z ostrim vrhom, ki se je pojavila na vseh gelih. Liso smo na vseh gelih določili za orientacijski znak (»landmark«), ki služi kot referenčna točka pri ujemaju lis. Kot referenčni gel pri ujemaju smo uporabili gel, na katerem so bili združeni vsi vzorci celotne 4. in 5. serije. Program je tako na vseh gelih določil lise, ki so ustrezale lisam na referenčnem gelu. Pregledali smo, kako se vsaka posamezna lisa na referenčnem gelu ujema z lisami na ostalih gelih ter naredili ročne popravke, kjer je bilo to potrebno (spojitev/deljenje lise, dodajanje/brisanje ujemanj). Pri pregledovanju smo si pomagali s tridimenzionalnim pogledom lis.

Izražanje različnih proteinov smo ocenili s pomočjo preglednice, ki podaja relativne volumne lis posameznih ujemanj. Volumen lise predstavlja volumen nad obrisom lise, ki se nahaja na 75 % višine lise (merjeno od vrha lise) (slika 3). Relativni volumen predstavlja razmerje med volumnom ene lise proti celokupnemu volumnu vseh lis na gelu (enačba 1). Na ta način se izognemo vplivu variacij v nanosu proteinov in barvanju med posameznimi geli (GE Healthcare, 2005).

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{s=1}^n Vol_s} * 100 \quad \dots (1)$$

Vol_s predstavlja volumen lise s v gelu z n lisami.



Slika 3: Tridimenzionalni pogled proteinske lise na 2-DE gelu odraža njeno obliko in volumen, ki se upošteva pri kvantifikaciji lis. Obris lise je na 75 % višine lise merjeno od vrha.

3.2.17 Statistična analiza rezultatov

Za statistično obdelavo smo uporabili normalizirane vrednosti relativnih volumnov (%Vol_N) posameznih lis, ki smo jih izračunali po enačbi 2.

$$\%Vol_N = \log_2 * \left(\frac{\%Vol}{\%Vol(\text{referenčni gel})} \right) \dots (2)$$

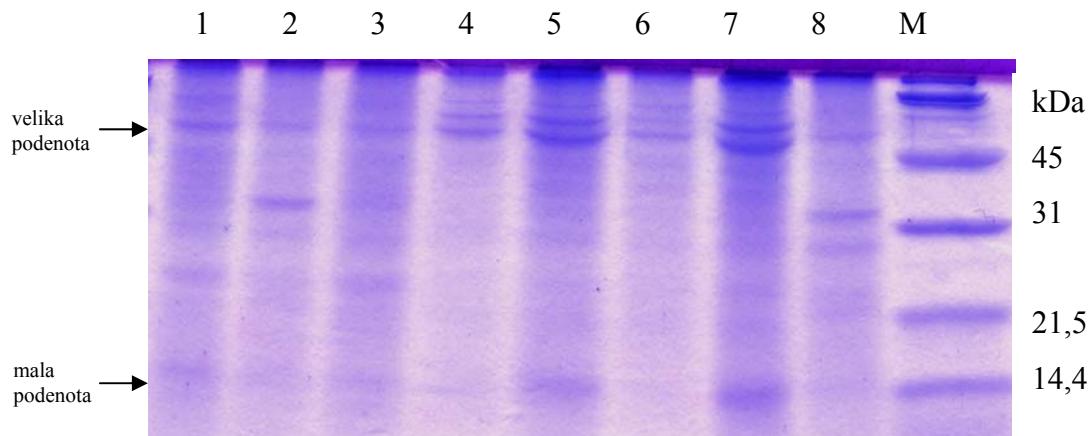
Za ugotavljanje statistično značilnih razlik v izražanju proteinov smo v programu MultiExperiment Viewer (Seed in sod., 2003) naredili več statističnih analiz: hierarhično razvrščanje vzorcev (HCL), analizo glavnih komponent (PCA), t-test ($p < 0,01$) in analizo variance (ANOVA) ($p < 0,05$).

4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA PRIPRAVE VZORCA ZA DVODIMENZIONALNO ELEKTROFOREZO

Optimizacija priprave vzorca je zajemala optimizacijo ekstrakcije proteinov ter optimizacijo čiščenja proteinskih ekstraktov. Primerjali smo dva načina ekstrakcije proteinov: ekstrakcijo s TBS/tween 20 in urea/SDS ter ekstrakcijo s pufrom Tris (Vilhar 1996). Pri tem smo v obeh primerih preverili, kakšen učinek ima dodatek 1 % (m/v) PVPP k ekstrakcijskemu pufru. Nadalje smo ugotavljali učinkovitost kompleta za odstranjevanje encima rubisko ter primerjali različne načine čiščenja proteinskih ekstraktov: čiščenje proteinov v ekstraktu s kompletom »2-D Clean-Up Kit«,obarjanje proteinov z acetonom ter obarjanje proteinov s TCA.

Učinkovitost ekstrakcije in postopkov čiščenja smo preverili s SDS-PAGE. Na podlagi rezultatov smo se odločili za ekstrakcijo proteinov s pufrom Tris (Vilhar, 1996) z 1 % (m/v) PVPP, ker je iz ekstrakta najbolj učinkovito odstranil nečistoče, ki ovirajo potovanje proteinov (slika 4). S slike 4 je razvidna tudi učinkovitost čiščenja ekstrakta z uporabo kompleta za odstranjevanje encima rubisko. Rubisko je sestavljen iz velike podenote (53 kDa) ter male podenote (14 kDa). Na gelu (slika 4) sta s puščicama označeni lis, ki pripadata mali in veliki podenoti encima rubisko. V primerih, ko smo vzorce čistili s kompletom za odstranjevanje encima rubisko, opazimo nižjo intenziteto omenjenih lis.

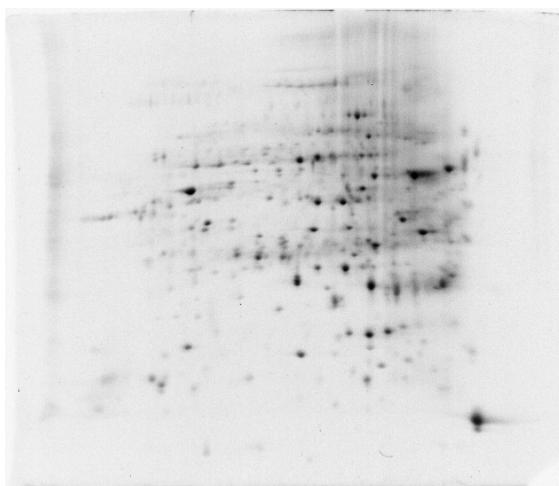


Slika 4: SDS-PAGE: Ocena optimizacije ekstrakcije in čiščenja proteinskih ekstraktov s kompletom za odstranjevanje encima rubisko. Puščici na levi strani gela označujeta veliko in malo podenoto encima rubisko. M – marker. 1) Ekstrakcija proteinov s TBS/tween 20 in urea/SDS. 2) Ekstrakcija proteinov s TBS/tween 20 in urea/SDS, ki ji je sledilo čiščenje ekstrakta s kompletom za odstranjevanje encima rubisko. 3) Ekstrakcija proteinov s TBS/tween 20 z 1 % (m/v) PVPP in urea/SDS. 4) Ekstrakcija proteinov s TBS/tween 20 z 1 % (m/v) PVPP in urea/SDS, ki ji je sledilo čiščenje ekstrakta s kompletom za odstranjevanje encima rubisko. 5) Ekstrakcija proteinov s pufrom Tris (Vilhar, 1996). 6) Ekstrakcija proteinov s pufrom Tris (Vilhar, 1996), ki ji je sledilo čiščenje ekstrakta s kompletom za odstranjevanje encima rubisko. 7) Ekstrakcija proteinov s pufrom Tris (Vilhar, 1996) z 1 % (m/v) PVPP. 8) Ekstrakcija proteinov s pufrom Tris (Vilhar, 1996) z 1 % (m/v) PVPP, ki ji je sledilo čiščenje ekstrakta s kompletom za odstranjevanje encima rubisko.

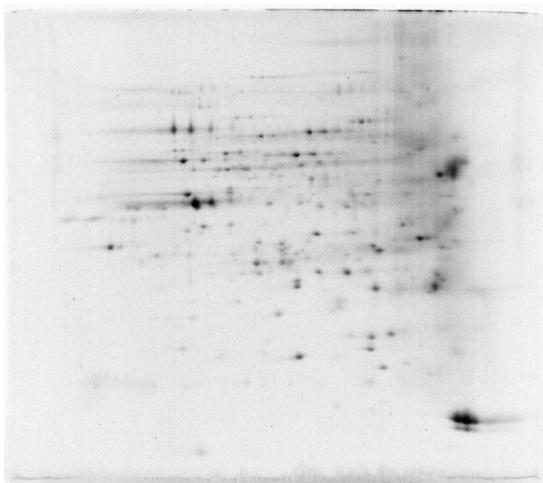
Preizkusili smo tudi tri načine čiščenja proteinskih ekstraktov: čiščenje proteinov v ekstraktu s kompletom »2-D Clean-Up Kit«,obarjanje proteinov v ekstraktu z acetonom ter obarjanje proteinov v ekstraktu z 10 % TCA. Pri obarjanju proteinov z acetonom oziroma s 10 % TCA se pelet v rehidracijskem pufru ni v celoti raztopil, kot se je to zgodilo pri čiščenju proteinov s kompletom »2-D Clean-Up Kit«. Zato smo se zaradi večje ponovljivosti postopka odločili za čiščenje s slednjim, prav tako pa smo na podlagi slik gelov SDS-PAGE pri čiščenju s kompletom »2-D Clean-Up Kit« opazili najmanjšo izgubo proteinov (rezultati niso prikazani).

4.2 PRIMERJAVA PROTEINSKIH PROFILOV V LISTIH KROMPIRJA PRED IN PO OKUŽBI Z VIRUSOM

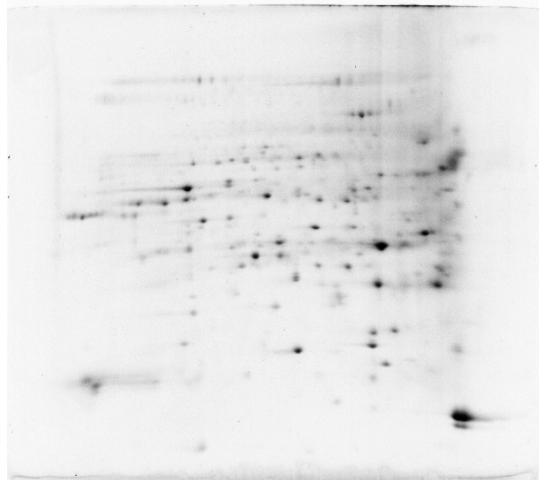
Z dvodimenzionalno elektroforezo smo analizirali 18 vzorcev, ki so opisani v preglednici 1. Naredili smo tudi referenčni gel, na katerem smo združili vse vzorce celotne 4. in 5. serije. Pri ročnem pregledu slik gelov smo opazili večje razlike med serijami, ki so predstavljale biološke ponovitve, kot pa med različno tretiranimi vzorci iste serije (slika 5).



Slika 5.a: Primer 2-DE gela 3. serije (N 3. s 48 h).

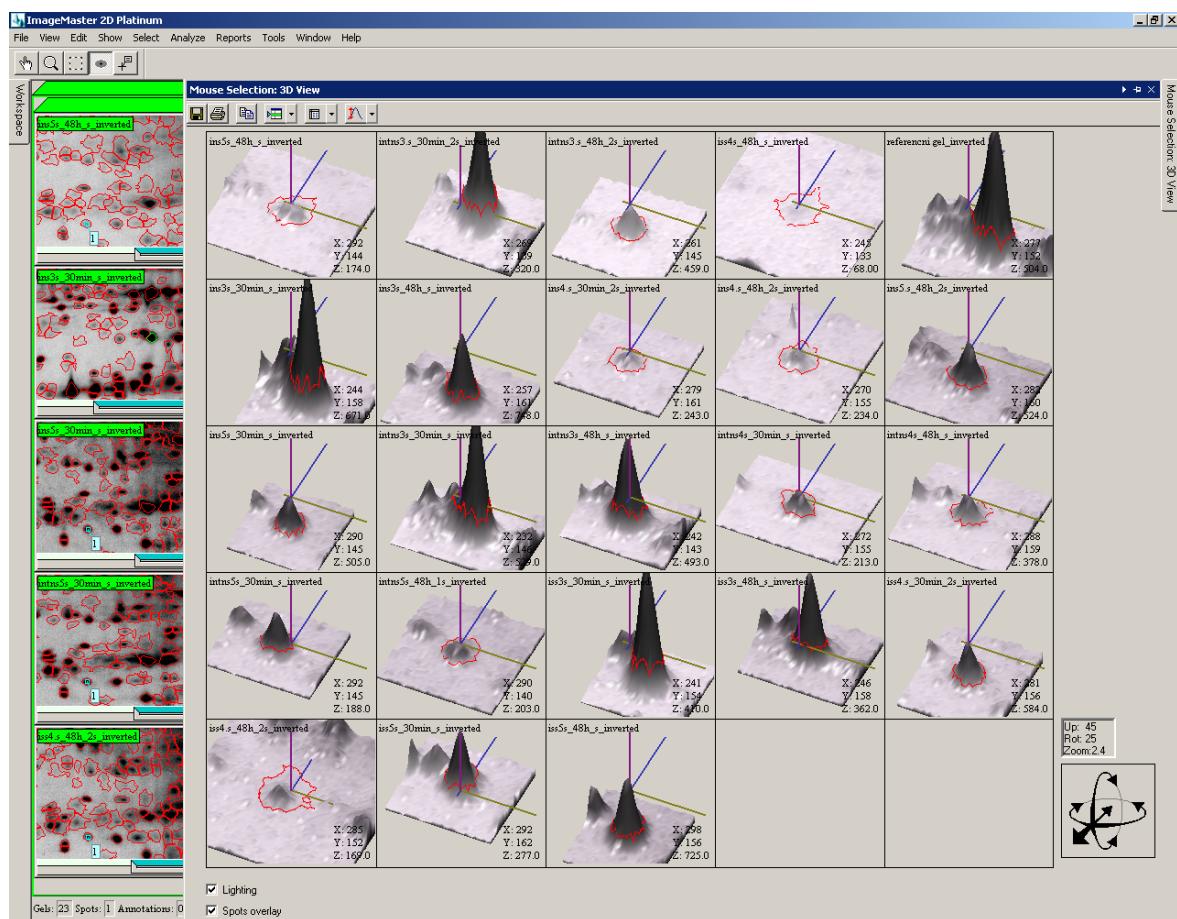


Slika 5.b: Primer 2-DE gela 4. serije (N 4. s 48 h).



Slika 5.c: Primer 2-DE gela 5. serije (N 5. s 48 h).

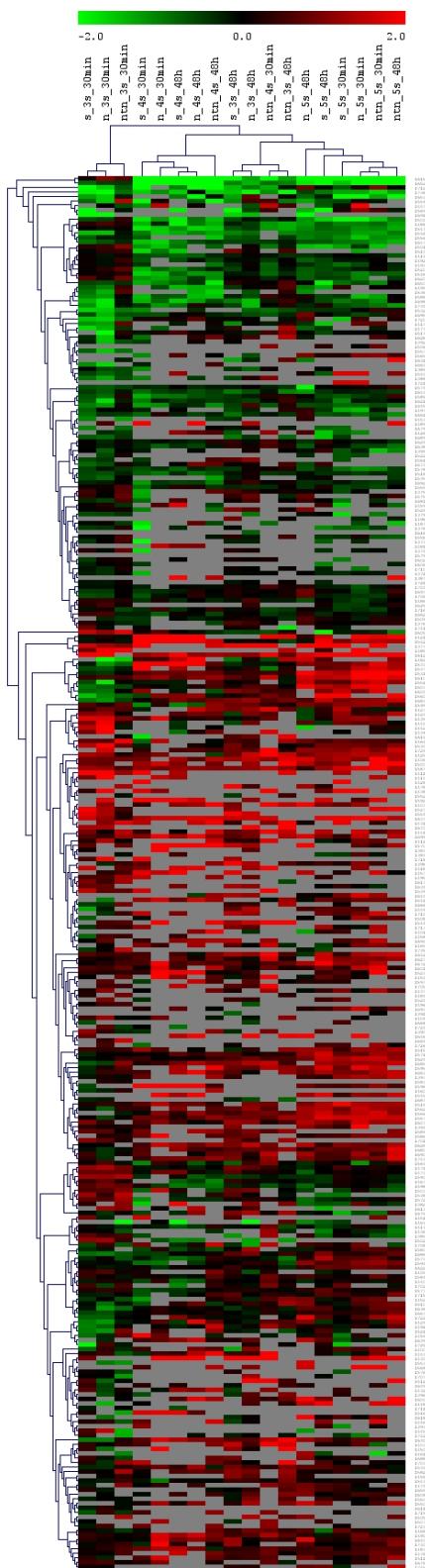
V programu ImageMaster 2D Platinum smo primerjali vse gele hkrati glede na referenčni gel. Program je zaznal do 532 lis na gel. V sklopu analize lis smo optimizirali parametra »smooth« in »saliency« (točka 3.2.16.2) ter tako v nadaljnjo analizo zajeli v povprečju 324 lis na gel ter na referenčnem gelu 393 lis. Geli so se v povprečju ujemali z referenčnim gelom v 63 %, kar pomeni 224 ujemanj na gel. S pomočjo poročila o ujemaju lis med geli, ki ga program poda v obliki preglednice, smo pregledali, kako se vsaka posamezna lisa na referenčnem gelu ujema z lisami na ostalih 18 gelih. Nekateri proteini se namreč v 2-DE niso popolnoma ločili, posledično so bile lise v tridimenzionalni postavitvi v obliku grebenov. Problematične pa so bile tudi lise, ki so se razširile po večji površini in v tridimenzionalni postavitvi niso tvorile izrazitega vrha. Tako smo pri pregledu lis izmed vseh 393 izločili 90 ujemanj, pri približno 115 ujemanjih pa smo na posameznih gelih uvedli ročne popravke. Ujemanja smo izločili v primeru, ko na referenčnem gelu lise ni bilo možno dobro določiti, ročne popravke pa smo uvajali v primerih različno deljenih lis, napačno določenih ali izpuščenih ujemanj. Ko je bila na primer lisa na nekaterih gelih razdeljena na dve lisi, na drugih gelih pa obkrožena kot ena lisa, smo to po lastni presoji poenotili. Pri tem smo si pomagali s tridimenzionalnim prikazom lis (slika 6).



Slika 6: Primerjava izbrane lise v tridimenzionalni postaviti med posameznimi geli z vzorci proteinskih ekstraktov listov krompirja.

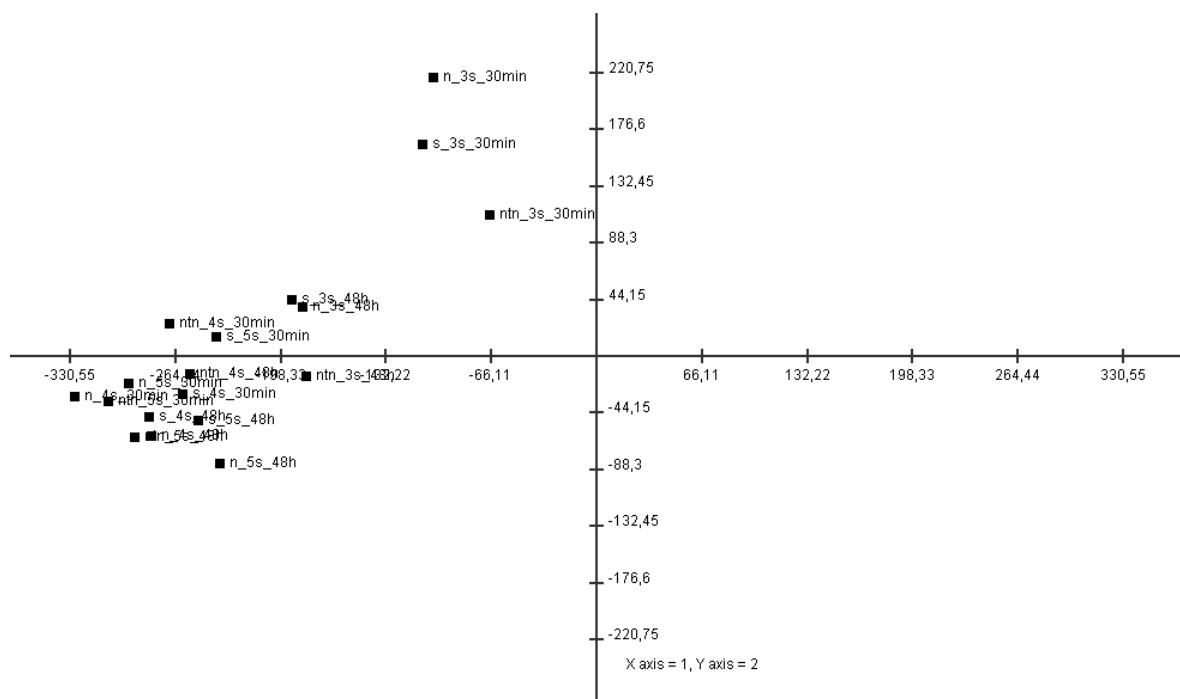
4.3 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Iz diagrama hierarhičnega razvrščanja (HCL) (slika 7) je razvidno, da je več podobnosti v proteinskem profilu znotraj posameznih serij kot pa med enako tretiranimi rastlinami (slepo okužene, okužene s PVY^N ali s PVY^{NTN}, pobrane 30 min oziroma 48 h po okužbi). Opazimo lahko odstopanje 3. serije oziroma večjo podobnost med 4. in 5 serijo. Kaže pa se tudi tendenca odstopanja vzorcev rastlin, okuženih s PVY^{NTN}.

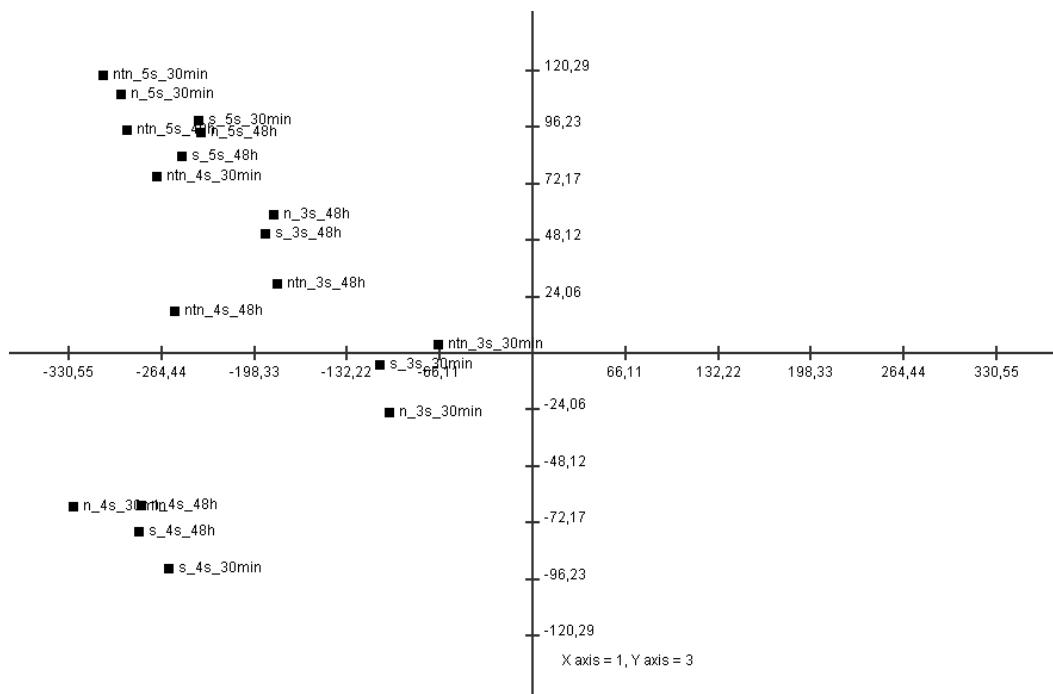


Slika 7: Hierarhično razvrščanje vzorcev različno obdelanih rastlin krompirja različnih serij (horizontalno) in 2-D elektroforetskih lis (vertikalno). Skala predstavlja intenziteto lis, ki sovpada z normaliziranimi vrednostmi relativnih volumnov lis (enačba 2). Sive lise pomenijo odsotnost proteina na gelu.

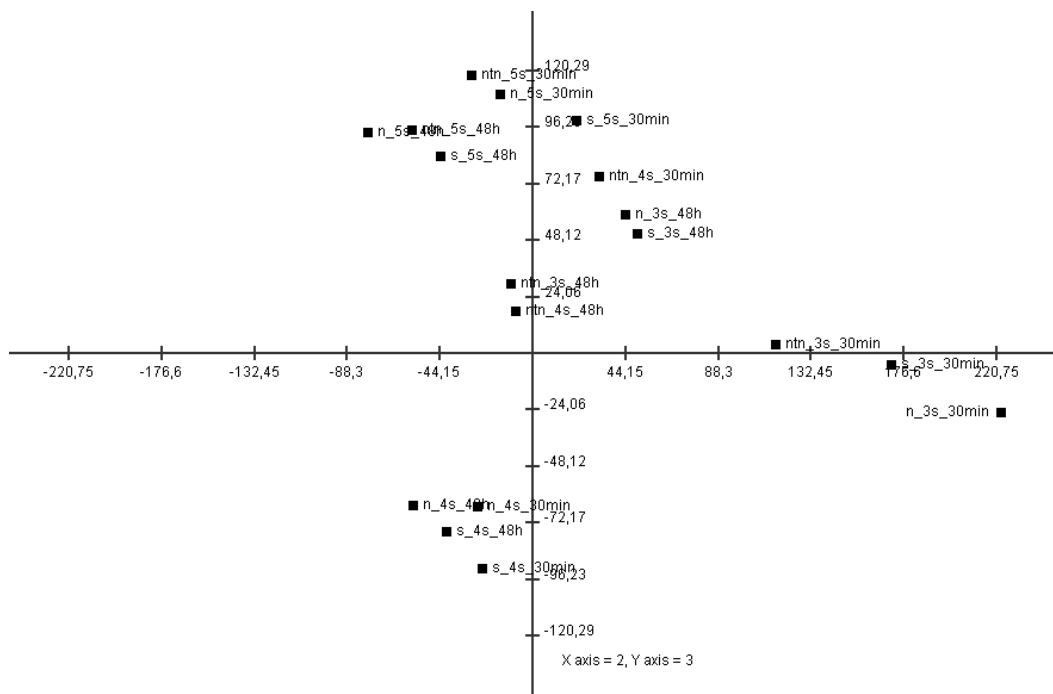
Razlike v proteinskem profilu različnih vzorcev smo matematično ovrednotili z analizo glavnih komponent (PCA) (slika 8). Pri tej metodi skupine ne določimo vnaprej, ampak iščemo komponente, s katerim lahko razložimo največ variabilnosti v danem setu podatkov in ugotavljamo povezave med spremenljivkami (Cankar in sod., 2005).



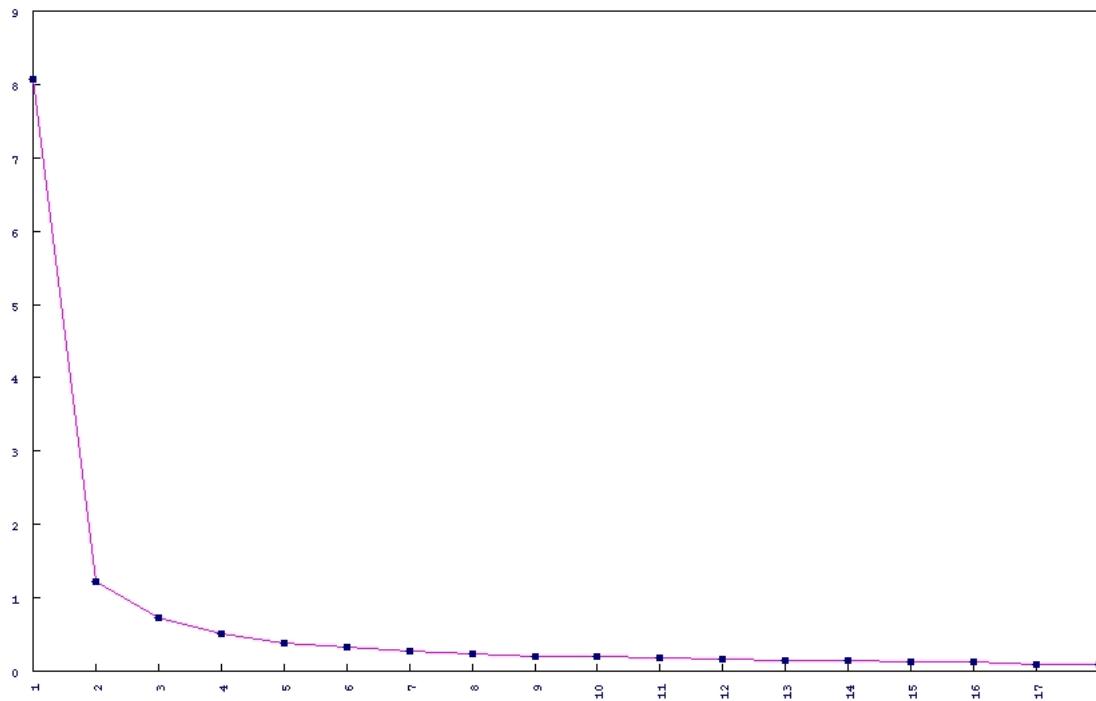
Slika 8.a: Analiza glavnih komponent (PCA): Razvrstitev 2-DE lis različno obdelanih rastlin krompirja različnih serij glede na 1. in 2. komponento PCA.



Slika 8.b: Analiza glavnih komponent (PCA): Razvrstitev 2-DE lis različno obdelanih rastlin krompirja različnih serij glede na 1. in 3. komponento PCA.



Slika 8.c: Analiza glavnih komponent (PCA): Razvrstitev 2-DE lis različno obdelanih rastlin krompirja različnih serij glede na 2. in 3. komponento PCA.



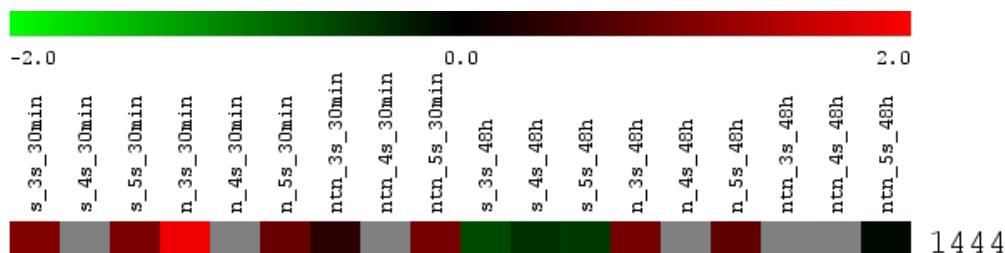
Slika 8.d: Prispevek posameznih komponent PCA k variabilnosti; s prvimi tremi komponentami smo zajeli 76 % vse variabilnosti. Os x: števila posameznih komponent PCA; os y: odstotki prispevanja posamezne komponente.

Analiza glavnih komponent pokaže, da se vzorci na podlagi izbranih lis med sabo ločijo. Najbolj očitno je združevanje vzorcev po serijah ter po času, medtem ko tip okužbe nima zelo izrazitega vpliva. Opazimo lahko tendenco odstopanja vzorcev rastlin, okuženih s PVY^{NTN}.

T-test je statistična metoda za ugotavljanje statistične značilnosti razlike med dvema srednjima vrednostma. Iskali smo proteine, katerih izražanje se v dveh različnih skupinah vzorcev signifikantno razlikuje. Primerjali smo naslednje skupine:

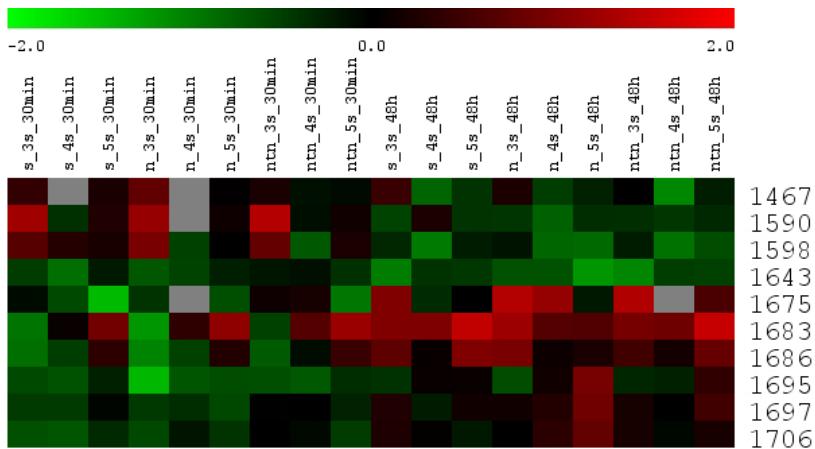
- rastlinski material, pobran po 48 h, slepo okužen in okužen s PVY^N
- rastlinski material, pobran po 48 h, slepo okužen in okužen s PVY^{NTN}
- rastlinski material, pobran po 48 h, okužen s PVY^N in okužen s PVY^{NTN}
- slepo okužen rastlinski material, pobran po 30 min in po 48 h
- rastlinski material, okužen s PVY^N, pobran po 30 min in po 48 h
- rastlinski material, okužen s PVY^{NTN}, pobran po 30 min in po 48 h

Do statistično značilnih razlik v izražanju je prišlo v primeru enega samega proteina s številom ujemanja 1444. Prišlo je do povečanega izražanja omenjenega proteina v rastlinah, okuženih s PVY^N, v primerjavi s slepo okuženimi rastlinami, ki so bile pobrane 48 h po okužbi. Omenjen protein je bil v slepo okuženih rastlinah, pobranih 30 min po okužbi, močneje izražen kot v slepo okuženih rastlinah, pobranih 48 h po okužbi (slika 9).

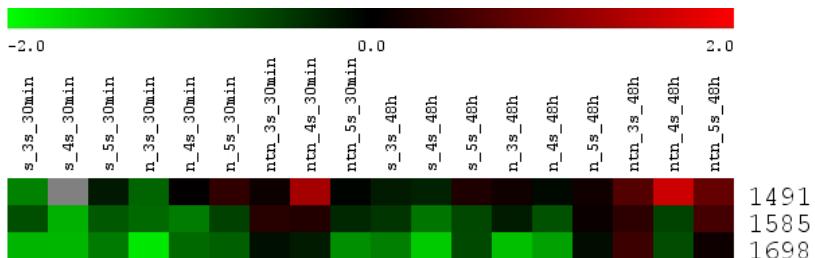


Slika 9: T-test: protein, ki se statistično značilno razlikuje med slepo okuženimi rastlinami in rastlinami, okuženimi s PVY^N, pobranimi 48 h po okužbi, ter med slepo okuženimi rastlinami, pobranimi 30 min in 48 h po okužbi. Skala predstavlja intenziteto lis, ki sovпадa z normaliziranimi vrednostmi relativnih volumnov lis (enačba 2). Sive lise pomenijo odsotnost proteina na gelu.

Naredili smo tudi analizo variance (2 fact ANOVA). Test s 95 % verjetnostjo pokaže proteine, ki se statistično značilno razlikujejo med izbranimi skupinami. Kot prvi dejavnik vpliva smo določili čas pobiranja listov (30 min in 48 h po okužbi), kot drugi dejavnik pa vrsto okužbe (slepa okužba, okužba s PVY^N in okužba s PVY^{NTN}) (slika 10).



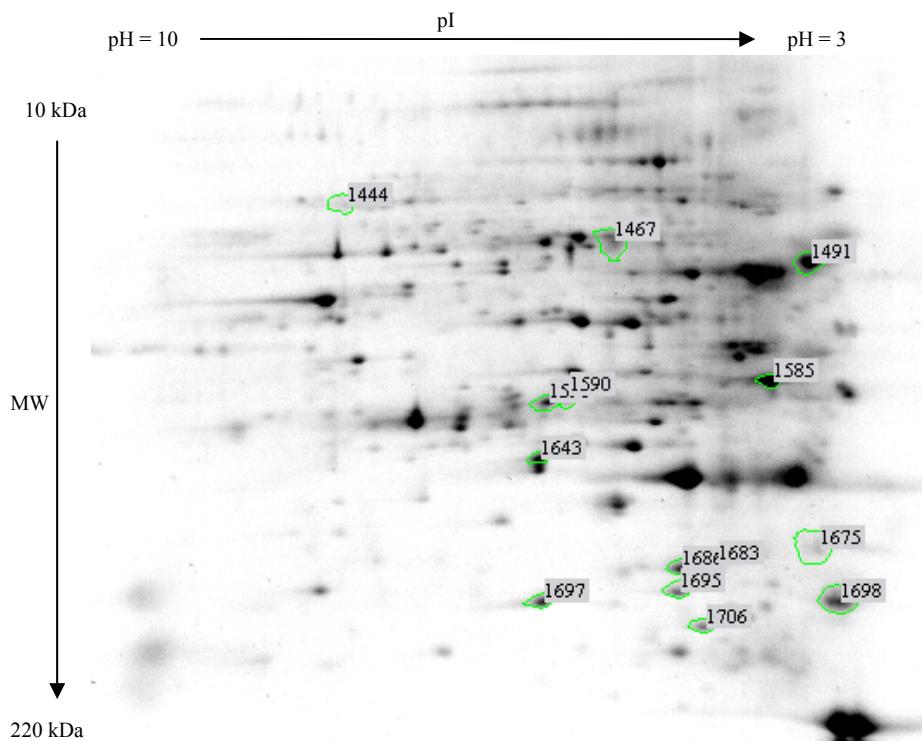
Slika 10.a: Analiza variance (ANOVA): Proteini, ki se statistično značilno razlikujejo glede na čas pobiranja rastlinskega materiala (30 min in 48 h po okužbi). Skala predstavlja intenziteto lis, ki sovпадa z normaliziranimi vrednostmi relativnih volumnov lis (enačba 2). Sive lise pomenijo odsotnost proteina na gelu.



Slika 10.b: Analiza variance (ANOVA): Proteini, ki se statistično značilno razlikujejo med slepo okuženimi rastlinami, rastlinami, okuženimi s PVY^N ter rastlinami, okuženimi s PVY^{NTN}. Skala predstavlja intenziteto lis, ki sovпадa z normaliziranimi vrednostmi relativnih volumnov lis (enačba 2). Sive lise pomenijo odsotnost proteina na gelu.

S slike 10.a lahko razberemo, da je bilo 48 h po okužbi izražanje proteinov 1467, 1590, 1598 in 1643 manjše kot pa 30 min po okužbi. Pri proteinih 1675, 1683, 1686, 1695, 1697 in 1706 pa je po 48 h prišlo do značilnega povečanja izražanja v primerjavi s časom 30 min po okužbi. S slike 10.b je razvidno povečanje izražanja proteinov 1491, 1585 in 1698 30 min in 48 h po okužbi v rastlinah, okuženih PVY^{NTN} v primerjavi s slepo okuženimi rastlinami in rastlinami, okuženimi s PVY^N.

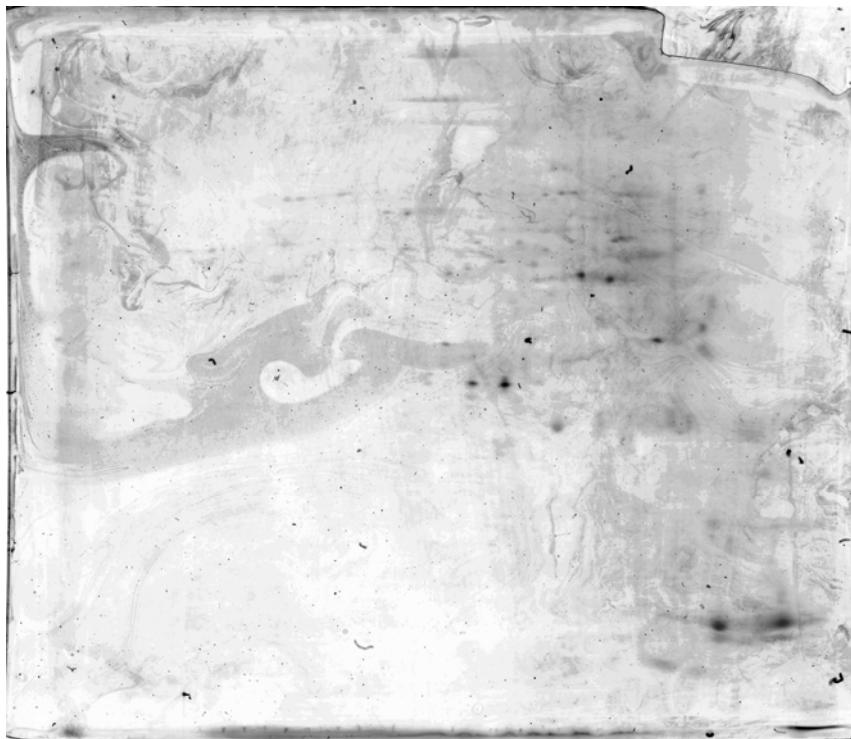
Proteini, za katere smo z uporabljenimi statističnimi metodami (t-test in ANOVA) pokazali statistično značilne spremembe v izražanju, so označeni na sliki 2-DE gela na sliki 11.



Slika 11: Referenčni 2-DE gel z združenimi proteinskimi ekstrakti rastlin krompirja 4. in 5. serije. Z zeleno so označene lise, za katere smo s statističnimi analizami pokazali značilno spremembo izražanja.

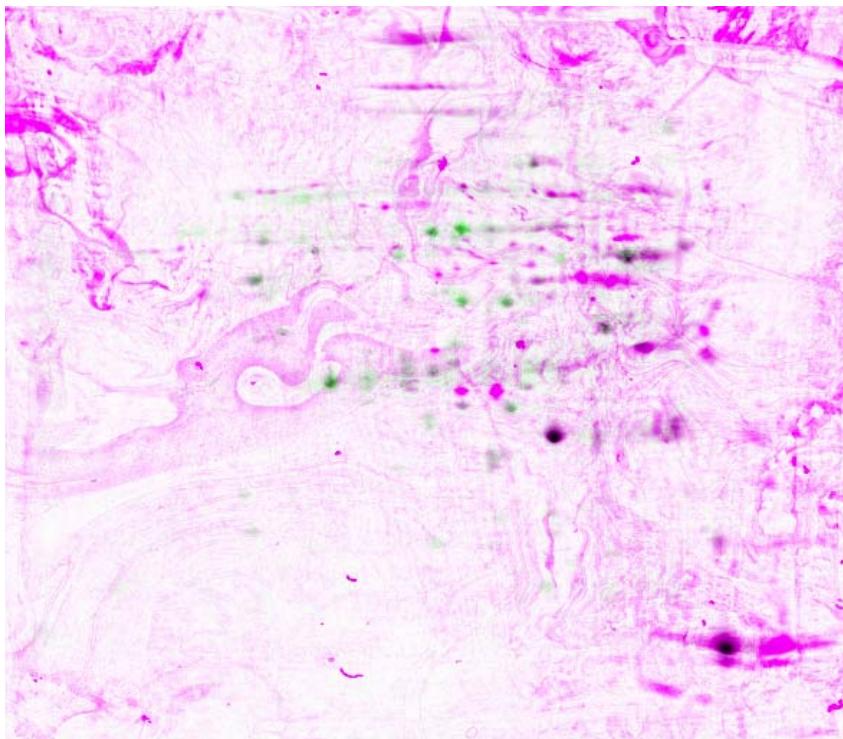
4.4 DETEKCIJA IN ANALIZA FOSFOPROTEINOV

Z barvilom za detekcijo fosfoproteinov Pro-Q Diamond smo barvali gele z vzorci 3. in 4. serije. Pri analizi slike fosfoproteinov nam je težave povzročala visoka obarvanost ozadja, prisotnost nespecifičnih signalov (voda na površini gela, prašni delci) ter v nekaterih primerih šibek signal obarvanih proteinov (slika 12). Programska detekcija lis fosfoproteinov posledično ni bila možna.



Slika 12: Primer 2-DE gela fosfoproteinov rastlin krompirja (S 3.s 30 min).

Slike gelov s fosfoproteini smo analizirali v programu Dymension analysis software. Slike gelov s celokupnimi proteini smo prekrili s slikami gelov s fosfoproteini. Pri prekrivanju so nas ovirali različni formati slik gelov, ker so bile slike posnete z različnimi kamerami (Ettan DIGE Imager in G-BOX:HR). Težavo smo delno odpravili tako, da smo na vsaki sliki ročno obrobili sliko gela in tako določili regijo slike, ki naj jo program uporabi za prekrivanje. Pri prekrivanju je program spodnji gel s celokupnimi proteiniobarval zeleno, zgornji gel s fosfoproteini pa rožnato. Prekrivajoče se lise so se ob tem obarvale črno (slika 13).



Slika 13: Primer prekrivanja 2-DE gela s celokupnimi proteini (obarvan zeleno) z 2-DE gelom s fosfoproteini (obarvan rožnato). Prekrivajoče se lise so obarvane črno.

Zaradi visoke intenzitete ozadja na gelih s fosfoproteini, je bil pri prekrivanju gel s celokupnimi proteini slabo viden, kar je še dodatno otežilo analizo fosfoproteinov izmed celokupnih proteinov. Fosfoproteine, ki smo jih določili, smo primerjali med posameznimi biološkimi skupinami, med različno okuženim rastlinskim materialom ter med rastlinskim materialom, pobranim v različnih časih po okužbi. Vizualno smo zaznali več razlik v fosforilaciji med 3. in 4. serijo kot pa med različno tretiranimi skupinami vzorcev. Zaradi razlikovanja 2-DE profilov celokupnih proteinov 3. in 4. biološke ponovitve in posledično razlikovanja vzorca fosforilacije smo težko sklepali, v katerih primerih pomeni fosforilacija odgovor na virusno okužbo.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Optimizacija ekstrakcije proteinov ter čiščenja proteinskih ekstraktov

Učinkovitost ločitve in identifikacije proteinov v proteomske raziskavah je odvisna od priprave vzorca. Prvi korak pri tem predstavlja učinkovita homogenizacija tkiva. Liste krompirja smo homogenizirali s trenjem v tekočem dušiku, ki minimizira proteolizo in druge načine proteinske razgradnje. Homogenizirane vzorce smo hranili na -80 °C, tekom dela pa smo jih hranili v posodah s tekočim dušikom ter pazili, da ni prišlo do odtajanja. Med postopki ekstrakcije proteinov ter čiščenja proteinskih ekstraktov smo vzorce shranjevali na ledu. Pri 2-DE so bile lise prisotne tudi v zgornjem delu gela, kjer se nahajajo proteini z večjo molekulske maso. Iz tega sklepamo, da z opisanim načinom dela učinkovito preprečimo proteolizo ter da dodatek proteaznih inhibitorjev ni potreben.

Za pripravo vzorca za 2-DE smo stremeli k uporabi enostavne in hitre metode, ki je ustrezna za pripravo večjega števila vzorcev in s katero bi se izognili večjim izgubam proteinov. Pri ekstrakciji proteinov smo bili omejeni na uporabo pufrov brez vsebnosti kaotropnih ionov in detergentov, ki bi poškodovali specifična protitelesa v koloni za odstranjevanje encima rubisko. Za najbolj učinkovito ekstrakcijo proteinov se je v našem primeru izkazala ekstrakcija s pufrom Tris (Vilhar, 1996) z dodatkom 1 % PVPP, ki je učinkovit pri odstranjevanju fenolnih komponent (Wang in sod., 2006).

Nadaljnji korak v pripravi vzorca je bilo odstranjevanje encima rubisko z uporabo imunoafinitetne kromatografije. Učinkovitost metode je bila razvidna tako iz slik gelov SDS-PAGE in 2-DE kot tudi iz merjenja koncentracije proteinov, ki se je po uporabi kolone vsaj 2-krat zmanjšala. Takšno zmanjšanje koncentracije proteinov je poleg odstranitve encima rubisko tudi posledica hkratne odstranitve nekaterih nečistoč, ki

reagirajo z Bradfordovim reagentom in podajajo lažne rezultate o koncentraciji proteinov. Posledično smo dodatno uvedli koncentriranje proteinskih ekstraktov, da smo dobili želeno količino proteinov za nanos na 2-DE. Po 19. ciklih čiščenj z uporabo imunoafinitetne kromatografije ni prišlo do upada kapacitete in specifičnosti vezanih protiteles. Na slikah 2-DE gelov namreč nismo zaznali proteina rubisko, ki se na gelih pogosto pojavlja kot široka razpotegnjena črta in ne kot lisa.

Preizkusili smo tri načine čiščenja proteinskih ekstraktov:obarjanje z acetonom, obarjanje s TCA ter čiščenje z uporabo komercialno dostopnega kompleta »2-D Clean-Up Kit«. Vsi postopki temeljijo na principu obarjanja proteinov in odstranjevanja motečih snovi, kot so soli, detergenti, lipidi in nukleinske kisline, ki bi sicer interferirale z izoelektričnim fokusiranjem. Pri obarjanju se proteini koncentrirajo, poleg tega pa se inaktivirajo komponente, ki sodelujejo v razgradnji proteinov. Pri precipitaciji proteinov s TCA ali z acetonom se pogosto srečujemo s težavami ponovnega raztplavljanja proteinov (Agrwal in sod., 2005), s čimer smo se soočili tudi v našem primeru. Posledično smo se odločili za čiščenje s kompletem »2-D Clean-Up Kit«. Pri uporabi kompleta »2-D Clean-Up Kit« nismo imeli težav z raztplavljanjem precipitiranih proteinov, nasprotno pa je v nekaterih primerih prihajalo do razpadanja peleta in posledično do izgub proteinov. Temu bi se morebiti lahko izognili s podaljševanjem časa centrifugiranja in centrifugalne sile, dokler se ne bi pojavile težave z raztplavljanjem peleta.

5.1.2 Analiza proteinskega profila v listih rastlin krompirja sorte 'Igor' po okužbi s PVY^N in PVY^{NTN}

Program ImageMaster 2D Platinum je primerjal vseh 18 slik gelov glede na referenčni gel hkrati, vendar je bilo pri velikem številu ujemanj lis potrebno uvesti ročne popravke. V poročilu o ujemanju lis nam je program podal relativne volumne lis posameznih ujemanj, ki smo jih nadalje normalizirali in statistično obdelali.

Kot že ob pregledu slik gelov smo tudi iz diagrama hierarhičnega razvrščanja v nasprotju s pričakovanji razbrali večje razlike med različnimi serijami kot pa med različno obdelanimi

rastlinami oziroma med rastlinami, pobranimi ob različnih časih. Tudi iz razvrstitve vzorcev glede na posamezne komponente pri analizi glavnih komponent (PCA) je bilo opazno združevanje vzorcev po serijah, poleg tega pa tudi po času pobiranja vzorcev (30 min in 48 h), kar pomeni, da na sestavo proteoma lahko vpliva tudi dnevni ritem rastlin. V obeh primerih pa smo lahko opazili tendenco odstopanja vzorcev rastlin, okuženih s PVY^{NTN}. To sovpada z dejstvom, da PVY^{NTN} na rastlinah krompirja sorte 'Igor' v primerjavi s PVY^N povzroča hujša bolezenska znamenja.

Iz diagrama hierarhičnega razvrščanja je bila razvidna večja podobnost 4. in 5. serije, medtem ko je 3. najbolj odstopala. Odstopanje 3. serije je lahko sezonsko pogojeno, saj je bila ta serija gojena spomladji, (material je bil pobran v mesecu juniju), medtem ko sta bili 4. in 5. serija gojeni jeseni (material je bil pobran v mesecu oktobru oziroma novembру). Razlikovanje med jesenskimi in spomladanskimi rastlinami krompirja sorte 'Igor' so zaznali tudi Milavec in sod. (1999). Rastline so se morfološko razlikovale, poleg tega so imele jesenske rastline nižjo vsebnost fotosintetskih pigmentov. Po okužbi s PYV^{NTN} je bilo znižanje nivoja pigmentov v jesenskih rastlinah bolj izrazito kot v spomladanskih, iz česar so sklepali, da so rastline z manj pigmenti bolj občutljive na različne vrste stresa.

V raziskavo smo vključili 3 biološke ponovitve, da bi dobili čim bolj celosten vpogled v zgodnji odgovor rastlin na virusno okužbo, vendar se je na proteomu rastlin močneje odražala rastna sezona kot virusna okužba, posledično so razlike med biološkimi ponovitvami oteževale primerjavo vzorcev. Zaradi takšnih raznolikosti bi lahko ločeno obravnavali vpliv virusne okužbe na rastline, gojene v različnih sezонаh. Vplivu rastnih razmer pa bi se verjetno najbolj izognili, če bi kot rastlinski material uporabili rastlinske celične suspenzije kot Ventelon-Debout in sod. (2004), ki so preučevali proteom rastlin riža (*O. sativa indica* in *O. sativa japonica*) ob okužbi z RYMV.

S t-testom smo določili statistično značilno spremembo izražanja enega samega proteina s številom ujemanja 1444. Prišlo je do povečanja relativne zastopanosti omenjenega proteina 48 h po okužbi s PVY^N ter do zmanjšanja relativne zastopanosti v slepo okuženih rastlinah 48 h po okužbi. Analiza variance je pokazala statistično značilno spremembo izražanja 13 proteinov. Od tega se je 48 h po okužbi izražanje 4 proteinov v vseh rastlinah zmanjšalo ter

šestih proteinov povečalo. Relativna zastopanost 3 proteinov pa se je povečala v rastlinah, okuženih s PVY^{NTN} 30 min in 48 h po okužbi v primerjavi s slepo okuženimi rastlinami in rastlinami, okuženimi s PVY^N. Spremembe izražanja proteinov, ki so se zgodile v vseh rastlinah, so lahko posledica mehanske inokulacije rastlin ali njihovega dnevnega ritma. Ostali proteini, ki so kazali spremenjen nivo izražanja, pa bi bili zanimivi za nadaljnjo identifikacijo, saj so spremembe njihovih relativnih zastopanosti del odgovora rastline na virusno okužbo.

Kot raziskovalni material smo uporabili celotne slepo in z virusom inokulirane liste. To nam je omogočalo vpogled v povprečni odgovor celotnega lista na okužbo. Spremembe, ki se dogajajo v okuženih listih, pa glede na kraj virusne okužbe variirajo tudi po regiji lista. Večina hitrih odgovorov se vrši na mestih, kjer virus vstopa v celice in se kasneje razvijejo lokalne lezije (Pompe Novak in sod., 2006). Mest lokalnih lezij zgodaj po virusni okužbi ne moremo določiti, več sprememb v izražanju proteinov pa bi lahko zaznali, če bi proteom listov krompirja razdelili na subproteome. V tem primeru bi proteine izolirali iz različnih celičnih kompartimentov ali pa glede na njihovo relativno topnost in jih nato ločeno analizirali. Ločitev proteinov bi lahko izboljšali tudi z uporabo IPG-trakov z ozkimi razponi pH gradientov (Cellini in sod., 2004)

Pri analizi fosfoproteinov, ki smo jih detektirali z barvilom Pro-Q Diamond, nam je težave povzročala visoka obarvanost ozadja ter prisotnost nespecifičnih signalov. Postopek barvanja gelov bi lahko še podaljšali in s tem povečali signal, s podaljšanjem razbarvanja pa bi zmanjšali obarvanost ozadja.

Zaradi težav pri prekrivanju gelov smo težko določili, kateri proteini izmed celokupnih so fosforilirani. V nekaterih primerih so fosfoproteini oddajali močan signal, na gelih s celokupnimi proteini pa zelo šibek signal, ki ga program ImageMaster 2D Platinum ni zaznal kot liso. To je lahko posledica različnih mej detekcij barvil Sypro Ruby (1 – 10 ng proteinov/ liso) in Pro-Q Diamond (1 – 16 ng proteinov/liso). Pri pregledu slik prekritih gelov smo zaradi razlik med 3. in 4. serijo in težav s prekrivanjem gelov težko sklepali, da je fosforilacija proteinov v nekaterih primerih dejansko posledica odgovora rastline na virusno okužbo.

5.2 SKLEPI

- Pokazali smo učinkovitost metode odstranjevanja encima rubisko z uporabo imunoafinitetne kromatografije.
- Metode, ki smo jih uporabili v raziskavi, so nam omogočile detekcijo do 532 proteinskih lis na gel.
- Program ImageMaster 2D Platinum omogoča istočasno primerjavo večjega števila gelov, kljub temu je rezultate ujemanj potrebno pregledati in v nekaterih primerih uvesti ročne popravke.
- Uporabljeni metodi dela in programska oprema so nam omogočile izboljšano analizo slik 2-DE gelov, saj smo v analizo lahko vključili v povprečju 324 lis na gel.
- Na proteomu rastlin se v zgodnjih časih po virusni okužbi močneje odraža vpliv rastne sezone kot pa virusna okužba. Razlike med biološkimi ponovitvami so otežile programsko obdelavo gelov.
- S statističnimi metodami smo pokazali statistično značilne spremembe v izražanju 14 proteinov. 10 od teh je kazalo spremembe glede na čas pobiranja rastlinskega materiala (30 min oziroma 48 h), 4 pa glede na tip okužbe (slepo okužene rastline in rastline, okužene s PVY^N oziroma PVY^{NTN}). Slednje bomo tekom nadaljnjega dela poskušali identificirati z uporabo MS.
- Razdelitev proteoma listov rastline na subproteome ali uporaba več IPG-trakov z ožjimi pH gradienti bi omogočila detekcijo več sprememb v izražanju proteinov v zgodnji fazici virusne okužbe.
- Z nanosom večje mase proteinov na 2-DE bi na gelih zaznali večje število lis.
- Za izboljšanje detekcije fosfoproteinov je potrebna nadaljnja optimizacija metode.

6 POVZETEK

V sklopu obrambnega odgovora rastline na virusno okužbo pride do sprememb izražanja večjega števila genov. Sinteza proteinov je nadalje odvisna od posttranskripcijskega procesiranja, posttranslacijske modifikacije pa odločajo o aktivnosti proteinov. Izmed posttranslacijskih modifikacij igra fosforilacija glavno vlogo v odgovoru rastline na okužbo s povzročiteljem bolezni. Za razumevanje interakcije med rastlino in povzročiteljem bolezni je najbolj zanimiv zgodnji odgovor rastline na okužbo, ki predstavlja dejanski obrambni odgovor in ne zgolj patološko reakcijo rastline na prisotnost virusa. Poznavanje obrambnega odgovora rastline na virusno okužbo bi omogočilo razvoj učinkovitega načina zaščite rastlin.

V diplomskem delu smo preučevali spremembo proteoma listov krompirja *Solanum tuberosum* L. sorte 'Igor' po okužbi s krompirjevim virusom PVY^N in PVY^{NTN} v časih 30 min in 48 h po okužbi. Proteinski profil smo preučevali z 2-DE, ki je primerna za ločevanje kompleksne mešanice proteinov ter omogoča analizo celotnega kompleta izraženih proteinov in posttranslacijskih modifikacij v izbranem tkivu v določenem času. V sklopu priprave vzorca za 2-DE smo uporabili imunoafinitetno kromatografijo za odstranjevanje visoko zastopanega encima rubisko. Z uporabo optimiziranega postopka ekstrakcije proteinov in čiščenja proteinskih ekstraktov smo na 2-DE gelih s programsko opremo ImageMaster 2D Platinum po optimizaciji parametrov detekcije detektirali v povprečju 324 proteinov na gel, ki smo jih nadalje analizirali s statističnimi metodami.

Rezultati analiz z različnimi statističnimi metodami kažejo na večje razlike med biološkimi ponovitvami kot pa med skupinami enako tretiranih rastlin, razvidno pa je bilo tudi združevanje vzorcev glede na čas pobiranja rastlinskega materiala (30 min in 48 h po okužbi). Razlike med biološkimi ponovitvami so otežile primerjavo vzorcev, kljub temu pa smo zaznali statistično značilno spremembo izražanja 14 proteinov. Od teh jih je 10 kazalo spremenjen nivo izražanja v vseh rastlinah 48 h po okužbi v primerjavi s 30 min po okužbi, kar je lahko posledica mehanske inokulacije ali odraz dnevnega ritma rastlin. 4 proteini pa

so kazali spremembe izražanja v različno okuženih rastlinah in lahko sodelujejo v odgovoru rastline na okužbo.

Analizirali smo tudi fosfoproteine, ki smo jih na 2-DE gelih detektirali z barvilom Pro-Q Diamond. Visoka obarvanost ozadja ter prisotnost nespecifičnih signalov sta nam onemogočila programsko detekcijo lis, zaradi raznolikosti bioloških ponovitev pa ni bilo možno sklepati, v katerem primeru je fosforilacija lahko posledica odgovora na virusno okužbo.

7 VIRI

Agrwal G.K., Yonekura M., Iwahashi Y., Iwahashi H., Rakwal R. 2005. Systems, trends and perspectives of proteomics in dicot plants part I: Technologies in proteome establishment. *Journal of Chromatography B*, 815: 109-123

Baebler Š. 2006. Izražanje genov pri občutljivi in odporni sorti krompirja (*Solanum tuberosum* L.) v zgodnjem odzivu na okužbo s krompirjevim virusom Y^{NTN}. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 109 str.

Birch P.R.J., Kamoun S. 2000. Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions. V: New technologies for life sciences: a trends guide. Wood R. (ed.). New York, Elsevier Science: 77-82

Brizard J.P., Carapito C., Delalande F., Van Dorsselaer A., Brugidou C. 2006. Proteome analysis of plant-virus interactome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5: 2279-2297

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254

Cankar K., van Dijk J., Gruden K., Blejec A., McNicol J., Kok E. 2006. Pristop k analizi mikromrež – uporaba na področju varnosti hrane. *Informatica Medica Slovenica*, 11, 1: 34-39

Carpentier S.C., Witters E., Laukens K., Deckers P., Swennen R., Panis B. 2005. Preparations of protein extracts from recaltritant 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.R., Kärenlampi S., Kok E.J., Leguay J.-J., Lehesranta S., Noteborn H.P.J.M., 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 a virus-resistant tomato. *Proteomics*, 4: 193-200

de Bokx J.A., Huttinga H. 1981. Potato virus Y. Wageningen, Research Institute for Plant Protection. (July 1981)

<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=242> (4. sept. 2008): 11 str.

Dermastia M., Ravnikar M., Kovač M. 1995. Increased cytokinin-9-glucosylation in roots of susceptible *Solanum tuberosum* cultivar infected by potato virus Y^{NTN}. American Phytopathological Society, 8, 2: 327-330

Gallagher S.R. 2006. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. V: Current protocols in molecular biology. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Smith J.A., Seidman J.G., Struhl K. (eds.). New York, John Wiley & Sons: 10.2A.1-10.2A.14

GE Healthcare. 2004. 2-D electrophoresis principles and methods. Little Chalfont, GE Healthcare.

[https://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/2A3643B6787885E0C12570BE000DC671/\\$file/80642960.pdf](https://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/2A3643B6787885E0C12570BE000DC671/$file/80642960.pdf) (15. avg. 2008): 168 str.

GE Healthcare. 2005. ImageMaster 2D Platinum 6.0 user manual. Uppsala, GE Healthcare.

http://www.tm.mahidol.ac.th/en/tmcl/2d_gel_electrophoresis/image_master_2d_platinum6_user_manual.pdf (15. avg. 2008): 300 str.

Gruden K., Štrukelj B., Ravnikar M., Herzog-Velikonja B. 2000. A putative viral resistance-connected protein isolated from potato cultivar sante resistant to PVY^{NTN} infection. Phyton, 40, 1: 191-200

Gygi S.P., Rochon Y., Franzia B.R., Aebersold R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Molecular and Cellular Biology, 19, 3: 1720-1730

Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. Plant Cell, 8: 1773-1791

Huang L., Harvie G., Feitelson J.S., Gramatikoff K., Herold D.A., Allen D.L., Amunngama R., Hagler R.A., Pisano M.R., Zhang W.-W., Fang X. 2005. Immunoaffinity separation of plasma proteins by IgY microbeads: Meeting the needs of proteomic sample preparation and analysis. Proteomics, 5: 3314-3328

Huib J.M., Linthorst H.J.M. 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. Critical Reviews in Plant Sciences, 10: 123-236

Invitrogen. 2005. Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain. Carlsbad, Invitrogen (9. avg. 2005)
http://www.interactivebioscience.cz/admin/_docs/protokol%20-%20Invitrogen%20ProQ%20Phosphoprotein%20Gel%20Staining.pdf (28. avg. 2008): 8 str.

Issaq H.J., Veenstra T.D. 2008. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. BioTechniques, 44: 697-700

Kerlan C. 2006. Potato virus Y. Le Rheu, INRA-Agrocampus Rennes. (october 2006)
<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414> (4.sept. 2008): 36 str.

Križaj I. 2008. Metode za analizo proteoma. V: Proteomika. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 31. jan. in 1. feb. 2008.

Raspor P., Jamnik P. (ur). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo:
19-31

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

Kus M. 1994. Krompir. Ljubljana, ČGP Kmečki glas: 225 str.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
bacteriophage T4. Nature, 227, 15: 680-685

Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaria P., Darnell J. 1995.
Molecular cell biology. 3rd ed. New York, Scientific American Books: 1344 str.

Matthews R.E.F. 1992. Fundamentals of plant virology. San Diego, New York, Boston,
London, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press: 403 str.

Merril C.R. 1987. Detection of proteins separated by electrophoresis. Advances in
Electrophoresis, 1:111-137

Milavec M., Kovač M., Ravnikar M. 1999. Photosynthetic pigments in potato plants
(*Solanum tuberosum* L.) cv. 'Igor' after primary infection with potato virus Y^{NTN}.
Phyton, Special issue: »Plant Physiology«, 39, 3: 265-269

Milavec M., Ravnikar M., Kovač M. 2001. Peroxidases and photosynthetic pigments in
susceptible potato infected with potato virus Y^{NTN}. Plant Physiology and
Biochemistry, 39: 891-898

Nelson D.L., Cox M.M. 2004. Lehninger principles of biochemistry. 4th ed. New
York, W. H. Freeman & Co.: 1136 str.

Peck S.C. 2003. Early phosphorylation events in biotic stress. Current Opinion in Plant Biology, 6: 334-338

Pompe-Novak M. 2002. Razlike med izražanju genov med zdravimi in s krompirjevim virusom Y^{NTN} okuženimi rastlinami krompirja (*Solanum tuberosum* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 240 str.

Pompe-Novak M., Gruden K., Baebler Š., Krečič-Stres H., Kovač M., Jongsma M., Ravnikar M. 2006. Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). Physiological and Molecular Plant Pathology, 67: 237-247

Rovere C.V., del Vas M., Hopp H.E. 2002. RNA-mediated virus resistance. Current Opinion in Biotechnology, 13, 2: 167-172

Sasse J., Gallagher S.R. 2003. Detection of proteins. V: Current protocols in molecular biology. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Smith J.A., Seidman J.G., Struhl K. (eds.). New York, John Wiley & Sons: 10.6.1-10.6.25

Seed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. 2003. TM4: a free, open source system for microarray data management and analysis. Biotechniques, 34, 2: 374-8.

http://www.tm4.org/documentation/TM4_Biotechniques_2003.pdf (28. avg. 2008): 4 str.

Soosaar J.L., Burch-Smith T.M., Dinesh-Kumar S.P. 2005. Mechanisms of plant resistance to viruses. Nature Reviews Microbiology, 3, 10: 789-798

Stasyk T., Hellman U., Souchelnytskyi S. 2001. Optimizing sample preparation for 2-D electrophoresis. Life Science News: Amersham Biosciences, 9: 1-4

Thurston G., Regan S., Rampitsch C., Xing T. 2005. Proteomic and phosphoproteomic approaches to understand plant-pathogen interactions. Physiological and Molecular Plant Pathology, 66: 3-11

Urcuqui-Inchima S., Haenni A.L., Bernardi F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. Virus Research, 74: 157-175

Ventelon-Debout M., Delalande F., Bizard J.P., Diemer H., Van Dorsselaer A., Brugidou C. 2004. Proteome analysis of cultivar-specific deregulations of *Oryza sativa indica* and *O. sativa japonica* cellular suspensions undergoing *Rice yellow mottle virus* infection. Proteomics, 4; 216-225

Vilhar B. 1996. Jasmonska kislina kot regulator morfoloških in biokemijskih sprememb rastlin krompirja v tkivni kulturi. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 135 str.

Walker J.M. 1996. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. V: The protein protocols handbook. Walker J.M. (ed.). Totowa, New Jersey, Humana Press: 55-61

Wang W., Vignani R., Scali M., Cresti M 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomics analysis. Electrophoresis, 27: 2782-2786

Xi J., Wang X., Li S., Zhou X., Yue L., Fan J., Hao D. 2006. Polyethylene glycol fractionation improved detection of low-abundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of plant proteome. Phytochemistry, 67: 2341-2348

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Maji Ravnikar, da mi je omogočila izvedbo diplomskega dela, ter za strokovne popravke diplomske naloge.

Posebna zahvala je namenjena doc. dr. Kristini Gruden in somentorici doc. dr. Poloni Jamnik. Doc. dr. Kristini Gruden se lepo zahvaljujem za vodenje, številne nasvete in pomoč tekom diplomskega dela; tako rekoč za mentorstvo. Hvala tudi za hiter in temeljit pregled diplomske naloge. Asist. dr. Poloni Jamnik iskrena hvala za zavzeto vodenje eksperimentalnega dela, za stalno pripravljenost pomoči in vzpodbudne besede.

Za recenzijo diplomske naloge se zahvaljujem prof. dr. Marini Dermastji.

Poloni Kogovšek in Katji Barle se zahvaljujem za uvedbo in pomoč pri laboratorijskem delu ter za pripravljenost odgovarjati na vprašanja.

Hvala mojemu fantu Marjanu za spodbudo in moralno podporo, hvala moji sestri Darji za nasvete. Predvsem pa hvala mojim staršem, da so mi stali ob strani in me spodbujali vsa leta študija.