

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Vita PRESKAR

**PRIMERJALNA PROTEOMSKA ANALIZA
SEKRETOMA BLAGEGA IN LETALNEGA
PATOTIPA FITOPATOGENE GLIVE *Verticillium
albo-atrum***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Vita PRESKAR

**PRIMERJALNA PROTEOMSKA ANALIZA SEKRETOMA
BLAGEGA IN LETALNEGA PATOTIPA FITOPATOGENE GLIVE
*Verticillium albo-atrum***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARATIVE PROTEOMIC ANALYSIS OF THE MILD AND
LETHAL PATHOTYPE OF THE PHYTOPATHOGENIC FUNGUS
Verticillium albo-atrum SECRETOM**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je nastalo kot zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalno delo je bilo opravljeno na Oddelku za Agronomijo, Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Po sklepu komisije za dodiplomski študij Oddelka za biotehnologijo z dne 8.6.2011 je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Branka Javornik in za somentorja dr. Stanislav Mandelc.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Borut BOHANEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za
agronomijo

Članica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za
agronomijo

Član: asist. dr. Stanislav MANDELČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za
agronomijo

Članica: doc. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 20.6.2012

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

Vita Preskar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.12:633.791:631.524:581.2(043.2)
KG	proteomika/hmeljeva uvelost/ <i>Verticillium albo-atrum</i> /analiza proteinov
KK	AGRIS F60/H20
AV	PRESKAR, Vita
SA	JAVORNIK, Branka (mentor) / MANDELIC, Stanislav (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2012
IN	PRIMERJALNA PROTEOMSKA ANALIZA SEKRETOMA BLAGEGA IN LETALNEGA PATOTIPA FITOPATOGENE GLIVE <i>Verticillium albo-atrum</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 41, [5] str., 3 pregl., 7 sl., 3 pril., 47 vir.
IJ	sl
JI	sl/ en
AI	Vaskularna uvelost, ki jo povzroča talni fitopatogen <i>Verticillium albo-atrum</i> je ena izmed najbolj razširjenih in uničujočih bolezni hmelja. <i>V. albo-atrum</i> v procesu patogeneze uporablja številne ekstracelularne proteine, ki so pogosto odločilnega pomena za uspeh okužbe rastline. Cilj diplomske naloge je bil primerjava sekretomov blagega in letalnega patotipa <i>V. albo-atrum</i> z uporabo dvodimenzionalne diferenčne elektroforeze in masne spektrometrije. Vzorce sekretomov dveh patotipov glive <i>V. albo-atrum</i> smo pridobili z gojenjem le te v pogojih, ki simulirajo hranilno vrednost okolja v okuženi rastlini. Z bioinformacijskimi analizami smo identificirali 118 proteinskih list, med katerimi jih je bilo 35 z višjo stopnjo izražanja v PG1 in 83 v PG2. Identificiranih je bilo skupno 45 različnih proteinov, 26 pri letalnem patotipu in 14 pri blagem. Pri letalnemu izolatu smo identificirali večino vseh proteinov kot tudi pomembne encime, ki sodelujejo pri razgradnji komponent rastlinske celične stene. Pri blagem izolatu je izstopala predvsem visoka koncentracija pektat liaze, ki je edini encim, ki sodeluje v procesu mehčanja rastlinske celične stene. Glede na dobljene rezultate identificiranih proteinov in njihovih koncentracij lahko zaključimo, da obstaja ključna razlika med letalnim in blagim sevom <i>V. albo-atrum</i>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDK 577.12:633.791:631.524:581.2(043.2)

CX proteomics/hop wilt/*Verticillium albo-atrum*/protein analysis

CC AGRIS F60/H20

AU PRESKAR Vita

AA JAVORNIK Branka(supervisor) / MANDELIC, Stanislav (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Program in Biotechnology

PY 2012

TI COMPARATIVE PROTEOMIC ANALYSIS OF THE MILD AND LETHAL PATHOTYPE OF THE PHYTOPATHOGENIC FUNGI *Verticillium albo-atrum* SECRETOM

DT Graduation thesis (university studies)

NO XI, 41, [5] p., 3 tab., 7 fig., 3 ann., 47 ref.

LA sl

AL sl/ en

AB Vascular wilt disease caused by phytopathogenic *Verticillium albo-atrum* is one of the most common diseases of hops. In the pathogenesis process *V. albo-atrum* uses a number of extracellular proteins, which are often critical to the success of infecting the plants. The goal of this study was to compare secretoms of mild and lethal *V. albo-atrum* pathotype using differential two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Samples of the *V. albo-atrum* secretomes were obtained by growing the fungi in conditions simulating the nutritional quality of the environment in the infected plant. With bioinformatic analysis, we identified 118 protein spots, of which 35 were characterized in higher levels of expression in PG1 and 83 in PG2. We have identified a total of 45 different proteins, 26 belonging to the lethal pathotype and 14 to the mild. Majority of proteins identified in the lethal isolate were important enzymes involved in breaking down the plant cell walls components. High concentrations of pectates lyase were identified in mild pathotype, which stood out as it is the only enzyme involved in the process of softening plant cell walls identified in this pathotype. According to the results of identified proteins and their concentrations we can conclude, that there is a significant difference between mild and lethal strain of *V. albo-atrum*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	V
KAZALO VSEBINE.....	VI
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 FITOPATOGENA GLIVA <i>Verticillium albo-atrum</i>	3
2.1.1 Taksonomija in morfologija	3
2.1.2 Fitopatogenost glive <i>Verticillium albo-atrum</i>.....	4
2.2 METODE V PROTEOMIKI	5
2.2.1 Dvodimenzionalna elektroforeza.....	5
2.2.1.1 Izoelektrično fokusiranje.....	6
2.2.1.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata.....	7
2.2.1.3 Dvodimenzionalna diferenčna gelska elektroforeza	7
2.2.2 Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo	9
2.2.3 Bioinformacijska orodja	11
2.3 PROTEOMSKE RAZISKAVE PATOGENIH GLIV	12
3 MATERIAL IN METODE.....	16
3.1 IZOLATI GLIVE <i>Verticillium albo-atrum</i> IN PRIDOBIVANJE SPOR.....	16
3.2 GOJENJE GLIVE <i>Verticillium albo-atrum</i>	16
3.2.1 Priprava gojišča SXM	16
3.2.2 Nacepljanje glive <i>Verticillium albo-atrum</i>	17
3.3 PRIPRAVA VZORCA SEKRETOMA.....	17

3.4	MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV	17
3.5	LOČEVANJE PROTEINOV Z DVODIMENZIONALNO DIFERENČNO GELSKO ELEKTROFOREZO (2-D DIGE)	18
3.5.1	Priprava vzorcev.....	18
3.5.2	Dvodimenzionalna diferenčna gelska elektroforeza.....	19
3.6	SLIKANJE GELOV IN PREGLED REZULTATOV	20
3.7	IDENTIFIKACIJA PROTEINOV Z MASNO SPEKTROMETRIJO	21
4	REZULTATI	24
4.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV	24
4.2	ANALIZA SLIK GELOV	24
4.3	IDENTIFIKACIJA PROTEINOV Z MASNO SPEKTROMETRIJO	26
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	32
5.1	RAZPRAVA	32
5.2	SKLEPI.....	34
6	POVZETEK.....	36
7	VIRI.....	37
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Potrebne količine snovi za pripravo 12,5 % poliakrilamidnega gela	22
Preglednica 2: Izmerjene koncentracije in izračunani volumni sekretomskih vzorcev izolatov PG1 in PG2.	24
Preglednica 3: Vsi identificirani proteini ($p \leq 0,01$)	29

KAZALO SLIK

Slika 1: Trajni micelij <i>V. albo-atrum</i> in konidiofore <i>V. albo-atrum</i>	3
Slika 2: Geli z imobiliziranim gradientom pH (24 cm, pH 7-11)	6
Slika 3: Princip delovanja 2-D DIGE	8
Slika 4: Grafični prikaz analize PCA slovenskih izolatov PG1 in PG2	25
Slika 5: Prikaz hierarhične analize slovenskih izolatov PG1 in PG2 glede na stopnjo izražanja.....	26
Slika 6: Proteinski profil sekretoma glive <i>V. albo-atrum</i> , sev PG1	27
Slika 7. Proteinski profil sekretoma glive <i>V. albo-atrum</i> , sev PG2.....	27

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Dodatni podatki o identificiranih proteinih v *Verticillium albo-atrum*.

PRILOGA B: Preglednica združenih vzorcev posameznih izolatov glede na gel.

PRILOGA C: Umeritvena krivulja za izračun koncentracije proteinov v vzorcu.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2-DE	dvodimenzionalna elektroforeza
2-D DIGE	dvodimenzionalna diferenčna gelska elektroforeza
BVA	analiza biološke variabilnosti
DIA	diferenčna analiza gelov
DMF	dimetilformamid
DTT	ditiotreitol
EDA	razširjena analiza podatkov
ESI	izoelektrično fokusiranje
IPG	imobiliziran pH-gradient
MALDI	ionizacija v matriksu z desorpcijo z laserjem
MS	masna spektrometrija
MS/MS	tandemska masna spektrometrija
Mw	molekulska masa
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
pI	izoelektrična točka
RGAE	ramnogalakturonan acetilesteraza
RG-aze	ramnogalakturonaze
SDS	natrijev dodecilsulfat
SXM	simulirano ksilemsko gojišče

1 UVOD

Vaskularna uvelost, ki jo povzročajo talni patogeni, je ena izmed najbolj razširjenih in uničujočih bolezni rastlin. Patogen okuži žilni sistem rastline, kar predstavlja velik problem, saj do sedaj noben znan fungicid ne deluje na tem mestu in se rastline zaradi tega ne more predčasno zavarovati. Med najpogostejše rastlinske patogene spadajo družine gliv *Ceratocystis*, *Fusarium*, *Opiostoma* in *Verticillium* (Fradin in sod., 2009).

Verticillium albo-atrum Reinke & Berthold spada med fitopatogene glive, ki povzročajo uvelost pri različnih pomembnih rastlinskih vrstah (Jamnik in sod. 2006), med katere spadajo rastline iz družin *Compositae*, *Malvaceae*, *Rosaceae*, *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Leguminosae* (Ashworth in sod., 1972) in *Cannabaceae*.

Fitopatogene glive v procesu patogeneze uporabljajo številne ekstracelularne proteine, ki so pogosto odločilnega pomena za uspeh okužbe rastline. Med temi proteini so najpomembnejši hidrolitični encimi, ki razgrajujejo fizične pregrade v rastlini kot npr. celične stene, specifični toksini in efektorski proteini, ki v rastlini povzročajo spremembe, ki patogenu omogočijo parazitizem.

Raziskave ekstracelularnih proteinov gliv iz rodu *Verticillium* so skromne, čeprav patotipi teh gliv povzročajo precejšno ekonomsko škodo na kmetijskih rastlinah. V Sloveniji ekonomska škoda nastaja predvsem v hmeljarstvu, kjer od leta 1997 beležimo izbruhe agresivnega (letalnega) patotipa. Ker je življenjski prostor glive *Verticillium albo-atrum* v okuženi rastlini prevodni sistem (t.i. ksilemske žile), so v tem primeru ekstracelularni proteini še toliko pomembnejši, saj gliva ni v direktnem kontaktu z rastlinskimi celicami. Eksperimenti na bombažu, krompirju in modelni rastlini *Arabidopsis thaliana* so pokazali, da sekretoma gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae* vsebujeta fitotoksine, elicitorje in številne encime, ki razgrajujejo celične stene (Bhadauria in sod., 2010, Fradin in Thomma, 2006, Mansoori in sod., 2005, Wang in sod., 2004). Vendar pa so bile dosedanje raziskave parcialne, omejene na identifikacijo in karakterizacijo posameznih proteinov.

Proteomika se ukvarja s preučevanjem proteinov na globalnem nivoju oz. na nivoju celotnega proteoma. S pojmom proteom opišemo celotno množico različnih proteinov, ki se sintetizirajo v določeni celici v določenem trenutku. S pomočjo proteomskih analiz lahko proteine okarakteriziramo, določimo njihovo funkcijo, raven izražanja in preučujemo vpliv različnih dejavnikov na izražanje proteinov.

Poznamo več različnih proteomskih tehnik preučevanja proteinov, vendar je med najbolj uporabljenimi ločevanje proteinov z dvodimenzionalno elektroforezo (2-DE) in identifikacija proteinov z masno spektrometrijo (MS). Dvodimenzionalna elektroforeza je

ena izmed najbolj učinkovitih metod preučevanja celotnega proteoma celice, celičnih linij, organov in tkiv (Wittmann- Liebold in sod., 2006).

Objavljeno genomsko zaporedje glive *V. albo-atrum* nam omogoča tudi bioinformacijske analize z namenom karakterizacije sekretoma in validacijo eksperimentalnih podatkov.

Nameni naloge so bil:

- pridobiti vzorce sekretomov dveh patotipov glive *V. albo-atrum* v pogojih, ki simulirajo hranilno vrednost okolja v okuženi rastlini (ksilemski sok),
- proteomska karakterizacija vzorcev sekretomov z dvodimenzionalno elektroforezo,
- identifikacija večjega števila proteinov,
- primerjava sekretomov blagega in letalnega patotipa *V. albo-atrum*.

Delovne hipoteze, ki smo jih postavili, so bile:

- da bomo z analizo sekretoma glive *Verticillium albo-atrum* ugotovili molekularne osnove patogenosti,
- da bomo s primerjavo sekretomov blagega in letalnega patotipa *Verticillium albo-atrum* okarakterizirali razliko v agresivnosti na molekularni ravni,
- da bomo z bioinformacijsko analizo določili funkcije proteinov in z orodji za napovedovanje lokalizacije proteinov validirali rezultate.

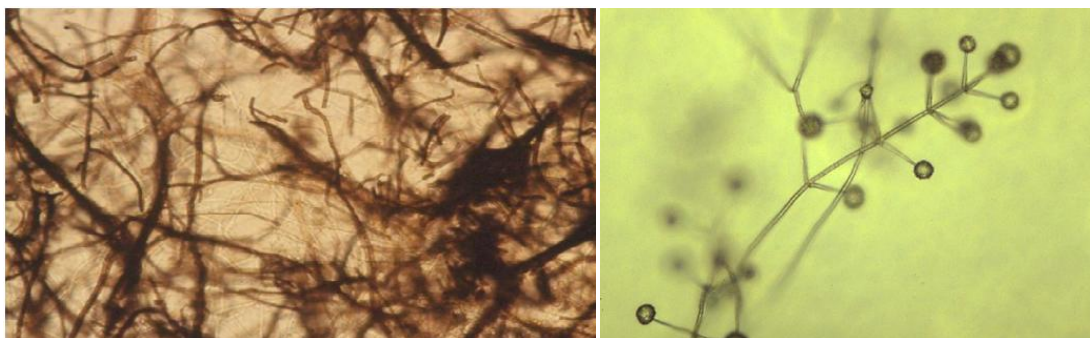
2 PREGLED OBJAV

2.1 FITOPATOGENA GLIVA *Verticillium albo-atrum*

2.1.1 Taksonomija in morfologija

Ness von Essenberck je leta 1816 prvi opisal rod *Verticillium*. Njegovo poimenovanje je temeljilo na specifični obliki vretenaste razvejanosti konidiofor (Fradin in Thomma, 2006). Prav zaradi te posebne razvejanosti se ga uvršča v skupino *Deutoreomycota*, skupino gliv, pri kateri ne poznamo spolnega cikla. Na začetku je bil rod *Verticillium* zelo heterogen in je vseboval okoli 190 različnih kmetijsko pomembnih parazitskih asexualnih gliv, ki so okuževale rastline, žuželke, nematode in tudi druge glive. Zaradi tega so v preteklih letih različne skupine znanstvenikov naredile ponovni pregled celotnega rodu in novo razporeditev vseh patogenov glede na specifične lastnosti. Tako sedaj rod *Verticillium* vsebuje le fitopatogene in saprofite, med tem ko ostali, ki parazitirajo žuželke, glive in nematode, spadajo med *Hypocreales* (*Lecanicillium*, *Pochonia*, *Haptocillium*, *Simplicillium*) (Pantou in sod. 2005). V rod *Verticillium* Nees spadajo najbolj patogeni sevi, kateri prizadenejo rastline tako v hladnih in toplih območjih, kot tudi v subtropskih in tropskih podnebjih (Pagg and Brady, 2002).

Reinke in Berthold, sta leta 1879 iz uvelega krompirja izolirala in opisala *Verticillium albo-atrum* (Pegg in Brady, 2002). Morfološka značilnost *V. albo atrum* je, da ob izpostavitvi neugodnim razmeram tvori temno rjav do črn trajen micelij, ki nastane z združevanjem melaniziranih nabreklih hif, ki mu omogoča preživetje v tleh dalj časa.



Slika 1: Trajni micelij *V. albo-atrum* (levo) (Radišek in sod., 2009) in konidiofore *V. albo-atrum* (desno) (DeSavigny, 2005)

Verticillium albo-atrum tvori bel puhast micelij, sestavljen iz hialinih ali steklasto obarvanih hif na katerih nastajajo vretenasti za rod *Verticillium* značilni konidiofori. Pri *V. albo-atrum* so konidiofori lahko tudi sekundarno razvejani (Hawksworth in Talboys, 1970; cit. po Mandelc, 2010).

2.1.2 Fitopatogenost glive *Verticillium albo-atrum*

Verticillium albo-atrum nima veliko različnih vrst gostiteljskih raslin in se ga večinoma povezuje z okužbami lucerne, hmelja, soje, paradižnika in krompirja (Fradin in Thomma, 2006). Prvi dokumentiran pojav infekcije hmelja z *Verticillium albo-atrum* izhaja iz Anglije, kjer so leta 1924 odkrili blago obliko hmeljeve uvelosti (Harris, 1927; Radišek in sod., 2006), letalna oblika hmeljeve uvelosti pa je bila odkrita leta 1933. Blaga oblika hmeljeve uvelosti vsako leto spreminja intenzivnost okužbe in redko povzroči smrt rastline. Letne klimatske spremembe nimajo vpliva na letalno obliko, ki povzroči resne simptome katerim sledi uvelost in smrt rastline. V Sloveniji so prvič odkrili letalno obliko sevov leta 1997 (Radišek in sod., 2006). Blaga oblika *V. albo-atrum* je v Sloveniji prisotna že od leta 1974 (Mandelc in sod., 2007).

Verticillium albo-atrum tvori trajne organe, s pomočjo katerih lahko v zemlji preživi veliko let (Mandelc in sod., 2009). Življenjski cikel glive lahko razdelimo na dormantno, parazitsko in saprofitsko fazo. Snovi, ki jih rastlina sprosti v zemljo vzpodbudijo kalitev trajnih organov, čemu sledi prodor glive v rastlino preko apikalnega meristema ali na mestu poškodbe korenin. Po prehodu preko koreninskega endodermisa gliva vstopi v prevodni sistem, kjer se micelij začne močno množiti in proizvajati konidiospore, katere nato s ksilemskim sokom potujejo po žili (Fradin in sod., 2009). Brez prisotnosti gostiteljske rastline, lahko melaniziran micelij *Verticillium albo-atrum* v zemlji preživi od dveh do pet let (Klosterman in sod., 2009).

V raziskavah fitopatogenosti *Verticillium albo-atrum* je poudarek predvsem na pektinolitičnih encimih, različnih toksinih in elicitorjih (Pegg, 1965; Mandelc in sod., 2009). Ker mora *Verticillium* prehajati preko žilnih membran, ki vsebujejo pektin, da se lahko razširi po rastlini, je največji poudarek na preučevanju pektinolitičnih encimov. Do sedaj so bili karakterizirani encimi poligalakturonaza, pektat-liaza in pektinesteraza. Za nekatere od teh encimov je bilo dokazano, da v *in vitro* pogojih razgrajujejo rastlinsko tkivo in povzročajo simptome uvelosti. Hkrati pa je bilo pri nekaterih sevih rodu *Verticillium* dokazano, da je stopnja izražanja poligalakturonaze, pektin liaze soodvisna s stopnjo virulence (Fradin in Thomma, 2006).

V filamentoznih glivah predstavljajo encimi, ki razgrajuje rastlinsko celično steno (celulaze, hemicelulaze, pektinaze in ligninaze) sredstvo za pridobivanje energije in hranil iz biopolimerov v celični steni. Poleg tega pa je znano da imajo poleg tega tudi pomembno vlogo v fitopatogenosti določene glive (Aro in sod., 2005).

2.2 METODE V PROTEOMIKI

Proteomika je skovanka besed proteom in genomika in je bila prvič uporabljena leta 1995. Definirana je kot globalna analiza in karakterizacija celotnega proteinskega komplementa celice, celične linije, tkiva ali organizma (Wittman-Liebold in sod., 2006; Graves in Haystead, 2002). Osnova razvoja proteomike je bila masna spektrometrija, ki je omogočila učinkovitejšo karakterizacijo proteinov. Pomembni so tudi drugi znanstveni pristopi k analizi določenega proteina ali proteoma, med katere spadajo ločevanje proteinov, genomika in bioinformatika. Prevladujoči metode ločevanja proteinov so visoko resolucijska 2-D elektroforeza s kasnejšo MS in tekočinska kromatografija z MS (LC-MS).

2.2.1 Dvodimenzionalna elektroforeza

Osnovna tehnika ločevanja proteinov, iz katere se je v nadaljevanju razvila dvodimenzionalna elektroforeza, je bila poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE). Le ta je bila prvič uporabljena na začetku sedemdesetih let in je v kratkem času postala priljubljeno orodje biokemikov za proučevanje proteinov. Vendar se je kmalu pokazalo, da sama SDS-PAGE ne ločuje dovolj dobro kompleksnih proteinskih vzorcev. Zato so ji dodali še eno stopnjo ločevanja in sicer izoelektrično fokusiranje. Tako je nastala 2-DE elektroforeza, ki ločuje proteine v dveh stopnjah. Najprej ločujemo proteine glede na njihovo izoelektrično točko (pI) s pomočjo izoelektričnega fokusiranja (IEF), nato sledi ločevanje proteinov glede na njihovo molekularno maso (Mw) s poliakrilamidno gelsko elektroforezo z natrijevim dodecil-sulfatom (SDS-PAGE).

O'Farrell (1975) je prvi predstavil dvodimenzionalno elektroforezo širši javnosti z novim popolnejšim protokolom v katerem je opisal boljše metode nanašanja vzorcev na IEF gele in detekcijo proteinov z avtoradiografijo. Največji problem je še vedno ostajalo dejansko določevanje kateri protein je na katerem mestu na gelu. Detekcija protiteles po prenosu Western in primerjava s čistimi proteini sta bili edini tehniki za identifikacijo proteinov. Napredek v 2-DE je prišel z uvedbo imobiliziranih gradientov pH v prvi dimenziji, s katerimi so odstranili težave s ponovljivostjo povezano z amfolitičnimi pH gradienti. In kasneje z uvedbo masne spektrometrije, ki je služila kot metoda za identifikacijo proteinov v gelu (Rabilloud in sod., 2010).

Dvodimenzionalna elektroforeza se je skupaj z masno spektrometrijo skozi leta razvila v najpomembnejšo metodo za identifikacijo in karakterizacijo proteinov. Ena izmed največjih prednosti 2-DE je v tem da lahko ločimo tudi proteine, ki so prestali postranslacijske modifikacije. Hkrati lahko ločujemo lahko do več 1000 proteinov na gel. (Graves in Haystead, 2002). Osnovni postopek ločevanja proteinov je skozi ostal enak do danes.

2.2.1.1 Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje temelji na ločevanju proteinov glede na njihovo izoelektrično točko (pI). To je pH, pri katerem je neto naboj proteina enak 0. Ločevanje proteinov poteka na gelih z imobiliziranim gradientom pH med dvema elektrodama. Proteini potujejo po gelu v električnem polju dokler ne dosežejo do točke v področju gela, kjer je pH natančno enak vrednosti njegove izoelektrične točke. Glede na to, da je aminokislinska sestava proteinov zelo raznovrstna je izoelektrična točka specifična lastnost določenega proteina. Prvi geli na katerih se je izvajalo izoelektrično fokusiranje so gradient pH tvorili amfoliti. Amfoliti lahko med elektroforezo potujejo po gelu zato gradient ni stabilen, kar predstavlja velik problem. To se je spremenilo z uvedbo imobiliziranih gradientov pH, kateri imajo kisle in bazične skupine vezane neposredno na gel. Resolucija izoelektričnega fokusiranja je odvisna od jakosti električnega polja, zaradi tega fokusiranje poteka na visoki napetosti (do 8000-10000V) (Cargile in sod. 2005; Wittmann-Liebold in sod. 2006; Rabilloud in sod., 2010). Zato je potrebno zagotoviti hlajenje gelov med potekom IEF, saj se le-ti lahko pregrejejo zaradi visoke napetosti. Zagotoviti moramo tudi, da je v raztopini najmanjša možna količina nabitih snovi. Zato vsebujejo komponente pufra za IEF nevtralne molekule:

- kot denaturant uporabimo 9 M urea ali 7 M urea+2 M tiourea, ki vzdržuje denaturirano stanje proteinov,
- detergent preprečuje združevanje proteinov preko hidrofobnih interakcij, uporabimo zwitterionski detergent CHAPS,
- reducent DTT za vzdrževanje cisteinov v reduciranem stanju,
- nosilni amfoliti (IPG puffer) za preprečevanje agregacije proteinov preko ionskih interakcij ter zagotavljanje bolj enakomerne prevodnosti.



Slika 2: Geli z imobiliziranim gradientom pH (24 cm, pH 7-11) (GE Healthcare, 2004)

2.2.1.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata

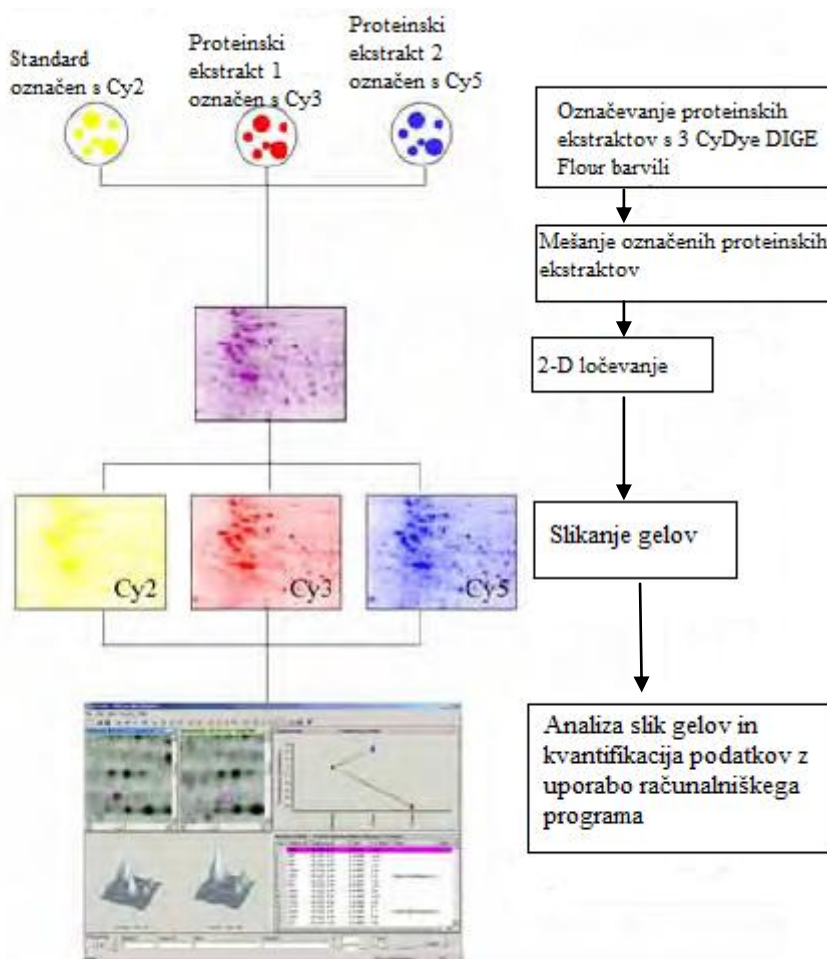
Drugo dimenzijo ločevanja predstavlja poliakrilamidna gelska elektroforeza, s katero ločujemo proteine glede na njihovo molekulsko maso. IPG trakove je potrebno pred nanosom na gele za elektroforezo uravnotežiti.

Uravnoteženje IPG trakov poteka v pufru za uravnoteženje, ki vsebuje SDS, ureo, glicerol in Tris. Spiranje trakov poteka v dveh stopnjah. Najprej osnovnemu pufru za uravnoteženje dodamo DTT, katerega po določenem času odlijemo in dodamo trakovom pufer z dodanim jodoacetamidom. Jodoacetamid zagotovi, da se med elektroforezo, ne tvorijo naključne disulfidne vezi. SDS v pufru se veže na proteine in jim da negativen naboj. Tako pripravljen trak lahko uporabimo v drugi stopnji 2-DE. Za ločevanje proteinov v drugi dimenziji se večinoma uporablja 12,5 % poliakrilamidni gel s katerim lahko ločujemo proteine velikosti 14-100 kDa. Po končani elektroforezi je potrebno gele pobarvati. Na izbiro imamo več različnih barvil, vendar se večinoma uporablja barvanje s srebrom ali s Coomassie brilliant blue G-250 (koloidno Coomassie barvilo). Uporabljajo pa se tudi dražja fluorescenčna barvila, kot sta Sypro Ruby in Deep Purple (GE Healthcare, 2004).

Dvodimenzionalna elektroforeza je učinkovito orodje za preučevanje proteoma določene celice. Vendar še vedno ostaja vprašanje o variaciji in pomanjkljivi občutljivosti ter kvantitativni zmogljivosti obstoječih reagentov za označevanje, kar omejuje 2-DE kot uspešno kvantitativno orodje (Marouga in sod., 2005).

2.2.1.3 Dvodimenzionalna diferenčna gelska elektroforeza

Dvodimenzionalna DIGE temelji na označevanju vzorcev proteinov s fluorescenčnimi barvili pred začetkom 2D gelske elektroforeze. Vzorci se lahko označijo z največ tremi različnimi fluorescenčnimi barvili CyDye (Cy2-rumena, Cy3-rdeča in Cy5-modra), ki imajo dobro ločen absorpcijski in emisijski spekter. Prednost 2-D DIGE je predvsem povečana občutljivost in možnost ločevanja več kot enega vzorca na gel, kar zmanjša variabilnost med geli. Pomembna je tudi uporaba internega standarda, ki ga naredimo z združevanjem enakih količin vseh bioloških vzorcev, katere obarvamo z Cy2. Vsako CyDye DIGE barvilo ima NHS-ester skupino, ki se kovalentno veže na ϵ -aminsko skupino lizina. Barvilo tako ne spremeni naboja proteina. CyDye barvila so tudi masno usklajena in vsakemu proteinu dodajo okoli 500Da. Tako proteini še vedno potujejo na isto mesto na gelu. Na vsak gel tako nanesimo en vzorec pobarvan s Cy5, drug vzorec s Cy3 in interni standard s Cy2. Potek 2-D DIGE prikazuje slika 3.



Slika 3: Princip delovanja 2-D DIGE (GE Healthcare, 2004)

Fluorescenčno obarvani proteini se po končanih drugi stopnji 2-D DIGE slikajo s skenerjem, kjer dobimo 3 ločene slike. Količina proteina v obeh vzorcih na gelu se izrazi kot razmerjem med relativnim volumnom lise v vzorcu in relativnim volumnom lise v internem standardu. Z uporabo internega standarda na vseh gelih odpravimo možnost razlik med geli, ki bi lahko nastale zaradi različnega obnašanja proteinov (Marouga in sod., 2005).

2.2.2 Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo

V zadnjih dveh desetletjih je masna spektrometrija postala primarna metoda za identifikacijo proteinov iz kompleksnih zmesi biološkega izvora. V veliki meri je to potrebno pripisati tehnološkemu napredku, ki je omogočil rutinske analize kompleksnih vzorcev, ter hitro rastočim genomskim podatkovnim bazam, ki omogočajo iskanje in validiranje podatkov pridobljenih z masno spektrometrijo. Pri masni spektrometriji gre za ločevanje ionov glede na njihov količnik masa/naboj.

Identifikacija proteinov temelji na analizi peptidov, ki so bili pridobljeni s proteolitično razgradnjo. Splošno uporabljen encim pri MS je tripsin za katerega je značilno, da proteine cepi na C-koncu lizina in arginina, razen če v zaporedju sledi prolin. Dobljene peptide se nato izloči iz gela in analizira z masnim spektrometrom. Le ta je sestavljen iz ionizatorja, analizatorja in detektorja. Ionizator poskrbi, da peptid pride v plinsko fazo in se nabije, kar sta pogoja, da delce lahko analiziramo z MS (Baldwin, 2004).

Glede na način ionizacije in vrsto masnih analizatorjev poznamo različne tipe masnih spektrometrov. Vzorce lahko ioniziramo s pomočjo elektronov, kemijske reakcije v plinski fazi, močnega električnega polja. Velik razmah sta v zadnjem času doživeli tehniki MALDI (ionizacijo z desorpcijo v matriksu z laserjem) in ESI (ionizacijo z razprševanjem) pri katerih molekule med procesom ionizacije ostanejo razmeroma intaktne.

Pri MALDI encimsko dobljene peptidne fragmente nanese na matriks iz nizkomolekularne organske kisline, da z njim kokristalizirajo. Nato jih ioniziramo z laserskim žarkom, pri čemer matriks absorbira energijo, se upari in v plinsko fazo s sabo odnese tudi molekule peptidov in jim preda svoj naboj (1^+). Nastajajo večinoma protonirani oz. deprotonirani ioni z enim nabojem v obliki $[M+H]^+$ ali $[M-H]^-$ (M-molekula). ESI uporablja visoko napetost za razprševanje peptidov. Peptidno mešanico v raztopini (hlapnem topilu) potiskamo skozi kapilaro, katere konica je pod visoko napetostjo. Temu sledi tvorba malih nabitih kapljic (aerosol), ki potujejo k nasprotno nabiti elektrodi. Med tem časom iz njih tudi zaradi dotoka vročega dušika izhlapeva topilo. Kapljice se manjšajo toliko časa dokler ne ostanejo le ioni vzorca, ki potujejo dalje v vmesno vakuumsko področje in naprej v masni analizator. Nastali ioni so lahko enojno ali večkrat nabiti, v obliki $[M+nH]^{n+}$ ali $[M-nH]^{n-}$.

Poznamo več vrst masnih analizatorjev. Med najenostavnejše spada analizator na čas preleta ionov (TOF-time of flight). Nastale ione peptidov pospešimo z napetostjo in jih usmerimo v dolgo cev, ki je pod vakuumom. Tam se ioni različno hitro premikajo glede na svojo maso in naboj. Meri se njihov čas prihoda do detektorja. Z masnim analizatorjem TOF se najpogosteje uporablja izvor ionov MALDI, s katerim lahko analiziram biomolekule z molekulsko maso 10000 in več.

Poznamo tudi kvadrupolni analizator, ionske pasti, ionsko ciklotronsko resonančni analizator s Fourierjevo transformacijo. Kvadrupolni analizator je sestavljen iz štirih vzporednih kovinskih palic, nameščenih okoli navidezne centralne osi, tako da imata para palic nasprotni napetosti. Med njimi je ustvarjeno dinamično električno polje, ki deluje kot filter in dovoljuje prehod le ionom določenih razmerij m/z . Kvadrupolni analizator je pogosto združen z ESI. Ionska past je svoje ime dobila po tem, da ujame ione v nekakšno past znotraj oscilirajočega električnega polja. Ioni z različnimi razmerji m/z vstopijo hkrati, a izstopijo ob različnih napetostih in s tem ob različnih časih. Tudi ta analizator je pogosto spojen z ESI. Instrument FT-ICR je vrsta ionske pasti iz kubične celice znotraj močnega magnetnega polja, v kateri se ioni gibajo ciklotronsko (v krožnih orbitah) v ravnini, pravokotni na magnetno polje. Nanje vpliva tudi električna napetost na obodnih ploščah, prav tako pravokotnih na magnetno polje. Detekcija poteka preko določitve frekvence obhoda ionov mimo sprejemnika.

Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo lahko poteka po dveh metodologijah. In sicer s tvorbo in analizo prstnih odtisov peptidnih mas (angl. Peptide mass fingerprinting) in z določanjem aminokislinskega zaporedja peptidov (Kočevar in Komel, 2008). Pri peptidnem mapiranju peptidom, ki jih z masno spektrometrijo iz lise, določimo maso. Natančno maso peptidov lahko določimo zaradi specifične mase vsake aminokislinske. Izolevcin in levcin sta edini aminokislini z enako maso, ter glutamin in lizin katerih masa je različna za 0,036 Da). Iz tega sledi, da je masa peptida glede na aminokislinsko sestavo dokaj unikatna lastnost, skupen seznam mas peptidov določenega proteina pa je neke vrste prstni odtis. Izmerjene mase primerjamo s teoretičnimi masami peptidov, ki bi jih dobili, če bi vse proteine iz baze podatkov razrezali s tripsinom. Najpogosteje se za napovedovanje identitete proteinov uporabljata algoritma Mascot (Perkins in sod. 1999; cit. po Mandelc, 2010) in Sequest (Eng in sod., 1994). Pogoji za identifikacijo proteina s pomočjo teh algoritmov, je dejanski obstoj zaporedja proteina v bazi podatkov. Vsaka zamenjava aminokislinske v peptidnem zaporedju pomeni spremembo mase in neujemanje. Peptidno kartiranje je uspešno samo pri proteinih organizmov tistih vrst, ki imajo določeno nukleinsko zaporedje celotnega genoma (Mandelc, 2010). V tem primeru se za ločevanje proteinov pogosto uporablja 2-D elektroforeza in MS po metodi MALDI-TOF.

Druga metoda se izvaja z uporabo tandemске masne spektrometrije (MS/MS), s katero dobljene peptidne ione s pomočjo plina še dalje razgradimo (Kočevar in Komel, 2008). Ta metoda se uporablja kadar genomsko zaporedje organizma še ni znano. To naredimo tako, da najprej naredimo peptidno mapiranje, nato pa posamezen peptid izberemo, izoliramo in vodimo v celico v kateri je inerten plin (dušik, helij ali argon). Peptid v trkih s plinom razpada in tako dobimo zmes fragmentov, katero vodimo v še en analizator. Dobimo serijo vrhov, razlika med sosednjima vrhovoma pa je enaka masi aminokislinske. Interpretacija rezultatov poteka ali s primerjavo mas fragmentov s teoretičnimi masami fragmentov iz baz podatkov, ali pa z določanjem aminokislinskega zaporedja peptida *de novo* z

računalniškimi algoritmi in iskanje zadetkov v bazi podatkov z algoritmi za iskanje podobnih zaporedij kot sta FASTA in BLAST. Zadetke v obeh primerih lahko dobimo tudi iz sorodnih vrst, če je zaporedje homolognega proteina dovolj podobno (Mandelc, 2010).

2.2.3 Bioinformacijska orodja

Bioinformatika je doživela razmah v zadnjih dvajsetih letih, ko je količina bioloških podatkov pričela naraščati eksponentno. Za ta razmah so bile gotovo pomembna metodološka odkritja, predvsem metode za določevanje proteinskih in nukleotidnih zaporedij. Naglo večanje znanih proteinskih in nukleotidnih podatkov je prisililo znanstvenike, da so le te začeli urejati v posebne podatkovne zbirke (Anderluh, 2002).

Zgodovina razvoja bioinformatike sega v petdeseta in šestdeseta leta prejšnjega stoletja, kjer je prišlo do bioloških kot računalniških odkritij. Prvi pristopi k razumevanju delovanja bioloških makromolekul so že združevali tako računalniške kot eksperimentalne informacije (Ouzunis in Valencia, 2003). Prva podatkovna zbirka, ki je vsebovala podatke o bioloških makromolekulah je bila »Atlas proteinskih zaporedij in struktur«, v kateri so bila zbrana vsa proteinska zaporedja, je izdala v knjižni obliki Margaret Dayhoff v letih 1968-1978.

Podatkovne zbirke danes delimo na bibliografske, primarne, sekundarne in strukturne. V primarnih podatkovnih zbirkah so shranjena primarna zaporedja proteinov ali zaporedja nukleinskih kislin. Nacionalni inštitut za biotehnoško informacijo (National Center for Biotechnology Information, NCBI) je del Nacionalne knjižnice Združenih držav in je bil ustanovljen leta 1988. Njegova vloga je razvoj novih informacijskih tehnologij, ki nam pomagajo razumeti molekulske in genske procese. Vzdržuje podatkovne zbirke GenBank, PubMed in PubMed Central, Nucleotide in Protein Sequences, Complete Genomes Taxonomy. Podatkovne zbirke so dostopne preko interneta s pomočjo iskalnika Entrez. Preiskujemo lahko s pristopnimi kodami ali ključnimi besedami po zaporedjih ali bibliografskih (PubMed in OMIM) podatkih z uporabo Boolovih operatorjev. Možno je tudi navzkrižno preiskovanje po podatkovnih zbirkah ("Search across databases").

Najbolj znana primarna zbirka nukleotidnih zaporedij je že omenjena GenBank, obstajajo pa tudi druge, npr. EMBL v Evropi in DDBJ (DNA Data Bank of Japan) na Japonskem. SwissProt je ena od najstarejših podatkovnih zbirk. Ustanovljena je bila leta 1986, sedaj zanjo skrbi Švicarski inštitut za bioinformatiko (SIB) in Evropski bioinformacijski inštitut (EBML/EBI). UniProt/SwissProt je podatkovna zbirka primarnih zaporedij z dodanimi določitvami njihovih funkcij. Nahaja se na proteomskem strežniku Expert Protein Analysis System (ExPASy).

Sekundarne podatkovne zbirke so iz primarnih izpeljane podatkovne zbirke, ki vključujejo že neko določeno znanje. Vsebujejo npr. samo koščke proteinskih ali nukleotidnih zaporedij DNA. Takšni delčki so navadno zelo pomembni za delovanje proteinov (Anderluh, 2002).

Večina teh baz, ter tudi drugih standardov in različnih aplikacij, obstaja neodvisno ena od druge in niso povezane v skupni sistem. To otežuje raziskovalnim skupinam hitro in učinkovito uporabo vseh razpoložljivih bioinformacijskih orodij. Največja težava pri razvoju računalniške programa, ki mi povezoval vsa ta orodja je predvsem v njihovi raznolikosti in kompleksnosti. Vendar pa razvoj področij kot je sistemska biologija povečuje potrebo po razvoju programov, ki bi povezovali različne baze podatkov in aplikacije. Ena izmed teh platform je BIAS (Bionformatics Integrated Application Software), ki predstavlja osnovo za integracijo različnih bioinformacijskih orodij v en računalniško enostaven in tudi močan sistem (Frank in sod., 2004).

2.3 PROTEOMSKE RAZISKAVE PATOGENIH GLIV

Sekretomske analize so pomemben faktor v razumevanju filamentoznih gliv, saj večina letih izloča znatno število proteinov, s katerimi si omogočajo saprofitski način življenja. Večina izmed teh proteinov se preučuje v povezavi s patogenostjo gliv. Primerjalna genomika nam po objavi večjega števila genomov gliv (*Aspergillus flavus*, *A. oryzae*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *Botrytis cinerea*, *Chaetomium globosum*, *Coprinus cinereus*, *Fusarium graminearum* in druge) omogoča boljši vpogled v mehanizem interakcije med rastlino in glivo (Kim in sod. 2007). Ključnega pomena je razumevanje delovanja in vpliv sekretornih proteinov glive na rastlinsko celično steno in nadaljnji proces vdora glive v rastlinsko tkivo. Delovanje različnih signalov, encimov in majhnih sekretornih proteinov vpliva na zmožnost sprožitve obrambnega sistema gostiteljske rastline zoper potencialnega patogena (Duplessis in Kuhn, 2008).

Značilnost filamentoznih gliv je, da izločajo veliko število degradacijskih encimov in drugih proteinov, kateri imajo različne vloge v pridobivanju hranil, kolonizaciji substrata in ekoloških interakcijah. Pri vsaj eni interakciji gostitelj-patogen je bilo dokazano, da je za začetek virulence potreben vsaj eden izmed ekstracelularnih glivnih encimov kot npr. poligalakturonaza, pektat liaza, ksilanaza in lipaza. Glive izločajo tudi veliko manjših in pogosto s cisteinom bogatih proteinov z neznano encimsko aktivnostjo. Nekateri izmed teh so pomembni pri interakcijah gostitelj-patogen (Paper in sod., 2007).

Wilson Francisco in sod. (cit. po Kim, 2007) so prvi raziskovali glivne sekretome in s svojimi odkritji pomembno prispevali k razvoju tega raziskovalnega področja. Osnovali so prvi protokol za izolacijo sekretoma gliv, s katerim so identificirali dvaindvajset sekretornih proteinov glive *A. flavus*, ki sodelujejo v degradaciji. To je pripomoglo k

razumevanju delovanja encimov, ki sodelujejo v degradaciji sekundarnih metabolitov, pri razkroju celic. Delo so nadaljevali z uporabo LC-MS/MS, s katero so identificirali nadaljnjih 51 proteinov, izmed katerih so jih 18 identificirali kot glavne degradacijske encime. Oda in sod. (cit. po Kim, 2007) so preučevali sekretom glive *Aspergillus oryzae*. Pri gojenju glive na trdnem ali tekočem gojišču so identificirali 29 ekstracelularnih proteinov. Nekaj identificiranih proteinov se je pri gojenju na tekočem gojišču nahajalo v celični steni, vendar so pri gojenju na trdnem gojišču prešli celično steno.

Botrytis cinerea spada med patogene filamentozne glive, ki okužuje več kot 200 rastlinskih vrst. Sekretorni proteini se izločajo iz glive kot prvotni odgovor glive na gostiteljsko rastlino. Shah in sod. (2009) so naredili analizo sekretoma glive *B. cinerea* z uporabo LC-MS/MS. Sekretorni proteini so bili pridobljeni iz glive, ki je rasla na celofanski membrani na gojišču iz ekstrakta paradižnika, jagod ali listov navadnega repnjakovca. Po analizi z LC-MS/MS je bilo identificirano skupno (vse rasne razmere) 89 proteinov *B. cinerea*. Šestdeset proteinov je nakazovalo vsebnost SignalIP motivov, kar nakazuje na ekstracelularni položaj proteinov. Sedem proteinov je bilo identificirano pod vsemi ravnimi pogoji, kar nakazuje, da spadajo med osnovne proteine, ki so potrebni za rast glive. Identificirali so predvsem transportne proteine, proteine povezane z metabolizmom sladkorjev, peptidaze, oksidacijsko/redukcijske proteine in patogenetske faktorje. Ti proteini so pokazatelji na kakšen način *B. cinerea* inficira in kolonizira rastlino.

Dvodimenzionalna elektroforeza s tandemsko masno spektrometrijo ter prenos Western so bili uporabljeni pri preučevanju proteinov in virulence glive *Pyrenophora tritici-repentis*, ki povzroča listno bolezen na pšenici. Gliva proizvaja veliko gostiteljsko-specifičnih toksinov, med drugim tudi Ptr ToxB, protein ki inducira bledikavost in ga kodira gen *ToxB*. Homolog *ToxB* je najden tudi pri ne-virulentnih izolatih glive. Za boljše razumevanje vloge tega homologa in ocenitev splošne patogene sposobnosti glive *P. tritici-repentis*, so primerjali proteoma ne-virulentnega seva 4 in virulentnega seva 5. Z metodo prenos Western so dokazali prisotnost Ptr ToxB samo v kalečih sporah in tekočinah kulture seva 5. Proteomska primerjava s pomočjo 2-DE je pokazala prisotnost 133 različnih proteinov v sekretomu (29 proteinov) in miceliju (104 proteini) sevov 4 in 5. Od tega jih je bilo 63 identificiranih z tandemsko masno spektrometrijo. Proteini s povečano vsebnostjo v sevu 5, so med drugim α -monozidaza in ekso- β -1,3-glukanaza (razgrajujeta celično steno), proteini tiplotega šoka, BiP proteini in različni metabolni encimi. Razlike med sevoma na proteomskem nivoju nakazujejo na zmanjšano patogeno aktivnost seva 4 *P. tritici-repentis* (Cao in sod. 2009).

Sprememba proteoma lista pšenice, ki je bil okužen z listno rjo, katero povzroča gliva *Puccinia triticina* je bil predmet raziskav Rampitsch in sod. (2006). Z 2-DE/MALDI-Q-TOF MS/MS so identificirali inducirane proteine v okuženih listih pšenice. Med drugim so odkrili elongacijski faktor 1 β (EF1 β) in začetne faktorje 5a (eIF5a), katera sodelujeta v

kontroli sprememb proteinov, α -4 podenota 20S proteasoma razgrajuje nezaželjene proteine in 14-3-3 protein sodeluje v biotskem in abiotskem stresnem odgovoru. Najdeni pa so bili tudi različni metabolni encimi (kinaze) in strukturni proteini (α -tubulin in ribosomski proteini). 2-DE/MALDI-TOF MS in ESI-MS/MS sta bili uporabljeni pri konstruiranju proteomskih map *Ustilago maydis* in *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Pri *U. maydis* so identificirali 250 proteinov od katerih so ovečano vsebnost v času dimorfične spremembe brstenja v filamentozno rast ugotovili pri trinajstih proteih. Za tri (disulfid izomeraza, glutaminaza A in hidrolaza) izmed teh 13 proteinov je bilo že znano, da nastanejo kot odgovor na na b-lokus indukcijo. Odkritje Rac1- in b-reguliranih proteinov podpira hipotezo, da je nastajanje filamentoznih vlaken med razvojem patogeneze inducirano s strani stimulatornega modula, ki vsebuje Rac1-. Pri *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* je bilo z 2-DE/MALDI-TOF MS določenih 180 proteinov, med katerimi jih ima večina vlogo v metabolizmu lipidov, proteinov in ogljikovih hidratov (Bhadauria in sod. 2010).

Visoko pretočna MS/MS je bila uporabljena za identifikacijo sekretornih proteinov *Fusarium graminearum*, ki so bili izločeni med rastjo v 13 medijih *in vitro* in *in planta* v času infekcije pšeničnega klasja. *In vitro* izločene proteine so pridobili iz rastlinskih filtratov, med tem ko so *in planta* proteine izolirali z vakuumsko infiltracijo. Skupno je bilo identificiranih 289 proteinov (229 *in vitro* in 120 *in planta*). Štiriindevetdeset *in planta* proteinov ni bilo najdenih v nobenem *in vitro* izolatu. Večina (91-100 %) *in vitro* proteinov je imelo napovedane signalne proteine med tem ko *in planta* samo 56 %. Vsaj 13 izmed neizločenih proteinov najdenih samo *in planta* je bilo identificiranih kot hišni encimi, med katere spadajo enolaza, trioza-fosfat-izomeraza, fosfoglukomutaza, kalmodulin, akonitaza in malat-dehidrogenaza. Prisotnost teh encimov samo v *in planta* sekretomskih vzorcih nakazuje na to, da med patogenezo poteka liza celic glive (Paper in sod. 2007). El-Bebany in sod. (2010) so opravili primerjalne proteomske analize na fitopatogeni glivi *Verticillium dahliae*, in sicer na sevih Vd-1396-9 in Vs06-14. Prvi spada med zelo agresivne seve, medtem ko Vs06-14 uvrščamo med manj agresivne. S to analizo so želeli identificirati proteinske faktorje, ki bi lahko prispevali k patogenosti *V. dahliae*. Z LC-ESI-MS/MS in MASCOT algoritmom so identificirali 25 proteinskih lis, ki so se razlikovale med sevoma. Nekatere izmed identificiranih sekvenc so bile homologne s proteini, ki sodelujejo v odgovoru na stres in vdiranje glive v gostitelja. To so pomembne funkcije, ki glivi omogočajo infekcijo gostiteljske rastline in preživetje v zemlji. Izohorizmat-hidrolaza, katera bi lahko zavirala rastlinski obrambni odgovor z inhibicijo nastajanja salicilne kisline, je bila identificirana samo pri zelo agresivnem sevu.

Pri glivi *Sclerotinia sclerotiorum* so z 2-DE analizo in ESI-Q-TOF MS/MS analizirali in identificirali micelijske in sekretorne proteine. Večina identificiranih sekretornih proteinov je spadala v skupino encimov, ki razgrajujejo celične stene, za katere je znano, da so patogeni ali virulenčni faktorji *S. sclerotiorum*. Endo- in eksopoligalakturonaza sta

pektinolitična encima, ki jih izloča gliva, da lažje prodre v rastlino. Podobno nalogo ima tudi pektin-metil-esteraza, ki depolimerizira pektin. Večina micelijskih proteinov je bilo karakteriziranih kot proteini, ki sodelujejo v metabolnih reakcijah, med njimi so piruvat-kinaza, enolaza, 3-fosfoglicerat-kinaza, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (Yajima in Kav, 2006).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 IZOLATI GLIVE *Verticillium albo-atrum* IN PRIDOBIVANJE SPOR

Izolate gliv *Verticillium albo-atrum* smo pridobili iz mikrobiološke zbirke na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu. V raziskavi smo uporabili naslednja izolata:

- Rec (blagi patotip, Slovenija) PG1
- T2 (letalni patotip, Slovenija) PG2

Potrebno je omeniti, da smo uporabili tudi izolate letalnega in blagega patotipa iz Anglije (M-blagi in PV-letalni) in Nemčije (P55-blagi, P15-letalni), vendar pa ti izolati niso predmet te diplomske naloge.

Izolati glive so bili najprej nacepljeni na trdno gojišče in sicer češpljev agar (angl. 'prune lactose yeast agar', 100 mL ekstrakta češpelj, 5 g laktoze, 1 g kvasnega ekstrakta, 20 g agarja, 900 mL ddH₂O), ki inducira tvorbo trajnih organov in močno sporulacijo.

Nastale spore smo nato morali sprati iz trdnega gojišča:

- v laminariju smo na gojišče odpipetirali 5 mL sterilne ddH₂O,
- s pomočjo pipete smo s tekočino spirali površino gojišča in kolonije micelija,
- nastalo suspenzijo smo skozi sterilno tkanino (odstrani dele micelija) prenesli v 50 mL centrifugirko,
- postopek smo ponovili še trikrat, tako da smo skupno gojišče sprali z 20 mL,
- suspenzijo smo centrifugirali 10 min pri 2000 obr./min (Centric 322A, Tehtnica),
- iz centrifugirke smo odpipetirali del supernatanta, tako da je ostalo 5 mL tekočine,
- pelet spor smo resuspendirali in prenesli kapljico na števno steklo Bürker-Türk,
- pod 200x povečavo smo glede na koncentracijo spor prešteli število spor v 0,0125 µL, 0,025 µL ali 0,1 µL,
- suspenzijo smo redčili s sterilno ddH₂O do koncentracije spor 10⁷/mL.

3.2 GOJENJE GLIVE *Verticillium albo-atrum*

3.2.1 Priprava gojišča SXM

Gojišče SXM (angl. 'simulated xylem medium') je gojišče, ki je bilo zasnovano kot približek sestave hranil v ksilemskem soku (Neumann in Dobinson, 2003). Kot vir ogljika je v gojišču prisoten samo natrijev polipektat, ki simulira prisotnost rastlinskih celičnih sten. Ker gliva *V. albo-atrum* v rastlini kolonizira ksilemske žile in torej živi v ksilemskem

soku, predvidevamo, da se bo v gojišču SXM obnašala podobno kot v okuženi rastlini ter izločala proteine, ki jih bomo analizirali z 2-D DIGE.

Gojišče SXM je sestavljeno iz:

- 2 g natrijevega polipektata (uporabili smo natrijev poligalakturonat),
- 4 g brezvitaminskega hidrolizata kazeina,
- 50 mL 20x raztopine kalijevih soli (5,2 g KCl, 5,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 15,2 g KH_2PO_4 , ddH₂O do 500 mL),
- 1 mL 1000x raztopine mikroelementov (2,2 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,1 g H_3BO_3 , 0,5 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,16 g $\text{CoCl}_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,16 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,11 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 5 g Na₄EDTA),
- 100 µL 1 mM biotina,
- ddH₂O do 1L.

Raztopino biotina smo sterilno filtrirali in v gojišče sterilno dodali po avtoklaviranju.

3.2.2 Nacepljanje glive *Verticillium albo-atrum*

V 100 mL gojišča SXM smo dodali 1 mL suspenzije spor s koncentracijo 10⁷ spor/mL. Vsak izolat smo nacepili v 5 erlenmajeric kot biološke ponovitve. Glive smo nato gojili 4 dni v stresalnem inkubatorju v temi pri 24 °C, 150 obr./min.

3.3 PRIPRAVA VZORCA SEKRETOMA

Po 4-dnevem gojenju smo kulturo prefiltrirali skozi tkanino, da smo odstranili micelij. Filtrat smo centrifugirali 10 min pri 2500 g, da smo odstranili spore in natrijev poligalakturonat (ni topen v vodi). Supernatant smo prenesli v sveže centrifugirke ter nato koncentrirali s centrifugalnimi koncentratorji Amicon Ultra-15 (Millipore):

- v koncentrator smo dodali 12 mL supernatanta
- centrifugiranje 30-45 min pri 5000 g in 4 °C
- filtrat smo odlili, v koncentrator dolili supernatant do 12 mL ter centrifugirali
- postopek smo ponavljali do porabe celotnega volumna supernatanta (80-90 mL) ter končnega volumna koncentrata do 1,5 mL
- koncentrat smo odpipetirali iz koncentratorja ter do analize shranili na -80 °C

3.4 MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV

Merjenje koncentracije proteinov v vzorcu je potekalo po metodi Bradford, ki temelji na vezavi barvila Coomassie Brilliant Blue G-250 preko elektrostatskih in tudi hidrofobnih interakcij na molekule proteina. Kot standard za izdelavo umeritvene krivulje smo uporabili goveji serumski albumin (BSA). V posamezno epico smo odpipetirali 10 µL

raztopine vzroca in 200 μL barvnega reagenta. Koncentrat le-tega je bil pred tem 5x redčen z ddH_2O . Inkubacija je potekala na sobni temperaturi. Absorbanco smo merili s spektrofotometrom NanoVue (GE Healthcare) pri 595 nm. Koncentracijo proteinov smo izračunali na podlagi umeritvene krivulje (Priloga C).

3.5 LOČEVANJE PROTEINOV Z DVODIMENZIONALNO DIFERENČNO GELSKO ELEKTROFOREZO (2-D DIGE)

3.5.1 Priprava vzorcev

Vzorci sekretoma, ki so bili shranjeni na $-80\text{ }^\circ\text{C}$, smo pred analizo z 2-D DIGE očistili nečistoč s kompletom reagentov 2D Clean-Up Kit (GE Healthcare) po naslednjem postopku:

- vzorce smo najprej odtalili in premešali na vibracijskem mešalniku, da se je vsebina mikrocentrifugirke dobro premešala
- vzorce določenih koncentracij smo razdelili v centrifugirke
- dodali smo 300 μL precipitanta in vzorce pustili na ledu 15 minut
- nato smo vzorcem dodali 300 μL koprecipitanta in vse skupaj centrifugirali na 16000 g za 5 min
- po centrifugiranju smo odstranili supernatant in dodali 40 μL koprecipitanta, pustili na ledu 5 minut in ponovno centrifugirali 5 min pri 16000 g
- nato smo odstranili supernatant in usedlino resuspendirali v 25 μL destilirane vode,
- temu smo dodali 1mL ohlajenega pufra za spiranje in premešali, dali v skrnjo na $-20\text{ }^\circ\text{C}$ za 60 min, ter premešali vsakih 10 min
- po 60 minutah smo vzorce centrifugirali 5 min pri 16000 g, ter nato odstranili supernatant
- usedlino smo sušili na zraku pet minut
- peletom smo dodali 50 μL DIGE pufra (7 M urea, 2 M tiourea, 4 % CHAPS, 30 mM Tris) in vorteksirali toliko časa dokler se peleti niso popolnoma raztopili
- vzorce smo nato dali v ultrazvočno kopel za 10 min ter ponovno vorteksirali in centrifugirali
- po 25 μL vzorcev smo odpipetirali v nove mikrocentrifugirke, kar je ostalo pa smo združili v skupno centrifugirko (interni standard) in dobro premešali

Vzorci za analizo z 2-D DIGE smo označili s fluorescenčnimi barvili Cy2 (rumena), Cy3 (rdeče) in Cy5 (modra) po naslednjem protokolu:

- barvila smo raztopili v 12,5 μL dimetilformamida (DMF) in dobro premešali
- interni standard smo razdelili v 12 centrifugirk po 25 μL
- vzorcem smo dodali po 1 μL ustreznega barvila, in sicer- polovici vzorcev smo dodali Cy3, drugi polovici Cy5 in internemu standardu smo dodali Cy2

- vse vzorce smo nato premešali, dali na led in v temo za 30 min
- nato smo vsakemu vzorcu dodali 1 μ L lizina (10 mM lizin)
- vzorce in interni standard smo nato združili glede na prej pripravljeno preglednico (Priloga B) (skupni volumen 75 μ L)
- temu pa smo na koncu dodali 75 μ L 2X vzorčnega pufra (7 M urea, 2 M tiourea, 4 % CHAPS, 2 % Pharmalyte 3-10, 2 % DTT)
- inkubacija na sobni temperaturi najmanj eno uro

3.5.2 Dvodimenzionalna diferenčna gelska elektroforeza

Za izoelektrično fokusiranje smo uporabili 24 cm trakove z imobiliziranim gradientom pH (IPG, pH 3-11 NL, GE Healthcare) in velik format poliakrilamidnih gelov (20-26 cm). IPG trakove smo predhodno rehidrirali z rehidracijskim pufrom z dodanim reagentom DeStreak (GE Healthcare; 7 M urea, 2 M tiourea, 2 % CHAPS, 0,5 % IPG pufer, 1,2 % DeStreak reagent, 0,002 % bromofenol modro), kateri izboljša ločbo v bazičnem delu gradienta pH. Vzorec smo pred začetkom fokusiranja odpipetirali v posebne posodice, katere smo pritrdili nad začetek vsakega traku.

Izoelektrično fokusiranje je potekalo po protokolu:

- 150V 3 h
- 300V 3 h
- Gradient do 1000V 1,95 h
- Gradient do 10000V 1,65 h
- 10000V 2,52 h

Po končanem izoelektričnem fokusiranju smo trakove shranili v plastični mapi na -80 °C.

Poliakrilamidne gele smo pripravili dan pred nanosom IPG trakov na gele, saj smo s tem dosegli največjo stopnjo polimerizacije. Poliakrilamidne gele smo pripravili po naslednjem protokolu:

- najprej smo pripravili stojalo za vlivanje gelov (Ettan DALTsix caster, GE Healthcare), kateri mora biti v vodoravnem položaju,
- v vakuumski bučki z magnetnim mešalom smo zmešali vse sestavine (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 40 % akrilamid/bisakrilamid (37,5:1), 10 % SDS in ddH₂O) razen TEMED in APS,
- po 5-10 min mešanja v vakuumu smo dodali še TEMED in 10% APS (0.2 g APS, 2 ml ddH₂O),
- to smo nato prelili v stojalo za vlivanje gelov,
- gele smo nato prelili z 1 mL/gel z elektroforeznim pufrom nasičenega butanola,
- po polimerizaciji, ki je trajala 2 h, smo odlili butanol in gele prekrili s shranjevalnim pufrom (0,375 M Tris pH 8,8, 0,1 % SDS).

Pred nanosom trakov na gele je le te potrebno uravnorežiti. To smo naredili tako, da smo trakove inkubirali v 10 mL pufru za uravnoreženje (6 M urea, 1,5 M Tris-HCl, pH=8,8, 30 % glicerol, 2 % SDS) z dodanim 1 % DTT 15 min. Nato smo pufer odlili in dodali 10 mL pufru za uravnoreženje z dodanim 2,5 % jodoacetamidom za 15 min. Inkubacija je celotni čas potekala z rahlim mešanjem.

Gelom smo pred nanosom trakov odstranili shranjevalni pufer, sprali in postavili v stojalo. Posamezen trak smo nato vzeli iz pufru z jodoacetamidom in ga pomočili v elektroforezni pufer, položili na daljšo stekleno ploščo in ga s pomočjo plastičnega distančnika potisnili do površine gela. Stik med trakom in gelom mora biti čim boljši. Na gel s vstavljenim trakom smo nato odpipetirali 2 mL 0,5 % raztopine agaroze v elektroforeznem pufru in odstranili morebitne mehurčke med gelom in trakom. Ko se je agarozna strdila, smo sestavili aparaturo (DALTsix elektroforeza, GE Healthcare) in priklopili napetost. Elektroforeza je potekala pod naslednjimi pogoji:

- temperatura hladilne tekočine je 25 °C,
- 10 mA/gel 1h,
- 40 mA/gel dokler fronta barvila ni prišla do roba gela.

3.6 SLIKANJE GELOV IN PREGLED REZULTATOV

Po končani elektroforezi smo steklene plošče sprali z ddH₂O in jih popolnoma osušili. Nato smo gele skenirali s čitalcem Ettan DIGE Imager (GE Healthcare). Ekspozicijski čas pri skeniranju smo prilagajali glede na intenziteto lise, saj mora biti intenziteta primerljiva med vsemi tremi kanali. Slike smo najprej naložili v bazo podatkov z modulom ImageLoader in jih nato analizirali s programom DeCyder 2D 6,5 (GE Healthcare).. Detekcijo lis in usklajevanje gelov smo naredili z modulom DIA (detekcija lis ter kvantifikacija proti internem standardu) in nato še z modulom BVA (usklajevanje med geli glede na referenčni gel in primerjalna analiza). Program določi referenčni gel, ki je pravzaprav gel z največ prepoznanimi lisami. Vse ostale gele nato poravnava z njim. Za boljše usklajevanje ročno določimo nekaj lis na gelu, katere nato program uporabi za orientacijo pri usklajevanju. Vse pridobljene rezultate smo nato ročno pregledali in po potrebi popravili. Kvantitativne podatke smo analizirali s t-testom, kjer smo primerjali stopnjo izražanja proteinov med letalnim in blagim izolatom. Podatke smo nato analizirali tudi z modulom EDA, kjer smo vključili tiste lise z statistično značilnostjo $p \leq 0,01$.

3.7 IDENTIFIKACIJA PROTEINOV Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Za identifikacijo proteinov z masno spektrometrijo smo pripravili nove preparativne gele. Najprej smo pripravili nove vzorce po prej navedenem postopku. Vendar smo tokrat uporabili večji količino vzorcev (nad 100 μL) zato smo na začetku dodali 400 μL precipitanta in nato 400 μL ko-precipitanta. Nadaljnji postopek je potekal enako kot v točki 3.4.1. s to razliko, da na koncu vzorcem nismo dodali CyDye barvila.

Za izoelektrično fokusiranje smo uporabili 24cm trakove z imobiliziranim gradientom pH (IPG, pH 3-11 NL, GE Healthcare) in velik format poliakrilamidnih gelov (20-26 cm). IPG trakove smo predhodno rehidrirali s 300 μL rehidracijskega pufra z dodanim reagentom DeStreak (GE Healthcare; 7 M urea, 2 M tiourea, 2 % CHAPS, 0,5 % IPG puffer, 1,2% DeStreak reagent, 0,002 % bromofenol modro) in 150 μL vzorca. To imenujemo rehidracijski nanos proteinov na trak.

Izoelektrično fokusiranje je potekalo po protokolu:

- 150V 3h
- 300V 3h
- Gradient do 1000V 1,95 h
- Gradient do 10000V 1,65 h
- 10000V 3,02h

Sledila je priprava preparativnih gelov. Najprej smo pripravili stojalo za vlivanje gelov (Ettan DALTsix caster, GE Healthcare) po sledečem postopku.

- Vse šipe najprej dobro očistimo,
- Eno izmed šip iz para smo najprej premazali s posebnim premazom za šipe (2500 μL »Bind-silane«, 2800 μL EtOH, 70 μL očetne kisline, 550 μL H₂O), ki nato gel pritrdi na šipo,
- na levi in desni rob premazane šipe nalepimo referenčni nalepki, ter pokrijemo z drugo šipo, katero pred tem očistimo vseh nečistoč,
- nato sestavimo stojalo za vlivanje gelov (Ettan DALTsix Caster, GE Healthcare), kateri mora biti v vodoravnem položaju.

Gele pripravimo po sledečem postopku:

- v vakuumski bučki z magnetnim mešalom smo zmešali vse sestavine (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 40 % akrilamid/bisakrilamid (37,5:1), 10 % SDS in ddH₂O) razen TEMED in APS,
- po 5-10 min mešanja v vakuumu smo dodali še TEMED in APS,
- gele smo nato prelili z 1 mL/gel z elektroforeznim pufrom nasičenega butanola,
- po polimerizaciji, ki je trajala 2 h, smo odlili butanol in gele prekrili s shranjevalnim pufrom (0,375 M Tris pH 8,8, 0,1% SDS).

Preglednica 1: Potrebne količine snovi za pripravo 12,5 % poliakrilamidnega gela

Komponenta	Volumen (za 6 gelov)
ddH ₂ O	148,8 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	87,5 mL
40 % akrilamid/bisakrilamid (37,5:1)	109,2 mL
10 % SDS	3,5 mL
TEMED	119 µL
10% APS	1,75 mL

Pred nanosom trakov na gele je le te potrebno uravnovežiti in nato pripraviti gele s trakovi za elektroforezo. To smo naredili po prej navedenem postopku pri točki 3.5.2.

Med potekom elektroforeze smo pripravili raztopino za barvanje gelov (17 % (NH₄)₂SO₄, 3 % H₃PO₄, 34 % CH₃OH). V 2000 mL čašo najprej odtehtamo 238 g amonijevega sulfata kateremu dodamo 42 mL fosforjeve kisline, ter približno 800 mL ddH₂O. Nato vse skupaj mešamo dokler se amonijev sulfat popolnoma ne raztopi. Ko se (NH₄)₂SO₄ raztopi začnemo med mešanjem počasi dodajati metanol (476 mL).

Gelom po končani elektroforezi odstranimo zgornjo stekleno ploščo ter jih položimo vsakega v svojo posodo v katerih je potekala fiksacija gelov čez noč v raztopini 30 % etanola in 7,5 % očetne kisline. Naslednji dan smo gele spiralis s 600 mL ddH₂O. Gelom smo v eni uri trikrat zamenjali ddH₂O. Ko so geli sprani odstranimo destilirano vodo in gele prelijemo z raztopino za barvanje gelov, ki smo jo pripravili pred tem. Gele pustimo v njej eno uro. Med tem časom odtehtamo 250 mg barvila/pladenj Coomassie Brilliant Blue, katerega nato dodamo v pladnje z gelom, katere ves čas rahlo mešamo. Gele pustimo v barvilu toliko časa, da se lise na njih obarvajo modro in postanejo dobro vidne.

Gele nato ponovno speremo, da odstranimo ostanke barvila. S tem pripravimo gele za skeniranje s skenerjem ImageScanner, ki omogoča skeniranje gelov, obarvanih z vidnimi barvili kot je Coomassie Brilliant. Površinsko skeniranje je primerno za zajem kakovostne slike gela, presewni način skeniranja pa omogoča natančno kvantifikacijo proteinov v primeru barvanja s Coomassie Brilliant Blue. Slike smo nato prenesli v program ImageMaster Platinum (GE Healthcare), kjer smo jih dokončno uredili in določili lise za izrez z robotom Ettan Spot Picker (GE Healthcare). Referenčni nalepki (IR1 in IR2) služita kot osnova za določanje X in Y koordinat posamezne lise in s tem natančen izrez lise iz gela.

Skupno smo izrezali 270 proteinskih lis, od tega 66 lis PG2 in 45 PG1. Analizo z masno spektrometrijo smo opravili na Univerzi York v Angliji. Meritve smo izvajali z spektrometrom MALDI-TOF/TOF. Dobljene rezultate tandemske masne spektrometrije smo nato analizirali s pomočjo algoritmom Mascot matrix – MS/MS ion search in

NCBI/BLAST/proteinBLAST. Za iskanje rezultatov s algoritmom Mascot smo uporabili sledeče parametre:

- Baza proteinov: NCBI_{nr}
- Taksonomija: Druge glive
- Encim: Tripsin
- Dovoljeno eno zgrešeno mesto cepitve
- Fiksne modifikacije: Karbamidometil na cisteinu
- Variabilne modifikacije: Oksidacija metionina
- Peptidna toleranca pri masi: 250 ppm
- Toleranca pri MS/MS: 0,5 Da

Identificiranim proteinom z neznano funkcijo smo s pomočjo BLAST-a poiskali podobnost z homolognimi proteini iz drugih organizmov, da bi lahko predvideli njihovo funkcijo. Sekvence identificiranih proteinov smo analizirali s SignalP (napovedovanje signalnih peptidov). Program vsebuje celoten genom glive *Verticillium albo-atrum* in od skupno 191 identificiranih proteinov je različnih proteinov 91, ter od tega 78 predvidenih ekstracelularnih proteinov s signalnim peptidom.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV

Koncentracijo proteinov v vzorcih smo izmerili z spektrofotometrično metodo po Bradfordu in rezultate podali v $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Za vsak vzorec smo naredili tri ponovitve, nato izračunali povprečje in volumne v katerih je 100 μg proteinov. Izračunane volumne smo nato uporabili pri pripravi vzorcev za dvodimenzionalno elektroforezo.

Preglednica 2: Izmerjene koncentracije in izračunani volumni sekretomskih vzorcev izolatov PG1 in PG2.

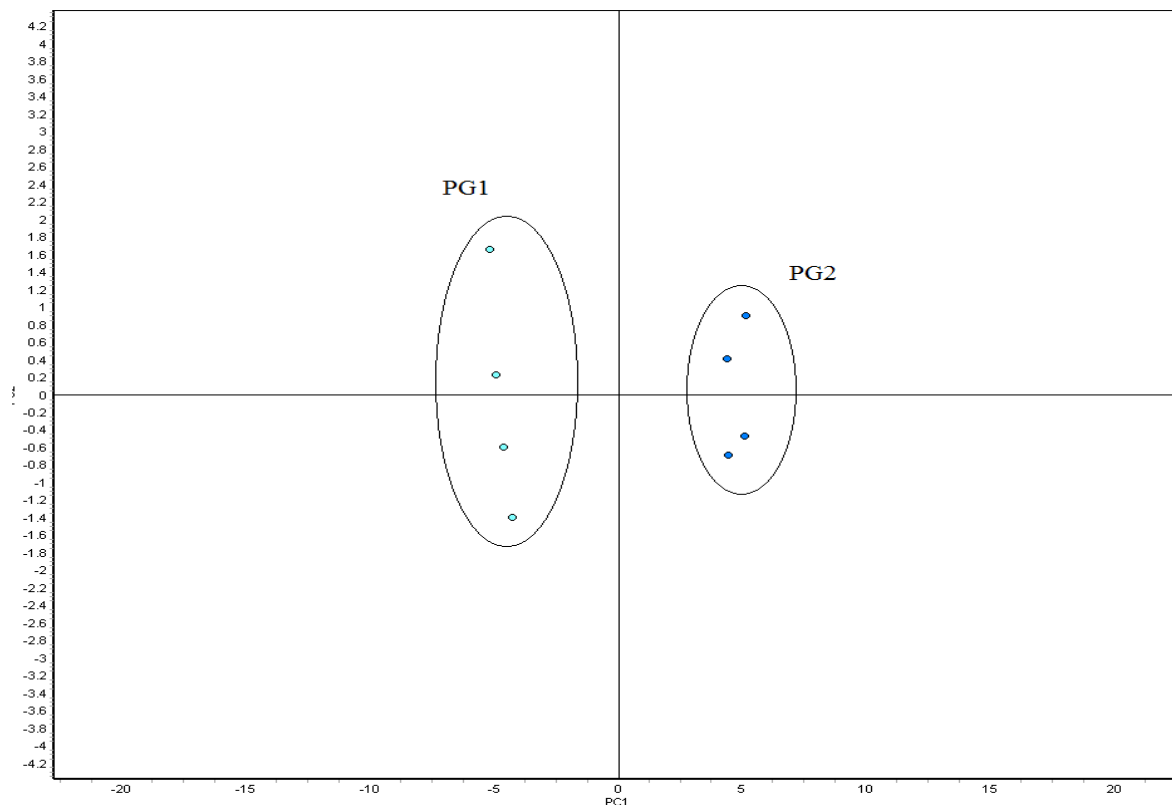
Izolat	Povprečje koncentracij [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	V_{vzorca} ($m_{\text{proteinov}} = 100 \mu\text{g}$)	Izolat	Povprečje koncentracij [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	V_{vzorca} ($m_{\text{proteinov}} = 100 \mu\text{g}$)
PG1a	0,98	102	PG2a	1,77	56
PG1b	0,35	286	PG2b	1,58	64
PG1c	0,63	159	PG2c	1,99	50
PG1d	0,86	116	PG2d	1,09	92
PG1e	1,37	73	PG2e	1,80	56

4.2 ANALIZA SLIK GELOV

Računalniška analiza slik gelov je potekala z programom DeCyder 2D 6,5 (GE Healthcare), kjer smo naredili primerjavo kvantitativnih podatkov med blagim in letalnim izolatom. Program nam pri pregledu slik gelov omogoča vizualno primerjavo posameznih lis na vseh gelih. Najprej program sam poravna vse gele glede na določene koordinate z lisami. Nato ročno preverimo, ali je program pravilno poravnal med sabo določene lise. Če opazimo da so le-ti nepravilno poravnani jih popravimo glede na referenčni gel, ki si ga je program določil sam. Program nam omogoča ogled določene lise v 3D obliki. Na posameznem gelu je bilo detektiranih od 1850 do 2500 lis, avtomatsko usklajenih med geli je bilo od 1400 do 1715 lis, po ročnem preverjanju pa je bilo med vsemi geli usklajeno 785 lis. Statistično značilne razlike v vsebnosti med PG1 in PG2 smo določili za 333 lis. (t-test, $p \leq 0,01$)

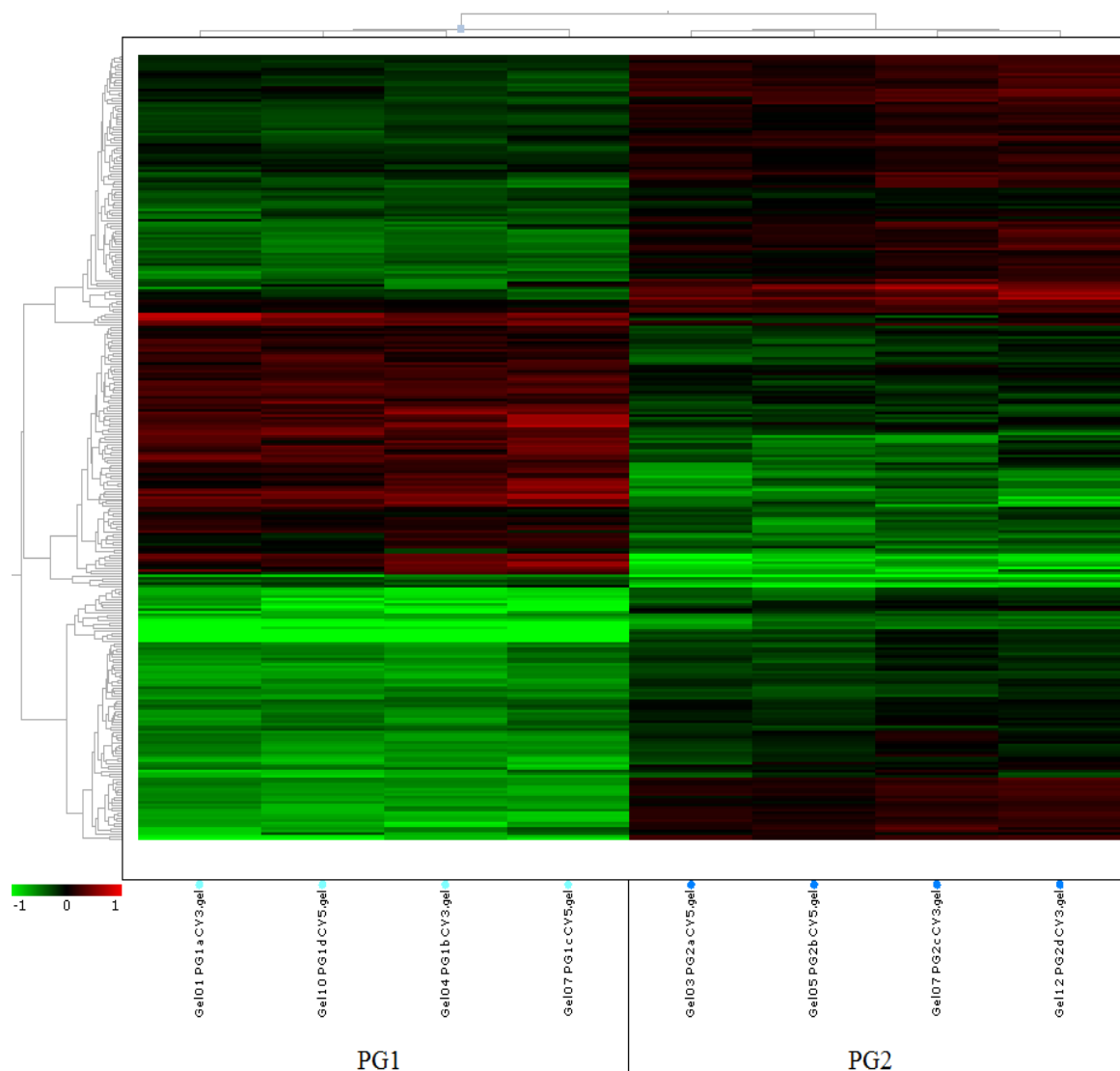
Kvantitativne podatke smo analizirali tudi z metodama PCA in Cluster, pri katerih smo v vhodni set podatkov vključili 302. proteinske lise. Pri analizi z metodo PCA smo uporabili podatke proteinskih lis, katerih količina se statistično značilno spreminja med vzorci ($p \leq 0,01$). PCA analiza nam je pokazala visoko ponovljivost pri bioloških ponovitvah ter občutno razliko med patotipoma PG1 in PG2. Na sliki 4 lahko vidimo, da se ponovitve istega patotipa grupirajo skupaj na grafu, vendar pa so si biološke ponovitve PG1 med sabo bolj različne kot PG2. Patotipa se ločita vzdolž osi PC1, ki pojasnjuje največji del

variabilnosti, torej je izolat oz. patotip tisti dejavnik, ki najbolj prispeva k razlikam v sekretomu.



Slika 4: Grafični prikaz analize PCA slovenskih izolatov PG1 in PG2

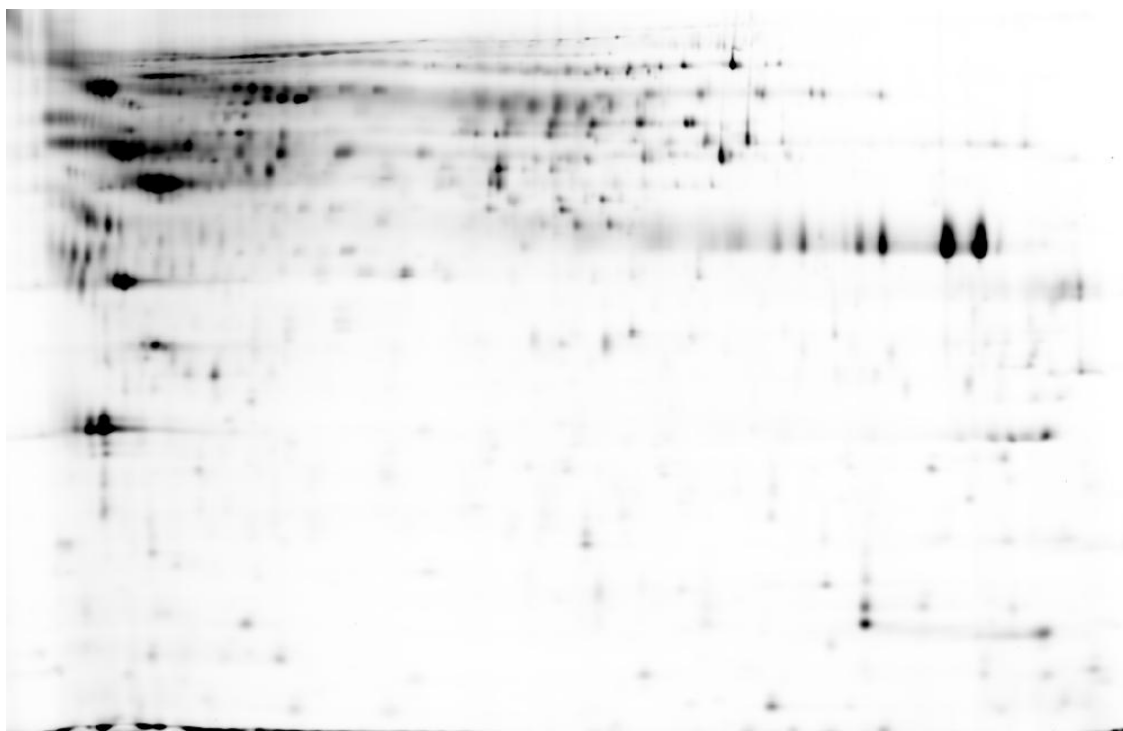
Cluster analiza (Slika 5.) nam prikaže povezanost med posameznimi vzorci PG1 in PG2 glede na profil izražanja, hkrati pa poveže lise s podobnim izražanjem. Vrstice na sliki nam predstavljajo posamezen protein (liso), navpično pa so razvrščeni posamezni geli. Po pričakovanju vzorci PG1 in PG2 tvorijo jasno ločeni skupini, lise pa so se razvrstile v tri približno enako velike skupine.



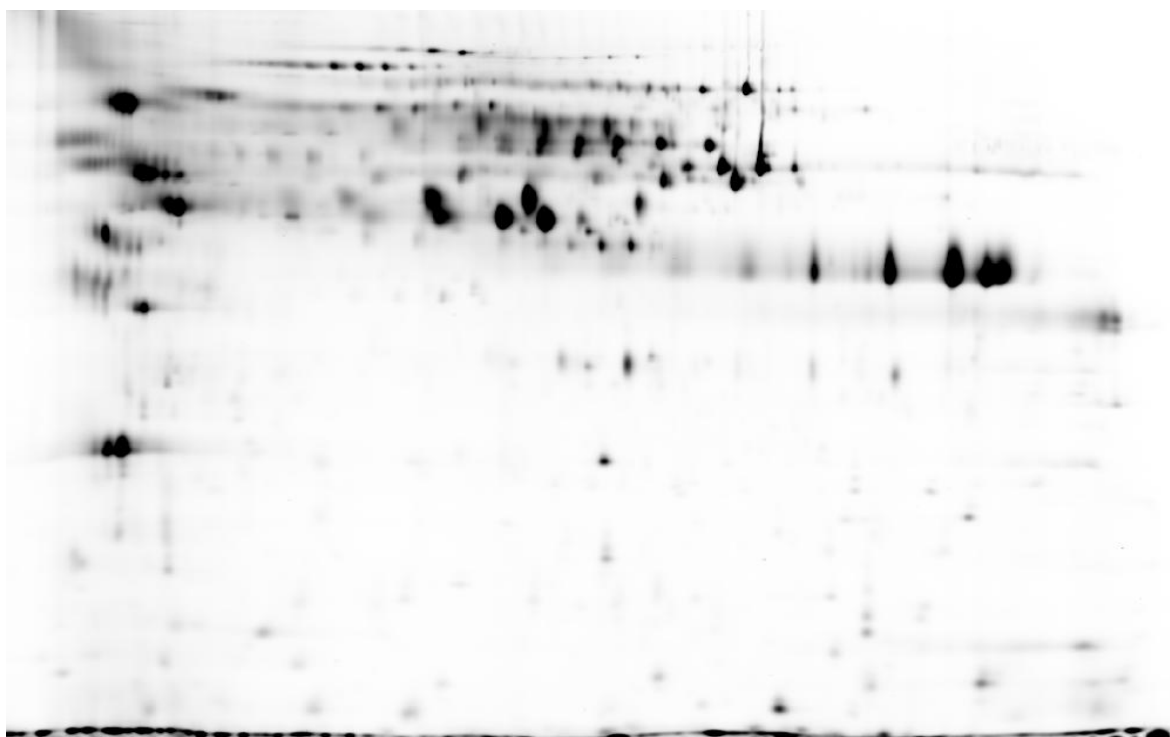
Slika 5: Prikaz hierarhične analize slovenskih izolatov PG1 in PG2 glede na stopnjo izražanja.

4.3 IDENTIFIKACIJA PROTEINOV Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Na podlagi t-testa ($p \leq 0,01$), ponovljivosti in faktorjev razlike smo za izrez iz preparativnih gelov izbrali 270 proteinskih lis za identifikacijo z masno spektrometrijo in algoritmom Mascot MS/MS Ion Search. Masna spektrometrija MALDI-MS/MS je potekala po standardnem protokolu, kjer je bila uporabljena razgradnja proteinskih vzorcev z tripsinom. Izmed 333 proteinskih lis s statistično značilno razliko (t-test, $p \leq 0,01$) v vsebnosti med izolatom smo identificirali 118 proteinskih lis (Preglednica 3, Priloga A), med katerimi jih je bilo 35 z višjo vrednostjo v PG1 in 83 z višjo vrednostjo v PG2.



Slika 6: Proteinski profil sekretoma glive *V. albo-atrum*, sev PG1



Slika 7: Proteinski profil sekretoma glive *V. albo-atrum*, sev PG2

Identifikacija proteinov je potekla s pomočjo algoritma Mascot, funkcijo proteinov pa smo določili s pomočjo baz podatkov NCBI in BLAST. Za šest proteinov, ki so bili identificirani v drugih glivah (*Magnaporthe grisea*, *Verticillium dahliae*,...), smo s pomočja BLAST-a poiskali homologe proteinov v *V. albo-atrum*. Pri vseh smo dobili zadetke z zelo visokim ujemanjem.

Pri identifikaciji posameznih lis na gelih je prišlo do ponavljanja identificiranih proteinov. Določeni ponavljajoči proteini so bili v nekaterih lisah bolj izraženi kot v drugih. Izmed 118 identificiranih lis je bilo identificiranih 45 različnih proteinov. Izmed teh jih je bilo 26 proteinov z višjo vsebnostjo pri letalnem in 14 pri blagem patotipu. Pri petih proteinih se vsebnost pri letalnem in blagem patotipu glive ni statistično razlikovala.

Proteini, katerih se količina poveča pri letalnem patotipu so:

- α -amilaza A tip3, alginat liaza, acetilksilan esteraza, alanin-glioksilat aminotransferaza, β -glukozidaza, manan endo-1,4- β -manozidaza, eksoglukanaza, endohitinaza, endopoligalakturonaza, gama-glutamyltranspeptidaza, glukoamilaza, lipaza, karboksilesteraza, FAD vezavna domena, vezavna domena škroba, nevtralna ceramidaza, protein naddružine PAP2, poligalakturonaza, poligalakturonaza 2, , ricin-B-lektin, ramnogalaturonan acetilesteraza, ramnogalakturonaza B, nekrozni in entilen inducirajoči protein, endoglukanaza 1 in protein celične stene PhiA.

Proteini, katerih se količina poveča pri blagem patotipu so:

- α/β hidrolaza, amidazna družina proteinov, bakterijska levcil aminopeptidaza, D-laktonohidrolaza, karboksipeptidaza, NAD(P)H odvisna D-ksilazna reduktaza, STI35 protein, nukleacijski protein, pektat liaza, polisaharid-deacetilazna proteinska družina, metaloproteinaza, nukleozid difosfat kinaza

Proteini z enako vsebnostjo pri obeh patotipih so:

- ohranjen hipotetični protein, holin dehidrogenaza, 1,3- β -glukanoziltransferaza Gel4, endo-1,4- β -ksilanaza in glukan-1,3- β -glukozidaza

Preglednica 3: Vsi identificirani proteini ($p \leq 0,01$)

Protein AC	T-test	Razmerje PG2/PG1	pI	Mw	Signalni peptid	Ime
EEY19304	0,0089	1,87	5,67	78494	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY19304	0,0097	1,92	5,67	78494	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY17921	0,0086	1,37	9,06	60082	da	β -glukozidaza
EEY17921	0,0068	1,33	9,06	60082	da	β -glukozidaza
EEY15116	0,0092	2,38	5,69	78965	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY15116	0,0019	2,93	5,69	78965	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY15116	0,00091	3,24	5,69	78965	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY15116	0,0034	2,23	5,69	78965	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY15116	0,00091	3,34	5,69	78965	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY15116	0,0016	3,17	5,69	78965	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY21949	0,00087	5,13	6,82	77782	da	Nevtralna ceramidaza
EEY21949	0,0068	2,51	6,82	77782	da	Nevtralna ceramidaza
EEY21949	0,0096	2,23	6,82	77782	da	Nevtralna ceramidaza
EEY16611	0,0055	2,61	5,12	68996	da	Holin dehidrogenaza
EEY16611	0,0031	2,72	5,12	68996	da	Holin dehidrogenaza
EEY16316	0,0068	1,78	4,28	48572	da	Eksoglukanaza
EEY20272	0,00011	10,88	8,43	62329	da	Glukoamilaza
EEY16583	0,0075	-2,6	11,42	40958	da	Holin dehidrogenaza
EEY20272	0,00014	13,22	8,43	62329	da	Glukoamilaza
EEY20836	0,0017	-2,49	10,4	8219	ne	Amidazna družina proteinov
EEY21549	0,00035	-5,38	6,64	65750	ne	Holin dehidrogenaza
EEY21549	0,0016	-3,59	6,64	65750	ne	Holin dehidrogenaza
EEY21549	0,00011	-15,66	6,64	65750	ne	Holin dehidrogenaza
EEY21549	0,00011	-19,44	6,64	65750	ne	Holin dehidrogenaza
EEY22932	0,0092	-2,42	4,57	58575	da	1,3- β -glukanoziltransferaza Gel4
EEY23125	0,0019	-4,74	5,03	60607	ne	Ohranjen hipotetični protein
EEY23125	0,0043	-3,46	5,03	60607	ne	Ohranjen hipotetični protein
EEY22323	0,0056	2,04	6,91	41097	da	Poligalakturonaza
EEY22323	0,0024	1,94	6,91	41097	da	Poligalakturonaza
EEY22323	0,002	3,2	6,91	41097	da	Poligalakturonaza
EEY22950	0,0074	2,06	7,49	49237	da	Eksoglukanaza
EEY18370	0,0011	2,71	5,35	29622	da	Endohitinaza
EEY21866	0,00079	2,49	8,82	55821	da	Lipaza
EEY21866	0,0011	2,08	8,82	55821	da	Lipaza
EEY21866	0,00049	2,27	8,82	55821	da	Lipaza
EEY21866	0,00091	2,21	8,82	55821	da	Lipaza
EEY21866	0,0008	2,44	8,82	55821	da	Lipaza
EEY19316	0,0011	-2,43	4,98	53975	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY21866	0,0069	1,74	8,82	55821	da	Lipaza
EEY21866	0,00032	2,33	8,82	55821	da	Lipaza
EEY21866	0,0012	2,25	8,82	55821	da	Lipaza
EEY21535	0,0067	1,52	5,25	46729	da	Poligalakturonaza
EEY20122	0,00063	3,33	6,44	45601	da	Endo-1,4- β -ksilanaza Z
EEY15099	0,00074	3,55	6,59	37060	da	Acetilsilan esteraza
EEY23542	0,0011	2,68	7,15	50232	da	Ramnogalakturonaza B
EEY23542	0,00011	8,03	7,15	50232	da	Ramnogalakturonaza B
EEY23542	0,00011	7,66	7,15	50232	da	Ramnogalakturonaza B

Se nadaljuje...

Nadaljevanje...

Protein AC	T-test	Razmerje PG2/PG1	pI	Mw	Signalni peptid	Ime
EEY23542	0,00011	6,14	7,15	50232	da	Ramnogalakturonaza B
EEY23542	0,00011	6,37	7,15	50232	da	Ramnogalakturonaza B
EEY17221	0,00033	3,56	8,08	45126	da	Karboksilesteraza
EEY17826	0,0015	2,04	6,36	50248	ne	Manan endo-1,4- β -manozidaza
EEY17221	0,00012	4,81	8,08	45126	da	Karboksilesteraza
EEY17221	0,00017	5,3	8,08	45126	da	Karboksilesteraza
EEY17221	0,00012	5,21	8,08	45126	da	Karboksilesteraza
EEY21027	0,0031	2,2	5,1	39986	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY23944	0,00095	2,66	8,54	52373	da	FAD vezavna domena
EEY22503	0,0015	-3,04	5,52	40012	da	D-laktonohidrolaza
EEY23944	0,00087	2,86	8,54	52373	da	FAD vezavna domena
EEY22503	0,0068	-2,58	5,52	40012	da	D-laktonohidrolaza
EEY23944	0,001	3,58	8,54	52373	da	FAD vezavna domena
EEY16687	0,00092	3,22	8,62	43953	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY23931	0,00031	-2,8	4,92	40173	da	Pektat liaza
EEY19375	0,00017	5,38	8,1	43554	da	Vezavna domena škroba –vsebuje protein
EEY17773	0,0025	2,06	6,71	40788	da	Protein naddružine PAP2
EEY17773	0,0016	4,77	6,71	40788	da	Protein naddružine PAP2
EEY21307	0,00015	7,75	5,61	43063	da	Izločen protein (Alginat liaza)
EEY21157	0,0035	2,76	6,08	51359	da	α -amilaza A tip 3
EEY22322	0,00011	24,07	5,89	42922	da	Poligalakturonaza 2
EEY21587	0,0062	2,13	7,62	53212	ne	Ohranjen hipotetični protein
EEY22322	0,00011	20,04	5,89	42922	da	Poligalakturonaza 2
EEY21587	0,0026	-3,48	7,62	53212	ne	Ohranjen hipotetični protein
EEY17284	0,006	1,48	6,28	42453	ne	Alanin-glioksilat aminotransferaza
EEY23412	0,00011	2,27	6,67	41440	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY23412	0,00011	2,16	6,67	41440	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY20327	0,00091	1,92	8,68	38446	da	Endopoligalakturonaza
EEY20327	0,0004	2,19	8,68	38446	da	Endopoligalakturonaza
EEY20327	0,0025	1,61	8,68	38446	da	Endopoligalakturonaza
EEY22980	0,0022	-4,27	4,88	39570	da	Karboksipeptidaza A4
EEY23667	0,0016	1,61	4,75	45757	da	Glukan 1,3- β -glukozidaza
EEY23667	0,007	-1,43	4,75	45757	da	Glukan 1,3- β -glukozidaza
EEY19810	0,0016	-7,67	7,71	37295	da	α/β - hidrolaza
EEY17054	0,0078	-2,27	5,28	41915	da	Bakterijska levcil aminopeptidaza
EEY17737	0,0012	-2,95	6,01	37443	ne	NAD(P)H-odvisna D-ksilozna reduktaza
EEY16472	0,0008	2,76	10,55	16752	da	Ricin B lektin: Paralelna ponovitev β -verige
EEY15759	0,00015	2,16	6,88	25031	da	Ramnogalakturonan acetilesteraza
EEY15257	0,0027	2,68	9,11	35287	da	Pektinesteraza
EEY23400	0,0027	-2,68	6,97	38224	da	Endo-1,4- β -ksilanaza
EEY17799	0,0012	-12,43	6,17	31168	da	STI35 protein
EEY19702	0,0019	-2,23	5,93	42269	da	Bakterijska levcil aminopeptidaza
EEY19702	0,0089	-1,42	5,93	42269	da	Bakterijska levcil aminopeptidaza
EEY21729	0,00033	-3,84	8,62	34191	da	Pektat liaza B
EEY17799	0,00087	-4,77	6,17	31168	ne	STI35 protein
EEY21779	0,00078	2,66	4,96	60238	da	Gama-glutamil transpeptidaza
EEY21779	0,00032	2,81	4,96	60238	da	Gama-glutamil transpeptidaza

Se nadaljuje...

Nadaljevanje...

Protein AC	T-test	Razmerje PG2/PG1	pI	Mw	Signalni peptid	Ime
EEY17799	0,00084	-3,87	6,17	31168	ne	STI35 protein
EEY21549	0,0021	2,53	6,64	65750	ne	Holin dehidrogenaza
EEY23484	0,0044	2,91	7,88	26319	da	Acetilesteraza
EEY19377	0,00011	-8,87	4,71	37954	da	Ohranjen hipotetični protein (tirozinaza)
EEY21027	0,0043	-3,6	5,1	39986	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY21027	0,0032	-3,43	5,1	39986	da	Ohranjen hipotetični protein
EEY19234	0,0046	1,64	5,42	25298	da	Nekrozni in etilen inducirajoč protein
EEY22044	0,0011	-5,36	4,94	39341	da	Nukleacijski protein
EEY19383	0,00086	-3,36	9,68	26764	da	Polisaharid-deacetilazna proteinska družina
EEY17001	0,00015	19,68	8,53	25319	da	Endoglukanaza-1
EEY15123	0,0021	-5,48	5,54	38013	da	Metaloproteinaza
EEY16769	0,0021	2,62	7,77	26418	da	Endo-1,4- β -ksilanaza
EEY21558	0,00035	-4,76	6,21	18959	ne	Nukleozid difosfat kinaza
EEY18971	0,00057	6,56	8,5	14083	da	Napovedani protein
EEY23667	0,00099	3,93	4,75	45757	da	Glukan 1,3- β -glukozidaza
EEY21558	0,00089	-5,15	6,21	18959	ne	Nukleozid difosfat kinaza
EEY16392	0,00095	2,34	4,89	19618	da	Protein celične stene PhiA
EEY15759	0,0004	2,58	6,88	25031	da	Ramnogalakturonan acetilesteraza
EEY15759	0,00032	2,62	6,88	25031	da	Ramnogalakturonan acetilesteraza
EEY22503	0,0019	-3,34	5,52	40012	da	D-laktonohidrolaza
EEY22323	0,0014	3,14	6,91	41097	da	Poligalakturonaza
EEY22323	0,0015	2,41	6,91	41097	da	Poligalakturonaza
EEY22932	0,001	2,37	4,57	58575	da	1,3- β -glukanoziltransferaza Gel4
EEY22322	0,00015	16,47	5,89	42922	da	Poligalakturonaza 2

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Rastlinska celična stena lahko vsebuje tudi do 90 % polisaharidnih komponent, katere na grobo razdelimo v tri skupine: celuloza, hemiceluloza in pektin. Celuloza predstavlja večinsko komponento polisaharidov celične stene in je sestavljena iz linearnega polimera β -1,4-vezane D-glukoze. Celulozni polimeri so povezani v urejene linearne strukture. Hemiceluloza je glede na zgradbo bolj heterogen polisaharid in predstavlja drugo najpomembnejšo komponento rastlinske celične stene. Ksilan je eden izmed hemiceluloznih polimerov, katerega najdemo v žitaricah in olesenelih rastlinah. Sestavljen je iz β -1,4-vezane D-ksilozne glavne verige, katero lahko dopolnjujejo različne stranske verige L-arabinoze, D-galaktoze, acetil, feruloil, p-kumaroil in komponente glukuronske kisline. Drug najpogostejši predstavnik hemiceluloz je (galakto)glukomanan, katerega glavna veriga je sestavljena iz β -1,4-vezanih D-manoznih in D-glukoznih komponent z D-glukoznimi stranskimi vezavami. Ksiloglukani so prisotni v celični steni enokaličnic in dvokaličnic. Sestavljeni so iz glavne β -1,4-vezane D-glukozne verige na kateri je vezana D-ksilozna, na to pa se lahko vežejo še L-arabinozne in D-galaktozne komponente. Ksiloglukani se z vodikovimi vezmi povežejo z celuloznimi mikrofibrili, ter s tem pripomorejo k stabilnosti celične stene. Pektin spada v zadnjo skupino heteropolisaharidov, ki sestavljajo rastlinsko celično steno. Osnovna veriga pektina je sestavljena iz galakturonskih kislin, povezanih z α -1,4-glikozidno vezjo. Na določenih mestih je na dolgo glavno verigo vezan α -1,2 ramnozni ostanek. Dolge stranske verige so v večini sestavljene iz arabinoznih in galaktoznih komponent, katere se vežejo na ramnozno verigo. Hemicelulozni in pektinski polisaharidi kot tudi lignin, se povezujejo z celuloznimi vlakni in s tem odtirajo celotno strukturo celične stene. Kovalentne povezave med njimi vplivajo tudi na omejeno celično rast in zmanjšujejo možnost razgradnje celične stene (de Vries in sod. 2001).

Kvantitativna analiza podatkov blagega in letalnega izolata glive *V. albo-atrum* iz Slovenije, je pokazala veliko razliko med identificiranimi proteini v sekretomu posameznega izolata.

Pri letalnemu patotipu glive *V. albo-atrum* lahko opazimo povečano izločanje encimov, ki razgrajujejo komponente rastlinske celične stene. Predvsem izstopa povečana količina izločene poligalakturonaze 2 (v treh lisah) in endoglukanaze 1. Poligalakturonaza je bila identificirana v petih lisah, vendar v primerjavi s poligalakturonazo 2 v zelo nizkih količinah. Sicer je funkcija obeh poligalakturonaz popolnoma enaka in sicer razgradnja poligalakturonana v rastlinski celični steni. Le ta je ena izmed glavnih komponent pektina. Encim deluje tako, da s hidrolizo glikozidnih vezi, ki se nahajajo med galakturonskimi kislinami, razgradi poligalakturonan. Poligalakturonaze, ki jih tvorijo rastline sodelujejo

pri zorenju le-teh, v primeru da jih tvorijo glive ali bakterije pa povzročajo gnitje rastlin. Fitopatogeni jih izločajo v rastlinsko tkivo in s tem povzročijo razgradnjo pektina v rastlinski celični steni. Ta proces jim omogoči izločanje metabolnih encimov v rastlino in s tem dostop do hranilnih snovi (Jones in sod., 1972). Mussell in sod. (1969) so uspešno dokazali, da je izločanje poligalakturonaze v gostiteljsko rastlino in njeno delovanje na celično steno eden izmed ključnih dejavnikov za uspešnost patogenost glive. V poskus so vključili glivi *V. albo-atrum* in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, za gostiteljski rastlini so uporabili paradižnik in bombaž. Prisotnost in aktivnost encima ter razrast gliv so dokazali pri vseh občutljivih rastlinskih koščkih (rastline so bile pred okužbo z glivama poškodovane) in pri nepoškodovanih rastlinskih odrezkih. Vendar pa pri odrezkih, kateri so bili odporni na delovanje gliv zaznali razrast glive po stebelu vendar nobene encimske aktivnosti ali znakov infekcije.

Obstajajo štirje razredi encimov, ki sodelujejo pri razgradnji celuloze v rastlinski celični steni (de Vries in sod., 2001). Izmed teh smo v letalnem izolatu PG2 identificirali tri. Količina izolirane endoglukanaze 1 izstopa v primerjavi z količino β -glukozidaze (dve lisi) in eksoglukanaze. Endoglukanaze cepijo celulozno verigo predvsem v bolj razvejanih amorfnih regijah. To omogoča celobiohidrolazi lažji dostop do razvejanih koncev za ponovno cepitev. Na koncu β -glukozidaza hidrolizira celobiozo do glukoze, ki se nato uporabi v metabolizmu glive kot vir ogljika (Aro in sod., 2005). Eksoglukanaza sprosti glukozo iz celuloze in glukooligosaharidov. Slednji nastanejo pri hidrolizi celuloze s strani endoglukanaze. Razlikovanje med eksoglukanazo in celobiohidrolazo pogosto ni enostavno zaradi različnih metod preučevanja teh encimov. Značilnost endoglukanaze in β -glukozidaze je, da lahko cepita tudi glavno verigo ksiloglukana (de Vries in sod., 2001).

Pri izolatu PG2 smo v petih lisah identificirali ramnogalakturonazo B, katera deluje na razvejane dele pektina, katerih ni mogoče razgraditi s pomočjo klasičnih pektinolitičnih encimov. RG-aze hidrolizirajo (1 \rightarrow 2) vez med galakturonsko kislino in ramnozilom znotraj ramnogalaturonanske verige (Mutter in sod., 1996). V isto skupino encimov spada tudi identificirana ramnogalakturonan acetilesteraza (RGAE). Njeno delovanje je specifično usmerjeno na hidrolizo acetil-esterskih modifikacij na razvejanih koncih pektina. Deacetilacija glavne verige s strani RGAE omogoči drugim encimom dostop do glavne glikozidne verige. Aktivno mesto encima je odprta reža, ki vsebuje katalitski trojček serin, histidin in aspartat. Ker se osnovna struktura zviije v $\alpha/\beta/\alpha$ zgradbo, je reža z njimi v postavljen bolj proti centrali paralelni β strukturi. Zaradi svoje specifične strukture ne spada med α/β hidrolaze (Mølgaard in sod., 2000).

Pektat liaza identificirana pri PG1 je encim, ki sodeluje pri mehčanju rastlinske celične stene. Deluje ob prisotnosti kalcijevih ionov in sicer tako, da reže de-esterificiran pektin, kateri sestavlja rastlinsko celično steno, in tvori oligosaharide z nenasičenimi galakturonozilnimi ostanki na nereducirajočih koncih (Marin-Rodríguez in sod., 2002).

Crawford in sod. (1987) so dokazali, da pri rasti na mediju iz pektina, fitopatogena gliva *Fusarium solani* f. sp. *lisi* izloča pektat liazo.

Čprav smo holin dehidrogenazo identificirali tako pri PG1 kot pri letalnemu PG2, je količina izraženega encima v PG1 lisah veliko večja. Pri blagem patotipu smo identificirali pet lis in pri PG2 tri lise. Holin dehidrogenaza katalizira štiri elektronsko oksidacijo holina v glicin-betain preko betain-aldehid intermediata. Spada v GMC (glukoza-metanol-holin) oksidoredukcijsko družino, ki je sestavljena iz homolognih proteinov z različno katalitično aktivnostjo.

Pri obeh sevih pa smo tudi identificirali β -1,3-glukanoziltransferazo. β -1,3-glukan je glavna gradbena komponenta v celični steni glive. Sintetizirajo se v glukan sintaznem kompleksu na plazemski membrani. Neosintetizirani glukani se nato prenesejo v periplazemski prostor, kjer se razvejajo in kovalentno vežejo z drugimi elementi v celični steni in tako tvorijo grobo tri-dimenzionalno strukturo. β -1,3-glukanoziltransferaze so bile identificirane pri preučevanju *Aspergillus fumigatus*. Klasificirali so jih kot unikatno družino. Ti encimi cepijo β -1,3 vez v β -1,3-glukan oligosaharidih z vsaj 10 glukoznimi enotami. Novo nastal reduciran konec (več kot pet glukoznih enot) prenesejo na ne-reducirajoči konec drugega β -1,3-glukan oligosaharida. S tem pride do podaljšanja drugega β -1,3-glukana (Gastebois in sod., 2010).

5.2 SKLEPI

Na podlagi primerjave sekretornih proteinov blagega in letalnega izolata fitopatogene glive *Verticillium albo-atrum*, katero smo gojili na hranilnem gojišču, ki simulira sestavo hranil v ksilemskem soku rastlin in s tem okolje glive v času rasti in kolonizacije rastline, smo ugotovili:

- da obstajajo razlike v količini in tipu izločenih proteinov glede na posamezen patotip,
- pri patogenemu izolatu smo identificirali v večini vse proteine kot pomembne encime, ki sodelujejo pri razgrajevanju komponent rastlinske celične stene in s tem k uničenju rastline. Identificiranih je bilo tudi nekaj proteinov, ki sodelujejo v metabolnih poteh,
- pri blagem izolatu PG1 je izstopala predvsem koncentracija identificirane holin dehidrogenaze, katera je bila sicer v veliko manjših količinah identificirana tudi pri PG2. Identificirana smo tudi α/β hidrolazno družino, ter pektat liazo, vendar v primerjavo z količino identificiranih proteinov, ki sodelujejo v razgradnji rastlinske celične stene pri PG2 lahko vidimo veliko razliko,

- pri obeh izolatih pa smo identificirali tudi veliko število ohranjenih hipotetičnih proteinov, kar je verjetno posledica tega, da je genomsko zaporedje vneseno v podatkovno bazo NBCInr dokaj novo in s tem tudi nepopolno.

Glede na zgoraj navede ugotovitve lahko potrdimo delovne hipoteze, ki smo si jih postavili pred pričetkom proteomske analize sekretoma.

6 POVZETEK

Vaskularna uvelost, ki jo povzroča talna fitopatogena *Verticillium albo-atrum* je ena izmed najbolj razširjenih in uničujočih bolezni hmelja. *V. albo-atrum* okuži žilni sistem rastline, kar predstavlja velik problem, saj do sedaj noben znan fungicid ne deluje na tem mestu in se rastline zaradi tega ne more predčasno zavarovati. Blaga oblika hmeljeve uvelosti vsako leto spreminja intenzivnost okužbe in redko povzroči smrt rastline. Letne klimatske spremembe nimajo vpliva na delovanje letalne oblike, ki povzroči resne simptome katerim sledi uvelost in smrt rastline.

Fitopatogene glive kot je *Verticillium albo-atrum* v procesu patogeneze uporabljajo številne ekstracelularne proteine, ki so pogosto odločilnega pomena za uspeh okužbe rastline. Gojenje glive je potekalo na gojišču SXM, ki je bilo zasnovano kot približek sestave hranil v ksilemskem soku rastline, ki je naravno okolje glive. Kot vir ogljika je v gojišču prisoten samo natrijev polipektat, ki simulira prisotnost rastlinske celične stene.

Primerjava sekretomov blagega in letalnega patotipa je potekala s pomočjo dvodimenzionalne diferenčne elektroforeze in kasnejšo identifikacijo proteinov s pomočjo masne spektrometrije. Dobljeni rezultati identificiranih proteinov so pokazali veliko razliko med sekretomom blagega in letalnega izolata *V. albo-atrum*. Pri letalnem patotipu smo identificirali 26 različnih proteinov in pri blagemu 14. Identificirani proteini pri PG2 so v večini encimi, ki so potrebni za razgradnjo komponent rastlinske celične stene in proteini, ki sodelujejo v metabolnih procesih. Predvsem je bila visoka koncentracija poligalakturonaze 2, ki sodeluje pri cepitvi pektina. Pri blagemu izolatu je izstopala predvsem koncentracija pektat liaze, ki je bila edini encimi, ki deluje na pektin in s tem mehča celično steno rastline. Holin dehidrogenaza je bila sicer identificirana tako pri letalnemu kot blagemu patotipu, vendar je količina izražene encima pri blagemu izolatu veliko večje kot pri letalnemu. Sicer je bila pri blagem patotipu identificirana tudi α/β hidrolaza. Pri obeh izolatih smo identificirali β -1,3-glukanoziltransferazo, ki sodeluje pri formaciji micelija glive.

Glede na dobljene rezultate identificiranih proteinov in njihovo koncentracijo lahko jasno vidimo ključno razliko med letalnim in blagim sevom *Verticillium albo-atrum*. Ta je predvsem v koncentraciji in številu sekretornih proteinov, ki razgrajujejo celično steno in s tem omogočajo glivi dostop do ksilemskih žil, kjer se lahko nato razmnožuje in raste.

7 VIRI

- Anderluh G. 2002. Bioinformatika - iskanje igle v kopici sena. Kvardkadabra. 16.
<http://www.kvardkadabra.net/index.html?/biologija/teksti/bioinformatika.htm> (17.8.2011)
- Ashworth L.J., McCutcheon O.D., George A.G. 1972. *Verticillium albo-atrum*: the Quantitative relationship between inoculum density and infection of cotton. *Phytopathology*, 62: 901-903
- Aro N., Pakula T., Penttilä M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 719-739
- Baldwin M.A. 2004. Protein identification by mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3:1-9
- Bhadauria V., Banniza S., Wang L.X, Wei Y.D., Peng Y.L. 2010. Proteomic studies of phytopathogenic fungi, oomycetes and their interactions with hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 81-95
- Brewis I.A., Brennan P. 2010. Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins. V: *Advances in protein chemistry and structural biology*. Donev R. (ur). Swansea, Elsevier: 1-44
- Cao T., Kim Y.M., Kav N.N.V, Strelkov S.E. 2009. A proteomic evaluation of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Proteomics*, 9: 1177-1196
- Cargile B.J., Sevinsky J.R., Essader A.S., Stephenson J.L., Bundy J.L. 2005. Immobilized pH gradient isoelectric focusing as a first dimension separation in shotgun proteomics. *Journal of Biomolecular Techniques*, 16, 3:181-189
- Crawford S.M., Kolattukudy P.E. 1987. Pectate lyase from *Fusarium solani* f. sp. *pisi*: Purification, characterization, *in vitro* translation of the mRNA, and involvement in pathogenicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 258, 1: 196-205
- Duplessis S., Kuhn H. 2008. Secretomic climax in plant-fungal interactions. *New Phytologist*, 179, 4: 907-910
- DeSavigny T. 2005. *Verticillium albo-atrum*. North Carolina State University.
http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/alboatrum/Verticillium_albo-atrum.html
(15.8.2011)

- El-Bebany A.F., Rampitsch C., Daayf F. 2010. Proteomic analysis of the phytopathogenic soilborn fungus *Verticillium dahliae* reveals differential protein expression in isolates that differ in aggressiveness. *Proteomics*, 10: 289-303
- Fradin E.F., Thomma B.P.H.J. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7: 71-86
- Fradin E.F., Zhang Z., Juarez Ayala J.C., Castroverde C.D.M., Nazar R.N, Robb J., Liu C.M., Thomma B. P. H. J. 2009. Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by Tomato Vell1. *Plant Physiology*, 150: 320-332
- Gastebois A., Fontaine T., Latgé J.P., Mouyna I. 2010. $\beta(1-3)$ Glucanoyltransferase Gel4p Is Essential for *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 9, 8: 1294-1298
- GE Healthcare. 2004. 2-D Electrophoresis Principals and methods. Little Chalfont. GE Healthcare UK Ltd.
http://www.gelifesciences.com/apatrix/upp01077.nsf/Content/2d_electrophoresis~2delectrophoresis_handbook (17.8.2011)
- Graves P.R., Haystead T.A.J. 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 1: 39-63
- Harris R.V. 1927. A wilt diseases of hops. East Malling Research Station Annual Report for 1925, II Supplement: 92-93
- Jamnik P., Radišek S., Javornik B., Raspor P. 2006. 2-D separation of *Verticillium albo-atrum* proteins. *Acta agriculturae Slovenica*, 87, 2: 455-460
- Jones T. M., Anderson A. J., Albersheim P. 1972. Host-pathogen interactions IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological Plant Pathology*, 2, 2:153-166
- Kim Y., Nandakumar M.P., Marten M.R. 2007. Proteomics of filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, 25, 9: 395-400
- Klosterman S.J., Atallah Z.K., Vallad G.E., Subbarao K. 2009. Diversity, pathogenicity and management of *Verticillium* species. *The Annual Review of Phytopathology*, 47: 39-62
- Kočevár N., Komel R. 2008. Preiskava bolezenskih proteomov z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo in masno spektrometrijo. *Medicinski razgledi*, 47: 193-203

- Mandelc S. 2010. Proteomska analiza povzročiteljev hmeljeve uvelosti (*Verticillium* spp.) in diferencialno izraženih proteinov v hmelju po okužbi s patotipom PG2 *Verticillium albo-atrum*. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 98 str.
- Mandelc S., Radišek S., Jamnik P., Javornik B. 2009. Comparison of mycelial proteomes of two *Verticillium albo-atrum* pathotypes from hop. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 159-171
- Mandelc S., Radišek S., Jamnik P., Javornik B. 2007. Proteomic analysis of the fungus *Verticillium albo-atrum*. V: Zbornik predavanj in referatov 8. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Radenci 6-7 marec 2007, Ljubljana, Maček J. (ur), Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 300-303 str.
- Mansoori B., Smith C.J. 2005. Elicitation of ethylene by *Verticillium albo-atrum* phytotoxins in potato. *Journal of Phytopathology*, 153, 3: 143-149
- Marin-Rodríguez M.C., Orchard J., Seymour B.G. 2002. Pectat lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, 53, 377: 2115-2119
- Marouga R., David S., Hawkins E. 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Journal*, 382: 669-678
- Mølgaard A., Kauppinen S., Larsen S. 2000. Rhamnogalacturonan acetyltransferase elucidates the structure and function of the new family of hydrolases. *Structure*, 8, 4: 373-383
- Mussell H. W., Green Jr. R. J. 1969. Host colonization and polygalacturonase production by two tracheomycotic fungi. *Phytopathology*, 60:192-195
- Mutter M., Colquhoun I.J., Schols H.A., Beldam G., Viragen G.J. 1996. Rhamnogalacturonase B from *Aspergillus aculeatus* is a rhamnogalacturonan α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D galactopyranosyluronide lyase. *Plant Physiology*, 110: 73-77
- Neumann M.J., Dobinson K.F. 2003. Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genet and Biology*, 38, 1: 54-62
- O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 10: 4007-4021

- Ouzunis C.A., Valencia A. 2003. Early bioinformatics: the birth of a disciplin- a personal view. *Bioinformatics*, 19, 7:2176-2190
- Pantou M P., Strunnikova O.K., Shaknazarova V.Y., Vishnevskaya N.A., Papalouka V.G., Typas M.A. 2005. Molecular and immunochemical phylogeny of *Verticillium* species. *Mycological Researc*, 109, 8: 889-902
- Paper J.M., Scott-Craig J.S., Adhikari N.D., Cuomo C.A., Walton J.D. 2007. Comparative proteomics of the extracellular proteins *in vitro* and *in planta* from pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Proteomics*, 7: 3171-3183
- Pegg G.F. 1965. Phytotoxin production by *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold. *Nature*, 208, 5016: 1228-1229
- Pegg G.F., Brady B.L. 2002. *Verticillium* Wilts. Wallingford, CABI Publishing
- Radišek S., Javornik B. 2006. Preučevanje fitopatogenih vrst gliv iz rodu *Verticillium albo-atrum*. Društvo za varstvo rastlin. (15.10.2011)
http://www.dvrs.bf.uni-lj.si/Radisek_Dvrs_09.pdf
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2006. Genetic variability and virulenc among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *European Journal of Plant Pathology*, 116:301-314
- Rabilloud T., Chevallett M., Luche S., Lelong C. 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and futur. *Journal of proteomics*, 73: 2064-2077
- Rampitsch C., Bykova N.V., McCallum B., Beimcik E., Ens W. 2006. Analysis of the wheat and *Puccinia tricina* (leaf rust) susceptible host-pathogen interaction. *Proteomics*, 6, 6: 1897-1907
- Shah P., Atwood III. J.A., Orlando R., Mubarek H.E., Podila G.K., Davis M.R. 2009. Comparaative proteomic analysis of *Botrytis cinerea* secretom. *Journal of Proteome Research*, 8, 1123-1130
- de Vries P.D., Visser J. 2001. Apergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular biology reviews*. 65,4:497-522
- Wang J. Y., Cai Y., Gou J. Y., Mao Y. B., Xu Y. H., Jiang W. H., Chen X.Y. 2004. VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4989-4995

Preskar V. Primerjalna proteomska analiza sekretoma blagega in letalnega...glive *Verticillium albo-atrum*.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2012

Wittmann-Liebold B., Graack H.R., Pohl T. 2006. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics*, 6, 17:4688-4703

Yajima W., Kav N.N.V. 2006. The proteome of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Proteomics*, 6: 5995-6007

ZAHVALA

Mentorici prof.dr. Branki Javornik in somentorju asist. dr. Stanislavu Mandelcu se zahvaljujem za podporo in pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi doc. dr. Poloni Jamnik za skrben pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi svoji družini, ki mi je stala ob strani in nudila podporo skozi vsa študijska leta.

PRILOGA A

Dodatni podatki o identificiranih proteinih v *Verticillium albo-atrum*.

Protein AC	Ime	Razmerje PG2/PG1	pI	Mw	Signalni peptid	Rezultati	Število peptidov
EEY19304	Ohranjen hipotetični protein	1,87	5,67	78494	da	181	4
EEY19304	Ohranjen hipotetični protein	1,92	5,67	78494	da	188	4
EEY17921	β -glukozidaza	1,37	9,06	60082	da	182	4
EEY17921	β -glukozidaza	1,33	9,06	60082	da	293	5
EEY15116	Ohranjen hipotetični protein	2,38	5,69	78965	da	344	3
EEY15116	Ohranjen hipotetični protein	2,93	5,69	78965	da	343	3
EEY15116	Ohranjen hipotetični protein	3,24	5,69	78965	da	399	4
EEY15116	Ohranjen hipotetični protein	2,23	5,69	78965	da	517	4
EEY15116	Ohranjen hipotetični protein	3,34	5,69	78965	da	472	6
EEY15116	Ohranjen hipotetični protein	3,17	5,69	78965	da	621	6
EEY21949	Nevtralna ceramidaza	5,13	6,82	77782	da	527	7
EEY21949	Nevtralna ceramidaza	2,51	6,82	77782	da	312	4
EEY21949	Nevtralna ceramidaza	2,23	6,82	77782	da	785	8
EEY16611	Holin dehidrogenaza	2,61	5,12	68996	da	224	3
EEY16611	Holin dehidrogenaza	2,72	5,12	68996	da	155	3
EDJ94098	Eksoglukanaza	1,78	5,04	50004	da	179	3
EEY20272	Glukoamilaza	10,88	8,43	62329	da	51	1
EEY16583	Holin dehidrogenaza	-2,6	11,42	40958	da	143	4
EEY20272	Glukoamilaza	13,22	8,43	62329	da	256	3
EEY20836	Amidazna družina proteinov	-2,49	10,4	8219	ne	72	1
EEY21549	Holin dehidrogenaza	-5,38	6,64	65750	ne	340	4
EEY21549	Holin dehidrogenaza	-3,59	6,64	65750	ne	206	2
EEY21549	Holin dehidrogenaza	-15,66	6,64	65750	ne	184	2
EEY21549	Holin dehidrogenaza	-19,44	6,64	65750	ne	165	2
EEY22932	1,3- β -glukanoziltransferaza Gel4	-2,42	4,57	58575	da	135	2
EEY23125	Ohranjen hipotetični protein	-4,74	5,03	60607	ne	347	4
EEY23125	Ohranjen hipotetični protein	-3,46	5,03	60607	ne	506	6
EEY22323	Poligalakturonaza	2,04	6,91	41097	da	101	1
EEY22323	Poligalakturonaza	1,94	6,91	41097	da	81	1
EEY22323	Poligalakturonaza	3,2	6,91	41097	da	54	1
EEY22950	Eksoglukanaza	2,06	7,49	49237	da	194	2
EEY18370	Endohitinaza	2,71	5,35	29622	da	210	4
EEY21866	Lipaza	2,49	8,82	55821	da	222	2
EEY21866	Lipaza	2,08	8,82	55821	da	255	4
EEY21866	Lipaza	2,27	8,82	55821	da	344	5
EEY21866	Lipaza	2,21	8,82	55821	da	244	4
EEY21866	Lipaza	2,44	8,82	55821	da	163	2
EEY19316	Ohranjen hipotetični protein	-2,43	4,98	53975	da	424	4
EEY21866	Lipaza	1,74	8,82	55821	da	252	3
EEY21866	Lipaza	2,33	8,82	55821	da	189	2
EEY21866	Lipaza	2,25	8,82	55821	da	161	1
EEY21535	Poligalakturonaza	1,52	5,25	46729	da	161	2
EEY20122	Endo-1,4- β -ksilanaza Z	3,33	6,44	45601	da	604	6

Se nadaljuje...

Nadaljevanje...

Protein AC	Ime	Razmerje PG2/PG1	pI	Mw	Signalni peptid	Rezultati	Število peptidov
EEY15099	Acetilsilan esteraza	3,55	6,59	37060	da	63	3
EEY23542	Ramnogalakturonaza B	2,68	7,15	50232	da	72	1
EEY23542	Ramnogalakturonaza B	8,03	7,15	50232	da	322	4
EEY23542	Ramnogalakturonaza B	7,66	7,15	50232	da	152	5
EEY23542	Ramnogalakturonaza B	6,14	7,15	50232	da	64	2
EEY23542	Ramnogalakturonaza B	6,37	7,15	50232	da	295	6
EEY17221	Karboksilesteraza	3,56	8,08	45126	da	201	2
EEY17826	Manan endo-1,4- β -manozidaza	2,04	6,36	50248	ne	150	2
EEY17221	Karboksilesteraza	4,81	8,08	45126	da	311	5
EEY17221	Karboksilesteraza	5,3	8,08	45126	da	414	6
EEY17221	Karboksilesteraza	5,21	8,08	45126	da	277	4
EEY21027	Ohranjen hipotetični protein	2,2	5,1	39986	da	253	2
EEY23944	FAD vezavna domena	2,66	8,54	52373	da	398	6
EEY22503	D-laktonohidrolaza	-3,04	5,52	40012	da	229	2
EEY23944	FAD vezavna domena	2,86	8,54	52373	da	196	4
EEY22503	D-laktonohidrolaza	-2,58	5,52	40012	da	246	2
EEY23944	FAD vezavna domena	3,58	8,54	52373	da	278	5
EEY16687	Ohranjen hipotetični protein	3,22	8,62	43953	da	418	5
EEY23931	Pektat liaza	-2,8	4,92	40173	da	349	4
EEY19375	Vezavna domena škroba	5,38	8,1	43554	da	173	2
EEY17773	Protein naddružine PAP2	2,06	6,71	40788	da	311	3
EEY17773	Protein naddružine PAP2	4,77	6,71	40788	da	383	4
EEY21307	Izločen protein (Alginat liaza)	7,75	5,61	43063	da	442	5
EEY21157	α -amilaza A tip 3	2,76	6,08	51359	da	224	4
EEY22322	Poligalakturonaza 2	24,07	5,89	42922	da	275	8
EEY21587	Ohranjen hipotetični protein	2,13	7,62	53212	ne	367	3
EEY22322	Poligalakturonaza 2	20,04	5,89	42922	da	284	8
EEY21587	Ohranjen hipotetični protein	-3,48	7,62	53212	ne	552	7
EEY17284	Alanin-glioksilat aminotransferaza	1,48	6,28	42453	ne	46	1
EEY23412	Ohranjen hipotetični protein	2,27	6,67	41440	da	348	5
EEY23412	Ohranjen hipotetični protein	2,16	6,67	41440	da	279	4
EEY20327	Endopoligalakturonaza	1,92	8,68	38446	da	136	2
EEY20327	Endopoligalakturonaza	2,19	8,68	38446	da	113	3
EEY20327	Endopoligalakturonaza	1,61	8,68	38446	da	412	4
EEY22980	Karboksipeptidaza A4	-4,27	4,88	39570	da	131	1
EEY23667	Glukan 1,3- β -glukozidaza	1,61	4,75	45757	da	306	3
EEY23667	Glukan 1,3- β -glukozidaza	-1,43	4,75	45757	da	236	2
EEY19810	α/β - hidrolaza	-7,67	7,71	37295	da	56	1
EEY17054	Bakterijska levcil aminopeptidaza	-2,27	5,28	41915	da	428	6
EEY17737	NAD(P)H-odvisna D-ksilozna reductaza	-2,95	6,01	37443	ne	48	2
EEY16472	Ricin B lektin: Paralelna ponovitev β -verige	2,76	10,55	16752	da	359	6
EEY15759	Ramnogalakturonan acetilesteraza	2,16	6,88	25031	da	167	2
EEY15257	Pektinesteraza	2,68	9,11	35287	da	76	1
EEY23400	Endo-1,4- β -ksilanaza	-2,68	6,97	38224	da	113	1
EEY17799	STI35 protein	-12,43	6,17	31168	da	219	3

Se nadaljuje...

Nadaljevanje...

Protein AC	Ime	Razmerje PG2/PG1	pI	Mw	Signalni peptid	Rezultati	Število peptidov
EEY19702	Bakterijska levcil aminopeptidaza	-2,23	5,93	42269	da	856	8
EEY19702	Bakterijska levcil aminopeptidaza	-1,42	5,93	42269	da	204	2
EEY21729	Pektat liaza B	-3,84	8,62	34191	da	178	3
EEY17799	STI35 protein	-4,77	6,17	31168	ne	202	3
EEY21779	Gama-glutamil transpeptidaza	2,66	4,96	60238	da	181	2
EEY21779	Gama-glutamil transpeptidaza	2,81	4,96	60238	da	191	3
EEY17799	STI35 protein	-3,87	6,17	31168	ne	194	5
EEY21549	Holin dehidrogenaza	2,53	6,64	65750	ne	226	3
EEY23484	Acetilesteraza	2,91	7,88	26319	da	91	2
EEY19377	Ohranjen hipotetični protein (tirozinaza)	-8,87	4,71	37954	da	262	4
EEY21027	Ohranjen hipotetični protein	-3,6	5,1	39986	da	47	1
EEY21027	Ohranjen hipotetični protein	-3,43	5,1	39986	da	160	1
EEY19234	Nekrozni in etilen inducirajoč protein	1,64	5,42	25298	da	258	3
EEY22044	Nukleacijski protein	-5,36	4,94	39341	da	285	3
EEY19383	Polisaharid deacetilazna proteinska družina	-3,36	9,68	26764	da	203	2
EEY17001	Endoglukanaza-1	19,68	8,53	25319	da	99	2
EEY15123	Metaloproteinaza	-5,48	5,54	38013	da	180	2
ABE02800	Endo-1,4- β -ksilanaza	2,62	7,77	26475	da	127	1
XP_386148	Nukleozid difosfat kinaza	-4,76	9,1	26169	ne	64	2
EEY18971	Napovedani protein	6,56	8,5	14083	da	186	1
EEY23667	Glukan 1,3- β -glukozidaza	3,93	4,75	45757	da	62	2
XP_386148	Nukleozid difosfat kinaza	-5,15	9,1	26169	ne	107	5
EAL86590	Protein celične stene PhiA	2,34	5,2	19679	da	58	1
EEY15759	Ramnogalakturonan acetilesteraza	2,58	6,88	25031	da	158	2
EEY15759	Ramnogalakturonan acetilesteraza	2,62	6,88	25031	da	167	2
EEY22503	D-laktonohidrolaza	-3,34	5,52	40012	da	325	5
EEY22323	Poligalakturonaza	3,14	6,91	41097	da	73	1
EEY22323	Poligalakturonaza	2,41	6,91	41097	da	145	2
EEY22932	1,3- β -glukanoziltransferaza Gel4	2,37	4,57	58575	da	313	4
EEY22322	Poligalakturonaza 2	16,47	5,89	42922	da	95	4

