

PROTEOMIKA - OSNOVE IN UPORABA PRI PROUČEVANJU SUŠNEGA STRESA RASTLIN

Rozalija POVŠE¹, Stanislav MANDELČ², Branka JAVORNIK³, Dominik
VODNIK⁴, Andreja ČERENAK⁵

UDK / UDC 577.2:632.112:581.1

pregledni znanstveni članek / original scientific article

prispelo / received: 10. oktober 2013

sprejeto / accepted: 3. december 2013

Izvleček

Namen sedanjega žlahtniteljskega programa hmelja, ki temelji na klasičnih postopkih, se pa v zadnjem času uporabljajo tudi izbrani molekularni pristopi, je razvoj sort hmelja z izboljšano kakovostjo in količino pridelka. Glede na klimatske spremembe v zadnjem obdobju je nujno v žlahtniteljske programe vključevati znanje o sušnem stresu in razviti primerne selekcijske metode. V prispevku je predstavljena teorija o proteomiki z osnovnimi metodami in uporaba le-teh pri proučevanju sušnega stresa rastlin.

Ključne besede: proteomika, sušni stres, rastline

PROTEOMICS - INTRODUCTION AND USE IN DROUGHT STRESS ASSESSMENTS IN PLANTS

Abstract

Current hop breeding program, combining classical and recently also molecular approaches, is aimed at developing hop cultivars with improved quality and quantity of crop. Recently, according to the climate changes it is necessarily to include knowledge of drought stress in the breeding program and to develop appropriate selection methods. In the article the theory about proteomics with basic methods are discussed and their use in drought stress assessments in plants.

Keywords: proteomics, drought stress, plants

¹ Mag. inž. živ., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: zala.povse@ihps.si

² Dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: stanislav.mandelc@bf.uni-lj.si

³ Prof. dr., prav tam, e-pošta: branka.javornik@bf.uni-lj.si

⁴ Prof. dr., prav tam, e-pošta: dominik.vodnik@bf.uni-lj.si

⁵ Doc. dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: andreja.cerenak@ihps.si

1 UVOD

V zadnjih letih se problematika, povezana s sušo v kmetijstvu, strmo povečuje, kar je posledica klimatskih sprememb, globalnega segrevanja in neprilagojenih sort kmetijskih rastlin. Pomanjkanje padavin in njihova nepravilna časovna razporeditev povečujeta tveganje kmetijske pridelave. Slovenija spada zaradi navedenih dejstev med države z večjo nestabilnostjo pridelka. Ugotovljeno je, da abiotiski stresni dejavniki globalno povzročijo kar 80 % celotnega zmanjšanja pridelka, ostalih 20 % izpada je posledica biotskih dejavnikov (Fowler, 2009). Sušne razmere se vedno pogosteje pojavljajo tudi pri pridelavi hmelja (*Humulus lupulus* L.), tako v Sloveniji kot v ostalih državah pridelovalkah. Hmelj se prideluje v trajnih nasadih, zato se posledice sušnih let odražajo še v naslednjih letih, kar pomeni večletna ekonomska tveganja.

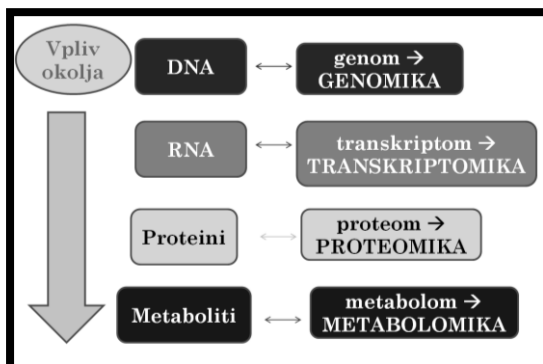
Suša je večdimenzionalni pojav, ki vključuje ne le primanjkljaj vode v tleh ampak tudi v atmosferi, pogosto je kombiniran tudi s stresnim delovanjem drugih abiotiskih dejavnikov npr. z visokimi temperaturami in biotskim stresom. Stres, povzročen zaradi pomanjkanja vode, zmanjšuje tudi odpornost rastlin na bolezni in škodljivce. Znale so posamezne raziskave o vplivu pomanjkanja vode na hmeljne rastline, tako je bilo pri hmelju opravljenih že nekaj raziskav na področju sušnega stresa (Čeh in sod., 2007), kjer so analizirali sekundarne metabolite v listih in storžkih hmelja (ksantohumol, polifenole in alfa-kislina), medtem ko so fiziološke meritve sušnega stresa pri hmelju (Čerenak in sod., 2010) pokazale, da je sorta Aurora bolj tolerantna na sušo in izraža višjo regenerativno sposobnost v primerjavi s Savinjskim goldingom. Novejših raziskav pri hmelju z modernejšimi pristopi v znanstveni literaturi še ni objavljenih.

Pri številnih kmetijskih rastlinah so že registrirane sorte s tolerantnostjo na pomanjkanje vode (Moussa in Abdel-Aziz, 2008; Melvin in sod., 2011), medtem ko pri hmelju še ni tovrstnih rezultatov. Za razvoj novih sort hmelja, ki bodo zagotavljale ustrezne donose v rastlinski proizvodnji tudi v sušnih razmerah, je potrebno uvesti v žlahtniteljske programe tudi nova spoznanja in razviti primerne selekcijske metode, saj je voda eden od glavnih omejitvenih faktorjev v kmetijstvu.

2 OMSKI PRISTOP V RAZISKAVAH

Proučevanja sušnega stresa pri hmelju se je smiselno lotiti z omskim pristopom, kamor se uvrščajo genomika, transkriptomika, proteomika in metabolomika. Z omskim pristopom se ukvarja sistemska biologija, kjer je končni cilj razumevanje delovanja organizmov preko razumevanja dinamike procesov v bioloških sistemih. Namen sistemske biologije je tudi povezovanje informacij, dobljenih na različnih nivojih proučevanja celičnih procesov. Dinamične interakcije med procesi v bioloških sistemih definirajo njihovo delovanje. Z omskim pristopom prispevamo k večji stopnji razumevanja bioloških procesov (Clark in Pazdernik, 2012). Na sliki

1 so prikazane metode omskega pristopa, iz česar je razvidno povečevanje vpliva okolja od genomike do metabolomike.



Slika 1: Sistematični prikaz metod omskega pristopa (Vir: Clark in Pazdernik, 2012).

Figure 1: Schematic view of omics approach.

Genomika je znanstveno področje, ki proučuje celoten genom organizma z različnimi metodami, kot so kartiranje, določevanje nukleotidnega zaporedja, funkcionalne analize genov, ipd. Deli se na strukturno genomiko, kjer so raziskave usmerjene v proučevanje tridimenzionalne strukture DNA, RNA in proteinskih molekul in na funkcionalno genomiko, kjer so glavni namen biokemijske študije funkcij genov, RNA molekul in proteinov v celicah, tkivih in organizmih (Elrod in Stansfield, 2010).

V okviru transkriptomike se preučuje izražanje genov na nivoju celotnega genoma ali le njegovega dela. Transkriptom je zbirka vseh RNA molekul (mRNA, rRNA, tRNA in drugih nekodirajočih RNA), ki jih proizvede ena celica, populacija celic ali celotni organizem v katerem koli času (Elrod in Stansfield, 2010).

Proteomika je znanstveno področje, ki vključuje analizo kompleksnih proteinskih vzorcev, proteinskih interakcij in proteinskih modifikacij v organizmu. V okviru proteomskih raziskav se sistematično identificirajo proteini, ki so izraženi v celici ali tkivu v določenem trenutku, uporabljajo pa se tudi za določanje najpomembnejših lastnosti posameznih proteinov (kot npr. vsebnost proteinov, njihove modifikacije, sodelovanje v multiproteinskih kompleksih,...) (Issaq, 2001). Metabolomika je področje, ki omogoča detekcijo molekul, ki niso proteinskega izvora in so različne kemijske sestave. Metabolom tako vsebuje vse majhne molekule in metabolne intermediate znotraj celice ali celotnega organizma v določenem trenutku. Razumevanje delovanja metabolitov je prav tako zelo kompleksno, saj lahko te molekule vplivajo na številne druge celične organele (Clark in Pazdernik, 2012).

2.1.1 Zakaj v raziskave vključiti proteomiko?

Proteini so nosilci večine bioloških funkcij, zato je za razumevanje delovanja celic potrebno raziskati kateri proteini so prisotni, kje se nahajajo, kakšne so njihove interakcije z drugimi molekulami in katere funkcije opravljajo tekom razvoja ali v različnih bolezenskih stanjih (Križaj, 2008; Fonovič, 2008). Ker podatki o sekvencah genov ne zagotavljajo popolne slike organizma, je potrebno pogledati preko genomske ravni, kakšna je povezava med geni in izraženimi proteini. Niti pri genomiki niti pri transkriptomiki ne dobimo popolne slike o celični regulaciji, kar pomeni, da ne moremo videti post-translacijskih sprememb kot so glikozilacija, fosforilacija, proteolitsko procesiranje in številne druge. En gen lahko kodira več kot en protein, dinamika izražanja proteinov se spreminja pod vplivom intracelularnega in/ali ekstracelularnega stresa, zato je potrebno neposredno določiti ravni izražanja. Ena bistvenih pomanjkljivosti transkriptomike je ravno ta, da na podlagi analize na ravni RNA ni mogoče neposredno sklepati o vsebnosti proteinov v celici. Največja prednost proteomike je tako zaznavanje sprememb v organizmu, ki se pojavijo po translaciji (prevajanje nukleotidnega zapisa mRNA v aminokislinsko zaporedje proteina) z uporabo kvantitativne analize proteinskega profila, ki je izražen v določenem trenutku. Spremljanje sprememb v celici na nivoju proteinov poda veliko bolj natančno informacijo o njenem fiziološkem stanju (Dhingra in sod., 2005).

3 METODE V PROTEOMIKI

V okviru proteomike raziskujemo poleg identitete proteinov tudi strukturo in funkcijo posameznega proteina. Strukturna proteomika vključuje razvoj in uporabo eksperimentalnih metod za določanje primarne, sekundarne in terciarne strukture proteinov. V okviru funkcionalne proteomike se, kot že ime samo pove, določajo z eksperimentalno analizo funkcije proteinov tudi z uporabo informacij, dobljenih v okviru strukturne genomike (Issaq, 2001).

Elektroforezne in kromatografske metode se dopolnjujejo z masno spektrometrijo, kar pri proteomski analizi ponuja celovit pregled nad stanjem proteinov iz vzorca. Za identifikacijo proteinov je potrebno razumeti tudi njihove razlike v funkciji, saj le-te in razlike v strukturi proteinov pomembno vplivajo na zapletenost in raznolikost organizmov. Zato avtorji definirajo proteomiko tudi kot sistematično analizo proteinov, ki jih določa genom. Genom pa predstavlja le prvi korak v kompleksnosti razumevanja biološke funkcije, saj lahko posamezni gen kodira več različnih proteinov (Dhingra in sod., 2005).

3.1 Gelske metode ločevanja proteinov

3.1.1 Nativna poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE)

Nativna poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE) je tehnika, ki omogoča, da se proteinske molekule ločijo v električnem polju na osnovi naboja. Pri ločevanju proteinskih molekul sta poleg naboja pomembna tudi velikost in oblika molekul, saj pri tej analitski metodi proteini potujejo skozi poliakrilamidni gel v električnem polju. Proteini v gelu so negativno nabiti in potujejo proti anodi. Zaradi zamreženih gelov struktura gela deluje kot molekulska sito preko katerega manjše molekule potujejo hitreje kot večje, zato se ločljivost povečuje z daljšanjem gela (Križaj, 2008; Boyer 2005).

3.1.2 Izoelektrično fokusiranje

Pri izoelektričnem fokusiranju (IEF) proteine ločimo glede na izoelektrično točko proteina. V gelu se pH lahko linearno ali eksponentno spreminja z enega dela na drug del, molekule pa se fokusirajo v tistem delu, kjer je pH enak izoelektrični točki (pI) proteina (kjer je neto naboj proteina enak 0). Protein ima električni naboj kadar pH ni enak pI, ko pa je $pH=pI$, potem protein izgubi naboj (saj je število pozitivnih nabojev enako številu negativnih nabojev) in se v gelu fokusira. Novejša je tehnologija imobiliziranih pH gradientov (IPG), kjer so skupine (kisle ali bazične) kovalentno vezane na poliakrilamidno mrežo gela in pH gradient je v tem primeru fiksiran, v primerjavi z IEF, kjer pH gradient ustvarjajo molekule v raztopini (Križaj, 2008; Mandelc, 2010).

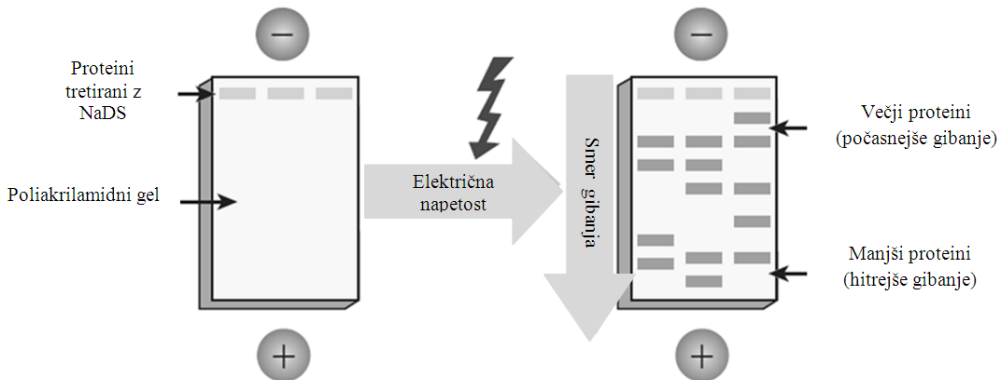
3.1.3 PAGE v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata

Najpomembnejša lastnost natrijevega dodecil sulfata (NaDS) je ta, da se molekule proteina enakomerno obdajo z NaDS in je količina vezanega NaDS proporcionalna molekulske masi proteina. NaDS ima poleg tega funkcijo, da poruši tridimenzionalno strukturo molekul proteina ter jih razvije v linearno obliko. Pri PAGE v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE / SDS-PAGE) proteinski vzorec najprej tretiramo z anionskim detergentom NaDS v prisotnosti ali odsotnosti reducenta, tako postane njihovo razmerje med nabojem, maso in obliko enako. Zaradi linearne oblike pa postane mobilnost v gelu odvisna le od mase proteinov, tako lažje molekule skozi gel potujejo bolj enostavno (slika 2), torej tudi hitreje (Križaj, 2008; Boyer, 2005).

3.1.4 Dvo-dimenzionalna PAGE

Dvo-dimenzionalna PAGE (2D-PAGE) je metoda, ki združuje dva postopka elektroforeze. Prvi korak elektroforetske ločitve je glede na njihov naboj z IEF in v drugem koraku (ki je v primerjavi s smerjo IEF pravokoten) glede na molekulske maso z NaDS-PAGE (slika 3). Nato je potrebna detekcija proteinov v gelu, ki jo lahko opravimo z barvanjem z barvilom Coomassie modrim, s srebrom ali

fluorescenčnimi barvili. Medtem ko je redkeje uporabljena avtoradiografija radioaktivno označenih proteinov med bolj občutljivimi metodami. Metoda je namenjena za primerjamo proteoma dveh sistemov, kar pomeni, da je omenjena metoda osnovna tehnika diferencialne proteomike, kjer naenkrat analiziramo celoten proteom organizma, tkiva ali celice (Križaj, 2008).



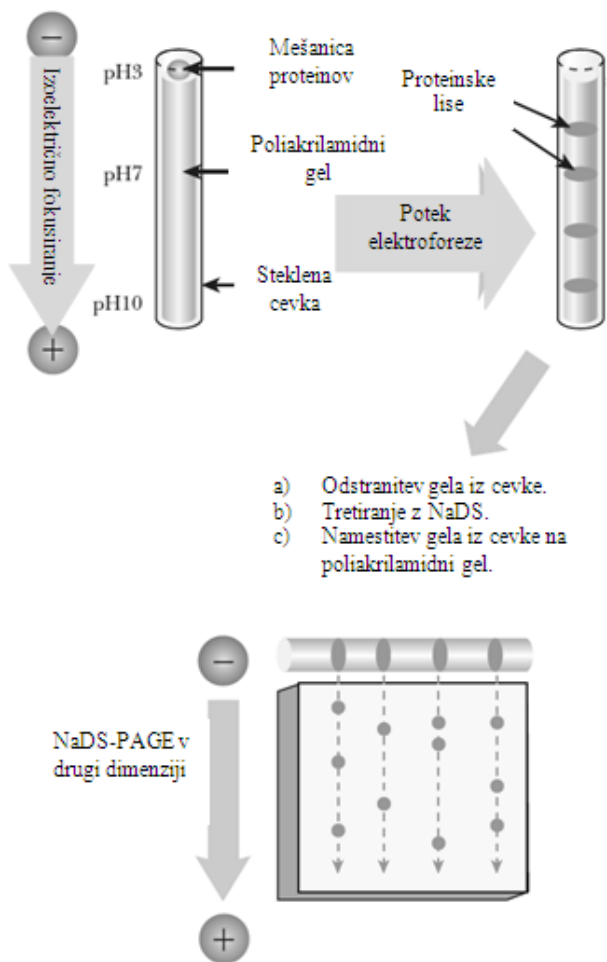
Slika 2: Prikaz poteka NaDS-PAGE (Vir: Clark in Pazdernik, 2012).

Figure 2: Flow chart of SDS-PAGE.

3.1.5 2D-DIGE (diferencialna dvodimenzionalna gelska elektroforeza)

2D elektroforeza je metoda, ki omogoča hkratno določevanje na tisoče proteinov in temelji na ločitvi proteinov v prvi dimenziji z izoelektričnim fokusiranjem (IEF) in v drugi dimenziji z SDS-PAGE. Vendar je kljub napredni tehnologiji tradicionalna 2D gelska elektroforeza zamudna in zahtevna. Poleg tega je problem tudi pri ponovljivosti med geli, kar vodi do večje medgelske variabilnosti, zaradi česar je težko razlikovati med spremembami, ki jih povzročata sistemska variabilnost metode in tistimi, ki jih dejansko povzročita nek stres na vzorcu. 2D diferencialna elektroforeza omogoča hkratno analizo več kot enega vzorca na istem gelu. Tehnika vključuje uporabo treh fluorescentnih barvil, in sicer Cy2, Cy3 in Cy5 (slika 4). Različni proteinski vzorci so označeni s 3 barvili, ki se dobro ločijo po absorpcijskih in emisijskih spektrih. Tako se označeni vzorci (vsak s svojim barvilom) lahko nanesejo vsi na isti gel, kjer se proteini med seboj ločijo. Različni proteinski ekstrakti so označeni z različnim CyDye fluorescentnim barvilom (ta ima NHS-ester skupino, ki se kovalentno veže na ϵ -aminsko skupino lizina), tako so vzorci združeni (izpostavljeni so identičnim pogojem ločevanja) in hkrati ločeni (Marouga, 2005). Razmerje med množino proteinov in barvil je takšno, da označimo približno 3% vsakega proteina, do večkratnega označevanja pa ne prihaja. Bistvenega pomena je uporaba internega standarda, ki ga pripravimo z mešanjem enakih deležev vseh vzorcev v eksperimentu, zato interni standard

vsebuje vse proteine, ki so prisotni v posameznih vzorcih. Na posamezen gel nanesemo po dva vzorca, prvi je označen s Cy3 in drugi s Cy5 (slika 4) ter interni standard (označen s Cy2). Po koncu elektroforeze z ustreznim čitalcem zajamemo 3 ločene slike, vsako za svoje barvilo. Najpomembnejša stopnja, ki odpravlja medgelsko variabilnost in s tem potrebo po tehničnih ponovitvah, je kvantifikacija rezultatov (Mandelc, 2010). Prednost izboljšane občutljivosti in natančnosti pri tehnologiji je sposobnost ločevanja več kot enega vzorca na enem gelu. Linearnost, občutljivost in širok dinamični obseg teh barvil so pomembne lastnosti, zaradi česar je metoda 2D-DIGE lahko tudi kvantitativna.

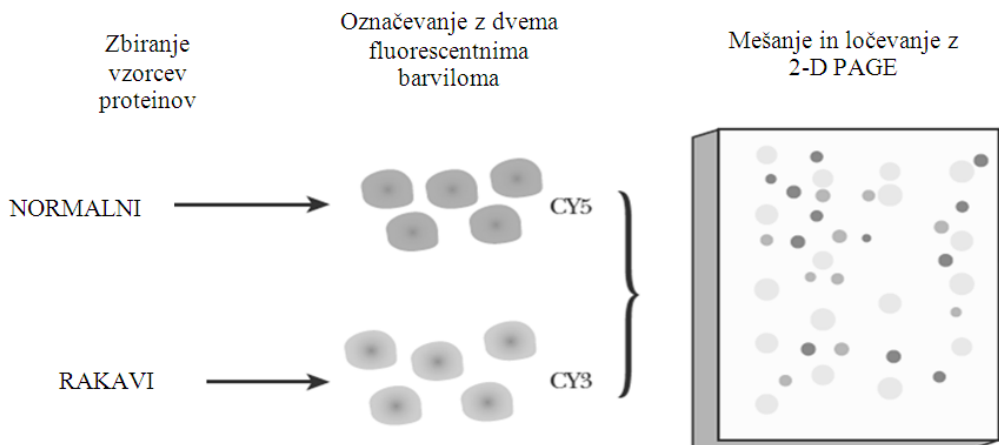


Slika 3: Shematičen prikaz 2D-PAGE (Vir: Clark in Pazdernik, 2012).
Figure 3: 2D-PAGE schematic view.

Največja natančnost kvantitativne metode 2D-DIGE je mogoča zaradi treh dejavnikov:

- sposobnosti hkratne analize več vzorcev na istem gelu,
- internega standarda, ki se doda na vsak gel (odpravimo možnost razlik med geli, ki bi lahko nastale zaradi različnega obnašanja proteinov),
- eksperimentalnih modelov, ki so specifični za to tehnologijo.

Ravno tako z DIGE poleg tega, da dobimo zanesljivejše rezultate, uporabimo manjše število gelov, saj sta po dva vzorca na istem gelu. Zaradi uporabe internega standarda ne potrebujemo tehničnih ponovitev istega vzorca na več gelih, hkrati pa je močno olajšano usklajevanje med geli (Marouga, 2005).



Slika 4: Primer barvanja proteinov z dvema fluorescentnima barviloma za analizo 2D-DIGE (Vir: Clark in Pazdernik, 2012).

Figure 4: Example of staining proteins with two fluorescent dyes for the 2D-DIGE analysis.

3.2 Kromatografske metode ločevanja proteinov v proteomiki

Kromatografija je generalni izraz za separacijske tehnike, kjer analit ločimo na podlagi različnega časa, ki ga potrebuje, da potuje po mobilni fazi glede na zadrževanje na stacionarni fazi. V proteomiki se uporablja tekočinska kromatografija (LC) za eno- ali večdimenzionalno ločevanje na peptide razgrajenih proteinskih vzorcev. Pri izvedbi LC (liquid chromatography) vzorec potuje z mobilno fazo skozi kromatografsko kolono polnjeno s stacionarno fazo. Večdimenzionalno ločevanje pri LC pomeni ločevanje na več zaporednih kromatografskih kolonah. Bistveno je, da se peptidi ločijo na podlagi razlik v

hitrosti migracije pod vplivom mobilne faze zaradi selektivnega zadrževanja (retenzije) komponent na stacionarni fazi. Glede na sestavo stacionarne in mobilne faze se komponente vzorca ločujejo na podlagi različnih fizikalno-kemijskih lastnosti. LC ima veliko uporabnih aplikacij v proteomiki, saj se lahko uporablja za separacijo, identifikacijo, čiščenje in kvantifikacijo proteinov in peptidov (Clark in Pazdernik, 2012).

3.3 Metode identifikacije proteinov – masna spektrometrija

Gel, ki ga dobimo kot rezultat 2D-PAGE, vsebuje proteine v obliki lis. Iz njega lahko želeno liso izrežemo, razgradimo peptide z encimom (npr. s tripsinom) in identificiramo s pomočjo masne spektrometrije (Kočevar in Komel, 2008). Glavna metoda za analizo kompleksnih proteinskih zmesi je masna spektrometrija (MS) (Križaj, 2008). Masni spektrometer je instrument, ki ione loči glede na njihovo razmerje mase in naboja (m/z) v plinski fazi. Ločitev ionov lahko poteka v homogenem magnetnem polju (masni spektrometer na magnetni razklon), lahko pa jo dosežemo tudi na druge načine, npr. v visokofrekvenčnih električnih poljih (kvadrupolni masni spektrometri), na osnovi časa preleta ionov (time of light), itd. (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007). Ionizator, analizator in detektor so glavni deli masnega spektrometra. Ioni nastanejo v ionizatorju in se v masnem analizatorju ločijo glede na razmerje med maso in nabojem (m/z), nato detektorji pri posamezni m/z izmerijo ionski tok. Rezultat meritve je masno spekter s prikazom absolutne ali relativne intenzitete ionskega toka v odvisnosti m/z in ga je potrebno interpretirati (Križaj, 2008).

Izredno hiter razvoj MS v proteomiki je omogočilo odkritje postopkov za ionizacijo proteinov. Metod za volatilizacijo in ionizacijo bioloških molekul je več, npr. ionizacija z elektroni (EI), kemijska ionizacija (CI) in ionizacija s hitrimi atomi (FAB), najpogosteje pa se uporabljata dve, elektrosprej ionizacija (ESI) in ionizacija s pomočjo laserske svetlobe (MALDI). Načini identifikacije proteinov z masno spektrometrijo so lahko različni in sicer peptidno kartiranje, "de novo" sekvenciranje (tandemska MS), metoda "peptidne značke" (Križaj, 2008).

3.2.1 Peptidno kartiranje

Peptidna karta je "prstni odtis" proteina, ki smo ga dobili z razgradnjo s proteazami z znanim mestom cepitve peptidne vezi v proteinu. Identiteto proteinu določimo na podlagi primerjave izmerjenih mas peptidov in teoretičnih mas peptidov, ki jih izračunamo iz zaporedja aminokislin v bazah podatkov. Algoritma, ki sta najpogosteje uporabljena za takšno napovedovanje najverjetnejše identitete proteinov sta Mascot in Sequest. Takšno napovedovanje identitete proteinov zahteva predhodno čiščenje vzorca in tudi poznavanje nukleotidnega zaporedja celotnega genoma (posledično tudi aminokislinsko zaporedje potencialnih proteinov), saj vsaka sprememba aminokislinske spremeni maso peptida in tako ni

ujemanja. Za identifikacijo pa potrebujemo več peptidov, ki se ujemajo (Mandelc, 2010).

3.2.2 "De novo" sekvenciranje – tandemska MS

Gre za specifično metodo z uporabo tandemske MS, le-to uporabimo kadar nukleotidno zaporedje organizma ni znano. Tandemski masni spektrometer se od običajnega razlikuje po tem, da ima zaporedno vezana dva masna analizatorja, med njima pa je nameščena tako imenovana kolizijska celica (kjer ioni fragmentirajo ob trkih z atomi ali molekulami razredčenega plina v celici) oziroma nek drug element za fragmentacijo ionov (npr. kvadrupol). S to metodo izvedemo meritve mas peptidov kot pri peptidnem kartiranju, nato posamezne izolirane peptide fragmentiramo v kolizijski celici, kjer peptidi različno razpadejo (glede na tip in energijo fragmentacije). Fragmentacija primarnih ionov je odvisna od količine energije, ki jo dovedemo ionom, vrstni red cepitve kovalentnih vezi v peptidu je določen z energijo posameznih vezi. Najprej se razcepi peptidna vez, saj je najšibkejša. Na podlagi primerjave določenega aminokislinskega zaporedja z bazami proteinskih zaporedij se identificira analizirani protein (Clark in Pazdernik, 2012; Križaj, 2008; Mandelc, 2010).

4 UPORABA PROTEOMIKE PRI PROUČEVANJU SUŠNEGA STRESA RASTLIN

4.1 Stres rastlin

Kakršne koli spremembe v okolju lahko porušijo homeostazo oz. ravnovesje organizma in privedejo do stresa. Gre za negativen vpliv na fiziološko stanje rastline, ki ga povzroči nenaden prehod iz optimalnih v neoptimalne razmere. Glede na dejavnike, ki stres povzročajo, ga delimo na:

- abiotski stres, kjer gre za fiziološko ali kemijsko motnjo iz okolja, ki vpliva na rastlino

- biotski stres, kjer gre za biološko motnjo (Hopkins in Hüner, 2008).

Med abiotske stresne dejavnike spadajo svetlobno sevanje (pomanjkanje ali presežek svetlobe v vidnem delu spektra, presežek UV sevanja), temperatura (toplo, hladno, zmrzal), voda (suh zrak, suha tla, poplave), plini (pomanjkanje kisika, vulkanski plini, plinska onesnažila antropogenega izvora), minerali (pomanjkanje ali presežek mineralov, neravnovesje, slanost, težke kovine, kislost ali alkalnost), mehanski učinki (veter, snežna odeja, ledeniki) (Larcher, 2001). Biotski stres povzročajo rastline (parazitske rastline, alelopatija), mikroorganizmi (virusi, bakterije, glive), živali (paša, teptanje), antropogeni vplivi (onesnaževanje, uporaba fitofarmaceutskih sredstev, zbijanje tal, ogenj, ionizirajoče sevanje, elektromagnetno valovanje). Če so rastline v stresnih razmerah, se to lahko odraža v eni ali več metabolnih disfunkcij. Ob zmernem in kratkotrajnem stresu se

rastline, ki so izpostavljene stresu, lahko regenerirajo v prvotno stanje, če pa je stres dovolj močan, lahko povzroči nepopravljive motnje v rasti in razvoju, npr. prepreči cvetenje, tvorbo semen in inducira senescenco, kar vodi v smrt rastline (Hopkins in Hüner, 2008).

4.2 Sušni stres rastlin

Omejena razpoložljivost vode, ki povzroča sušni stres, je lahko posledica fizikalnih in podnebnih lastnosti okolja, interakcij tla-padavine, tla-rastline, ozračje-rastline, povečanih potreb rastlin ali kombinacije naštetih dejavnikov. Vzroki za sušo so lahko poleg primanjkljaja padavin tudi intenzivna evaporacija, osmotska vezava vode v slanem okolju, zamrznitev tal ali preplitva tla, ki omejujejo razvoj korenin. Do pomanjkanja vode oz. suše pri rastlinah pride, kadar je izgubljanje vode s transpiracijo večje od privzema vode in je vodna bilanca negativna (Bray, 1997). Prve vidne posledice sušnega stresa opazimo, ko turgor upade do takšne mere, da rastlina prične veneti, vendar primanjkljaj vode spremeni metabolizem in mobilnost hranil že veliko prej (Larcher, 2001). Na celičnem nivoju je na pomanjkanje vode najbolj odzivna rast, saj celica ob premajhnem turgorju ne more povečevati svojega volumna. Že ob blagem sušnem stresu sta omejeni vgradnja dušika (nitrata) v organske molekule ter sinteza proteinov. V večjih količinah se sintetizira hormon abscizinska kislina (ABA), medtem ko je sinteza citokininov - druge skupine hormonov - inhibirana. V odgovoru na delovanje hormona ABA, in zaradi upada vodnega potenciala nasploh, se začnejo pripirati listne reže. To v nadaljevanju omeji fotosintezo. Pri resnejšem pomanjkanju vode prihaja do sekundarnega stresa zaradi kopičenja reaktivnih kisikovih zvrsti (oksidativni stres) (Larcher, 2001). Na celičnem nivoju se močnejša suša odraža v koncentriranju topljencev, spremembi prostornine celice in obliki membrane, porušitvi membranskih gradientov (porazdelitve ionov), izgubi integritete membrane in denaturaciji proteinov. Rezultat popolne izgube proste vode je izsušitev oz. dehidracija (Bray, 1997).

Večina rastlin aktivno uravnava svojo vodno bilanco – so homojohidre. Na sušo so prilagojene oz. se prilagajajo z mehanizmi, ki preprečujejo znatnejši upad vodnega potenciala oz. izsušitev. Ti mehanizmi vključujejo prilagoditve na ravni zgradbe rastlinskih organov (npr. manjši ali popolnoma reducirani listi, s povrhnjico, ki preprečuje preveliko oddajanje vode; primerno razvite korenine z veliko hidravlično prevodnostjo; prevodna tkiva, katerih zgradba omejuje nastanek embolij,...) ter s presnovnimi mehanizmi, ki vodijo v večjo učinkovitost izrabe vode (primer kompleksne presnovne prilagoditve sta C₄- in CAM-tip fotosinteze). Možen je tudi popoln izogib suši s časovno prilagojenim razvojem v času vegetacijske sezone, ko je preskrba z vodo zadovoljiva. Med homojohidrimi rastlinami je malo takšnih, ki imajo razvito toleranco na izsušitev, ki pomeni sposobnost, da lahko celične strukture izsušitev preživijo in da se celični procesi ob

ponovni oskrbi z vodo lahko aktivirajo. Je pa tovrstna toleranca tudi pri večini višjih rastlin običajni pojav pri na izsušitev odpornih strukturah kot so semena, spore ali pelod (Larcher, 2001).

Presnovni odziv rastline na sušo temelji na spremembah v posameznih delih metabolizma rastlinske celice. Nekateri procesi se upočasnijo, drugi - predvsem tisti udeleženi v mehanizmih odpravljanja stresa - pa se aktivirajo. Tako se ob suši spremeni ekspresija genov in sinteza proteinov. Pri proučevanju tolerance na izsušitev in prilagoditve celičnih procesov ob izsuševanju semen so ugotovili, da se v takšnih razmerah med drugim sintetizirajo proteini, ki imajo neposredno vlogo pri ohranjanju funkcije drugih bioloških molekul: LEA-proteini (late embryogenesis abundant proteins) in dehidrini (Tunnacliffe in Wise, 2007; Farooq in sod. 2009). Kasnejše raziskave so pokazale, da se tovrstni proteini sintetizirajo tudi v drugih delih rastline kot zaščita pred sušnim stresom. Poleg njih je dobro znana tudi povečana sinteza akvaporinov - proteinov, ki so pomembni za hidravlično prevodnost v rastlinskih tkivih in proteinov, ki sodelujejo pri nastanku osmotsko zaščitnih snovi in drugih.

4.2.1 Rezultati nekaterih objavljenih raziskav uporabe proteomike pri proučevanju sušnega stresa

Proteinska slika rastline, ki je izpostavljena sušnemu stresu, je precej kompleksna. Najlažje jo proučimo z metodami diferencialne proteomike, kjer primerjamo proteom rastlin v stresu in kontrolnih (rastlin, ki niso izpostavljene stresnim pogojem). Primere takšnih raziskav predstavljajo študije navedene v preglednici 1. V raziskavah sušnega stresa z metodami proteomike so identificirali tako regulatorne kot funkcionalne proteine. Pri dobu je 22 od 95 identificiranih proteinov vključenih v asimilacijo ogljika, drugih 25 od 95 pa so proteini, ki so vključeni v fotosintetske ali metabolne procese, 20 identificiranih proteinov pa je direktno vključenih v metabolizem proteinov ali aminokislin. Pri dobu in fižolu je bila velika podenota encima RuBisCo identificirana v več lisah z višjo vsebnostjo v proteomu rastlin izpostavljenih stresu v nasprotju s fotosintetskimi proteini, katerih raven je v teh rastlinah upadla (Sergeant in sod., 2011; Zadražnik in sod., 2012). Pri pšenici so bili identificirani proteini klasificirani po biološki funkciji in sicer so bili proteini vključeni v odgovor na stres, sintezo proteinov, energijski metabolizem, fotosintezo, sekundarni metabolizem, signalizacijo, transkripcijo in remobilizacijo kovin (Bazargani in sod., 2011). Pri proučevanju sušnega stresa pri fižolu s proteomiko so poleg navedenih funkcij identificiranih proteinov določili še proteine vključene v pretvorbe ATP, zmanjševanje ROS v celici, signalno transdukcijo, sekundarni metabolizem in proteolizo (Zadražnik, 2012). Pri raziskavah čičerike so bili ugotovljeni proteini, katerih koncentracija se med sušnim stresom poveča: celični signalni proteini, degradacijski proteini, transportni proteini za prenos v celično jedro, molekularni šaperoni, proteini signalnih poti za

ROS, translacijski proteini in proteini, ki preoblikujejo kromatin, ter tisti, ki sodelujejo pri prepisovanju in podvajanju nukleinskih kislin (Pandey in sod., 2008). V sušnem stresu so med pomembnejšimi dejavniki tudi encimi in njihova aktivnost, tako so pri rižu (izpostavljenem sušnemu stresu) našli tri različne oblike *S*-adenozilmetionin (SAM) sintetaze, katere koncentracija je izrazito zmanjšana med sušnim obdobjem in povečana med regeneracijo rastlin z vodo. Glavna funkcija SAM je, da deluje kot prekursor v biosintezi fitohormona etilena in poliaminov (Muthurajan in sod., 2010). SAM sintetaza je bila identificirana tudi v koreninah suši izpostavljenih rastlin soje (Alam, 2010). Pomembni proteini so tudi aktin-vezavni proteini (ADFs), ki igrajo glavno vlogo v prilagajanju aktinskega skeleta na izgube vode in s tem tudi pri spremembah aktina v celičnem skeletu. Tako teh proteinov niso zaznali v rižu, ki je bil dobro preskrbljen z vodo, medtem ko so bili v tretiranih rastlinah ti proteini prisotni. Med pomembnejšimi proteini, akumuliranimi v sušnim razmeram izpostavljenih rastlinah, so tudi LEA proteini. Ti proteini delujejo kot šaperoni, ki stabilizirajo vezikle, proteine in membranske strukture v stresu izpostavljenih rastlinah. Indukcija LEA proteinov je povezana s povečano koncentracijo abscizinske kisline in zaostankom v rasti. V rižu so bili najdeni 4 različni LEA proteini, ki so se pri suši izpostavljenih rastlinah pojavili v višji koncentraciji v primerjavi s kontrolnimi rastlinami (Muthurajan in sod., 2010). Med LEA proteine spadajo tudi dehidrini, ki zmanjšujejo negativni učinek ROS na celične procese, tako so jih našli v povečani koncentraciji v sojinih koreninah suši izpostavljenih rastlin (Alam in sod., 2010). Ksiloglukan endotransglikolaze (XET) so skupina encimov, ki so vključeni v modifikacije celuloze in ksiloglukana. Ekspresija XET proteinov je zmanjšana v razmerah sušnega stresa, kar pomeni, da so tako biosinteza celične stene kot tudi celični elongacijski procesi med sušnim stresom zmanjšani. XET proteini so bili identificirani v rižu pri rastlinah, izpostavljenih suši (Muthurajan in sod., 2010). Arogenat dehidrataza (ADT) in preferat dehidrataza (DPT) katalizirata dehidracijske oziroma karboksilacijske reakcije arogenata in preferata. Oba encima sta v zmanjšani koncentraciji prisotna v stresu izpostavljenih koreninah soje, enako pa velja tudi za encim izoflavon reduktazo (IFR), ki pa je bila v nekaterih lisah zmanjšana, v nekaterih pa povečana (Alam in sod., 2010).

Preglednica 1: Pregled nekaterih objavljenih raziskav na področju proteomike sušnega stresa.

Table 1: Overview of some of the published research in the field of proteomics drought stress.

Rastlina	Tkivo/ celični organ	Trajanje sušnega stresa	Metoda	Glavne ugotovitve	Referenca
Navadna čičerika (<i>Cicer arietinum</i> L.)	Jedro	24 – 144 h	2D-PAGE LC-MS- MS	205 diferencialno izraženih proteinov, od teh je bilo 147 identificiranih v povezavi s sušnim stresom.	Pandey in sod., 2008
Riž (<i>Oryza sativa</i>)	Listni pecelj	3 dni	2D-PAGE MALDI- TOF	31 diferencialno izraženih proteinov, od teh je bilo 10 identificiranih in povezanih s sušnim stresom.	Muthurajan in sod., 2010
Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Koreni	5 dni	2D-PAGE MALDI- TOF	45 proteinov je bilo diferencialno izraženih, 28 identificiranih in povezanih s sušnim stresom.	Alam in sod., 2010
Trepetlika (<i>Populus tremula</i> L.)	Listi in kambij	12 dni	2D-PAGE MALDI- TOF-TOF	91 diferencialno izraženih proteinov v listih in 65 v kambiju. Identificiranih in s sušo povezanih proteinov je bilo v listih 52 proteinov in 36 v kambiju.	Durand in sod., 2011
Dob (<i>Quercus robur</i> L.)	Listi	Do 15 % relativne vsebnosti vode (RWC) v listih	2D-DIGE MALDI TOF/TOF	113 diferencialno izraženih proteinov, od teh 95 identificiranih.	Sergeant in sod., 2011
<i>Sporobolus stapfianus</i>	Listi	Do 30 % RWC v listih	2D-DIGE MS-MS	96 diferencialno izraženih proteinov in od tega 82 identificiranih.	Oliver in sod., 2011

Nadaljevanje preglednice s prejšnje strani.

Rastlina	Tkivo/ celični organ	Trajanje sušnega stresa	Metoda	Glavne ugotovitve	Referenca
Navadna pšenica (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Listni pecelj	10-30 po cvetenju	2D-PAGE MALDI TOF/TOF	135 diferencialno izraženih proteinov, od tega 82 identificiranih in povezanih s procesi rastlin v sušnem stresu.	Bazargani in sod., 2011
Navadni fižol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Listi	7-17 dni	2D-DIGE LC-MS- MS	58 diferencialno izraženih in identificiranih proteinov v sorti Tiber in 64 v sorti Starozagorski	Zadražnik in sod., 2012
Bombaževец (<i>Gossypium herbaceum</i> L.)	Listi	35-75 % RWC	2D-PAGE MALDI TOF/TOF	16 proteinov bolj izraženih v tretiranih rastlinah in 6 manj izraženih	Deeba in sod., 2012

5 ZAKLJUČEK

V prispevku je prikazano, zakaj je proteomika uporabna pri proučevanju sušnega stresa. Predstavljena je teorija proteomike z osnovnimi metodami, ki se najpogosteje uporabljajo pri analizah sušnega stresa. Žlahtnjenje hmelja je sorazmerno dolgotrajen in zapleten postopek, zato lahko proučevanje sušnega stresa rastlin s proteomiko prispeva k razvoju markerjev, povezanih z odgovorom rastlin na sušni stres. Rezultati tovrstnih raziskav so uporabni pri vzgoji novih na sušo tolerantnih sortah hmelja.

6 LITERATURA

- Alam I., Sharmin S.A., Kim K.H., Yang J.K., Choi M., S., Lee B.H. Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. *Plant Soil*. 2010; 333(1-2): 491-505.
- Bazargani M.M., Sarhadi E., Bushehri A.A.S., Matros A., Mock H.P., Naghavi M.R., Hajihoseini V., Mardi M., Hajirezaei M.R., Moradi F., Ehdaie B., Salekdeh G.H. A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. *Journal of Proteomics*. 2011; 74(10): 1959-1973.
- Bray E.A. Plant responses to water deficit. *Trends in plant science*. 1997; 2 (2): 48-54.
- Clark D., Pazdernik N.J. 2012. *Proteomics*. V: Academic Cell Biotechnology. Elsevier: 269-304.

- Čeh B., Kač M., Košir I., Abram V. Relations between Xanthohumol and Polyphenol Content in Hop Leaves and Hop Cones with Regard to Water Supply and Cultivar. *International Journal of Molecular Sciences*. 2007; 8(9): 989-1000.
- Čerenak A., Razinger J., Drinovec L., Čremožnik B., Šuštar-Vozlič J., Meglič V. Physiological response of hop (*Humulus lupulus* L.) plants to drought stress. *Hmeljarski bilten*. 2010; 17: 34-43.
- Deeba F., Pandey A.K., Ranjan S., Mishra A., Singh R., Sharma Y.K., Shirke P.A., Pandey V. Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2012; 53: 6-18.
- Dhingra V., Gupta M., Andacht T., Fu Z.F. 2005. New frontiers in proteomics research: A perspective. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005; 299(1-2), 1-18.
- Durand T.C., Sergeant K., Renaut J., Planchon S., Hoffmann L., Carpin S., Label P., Morabito D., Hausman J.F. Poplar under drought: Comparison of leaf and cambial proteomic responses. *Journal of Proteomics*. 2011; 74(8): 1396-1410.
- Elrod S., Stansfield W. 2010. Schaum's Outlines Genetics, fifth edition 450 fully-solved problems. 307 p.
- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S.M.A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*. 2009; 29: 185-212.
- Fonovič M. 2008. Proteomika - veda ali tehnologija, V: Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 31. januar in 1. februar 2008. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Raspor P. in Jamnik P. (ur.), str. 1-10.
- Fowler D.B. 2009. Use of Genomic Tools in Selection for Cold Adaptation in Wheat and Its Relatives, International Conference Plant abiotic stress tolerance, Programme and Abstracts, 8-11 February 2009, 205 p.
- Hopkins W.G., Hüner N.P.A. 2008. Introduction to plant physiology. 4th ed. The University of Western Ontario, 503 str.
- Issaq H.J. The role of separation science in proteomics research. *Electrophoresis*. 2001; 22: 629-3638.
- Kočevar N., Komel R. Preiskava bolezenskih proteomov z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo in masno spektrometrijo. *Medicinski razgledi*. 2008; 47: 193-203.
- Kosová K., Vítámvás P., Prášil I.T., Renaut J. Plant proteome changes under abiotic stress- Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*. 2011; 74(8): 1301-1322.
- Križaj I. 2008. Metoda za analizo proteoma, V: Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 31. januar in 1. februar 2008. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Raspor P. in Jamnik P. (ur.), 19-32.
- Larcher W. 2001. Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. 4th edition. New York, Springer: 513 p.
- 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, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 98 str.
- Marouga R., David S., Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005; 382(3): 669-678.

- Moussa H.R., Abdel-Aziz S.M. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Science*. 2008; 1(1): 31-36.
- Muthurajan R., Shobbar Z.-S., Jagadish S.V.K., Bruskiwich R., Ismail A., Leung H., Bennett J. Physiological and Proteomic Responses of Rice Peduncles to Drought Stress. *Molecular Biotechnology*. 2010; 48(2): 173-182.
- Oliver M.J., Jain R., Balbuena T.S., Agrawal G., Gasulla F., Thelen J.J. Proteome analysis of leaves of the desiccation-tolerant grass, *Sporobolus stapfianus*, in response to dehydration. *Phytochemistry*. 2011; 72(10): 1273-1284.
- Pandey A., Chakraborty S., Datta A., Chakraborty N. Proteomics Approach to Identify Dehydration Responsive Nuclear Proteins from Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular & Cellular Proteomics*. 2008; 7: 88-107.
- Sergeant K., Spieß N., Renaut J., Wilhelm E., Hausman J.F. One dry summer: A leaf proteome study on the response of oak to drought exposure. *Journal of Proteomics*. 2011; 74(8): 1385-1396.
- Taiz L., Zeiger E. 2006. Plant physiology. 4th ed. Sunderland, Sinauer Associates 764 p.
- Tunnacliffe A., Wise M.J. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*. 2007; 94: 791-812.
- Zadražnik T., Hollung K., Egge-Jacobsen W., Meglič V., Šuštar-Vozlič J. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Proteomics*. 2012; 78: 254-27.