СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ

АГРОБИОИНСТИТУТ – гр. София

Петко Василев Младенов

Автореферат

за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”

по научна специалност - Генетика

Анализ на стресови белтъци, експресирани при изсушаване и възстановяване на Haberlea rhodopensis

Научни ръководители:

Проф. д-р Димитър Джилянов

Проф. д-р Магдалена Чорбаджиева

Рецензенти:

проф. Магдалена Чорбаджиева

проф. д-р Димитър Джилянов

проф. д-р Мариела Оджакова

проф. дбн Иван Атанасов

доц. дсн Самир Наимов

София

2014 г.

Използвани съкращения

PSII- фотосистема II

PSI - фотосистема I

CEF- цикличен електронен поток

LEF- линеен електронен поток

LEA – протеини, експресирани по време на късна ембриогенеза

HSPs - топлинно шокови белтъци

TLPs - тауматин подобни белтъци

IDRs - вътрешно деструктурирани региони

АТФ - аденозин трифосфат

ALDH - алдехид дехидрогеназа

NAD -никотинамид аденин динуклеотид

NADP - никотинамид аденин динуклеотид фосфат

NADH -никотинамид аденин динуклеотид редуциран

NADPH - никотинамид аденин динуклеотид фосфат редуциран

ПААГ - полиакриламид гел-електрофореза

BN-PAGE - Blue native полиакриламид гел-електрофореза

DTT - дитиотрейтол

SDS- натриев додецил сулфат

PVPP- поливинил полипиролидон

EDTA -етилендиаминтетраоцетна киселина

PMSF- фенилметилсулфонил флуорид

TEMED - тетраметилетилендиамин

PBS - фосфатно буфериран солеви разтвор

BSA - говежди серумен албумин

DAB - диаминобензидин

NBT - нитроблу тетразолиум сол

PMS - феназин метосулфат

ЯМР - ядрено магнитен резонанс

MSTF - N-метил- N-(триметилсилил) трифлуороацетамид

BSTF - N,O-бис(триметилсилил) трифлуороацетамид

GC - MS -газова хроматография/масспектрометрия

PCA - анализ на основните компоненти

WC - водно съдържание

SOM - Самоорганизираща се карта

IEF - изоелектрично фокусиране

2D-PAGE - двумерна полиакриламид гел електрофореза

pI - изоелектрична точка

DHAP - дихидроксиацетон фосфат

P-gluconate - фосфоглюконат

αG6P - алфа глюкозо-6-фосфат

βG6P - бета глюкозо-6-фосфат

αM6P - алфа манозо-6-фосфат

βM6P - бета манозо-6-фосфат

GAP - глицералдехид фосфат

G3P - глицерол 3-фосфат

PGA - фосфоглицеринова киселина

Fru 6 P - фруктозо-6-фосфат

AMP - аденозин монофосфат

P-choline - фосфохолин

GPG - глицерофосфоглицерол

GPGPG - глицерол- глицерофосфоглицерол

GPE- глицерофосфоетаноламин

GPI- глицерофосфоинозитол

GPC- глицерофосфохолин

PEP - фосфоенолпируват

ADP - аденозин дифосфат

UDP-glucose -уридиндифосфат-глюкоза

TCA - цикъл на трикарбоновите киселини

UFA/SFA - ненаситени/наситени мастни киселини

TOM - транслокатор на външната митохондриална мембране

LHC - светосъбиращ комплекс

BAIBA - бета аминоизобутирова киселина

GABA - гама аминоизобутирова киселина

2Д ДИГЕ – двумерна диференциална гел електрофореза

1. Увод

Сушата е един от основните фактори, които ограничават нарастването и продуктивноста на всички видове растения. Водният дефицит инициира негативни промени в редица процеси в клетката, като загуба на тургор, нарушаване на потенциала на водните градиенти, производство на реактивни радикали, промени в обема на клетките и мембранния интегритет, както и денатурация на протеини и други клетъчни компоненти. В еволюцията са се развили механизми за намаляване на негативното влияние на водния дефицит (показано на схемата по-долу), като някои видове известни като ‘възкръсващи растения’, показват екстремна толерантност към десикативните стресови условия.



Haberlea rhodopensis е балкански ендемит, обитаващ скалисти биотопи, предимно на територията на България. Таксономично родопският силивряк влиза в семейство Gesneriaceae и заедно с род Ramonda представят единствените ‘възкръсващи растения’ в Европа. В тази връзка това растение предлага уникална възможност за изучаване на механизмите на десикативна толерантност.



Фиг. 1. Естествени находища на *Haberlea rhodopensis* в Стара планина

Настоящият дисертационен труд обхваща няколко аспекта от процесите на толерантност при *Haberlea rhodopensis* във връзка с промените в белтъчната за фенотипиране на растенията по време на стрес, базирани на промените във водното съдържание и фотосинтетичната активност. Проведени са анализи за установяване на промените в белтъчния апарат на фотосинтетичната машина. Беше използван компонента като краен продукт от генната експресия. В тази връзка, първо бяха проведени анализи насочен белтъчен анализ за установяване на експресията на шаперонови и антиоксидантни белтъци. Промените в метаболизма са изследвани чрез паралелно измерване на промените в метаболитните и белтъчни нива в клетката по време на стрес. В тази връзка като бъдещи насоки за работа остава идентификацията на диференциално експресираните белтъци по време на стрес.

2. Цел и задачи

Цел на настоящия дисертационен труд е изясняване на промените в белтъчния профил на възкръсващото растение *Haberlea rhodopensis* във връзка с промените във фотосинтезата, осмотичния потенциал, анти-оксидативния статус и първичния метаболизъм по време на изсъхване и възстановяване.

За постигане на така дефинираната цел бяха поставени следните задачи

1. Фенотипиране на растенията по време на изсъхване и възстановяване и чрез анализ на промени във фотосинтетичната активност

2. Анализ на тилакоидните белтъци по време на стрес

3. Анализ на шаперонови белтъци- дехидрини

4. Анализ на антиоксидантни ензими- алдехид дехидрогенази

5. Анализ на промените в първичния метаболизъм, посредством интегрирането на широкомащабни метаболитни и белтъчни анализи.

3. Материали и методи

Растителен материал

В настоящата работа са използвани растения на родопски силивряк (*Haberlea rhodopensis*), отгледани чрез *ин витро* размножаване (Djilianov et al. 2005), впоследствие прехвърлени и адаптирани в почва. Растенията се отглеждат в лабораторни условия.

За реализиране на изброените задачи бяха използвани разнообразни молекулярно-биологични методи като:

- **Определяне на междинни етапи на стрес по време на изсъхване и възстановяване посредством JIP тест**

Листни проби за паралелни измервания на съдържанието на вода (WC) и бърза хлорофилна флуоресценция (JIP тест) се събират в началото на дехидратацията, и след това всеки ден по време на курса от дехидратация. За процеса на възстановяване листните проби са събирани след 6 и 12 часа и 1, 2, 3, 4 и 7 дни след старта на рехидратация на растенията. За да бъдат предварително групирани листните проби, в зависимост от параметрите на JIP теста, се използва анализ на основните компоненти (PCA). За да се класифицират различни групи листни проби в различни стрес състояния се използват оценките на JIP параметрите от първите 3 главни компонента от PCA като входни вектори за построяването на самоорганизираща се карта (SOM).

- **Спектроскопични измервания за определяне на фотосинтетичните потоци и анализ на белтъчната организация на фотосинтетичния апарат**

Относителната ефективност на линейния и цикличния електронен поток в различни условия се получава чрез сравняване на промените в P700 редокс състоянието с получените флуоресцентни параметри, отразяващи PSII активността. Една аликвотна част от пречистени тилакоидни мембрани се разтварят с додецил малтозид, след което са разделени с BN PAGE и 2D SDS PAGE.

- **Екстракция на тотален листен белтък**

За екстракция на нативни протеини изходният материал е хомогенизиран с екстракционен буфер. Хомогенатът се центрофугира и супернатантата се насища с амониев сулфат за утаяване на екстрахираните белтъци. За екстракция на тотални листни белтъци при денатуриращи условия са използвани два различни метода: метод с фенол и натриев додецилсулфат и метод с комбинация от няколко детергента и хаотропа с последващо утаяване с ацетон.

- **Обогатяване на екстрактите на ниско експресирани белтъци**

Използвани са два подхода за обогатяване на екстракта на ниско експресирани белтъци. При първия подход са използвани комбинаториални хексапептидни библиотеки (ProteoMiner) на фирмата BioRad. Вторият подход е базиран на префракционирането на положително и отрицателно заредени белтъци съответно, с йонообменни колони (Aurum) на фирмата BioRad.

- **Пречистване на хлоропласти и митохондрии от един изходен екстракт**

Фракционирането на хлоропласти и митохондрии се извършва посредством последователни диференциални и плътностни ултрацентрофугирания. За оценка на фракциите се използва имунодетекция и зимограмна детекция на специфични белтъчни маркери.

- **Едномерна полиакриламидна гел електрофореза на белтъци (SDS- PAGE)**

Използвана е системата на Laemmli (1970) посредством разделяне чрез градиентни гелове (10-20% T), приготвени във формер за едновременно приготвяне на 4 гела (GE Healthcare) съгласно инструкциите.

- **Денатуриращa двумерна електрофореза**

За първо направление на разделяне на белтъците по изоелектрична точка са използвани дехидратирани гелове с имобилизирани амфолини (GE Healthcare). Изоелектричното фокусиране се провежда с IPGPhor III (GE Healthcare) съгласно указанията на производителя. След приключване на програмата за електрофокусиране, геловете

се еквилибрират и стриповете се поставят за разделяне на белтъците при вертикална денатурираща електрофореза.

- **Пренос на белтъци върху нитроцелулозна мембрана и имуноблот**

Електропреносът се извършва с апарат за полусух пренос Semi-Phor (Hoefer). Нитроцелулозната мембрана се блокира за един час в PBS буфер с 3% BSA при стайна температура. Следва инкубиране с първо антитяло-антидехидрин поликлонален антисерум. Мембраната се промива три пъти и се инкубира с второ антитяло – анти IgG-HRP. Следва развиване на цветна реакция с реакционна смес за пероксидазна активност (DAB/H2O2).

- **Изоелектрично фокусиране в нативни условия и нативна двумерна елакрофореза**

Използва се хоризонтална плака с гел с подвижни амфолини с pI в диапазона 3.5-9.5 (Pharmacia-Biotech). Изоелектричното фокусиране се провежда на Pharmacia Multiphor II. След изоелектрично фокусиране в първо направление стартовете се изрязват и еквилибрират, след което се пускат на второ направление на нативна гел електрофореза.

- **Метаболитно профилиране**

Метаболитното профилиране е направено с комбинацията от ^{1}H, ^{13}C и ^{31}P NMR анализ и газ-хроматографски/масспектрометричен анализ на различни типове екстракти (перхлорен, метанол/вода и хлороформ/метанол). Еднокомпонентна ANOVA се използва за определяне на статистическата достоверност на разликите на всеки измерен метаболит по време на стреса. След това е извършен PCA и HCA/Heatmap анализ. Всички метаболити са картирани в AraCyc база данни, и след това метаболитните пътища са използвани като шаблони за създаване на метаболитна карта със софтуера Cytoscape.

- **Белтъчно профилиране**

Използвана е диференциална денатурираща двумерна електрофореза с флуоресцентно белязане на пробите. Определянето на изоелектрични точки и молекулните маси, както площа и интензитета на разделените белтъци, е осъществено със специализираните софтуери – Image Quant (GE Healthcare) и Image Master 2D Platinum (GE Healthcare).

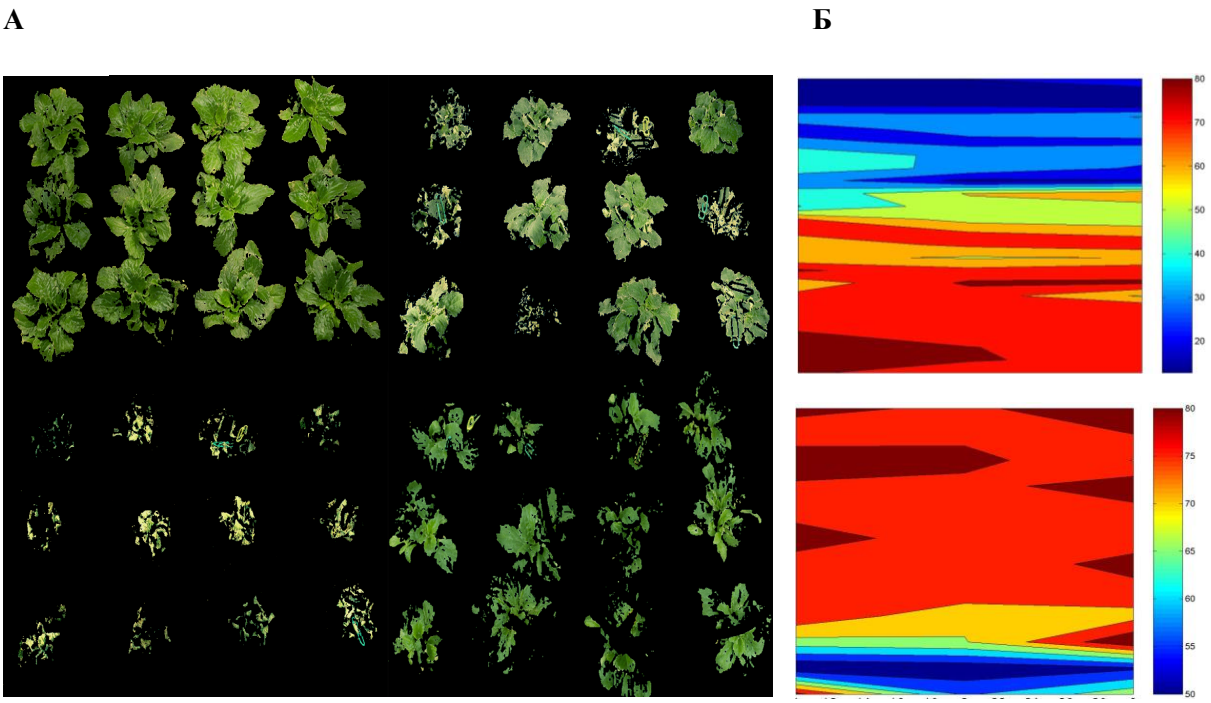
- **Масспектроскометричен анализ на белтъчни петна от двумерна електрофореза**

Петната от интерес са изрязват ръчно и се нарязват на парчета преди да се алкилират и трипсинизират, след което пептидите се екстрахират. Следва нано-LC-MS/MS анализ и генериране на списъци от получените спектри с Mascot Distiller version 2.4.1 software (Matrix Science). MS/MS спектрите са претърсени срещу актуализирана компилация от базата данни на UP_Viridiplantae на Uniprot (2014_01).

4. Резултати

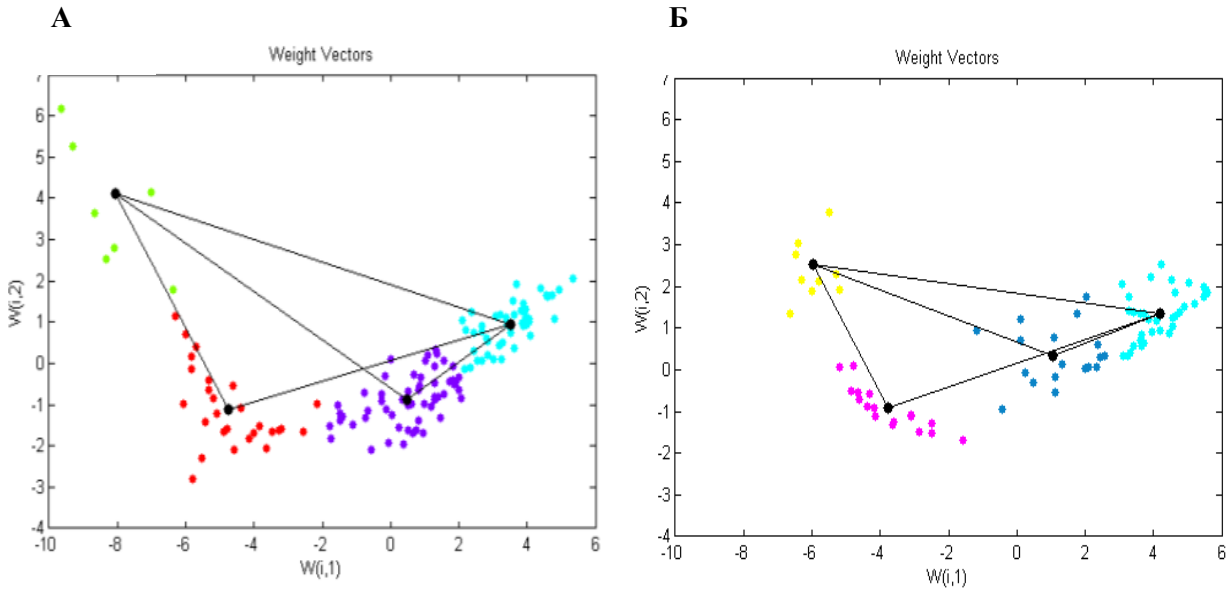
а. Определяне на междинни етапи на стрес по време на изсъхване и възстановяване

Беше приложено относително бавно засушаване на адаптирани към почва добре развити, размножени *in vitro* растения *Haberela rhodopensis*. Процесът на изсушаване от хидратирани растения (около 80% WC) до напълно дехидратирани (около 16% WC) растения в оранжерийни условия отнема около 8 дни без поливане. докато, за да се възстановят напълно, са необходими седем дни, след старта на рехидратиране при контролиран режим на поливане. По време на изсушаването и възстановяването на растенията беше наблюдавана хетерогенност във водното съдържание, както между листата от различни растения, така и в листата от едно и също растение, както е илюстрирано на Фиг. 2.



Фиг. 2. Промяна на водното съдържание. А) Снимки на групи растения с различни нива на водно съдържание при изсушаване и оводняване. Б) Контурна диаграма на водното съдържание на всички растения (y) включително на всеки отделен лист от всяко отделно растение (x) при изсушаване (горе) и оводняване (долу). С цветната скала е означено съответното водно съдържание (WC)

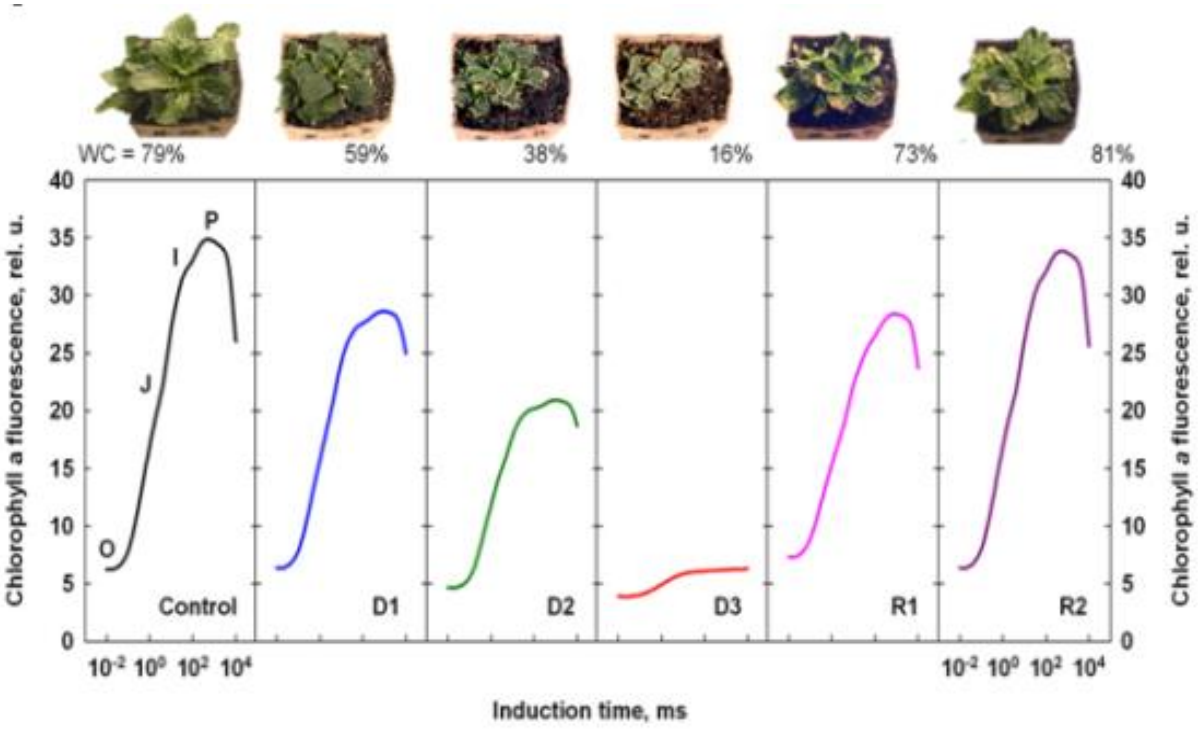
За да се определят добре стресовите състояния за вземане на проби и предвид унифицирането им при събиране, беше използван недеструктивен метод за определяне на водния статус на растението (който да позволява използването на пробата за други анализи след това), базиран на JIP-TEST и съответните статистически методи за обработка на суровата информация и интерпретация на данните. Първо беше направена оценка на разпределението на листните проби според вариацията във флуоресцентните параметри с PCA, след което бяха построени самоорганизиращи се карти (SOM) със зададена топология и брой неврони, според PCA разпределението.



Фиг. 3. SOM визуализация на класифицираните листни проби в съответствие с четирите неврони, определящи центровете за всяко състояние на засушителен стрес. А) Изсъхване и възстановяване Б). Позициите на листните проби, получени след PCA преобразуване, са клъстерирани с невроните според тегловните им позиции, определени от двата тегловни вектора.

След класификацията на листните проби посредством SOM бяха определени и средните стойности на WC и JIP параметрите за всяко състояние, използвайки данните от измерванията с най-близки позиции (9-12 измервания) за всеки неврон при изсъхване. Съответно, за възстановяване бяха избрани последните два клъстера в положителната скала на първия тегловен вектор. В резултат на това бяха определени средните стойности на класифицираните състояния на *Haberlea rhodopensis* по време на стрес : (C) – контролни-свежи растения, две междинни състояния на изсушаване D1 и D2, напълно сухи растения D3, междинно възстановяване (R1) и пълно възстановяване (R2).

Като резултат, всички проби за различните анализи са извършени с помощта на така пригодения недеструктивен метод за оценка на десикативен стрес. По този начин, беше възможно да бъде определено физиологичното състояние на около 50 листа от различни интактни растения в продължение на 60 мин. Според тяхното клъстериране в създадената SOM, те се класифицират съответно в групи (Фиг. 4).



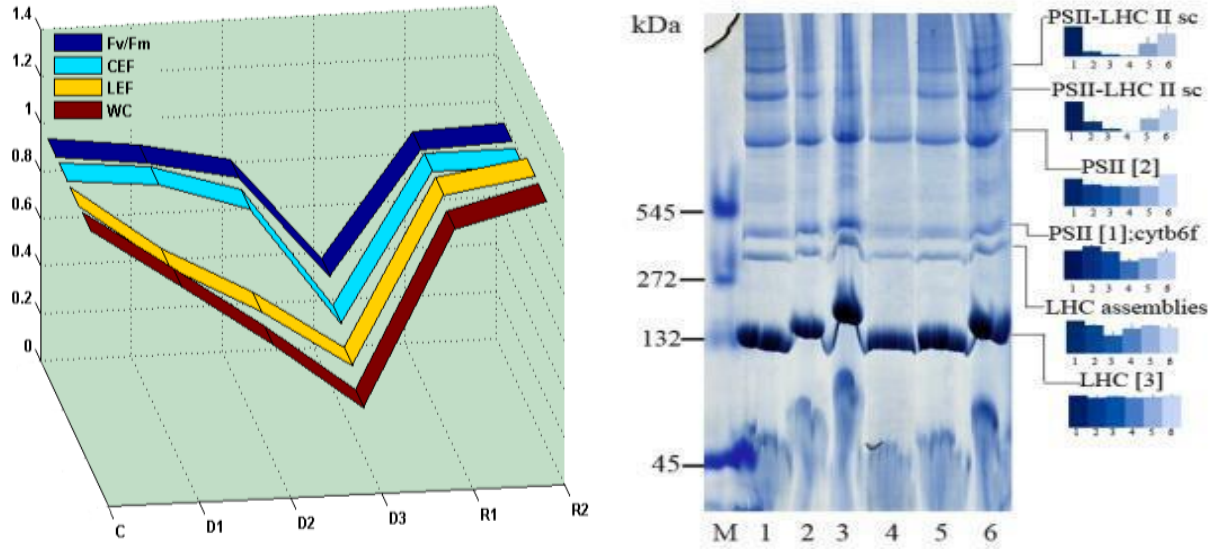
Фиг. 4. Усреднени представителни JIP криви за всяко определено състояние по време на стрес

b. Спектроскопични измервания за определяне на фотосинтетичните потоци и анализ на белтъчната организация на фотосинтетичния апарат

Въз основа на резултатите, получени от JIP теста, беше измерена ефективността на електронния поток при различните водни статуси на растението. В тази връзка, за първи път беше направена оценка за промяната в линейния и цикличен електронен поток при *H. rhodopensis.* В резултат беше установено (Фиг. 5 A), че ефективността на LEF намалява по почти идентичен начин като водното съдържание, но от друга страна е отчетен малък спад в ефективността на CEF, което предполага, че този процес е по-устойчив на воден дефицит при *H. rhodopensis* (Фиг. 5 A). Отчетените промени във фотосинтетичния електронен пренос бяха основа за по-задълбочен анализ на организацията на

фотосинтетичния апарат на *H. rhodopensis* по време на стрес. Резултатите от приложената BN- PAGE показват типичната организацията на апарата за фотосинтеза в растенията: PSII [2]; PSII [1]; Cytb6f; LHCII ансамбли; LHCII, както и високо молекулни суперкомплекси, състоящи се от различни форми на PSII-LHCIIsc (Фиг. 5 Б). По време на прехода от C до D1 състояние започва дисоциация на ивиците, съответстващи на PSII-LHCIIsc, като намаляват интензитета си, а най-големите се дисоцират напълно (Фиг. 5 Б). Това намаляване на PSII-LHCIIsc продължава до етапа D3, където се наблюдава почти пълна дисоциация на всички високо молекулни комплекси. В D3 количеството на активни PSII димери също леко намалява. По време на рехидратация възстановяването на суперкомплексите частично започва в R1 етап и завършва напълно в R2 етап. От друга страна, количествата на LHCII не се променят по време на стрес.

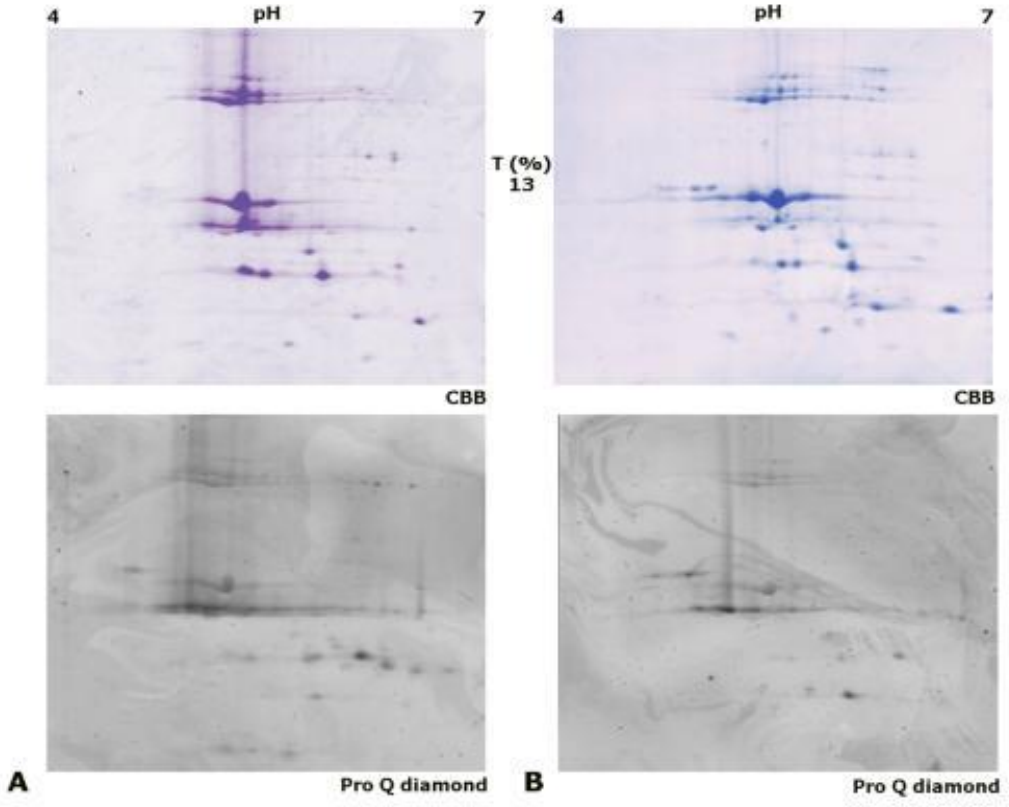
А **Б**



Фиг. 5. А) Количествено сравнение на линейния и цикличен електронен поток в контекста на намаляване на водното съдържание и Fv/Fm съответно, в избрани етапи на засушаване и възстановяване. Силата на сигналите е усреднена от 6 повторения и нормализирана спрямо контролното състояние. Б) BN-PAGE разделяне и количествено определяне на тилакоидните белтъчни комплекси от *H. rhodopensis* след разтваряне с DDM. М-белтъчен маркер за мол. маса (kDa); 1 - контролни растения C; 2 - етап D1, - умерено изсушаване; 3 - етап D2, тежко обезводняване; 4 - етап D3, сухи растения; 5 - етап R1, междинно възстановяване; 6 - етап R2, пълно възстановяване.

Предвид получените резултати и ролята на фосфорилирането и дефосфорилирането на някои белтъци от фотосинтетичния апарат, за наблюдаваните реорганизации на

фотосинтетичните комплекси беше проведен по-детайлен анализ на тилакоидните белтъци посредством 2D PAGE, както и анализ за фосфорилиране (Фиг. 6). В резултат бяха установени разлики в белтъчния профил на тилакоидните мембрани и разлики във фосфопротеиновия профил. В тази връзка предстои по-детайлен анализ на промените в тилакоидния протеом, свързани със софтуерен анализ и идентификация посредством масспектрометрия.

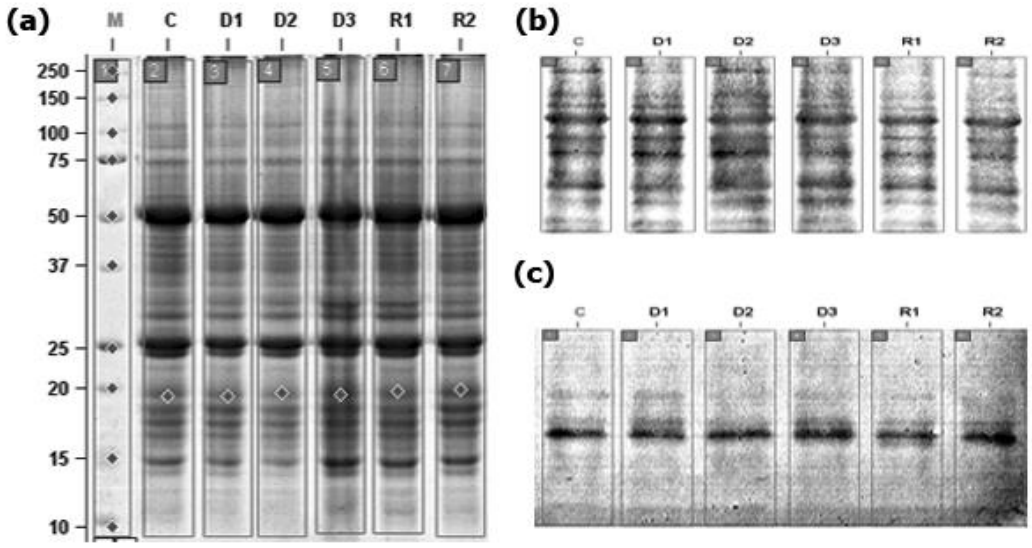


Фиг. 6. Анализ на тилакоидни белтъци от *H. rhodopensis*. Разделяне на тилакоидни белтъци в контролни растения (А) и сухи растения (Б) с 2D-PAGE и последващ анализ на фосфорилиране с ProQ Diamond.

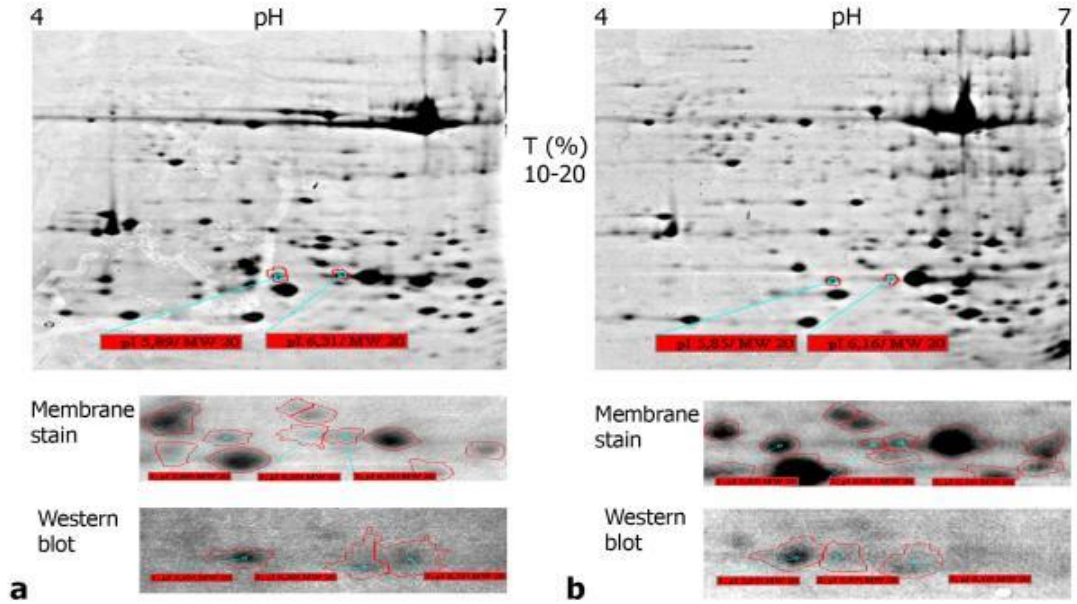
с. Анализ на шаперонови белтъци

Защитната роля на дехидрините като молекулярни шаперони при десикативна толерантност в растенията е добре известна. Резултатите от извършената имунодетекция със специфични поликлонални антитела срещу силно консервативния К сегмент (Close et al. 1993) показват, че антителата разпознават основно един белтък с мол. маса 20 кDa. Не бяха наблюдавани обаче значителни промени в експресията на откритите протеини по време на изсушаване и възстановяване (Фиг. 7). За да се потърсят възможни пост-транслационни промени, беше проведена 2D-PAGE, последвана от имуноблот анализ в

контролни и напълно засушени растения. Бяха установени три белтъчни изоформи с pIs от 5.89, 6.20 и 6.31 и мол. маса 19 kDa с малка промяна в изместването към киселия диапазон при сухите растения (Фиг. 8).

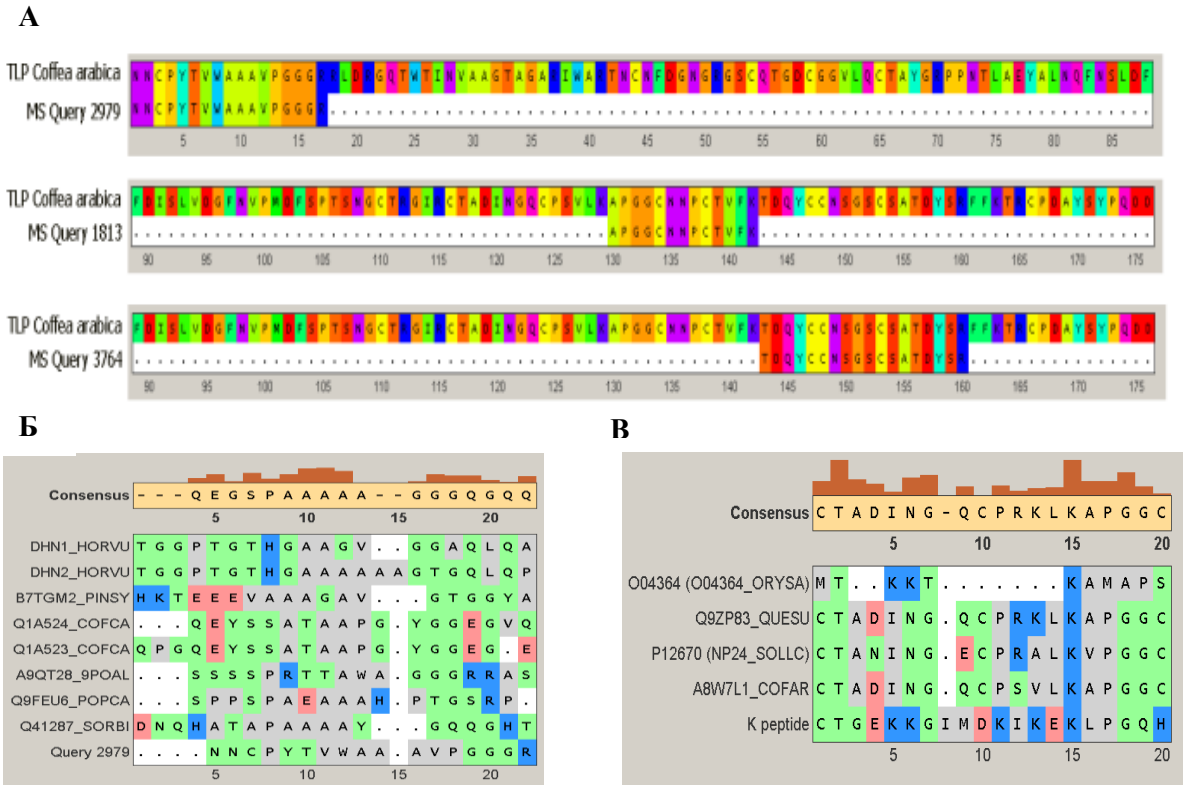


Фиг. 7. Имунодетекция с анти-дехидрин специфични антитела в екстракти от *H. rhodopensis* в различни фази на засушаване и рехидратация. а) разделяне на листни разтворими белтъци чрез SDS-PAGE и CBB оцветяване. б) обратимо оцветяване с MemCode™ на нитроцелулозната мембрана след пренос. в) имунодетекция със специфични анти- дехидрин антитела.



Фиг. 8. Представителна 2D-PAGE на листни белтъци от *H. rhodopensis* и имуноблот за установяване на дехидрини при а) контролни растения и б) напълно сухи растения

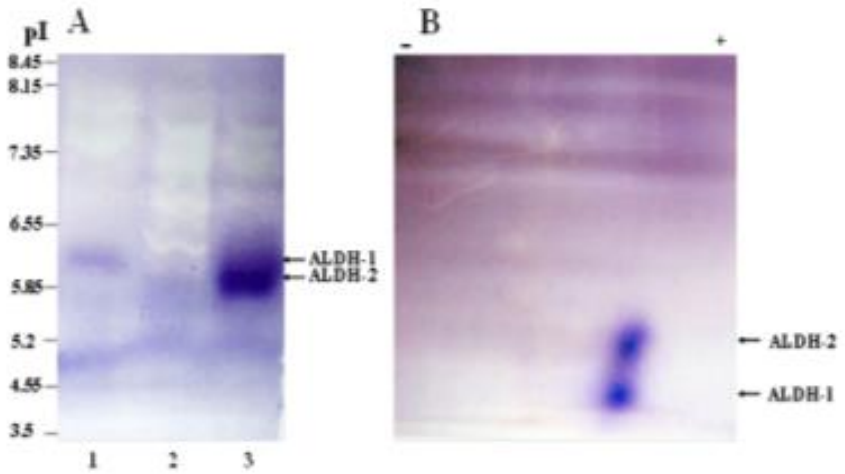
За идентифициране на откритите с антителата белтъци, всеки две от основните петна с най-силен интензитет в контролните и напълно сухи състояния, означени в червено на геловете на Фиг. 8, бяха екстрахирани и анализирани с LC-MS/MS. В резултат на получените пептидни последователности беше идентифициран тауматин-подобен протеин (TLP) (Фиг. 9А), който принадлежи към семейството на протеини, свързани с устойчивост на стрес, но без видима прилика с последователността на известни дехидринови протеини. За по-подробно сравнение беше проведено сравнение на получената секвенция, съответстваща на деструктурирания участък от TLP и известни дехидрини от една страна, и секвенцията на консервативния К сегмент на дехидрините с известни TLPs. По този начин бяха получени консенсусни последователности с известно сходство между двата класа белтъци. Нещо повече, беше открит и необходимия (6) брой еднакви аминокиселинни последователности между К сегмента и TLP, които обясняват епитопната крос-реакция на използваните специфични антитела (Фиг. 9 Б, В).



Фиг. 9. LC-MS/MS на откритите белтъци. А) налагане на получените пептидни секвенции върху цялата последователност на идентифицирания TLP от *Coffea arabica*. Б) Сравняване на един от получените пептиди –съответстващ на неподредения участък при TLP от домат и известни дехидринови последователности. В) Сравняване на консервативния К-сегмент от дехидрините, служещ за епитоп на използваното антитяло с известни последователности на TLP.

d. Зимограмен анализ на алдехид дехидрогенази

Анализите за ALDH ензимното действие са проведени със свежи растения (контроли), растения с 50% водно съдържание и напълно засушени такива. В контролните растения се открива само една основна ивица (обозначена като ALDH1) с pI 5.95 (Фиг. 10A, старт 1). Последната в голяма степен намалява по време на първия етап на засушаване (D1), като се наблюдава слаба активност на друга ивица с pI 6.35 (обозначена като ALDH2). Интересно е, че и двете показват поразително висока интензивност на последния етап на засушаване (D2). След разделянето на D2 старта с двумерна електрофореза бяха наблюдавани две добре разделени петна с активности с pI 5.95 и 6.35, които съответстват на ALDH1 и ALDH2. Тъй като ALDH1 и ALDH2 се различават не само по техните изоелектрични точки, но и по тяхната мобилност във второ направление на нативен гел, може да приемем, че съответните ALDHS вероятно са продукти на два гена.

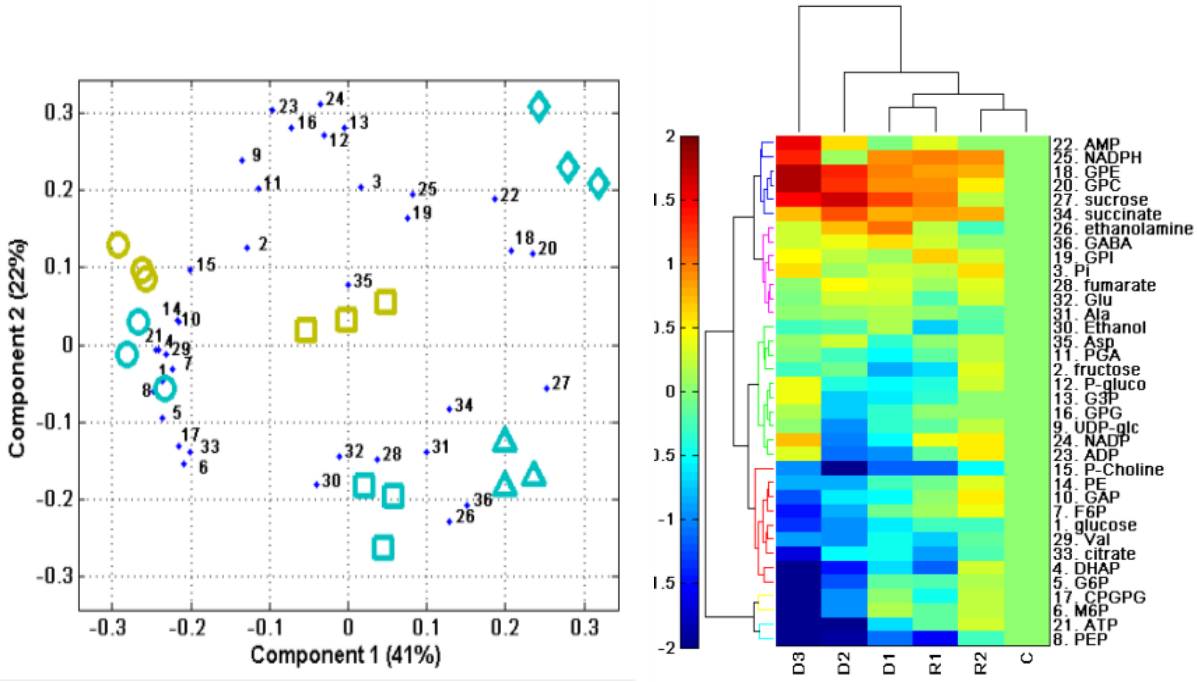


Фиг. 10. Откриване на ALDH активност в общите листни белтъци на *Haberlea rhodopensis*. A) Изоелектрично фокусиране и активност на ALDH в контролни растения (старт 1), при D1 (старт 2) и D2 (старт 3). Равни количества белтък (25 мкг) са нанесени на всеки старт. B) Активност на ALDH от D2 в неденатурираща 2D-PAGE.

e. Метаболитно профилиране

С комбинацията от ^{1}H, ^{31}P и ^{13}C ЯМР, бяха идентифицирани и количествено определени общо 36 метаболита в хода на дехидратацията и възстановяването на *Haberlea rhodopensis*. За да бъдат обобщени данните от ЯМР, беше построен PCA би-плот, който

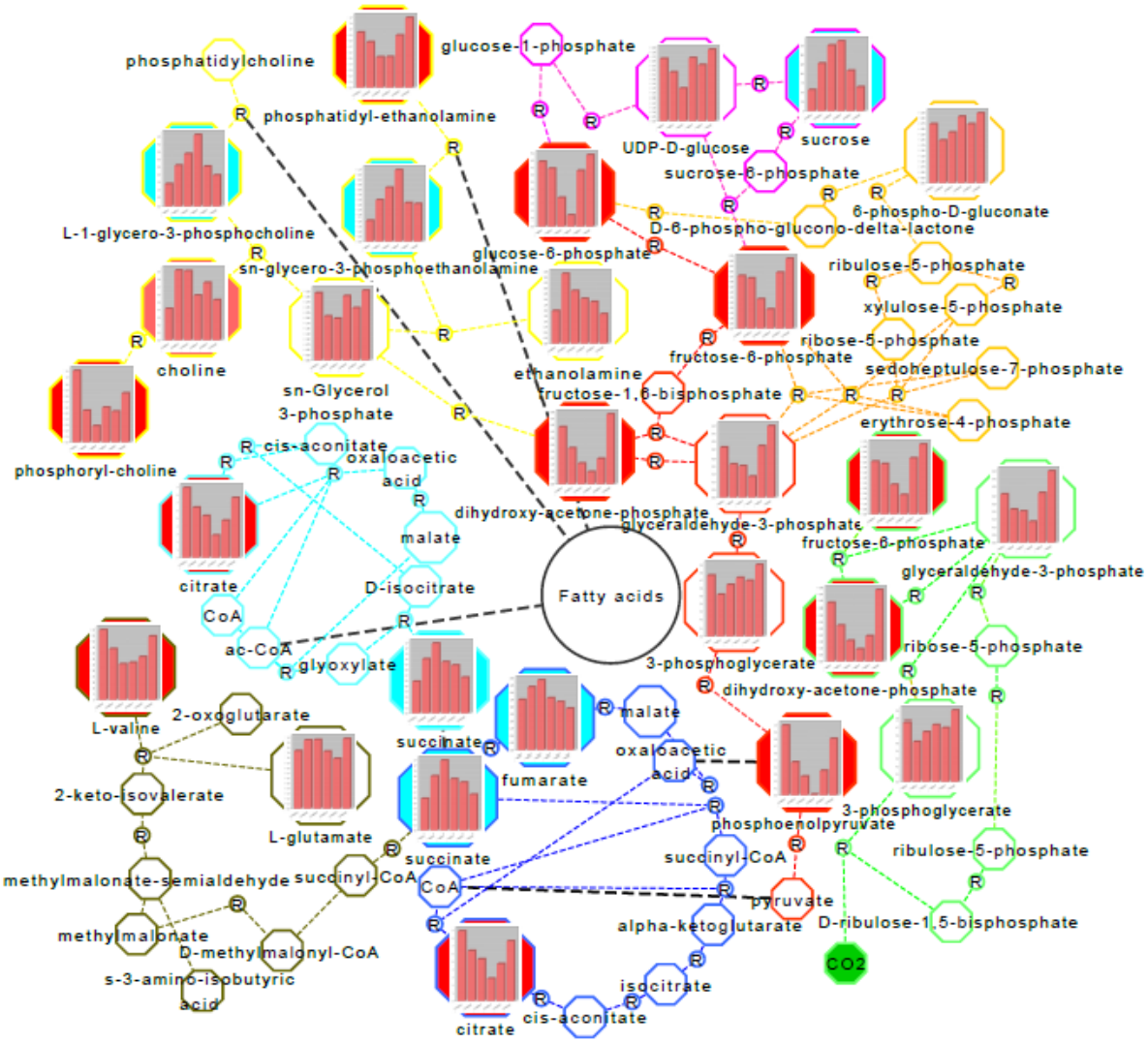
показва паралелно вариацията в данните от метаболитните измервания и групирането на биологичните проби въз основа на сходствата и различията в измерените метаболити (Фиг. 11 А). В допълнение, за да се визуализира по-добре динамиката на метаболитните промени, беше построена и HCA/Heat карта (Фиг. 11 Б).



Фиг. 11. Мултивариационна статистика на метаболитните профили. А) Анализ на основните компоненти (PCA) biplot на метаболитите, определени в *Haberlea rhodopensis* като лодинги - представени като числа, оценени в проби от различни третирания: ○ за контрола (С); за D1; Δ за D2; ◊ за D3 син цвят ; □за R1; ○ за R2 зелен цвят. Номерата на метаболитите съответстват на означенията на Heat картата. Б) HCA/Heat map за групиране и визуализация на динамиката на определените метаболити, представени от log2 на средната на техните абсолютни стойности нормализирани към контролните стойности.

Първите три компонента на PCA обясняват 70% от тоталното вариране на измерените метаболити в листните проби и показва добро разделяне на третираните повторения. Първата група от лодинги (метаболити) с най-висок принос за разделянето на третиранията в PC1 положителната скала включва: PEP, глюкоза, DHAP, G6P и ATP, и втората група, за отрицателната съответно: GPC, захароза и GPE (Фиг. 11 А). За останалата част от вариацията в PC2 - NADP, ADP, GPG и G3P са с основен принос за разделянето на третиранията в положителната скала и етаноламин и GABA за

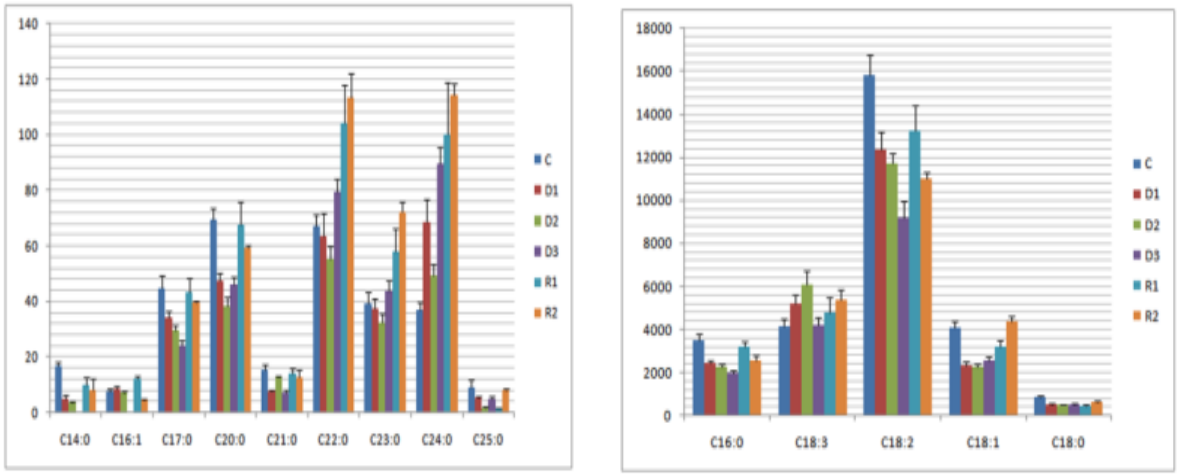
отрицателната съответно. HCA/Heat map групирането на третиранията, в зависимост от техните Евклидови разстояния, показва същото разпределение като при PCA (Фиг. 11 Б). По отношение на динамиката на всички измерени метаболити са наблюдават три главни клъстера от гледна точка на увеличаване или намаляване на тяхното количество (Фиг. 11 Б, редици). Първият клъстер (Фиг. 11 Б, редове, горен клъстер) представлява метаболитите с повишена концентрация по време на изсушаване. Вторият клъстер от метаболити (Фиг. 11 редове, среден клъстер) представлява общо метаболитите, които намаляват по време на суша. И накрая се наблюдава трети главен клъстер (долен клъстер), който се характеризира с намаление на концентрациите на GPGP, M6P, ATP, и PEP по време на D2- D3 прехода. Идентифицираните метаболити бяха картирани в AraCyc на TAIR (Фиг. 11) и тяхната динамика беше анализирана към контекста на метаболизма на растенията. В резултат бяха взети предвид няколко метаболитни пътя (Фиг. 12): биосинтеза на захароза (розово), гликолиза (червено), цикъл на Калвин (светло зелено), пентозофосфатен път (оранжево), глицерофосфолипиден метаболизъм (жълто), деградация на валин и глутамат (тъмно зелено), TCA цикъл (тъмно синьо) и глиоксилатния цикъл (светло синьо). Натрупването на захароза започва през D1 етап и продължава по време на D2 и D3, като в тази връзка нивото на UDP-глюкоза спада по време на тези етапи и най-накрая се увеличава в D3. Динамиката на F6P и G6P също показва интензивно потребление от D1 до D3 етапи, което предполага смяна на посоката на гликолизата към биосинтеза на захароза по време на тези преходи. Всъщност, PCA и HCA моделите също показват, че всички гликолитни междинни продукти драстично намаляват с водното съдържание на листа. Леко увеличеното ниво на PGA в D3 може да се дължи на компартментацията на растителния метаболизъм. По този начин, относително високите нива по време на суша в хлоропластите биха могли да служат като депо, което да гарантира бързото възстановяване на фотосинтезата при рехидратация. На следващо място, повишените нива на фосфоглюконат сочат, че една част от гликолитичния поток би могла да се отклонява към пентозофасфатния път, който би могъл да послужи като доставна единица на еритрозо 4 фосфат. Заедно с PEP, те участват в натрупването на



Фиг. 12. Метаболитните промени, съответстващи на относителните стойности на всяко третиране (спрямо стойностите на контролни растения) в контекста на избрани метаболитни пътища. Барове отляво надясно, представени на C, D1, D2, D3, R1 и R2 етапи съответно.

полифеноли през шикиматния път. От друга страна се наблюдава изразено разграждане на фосфатидил етаноламина в *H. rhodopensis*. Във връзка с това, нивата на GPE се увеличат драматично по време на стрес, отразено и в PCA модела. Освен това, ние наблюдавахме същите тенденции за GPC, което предполага, че фосфатидилхолинът също може да е подложен на разграждане. Изразеното разграждане на валин, което показва висока концентрация в контролните растения (концентрацията на валин в абсолютни стойности е

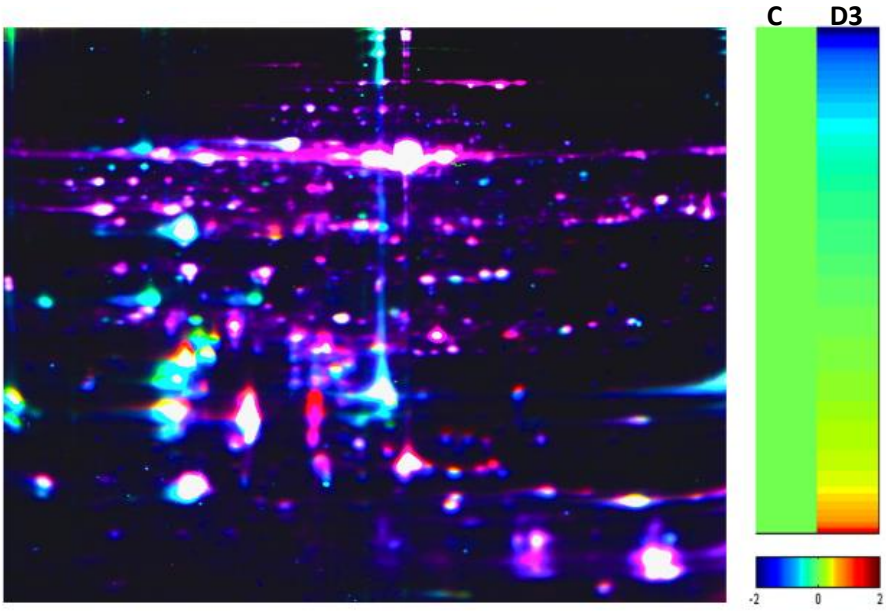
същата като захарозата в контролните растения), могат да бъдат свързани с доставяне на въглеродни източници на глюконеогенезата чрез сукцинат и TCA цикъл. Всъщност, увеличението на концентрацията на янтарна киселина и фумарова киселина по време на засушаване подкрепят такава хипотеза. От друга страна, намаляването на лимонена киселина може да се дължи на обмена на трикарбонови скелети между цикъла на лимонена киселина за глюконеогенеза. След проведения метаболитен фингърпринт с ЯМР, беше направен анализ на мастните киселини посредством GC/MS (Фиг. 13), за да бъде установено тяхното количество по време на стрес във връзка с регистрираното разграждане на липиди. Както се очакваше, повечето мастни киселини показаха спад по време на стрес (Фиг. 13).



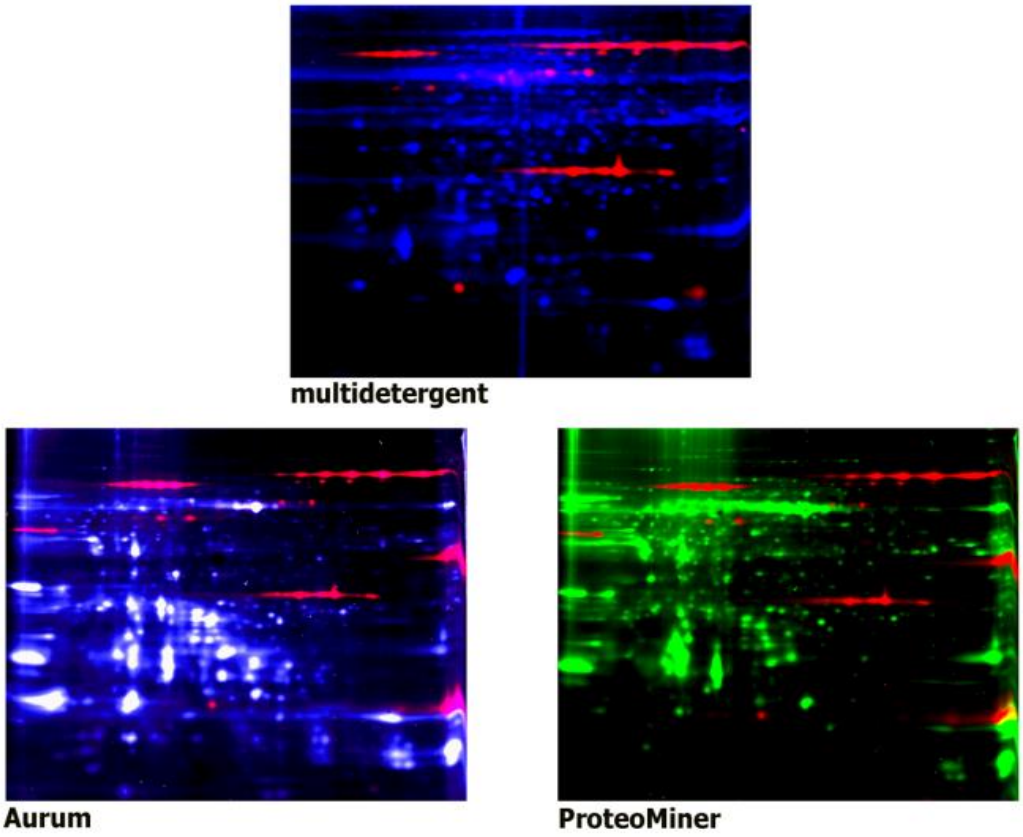
Фиг. 13. Количествен анализ (µg/gDW) на всички идентифицирани мастни киселини в *H. rhodopensis.*

f. Белтъчно профилиране

След проведения експресионен анализ на първоначалния тотален белтъчен екстракт не беше установена очакваната драстична промяна на белтъчния профил, каквато се наблюдава при чувствителни на засушаване растения. По-голяма тенденция се забеляза в белтъците, които намаляват в сухо състояние, въпреки че бяха регистрирани и такива, които се увеличават (Фиг. 14). Във връзка с това, че много често ниско експресирани



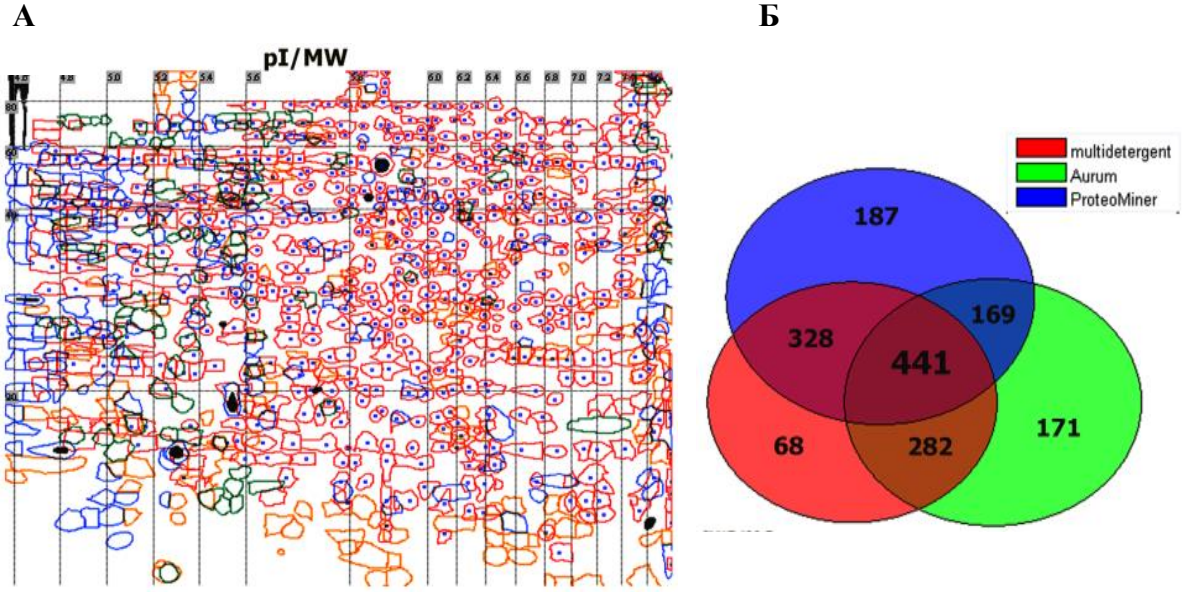
Фиг. 14. 2Д ДИГЕ експресионен анализ на контролни и сухи растения от *H. rhodopensis.* Промяната в детектираните спотове е представена на Heat map, като логаритмувана промяна в обема на всеки спот в D3, отнесен към обема в контролното състояние.



Фиг. 15. Разделяне с 2Д ДИГЕ на тотален листен екстракт (multidetergent), екстракти, третирани с йонообменна хроматография (Aurum) и екстракт, третиран с комбинаториална хексапептидна библиотека (Proteominer). С червена флуоресценция е визуализиран pI/MW маркера, използван за вътрешен стандарт.

белтъци като транскрипционни фактори участват в адаптацията на растенията към суша, бяха използвани стратегии за обогатяване на първоначалния белтъчен екстракт преди разделяне и визуализиране посредством 2Д ДИГЕ (Фиг. 15)

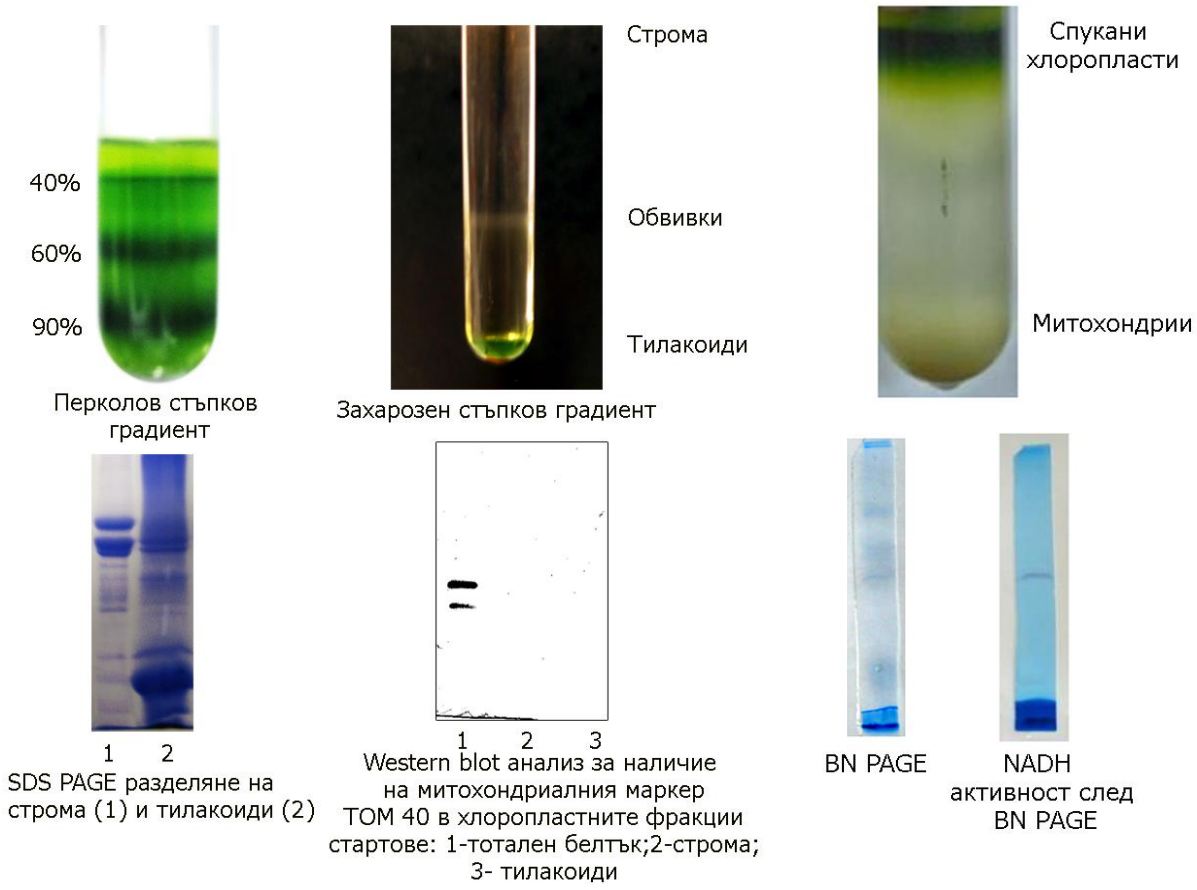
Посредсвом използваният pI/MW стандарт и функциите на Image Master 2D Platinum беше възможно отчитането на броя спотове и техните pI/MW, характерни за всеки екстракт чрез точното налагане на всеки един от геловете. По този начин беше създадена 2D протеомна карта, обогатена на ниско експресирани белтъци (Фиг. 16).



Фиг. 16. Обединяване и картиране на тоталния листен белтък от *H. rhodopensis*, разделен с 2D-PAGE. А, с червено са означени петната, характерни за първоначалния белтъчен екстракт, сините типове показват петната, които са намерени и в останалите екстракти. С жълто са показани общите петна за AURUM и ProteoMiner. Със син цвят са отбелязани петната, характерни за AURUM и със зелено – тези, характерни за ProteoMiner. В) Вен диаграмите представят припокриващите се и уникални петна от общия брой детектирани белтъчни петна.

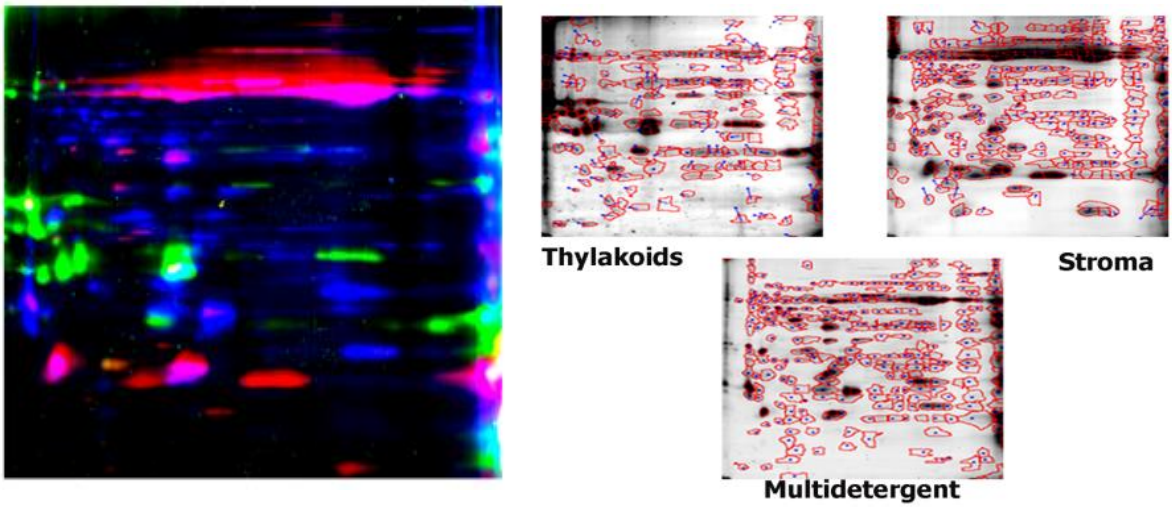
Представеният протокол за субклетъчно фракциониране даде възможност за едновременното изолиране и пречистване на интакни хлоропласти и митохондрии с цел бъдещ анализ на протеомите на тези субклетъчни компартменти (Фиг. 17). Вторият етап на изготвянето на 2D протеомна карта беше картирането на пречистените стромална и тилакоидни фракции върху първоначалния белтъчния екстракт (Фиг. 18). Беше установено, че повечето белтъци в двете фракции присъстват в първоначалния белтъчен

екстракт, но е необходимо повторение на експеримента с цел по-добро разделяне за по-отчетлива картина



Фиг.17. Пречистване на интактни хлоропласти и митохондрии от *H. rhodopensis*. А) Пречистване и субфракциониране на хлоропласти, разделяне на белтъка с SDS PAGE и оценка на чистотата с Western blot срещу известен митохондриален маркер. Б) Пречистване на интактни митохондрии, разделяне на белтъка с BN PAGE и зимограма на NADH дехидрогеназа.

.



Фиг. 18. Картиране на стромалната и тилакоидна фракции върху тотален листен белтък от *H. rhodopensis.*

5. Обсъждане на резултатите

Анализите върху влиянието на стреса от сушата при саксийни растения често пъти е затруднено поради разнородното изсъхване на почвата, което води до хетерогенност във водното съдържание на листата при различни растения и дори до хетерогенност в листата на едно и също растение (Фиг. 2 B). От друга страна изучаването на дискретни и възпроизводими физиологични състояния на растението по време на стрес е важна стъпка, за да се опише точно динамиката на отговор. Най-широко използваният метод за оценка на състоянието на водния статус на листа е оценката на относителното съдържание на вода (RWC). Въпреки това, количествено определяне на този параметър по традиционни методи е много бавен процес, и освен това този метод е деструктивен, което означава, че пробата не може да се използва за други експерименти. В настоящата работа беше разработен недеструктивен, бърз и надежден метод за определяне на водния статус на *Haberlea rhodopensis* по време на изсъхване и възстановяване. Този метод се основава на промени в бързата флуоресценция на хлорофила (Strasser *et al.* 2010) в интактни растения и класификацията им в самоорганизираща карта (SOM) (виж Фиг. 3). В резултат на комбинацията от бърза флуоресценция и адсорбционна спектроскопия беше показано, че за разлика от намаляването на линеен електронен поток между фотосистемите,

цикличният електронен поток (CEF) около PSI показва висока активност до пълното сухо състояние (Фиг. 4 А). Разкачането на суперкомплексите от PSII и LHC II (Фиг. 4 Б) може да доведе до ситуация, в която този комплекс вече не може да допринесе електрони към останалите комплекси от веригата на фотосинтетичния електронен поток - цитохром b6f и пластоцианин. При тези условия, следователно цикличният електронен поток може просто да бъде засилен, защото PSI задвижваните електрони вече не трябва да се конкурират с тези от PSII. В тази връзка не бяха наблюдавани големи промени в останалите комплекси с изключение на леко намаляване и на PSII димерите, които са най-малките функционални комплекси на PSII. Количеството на LHC II не се променя по време на стрес. Според съвременните догми, разкачането на големите комплекси PSII и LHC II и реорганизацията на тилакоидните домени най-често се дължи на обратимото фосфорилиране или дефосфорилиране на различни белтъци от фотосинтетичния апарат. Резултатите от проведените анализи след разделяне на тилакоидни белтъци с 2D PAGE показаха промени както във фосфопротеиновия профил, така и появяване и деградация на протеини при сравнение на контролни и сухи растения.

Дискутирана тема, свързана с натрупването на защитни протеини при десикативната толерантност, представляват белтъците с неподредени участъци в техните молекули. В тази връзка едни от най-добре изучените представители на тази група са дехидрините. В резултат на проведения имуноблот за дехидрини беше установен 20 kDa протеин в *H. rhodopensis* (Фиг. 7). След 2D- имуноблот се наблюдават три изоформи, които съответстват на диапазона от 20 kDa, открит в 1D имуноблота (Фиг. 8). Трите пептида, получени от MS/MS анализ на белтъчните петна, екстрахирани от 2D геловете, идентифицираха протеин, съответстващ на Thaumatin-подобни протеини (TLPs) от Coffea arabica (Фиг. 9). Освен това, част от единия пептид съответства на неподреден участък, описан в TLP NP40 от домати (Ghosh & Chakrabarti 2008), което потвърждава съществуването на такива неподредени структури в протеома на *H. rhodopensis*. Интересно е, че протеини, имунологично свързани с дехидрините, са докладвани в дрожди, след секвенирането на генома им, обаче не са идентифицирани гени, съответстващи на дехидрини, което предполага, че някои от дехидриновите структурни мотиви могат да бъдат намерени в други протеини. При сравняването на известни дехидрини с неподредения участък, намерен в *H. rhodopensis*, са показани известни

прилики и възможни консенсусни последователности. Обратно, при сравняването на силно консервативния К-сегмент на дехидрините (използван като епитоп за получаване на използваното антитяло), е показана консенсусна област, включваща 6 абсолютно идентични аминокиселини, което обяснява получената крос-реакция на използваното антитяло с идентифицирания TLP. В тази връзка, конститутивната експресия на тези протеини в *H. rhodopensis* предполага, че те могат да играят роля в толерантността при изсъхване.

При анализа на тотални протеини, изолирани при нативни условия от листата на контролните и изсъхнали растения с помощта на зимограмен анализ, бяха наблюдавани промени в броя и интензитета на ивиците, представляващи ALDH дейности (Фиг. 10). Стрес-индуцирана експресия на ALDH гени при дехидратация са докладвани в няколко растителни видове. Освен това няколко проучвания показват, че свръх-експресията на ALDHs в някои растения наистина подобрява растителната толерантност към различните абиотични стресови фактори. Променената активност на ALDH по време на изсъхване в *H. rhodopensis* и наличието на високо активна втора изоформа на ALDH(2) в сухите растения предполагат нейната защитна роля в забележителната толерантност на *H. rhodopensis*. Въпреки това са необходими по-комплексни анализи за изясняване на структурата и функцията на ALDH(2).

Комбинираното NMR метаболитно профилиране и количествен анализ и проучванията с бърза флуоресценция и адсорбционна спектроскопия послужи като мост между динамиката на първичния метаболизъм и фотосинтезата. Показано е, че при изсушаване на *H. rhodopensis* АТФ намалява успоредно с линейния електронен поток и съдържанието на вода в листа. В тази връзка се предполага, че АТФ е напълно използван за енергийно зависими метаболитни реакции, като постоянните нива на цикличния електрон поток играят важна роля за синтеза на АТФ. След омокряне, бързото възстановяване на АТФ се дължи на възстановяването на фотосинтетичната машина. Не беше отчетено и драстично намаляване на съотношението NADP/NADPH по време на стрес, което вероятно се дължи на фотопротективните функции на LEF/CEF. Широко прието е, че натрупването на захароза при изсушаване е сред основните защитни механизми за *H. rhodopensis*. В тази връзка беше наблюдавано значително потребление на гликолитни междинни продукти успоредно с натрупването на захароза (Фиг. 11). В

допълнение, докато повечето от определените аминокиселини показват сравнително ниски концентрации, съдържанието на валин преди стреса е почти подобно на това на захарозата. По време на изсушаване количеството му показа намаляване наполовина и пълно възстановяване след рехидратация. По този начин може да се заключи, че както при други растения, *H. rhodopensis* би могло да използва разклонени аминокиселини като алтернативен източник на въглерод по време на стрес. По време на стрес PE намалява два пъти, като показва корелация заедно с валина (Фиг. 11). Отчетеното намаляване на свободните мастни киселини в *H. rhodopensis* би могло да се дължи на тяхната деградация чрез глиоксалатния цикъл, което гарантира друг алтернативен източник на въглерод чрез връзката между цикъла на трикарбоновите киселини (TCA) и глюконеогенезата. Значителното натрупването на сукцинат и фумарат в ранните етапи на изсушаване (D1-D2) (Фиг. 11), успоредно с намаляването на валин и свободните мастни киселини, доказва връзката на тези два алтернативни източника на въглерод с цикъла на TCA. От друга страна, изразените натрупвания на GPC поради разграждането на липиди заедно с натрупването на захароза може да гарантират достатъчна осмопротекция на клетката за оцеляване на *H. rhodopensis* по време на екстремното засушаване.

Сравнителният белтъчен експресионен анализ на първоначалния листен екстракт при контролни и сухи растения очаквано показа промени в интензитета на белтъчна експресия в посока немаляване по време на засушаване. По-интересно е, че не бяха отчетени драстични промени, както и че количеството на променените белтъчни петна беше по-ниско от очакваното. В тази връзка бяха оптимизирани протоколи за обогатяване на ниско експресирани белтъци с цел бъдещ количествен анализ. Освен това във връзка с промените, отчетени в първичния метаболизъм на *H. rhodopensis* и неговата функционална клетъчна компартментация, бяха извършени експерименти в посока на картиране на различни части от листния протеом на *H. rhodopensis* заедно с експресионен анализ посредством 2Д ДИГЕ.

1. Изводи

1. Предложен е нов недеструктивен подход за оценка на състоянието на растенията по време на десикативен стрес. Този метод дава възможност да се определи с добра възпроизводимост физиологичното състояние на многобройните листни проби от различни растения от *H. rhodopensis* в кратък период от време и по този начин да се свърже активността на фотосинтезата с всички други изследвани процеси.
2. Цикличният електронен транспорт остава активен почти до пълно сухо състояние за разлика от намалението на линейния електронен поток, което се дължи на промените в протеиновата организация на фотосинтетичната машина. Тези процеси могат да имат фотопротективна роля и да предоставят достатъчно ATP за гориво на специфични процеси, необходими за оцеляване на растението.
3. Настоящите изследвания показват липсата на дехидрини в *H. rhodopensis*, в подкрепа на транскриптомните анализи, проведени до момента. Идентифициран е друг клас вътрешно деструктурирани протеини, имунологично свързани с растителните дехидрини – тауматин-подобни белтъци (TLPs). Тези протеини се експресират конститутивно и биха могли да се считат за подходящи кандидати, отговорни за толерантността на *H. rhodopensis* в условия на стрес.
4. Открита е нова, високо активна изоформа на алдехид дехидрогеназа (ALDH) в сухите растения, която най-вероятно има детоксикираща роля в отговор на повишеното количество алдехидни радикали, генерирани от оксидативния стрес.
5. Резултатите от настоящото изследване потвърждават хипотезата за подтискане на фотовъглеродната реакция в анхидробиотите, както и необходимостта от осигуряване на дишане за натрупване на осмопротектанти за клетките. В тази връзка се предполага, че в късните етапи на засушаване алтернативни източници на въглерод за масовото натрупване на захароза се предоставят от високите първоначални количества валин, които намаляват по време на стрес и разграждане на липидите (чрез разграждането на мастните киселини).
6. Открит е нов кандидат за мощен осмопротектант при Хаберлеа, който се натрупва заедно със захарозата по време на стрес. Това е глицерофосфохолин (GPC) – продукт

от разграждането на липидите, за който е доказано, че участва в осмопротекцията на клетките.

2. Приноси

1. Предложен е нов недеструктивен подход за оценка на състоянието на растенията по време на десикативен стрес.
2. Адаптирана е процедура за изолиране на интактни хлоропласти и митохондрии от възкръсващо растение, подходящи за белтъчни анализи.
3. Чрез методи за обогатяване на ниско-експресирани белтъци, значителнно е увеличен броят на детектираните белтъци след разделяне с двумерна електрофореза.
4. Посредством 2Д ДИГЕ е изготвена протеомна карта и е проведен експресионен анализ, което е добра основа за бъдещите изследвания с MS/MS.

Публикации в научни списания

1. D. Djilianov, S. Ivanov, T. Georgieva, D. Moyankova, S. Berkov, G. Petrova, P. Mladenov, N. Christov, N. Hristozova,D. Peshev, M. Tchorbadjieva, V. Alexieva, A. Tosheva, M. Nikolova, I. Ionkova, W. van den Ende (2009) A HOLISTIC APPROACH TO RESURRECTION PLANTS. HABERLEA RHODOPENSIS – A CASE STUDY Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 23/2009/4

2. MLADENOV P., ZASHEVA D., PESHEV D., CHRISTOV N., ROLLAND N., DJILIANOV D. and TCHORBADJIEVA M. (2013) SUB-CELLULAR FRACTIONATION AND GEL-BASED PROTEOMICS OF HABERLEA RHODOPENSIS: A PROMISING APPROACH TO OPEN THE BLACK BOX OF RESURRECTION PLANTS Bulgarian Journal of Agricultural Science, 19 (2) 2013, 22–25

3. Moyankova D., Mladenov P., Berkov S., Peshev D., Georgieva D. and Djilianov D. (2014) Metabolic profiling of the resurrection plant Haberlea rhodopensis during desiccation and recovery Physiologia Plantarum Volume 152, Issue 4

4. Mladenov P., Zasheva D., Djilianov D., Tchorbadjieva M. (2015) Towards proteomics of desiccation tolerance in the resurrection plant Haberlea rhodopensis Comptes rendus de l'Acad´emie bulgare des Sciences Tome 68, No 1, 2015 BIOLOGIE Biochimie

Участия в конференции

1. **Mladenov P**, Tchorbadjieva M, Djilianov D (2009) Accumulation of dehydrins during desiccation of resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. COST FA0603 "Plant Proteomics in Europe" WG2 & MC Meeting, Nitra, Slovakia, October 14-16, p. 45 **(постер)**

2. Mladenov P, Finazzi G.,Bligny R. Rolland N and Djilianov D Metabolic profiling and subcellular fractionation, a strategy to decipher the desiccation tolerance of the resurrection plant Haberlea rhodopensis (2010) "Proteomics in Plants, Microorganisms and Environment" **(постер)**

3. **Petko Mladenov**, Diana Zasheva, Nikolai K. Christov, Magdalena Tchorbadjieva, Dimitar Djilianov (2012) Sub-cellular fractionation and gel based proteomics of *Haberlea rhodopensis*: a promising approach to break the black box of resurrection plants. Младежка научна конференция "Климентови дни" 22-23, ноември 2012 **(постер)**