

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Ana G. Pantelić

**Identifikacija i karakterizacija LEA proteina i
metaboličkih puteva odgovornih za toleranciju na
desikaciju biljke *Ramonda serbica* Pančić**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Ana G. Pantelić

**Identification and characterization of LEA proteins
and metabolic pathways underlying desiccation
tolerance in the resurrection plant
Ramonda serbica Pančić**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2026

Mentori:

Dr Ljubodrag Vujisić
vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Dr Marija Vidović
naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu – Institut za molekularnu
genetiku i genetičko inženjerstvo

Članovi komisije:

Dr Vele Tešević
redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Dr Mira Milisavljević
naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu – Institut za molekularnu
genetiku i genetičko inženjerstvo

Dr Gordana Krstić
docent,
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Datum: _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije realizovan je na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu u Grupi za molekularnu biologiju biljaka. Rad je finansijski podržan od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (broj ugovora 451-03-33/2026-03/200042), kao i kroz sledeće projekte i fondove: (i) Fond za nauku Republike Srbije (PROMIS projekat LEAPSyn-SCI, 6039663; Projekat dokaza koncepta – PoC: PEPTOSOME); (ii) PoC projekte finansirane kroz SAIGE program (LEAPSOME i LEAPSYN); (iii) međunarodne bilateralne projekte sa Republikom Slovačkom i Republikom Francuskom.

Pored laboratorija u sklopu IMGGI, deo istraživanja sproveden je na Hemijskog fakultetu u Beogradu, na Nacionalnom hemijskom institutu u Ljubljani, Slovenija u okviru COST akcije ML4NGP (CA21160), i na Institutu za agrofiziku u Lublinu, Poljska u okviru COST akcije (CA18210).

Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki, dr Mariji Vidović, na nesebičnoj podršci, posvećenosti i izuzetnom strpljenju koje je pokazala tokom rada sa mnom, kao i na dragocenom prenošenju znanja i iskustva. Takođe, iskreno sam zahvalna na omogućavanju kratkih istraživačkih boravaka u inostranstvu, bez kojih realizacija ove doktorske disertacije ne bi bila moguća. Njeno mentorstvo značajno je doprinelo mom akademskom i profesionalnom razvoju.

Iskrenu zahvalnost dugujem mentoru dr Ljubodragu Vujisiću, na podsticajnoj višegodišnjoj saradnji. Njegovi saveti i sugestije tokom izrade i pisanja same doktorske disertacije doprineli su unapređenju njenog kvaliteta.

Zahvaljujem se članovima komisije, dr Veletu Teševiću, dr Miri Milisavljević i dr Gordani Krstić, na izdvojenom vremenu za temeljno čitanje rukopisa, kao i na konstruktivnim sugestijama.

Takođe se zahvaljujem dr Miri Milisavljević i dr Miloradu Kojiću na korisnim stručnim diskusijama o ekspresiji proteina, kao i dr Milošu Rokiću na sugestijama u vezi sa procesom prečišćavanja proteina RsLEA30.

Posebnu zahvalnost dugujem i svim članovima Lab08 na prijatnoj radnoj atmosferi i razumevanju koje su pokazali tokom celokupnog perioda izrade ove doktorske disertacije. Takođe, veliko hvala omladini naše grupe na pozitivnoj energiji, lepom druženju i podršci, koji su mi znatno ulepšali i olakšali rad. Hvala kolegici Tatiani Ilinoj na nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu, i svim diskusijama i podršci koja mi je mnogo značila.

Zahvalnost dugujem i kolegi, Stefanu Lekiću (Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju), kao i Lazaru Popoviću (Inovacioni centar Hemijskog fakulteta) na tehničkoj podršci prilikom snimanja FTIR spektara, kao i na pomoći u obradi i analizi rezultata.

Special thanks to Dr. Mélisande Blein-Nicolas and Dr. Thierry Balliau (Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest, Paris, France) for performing the proteomics and MS measurements and providing essential technical support, invaluable guidance, and expert advice throughout the process.

I would also like to express my sincere gratitude to Dr. Helena Gradišar for her dedication, expertise, and invaluable support during my research stay at the National Institute of Chemistry regarding RsLEA30 purification and structural analysis. I am further grateful to Dr. Iva Hafner Bratkovič and Dr. Roman Jerala for enabling and supporting this research visits, as well as to all colleagues from the Department of Synthetic Biology and Immunology for their cooperation and welcoming professional environment.

I am grateful to Dr. Agata Leszczuk and Natalia Kutyríeva-Nowak from the Institute of Agrophysics at the Polish Academy of Science in Lublin, Poland, for their kind supervision and for providing the opportunity to learn advanced microscopy techniques, as well as for their kindness and hospitality during my stay.

I would also like to express my sincere gratitude to Dr. Zuzana Bednarikova and Dr. Miroslav Gančár from the Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovakia, for the opportunity to collaborate with them and for the valuable knowledge I gained during my stay regarding protein structure and aggregation. I am deeply thankful for their enthusiasm, expertise, and support, as well as for their openness in sharing their experience and scientific insights.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima koji su me tokom ovih godina slušali i ohrabivali.

Najdublje hvala mojoj porodici – mami Biljani, tati Goranu i sestri Aleksandri. Bez vaše ljubavi, razumevanja i neiscrpne podrške, ovaj put bi bio nezamisliv.

Najveću zahvalnost dugujem svom najdražem Aci, za neizmernu ljubav, razumevanje i neprekidno bodrenje. Njegova podrška tokom celokupnog procesa istraživanja i pisanja ove disertacije bila je moj najveći oslonac.

...i svima onima koji nisu ovde, ali su zauvek u našim srcima.

Spisak skraćenica

ADH	alkohol-dehidrogenaza
AGP	arabinogalaktan protein
ALDH	aldehid-dehidrogenaza
APX	askorbat-peroksidaza
Asc	askorbat
ATR	prigušena totalna refleksija (eng. <i>attenuated total reflectance</i>)
BSA	goveđi serum albumin (eng. <i>bovine serum albumin</i>)
CAT	katalaza
CD	cirkularni dihiroizam
CET	ciklični elektronski transport
CHAPS	3-[(3-holamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonat
CLSM	konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija (eng. <i>confocal laser scanning microscopy</i>)
CS	citrat-sintaza
CTK	ciklus trikarboksilne kiseline
CV	koeficijent varijacije
DAP	diferencijalno zastupljen protein (eng. <i>differentially abundant protein</i>)
DEG	diferencijalno eksprimiran gen
DL	desikovani listovi
DLS	dinamičko rasipanje svetlosti (eng. <i>dynamic light scattering</i>)
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfati
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
FASP	eng. <i>filter-aided sample preparation</i>
Fm	maksimalna fluorescencija hlorofila <i>a</i>
FNR	feredoksin-NADP ⁺ -reduktaza
Fo	minimalna fluorescencija hlorofila <i>a</i>
FTIR	Furijeva transformacija infracrvena spektroskopija
GLP	proteine nalik džerminu (eng. <i>germin-like proteins</i>)
GR	glutation-reduktaza
GSH	redukovani glutation

GST	glutation-S-transferaza
HG	homogalakturonan
HL	hidratisani listovi
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi (eng. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HRP	peroksidaza rena
HSP	protein toplotnog šoka (eng. <i>heat shock protein</i>)
IDP	neuređeni proteini (eng. <i>intrinsically disordered proteins</i>)
IMAC	imobilizovana metal afinitetna hromatografija
IPTG	izopropil-D-1-tiogalaktopiranozid
Jabs/RC	prosečan fluks apsorbovanih fotona po PS II reakcionom centru
LB	Luria-Bertani
LC-MS/MS	tečna hromatografija kuplovana sa tandem masenom spektrometrijom
LEA proteini	proteini zastupljeni u kasnoj fazi embriogeneze (eng. <i>late embryogenesis abundant</i>)
LHC	kompleks za sakupljanje svetlosti (eng. <i>light harvesting complex</i>)
LLPS	tečno-tečni fazni prelazi (eng. <i>liquid-liquid phase separation</i>)
MET	mitohondrijski elektronski transport
MS	masena spektrometrija
NPQ	nefotohemijsko gašenje fluorescencije hlorofila (eng. <i>non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence</i>)
OAA	oksaloacetat
OD	optička gustina
OEC	kompleks za izdvajanje kiseonika (eng. <i>oxygen evolving complex</i>)
OEE	eng. <i>oxygen-evolution enhancers</i>
PAE	predviđena greška poravnanja (eng. <i>predicted aligned error</i>)
PAR	fotosintetski aktivno zračenje (eng. <i>photosynthetically active radiation</i>)
PBS	natrijum-fosfatni pufer (pH 7,4) sa fiziološkim rastvorom (eng. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCA	analiza glavnih komponenti (eng. <i>principal component analysis</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
PEP	fosfoenolpiruvat
PEPK	fosfoenolpiruvat-karboksilaza
PET	fotosintetski elektronski transport

PG	poligalakturonaza
PL	pektin-liaza
PME	pektinmetil-esteraza
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
POD	peroksidaza klase III
PPO	polifenol-oksidaza
PS	fotosistem
PVDF	poliviniliden-fluorid
PVP	polivinilpirolidon
QA	plastohinon A
Qb	plastohinon B
RG	ramnogalakturonan
ROS	reaktivne kiseonične vrste (eng. <i>reactive oxygen species</i>)
RSV	relativni sadržaj vode
SC	broja spektara
SCX	jak katjonski jonoizmenjivač (eng. <i>strong cation exchange</i>)
SDS-PAGE	natrijum-dodecil-sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (eng. <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEC-MALS	gel filtracija u kombinaciji sa rasipanjem svetlosti pod različitim uglovima (eng. <i>size exclusion chromatography-multiangle light scattering</i>)
SMP	proteini sazrevanja semena (eng. <i>seed maturation proteins</i>)
SOD	superoksid-dismutaza
TBST	fiziološki rastvor puferisan Tris puferom pH 7,2 sa 0,1 % Tween 20
TCA	trihlorsirćetna kiselina (eng. <i>trichloroacetic acid</i>)
TD	tolerancija na desikaciju
TFE	trifluoretanol
TMH	transmembranski heliks
TMT	eng. <i>tandem mass tag</i>
XIC	ekstrakcija jonskih hromatograma (eng. <i>extracted ion chromatogram</i>)
Φ ET2o	mera za kvantni prinos elektron-transportnog fluksa sa plastohinona A na plastohinon B
Φ Po	maksimalni kvantni prinos primarne PS II fotohemije
Φ RE1o	kvantni prinos toka elektrona do PS I akceptora elektrona

Identifikacija i karakterizacija LEA proteina i metaboličkih puteva odgovornih za toleranciju na desikaciju biljke *Ramonda serbica* Pančić

Sažetak

U okviru ove disertacije, pomoću integrativnog „multiomskog“ pristupa identifikovani su ključni molekularni kandidati i metabolički putevi koji leže u osnovi tolerancije na desikaciju kod biljke vaskrsnice *Ramonda serbica* Pančić. Istraživanje je primarno fokusirano na proteine zastupljene u kasnoj fazi embriogeneze (LEA proteine), kao i na remodelovanje ćelijskog zida. Rezultati dobijeni putem uporedne *de novo* transkriptomike i proteomike hidratiziranih i desikovanih listova ukazali su na presudni značaj LEA proteina, fermentacije, C1-metabolizma, metabolizma azota i hema, kao i biosinteze skroba i degradacije saharoze. Pored toga, fina regulacija sinteze proteina i njihovog pravilnog uvijanja u nativnu konformaciju čine neophodne korake za očuvanje ćelijskog integriteta tokom desikacije. Na osnovu konzerviranih motiva i filogenije, 318 RsLEA proteina je po prvi put identifikovano i klasifikovano. Modelovanje i spektroskopija cirkularnog dihroizma rekombinantnih proteina RsLEA4 grupe potvrdili su njihovu pretežno neuređenu strukturu u hidratiziranim uslovima, dok u prisustvu lipidnih mimetika ili tokom simulacije desikacije, oni prelaze u α -heliksne strukture, ukazujući na zaštitnu ulogu u vidu molekularnih štitova. Dodatno, desikacija dovodi do smanjenja zapremine ćelije i nabiranja ćelijskog zida uz potpuno očuvanje njegovog kontinuiteta, što je praćeno očvršćavanjem i lokalizovanim olabavlivanjem zida, vođenim orkestriranom demetilesterifikacijom pektina. Analiza proteina jonski vezanih za ćelijski zid pružila je prve dokaze o prisustvu dva RsLEA proteina u ovom kompartmentu. Konačno, ova teza nudi nove uvide u složenu metaboličku regulaciju tolerancije na desikaciju i predlaže potencijalne strategije koje se mogu koristiti za poboljšanje otpornosti useva na sušu.

Ključne reči: Biljke vaskrsnice; *de novo* transkriptomika; LEA proteini; predikcija sekundarne strukture proteina; prirodno neuređeni proteini; proizvodnja proteina tehnologijom rekombinantne DNK; proteomika; remodelovanje ćelijskog zida; strukturna karakterizacija proteina; tolerancija na desikaciju.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

Identification and characterization of LEA proteins and metabolic pathways responsible for desiccation tolerance in the plant *Ramonda serbica* Pančić

Abstract

This thesis employed an integrative "multi-omics" approach to identify key molecular candidates and pathways underlying desiccation tolerance in the resurrection plant *Ramonda serbica* Pančić, with a primary focus on Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins and cell wall (CW) remodeling. Comprehensive transcriptomic and proteomic profiling of hydrated and desiccated leaves revealed that LEA proteins, fermentation, C1-metabolism, nitrogen and heme metabolism, along with starch biosynthesis and sucrose degradation, are crucial for desiccation tolerance. Furthermore, the precise regulation of protein synthesis and folding emerged as a fundamental mechanism for preserving cellular integrity.

By integrating *de novo* transcriptomics with homologous domain analysis, 318 RsLEA proteins were identified and classified based on conserved motifs and phylogeny. Structural characterization of recombinant proteins belonging RsLEA4 group, using circular dichroism spectroscopy and *in silico* modeling, showed their predominantly disordered structure under hydrated conditions. However, their transition to α -helical structures under desiccation-mimicking environments or in the presence of lipid-mimetics, suggesting their protective role as molecular shields. At the cellular level, desiccation induced volume reduction and CW folding without loss of continuity. This process was accompanied by CW strengthening and localized loosening, driven by an orchestrated pectin demethylesterification. Selective analysis of the CW ionic proteome provided the first evidence of LEA proteins associated with the CW in *R. serbica*.

Finally, this thesis offers new insights into the metabolic regulation of desiccation tolerance and proposes potential strategies that can be used for improving crop drought resistance.

Keywords: *de novo* transcriptomics; cell wall remodeling; desiccation tolerance; intrinsically disordered proteins; LEA proteins; protein secondary structure prediction; protein structural characterization; proteomics; recombinant DNA technology; resurrection plants.

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Sadržaj

UVOD	1
1. OPŠTI DEO	2
1.1 Desikacija: pojam i efekti u biljkama	2
1.2 Mehanizmi tolerancije na desikaciju kod biljaka vaskrsnica	2
1.2.1 Biljke vaskrsnice	2
1.2.2 Fiziološke adaptacije biljaka na desikaciju	3
1.2.3 Odgovor ćelijskog zida na desikaciju	4
1.2.4 Metabolički putevi uključeni u toleranciju na desikaciju	7
1.2.5 LEA proteini	8
1.3 <i>Ramonda serbica</i> kao model biljka za proučavanje mehanizama tolerancije na desikaciju	9
1.3.1 Geografska distribucija i prirodno stanište srpske ramonde	9
1.3.2 Adaptacije srpske ramonde na desikaciju	10
2. REZULTATI	14
2.1 Tok istraživanja	14
2.2 Molekularni mehanizmi uključeni u toleranciju srpske ramonde na desikaciju	15
2.2.1 Promene u transkriptomu i proteomu listova srpske ramonde tokom desikacije	15
2.2.2 Uticaj desikacije na fotosintetske parametre/procese	19
2.2.3 Odgovor metabolizma ugljenih hidrata u ćelijama listova	21
2.2.4 Promene u proizvodnji energije u ćelijama listova	23
2.2.5 Odgovor antioksidativnog sistema ćelija listova	24
2.2.6 Uticaj desikacije na LEA proteine iz listova	25
2.3 Odgovor komponenti ćelijskog zida listova srpske ramonde na desikaciju i oporavak	27
2.3.1 Histološke promene	27
2.3.2 Diferencijalno eksprimirani geni koji kodiraju proteine	27
2.3.3 Diferencijalno zastupljeni proteini ćelijskog zida	28
2.3.4 Promene sastava glikoproteina ćelijskog zida	39
2.3.5 Promene sastava polisaharida ćelijskog zida	41
2.4 LEA proteini iz listova srpske ramonde – proizvodnja i karakterizacija	45
2.4.1 Klasifikacija LEA proteina	45
2.4.2 Funkcionalna anotacija LEA proteina	46
2.4.3 <i>In silico</i> strukturna analiza LEA proteina	56
2.4.4 Proizvodnja odabranih LEA4 proteina tehnologijom rekombinantne DNK	63
2.4.5 Hromatografsko prečišćavanje odabranih LEA4 proteina	65

2.4.6 Validacija odabranih LEA4 proteina	69
2.4.7 Strukturna karakterizacija odabranih LEA4 proteina <i>in vitro</i>	70
3. DISKUSIJA	75
3.1 Glavni metabolički procesi odgovorni za toleranciju ramonde na desikaciju.....	75
3.1.1 Promene u fotosintetskim procesima ramonde tokom desikacije	75
3.2 Značaj akumulacije LEA proteina u srpskoj ramondi tokom desikacije: potencijalna fiziološka funkcija na osnovu strukturnih karakteristika	78
3.3 Remodelovanje komponenti ćelijskog zida tokom desikacije	85
4. EKSPERIMENTALNI DEO	91
4.1 Biljni materijal i eksperimentalna postavka	91
4.2 Metode.....	91
4.2.1 Merenje relativnog sadržaja vode (RSV) u listovima srpske ramonde	91
4.2.2 Analiza parametara brze kinetike fluorescencije hlorofila (OJIP) u listovima srpske ramonde	92
4.2.3 Analiza fotosintetskih pigmenata iz listova srpske ramonde.....	92
4.2.4 <i>De novo</i> transkriptomaska analiza HL i DL srpske ramonde	92
4.2.5 Proteomska analiza ukupnog proteinskog ekstrakta HL i DL srpske ramonde.....	94
4.2.6 Kvalitativna i kvantitativna analiza solubilnih šećera iz listova srpske ramonde	96
4.2.7 Analiza fenolnih jedinjenja iz listova srpske ramonde	96
4.2.8 FTIR analiza polimera ćelijskog zida iz listova srpske ramonde	97
4.2.9 Analiza glikoproteina ćelijskog zida listova srpske ramonde <i>in situ</i> konfokalnom mikroskopijom.....	97
4.2.10 Analiza histoloških promena ćelijskog zida listova srpske ramonde optičkom mikroskopijom.....	98
4.2.11 Ekstrakcija i analiza fenolnih jedinjenja vezanih za ćelijski zid listova srpske ramonde	98
4.2.12. Proteomska analiza frakcija obogaćenih ćelijskim zidom listova srpske ramonde...98	
4.2.13 Proizvodnja tri LEA4 proteina srpske ramonde	102
4.2.14 Hromatografsko prečišćavanje LEA4 proteina srpske ramonde	104
4.2.15 Gel filtracija u kombinaciji sa rasipanjem svetlosti pod različitim uglovima (SEC-MALS).....	105
4.2.16 Validacija aminokiselinske sekvence rekombinantno proizvedenih LEA4 proteina pomoću MS.....	105
4.2.17 Određivanje strukture LEA proteina spektroskopijom cirkularnog dihroizma	106
4.2.18 Određivanje hidrodinamičkog radijusa LEA proteina dinamičkim rasipanjem svetlosti	106
4.2.19 Merenje koncentracije proteina	106
4.2.20 Statističke analize primenjene u eksperimentalnom radu.....	106

4.2.21 Identifikacija i <i>in silico</i> karakterizacija LEA proteina.....	106
4.2.22 Filogenetska analiza i funkcionalna anotacija LEA proteina	107
4.2.23 Predviđanje sekundarne strukture LEA proteina	107
4.2.24 Predviđanje 3D strukture LEA proteina <i>AlphaFold3</i> serverom	108
5. ZAKLJUČAK.....	109
LITERATURA.....	110
PRILOZI	124
BIOGRAFIJA	126

UVOD

Suša, čija se učestalost i intenzitet povećavaju usled globalnih klimatskih promena, predstavlja primarni uzrok značajnih ekonomskih gubitaka u poljoprivredi, ugrožavajući preko 60 % obradivih površina širom sveta. Savremene strategije za unapređenje otpornosti useva oslanjaju se na dubinsko razumevanje molekularnih mehanizama tolerancije na sušu rezistentnih vrsta. U tom smislu, biljke vaskrsnice predstavljaju jedinstven model-sistem, jer su sposobne da prežive ekstremnu desikaciju (ispod 5 % relativnog sadržaja vode u ćeliji) i brzo reaktiviraju metaboličke funkcije nakon rehidracije. U okviru ove doktorske disertacije, kao model-sistem za rasvetljavanje molekularnih mehanizama tolerancije na desikaciju korišćena je srpska ramonda (*Ramonda serbica* Pančić), tercijarni reliktni i endemična biljna vrsta Balkanskog poluostrva.

Glavni cilj ove doktorske disertacije je identifikovanje glavnih metaboličkih puteva odgovornih za toleranciju na desikaciju i onih neophodnih za rehidraciju, u okviru koga je trebalo: (i) odrediti razlike u metabolizmu hidratiziranih i desikovanih listova srpske ramonde; (ii) identifikovati LEA proteine, potom ih proizvesti i okarakterisati *in silico* i *in vitro* pristupima i (iii) ispitati remodelovanje arhitekture ćelijskog zida tokom desikacije i oporavka nakon rehidracije.

Predstavljena doktorska disertacija sastoji se iz sledećih delova:

OPŠTI DEO – kroz tri poglavlja pruža sveobuhvatan pregled literature i definiše ključnu terminologiju korišćenu u radu. Dat je osvrt na savremena saznanja o mehanizmima tolerancije na desikaciju, sa posebnim fokusom na srpsku ramonu. Poseban akcenat stavljen je na strukturnu i funkcionalnu karakterizaciju proteina zastupljenih u kasnoj fazi embriogeneze (eng. *late embryogenesis abundant proteins*, LEA proteina), kao i na specifične promene u ćelijskom zidu.

REZULTATI – obuhvata eksperimentalne nalaze koji su dobijeni prilikom izrade ove doktorske disertacije. Prikazani su rezultati transkriptomike, proteomike i metaboličke analize ukupnih ekstrakata potpuno hidratiziranih listova, kao i uzoraka tokom desikacije srpske ramonde, u cilju identifikovanja glavnih metaboličkih puteva uključenih u desikaciju. Na osnovu dobijenih rezultata, dalje istraživanje je fokusirano na:

1. promene u sastavu i organizaciji: (i) ukupnih polimera ćelijskog zida srpske ramonde indukovane desikacijom i rehidracijom (infracrvenom spektroskopijom sa Furijevom transformacijom); (ii) polisaharidnih komponenti ćelijskog zida, analiziranih imunohistohemijski uz upotrebu konfokalne mikroskopije; (iii) proteina kroz proteomsku analizu izolovanih frakcija obogaćenih ćelijskim zidom;
2. *in silico* identifikacije i klasifikacija LEA proteina, kao i njihova strukturna analiza, na osnovu čega su tri desikacijom indukovana proteina LEA4 grupe proizvedena, prečišćena i strukturno okarakterisana.

EKSPERIMENTALNI DEO – sadrži detaljne informacije o korišćenim metodama, tehnikama, aparatima i softverima. Dat je opis biljnog materijala, kao i pripreme uzoraka za sve navedene analize.

ZAKLJUČAK – predstavlja sumirane i sažete rezultate proizašle iz ove doktorske disertacije.

PRILOZI – sadrži dodatni materijal koji je proizašao iz ove disertacije. Predstavljani su transkriptomski i proteomski podaci kroz tabele, kao i detaljna klasifikacija LEA proteina.

LITERATURA – navedeno je 258 literaturnih izvora koji su korišćeni prilikom pisanja ovog rada, navedenih prema abecednom redu, kao i spisak svih linkova

1. OPŠTI DEO

1.1 Desikacija: pojam i efekti u biljkama

Suša, kao fiziološki oblik stresa usled deficita vode, oduvek je bila jedan od najvećih poljoprivrednih problema, posebno zato što utiče na vijabilnost i prinos useva. Prijavljeni su globalni gubici od oko 70 % potencijalnog prinosa useva usled suše, i smatra se da će daljim napretkom klimatskih promena ovaj broj rasti (Wu i sar. 2017).

Većina biljaka cvetnica pri fiziološkim uslovima ima relativni sadržaj vode (RSV) od oko 85–100 % tokom aktivnog rasta, a ne mogu da prežive ako sadržaj vode padne ispod 50–30 % (Gariola i sar. 2017). Tolerancija na desikaciju (TD) predstavlja sposobnost organizma da preživi stanje u ćeliji kada je RSV ispod 5 %. Većina viših biljaka poseduje fazu u svom životnom ciklusu tokom koje pojedina tkiva mogu preživeti desikaciju. Međutim, ova sposobnost je ograničena na specijalizovana tkiva kao što su semena i polen (ortodoksna desikacija), a retko na vegetativna tkiva, kao što su koren i list. TD vegetativnih delova biljaka ograničena je na jedinstvenu grupu biljaka, tzv. biljake vaskrsnice (Bartels i Hussain 2011). Pored biljaka vaskrsnica, postoje i drugi organizmi koji se odlikuju sposobnošću TD kao što su cijanobakterije, kvasci, lišajevi, alge, neke bakterije, gljive, kao i neki beskičmenjaci poput nematoda, rotatorija i tardigrada (Wharton 2015; Janis i sar. 2022).

Pretpostavka je da se TD pojavila vrlo rano tokom evolucije života na kopnu. Zadržana je tokom čitave evolucije kopnenih biljaka, ispoljavajući se u sporama, a kasnije i u semenima. Pretpostavlja se da je vegetativna tolerancija na desikaciju kod vaskularnih biljaka evoluirala usled reprogramiranja genskih regulatornih mreža koje kontrolišu gene uključene u TD (Oliver i sar. 2005; Barthlott i sar. 2022). Ključne osobine koje biljke moraju imati da bi se uspešno izborile sa desikacijom su sposobnosti: (i) ograničavanja oštećenja makromolekula izazvanih desikacijom tako da može doći do njihove popravke; (ii) održavanja ćelijskog i subćelijskog fiziološkog integriteta tokom desikacije i (iii) ispravljanja oštećenja nastalih tokom rehidracije (Alpert i Oliver 2002).

1.2 Mehanizmi tolerancije na desikaciju kod biljaka vaskrsnica

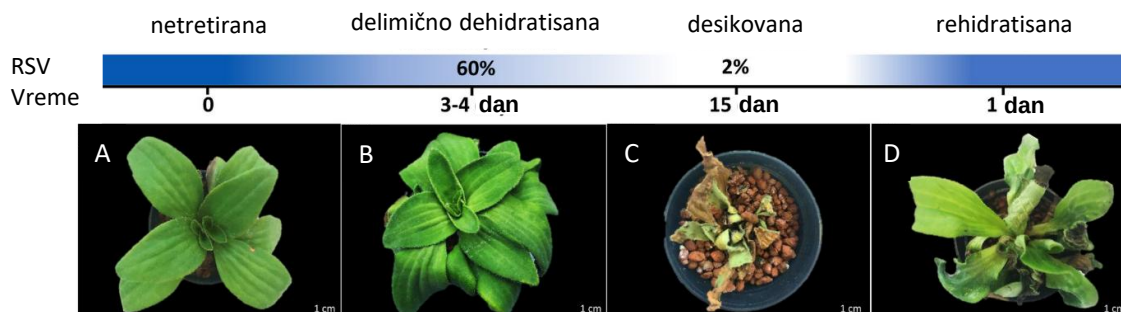
U cilju uspešnog preživljavanja desikacije, biljke vaskrsnice su pretrpele adaptacije na morfološkom, fiziološkom i molekulskom nivou. Tokom procesa desikacije aktiviraju se kompleksni mehanizmi koji omogućavaju stabilizaciju proteina, membrana i ćelijskog zida. To podrazumeva pojačanu akumulaciju osmoprotektanata (npr. saharoze, trehaloze, prolina), antioksidativnih jedinjenja, uz sintezu LEA proteina i proteina toplotnog šoka (HSP, eng. *heat shock protein*) koji sprečavaju denaturaciju makromolekula (Ingram i Bartels 1996; Tunnacliffe i Wise 2007).

1.2.1 Biljke vaskrsnice

Biljke vaskrsnice su izuzetne po sposobnosti da mogu da tolerišu gubitak vode i do 95 % u svojim vegetativnim organima (slika 1). U potpuno isušenom stanju mogu opstati godinama, pri čemu su procesi rasta i reprodukcije privremeno zaustavljeni. Međutim, sa ponovnom dostupnošću vode nastupa brza rehidracija, nakon čega biljka ponovo postaje u potpunosti metabolički aktivna vrlo brzo, nekad i nakon 24 sata (Scott 2000). Manje od 0,2 % svih vaskularnih biljaka poseduje sposobnost TD (Gechev i sar. 2021).

Većina biljaka vaskrsnica naseljava ekološke niše izložene smenama dugih sušnih i kratkih kišnih perioda, poput predela u južnoj Africi, Južnoj Americi i zapadnoj Australiji (Oliver i sar. 2020).

Često se mogu naći na stenovitim staništima, ali uspešno opstaju i na plitkim, peskovitim zemljištima (Alcantara i sar. 2015). Rast i razmnožavanje ovih biljaka odvija se tokom kišnih perioda, ali nakon sušenja, biljke mogu ostati u stanju mirovanja dug vremenski period (Scott 2000). Karakteristične vrste koje naseljavaju Afriku su pripadaju rodovima *Xerophyta* (*X. humilis* i *X. viscosa*) i *Craterostigma* (*C. plantagineum* i *C. wilmsii*), dok su u Južnoj Americi zastupljene vrste roda *Selaginella* (*S. lepidophylla* i *S. bryopteris*).



Slika 1. Morfološke promene biljke *C. plantagineum* tokom ciklusa desikacije/rehidratacije – prerađena slika iz rada Xu i sar. (2021). RSV, relativni sadržaj vode.

Familija *Gesneriaceae* okuplja biljke cvetnice, koje uglavnom naseljavaju južni deo Evrope i kojoj pripadaju biljke vaskrsnice *Boea hygrometrica* (sinonim: *Doroceras hygrometricum*; naseljava Afriku, i južni deo Azije), *Haberlea rhodopensis* (endemska vrsta u Bugarskoj) i sve četiri vrste roda *Ramonda*, *R. serbica* i *R. nataliae* (endemske vrste za Balkansko poluostrvo), *R. heldreichii* (endemska vrsta u Grčkoj) i *R. myconi* (naseljava Iberijsko poluostrvo). Ove biljke se smatraju tercijskim reliktima, višegodišnje su i zimzelene spororastuće biljke (Rakić i sar. 2014).

U zavisnosti od toga da li tokom desikacije dolazi do očuvanja fotosintetskog aparata ili do njegove razgradnje, biljke vaskrsnice se klasifikuju kao homoiohlorofilne ili poikilohlorofilne (Challabathula i sar. 2018). Kod poikilohlorofilnih vrsta tokom desikacije dolazi do smanjenja nivoa hlorofila i do razgradnje tilakoidne membrane kako bi se smanjila proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, eng. *reactive oxygen species*), kao što su: vodonik-peroksid (H_2O_2), hidroksil radikal (HO^*) i superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$) (Dinakar i Bartels 2013; Challabathula i sar. 2016). Nakon rehidratacije, fotosintetske strukture se ponovo uspostavljaju (Dinakar i sar. 2012).

Nasuprot njima, homoiohlorofilne biljke zadržavaju nivo hlorofila i štite svoj fotosintetski aparat tokom desikacije, što im omogućava bržu reaktivaciju tokom rehidratacije (Dinakar i sar. 2012). Stoga su homoiohlorofilnim vrstama tokom desikacije potrebni efikasniji mehanizmi zaštite od ROS u poređenju sa poikilohlorofilnim vrstama (Farrant i sar. 2007; Challabathula i sar. 2016; Georgieva i sar. 2017).

Biljke vaskrsnice ostvaruju značajnu kompetitivnu prednost u odnosu na druge vrste, jer često mogu da nasele ekološke niše koje su nenaseeljive za većinu viših biljaka. Zahvaljujući specifičnim adaptacijama, one istovremeno predstavljaju jedinstvene model-organizme za istraživanje TD i potencijalno vredan resurs za unapređenje otpornosti poljoprivrednih useva na nepovoljne uslove izazvane klimatskim promenama (Scott 2000, Oliver i sar. 2005).

1.2.2 Fiziološke adaptacije biljaka na desikaciju

Kod biljaka osetljivih na sušu, gubitak vode uzrokuje ireverzibilna oštećenja ćelijskih membrana i razgradnju fotosintetskih pigmenata, dok pri rehidrataciji dolazi do razgradnje hloroplasta. Tokom desikacije, stome ovih biljaka se zatvaraju, što smanjuje asimilaciju ugljen-dioksida i posledično dovodi do smanjenja aktivnosti fotosistema II (PS II; Xu i sar. 2021).

Fotosinteza je primarni metabolički proces koji biva pogođen desikacijom, zbog čega fotosintetski aparat mora biti zaštićen ili sposoban za brzu reaktivaciju nakon rehidratacije. Merenje asimilacije ugljenika u hidratisanim, desikovanim i rehidratiranim listovima biljke vaskrsnice *C. plantagineum* pokazala su inhibiciju fotosinteze tokom desikacije i njen oporavak nakon rehidratacije (Dinakar i sar. 2012; Bartels i Hussain 2001; Porembski 2011). Ova inhibicija fotosinteze tokom desikacije može se posmatrati kao zaštitni mehanizam, jer se na taj način smanjuje prekomerna proizvodnja ROS.

Mehanizmi koji učestvuju u sprečavanju oštećenja i/ili reparaciji fotosintetske mašinerije tokom desikacije i rehidratacije razlikuju se između različitih vrsta biljaka vaskrsnica. Kako je već pomenuto fotosintetski aparat kod homoiohlorofilnih biljaka je privremeno inaktiviran, tj. ne dolazi do njegove razgradnje, što ovim biljkama omogućava brz oporavak nakon rehidratacije (Navari-Izzo i sar. 2000, Ingle i sar. 2008, Strasser i sar. 2010). Iz tog razloga homoiohlorofilne biljke smanjuju nastanak i akumulaciju ROS, ne samo sprečavanjem interakcije svetlosti i hloroplasta uvijanjem lista, već i sledećim mehanizmima: (i) uklanjanjem ROS antioksidativnim enzimima i metabolitima; (ii) akumulacijom ksantofila i antocijana koji deluju kao zaštitni filteri (eng. *sun-screen compounds*); (iii) smanjenjem ekspresije gena koji kodiraju komponente fotosistema, i (iv) povećanom ekspresijom gena koji kodiraju zaštitne proteine (Challabathula i sar. 2016).

Proces desikacije kod ovih biljaka indukuje značajne strukturne modifikacije, pri čemu hloroplasti gube svoju primarnu formu i poprimaju izrazito ovalan oblik, uz povećanje stepena preklapanja tilakoidnih membrana (Bartels i sar. 1992; Navari-Izzo i sar. 2000). Iako se ukupan sadržaj lipida kod vaskrsnice *C. plantagineum* ne menja, lipidni sastav tilakoidnih membrana podleže značajnim promenama tokom desikacije koje doprinose njihovoj stabilizaciji. Pretpostavlja se da promene u interakcijama između lipida i proteina čine značajan deo mehanizma TD (Challabathula i sar. 2016).

Dodatni problem sa kojim se biljke vaskrsnice suočavaju tokom desikacije je drastično smanjenje zapremine ćelije (za 60 do 80 %), što dovodi do mehaničkog stresa i izlaganja makromolekula mogućoj agregaciji, denaturaciji, destabilizaciji i inaktivaciji (Farrant 2007). Sa opadanjem sadržaja vode, mehanički i metabolički faktori stresa postaju izraženiji i dolazi do subcelularnih perturbacija i koncentrovanja ćelijskog sadržaja. To povećava šanse za neželjene molekulske interakcije, denaturaciju makromolekula i narušavanje biohemijskih aktivnosti (Farrant i Moore 2011).

1.2.3 Odgovor ćelijskog zida na desikaciju

Tokom desikacije listovi biljaka vaskrsnica se progresivno savijaju ka unutra, izazvani strukturnim promenama u ćelijskom zidu, tako da izrazito dlakava abaksijalna strana lista postaje izložena sunčevoj svetlosti. Na taj način, hloroplasti u palisadnom tkivu ostaju u senci i zaštićeni od svetlosti, čime se minimizira mogućnost oštećenja fotosintetičkog aparata izazvanog svetlošću (Rakić i sar. 2015). Ilustracije radi, kada je listovima rozete homoiohlorofilne biljke vaskrsnice *C. wilmsii* onemogućeno savijanje tokom dehidratacije na svetlosti, došlo je do smrtonosnih oštećenja izazvanih svetlosnim stresom, što je rezultiralo gubitkom vitalnosti biljke (Farrant i sar. 2003).

Dodatno, mehanički stres uzrokovan desikacijom se ublažava povećanom vakuolizacijom, pri čemu se molekuli vode u vakuoli zamenjuju nevodenim supstancama, prvenstveno osmoprotektantima. Uporedo sa time, dolazi do remodelovanja arhitekture ćelijskog zida radi povećanja njegove fleksibilnosti, što omogućava njegovo reverzibilno sabijanje (Moore i sar. 2008). Opisane promene su specifične za datu biljku vaskrsnicu i mogu uključivati ugradnju posebnih proteina u ćelijski zid (proteini bogati glicinom) kao i aktivaciju ekspanzina.

Ćelijski zid okružuje biljnu ćeliju i obezbeđuje mehaničku potporu. On definiše morfologiju i ključan je za rast biljke i odgovore na spoljašnje stresne faktore (Pilling i Höfte 2003; Hamann 2015). Glavni gradivni blokovi ćelijskog zida su celuloza, kaloza, pektin i hemiceluloze. Celuloza je linearni homopolisaharid izgrađen od ostataka glukoze vezanih β -(1,4)-glikozidnim vezama. Mikrofibrili celuloze su međusobno povezani hemicelulozom i pektinom, čime formiraju rigidnu strukturu koja daje mehaničku potporu (Nishiyama 2009; Wang i sar. 2012).

Pektin je najzastupljenija komponenta i čini do 50 % (w/w) ćelijskog zida kod biljke *Arabidopsis thaliana* (Zabackis i sar. 1995). Predstavlja heterogeni matriks homogalakturnana (HG), ramnogalakturnana (RG)-I i RG-II. HG je najzastupljeniji (oko 65 % pektina), dok RG-I čini 20–35 % pektina i sastoji se od naizmenično vezane ramnoze i galakturonske kiseline. RG-II je manja zastupljena komponenta pektina i izgrađen je od galakturonske kiseline vezane β -(1,4) vezama (Mohnen, 2008).

Najzastupljenije hemiceluloze u ćelijskom zidu dikotila su ksiloglukan i ksilan i njihova uloga je u umrežavanju celuloznih vlakana (Park i Cosgrove 2015; Simmons i sar. 2016). Osnovni lanac ksiloglukana čine ostaci glukoze vezane β -(1,4)-glikozidnim vezama, dok bočni lanci sadrže ksilozu, galaktozu (često acetilovanu), fukoze i arabinoze. Osnovni lanac ksilana grade ksiloze vezane β -(1,4)-glikozidnim vezama sa bočnim lancima α -arabinofuranoze i α -galakturonske kiseline. Kaloza je takođe linearni homopolisaharid, i sastoji se od glukoze vezane β -(1,3)-glikozidnim vezama (Chen i sar. 2020).

Pored polisaharida, bitnu ulogu imaju i proteini uronjeni u matriks ćelijskog zida, koji doprinose strukturnom integritetu zida, rastu ćelije i prenosu signala. Najbrojniju grupu čine proteini bogati hidroksiprolinom (uključujući ekstenzine), koji su visoko glikozilovani i učestvuju u kovalentnom umrežavanju zida. Prisutni su i proteini bogati prolinom, proteini bogati glicinom, kao i arabinogalaktan proteini (AGP, eng. *arabinogalactan protein*) koji su visoko glikozilovani i uključeni u signalne puteve. Ekspanzin je ključni protein koji omogućava neenzimsko olablјivanje ćelijskog zida raskidanjem vodoničnih veza između celuloze i hemiceluloze (Jamet i sar. 2023).

Remodelovanje ćelijskog zida katalizuju: pektin-metilesteraze (PME, uklanjaju metil grupe sa pektina), pektin-acetilesteraza (PAE, uklanjaju acetil grupe sa pektina), poligalakturnaze (PG, hidrolizuju glikozidne veze pektina), pektin-lijaze (PL, preferiraju visoko metilesterifikovani pektin). Uklanjanjem metil i acetil grupa dolazi do promene naelektrisanja i konformacije pektina što omogućava poligalakturnazama da hidrolizuju glikozidne veze. Ravnoteža između PME i PL aktivnosti direktno utiče na brzinu i način popuštanja (olablјivanja) ćelijskog zida (Suberkropp 2020; Wormit i Usadel 2012).

Modifikacije kao što su transglukozilacija, acetilovanje ili metilesterifikacija pektinskih karboksilnih grupa, kao i umrežavanje različitih komponenti, igraju glavnu ulogu u promeni mehaničkih svojstava ćelijskog zida (Caffall i sar. 2009; Park i Cosgrove 2015). Razumevanje ponašanja polisaharidnog matriksa kao odgovora na stres je od suštinskog značaja za razumevanje fleksibilnosti ćelijskog zida. Tokom desikacije, vakuola se skuplja, a ćelijski sadržaj se povlači ka unutrašnjosti, što stvara visoku napetost između plazmaleme i ćelijskog zida (Levitt i Levitt 1987).

Većina biljaka vaskrsnica tokom desikacije prolazi kroz značajno sabijanje i ukrućivanje ćelijskog zida, proces koji se brzo preokreće kada nastupi rehidracija (Phillips i sar. 2008; Jung i sar. 2019). Kontrolisano sabijanje ćelijskog zida sprečava prekid kontakta između plazmaleme i ćelijskog zida, što je presudno za održavanje integriteta ćelije (Vicré i sar. 1999; Farrant 2000; Vicré i sar. 2004). Stepen ovog sabijanja zavisi od morfologije i površine lista; npr. uski listovi biljke *Oropetium thomaeum* pokazuju manji stepen sabijanja nego kod biljke *C. plantagineum* tokom desikacije. Ćelije desikovanih listova biljaka vaskrsnica pokazuju veće sabijanje nakon dehidracije u poređenju sa ćelijama korena ili stabljike.

Kod pojedinih biljaka vaskrsnica (npr. *C. plantagineum* i *C. wilmsii*), tokom desikacije je uočen povećan, a tokom rehidracije smanjen nivo demetilesterifikovanog HG (Moore i sar. 2024; Vicré i sar. 1999; Jung i sar. 2019). Budući da se HG sintetiše u metilesterifikovanom obliku i naknadno demetilestrifikuje (hidrolizom metil-estara nastaje slobodna karboksilna grupa) u ćelijskom zidu, smanjenje njegovog udela sugerije *de novo* sintezu metilesterifikovanog HG tokom rehidracije (Staehelin i Moore 1995; Sterling i sar. 2001).

Visok udeo demetilestrifikovanog HG sa slobodnim COO^- grupama u kombinaciji sa vezanim Ca^{2+} (Vicré i sar. 1999) dovodi do formiranja tzv. „egg-box“ struktura tokom desikacije (Moore i sar. 1986; Chen i sar. 2020). Smatra se da ove strukture dovode do očvršćivanja i smanjenja poroznosti ćelijskog zida (Vicré i sar. 1999; Jung i sar. 2019). Visoko demetilestrifikovani HG pruža dodatna mesta za vezivanja Ca^{2+} , ali i specifičnih proteina, što može biti značajno za hidratacioni status ćelijskog zida (Giarola i sar. 2016; Jung i sar. 2019). Takođe, promene u sastavu i strukturnoj organizaciji RG-I, RG-II i hemiceluloza mogu ojačati ćelijski zid biljaka vaskrsnica tokom desikacije. Povećan sadržaj ksiloglukana ukazuje na intenzivnije umrežavanje celuloznih vlakana, čime se povećava rigidnost ćelijskog zida (Moore i sar. 1986; Park i Cosgrove 2015).

Osim opisanih enzimski potpomognutih promena u hemijskom sastavu polisaharida ćelijskog zida, tokom desikacije može doći i do njihovih neenzimskih modifikacija. Naime, desikacija indukuje promene u turgorovom pritisku, aktivirajući i otvarajući mehanosenzitivne kalcijumske kanale, koji podižu nivo Ca^{2+} u citoplazmi. NADPH-oksidaze iz plazma membrane se aktiviraju vezivanjem ovih jona kalcijuma i proizvode $\text{O}_2^{\bullet-}$ u apoplastu, koji predstavlja supstrat za superoksid-dizmutazu (SOD, koja katalizuje dismutaciju $\text{O}_2^{\bullet-}$ na H_2O_2 i kiseonik) u ćelijskom zidu. Apoplastni H_2O_2 , nastao delovanjem SOD, takođe indukuje ulazak Ca^{2+} u ćeliju. Međutim, prevelika koncentracija citosolnog Ca^{2+} je toksična za ćeliju, te dolazi do njegovog transporta u apoplast. Promena pH i alkalizacija apoplasta utiče na PME, koja vrši demetilesterifikaciju pektina i generiše negativno naelektrisan pektin koji može da formira „egg-box“ strukturu sa jonima Ca^{2+} i dovede do očvršćavanja ćelijskog zida. Kinaza asocirana sa ćelijskim zidom (eng. *wall-associated kinase*) gradi kompleks sa glicinom bogatim proteinom i detektuje „egg-box“ strukturu, što dalje dovodi do aktivacije invertaze. Klasični AGP, usidreni preko glikozilfosfatidilinozitolata, uključeni su u transdukciju signala između intracelularnog i ekstracelularnog kompartmenta i deluju kao plastifikatori kod biljaka vaskrsnica tokom desikacije (Chen i sar. 2020).

Očvršćavanju ćelijskog zida doprinose i peroksidaze klase III (POD) iz apoplasta i one jonski i kovalentno vezane za ćelijski zid generalno katalizuju oksidaciju različitih fenolnih supstrata koristeći apoplastni H_2O_2 stvarajući monolignole i polifenole koji učvršćuju (eng. *stiffening*) ćelijski zid. Dodatno, POD mogu doprineti očvršćavanju zida pospešujući umrežavanje ekstenzina sa polisaharidima (Chen i sar. 2020).

S druge strane, POD mogu da kroz hidroksilni ciklus pomoću $\text{O}_2^{\bullet-}$ stvaraju hidroksil radikal, $\text{HO}^{\bullet}$. Hidroksil radikal može nastati od superoksid anjon radikala i neenzimski, u prisustvu tragova Cu^+ i Fe^{2+} u zidu u Haber-Vajsovoj i Fentonovoj reakciji. Ovom nastanku doprinosi i apoplastna glutation reduktaza, stvarajući redukovani glutation (GSH), koji služi kao donor za redukciju stabilnijeg Fe^{3+} i Cu^{2+} u redoks aktivne Fe^{2+} i Cu^+ koji zatim mogu učestvovati u pomenutim reakcijama. Hidroksil radikal je visoko reaktivan i može da raskida glikozidne veze polisaharida ćelijskog zida i time doprinese olabavljanju i povećanoj fleksibilnosti ćelijskog zida (eng. *loosening*).

Iz svega navedenog se može zaključiti da je remodelovanje komponenti ćelijskog zida fundamentalni proces u mehanizmu tolerancije na desikaciju (TD). Preciznim balansiranjem dva suprotstavljena efekta — očvršćivanja (koje pruža strukturnu stabilnost) i olabavlivanja (koje omogućava fleksibilnost) — biljke vaskrsnice uspevaju da prevaziđu ekstremni mehanički stres

(Tenhaken 2015). Ovakva dinamička adaptacija ćelijskog zida ključna je za očuvanje integriteta plazmaleme i sprečavanje letalnih oštećenja tokom procesa isušivanja (Chen i sar. 2020).

1.2.4 Metabolički putevi uključeni u toleranciju na desikaciju

1.2.4.1 Metabolizam ugljenih hidrata

Pojačana akumulacija šećera, posebno saharoze, alkoholnih šećera i oligosaharida iz porodice rafinoze tokom kasnih faza desikacije je karakterističan korak u mehanizmu TD biljaka vaskrsnica (Farrant i sar. 2012). Glavni šećer koji se akumulira u većini biljaka vaskrsnica tokom desikacije je saharoza (Martinelli 2008; Ingram i Bartels 1996; Gođevac i sar. 2022). Saharoza i trehaloza služe kao osmoprotektanti koji stabilizuju strukture različitih makromolekula (Martinelli 2008; Liu i sar. 2019). Oligosaharidi, kao što su rafinoza i stahioza, takođe se akumuliraju tokom desikacije kod mnogih biljaka vaskrsnica, štiteći ćelije kroz imitiranje molekula vode.

Pored osmoprotektivne uloge, neki od navedenih šećera mogu imati i signalnu funkciju u regulaciji važnih metaboličkih puteva. Trehaloza i trehaloza-6-fosfat su glavni metabolički regulatori, koji utiču na metabolizam ugljenih hidrata, rast i energetske status (Smeekens i sar. 2010). Trehaloza-6-fosfat stimuliše ADP-glukoza pirofosforilazu, čime podstiče sintezu skroba, dok trehaloza ispoljava suprotan efekat, stimulišući njegovu razgradnju (Smeekens i sar. 2010). Pojedini šećeri mogu da služe kao antioksidansi (Van den Ende i Valluru 2009), ali i kao senzori koji modulišu gensku ekspresiju tokom oksidativnog stresa (Rosa i sar. 2009). Takođe, akumulirani oligosaharidi se mogu brzo mobilisati tokom rehidratacije i služiti kao izvor energije za brz funkcionalni oporavak (Farrant i sar. 2015).

1.2.4.2 Antioksidativni metabolizam

Inhibicija fotosinteze tokom desikacije dovodi do disbalansa između primarnih i sekundarnih fotosintetskih reakcija, što za posledicu ima povećanu proizvodnju ROS (Reddy i sar. 2004; Laxa i sar. 2019). Akumulirani ROS oksiduju makromolekule u ćeliji narušavajući fiziološke funkcije (Kranner i Colville 2011). S druge strane, ROS predstavljaju važne signalne molekule koji indukuju aktivaciju zaštitnih mehanizama (Laxa i sar. 2019). Pri optimalnim fiziološkim uslovima, ROS se efikasno uklanjaju pomoću antioksidativnog sistema (Morse i sar. 2011; Pandey i sar. 2010).

Akumulacija neenzimskih antioksidanata, kao što su karotenoidi, askorbat (Asc), tokoferoli i GSH, kao i pojačana aktivnost antioksidativnih enzima, poput SOD, katalaze (CAT, razgrađuje H_2O_2 na vodu i kiseonik) i POD karakteristični su odgovori na stres (Morse i sar. 2011; Mihailova i sar. 2022). Pokazano je da Asc i GSH (kroz Asc-GSH ciklus za detoksikaciju H_2O_2), kao i sa njima povezani enzimi, igraju značajnu ulogu u ranim odgovorima biljke na desikaciju (Du i Rennenberg 2018; Mihailova i sar. 2022). Međutim, promene u sadržaju i profilu različitih antioksidanata su specifične za datu vrstu i zavise od intenziteta i dužine trajanja desikacije. Iako se antioksidativni sistem aktivira i kod biljaka osetljivih na sušu, biljke vaskrsnice poseduju jedinstvenu sposobnost održavanja antioksidativne aktivnosti čak i u potpuno desikovanom tkivu (Laxa i sar. 2019). Farrant i sar. (2007) su pokazali da antioksidativni enzimi eliminišu ROS čak i pri RSV manjem od 10 %, sugerišući da su enzimi i makromolekuli dobro zaštićeni pod ovim uslovima i da je njihova nativna struktura očuvana. Održavanje ove aktivnosti tokom ciklusa desikacije i rehidratacije presudno je za opstanak i brz oporavak biljaka vaskrsnica.

Tokom rehidratacije dolazi do prekomernog generisanja ROS, odnosno oksidativnog praska (eng. *oxidative burst*), usled ponovnog aktiviranja fotosintetskog aparata, što dovodi do nepotpunog iskorišćavanja svetlosne energije. ROS mogu dovesti do oštećenja makromolekula i narušavanja ćelijskog integriteta peroksidacijom lipida membrane. Međutim, uporedo sa tim procesima, dolazi do aktivacije antioksidativnog sistema, uključujući enzime SOD, CAT i askorbat-peroksidaze

(APX) koja specifično redukuje H_2O_2 koristeći askorbat kao donor elektrona, i neenzimske komponente: prolin, šećere i fenolna jedinjenja koji brzo neutrališu nastale ROS i omogućavaju održavanje ćelijskog integriteta i funkcije, posebno fotosinteze.

1.2.4.3 Zaštitni proteini

Pored antioksidativnih enzima, tokom suše i desikacije dolazi i do pojačane sinteze i drugih zaštitnih proteina i to u svim ćelijskim kompartmentima kako biljaka osetljivih na sušu, tako i u biljkama vaskrsnicama (Bartels i Hussain 2001; Battaglia i sar. 2008; Hundertmark i Hincha 2008). U ove proteine spadaju: LEA proteini, HSP, proteini koji se rano indukuju nakon izlaganja svetlosti (eng. *early light-inducible proteins*, ELIP). Velika porodica šaperona, HSP, generalno stabilizuju i ponovo uvijaju delimično ili potpuno razvijene/denaturisane proteine (Yurina 2023). Ove proteine karakteriše veća izloženost njihovih hidrofobnih aminokiselinskih ostataka kojima interaguju sa drugim proteinima i sprečavaju neželjene intermolekulske interakcije (Richter i sar. 2010). Visoko su ekspimirani u tkivima biljaka vaskrsnica, tokom desikacije i rehidratacije i pretpostavlja se da sprečavaju agregaciju proteina i denaturaciju (Gechev i sar. 2013). ELIP su inicijalno prepoznati kao proteini koji se brzo ekspimiraju pri visokom intenzitetu svetlosti. Oni su deo fotoprotektivnog odgovora biljke, pomažu biljkama u sprečavanju fotooksidativnog oštećenja vezivanjem slobodnog hlorofila i stabilizacijom fotosintetičke mašinerije. Pokazano je da se ELIP transkripti akumuliraju tokom desikacije kod mnogih vrsta vaskrsnica (Gechev i sar. 2013; VanBuren i sar. 2019; Yobi i sar. 2017) i pretpostavlja se da oni funkcionišu kao fotoprotektanti tako što se vezuju za hlorofile i stabilizuju antocijanine (Blomstedt i sar. 2018).

1.2.5 LEA proteini

Osamdesetih godina 20. veka, u semenu pamuka (*Gossypium hirsutum*), a zatim i u pšenici (*Triticum aestivum*), otkriveni su proteini zastupljeni u kasnoj fazi embriogeneze, tzv. LEA proteini (Dure i sar. 1981; Dure i Galau, 1981). Nedugo zatim, LEA proteini su pronađeni u vegetativnim delovima biljnih tkiva, gde se akumuliraju kao odgovor biljke na stresne uslove, poput desikacije, niskih temperatura, saliniteta i izloženosti teškim metalima (Chen i sar. 2019). Takođe, LEA proteini su otkriveni i kod drugih organizama koji ispoljavaju TD (Hand i sar. 2011).

LEA proteini predstavljaju veliku grupu hidrofilnih i uglavnom prirodno neuređenih proteina (eng. *intrinsically disordered proteins*) niske molekulske mase (10-30 kDa). U vodenom rastvoru oni zadržavaju neuređenu strukturu, funkcionišući kao molekularni šaperoni koji formiraju hidratacioni štit oko osetljivih molekula. Interesantno je da tokom desikacije može doći do njihovog konformacionog prelaza iz neuređene u uređenu strukturu (Banerjee i sar. 2016; LeBlanc i sar. 2021). Na taj način LEA proteini omogućavaju očuvanje trodimenzionalne (3D) strukture proteina, sprečavajući njihovu denaturaciju i agregaciju (Banerjee i sar. 2016).

Istovremeno, LEA proteini mogu interagovati sa fosfolipidnim dvoslojem, kako bi održali njihovo fluidno-kristalno stanje, čime se povećava stabilnost ćelijskih membrana (Tolter i sar. 2010). Pored toga, LEA proteini doprinose vitrifikaciji interagujući sa šećerima i stabilizujući staklasto stanje u ćeliji, pružajući tako strukturnu podršku tokom desikacije (Shimizu i sar. 2010). Još jedna predložena osobina LEA proteina je njihovo učestvovanje u stvaranju molekularskih kondenzata putem tečno-tečnog faznog razdvajanja (eng. *liquid-liquid phase separation*, LLPS), što je pokazano kod jedne vrste slanih račića, *Artemia franciscana* (Janis i sar. 2022). Određeni LEA proteini uključeni su i u zaštitu strukture hromatina tokom desikacije, igrajući ulogu u reparaciji DNK i remodelovanju hromatina.

Uz povećanje obima dostupnih informacija o novootkrivenim članovima familije LEA proteina, kao i napredak bioinformatičkih alata, trenutna klasifikacija ostaje neujednačena u naučnoj

literaturi. Tabela 1 ilustruje neusklađenost u nomenklaturi i različite nazive grupa koji se sreću u literaturi (Banerjee i sar. 2016; Chen i sar. 2019).

Tabela 1. Različita podela i klasifikacija LEA proteina prema različitim autorima

<i>Pfam</i> ^a	Hundertmark i Hinch (2008)	Bies-Ethève i sar. (2008)	Battaglia i sar. (2008)	Bray i sar. (1993)	Dure i sar. (1989)
LEA1	LEA1	LEA4	LEA4	LEA4	D-113
LEA2	LEA2	LEA7	LEA5C	-	D-95
LEA3	LEA3	LEA6	LEA5B	-	D-73
LEA4	LEA4	LEA3	LEA3	LEA3 ili LEA5	D-7 ili D-29
LEA5	LEA5	LEA1	LEA1	LEA1	D-19
LEA6	-	LEA8	LEA6	-	-
SMP ^b	SMP ^b	LEA5	LEA5A	LEA6	D-34
Dehidrini	Dehidrini	LEA2	LEA2	LEA2	D11
ABA_WDA ^b	-	-	LEA7	-	-

^a eng. *protein families*; ^b proteini sazrevanja semena (eng. *seed maturation proteins*, SMP); ^b abscisinska kiselina (eng. *abscisic acid*, ABA) i aklimacija na deficit vode (eng. *water deficit acclimation*, WDA).

LEA proteini su lokalizovani u skoro svim unutarćelijskim odeljcima, uključujući citosol, nukleus, hloroplaste, mitohondrije, a prisutni su i kao membranski proteini u plazmalemi. *In vitro* istraživanja su pokazala da LEA proteini mogu sprečiti inaktivaciju različitih enzima, kao što su laktat-dehidrogenaza, malat-dehidrogenaza, citrat-sintaza (CS) i CAT, tokom izloženosti različitim stresnim uslovima (Celik Altunoglu i sar. 2017). Istovremeno, pojedini LEA proteini mogu učestvovati u uklanjanju ROS, kao i vezivanju različitih jona metala, čime smanjuju njihovu toksičnost i oksidativna oštećenja tokom desikacije (Wang i sar. 2017).

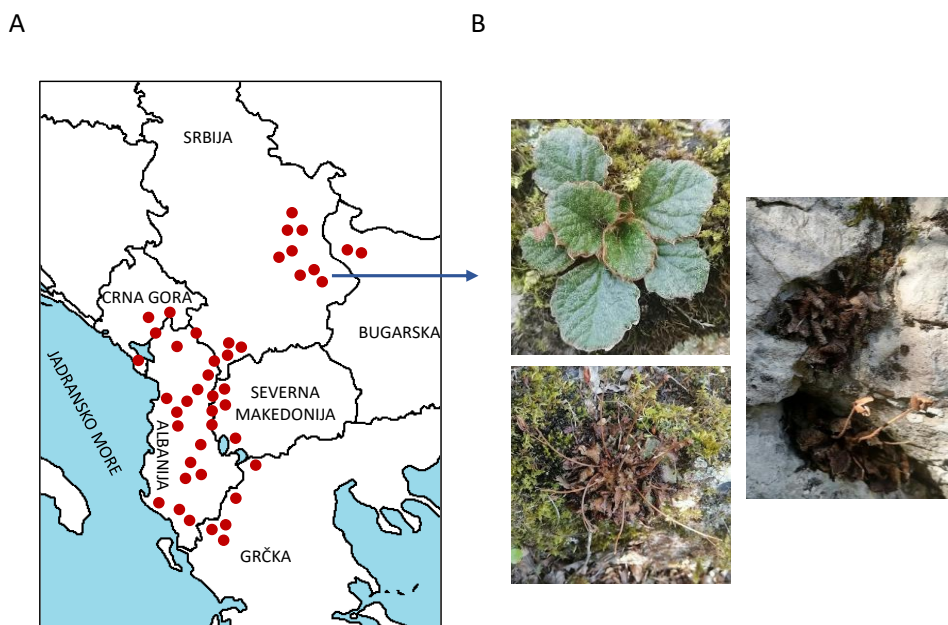
Pokazano je da prekomerna ekspresija *LEA* gena povećava toleranciju transgenih linija na abiotički stres, kao što su tolerancija na niske temperature kod transgenih biljaka vrste *A. thaliana*, odnosno tolerancija na sušu i visoku koncentraciju soli kod transgenog pirinča i pšenice (Lan i sar. 2013; Tolleter i sar. 2010). Takođe, heterologna ekspresija LEA proteina iz vrste *Pinus tabulaeformis* u bakteriji *Escherichia coli* značajno poboljšava ćelijsku toleranciju na salinitet i visoke temperature (Gao i sar. 2016).

1.3 *Ramonda serbica* kao model biljka za proučavanje mehanizama tolerancije na desikaciju

1.3.1 Geografska distribucija i prirodno stanište srpske ramonde

Srpska ramonda (*Ramonda serbica* Pančić) je biljka vaskrsnica koju je otkrio Josif Pančić 1874. godine. Reč je o heksaploidnoj biljnoj vrsti sa veličinom genoma od 1261 Mbp 1C (Lazarević i sar. 2013) koja primarno raste na krečnjačkom tlu. Ova endemska vrsta je rasprostranjena u delovima Albanije, Srbije, Crne Gore, Severne Makedonije i Grčke, na nadmorskoj visini od 200 do 1950 metara (slika 2; Meyer, 1970; Stevanović i sar. 1991).

Srpska ramonda predstavlja reliktnu planinsku floru koja je naseljavala centralni i južni Balkan tokom kasnog tercijara, kada su temperatura i vlažnost bile umerene do suptropske. Početak globalnog zahlađenja na severnoj hemisferi tokom ledenog doba smanjio je visokoplaninske populacije srpske ramonde, ograničavajući njihova staništa na zaštićene mikrolokacije kao što su klisure i kanjoni, gde su klimatski uslovi bili blaži i stabilniji (Rakić i sar. 2014).



Slika 2. Srpska ramonda i njeno prirodno okruženje. Distribucija srpske ramonde na Balkanskom poluostrvu prikazana je crvenim tačkama, slika napravljena na osnovu podataka iz Rakić i sar. 2014 (A); fenotip srpske ramonde u hidratisanom stanju u prirodnom staništu slikan u julu 2023. godine, i tokom desikacije u okviru sušnog perioda u avgustu 2024. godine na lokaciji Sićevačke klisure (B).

Srpska ramonda nastanjuje stenovite i strme pukotine okrenute ka severnoj strani sveta, često prekrivene mahovinom i zaklonjene od direktne sunčeve svetlosti. U odnosu na biljke vaskrsnice koje naseljavaju tropske i suptropske oblasti na južnoj hemisferi, srpska ramonda uspešno preživljava u potpuno drugačijim uslovima životne sredine. Ova vrsta je izložena umereno-kontinentalnoj klimi koju karakterišu topla i suva leta, ali i zimska sezona sa dugim periodima niskih temperatura (0°C ili nižim), često sa oskudnim snežnim pokrivačem. Unutar ovog opsega klimatskih ekstrema, dinamične sezone promene vremena prisiljavaju biljke da prolaze kroz cikluse desikacije/rehidratacije nekoliko puta tokom godine (slika 2).

1.3.2 Adaptacije srpske ramonde na desikaciju

S obzirom na to da je mehanizam TD strogo specifičan za svaku biljnu vrstu, neophodno je detaljno razmotriti prethodno poznate adaptivne strategije karakteristične za srpsku ramondu. U ovom poglavlju sumirana su dosadašnja saznanja o fiziološkim, biohemijskim i strukturnim promenama koje ovoj biljci vaskrsnici omogućavaju preživljavanje ekstremnog gubitka vode.

1.3.2.1 Fiziološke adaptacije srpske ramonde na desikaciju

Kao homoiohlorofilna vrsta koja tokom desikacije zadržava približno 50 % sadržaja hlorofila (Dražić i sar. 1999; Jovanović i sar. 2011), srpska ramonda mora posedovati specifične mehanizme za očuvanje integriteta fotosintetskog aparata. Dva glavna mehanizma zaštite su: (i) smanjena asimilacija CO_2 usled zatvaranja stoma, kada dolazi do povećane koncentracije elektrona u lumenu tilakoida; (ii) i aktiviranje nefotohemijskog gašenja fluorescencije hlorofila (NPQ, eng. *non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence*; Degl'Innocenti i sar. 2008).

Tokom desikacije redukuje se provodljivost stoma i smanjuju se vrednosti parametara fluorescencije, poput fotohemijskog gašenja, minimalne i maksimalne fluorescencije hlorofila *a*, maksimalnog i operativnog prinosa fotohemijske efikasnosti, kao i brzine linearnog elektronskog transportnog lanca; Rakić i sar. 2015). Svi ovi mehanizmi dovode do aktivacije nefotohemijskih procesa i porasta NPQ (Rakić i sar. 2015; Roháček i sar. 2008). Istovremeno, srpska ramonda značajno povećava sadržaj zeaksantina, Asc i GSH, što ima ključnu ulogu u rasipanju toplotne energije i zaštiti PS II od fotooštećenja (Augusti i sar. 2001).

Kapacitet fotosinteze srpske ramonde je povećan u kontrolisanim laboratorijskim uslovima u odnosu na onaj kada se biljka nalazi u prirodnom staništu, gde je intenzitet sunčevog zračenja relativno nizak (Rakić i sar. 2015). Međutim, nizak intenzitet svetlosti u prirodnom staništu je od izuzetnog značaja jer dovodi do smanjene fluktuacije dnevne temperature, kao i vlažnosti vazduha, što je ključno za održavanje specifičnih i stabilnih mikroklimatskih uslova koji su povoljni za fiziološku aktivnost biljaka tokom vlažne sezone.

Budući da se svetlosna energija prikupljena u biljkama koje su izložene desikaciji ne može efikasno trošiti u procesu fotosinteze, izlaganje desikovanih listova srpske ramonde sunčevom zračenju bi predstavljalo dodatno i prekomerno energetske opterećenje. Ovaj negativni uticaj suviše svetlosti na fotosintetički aparat sprečava se prethodno pomenutim zaštitnim mehanizmom koji podrazumeva skupljanje i uvijanje listova ka unutra, pri čemu se palisadno tkivo (bogat hloroplastima) zaklanja od svetlosti i štiti od fotooksidativnih oštećenja (Rakić i sar. 2015).

1.3.2.2 Antoksidativni metabolizam

Poput ostalih biljaka vaskrsnica, i u listovima srpske ramonde tokom desikacije dolazi do aktivacije antioksidativnog sistema. Listovi ove vrste bogati su fenolnim jedinjenjima, poput hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina i flavonoida, koja imaju izražen antioksidativni kapacitet (Sgherri i sar. 2004; Gođevac i sar. 2022). Najzastupljenije fenolne kiseline srpske ramonde su hlorogenska kiselina, protokatehuinska kiselina i *p*-hidroksibenzojeva kiselina.

Porast aktivnosti enzima antioksidativnog sistema u listovima srpske ramonde posebno je izražen u ranoj fazi dehidracije, kao i tokom prvih sati rehidracije (30–70 % RSV; Jovanović i sar. 2011). Rane faze desikacije karakterišu vrlo visoke aktivnosti APX i GR, ukazujući na važnu ulogu Asc-GSH ciklusa u održavanju redoks homeostaze (Sgherri i sar. 2004; Jovanović i sar. 2011). Dalja dehidracija dovodi do smanjenja aktivnosti APX, POD i GR, paralelno sa povećanjem aktivnosti SOD, što rezultira pojačanom akumulacijom H₂O₂ kao i prolaznim povećanjem peroksidacije membranskih lipida i curenjem jona kroz plazmalemu (Sgherri i sar. 2004).

Konačno, u desikovanim listovima srpske ramonde, kada je metabolizam skoro potpuno zaustavljen, proizvodnja H₂O₂ je smanjena, a aktivnosti svih ispitivanih antioksidativnih enzima su blizu njihovih konstitutivnih nivoa. Ovo ukazuje na njihovu izuzetnu otpornost na denaturaciju, čak i pri ekstremnom gubitku vode. Povećano stvaranje H₂O₂ tokom kasnijih faza desikacije srpske ramonde može predstavljati signal za višestruko povećanje nivoa Asc i GSH (Augusti i sar. 2001; Sgherri i sar. 2004). Većina ovih rezervi Asc i GSH se mobiliše gotovo odmah po rehidraciji, kako bi se uklanjao H₂O₂ kroz Asc-GSH ciklus. Kako se Asc i GSH oksiduju (troše), sa nastavkom oporavka raste aktivnost SOD, CAT, APX, GR i POD, što ukazuje na to da prvih nekoliko sati rehidracije predstavlja kritičan period u pogledu ćelijskog oksidativnog stresa (Sgherri i sar. 2004; Jovanović i sar. 2011; Veljović-Jovanović i sar. 2006 i 2008).

Vrlo visoka aktivnost POD, praćena smanjenjem ukupne količine njihovih endogenih supstrata, odnosno fenolnih kiselina, ukazuje na njihovu ulogu u uklanjanju H₂O₂ tokom rane faze desikacije

(Sgherri i sar. 2004; Veljović-Jovanović i sar. 2008). Pored toga, visoka aktivnost polifenol-oksidaaza (PPO) u desikovanim listovima biljke *R. serbica* dodatno potvrđuje da oksidacija fenola ima važnu ulogu u mehanizmu adaptacije na deficit vode (Veljović-Jovanović i sar. 2008).

Nasuprot tome, tokom prvih nekoliko sati rehidracije, specifična aktivnost POD je niska, a sadržaj fenolnih kiselina raste, što je verovatno posledica prioritete oksidacije velikih zaliha Asc. Rehidracija dovodi do kratkotrajnog nestanka izoformi PPO sa pI od 5 do 7,4, koje su normalno prisutne u desikovanim listovima, da bi ponovo bile indukovane u roku od jednog dana nakon rehidracije. Ovakva dinamika je u skladu sa prolaznim smanjenjem aktivnosti SOD, APX i POD tokom početnih sati oporavka (Veljović-Jovanović i sar. 2006). Ova privremena inaktivacija antioksidativnih enzima može biti posledica nekontrolisanih lančanih radikalskih reakcija, aktiviranih blagim povećanjem relativnog sadržaja vode, koje mogu dovesti do oksidacije proteina (Davies i sar. 1987).

1.3.2.3 Metaboličke promene

Ukupan sadržaj polarnih lipida u listovima srpske ramonde je prilično nizak (15–20 mg g⁻¹ suve mase) u poređenju sa drugim cvetnicama (Stevanović i sar. 1992). Desikacija duplira sadržaj sterola, čime se stabilizuje integritet plazmaleme. Istovremeno, dolazi do smanjenja sadržaja galaktolipida (glavne klase lipida listova srpske ramonde) na oko 10 % konstitutivne vrednosti uz porast odnosa monogalaktozildiacilglicerola i digalaktozildiacilglicerola (Quartacci i sar. 2002; Stefanov i sar. 1992). Desikacija takođe dovodi do smanjenja ukupnog sadržaja lipida plazmaleme za skoro 75 %, prvenstveno usled smanjenja količine fosfolipida. Ovaj proces uslovljava smanjenje površine membrane, čime se ona prilagođava umanjenoj zapremini ćelije izazvanoj desikacijom. Koncentracija sterola se udvostručuje, dok porast nivoa cerebrozida i smanjenje nivoa nezasićenosti fosfolipida, dodatno stabilizuju membranu i poboljšavaju interakcije između lipida i proteina tokom desikacije (Quartacci i sar. 2002).

Pored promena u sadržaju i sastavu lipida, važnu ulogu u mehanizmu TD srpske ramonde igraju i rastvorljive komponente. Sadržaj najzastupljenijeg šećera, saharoze, povećava se tokom dehidracije (Živković i sar. 2005; Gođevac i sar. 2022). Najprisutnija aminokiselina je prolin, koji u različitim fazama dehidracije i ponovnog zalivanja predstavlja od 50–70 % ukupne količine slobodnih aminokiselina, iako se količina ukupnih slobodnih aminokiselina značajno smanjuje (Živković i sar. 2005). Dinamika promena u sadržaju prolina tokom dehidracije i rehidracije prati promene detektovane u sadržaju Asc i GSH (Jovanović i sar. 2011), što ukazuje na njegovu višestruku ulogu: od antioksidativne odbrane u inicijalnoj fazi rehidracije do osmoregulacije, stabilizacije unutarćelijskih struktura i regulaciji ekspresije gena (Kavi Kishor i sar. 2005).

Dominantna organska kiselina u listovima i korenu srpske ramonde je oksalna kiselina, koja čini čak 90 % svih detektovanih organskih kiselina tokom ciklusa dehidracije/rehidracije (Živković i sar. 2005). Pretpostavlja se da je upravo razgradnja velikih zaliha Asc nakon rehidracije primarni izvor oksalne kiseline. Kod biljaka koje akumuliraju K⁺, Na⁺, Ca²⁺ i Mg²⁺ tokom desikacije, oksalna kiselina igra važnu ulogu u održavanju jonske ravnoteže i pH vrednosti (Živković i sar. 2005).

1.3.2.4 Zaštitni proteini

U kontekstu održavanja proteinske homeostaze, u listovima srpske ramonde nivo ubikvitinacije proteina biva povećan tokom faze desikacije kada je RSV 55 %, sugerišući da ta faza desikacije može biti kritični momenat za indukciju adaptivnog odgovora na isušivanje (Jovanović i sar. 2010). S druge strane, značajne količine ukupnih dehidrina (podgrupa LEA proteina) su već prisutne u listovima srpske ramonde pri optimalnim fiziološkim uslovima, dok se tokom ciklusa

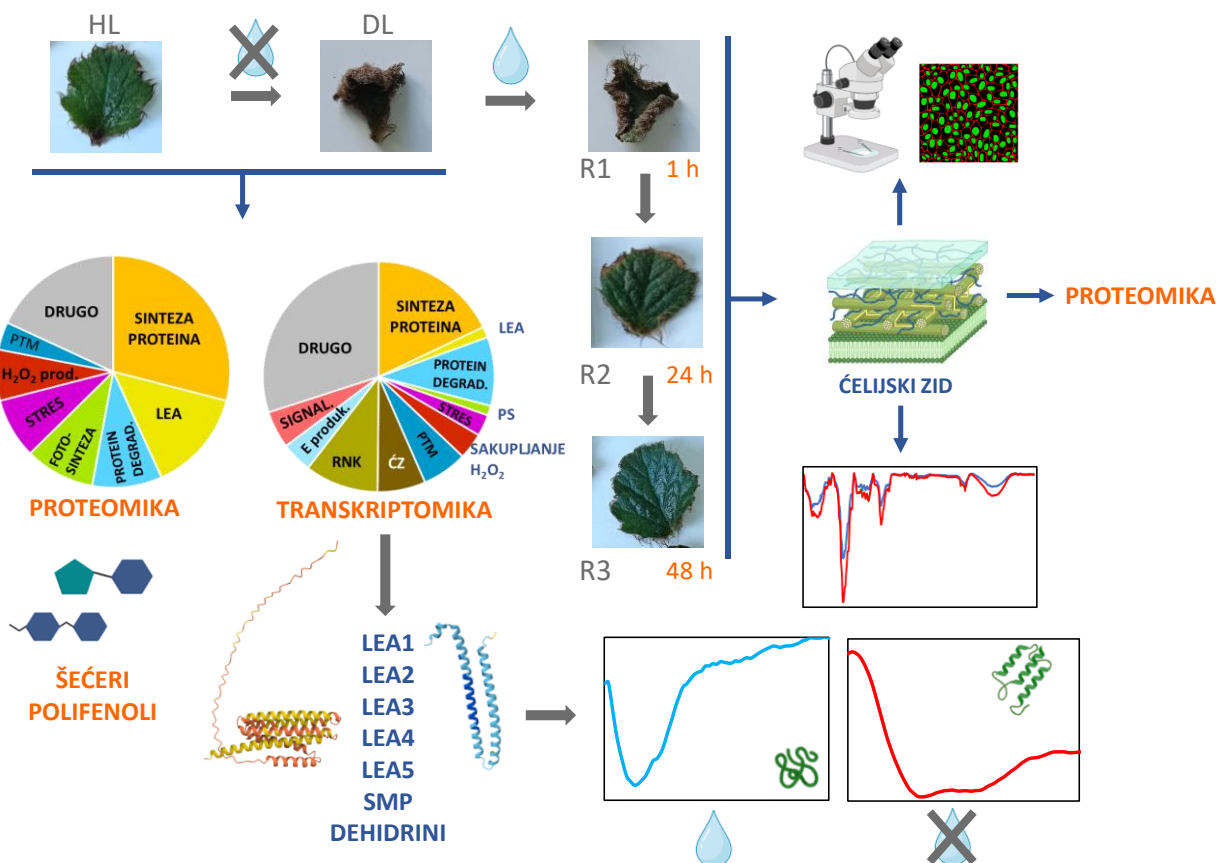
dehidracije/rehidracije povećava ekspresija specifičnih dehidrina (Jovanović i sar. 2011). Dehidrini pronađeni kod srpske ramonde mogli bi biti odgovorni za zadržavanje vode omogućavajući postepenu dehidraciju koja je neophodna za blagovremenu aktivaciju različitih zaštitnih mehanizama. Pojava novih, specifičnih dehidrina tokom procesa desikacije koincidira sa opadanjem aktivnosti antioksidativnih enzima i porastom peroksidacije lipida, sugerišući njihovu esencijalnu ulogu u zaštiti ćelijskih struktura pri ekstremnom gubitku vode.

Opisane promene u ekspresiji svih komponenti antioksidativnog sistema, kao i osmoprotektivnih metabolita, ukazuju na postojanje strogo koordinisane i čvrsto regulisane strategije TD. Budući da je ovaj mehanizam izuzetno kompleksan i obuhvata regulaciju na nivou gena, proteina i metabolita, neophodno je bilo sprovesti opsežne proteomske i transkriptomске studije kako bi se stekao uvid u ovu fino orkestriranu mrežu. Pored toga, specifičan odgovor u vidu progresivnog uvijanja listova ka unutra direktno implicira značajnu ulogu ćelijskog zida. S obzirom na to da su podaci o remodelovanju arhitekture komponenti ćelijskog zida srpske ramonde tokom desikacije i rehidracije do sada bili oskudni, dalja istraživanja strukturnih i biohemijskih promena u ćelijskom zidu su od suštinskog značaja. Ovakav integrisani pristup treba da omogući potpuno razumevanje strategije preživljavanja srpske ramonde i identifikaciju ključnih faktora koji joj omogućavaju povratak u život nakon ekstremnog gubitka vode.

2. REZULTATI

2.1 Tok istraživanja

U cilju dobijanja sveobuhvatne slike o mehanizmu tolerancije na desikaciju u ćelijama listova srpske ramonde, urađena je transkriptomaska i proteomska analiza pri fiziološkim uslovima, kao i tokom desikacije. Pored toga, analizirani su parametri brze kinetike fluorescencije hlorofila (na osnovu OJIP krive), sadržaj solubilnih šećera i fenolnih jedinjenja, kao i aktivnost odabranih enzima. Tokom desikacije zabeležene su značajne promene u nivou LEA proteina, stoga je urađena njihova detaljna bioinformatička analiza (identifikacija i klasifikacija), kao i rekombinantna proizvodnja u cilju određivanja njihovih strukturnih karakteristika i fiziološke funkcije. Kako bismo dobili uvid u remodelovanje arhitekture i sastava ćelijskog zida u odnosu na sadržaj vode u ćelijama listova srpske ramonde, nova eksperimentalna postavka upotpunjena je sa dodatne tri tačke rehidratacije: 1 sat (R1), 1 dan (R2) i 2 dana (R3) nakon ponovnog zalivanja. Ispitivanje komponenti ćelijskog zida obuhvatalo je selektivnu proteomsku analizu proteina vezanih za ćelijski zid, imunocitohemijske analize šećernih komponenti AGP i analize sadržaja ostalih polimera ćelijskog zida, poput lignina, pektina, hemiceluloze i celuloze (slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz toka rada ove doktorske disertacije. HL, hidratizirani listovi; DL, desikovani listovi; R1, listovi uzorkovani nakon 1 h; R2, nakon 24 h; R3, nakon 48 h od ponovnog zalivanja; PS, fotosinteza; PTM, posttranslacione modifikacije; SMP, proteini sazrevanja semena; ČZ, ćelijski zid.

Biljke su uzorkovane sa prirodnog staništa u Sićevačkoj klisuri. Urađena su dva eksperimenta: prvi je podrazumevao hidratizirano stanje i desikaciju – materijal iz tog eksperimenta je korišćen kako bi se odredio sveobuhvatni odgovor biljke na desikaciju, sa ciljem da se na integriran način sagledaju složeni biološki odgovori, drugi eksperiment je pored hidratiziranog i desikovanog stanja

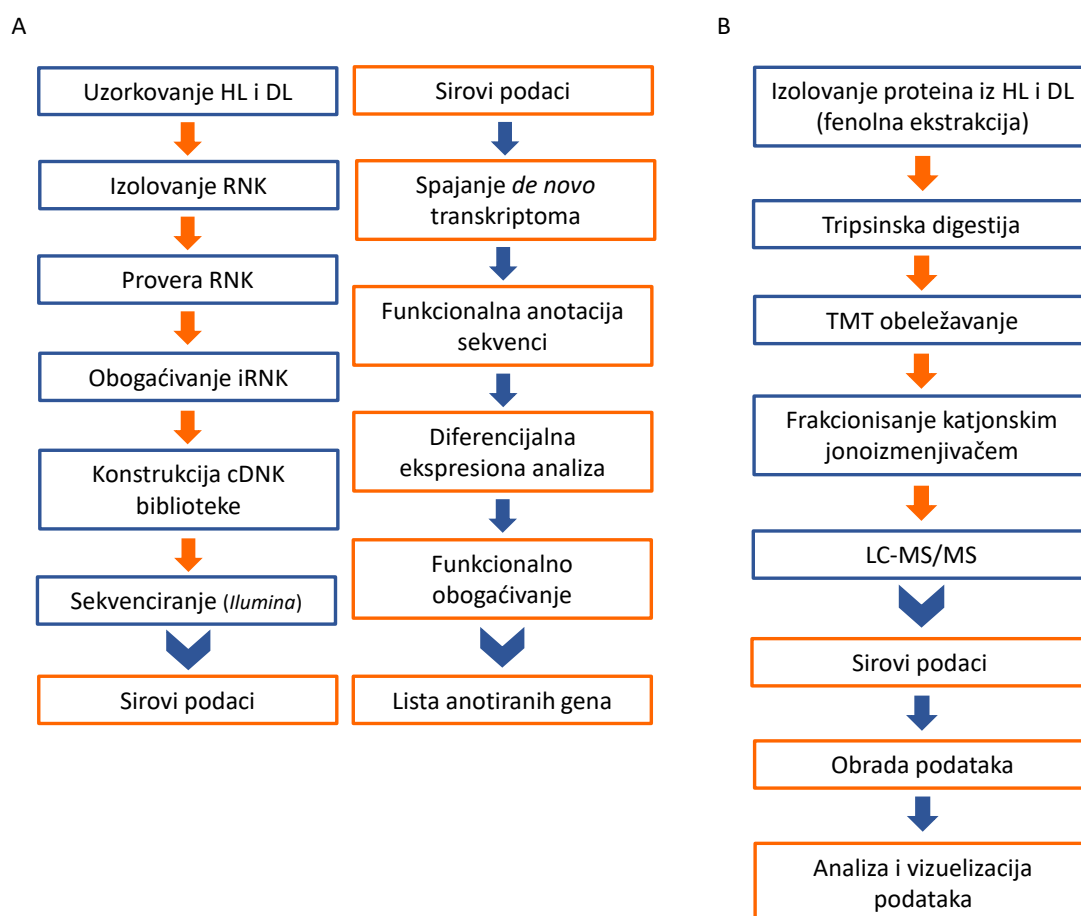
uključio i stanje rehidracije, u cilju detaljnijeg proučavanja promena u ćelijskom zidu tokom perioda desikacije i naknadnog oporavka.

2.2 Molekularni mehanizmi uključeni u toleranciju srpske ramonde na desikaciju

2.2.1 Promene u transkriptomu i proteomu listova srpske ramonde tokom desikacije

U cilju određivanja diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) tokom desikacije srpske ramonde, urađena je *de novo* transkriptomaska analiza HL i DL (kratak shematski prikaz procedure nalazi se na slici 4A).

Proteomska analiza je urađena u cilju određivanja diferencijalno zastupljenih proteina (eng. *differentially abundant proteins*, DAP) tokom desikacije u odnosu na hidratizano stanje (skraćeni pregled procedure prikazan je na slici 4B).

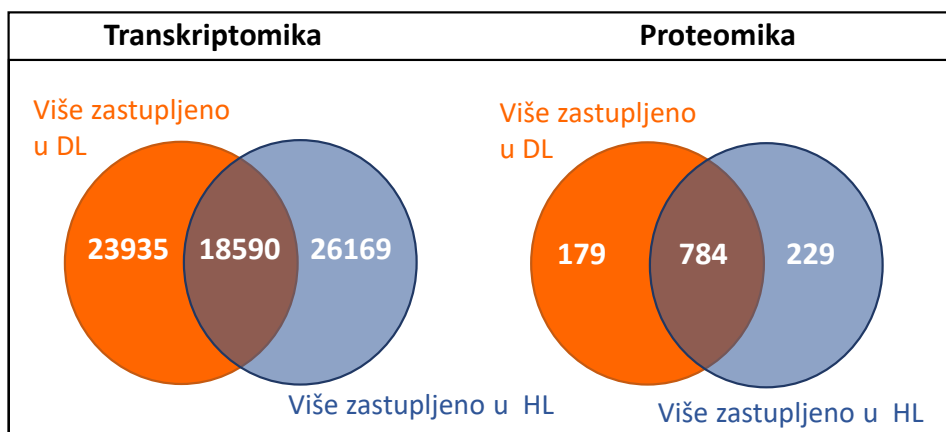


Slika 4. Shematski prikaz procedura *de novo* transkriptomске (A) i proteomske (B) analize HL i DL srpske ramonde. Pravougaonici uokvireni plavom bojom predstavljaju eksperimentalne korake, a oni oivičeni naranđastom korake bioinformatičke obrade dobijenih podataka.

Diferencijalnom transkriptomskom analizom HL i DL srpske ramonde identifikovano je 68694 DEG (prilog 1). Primenom kriterijuma $p < 0,05$ i $|\log_2 \text{fold change}| \geq 2$, identifikovano je 23935 gena sa povećanom, i 26169 gena sa smanjenom ekspresijom u DL u poređenju sa HL, dok se ekspresija 18590 gena nije menjala tokom desikacije (slika 5).

Primenjena tzv. *shotgun* diferencijalna proteomska analiza sa šestokanalnim *Tandem Mass Tag* (TMT) obeleživačem bazirana na *de novo* transkriptomskoj bazi, omogućila je kvantifikaciju 1192 različite proteinske grupe. Među njima, 408 proteinskih grupa DAP je bilo statistički značajno (p

$< 0,05$ i $|fold\ change| \geq 1,3$). Ukupno je 229 proteinskih grupa bilo više zastupljeno u HL, a 179 u DL, dok je 784 njih ostalo nepromenjeno (slika 5).



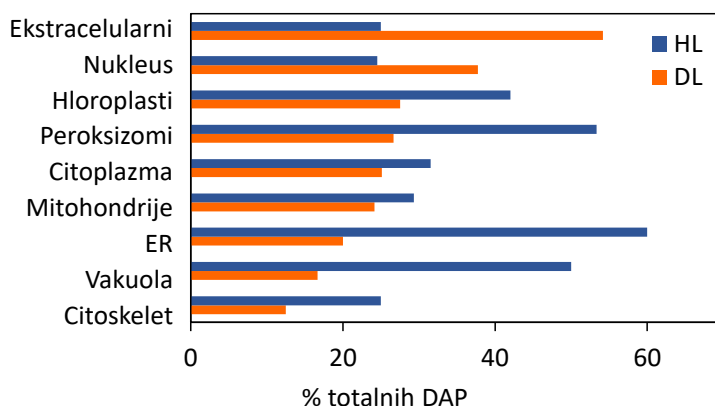
Slika 5. Identifikovani DEG i DAP u HL i DL srpske ramonde. DEG, diferencijalno eksprimirani geni; DAP, diferencijalno zastupljeni proteini.

2.2.1.1 Bioinformatička funkcionalna anotacija DEG i DAP

Anotacijom dobijenih DEG na osnovu Ontologije gena (eng. *Gene Ontology*, GO) bioloških procesa pokazano je da se većina DEG odnosi na procese ćelijskog transporta, uvijanja proteina u nativnu strukturu, metabolizam azota, ugljenih hidrata i lipida, kao i na embrionski razvoj (uključujući i gene koji kodiraju LEA proteine), proteine nalik džerminima (eng. *germin-like proteins*, GLP), i proliferaciju ćelija (prilozi 2 i 3).

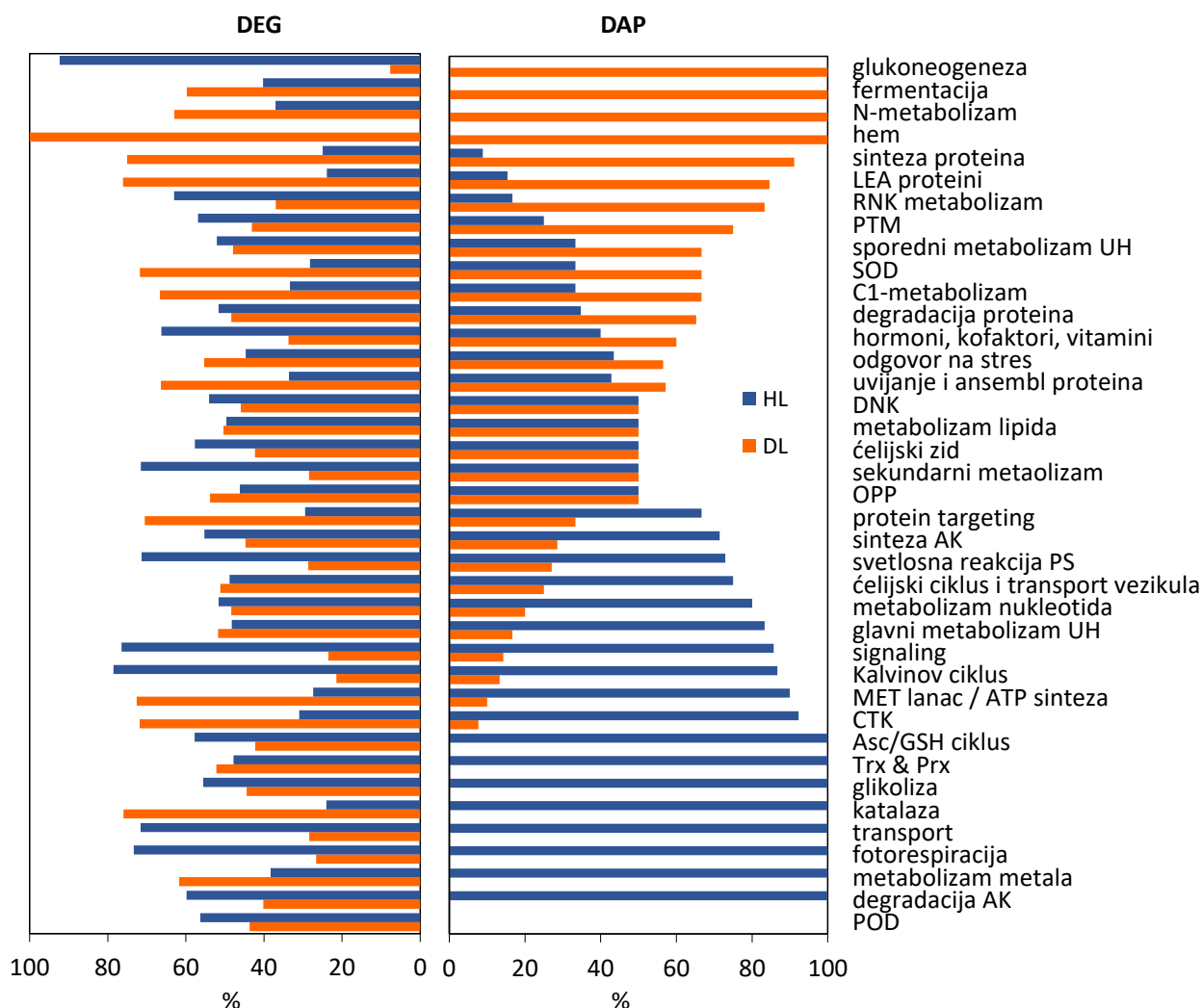
Većina DAP na koje je desikacija uticala su proteini uključeni u fotosintetske procese, proteinsku homeostazu (posebno sintezu proteina), uvijanje proteina u nativnu strukturu, odgovor na stres (uključujući i LEA proteine), ali i u metabolizam ugljenih hidrata i ćelijski transport (prilozi 2 i 4). Na nivou enzimske aktivnosti, najviše DEG nakon desikacije kodiralo je oksidoreduktaze, transmembranske transportere, hidrolaze, liaze, i DNK-vezujuće transkripcione faktore.

Prema *KEGG* bazi podataka, većina DEG kodira proteine koji učestvuju u signalizaciji i metabolizmu skroba, saharoze, fenilpropanoida i flavonoida. Značajno povišeni DEG tokom desikacije kodiraju proteine koji su uključeni u procese koji se odvijaju u ekstracelularnom matriksu, ćelijskom zidu i tilakoidima.



Slika 6. Predviđanje unutarćelijske lokalizacije DAP u HL i DL srpske ramonde.

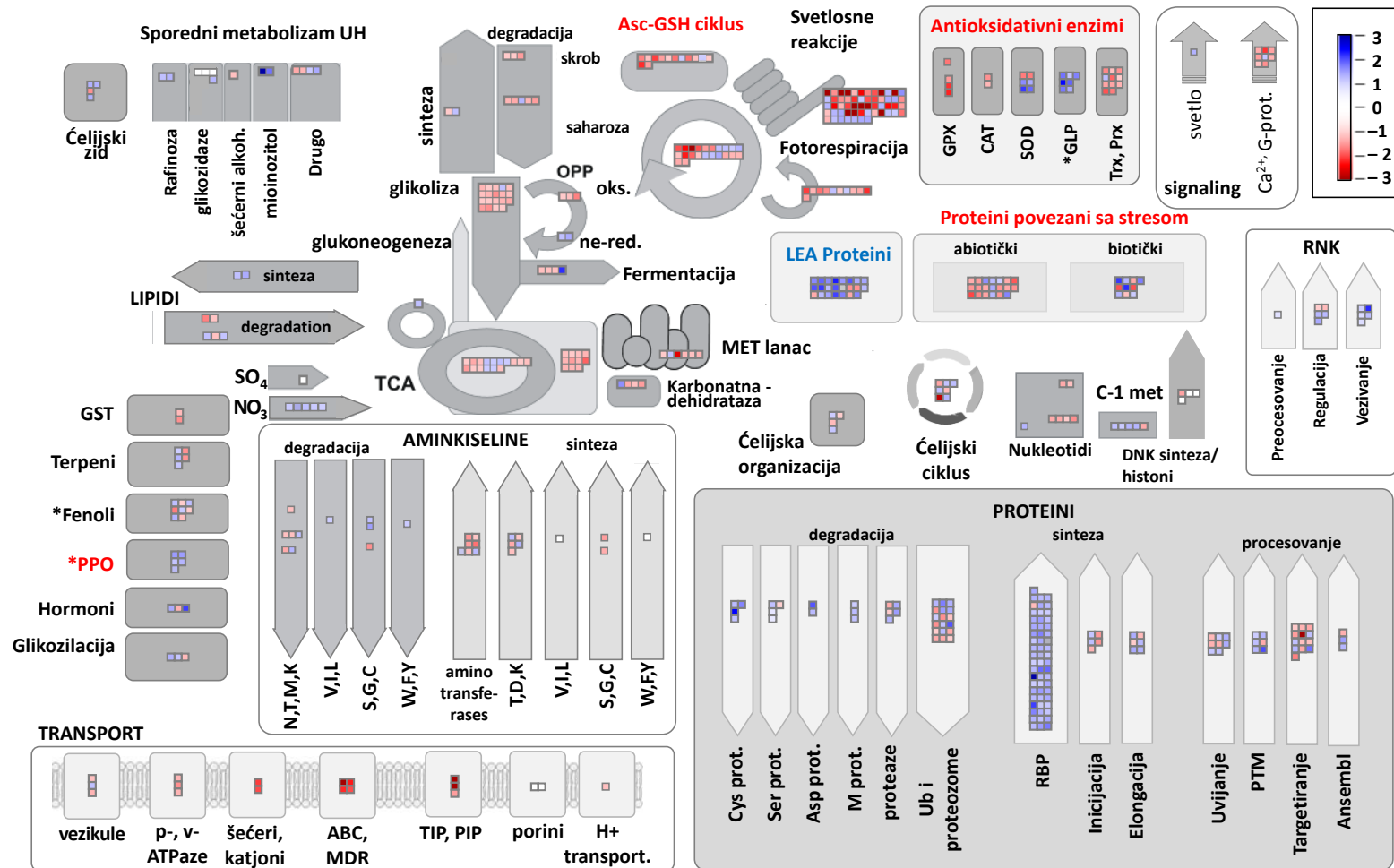
Bioinformatički alati su predvideli da se DAP nakon desikacije nalaze u devet ćelijskih kompartmenata, i to pre svega u hloroplastima (42 %), zatim citoplazmi (32 %), mitohondrijama (9 %) i jedru (8,3 %). Nakon desikacije, udeo ekstracelularnih proteina i jedarnih proteina je porastao, dok je zastupljenost proteina iz vakuole, hloroplasta, peroksizoma, endoplazmatičnog retikuluma i citoskeleta smanjena (slika 6). Kako bi se ispitala korelacija između promena u DEG i DAP indukovanih desikacijom, određena je klasifikacija prema funkcionalnim grupama (slika 7). Većina DEG i DAP koji se odnose na fotosintezu, transport, sekundarni metabolizam i signalizaciju bila je smanjena u DL u poređenju sa HL. S druge strane, DAP i DEG koji kodiraju proteine uključene u fermentaciju, metabolizme azota i hema, sintezu i uvijanje proteina u nativnu konformaciju, C1 metabolizam i LEA proteine bili su povećani u DL, u odnosu na HL.



Slika 7. Funkcionalna klasifikacija DEG i DAP u HL i DL srpske ramonde. Detaljna klasifikacija je data u prilogima 3 i 4.

2.2.1.2 Glavni metabolički putevi uključeni u desikaciju listova srpske ramonde

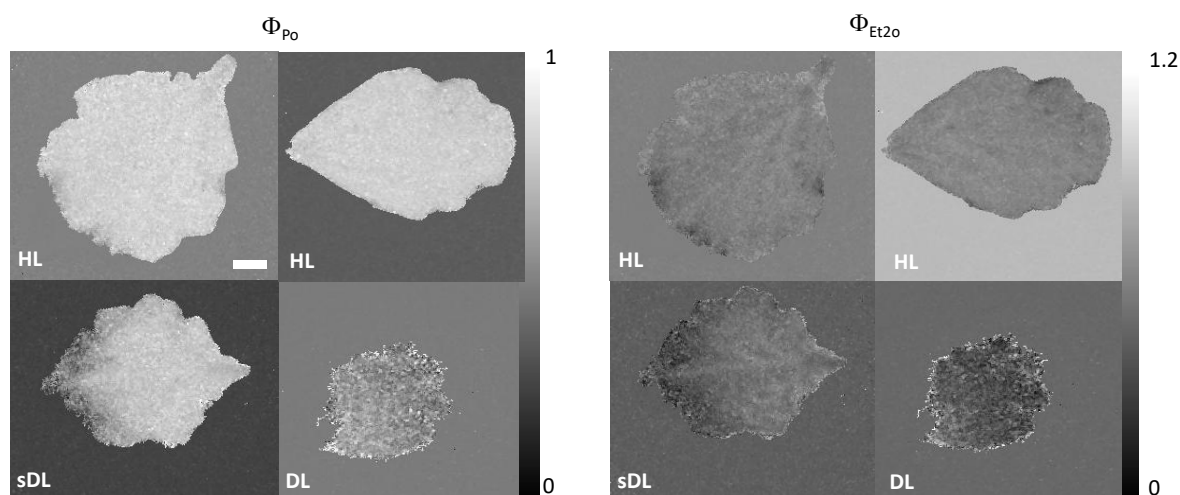
Radi boljeg pregleda, kao i razumevanja proteomskih promena izazvanih desikacijom, DAP indukovani desikacijom su raspoređeni u metaboličke puteve biljne ćelije prikazane na slici 8, gde su DAP prevedeni u ortologe biljke *A. thaliana* i ručno mapirani prema TAIR bazi podataka (dodato na *MapMan* shemu koja je korišćena kao baza).



Slika 8. Shematski prikaz diferencijalno zastupljenih proteina u DL u poređenju HL. Plavom bojom su označeni DAP povećani u DL, dok su crvenom bojom označeni DAP povećani u HL (uz prikazanu mapu intenziteta odnosa promena, tzv. *fold change heatmap*). Skraćenice: AK, aminokiseline; ABC, ATP-vezujući transporter; Asc, askorbat; CAT, katalaza; UH, ugljeni hidrati; GLP, proteini nalik džerminima; GSH, redukovani glutation; GST, glutation-S-transferaze ; MDR, višestruko otporni transporter (eng. *multidrug resistance transporter*); OPP, oksidativni pentozofosfatni put; PIP, proteini plazma membrane (eng. *plasma membrane intrinsic proteins*); PPO, polifenol-oksidadze; Prx, peroksiredoksin (eng. *peroxiredoxin*); PTM, posttranslacione modifikacije; oks., oksidovani; red., redukovani; RBP, proteini koji se vezuju za ribozome; CTK, ciklus trikarboksilnih kiselina; TIP, proteini tonoplasta (eng. *tonoplast intrinsic protein*); Trx, tioredoksini; Ub, ubikvitin.

2.2.2 Uticaj desikacije na fotosintetske parametre/procese

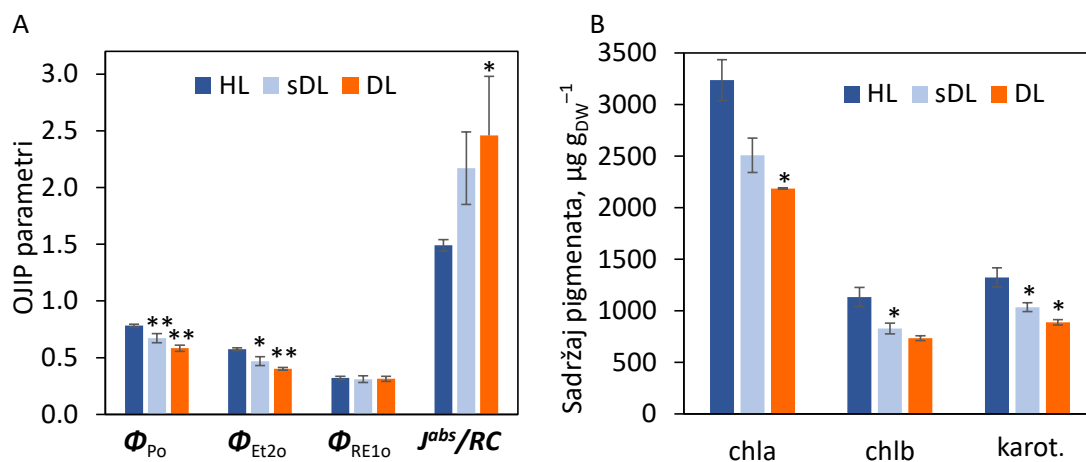
Direktno snimanje brze kinetike fluorescencije hlorofila (OJIP) preko cele površine lista pokazalo je smanjenje maksimalnog kvantnog prinosa primarne PS II fotohemije (Φ_{P_0}) u delimično dehidratiranim listovima (sDL, sa ~60 % RSV) u poređenju sa potpuno hidratiranim listovima. Smanjenje je prvo uočeno na gornjem delu lista, dok je kod DL (15–20 % RSV) smanjenje bilo ujednačeno duž celog lista (slika 9).



Slika 9. Reprezentativne slike efekata desikacije na OJIP parametre kod potpuno hidratiranih (HL; RSV ~ 90 %), delimično dehidratiranih (sDL, RSV ~ 60 %) i desikovanih (DL, RSV ~ 15–20 %) listova biljke *R. serbica*. Φ_{P_0} ; jednako je F_v/F_m – maksimalni kvantni prinos primarne PS II fotohemije; Φ_{ET20} , mera za kvantni prinos elektronskog transportnog fluksa sa plastohinona A (Q_A) na plastohinon B (Q_B). Linija predstavlja 1 cm.

Delimično isušeni listovi su pokazali veću osetljivost mezofilnih ćelija na desikaciju u poređenju sa provodnim tkivom, što je primećeno kroz kvantni prinos elektronskog transportnog fluksa (Φ_{ET20}) od plastohinona A (Q_A) do plastohinona B (Q_B). Kod desikovanih listova, i mezofilne ćelije i provodno tkivo je bilo podjednako pogođeno. Inhibicija efikasnosti PS II (ali ne i PS I) izazvana desikacijom bila je vidljiva na nivou cele površine lista (slika 9). Desikacija je izazvala porast prosečnog protoka fotona apsorbovanih po reakcionim centrima PS II (J^{abs}/RC), što ukazuje na smanjenje broja aktivnih reakcionih centara PS II. Ovo je posebno izraženo u DL, iako je J^{abs}/RC 45 % viši u sDL u odnosu na HL (slika 10A).

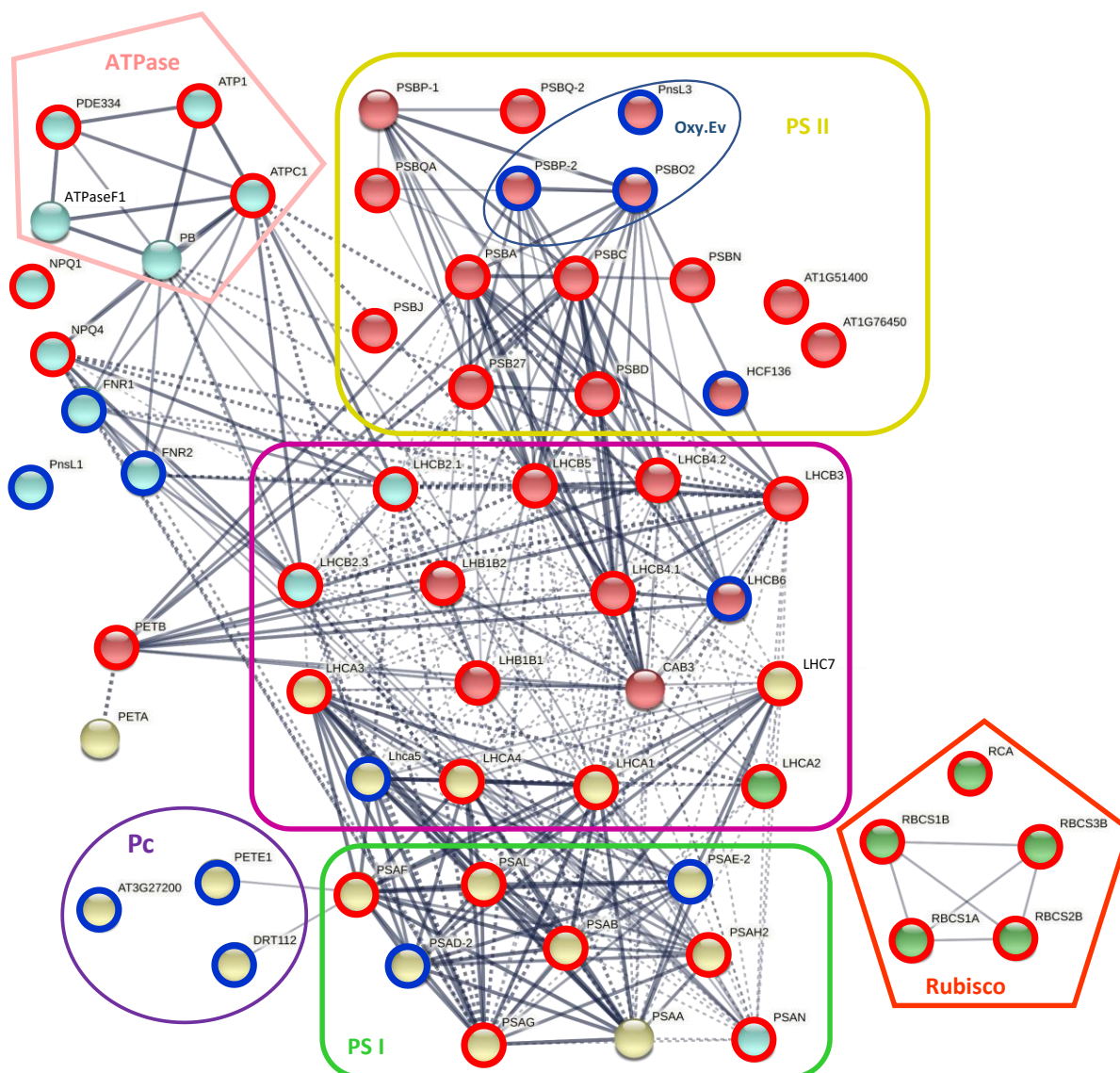
Tokom desikacije došlo je do smanjenja količine fotosintetskih pigmenata, hlorofila *a* i *b*, kao i karotenoida za 32 % – 35 % (slika 10B). U cilju praćenja dinamike promena, pigmenti u sDL su takođe analizirani. Iako je sadržaj svih merenih pigmenata smanjen u sDL u poređenju sa HL, statistički značajna promena je primećena u sadržaju hlorofila *b* (smanjenje 27 %), kao i u sadržaju karotenoida, sDL u poređenju sa HL. Međutim, nisu primećene značajne razlike između sDL i DL u sadržaju fotosintetskih pigmenata.



Slika 10. Uticaj desikacije na OJIP parametre i sadržaj pigmenata povezanih sa fotosintezom u listovima srpske ramonde. (A) Φ_{Po} predstavlja Fv/Fm – maksimalni kvantni prinos primarne PS II fotohemije; Φ_{ET20} je mera kvantnog prinosa toka elektrona od plastohinona A (Q_A) do plastohinona B (Q_B); Φ_{RE10} je kvantni prinos toka elektrona do PS I akceptora elektrona; J^{abs}/RC je prosečan fluks apsorbovanih fotona po PS II reakcionom centru. Zvezdice označavaju statistički značajne razlike između delimično dehidratiranih listova (sDL) i desikovanih (DL) u poređenju sa hidratiranim listovima (HL), prema Man-Vitnijevom U-testu (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) (B); chl a, hlorofil a; chl b, hlorofil b; karot., karotenoidi. Zvezdice označavaju značajne razlike između sDL i DL u poređenju sa HL, prema t-testu (* $p < 0,05$). Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti $\pm$ standardna greška.

Dobijeni rezultati vezani za pigmente i efikasnost fotosinteze su u dobroj korelaciji sa proteomskim podacima, gde je primećen 4 do 5 puta manji broj detektovanih proteina koji učestvuju u fotosintezi u DL. Takođe, 21 od 23 DAP koji učestvuju u Kalvin-Bensonovom ciklusu (kao što su ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza, EC 4.1.1.39, Rubisco, i njegova aktivaza, fosfoglicerat-kinaza i fruktoza-bifosfat aldolaza), kao i u fotorespiraciji (glikolat-oksidaza, glicerat-dehidrogenaza) su bili manje zastupljeni u DL u poređenju sa HL (slika 8). Od 45 DAP uključenih u fotosintetski elektronski transportni (PET) lanac, 35 je manje zastupljeno tokom desikacije. Dve subjedinice kompleksa za sakupljanje svetlosti (eng. *light harvesting complex*, LHC) povezane sa PS II (Rs91513 i Rs_153379), dve subjedinice PS I (Rs_121438 i Rs_164136), faktor stabilizacije PS I (Rs_153379), tri bakar-vezujuća transportera elektrona (plastocijanini, Rs_90850, Rs_146509, Rs_160542) kao i sve četiri feredoksin-NADP⁺-reduktaze (FNR, Rs_205228, Rs_156747, Rs_88126 i Rs_27514) su bile više zastupljene u HL u odnosu na DL. Tri proteina uključena u kompleks za izdvajanje kiseonika (eng. *oxygen evolving complex*, OEC) na PS II bila su više akumulirana tokom desikacije (slika 11).

Analiza transkriptomskih rezultata otkrila je značajan udeo gena koji kodiraju ključne komponente fotosinteze bio povišen tokom desikacije. Konkretno, 26 od 96, 18 od 61 i svih 18 DEG koji kodiraju komponente PS I, PS II, LHC i Rubisco kompleksa su bili povećani tokom desikacije (prilog 3). Zanimljivo je da je među 67 identifikovanih DAP povezanih sa PET lancem, samo 31 bio nađen i među DEG. Koherentne promene između DAP i DEG uočene su kod komponenti LHC, osim za protein 6a koji se vezuje za hlorofil a-b (Rs_20252), kao i PS I/PS II subjedinice, osim reakcionog centra PS I (Rs_121438) i subjedinice IV koja pripada PS I (Rs_164136). Promene izazvane desikacijom koje su uticale na Rubisco kompleks i njegove aktivaze bile su usklađene kako na nivou transkripata, tako i na nivou proteina. S druge strane, nivoi transkripata tri tzv. „*oxygen-evolution enhancers*” (OEE) kompleksa na PS II, kao i plastocijanina i FNR, bili su niži u DL, što je u suprotnosti sa dobijenom zastupljenošću tih proteina (prilozi 3 i 4).



Slika 11. Grafički prikaz analize protein-protein interakcija DAP vezanih za fotosintezu u HL i DL srpske ramonde dobijene pomoću *STRING* softvera. Grupisanje je rađeno u pet klastera. Naglašeni su fotosintetski kompleksi (PS I, fotosistem I; PS II, fotosistem II; Pc, plastocijanini; LHC, kompleks za sakupljanje svetlosti). Veze između klastera prikazane su isprekidanim linijama. Prikazana je i fizička podmreža, gde su povezani proteini deo istog fizičkog kompleksa. Debljina linije označava količinu dostupnih literaturnih podataka. Minimalna vrednost za srednji nivo poverenja interakcije postavljena je na 0,400. Plavom bojom su zaokruženi DAP koji su bili povišeni nakon desikacije, a crvenom oni koji su bili smanjeni. Skraćenice se odnose na simbole i oznake anotacija odgovarajućih proteinskih ortologa iz biljke *A. thaliana*.

2.2.3 Odgovor metabolizma ugljenih hidrata u ćelijama listova

Kako bi se ustanovila uloga rastvorljivih šećera u toleranciji na desikaciju kod srpske ramonde, analiziran je sadržaj najzastupljenijih heksoza, pentoza, disaharida, oligosaharida i šećernih alkohola. Ukupan sadržaj rastvorljivih šećera bio je tri puta veći u DL u poređenju sa HL (tabela 2). Najzastupljeniji šećeri bili su glukoza, fruktoza i saharoza, sa približnim molarnim udelima od 28–32 %, 25 % i 14–16 % ukupnih šećera, redom. Najveće statistički značajne promene primećene su u nivou galaktoze, ramnoze, stahioze i arabinitola (tabela 2). Nakon desikacije, udeo manitola je bio povećan sa 0,3 % na 3,9 %; ramnoza i melibioza su povećane 40 puta (sa 0,1 % na 4 %), količina stahioze je povećana 164 puta (sa 0,02 % na 3,5 %), a gentiobioza sa 0,02 % na 6 % (prilog 5). Istovremeno, uočen je i slabi pad odnosa glukoze i fruktoze tokom desikacije.

Tabela 2. Sadržaj rastvorljivih šećera u HL i DL kod srpske ramonde. Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti $\pm$ standardne greške ($n = 5-6$). Zvezdice označavaju značajne razlike između tretmana i odgovarajućih kontrola prema t -testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

	HL	DL		HL	DL
	Heksoze (mmol g^{-1} DW)			Oligosaharidi ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)	
Glukoza	$0,94 \pm 0,15$	$2,26 \pm 0,34$ **	Izomaltotrioza	$2,7 \pm 0,6$	$7,8 \pm 2,7$
Fruktoza	$0,71 \pm 0,10$	$2,06 \pm 0,40$ **	Maltotrioza	$6,3 \pm 1,5$	$6,7 \pm 1,7$
Galaktoza	$0,19 \pm 0,02$	$0,79 \pm 0,10$ *	Rafinoza	$6,4 \pm 2,9$	$16,4 \pm 2,8$ *
	Pentoze ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)		Melezitoza	$2,9 \pm 1,2$	$10,0 \pm 2,0$ *
Arabinoza	$64,4 \pm 19,9$	$168,6 \pm 57,2$	Panoza	$0,23 \pm 0,12$	$0,82 \pm 0,32$
Riboza	$26,5 \pm 6,5$	$105,3 \pm 21,1$ *	Stahioza	$0,70 \pm 0,21$	$4,54 \pm 0,81$ **
Ramnoza	$2,6 \pm 0,4$	$25,1 \pm 5,6$ *		Šećerni alkoholi ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)	
Ksiloza	$12,3 \pm 3,3$	$34,7 \pm 6,9$ *	Eritritol	$75,23 \pm 27,5$	$213,7 \pm 50,5$ *
	Disaharidi ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)		Sorbitol	$48,9 \pm 16,2$	$155,0 \pm 60,7$
Saharoza	$317,4 \pm 60,1$	$1367,5 \pm 461,3$	Galaktitol	$122,0 \pm 41,7$	$296,9 \pm 171,5$
Trehaloza	$29,2 \pm 4,7$	$79,1 \pm 31,8$	Arabinitol	$12,3 \pm 4,6$	$66,5 \pm 18,4$ *
Melibioza	$2,4 \pm 0,7$	$5,7 \pm 1,9$	Manitol	$6,2 \pm 1,2$	$23,5 \pm 8,8$
Maltoza	$13,6 \pm 4,2$	$62,4 \pm 18,9$ *			
Izomaltoza	$2,7 \pm 0,6$	$7,8 \pm 2,7$ *	Ukupna količina rastvorljivih šećera (mmol g^{-1} DW)		
Turanoza	$90,4 \pm 28,0$	$312,2 \pm 76,6$ *		$2,7 \pm 0,3$	$8,2 \pm 1,0$ **

DW – suva masa (eng. *dry weight*, DW)

Četiri DAP, prepoznata kao galaktitol-saharoza galaktoziltransferaza, uključena u sintezu rafinoze, blago su povećana tokom desikacije (20–30 %, prilog 4). Za razliku od HL, u DL nisu pronađeni DAP uključeni u transport ugljenih hidrata.

Transkriptomski podaci ukazuju na to da su neki od DEG koji kodiraju enzime koji učestvuju u biosintezi skroba povećani, a neki suprimirani u DL. Sva tri gena koja kodiraju skrob-sintazu, kao i pet od dvanaest UDP-glukoza-skrob glukoziltransferaza, i šest od jedanaest gena koji kodiraju enzim glikogenskog grananja su povećani tokom desikacije (prilog 3). Enzimi uključeni u razgradnju skroba, kao što su β -amilaza i β -glukan-vodena dikinaza uglavnom su suprimirani tokom desikacije. Shodno tome, zastupljenost β -glukan-vodene dikinaze smanjena je u DL u poređenju sa HL (prilog 4). Razmatrajući DEG povezane sa β -amilazom, jedanaest transkripata bilo je povećano u DL, a pet u HL.

Desikacija je indukovala i nekoliko gena koji kodiraju proteine uključene u razgradnju saharoze, poput saharoza-sintaze (Cluster-14775.53194; Cluster-14775.67439; Cluster-36760.0), fruktokinaze (Cluster-14775.41759 – Rs_151532, Cluster-14775.46131 – Rs_122669, Cluster-5400.0 – Rs_22332, Cluster-14775.1477 – Rs_168711, Cluster-14775.37835 – Rs_120931, Cluster-14775.110729 – Rs_168332), jedne neutralne invertaze i jedne invertaze ćelijskog zida (Cluster-14775.100229 – Rs_129413, Cluster-14775.61851 – Rs_174460). Tri saharoza sintaze (Rs_93795, Rs_35712, Rs_35714), važne za razgradnju saharoze tokom razvijanja semena, posebno kasne faze, bile su više zastupljene u HL nego u DL, dok je jedna (Rs_35713) bila više zastupljena u DL nego u HL.

2.2.4 Promene u proizvodnji energije u ćelijama listova

2.2.4.1 Glikoliza

Geni koji kodiraju enzime za početne i ključne korake glikolize, kao što su fosfofruktokinaza i fosfoglukomutaza, bili su diferencijalno eksprimirani u HL i DL. Četiri od 11 DEG koji kodiraju fosfoglukomutazu bili su indukovani desikacijom, kao i 11 od 12 DEG koji kodiraju fosfofruktokinazu (prilog 3). Sva tri DEG koja kodiraju piruvat-kinazu bila su povećana u DL. Nasuprot tome, dve piruvat-kinaze bile su manje akumulirane u DL nego u HL (Rs_171713 i Rs_205284; prilog 4). Desikacija je takođe povećala samo 9 od 29 DEG za fosfoenolpiruvat-karboksilazu (PEPK), koja je uključena u nastajanje oksaloacetata (OAA) iz fosfoenolpiruvata (PEP), prekursora malata u CAM fotosintezi. Takođe, tri PEPK izoforme bile su za 40–60 % manje akumulirane u DL nego u HL (prilog 4).

2.2.4.2 Fermentacija

Zastupljenost jedne aldehyd-dehidrogenaze (ALDH) uključene u fermentaciju, kao i detoksikaciju i antioksidativnu zaštitu bila je povećana dva puta u DL (prilog 4). Takođe, 21 od 40 DEG za alkohol-dehidrogenazu (ADH) i 26 od 38 DEG koji kodiraju ALDH su bili značajno povećani u DL u poređenju sa HL (prilog 4).

2.2.4.3 Pentozofosfatni put

Broj DEG koji kodiraju 6-fosfoglukolaktonsku dehidrogenazu (sedam od osam izoformi) i 6-fosfoglukonatnu dehidrogenazu (šest od devet) bio je veći u DL nego u HL. Osam od 21 transkripta koji kodiraju glukozo-6-fosfat-1-dehidrogenazu bilo je indukovano desikacijom (prilog 4). Desikacija je indukovala akumulaciju transketolaze (Rs_169964) i njenih transkripata (prilog 4), uključenih u ne-oksidativni deo pentozofosfatnog puta. Konkretno, polovina gena koji kodiraju različite transketolaze indukovana je desikacijom (prilog 3).

2.2.4.4 Ciklus trikarboksilnih kiselina (CTK)

Većina DEG koji kodiraju enzime ciklusa CTK bila je indukovana desikacijom (72 %). Posebno su se istakli, fumaraza (sve izoforme), kompleksi 2-oksoglutarat dehidrogenaze (sve detektovane izoforme) i sukeinat dehidrogenaza (16 od 21 izoforme, prilog 3). Međutim, desikacija nije indukovala enzime uključene u CTK (prilog 4), ali je primećena povećana akumulacija karboanhidraze (Rs_131324), čiji su transkripti bili blago sniženi. Pored toga, dve mitohondrijske malat-dehidrogenaze (Rs_28856 i Rs_24043) bile su manje zastupljene u DL u poređenju sa HL, iako nivoi njihovih transkripata nisu bili promenjeni (prilozi 3 i 4).

Od sedam DEG koji kodiraju CS, koja predstavlja prvi i ograničavajući enzim CTK, četiri su bila više eksprimirana u DL (prilog 3), dok je samo jedna izoforma pronađena među DAP i njen nivo je bio blago veći u HL (prilog 6). Paralelno sa ovim rezultatima, pokazana je i slabo povećana *in vitro* aktivnost endogene CS u sDL.

2.2.4.5 Mitohondrijski elektronskog transportni (MET) lanac

Samo tri DAP, koji su deo mitohondrijskog elektronskog transportnog (MET) lanca (F1 subjediniče za dve ATPaze i deokuplujući protein) pronađena su u listovima biljke *R. serbica*, i sva tri su bila manje zastupljena u DL (slika 8). Nivoi ekspresije većine DEG koji kodiraju proteine povezane sa kompleksima I-V bili su povećani tokom desikacije (prilog 3). Ekspresija dva gena koji kodiraju deokuplujući protein (Cluster-14775.64964 – Rs_127314 i Cluster-14775.67964 – Rs_148751) bila je smanjena u DL. Gotovo isti broj gena koji kodiraju ATP/ADP i druge mitohondrijske transportere detektovan je u DL i HL.

3.2.4.6 Gluoneogeneza/Gliksalatni ciklus

Geni koji kodiraju proteine koji učestvuju u ovim ciklusima, kao što su piruvat *orto*-difosfat-dikinaza, gliksalatna CS, PEPK i Ala:gliksalat aminotransferaza, uglavnom su bili smanjeni tokom desikacije (prilog 3). Među DAP, samo je jedna identifikovana PEP-karboksikinaza bila blago zastupljenija u HL (prilog 4).

2.2.5 Odgovor antioksidativnog sistema ćelija listova

Desikacija je izazvala značajne promene u genima i proteinima povezanim sa odgovorom na oksidativni stres u listovima srpske ramonde.

2.2.5.1 Opšti antistresni odgovor

Geni koji kodiraju biljne odbrambene proteine i proteine povezane sa opštim odgovorom na stres, kao što su visoka/niska temperatura, desikacija i salinitet bili su diferencijalno regulisani (prilog 3). Na primer, univerzalni protein stresa (Rs_79866) bio je zastupljeniji u HL, dok je cistein-proteaza indukovana niskom temperaturom (Rs_120722) bila više zastupljena u DL (prilog 6). Geni uključeni u biosintezu prolina su bili uglavnom povećani tokom desikacije, poput šest od jedanaest izoformi Δ^1 -pirolin-5-karboksilat sintaze. Zanimljivo, među identifikovanim DEG iz HL i DL, 103 kodiraju razne izoforme POD (prilog 3). Među njima, 58 je bilo smanjeno u DL. Iznenadujuće, nijedna POD nije pronađena među DAP u HL i DL (prilog 4). Devetnaest od 25 DEG koji kodiraju CAT bilo je povećano u DL, dok su samo dve izoforme identifikovane među DAP i obe su bile manje zastupljene u DL. Pored toga, većina DEG koji kodiraju askorbat-oksidade su bili smanjeno ekspresirani tokom desikacije (prilog 3).

2.2.5.2 Askorbat-glutation (Asc-GSH) ciklus

Asc ima ključnu ulogu u neutralisanju H_2O_2 u okviru Asc-GSH ciklusa. Većina detektovanih DEG koji kodiraju APX, i 58 % od DEG koji kodiraju ostale komponente Asc-GSH ciklusa, bili su smanjeni tokom desikacije (prilog 3). Među identifikovanim DAP, enzimske komponente Asc-GSH ciklusa bile su ili smanjene ili nepromenjene u DL u poređenju sa HL (slika 8 i prilog 7). Slično, broj DEG koji kodiraju glutathion-S-transferaze (GST), peroksiredoksin i tioredoksin su bili i povećani i smanjeni u DL u odnosu na HL. Među DAP, peroksiredoksin, tioredoksin, kao i tiolne peroksidade, i dve GST izoforme su bili manje zastupljeni u DL u poređenju sa HL.

2.2.5.3 Superoksid dismutaze (SOD)

Među identifikovanim DAP, šest izoformi SOD su detektovane. Četiri Cu/Zn-SOD izoforme su bile više zastupljene u DL, što se poklapa sa ekspresijom njihovih gena. Nasuprot tome, MnSOD i FeSOD su bili više akumulirani u HL, a geni koji kodiraju FeSOD su pratili taj obrazac.

2.2.5.4 GLP proteini

Samo dva gena koja kodiraju GLP (Cluster-14775.5494 – Rs_173035; Cluster-14775.5494 – Rs_171415) su identifikovana među DEG i bila su povećana nakon desikacije (prilog 3). Ipak, svih sedam anotiranih GLP proteina u okviru pronađenih DAP je bilo više akumulirano u DL nego u HL (slika 8 i prilog 7). Višestruko poravnanje sekvenci i filogenetska analiza pokazale su visok stepen homologije između ovih sedam GLP indukovanih desikacijom (prilog 8). Štaviše, tri homologna motiva su identifikovana u ovim proteinima, uključujući sva tri domena specifična za GLP.

2.2.5.1 Metabolizam fenolnih jedinjenja

U listovima srpske ramonde najzastupljenija fenolna komponenta bila je katehin, praćen epikatehinom i neidentifikovanim komponentom X337 (apsorpcioni maksimum na 337 nm, prilog 9). Kafena kiselina i hlorogenska kiselina (estar hininske i kafene kiseline) su predstavljali najzastupljenije hidroksicimetne kiseline, dok su koncentracije oba flavon-3-ola, kvercetina i kampferola, bile slične. Tokom desikacije, ukupni sadržaj identifikovanih fenola bio je 40 % veći u DL u poređenju sa HL, dok se jedina statistički značajna akumulacija odnosila na komponentu X337 (prilog 9).

Što se tiče DEG koji kodiraju gene uključene u šikimatni, fenilpropanoidni i flavonoidni put, skoro svi su bili manje eksprimirani u DL (prilog 3). Slično, među identifikovanim DAP, 2-hidroksi-izoflavanon-dehidrataza (Rs_10942) je bila manje zastupljena, dok je antocijanidin-3-O-glukoziltransferaza (Rs_14592) bila više akumulirana u DL nego u HL (prilog 4).

Zanimljivo je da je čak pet PPO izoformi bilo više zastupljeno u listovima srpske ramonde nakon desikacije u poređenju sa HL (slika 8, prilog 4). Ovaj rezultat podržava i povećana aktivnost PPO ekstrahovanih iz desikovanih listova srpske ramonde. Maksimalna *in vitro* aktivnost PPO izmerena je u DL. Međutim, geni koji kodiraju ove enzime bili su više eksprimirani u HL, nego u DL (11 od 12, prilog 4).

2.2.6 Uticaj desikacije na LEA proteine iz listova

Kvantitativna *TMT* proteomska analiza je potvrdila povećanu akumulaciju LEA proteina u desikaciji (tabela 3). Ukupno 26 LEA proteina je anotirano, od kojih je 22 bilo više zastupljeno tokom desikacije. Bioinformatički je predviđeno da se oni nalaze uglavnom u jedru, hloroplastima i mitohondrijama. Proteinskoj porodici LEA4 je pripadalo 18 proteina, dok su dva bila dehidrini, a jedan je pripadao proteinskoj grupi LEA1. Tri člana LEA2 grupe i jedan član proteina sazrevanja semena (eng. *seed maturation proteins*, SMP), sedme grupe LEA proteinske porodice, su bili manje zastupljeni u DL nego u HL (tabela 3). Posebno se istakao protein Rs_3451 (RsLEA30), koji pripada LEA4 grupi, za koji je pokazan dvostruki porast zastupljenosti.

Tabela 3. Diferencijalno zastupljeni LEA proteini u srpskoj ramondi tokom desikacije.

LEA podgrupa	Rs_kod	log ₂ (DL/HL)	Unutraćelijska lokalizacija*
LEA1.3	Rs_170082	1,6	jedro
LEA2.2	Rs_151841	-1,3	jedro
LEA2.2	Rs_70056	-1,4	hloroplasti, citoplazma
LEA2.2	Rs_70057	-1,6	citoplazma
LEA4.3	Rs_139539	2,3	hloroplasti, mitohondrije
LEA4**	Rs_191445	2,3	mitohondrije
LEA4.3	Rs_67538	2,1	hloroplasti
LEA4**	Rs_121834	2,1	mitohondrije
LEA4.3	Rs_136891	2,0	jedro
LEA4.3	Rs_3451	2,0	hloroplasti
LEA4.3	Rs_67537	1,9	jedro
LEA4.3	Rs_67210	1,9	jedro, mitohondrije
LEA4.3	Rs_67211	1,7	mitohondrije
LEA4.3	Rs_67212	1,7	mitohondrije
LEA4.3	Rs_67539	1,6	hloroplasti
LEA4.3	Rs_205247	1,6	hloroplasti
LEA4.3	Rs_205105	1,6	hloroplasti
LEA4.3	Rs_52085	1,5	mitohondrije
LEA4.3	Rs_140058	1,4	jedro
LEA4**	Rs_187459	1,4	mitohondrije, jedro
LEA4**	Rs_67929	1,4	citoplazma
LEA4.2	Rs_108587	1,4	jedro, mitohondrije
LEA4**	Rs_165950	1,3	jedro
DEH**	Rs_194906	1,3	jedro
DEH1	Rs_107018	1,3	jedro, mitohondrije
SMP	Rs_104365	-1,6	jedro, citoplazma

* Predviđena unutarćelijska lokalizacija. ** LEA proteini kraći od 100 aminokiselina nisu klasifikovani u podgrupe.

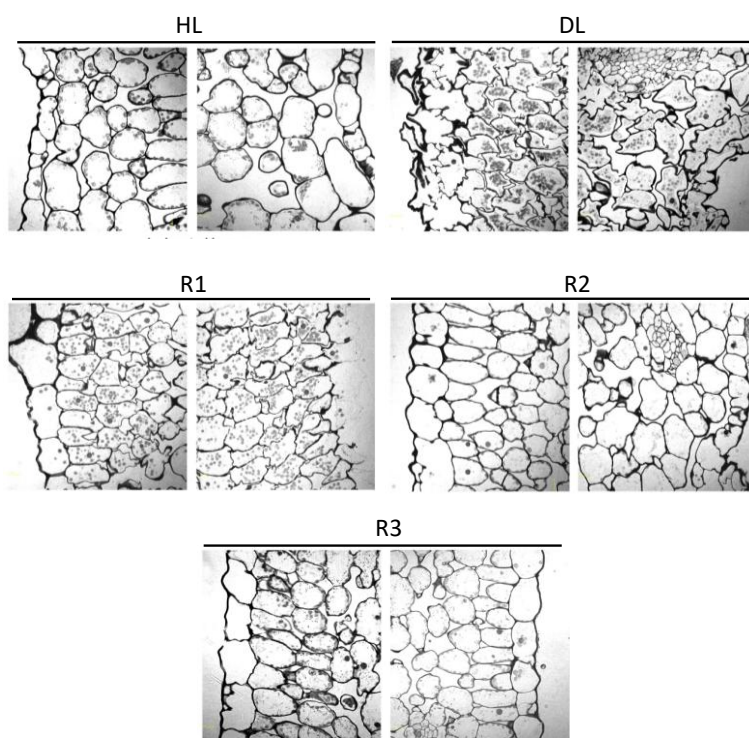
2.3 Odgovor komponenti ćelijskog zida listova srpske ramonde na desikaciju i oporavak

2.3.1 Histološke promene

Mikroskopska analiza poprečnih preseka tkiva lista, pomoću bojenja toluidinskim plavim omogućila je identifikaciju morfoloških razlika između hidratizanih (HL), desikovanih (DL) i listova u različitim fazama rehidracije (R1, R2, R3). U slučaju HL, ćelije pokazuju tipičnu fiziološku organizaciju: dominira velika centralna vakuola koja potiskuje citoplazmu i hloroplaste koji se uočavaju kao sive sferne strukture, ka periferiji ćelije (slika 12).

Nasuprot tome, presek tkiva u stanju desikacije (DL) otkriva smanjenu zapreminu ćelija deformisanog, stišnjenog oblika, sa naboranim ćelijskim zidovima i plazma membranama. Posebno je značajno da na presecima DL nisu uočeni prekidi u kontinuitetu, niti pukotine u ćelijskom zidu, što ukazuje na očuvanje njegovog integriteta.

Tokom procesa rehidracije i oporavka, uočava se postepena restitucija ćelijske arhitekture. Već nakon jednog sata (R1), vakuola počinje da raste, čime se zapremina ćelije postepeno povećava. Do kraja perioda od 48 sati (R3), ćelije mezofila u potpunosti vraćaju svoju prvobitnu zapreminu i turgor, a hloroplasti se redistribuiraju u svoje inicijalne periferne pozicije (Slika 12).



Slika 12. Histološke promene ćelija listova srpske ramonde, detektovane bojenjem toluidinsko-plavim. Prikazane su po dve reprezentativne biološke replike snimljene za HL, DL, R1, R2, i R3.

2.3.2 Diferencijalno eksprimirani geni koji kodiraju proteine

Analiza transkriptoma otkrila je dinamične promene u ekspresiji gena odgovornih za arhitekturu ćelijskog zida. Pektin-metilesteraze (PME) modifikuju ćelijski zid procesom demetilesterifikacije pektina. U listovima srpske ramonde identifikovano je 27 DEG koji kodiraju PME i 45 DEG koji kodiraju njihove inhibitore (PMEI; prilog 3). Od toga je u desikovanim listovima pokazan porast ekspresije 13 PME gena i tri PMEI gena. Pored toga, geni koji kodiraju pektin-liazu (PL) i poligalakturonaze (PG) su bili specifično regulisani pre i posle desikacije. Svi transkripti koji kodiraju celuloza-sintazu su bili niže eksprimirani u DL nego u HL (prilog 3). Takođe, jedanaest od dvanaest DEG koji kodiraju ekspanzine bilo je smanjeno čak 4–8 puta u DL.

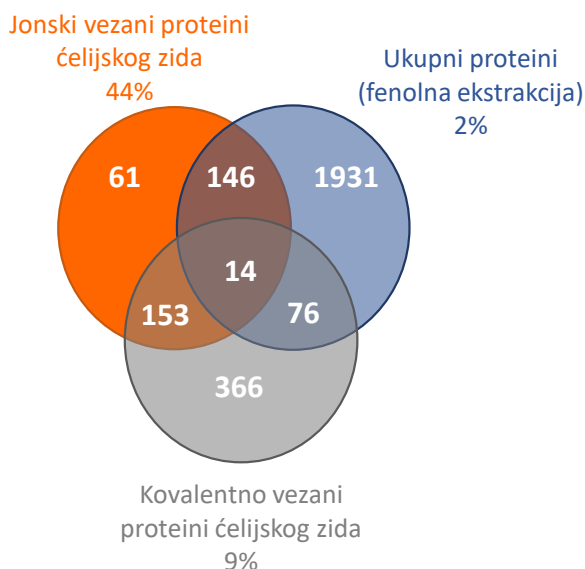
DEG koji kodiraju strukturne proteine ćelijskog zida, odnosno svi koji kodiraju proteine nalik na ekstenzine, proteine koji sadrže ponovke bogate leucinom, kao i šest glikoproteina bogatih hidroksiprolinom su bili smanjeno eksprimirani u DL, u odnosu na HL (prilog 4). Među genima koji kodiraju strukturne proteine ćelijskog zida najizraženiji pad ekspresije (8–10 puta) u DL zabeležen je kod proteina ćelijskog zida bogatih prolinom. Nasuprot ovoj opštoj supresiji, dva proteina bogata glicinom (Rs_28695 i Rs_140483) su bila značajno više zastupljena tokom desikacije (prilog 6).

2.3.3 Diferencijalno zastupljeni proteini ćelijskog zida

2.3.3.1 Optimizacija izolovanja proteina ćelijskog zida

U cilju postizanja maksimalne pokrivenosti proteoma ćelijskog zida (tzv. *cell wall proteome*), u ovoj studiji su primenjena dva pristupa ekstrakcije proteina iz listova srpske ramonde: izolovanje ukupnih ćelijskih proteina (fenolna ekstrakcija) i izolovanje frakcija obogaćenih komponentama ćelijskog zida, iz kojih su sukcesivno ekstrahovani jonski i kovalentno vezani proteini ćelijskog zida.

Proteomskom analizom ekstrakta ukupnih ćelijskih proteina identifikovano je 2167 proteina. Međutim, bioinformatička analiza pomoću *TargetP* softvera pokazala je da samo 44 identifikovana proteina (2 %) sadrže signalni peptid i pripadaju apoplastnom prostoru, dok su ostatak činili proteini drugih ćelijskih organela.



Slika 13. Poređenje efikasnosti različitih protokola za izolovanje proteina ćelijskog zida srpske ramonde. Procenti predstavljaju udeo detektovanih proteina sa predviđenim signalnim peptidom za apoplast (*TargetP*), u odnosu na ukupan broj identifikovanih proteina u datoj frakciji.

Iako je iz frakcija obogaćenih ćelijskim zidom identifikovano 374 proteina, znatno veća specifičnost postignuta je ovim pristupom. Detaljnom *TargetP* analizom i manuelnim filtriranjem, potvrđeno je da 158 (44 %) ovih proteina pripada grupi jonski vezanih proteina ćelijskog zida (slika 13). Kako bi se proteomska mapa upotpunila i proteinima koji su kovalentno vezani za ćelijski zid, preostali talog (nakon ekstrakcije jonski vezanih proteina) je tretiran direktno tripsinom (on-matrix digestion), kako bi se digestovali dostupni proteinski regioni. Tom prilikom je identifikovano dodatnih 609 proteina koji nisu bili prisutni u jonski vezanoj frakciji, a od njih je samo 55 (9 %) novoidentifikovanih proteina zapravo pripadalo ćelijskom zidu prema *TargetP* analizi. Međutim, iako se ovo može smatrati značajnim za razumevanje ćelijskog zida, uočeno je veliko variranje identifikovanih proteinskih grupa, posebno u preostalom delu identifikovanih

proteina koji je predstavljao nasumične protoplastne kontaminante oslobođene nakon tripsinizacije taloga.

Na osnovu prikazanih rezultata optimizacije dobijanja proteinskih ekstrakata jednog uzorka, zaključeno je da je najefikasniji pristup za sve eksperimentalne grupe izolovanje frakcija obogaćenih ćelijskim zidom, uz fokus na jonski vezane proteine.

Pre finalne analize dobijenog proteoma, sprovedena je stroga filtracija identifikovanih proteina u cilju eliminacije unutarćelijskih kontaminanata. Proteini koji ne pripadaju ćelijskom zidu i apoplastu isključeni su na osnovu tri komplementarna kriterijuma:

- Prisustvo signalnog peptida: korišćen je *TargetP* softver za identifikaciju sekvenci koje usmeravaju proteine u sekretorni put;
- Homologija sekvence: analiza homologije sa poznatim apoplastnim proteinima omogućila je zadržavanje onih proteina kod kojih signalna sekvenca možda nije detektovana usled nepotpunih sekvenci ili tehničkih ograničenja pri identifikaciji;
- Funkcionalna anotacija: Korišćene su baze podataka eksperimentalno potvrđenih proteina ćelijskog zida (za detalje videti poglavlje 4.2.13). Ovakvim pristupom su iz skupa proteina koji se dalje obrađuju isključeni proteini koji sigurno ne pripadaju ćelijskom zidu, a pojavili su se kao kontaminacija u ovim ekstraktima (npr. citrat-sintaza, citohrom *c* oksidaza, histoni), čime je značajno povećana pouzdanost statističke analize i biološka relevantnost dobijenih rezultata.

2.3.3.2 Identifikacija i kvantifikacija proteina pomoću ekstrahovanih jonskih hromatograma (XIC)

Za preciznu kvalitativnu i kvantitativnu analizu peptida i proteina primenjena je metoda ekstrahovanih jonskih hromatograma (eng. *extracted ion chromatogram*, XIC) koja se odlikuje visokom preciznošću.

Tabela 4. Broj dobijenih *m/z* vrednosti, peptida i proteina nakon svakog koraka XIC obrade.

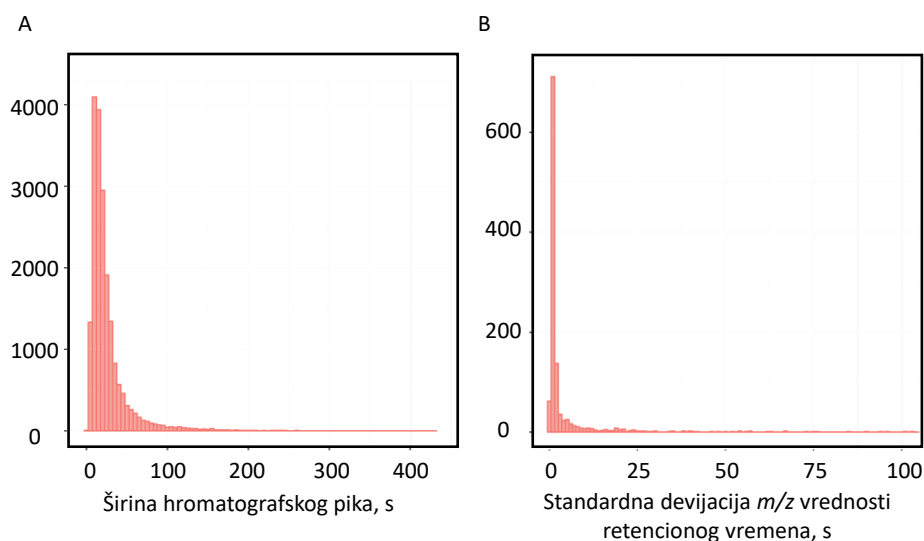
Korak u obradi rezultata	Broj <i>m/z</i> vrednosti	Broj peptida	Broj proteina
Početni broj	9399	8690	2812
Uklanjanje proteina koji ne pripadaju ćelijskom zidu	1221	1145	358
Filtriranje 1 ^a	1149	1091	357
Filtriranje 2 ^b	1092	1039	355
Filtriranje 3 ^c	1077	1025	354
Filtriranje 4 ^d	709	709	278
Normalizacija vrednosti ^e	709	709	278
Filtriranje 5 ^f	322	322	182
Filtriranje 6 ^g	148	148	54
Filtriranje 7 ^h	148	148	54

U procesu kontrole kvaliteta izbačene su *m/z* vrednosti: ^a sa širinom hromatografskog pika većom od 200 sekundi u bilo kom uzorku; ^b sa standardnom devijacijom retencionog vremena većom od 20 s; ^c sa retencionim vremenima između 0 i 850 s; ^d povezane sa proteinima koji nemaju identifikovane jedinstvene peptide; ^e metod normalizacije se bazira na medijani svih intenziteta; ^f koje predstavljaju proteine koji se javljaju samo u 25 % uzoraka unutar definisanih grupa; ^g koje nemaju minimalan koeficijent korelacije od 0,5 sa peptidima koji su dodeljeni istom proteinu; ^h koje predstavljaju proteine kvantifikovane sa manje od dva jedinstvena peptida.

Inicijalno je identifikovano 9399 m/z vrednosti koje odgovaraju skupu od 2812 proteina. Nakon prethodno opisanog uklanjanja proteina koji ne pripadaju ćelijskom zidu, urađena je rigorozna kontrola kvaliteta podataka, kroz nekoliko faza filtriranja na osnovu hromatografskih parametara, normalizacija i odbacivanje nepouzdatih peptida (tabela 4, filteri 1-7).

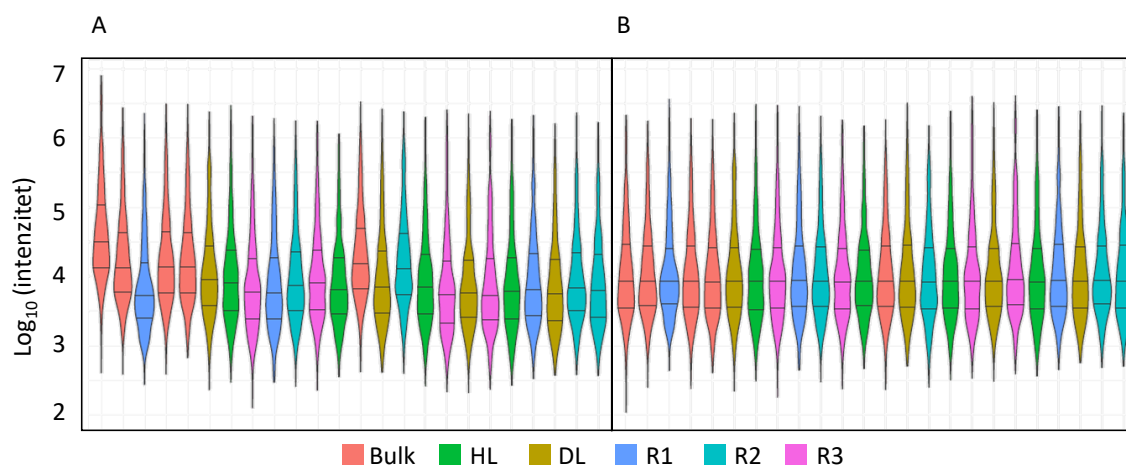
Na osnovu rezultata prikazanih na slici 14A, uočava se da je širina hromatografskih pikova većine peptida iznosila oko 20 s, što predstavlja optimum pri primenjenim hromatografskim uslovima. Zanimljivo mali broj pikova sa većom širinom ukazuje na to da je većina peptida bila efikasno eluirana sa kolone.

Slika 14B pokazuje da je primenjeno poravnanje retencionog vremena bilo izuzetno efikasno. Ovakav rezultat potvrđuje visoku reproduktivnost sistema, odnosno ukazuje na to da tokom hromatografskog razdvajanja nije došlo do značajnih pomeranja retencionih vremena između uzoraka i tehničkih replikata (tzv. „bulks“).



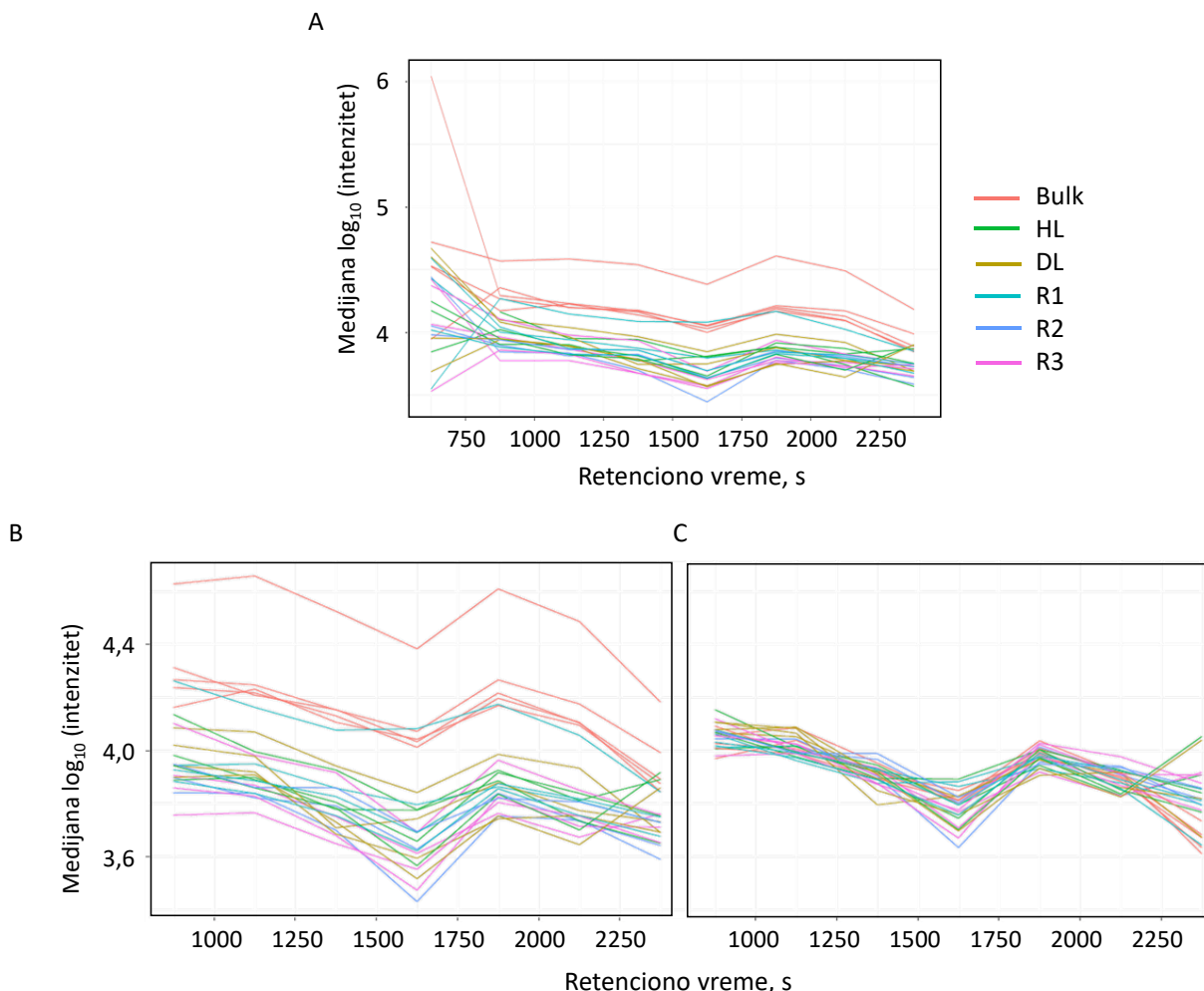
Slika 14. Distribucija širina hromatografskog pika (A) i standardne devijacije retencionog vremena (B).

Medijana jonskih intenziteta početnih podataka je varirala između različitih uzoraka (slika 15A), što ukazuje na razlike u ukupnoj količini proteina u različitim uzorcima, uprkos primeni veoma osetljivih metoda za određivanje koncentracije proteina. Nakon sprovedene normalizacije (metodom medijane), jonski intenziteti uzoraka su uspešno izjednačeni (slika 15B).



Slika 15. Medijana jonskih intenziteta pre (A) i nakon (B) normalizacije. *Bulk* uzorak je sadržao po 10 μL svakog uzoraka.

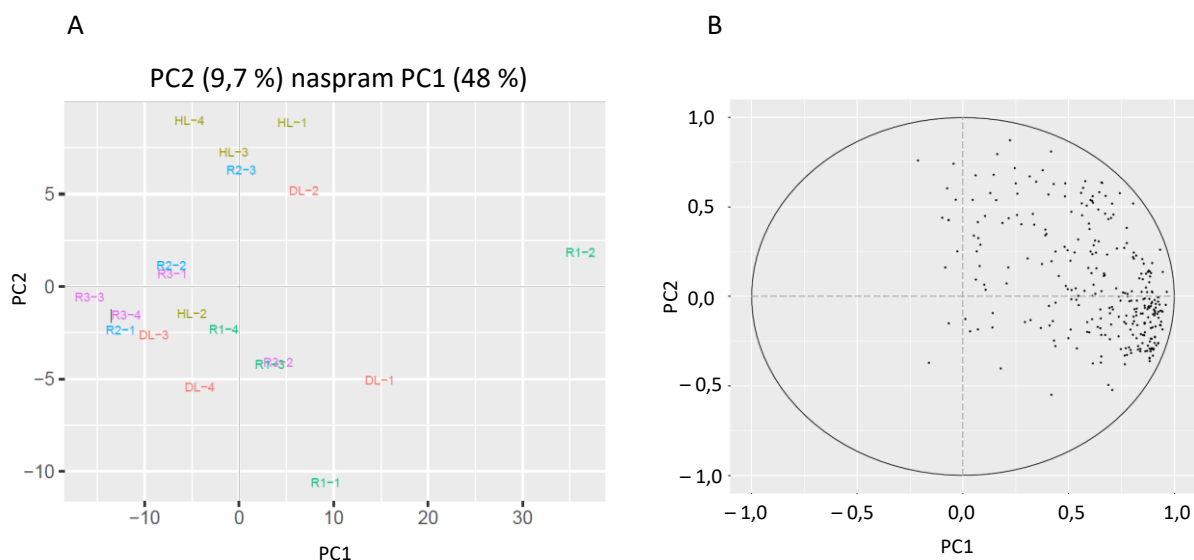
Takođe, profil medijane intenziteta MS hromatograma po retencionim vremenima je bio uniforman između uzoraka, počev od 850 s (slika 16A). Vrednosti m/z čija su retencionna vremena pripadala segmentu 0–850 s uklonjene su tokom procesa filtriranja (Filter 3; slika 16B i C).



Slika 16. Profil medijane intenziteta MS hromatograma pre (A) i nakon (B) filtriranja (filter 3), kao i nakon normalizacije (C).

Kako bi se stekao uvid u profil i sadržaj proteina između različitih eksperimentalnih grupa (HL, DL, R1, R2, i R3 za više detalja videti poglavlje 4.2.13) urađena je preliminarna analiza glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis*, PCA) sa početnim rezultatima. Dobijene razlike se mogu prikazati kroz dve PC ose (slika 17).

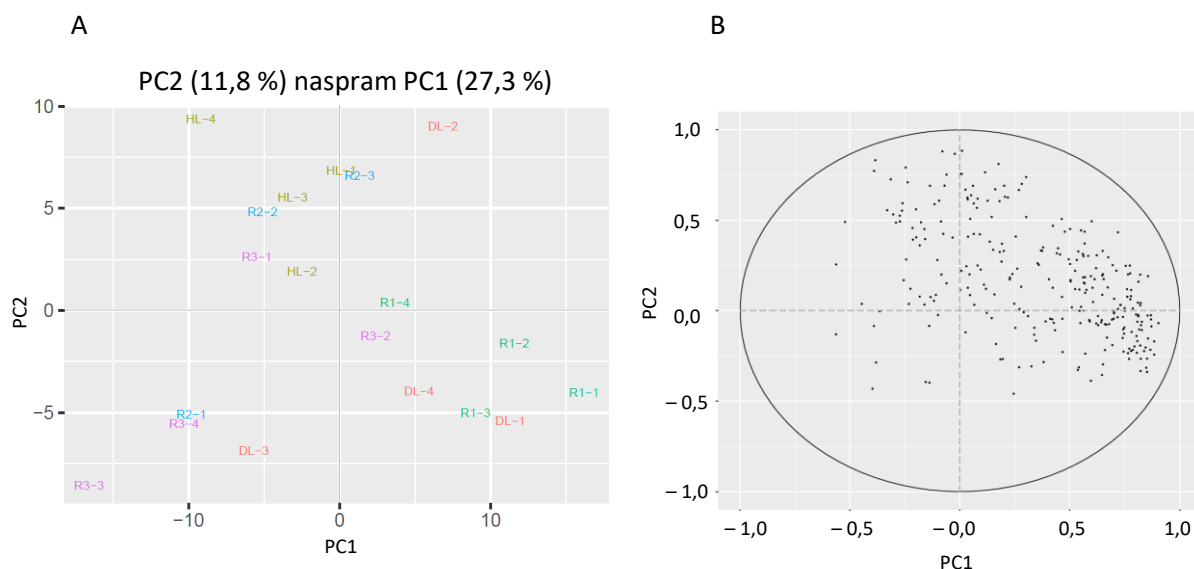
Prva glavna komponenta (PC1) obuhvata 48 % ukupne varijanse (slika 17A). Većina m/z vrednosti bila je koncentrisana na periferiji desnog kvadranta, što dodatno potvrđuje varijacije u ukupnom proteinskom opterećenju pre normalizacije. Inicijalni PCA grafik nije ukazao na grupisanje uzoraka po eksperimentalnim fazama, otkrivajući značajnu varijabilnost između bioloških replika. Ova varijabilnost se može pripisati različitoj fiziološkoj istoriji i starosti jedinki, budući da je biljni materijal prikupljan sa prirodnog staništa (slika 17B). Takođe, na PCA grafiku nisu identifikovane ekstremne vrednosti (eng. *outliers*), koje bi zahtevale isključenje iz dalje obrade.



Slika 17. Inicijalna analiza glavnih komponenti nakon uklanjanja proteina koji ne pripadaju ćelijskom zidu (292 *m/z* vrednosti). PCA grafik (A) i pripadajući korelacioni krug (B).

Nakon normalizacije, ponovo urađena PCA analiza sa 169 *m/z* vrednosti pokazala je bolju distribuciju podataka po korelacionom krugu (slika 18). PC1 i PC2 zajedno obuhvataju 39 % ukupne varijanse, pri čemu je prva komponenta primarno odgovorna za razdvajanje HL i DL grupa uzoraka (slika 18A). Uprkos normalizaciji, uočeno je preklapanje profila uzoraka HL i R3, kao i DL i R1, dok je grupa R2 zauzela intermedijarnu poziciju (slika 18B).

Iz tog razloga, a u cilju povećanja statističke snage analize, u daljoj obradi su spojeni uzorci HL i R3 (potpuni oporavak, 48 h), kao i DL i R1 (faza desikacije i inicijalne rehidratacije, 1 h). Grupa R2 (24 h) ostavljena je kao nezavisna kako bi se precizno pratila dinamika procesa oporavka. Ovo redefinisane grupa omogućilo je rad sa većim brojem uzoraka po kategoriji ($n=8$ za DL i HL), čime je značajno povećana pouzdanost detekcije diferencijalno zastupljenih proteina.



Slika 18. Analiza glavnih komponenti nakon normalizacije urađena sa 169 *m/z* vrednosti, PCA grafik (A) i pripadajući korelacioni krug (B).

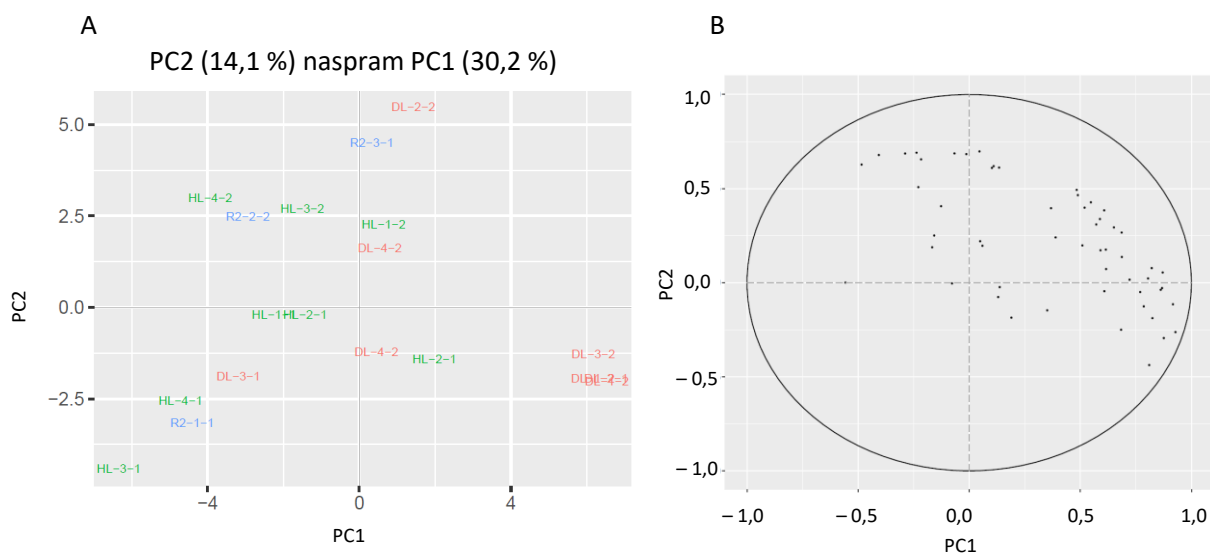
Primenom filtera 5 nakon normalizacije, izbačene su *m/z* vrednosti koje predstavljaju peptide proteina identifikovane u manje od 25 % uzoraka unutar definisanih grupa (HL, DL i R2). Ovim

rigoroznim kriterijumom filtriranja izbačeno je više od 60 % proteina, čime je osigurano da se dalja analiza fokusira isključivo na visokopouzdanje signale.

Zbog inherentne ograničenosti masene spektrometrije u detekciji svih jona koji istovremeno izlaze iz izvora, česta je pojava nedostajućih vrednosti (eng. *missing values*) koje se imputiraju u uzorku u kom nisu identifikovane. Kako bi se ovaj problem prevazišao, primenjen je proces imputacije, korišćena je k-NN metoda (eng. *k-nearest neighbors*) na nivou peptida. Ovaj algoritam procenjuje nedostajuće intenzitete na osnovu profila korelacije sličnih peptida, čime je omogućeno zadržavanje biološki značajnih proteina u daljoj statističkoj obradi.

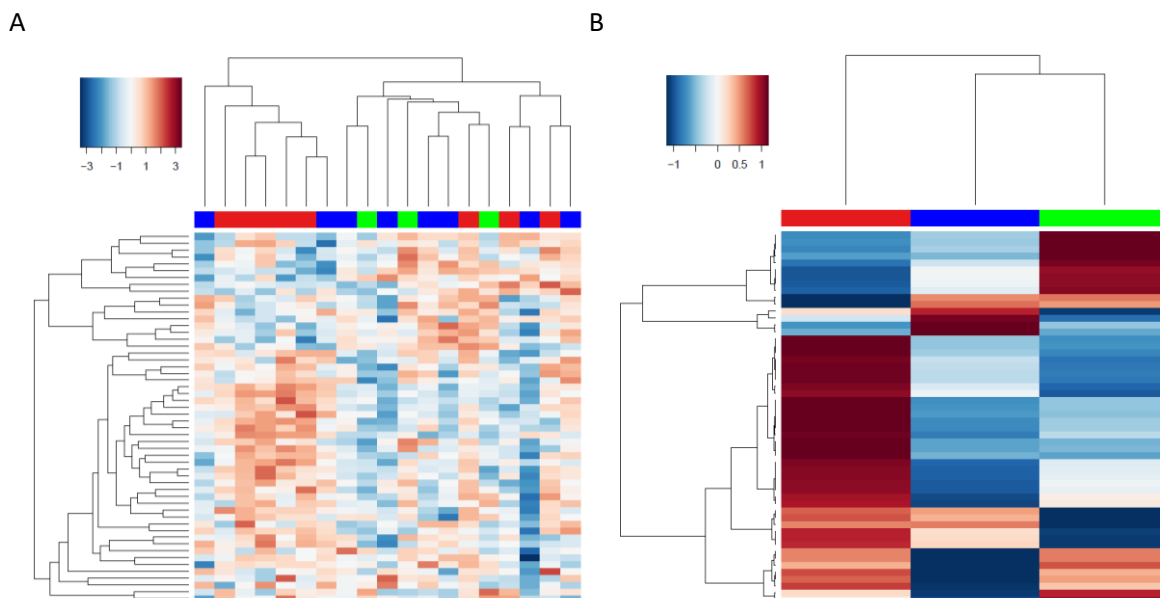
Nakon sprovedenog filtriranja i imputacije, finalni set podataka koji je obuhvatio 54 proteina podvrgnut je PCA analizi kroz sva 24 uzorka. S obzirom na to da eksperimentalni dizajn uključuje grupu sa tri biološka ponavljanja (R2 uzorak, gde je prag detekcije statistički strožiji), imputacija je bila neophodan korak za prevazilaženje problema nedostajućih vrednosti. Bez ovog koraka, značajan broj proteina bi bio eliminisan, dok je na ovaj način omogućena robusna multivarijantna analiza i jasna vizuelna diferencijacija uzoraka na osnovu njihovih proteomskih profila.

Ipak, uprkos primenjenim metodama, finalna PCA analiza ovih 54 proteina ukazuje na relativno diskretne razlike između tri ispitivane grupe (HL, DL i R2), uz uočljivo preklapanje profila većine uzoraka (Slika 19), što može ukazati na to da su promene u proteomu ćelijskog zida tokom ovih faza veoma suptilne ili lokalizovane na specifične izoforme proteina.



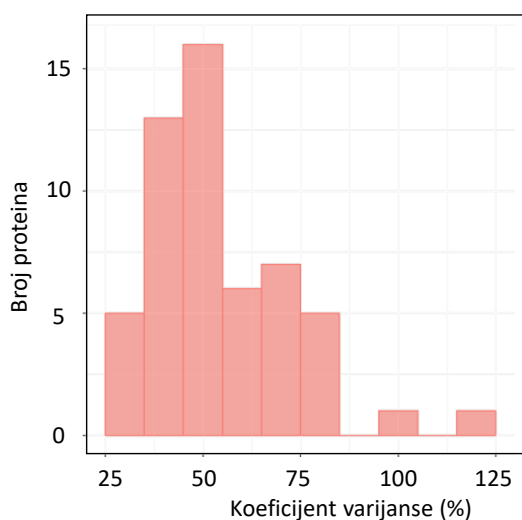
Slika 19. Analiza glavnih komponenti nakon celokupne obrade podataka XIC metodom. PCA grafik (A) i pripadajući korelacioni krug (B).

Znatno precizniji uvid u promene proteoma dobija se nakon primene hijerarhijskog klasterovanja i vizuelizacije diferencijalne zastupljenosti proteina između tri eksperimentalne grupe (Slika 20). Toplotna mapa (eng. *heat map*) jasno generiše klastere proteina sa sličnim obrascima promene, pri čemu je uočljivo da je većina identifikovanih proteina bila značajno više zastupljena u stanju desikacije (DL). Među proteinima čija je zastupljenost porasla u DL, posebno se izdvajaju ključni faktori za remodelovanje zida i odbranu od oksidativnog stresa, kao što su specifične peroksidaze, mirakulin, serin-karboksiptidaze, kao i članovi familije α/β hidrolaza.



Slika 20. Hijerarhijsko klasterovanje i toplotna mapa (eng. *heat map*) diferencijalno zastupljenih proteina dobijenih XIC obradom podataka. Prikazano je klasterovanje eksperimentalnih faza (HL, DL i R2) svakog pojedinačnog uzorka (A) i za usrednjene vrednosti po eksperimentalnim fazama (B). Svaki red na slici predstavlja individualni protein dok je svaka kolona set nezavisnih bioloških replikata. Regioni predstavljeni crvenom bojom ukazuju na povećanu relativnu zastupljenost proteina, dok plava boja označava njihov smanjen nivo. Boje iznad kolona predstavljaju: DL (crvena); HL (plava); R2 (zeleni).

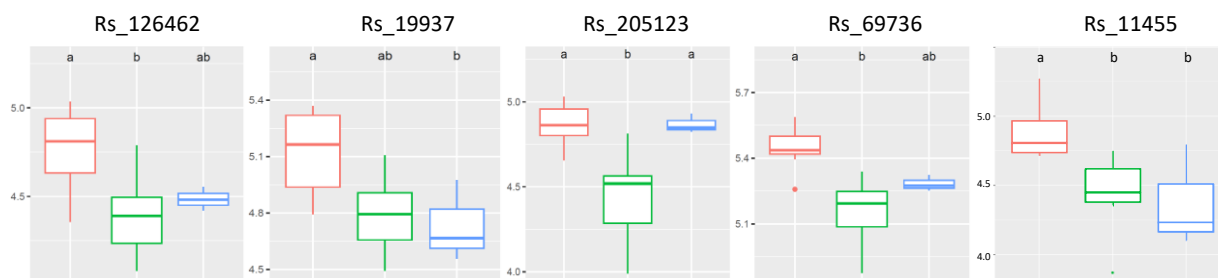
Distribucija koeficijenta varijanse (CV; slika 21) izračunata je na nivou celokupnog eksperimenta kako bi se procenila ukupna varijabilnost proteina kroz sve biološke replike i eksperimentalne grupe. Najveći broj identifikovanih proteina pokazuje CV vrednosti u opsegu od 40% do 60%, što predstavlja prihvatljiv nivo biološke i tehničke varijabilnosti, uzimajući u obzir heterogenost uzoraka prikupljenih sa prirodnog staništa. Prisustvo manjeg broja proteina sa visokim koeficijentom varijanse (iznad 100%) sugerise postojanje proteina čija je zastupljenost izrazito heterogena ili podložna većim fluktuacijama u merenju.



Slika 21. Distribucija koeficijenta varijanse (XIC metod).

Kako bi se iz finalnog seta od 54 proteina odabrali oni sa statistički značajnom razlikom u zastupljenosti u zavisnosti od sadržaja vode u listovima ($|\log FC| \geq 1,5$), korišćena je jednofaktorska ANOVA, praćena *Tukey HSD post hoc* testom ($p < 0,05$).

Ovom rigoroznom selekcijom identifikovano je pet diferencijalno zastupljenih proteina (slika 22, tabela 5): dva LEA4 proteina (Rs_205123 i Rs_69736), bazni 7S globulin (Rs_11455), protein nalik lizozomalnoj β -glukozidazi (Rs_19937), kao i protein nalik α -galaktozidazi (Rs_126462; tabela 5). Svi diferencijalno zastupljeni proteini su bili povećani u DL u odnosu na HL srpske ramonde, izuzev Rs_19937 koji je bio više zastupljen u DL u odnosu na R2.



Slika 22. Diferencijalno zastupljeni proteini dobijeni XIC metodom. DL, crvena; HL, zelena; R2, plava.

Tabela 5. Diferencijalno zastupljeni proteini prethodno izolovanih frakcija ćelijskog zida

Rs broj	Opis	Identifikovana sekretorna signalna sekvenca
Rs_11455	bazni 7S globulin	Da
Rs_19937	protein nalik lizozomalnoj β -glukozidazi	Da
Rs_69736	LEA protein D-29	Da
Rs_126462	protein nalik α -galaktozidazi	Da
Rs_205123	LEA protein D-29, izoforma X3	Da

2.3.3.3 Analiza dobijenih rezultata metodom broja spektara (SC)

Pored XIC pristupa, primenjena je metoda broja spektara (eng. *Spectral Counting*, SC), kao semikvantitativni pristup koji procenjuje relativnu zastupljenost proteina na osnovu učestalosti masenih spektara (MS/MS) dodeljenih peptidima određenog proteina.

Primena SC metode imala je za cilj identifikaciju dodatnih proteina koji su izostali u XIC analizi. Do ovoga najčešće dolazi usled visokog procenta nedostajućih vrednosti ili nemogućnosti precizne separacije i integracije hromatografskih pikova neophodnih za XIC kvantifikaciju. Dok XIC zahteva visok integritet pika, SC metoda je robusnija u detekciji proteina niže zastupljenosti ili onih sa specifičnim fizičko-hemijskim karakteristikama koje otežavaju hromatografsku obradu.

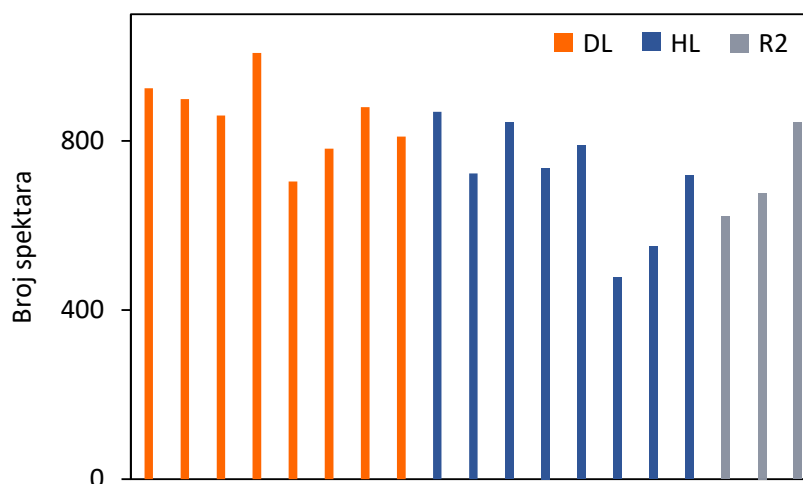
U tabeli 6 je prikazan broj dobijenih proteina nakon svakog sukcesivnog koraka SC analize. Kao i u slučaju XIC pristupa, SC metoda je podrazumevala prethodno uklanjanje proteina koji ne pripadaju ćelijskom zidu, proveru kvaliteta dobijenih podataka, zatim normalizaciju spektralnih vrednosti i na kraju odbacivanje statistički nepouzdatih proteina (tabela 6). Finalno, kako bi se onemogućilo dupliranje rezultata, pre statističke analize iz ovog seta su isključeni proteini koji su bili uspešno identifikovani XIC metodom.

Tabela 6. Broj dobijenih proteina nakon svakog sukcesivnog koraka SC obrade.

Korak u obradi rezultata	Broj proteina
Početni broj	2812
Uklanjanje proteina koji ne pripadaju ćelijskom zidu	371
Normalizacija ^a	371
Filtriranje 7 ^b	176

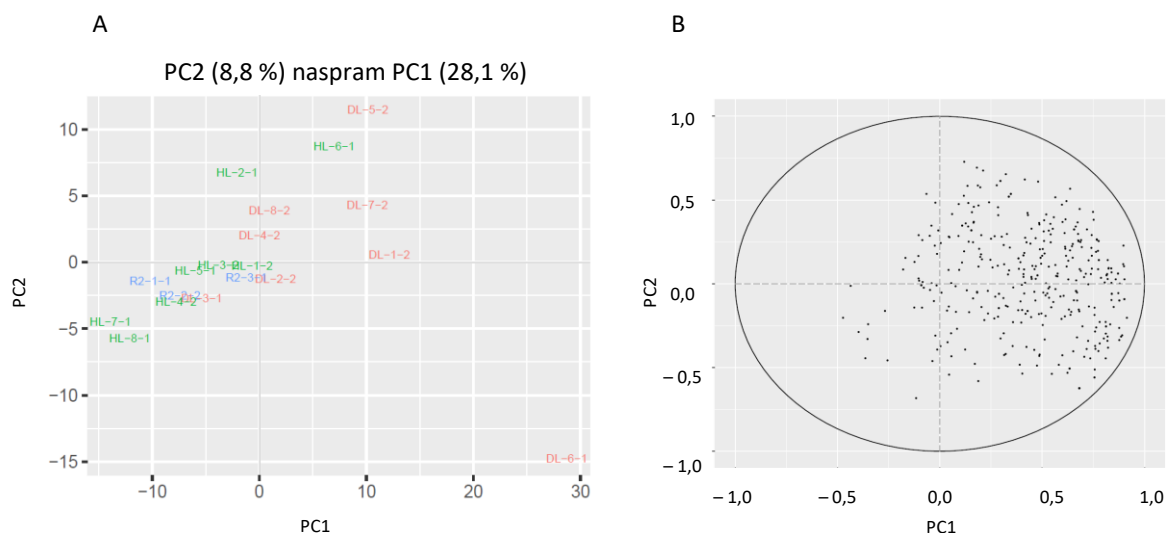
^a Normalizacija je izvršena metodom procentualnog udela spektara u ukupnom broju; ^b Isključivanje identifikovanih proteina sa manje od pet spektara.

Ukupan broj spektara po svakom uzorku prikazan je na slici 23. Slično kao i kod XIC pristupa, i ovde rezultati ukazuju na varijacije u ukupnom broju detektovanih spektara između analiziranih uzoraka. Ova pojava potvrđuje da standardne metode za određivanje koncentracije proteina često ne mogu u potpunosti kompenzovati mikrovarijacije nastale tokom kompleksne pripreme uzoraka ćelijskog zida.



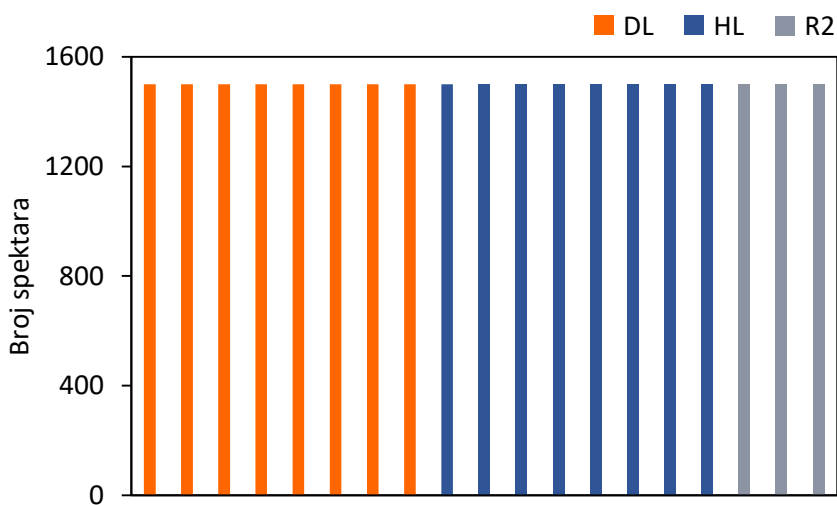
Slika 23. Broj spektara inicijalno dobijenih u svakom od analiziranih uzoraka (SC pristup).

Rezultati PCA analize sirovih podataka (371 protein), grupisanih prema prethodno definisanim i spojenim eksperimentalnim fazama (HL, DL i R2), predstavljeni su na Slici 24. Prva glavna komponenta (PC1) dominantno doprinosi ukupnoj varijansi u poređenju sa drugom komponentom (Slika 24A), pri čemu se uočava jasna tendencija razdvajanja uzoraka iz grupe DL od uzoraka iz grupa HL i R2. Takođe, evidentna je i varijabilnost između bioloških replika, što je očekivana posledica kompleksnosti uzoraka izolovanih iz prirodne populacije. Važno je naglasiti da ni u ovom setu podataka nisu identifikovane statistički značajne ekstremne vrednosti (eng. *outliers*).



Slika 24. Rezultati analize glavnih komponenti (PCA) sprovedene nakon uklanjanja proteina koji ne pripadaju ćelijskom zidu (set od 371 proteina). Prikazano je razdvajanje po prvoj i drugoj komponenti (A) i pripadajući korelacioni krug (B).

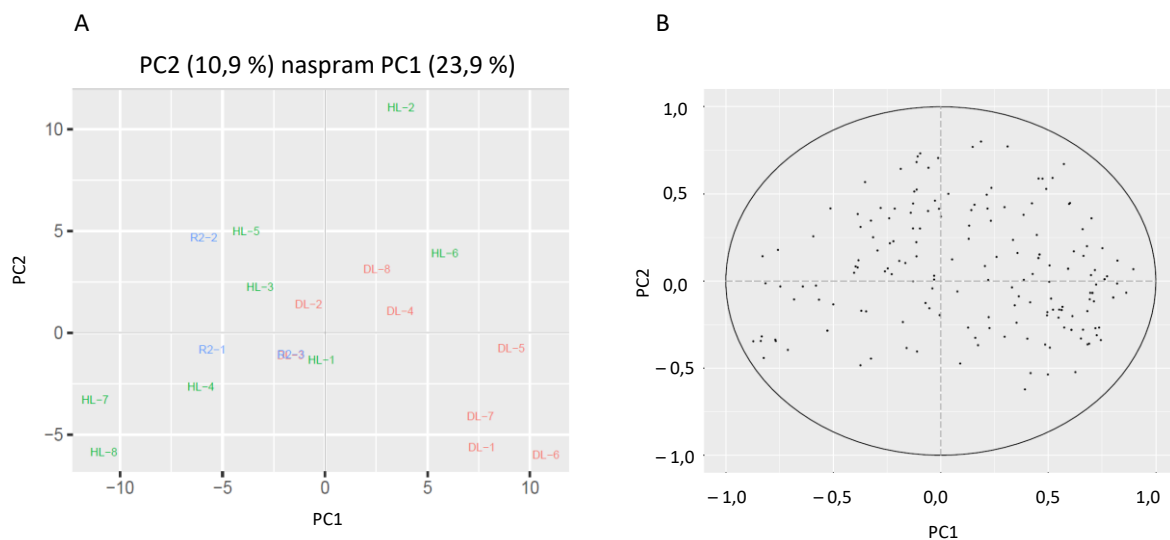
Podaci su normalizovani u odnosu na ukupan broj spektara po uzorku. Konkretno, broj spektara svakog identifikovanog proteina u pojedinačnom uzorku podeljen je sa ukupnim brojem spektara detektovanim u zbirnom uzorku (tzv. *bulk* uzorak), a zatim pomnožen sa 100 (slika 25). Pomenuti *bulk* uzorak formiran je spajanjem alikvota od po 10 μ L svih pojedinačnih uzoraka, čime je stvoren reprezentativni interni standard koji sadrži kompletan proteinski profil celokupnog eksperimenta.



Slika 25. Broj spektara nakon normalizacije podataka (metodom procentualnog udela).

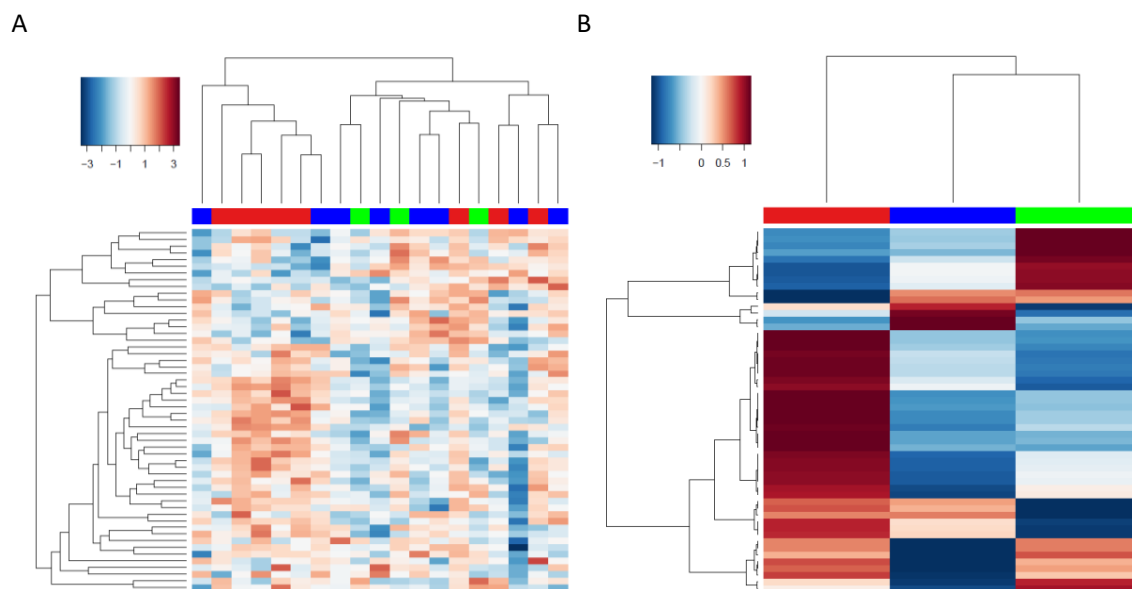
Na slici 26A je prikazan PCA grafik konstruisan na osnovu finalnog seta od 176 proteina preostalih nakon normalizacije i eliminacije onih identifikovanih sa manje od pet spektara (tabela 6). Na PCA dijagramu se sada jasno uočava tendencija grupisanja uzoraka DL duž prve komponente, dok se sa suprotne strane nalaze uzorci koji pripadaju grupama HL i R2.

Nakon primenjene normalizacije i rigoroznog filtriranja, korelacioni krug pokazuje znatno uravnoteženiju raspodelu varijabli. Za razliku od inicijalne analize, tačke (m/z vrednosti/proteini) više nisu dominantno koncentrisane u desnom delu kruga, već su ravnomernije raspoređene ka centralnom i levom području (slika 26B).



Slika 26. Analiza glavnih komponenti nakon normalizacije i rigoroznog filtriranja (set od 176 proteina). Prikaz prostornog rasporeda uzoraka u odnosu na prve dve glavne komponente (A); i pripadajući korelacioni krug (B).

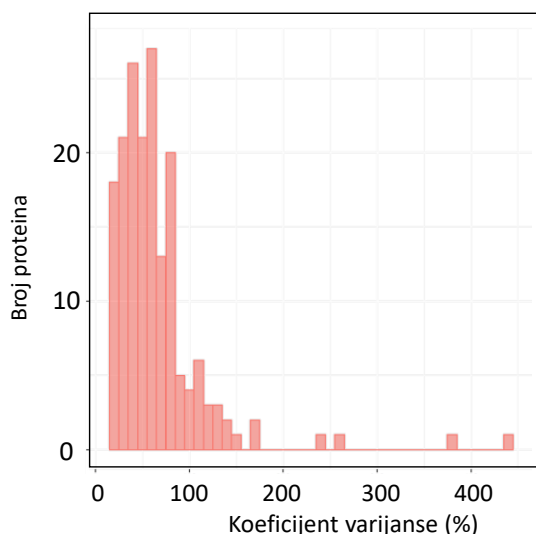
Hijerarhijsko klasterovanje identifikovanih proteina u analiziranim uzorcima (Slika 27) omogućilo je profilisanje proteoma na osnovu sličnosti u obrascima njihove zastupljenosti. Primenom ove metode identifikovani su distinktni klasteri proteina koji pokazuju koordinisan odgovor na promene u sadržaju vode u listu. Zajednički trendovi zastupljenosti proteina u zavisnosti od fiziološkog stanja biljke (HL, DL i R2) vizuelizovani su tzv. toplotnom mapom (Slika 27), koja jasno razdvaja grupe proteina čija je sinteza ili degradacija specifično indukovana tokom procesa desikacije i naknadne rehidracije.



Slika 27. Hijerarhijsko klasterovanje i toplotna mapa (eng. *heat map*) diferencijalno zastupljenih proteina dobijenih SC obradom podataka. Prikazano je klasterovanje eksperimentalnih faza (HL, DL i R2) svakog pojedinačnog uzorka (A) i prikaz za usrednjene vrednosti po eksperimentalnim fazama (B). Svaki red na slici predstavlja individualni protein dok je svaka kolona predstavlja set nezavisnih bioloških replikata. Regioni predstavljeni crvenom bojom ukazuju na povećanu relativnu zastupljenost proteina, dok plava boja označava njihov smanjen nivo. Boje iznad kolona predstavljaju: DL (crvena); HL (plava); R2 (zeleni).

Na slici 28 prikazana je analiza globalne varijabilnosti sprovedena je izračunavanjem koeficijenta varijanse (CV) za svaki identifikovani protein tokom eksperimentalnih faza, obuhvatajući sve

biološke replike i eksperimentalne grupe. Dobijeni distribucionni grafik ukazuje na to da većina proteina ispoljava CV vrednosti niže od 100 %, sa najizraženijom učestalošću u opsegu između 20 % i 80 %, što se u proteomici kompleksnih bioloških uzoraka smatra indikatorom visoke reproducibilnosti merenja i pouzdanosti eksperimentalnog dizajna.



Slika 28. Distribucija koeficijenta varijanse (SC metod).

Desna asimetrija distribucije (eng. *skewed right*) otkriva prisustvo manjeg broja proteina sa visokom varijabilnošću. Ova pojava potvrđuje da su primenjeni tehnički postupci tokom pripreme uzoraka, kao i sam metod kvantifikacije bili pouzdani za većinu analiziranih proteina. Prisustvo vrednosti koje formiraju distribuciju sa tzv. „dugim repom“ na desnoj strani dijagrama sa CV vrednostima koje premašuju 100 %, ukazuje na proteine čija je kvantifikacija bila manje stabilna ili na one koji su sami po sebi bili podložni većoj biološkoj fluktuaciji unutar populacije biljaka prikupljenih sa terena.

Nakon sprovedene PCA analize i evaluacije globalne varijabilnosti, iz skupa podataka isključena su 42 proteina koja su prethodno uspešno kvantifikovana preciznijom XIC metodom. Kako bi se identifikovali potencijalni novi proteini sa statistički značajnom razlikom u zastupljenosti, primenjena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA, $p < 0,05$). Međutim, rezultati su pokazali da zastupljenost nijednog od proteina identifikovanih isključivo SC pristupom nije dostigla nivo statističke značajnosti između tri ispitivane eksperimentalne grupe (HL, DL i R2). Ovakav ishod ukazuje na to da su ključne promene u proteomu ćelijskog zida dominantno obuhvaćene proteinima veće zastupljenosti, koji su već detektovani XIC metodom. Odsustvo statistički značajnih razlika u SC setu može se pripisati većoj biološkoj varijabilnosti proteina prisutnih u tragovima, kao i manjoj diskriminatornoj snazi semikvantitativne spektralne analize u poređenju sa metodom merenja intenziteta jonskih pikova.

2.3.4 Promene sastava glikoproteina ćelijskog zida

Primenom monoklonskih antitela uz konfokalnu laser skenirajuću mikroskopiju (CLSM) omogućena je identifikacija prostorne distribucije komponenti ćelijskog zida, kao i njihove strukturne transformacije tokom ciklusa desikacije i rehidratacije (slika 29). Histološki nalaz potpuno hidratiziranih listova bio je sličan stanju zabeleženom 48 h nakon ponovnog zalivanja (R3), što ukazuje na uspešan strukturni oporavak tkiva.

U svim fazama ciklusa identifikovani su ključni markeri ćelijskog zida: glikoprotein ekstenzin (LM1), AGP epitopi sa β -vezanom galakturonskom kiselinom (JIM13), AGP epitopi sa β -vezanom glukuronskom kiselinom (LM2), kao i različiti domeni pektina (RG-I, galaktozilni ostaci

prepoznati antitelom LM16, nisko metilesterifikovani HG prepoznat antitelom LM19 i visoko metilesterifikovani HG prepoznat antitelom LM20).

Epitopi prepoznati antitelom JIM13, AGP- β -D-GalUA, (slika 29) su na periferiji ćelija HL uzoraka formirali mrežastu strukturu. Tokom desikacije dolazi do formiranja još gušće mrežaste strukture, uz prateći porast intenziteta fluorescencije. Kako se povećava količina vode u ćeliji, posebno u R1, mreža počinje da liči na onu u HL, dok se u završnoj fazi (R3) uočavaju diskretni agregati zrnaste strukture, uz istovremeni pad intenziteta signala.

Slična dinamika uočena je i kod ekstenzina (LM1). U HL stanju, ovi glikoproteini su lokalizovani na periferiji ćelija i na površini epidermisa, često u vidu zrnastih struktura. U DL fazi, intenzitet signala unutar ćelije raste, formirajući mrežastu organizaciju koja koincidira sa povlačenjem signala sa same površine epidermisa. Tokom oporavka, signal se smanjuje i mrežaste strukture se ponovo reorganizuju u zrnaste, posebno uočljive u R3 fazi.

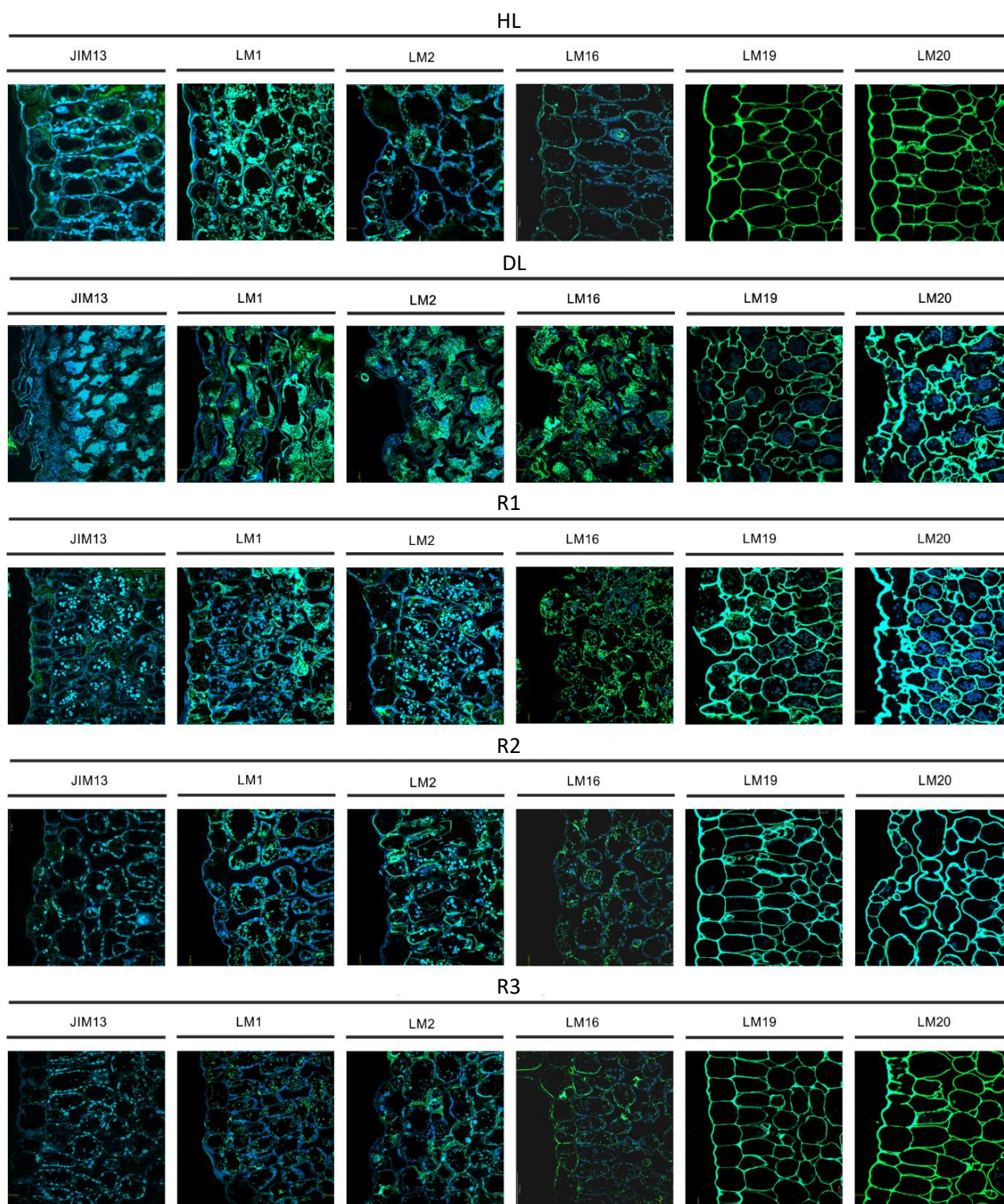
Epitopi LM2 (AGP- β -D-GlcA) u HL i R3 stanjima dominantno su lokalizovani na periferiji ćelija u vidu zrnastih struktura, koje tokom desikacije prelaze u mrežastu strukturu koja se širi preko čitavog citoplazmatskog prostora. Već jedan sat nakon zalivanja (R1), ponovo se uspostavlja inicijalna zrnasta struktura, koja u fazi R3 u potpunosti oponaša početno stanje.

Galaktozilni ostaci na RG-I lancima (LM16) u HL uzorcima nisu kontinuirani i linearni, već su prisutni kao sitnija zrnca u ćelijskom zidu. Tokom desikacije, oni se reorganizuju u gustu intracelularnu mrežu, koja daje maksimalni signal u DL i R1 uzorcima. Tokom rehidracije dolazi do njihove ponovne relokacije u ćelijski zid i povratka u granularnu formu.

Za razliku od glikoproteina, nisko i visoko metilesterifikovani HG (LM19 i LM20) ostaju ekskluzivno u ćelijskom zidu u svim ispitivanim stanjima (slika 29). Tokom desikacije dolazi do smanjenja signala, dok u završnim fazama rehidracije, u uzorcima iz R3 faze, intenzitet fluorescencije gotovo dostiže vrednosti poput onih u HL uzorcima.

Uporedo sa biohemijskim promenama zida, CLSM je omogućila vizuelizaciju drastičnih promena u organizaciji protoplasta. Usled gubitka turgora i smanjenja zapremine vakuole u DL fazi, hloroplasti (uočeni putem autofluorescencije) migriraju sa periferije ka centru ćelije. Potpuna rehidracija (24 h – 48 h) dovodi do restitucije zapremine vakuole, čime se hloroplasti ponovo potiskuju ka periferiji, što potvrđuje očuvanost ćelijskog integriteta i vitalnost sistema.

Hloroplasti (vizuelizovani putem njihove karakteristične autofluorescencije) su u HL presecima pozicionirani na periferiji ćelije zbog prisustva velike centralne vakuole koja vrši turgorov pritisak. Tokom procesa desikacije, celokupan ćelijski sadržaj, uključujući hloroplaste, migrira ka centru ćelije. Ova centripetalna reorganizacija je direktna posledica desikacijom indukovanih smanjenja zapremine vakuole i naboravanja ćelijskog zida i plazmaleme. Već nakon 24 časa od ponovnog zalivanja, vakuole obnavljaju svoju prvobitnu zapreminu, dok se morfološki očuvani hloroplasti ponovo simetrično raspoređuju po periferiji ćelije, u potpunosti oponašajući distribuciju karakterističnu za HL stanje.



Slika 29. Dinamika zastupljenosti i prostorne distribucije glikoproteina ćelijskog zida srpske ramonde u različitim fazama ciklusa desikacije i rehidratacije (HL, DL, R1, R2 i R3), vizuelizovana primenom konfokalne laserske skenirajuće mikroskopije.

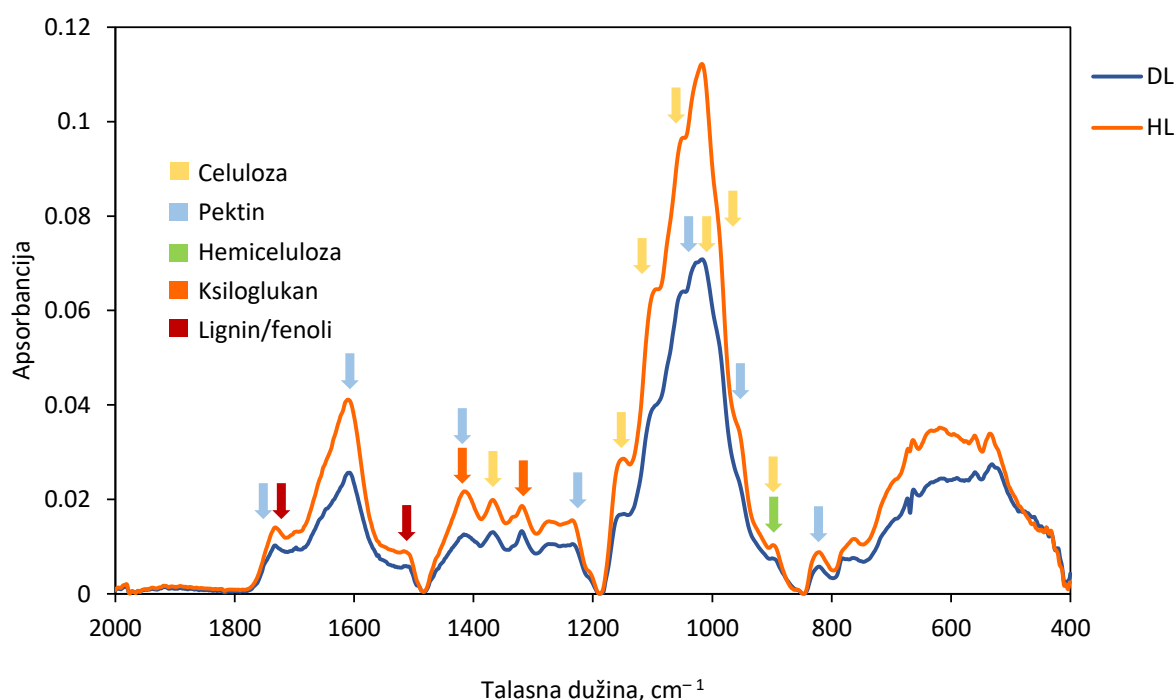
2.3.5 Promene sastava polisaharida ćelijskog zida

FTIR spektroskopija (infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom) je korišćena za određivanje profila polimera ćelijskog zida biljke. Komparativni prikazi preklopljenih FTIR spektara ćelijskog zida za DL i HL (prva eksperimentalna postavka) prikazani su na slici 30, dok su za HL, DL, R1, R2, i R3 (druga eksperimentalna postavka) prikazan na slici 30.

U spektrima obe grupe (HL i DL) identifikovane su trake koje odgovaraju celulozi, kao što su deformacione simetrične CH_2 vibracije na 1416 cm^{-1} , CH_2 deformacione vibracije (savijanje) na 1368 cm^{-1} , CH_2 deformacione vibracije na 1320 cm^{-1} , O–C–O asimetrične valencione vibracije glikozidne veze na 1147 cm^{-1} , C–OH valenciona vibracija sekundarnog alkohola na 1052 cm^{-1} i C–OH valenciona vibracija primarnog alkohola na 1029 cm^{-1} (Živanović i sar. 2021).

Pektinsku frakciju karakterišu specifične trake na 1733 cm^{-1} (C=O valenciona vibracija estarske funkcionalne grupe), 1611 cm^{-1} (COO^- asimetrična valenciona vibracija poligalakturonske kiseline), 1420 cm^{-1} (COO^- simetrična valenciona vibracija poligalakturonske kiseline), kao i signali na 1260 i 1236 cm^{-1} (C–O valenciona vibracija). Dodatno pektinu pripadaju trake i na 1097 cm^{-1} (C–O i C–C valencione vibracije), 1017 cm^{-1} (C–O, C–C valencione, npr. $\text{C}_2\text{--C}_3$, $\text{C}_2\text{--O}_2$, $\text{C}_1\text{--O}_1$), 955 cm^{-1} (CO deformaciona vibracija van ravni), 822 cm^{-1} (skeletalna vibracija).

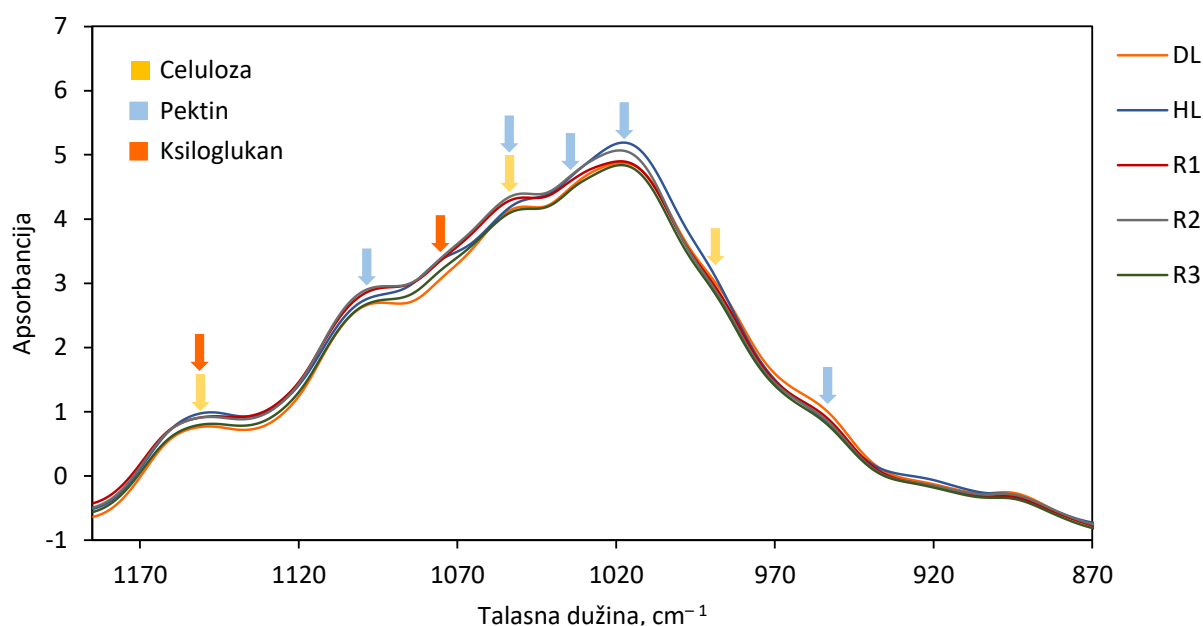
Vrlo specifični pikovi za lignin su na 1510 i 1517 cm^{-1} , a na 1720 cm^{-1} za fenolne estre. Trake na 1072 cm^{-1} (C–O valenciona, C–C valenciona), 1120 cm^{-1} , 1147 cm^{-1} , 1319 cm^{-1} , i 1368 cm^{-1} , su tipične za ksiloglukan (Alonso-Simón i sar. 2011). Značajno je istaći pik na 898 cm^{-1} , koji predstavlja doprinos celuloze, hemiceluloze i pektina, a čiji je intenzitet bio povišen u HL stanju (slika 30).



Slika 30. Komparativna analiza FTIR spektara ćelijskih zidova srpske ramonde u hidratisanom (HL, narandžasta linija) i desikovanom stanju (DL, plava linija) iz prve eksperimentalne postavke. Prikazani su usrednjeni spektri dobijeni analizom sedam nezavisnih bioloških replikata po grupi ($n = 7$). Na spektrima su jasno označeni karakteristični pikovi koji odgovaraju ključnim polimerima ćelijskog zida: celulozi, pektinu, hemicelulozi (dominantno ksiloglukanima) i ligninskoj frakciji (vibracije fenolnog prstena i fenolnih estara).

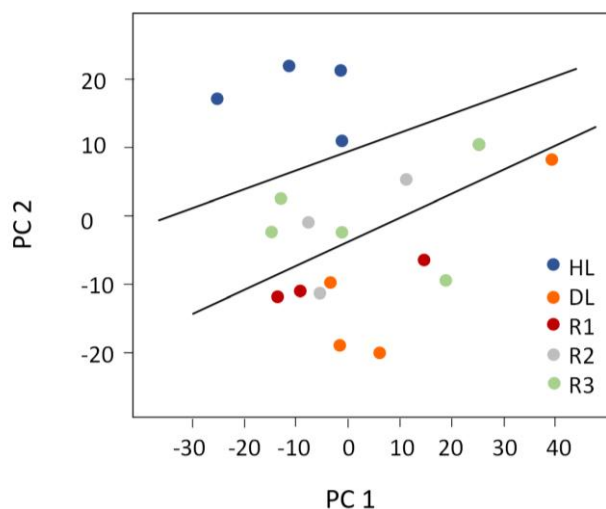
S obzirom na to da su u okviru prvog eksperimenta uzorci analizirani u potpuno hidratisanom (HL) i potpuno desikovanom (DL) stanju, drugi eksperiment je dizajniran tako da, uz HL i DL, pruži uvid i u dinamiku oporavka biljaka, nakon ponovnog zalivanja. Shodno tome, uzorkovanje je prošireno na odabrane vremenske intervale nakon ponovnog zalivanja: jedan sat (R1), kao i jedan (R2) i dva dana (R3) nakon rehidratacije.

Statistički značajne razlike u FTIR spektrima ovih eksperimentalnih faza, identifikovane su u spektralnom opsegu od 1185 do 870 cm^{-1} (slika 31), koji se naziva i "područje otiska prsta" (eng. *fingerprint region*) za ugljene hidrate.



Slika 31. Uporedni prikaz FTIR spektara ćelijskih zidova listova srpske ramonde tokom kompletnog ciklusa desikacije i rehidracije (HL, DL, R1, R2 i R3). Spektari su prikazani u opsegu od 1185 do 870 cm^{-1} („fingerprint” područje za polisaharide). Prikazane su usrednjene vrednosti spektara dobijene analizom bioloških replikata ($n = 4$ za HL, DL, R1 i R3; $n = 3$ za R2). Strelicama su označene karakteristične vibracione trake koje odgovaraju celulozi, hemicelulozi, pektinu i ksiloglukanu.

Ovaj opseg obuhvata ključne vibracione trake (tabela 7) karakteristične za polisaharide, kao što su celuloza ($1155, 1050, 990 \text{ cm}^{-1}$) i ksiloglukan ($1150, 1070 \text{ cm}^{-1}$), dok se takođe mogu uočiti i pektinske trake ($1097, 1050, 1035, 1015, 955 \text{ cm}^{-1}$). S druge strane, analizom traka koje odgovaraju hemicelulozi, ligninu i proteinima, nisu pronađene značajne razlike između ispitivanih grupa (HL, DL, R1, R2, R3). Statističko razdvajanje uzoraka na osnovu njihovih spektralnih karakteristika analizirano je primenom PCA metode (slika 32). Nasuprot tome, zabeležen je pad intenziteta signala za ksiloglukane, celulozu i pektine u DL stanju u poređenju sa HL.



Slika 32. Analiza glavnih komponenti (PCA) FTIR spektara u domenu skeletnih vibracija polisaharida (opseg $1185\text{--}870 \text{ cm}^{-1}$). Prikazan je prostorni raspored uzoraka svih ispitivanih faza (HL, DL, R1, R2 i R3) druge eksperimentalne postavke.

Iz grafika vrednosti glavnih komponenti (eng. *score plot*) uočava se jasno razdvajanje između grupa (DL + R1, R2 + R3, i HL) koje se primarno zasniva na vrednostima druge glavne komponente (PC2), dok prva glavna komponenta (PC1) dominantno odražava individualnu varijabilnost uzoraka unutar samih grupa (slika 32).

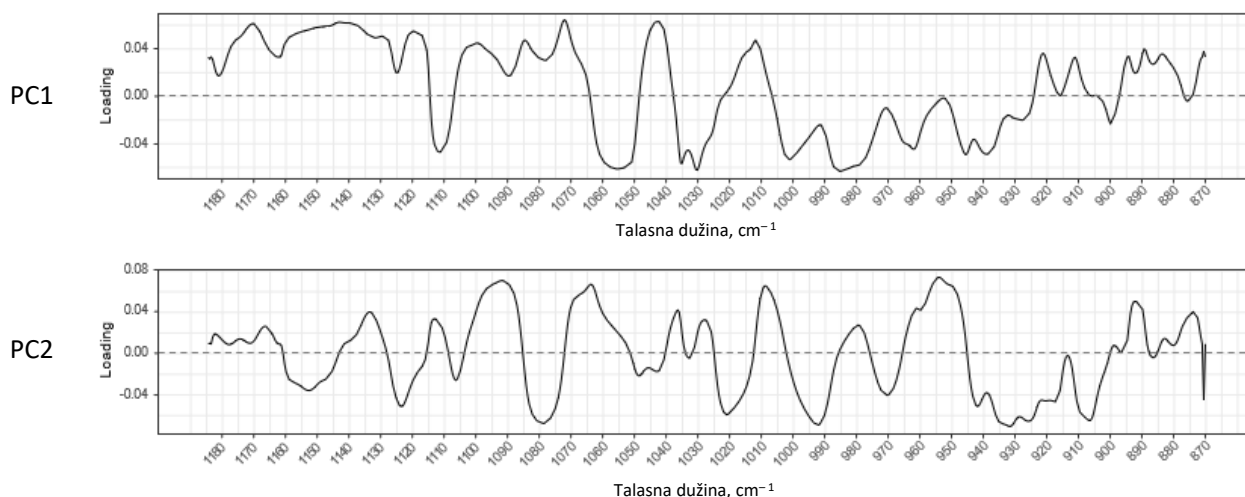
Na osnovu grafika doprinosa varijabli (eng. *loading plot*; Slika 33), identifikovane su ključne trake odgovorne za grupnu diskriminaciju: 1153, 1135, 1123, 1106, 1092, 1080, 1065, 1036, 1027, 1020, 1010, 992, 980, 970, 955, 943, region 935–920, 905, 893 i 875 cm^{-1} . Analiza vektorskih doprinosa je pokazala da trake koje u grafiku doprinosa varijabli (slika 33) imaju pozitivnu vrednost su povišenog intenziteta kod HL grupe, dok su one sa negativnom vrednošću povišenog intenziteta u DL i R1 grupama. Uzorci u fazama oporavka R2 i R3 pokazuju prelazni profil sa nižim intenzitetima traka, predstavljajući spektralni intermedijer između desikovanog i potpuno hidratisanog stanja.

Najkarakterističnije trake za separaciju grupe HL (pozitivne PC2 vrednosti; slika 33) su: 1135, 1092, 1065, 1036, 1010, 955 i 893 cm^{-1} (tabela 7). Trake na 1092, 1065, 1036, 955 cm^{-1} se mogu identifikovati kao trake koje potiču primarno od pektina (Kačuráková i Wilson 2001; Vidović i sar. 2022), dok traka na 893 cm^{-1} verovatno potiče od hemiceluloze, uz moguć doprinos vibracija celuloznih vlakana.

S druge strane, ključni spektralni markeri za razdvajanje DL grupe (negativne PC2 vrednosti; slika 33) su identifikovani na: 1153, 1123, 1106, 1080, 1050, 1020, 992, 970, 943, 935–920 i 905 cm^{-1} (tabela 7). Trake na 1153, 1106, 1050, 1020 cm^{-1} uglavnom potiču od celuloze (Vidović i sar. 2022; Milić i sar. 2023), dok se posebno izdvaja traka na 1123 cm^{-1} koja je prepoznata kao marker ksiloglukan.

Tabela 7. Eksperimentalno dobijene FTIR trake i njihova asignacija.

Eksp. traka	Komponenta	Smer doprinosa	Teorijska traka	Referenca
893	celuloza/hemiceluloza	+	895	Vidović i sar. 2022
955	pektin	+	955	Vidović i sar. 2022
1020	celuloza	–	1017	Vidović i sar. 2022
1036	pektin	+	1039	Kačuráková i Wilson 2001
1050	pektin/celuloza	–	1049/1052	Kačuráková i Wilson 2001; Vidović i sar. 2022
1065	pektin	+	1066	Kačuráková i Wilson 2001
1092	pektin	+	1097	Vidović i sar. 2022
1106	celuloza	–	1105	Milić i sar. 2023
1123	ksiloglukan	–	1120	Vidović i sar. 2022
1153	celuloza	–	1147	Vidović i sar. 2022; Milić i sar. 2023



Slika 33. Grafik doprinosa varijabli analize glavnih komponenti (PC1, PC2). Vrednosti na grafiku predstavljaju doprinos pojedinačnih talasnih brojeva (izraženi kao cm^{-1}) spektralnoj separaciji uzoraka. Pozitivne i negativne vrednosti duž PC2 ose ukazuju na ključne spektralne markere koji diskriminiraju HL grupu od DL i R1 grupa.

2.4 LEA proteini iz listova srpske ramonde – proizvodnja i karakterizacija

Transkriptomskom analizom su dobijene sekvence LEA proteina (pretražene naspram NCBI NR baze podataka). Nakon identifikacije, pronađeni LEA proteini su klasifikovani i dalje podeljeni u podgrupe. Sprovedena je detaljna *in silico* karakterizacija, nakon čega su odabrani proteini proizvedeni i eksperimentalno okarakterisani *in vitro* sa ciljem sagledavanja i predlaganja njihove potencijalne biološke funkcije.

2.4.1 Klasifikacija LEA proteina

2.4.1.1 Identifikacija i klasifikacija LEA proteina iz vrste *Ramonda serbica*

Kompletna *de novo* transkriptomska baza podataka srpske ramonde deponovana je na: <https://zenodo.org/record/6341873> (doi: 10.5281/zenodo.6341873), dok su aminokiselinske sekvence dostupne na sledećem linku: <https://zenodo.org/record/6340979> (doi: 10.5281/zenodo.6340979). Podaci o RNK sekvencama mogu se naći u NCBI NR (ne-redundantne proteinske sekvence) bazi podataka *Short Read Archive* (SRA) pod identifikacionim brojevima SRR18015613 i SRR18015612 (projekat PRJNA806723, uzorak SAMN25859880). Pregled kvaliteta podataka, raspodela dužine i broj transkripata i unigena, kao i anotirani unigeni, prikazani su u prilogu 10. Skoro polovina (49,1 %) anotiranih sekvenci najbolje se preklapala sa sekvencama kineske biljke vaskrsnice: *B. hygrometrica* (prilog 11).

Pretragom dobijenih spojenih transkripata iz HL i DL uzoraka u NCBI NR bazi proteinskih sekvenci pomoću BLAST alata, identifikovano je 433 člana LEA proteinske familije (prilog 12). Sekvence LEA proteina iz srpske ramonde pokazale su visoku homologiju sa LEA proteinima iz biljnih vrsta *Striga asiatica* i *Capsicum annuum* (prilog 13). Skoro 20 sekvenci LEA proteina srpske ramonde bilo je slično sa LEA proteinima iz *B. hygrometrica*. Nakon uklanjanja sekvenci kraćih od 100 aminokiselina sa liste od 359 proteina koji sadrže LEA domene, finalnu bazu LEA proteina iz srpske ramonde činilo je njih 318 (prilog 12). Na osnovu specifičnih LEA proteinskih domena, svi identifikovani LEA proteini svrstani su u sedam proteinskih grupa, i to: od LEA1 do LEA5, grupu dehidrina i SMP, prema *Pfam* klasifikaciji (prilog 13).

Najzastupljenija grupa LEA proteina u srpskoj ramondi bila je LEA2 proteinska grupa, koju je činilo 127 proteina (skoro 40 % ukupnih identifikovanih LEA proteina), zatim LEA4 grupa sa 96 proteina (~30 %), dok je najmalobrojnija bila LEA5 grupa sa 11 LEA proteina (tabela 8).

Tabela 8. Sličnost sekvenci LEA proteina iz srpske ramonde sa LEA proteinima iz pamuka i *A. thaliana*. Procenat sličnosti je izražen kao srednja vrednost $\pm$ standardna greška.

LEA grupa	Pfam ID	Br. proteina	Sličnost sa <i>A. thaliana</i> , %	Sličnost sa <i>G. hirsutum</i> , %
LEA1	PF03760	24	41,5 $\pm$ 0,9	28,8 $\pm$ 0,4
LEA2	PF03168	127	32,8 $\pm$ 0,9	29,8 $\pm$ 0,3
LEA3	PF03242	18	34,7 $\pm$ 1,6	27,7 $\pm$ 0,5
LEA4	PF02987	96	29,8 $\pm$ 0,3	28,2 $\pm$ 0,3
LEA5	PF00477	11	58,6 $\pm$ 4,4	27,8 $\pm$ 0,5
Dehidrini	PF04927	25	41,6 $\pm$ 1,6	34,4 $\pm$ 0,9
SMP	PF00257	17	37,9 $\pm$ 0,9	24,7 $\pm$ 0,3

2.4.2 Funkcionalna anotacija LEA proteina

2.4.2.1 Fizičko-hemijske osobine LEA proteina srpske ramonde

Fizičko-hemijske karakteristike (kao što su dužina sekvence, izoelektrična tačka – pI, aminokiselinski sastav, proteinska molekulska masa i prosečna hidrofobnost – *GRAVY* indeks) za sve LEA proteine iz srpske ramonde prikazane su u prilogu 12. Primećeno je da ovi proteini iz srpske ramonde imaju različitu dužinu, čak do 444 aminokiseline, što odgovara molekulskoj masi od 44,9 kDa. Prosečna dužina sekvence članova LEA2 proteinske grupe je najveća (~226 aminokiselina), a zatim sledi grupa LEA4 proteina (~187 aminokiselina), dok je prosečna dužina sekvenci članova LEA5 proteinske grupe najkraća (118 aminokiselina, tabela 9). Sekvence članova LEA4 proteinske grupe najviše variraju u dužini i masi (prilog 12).

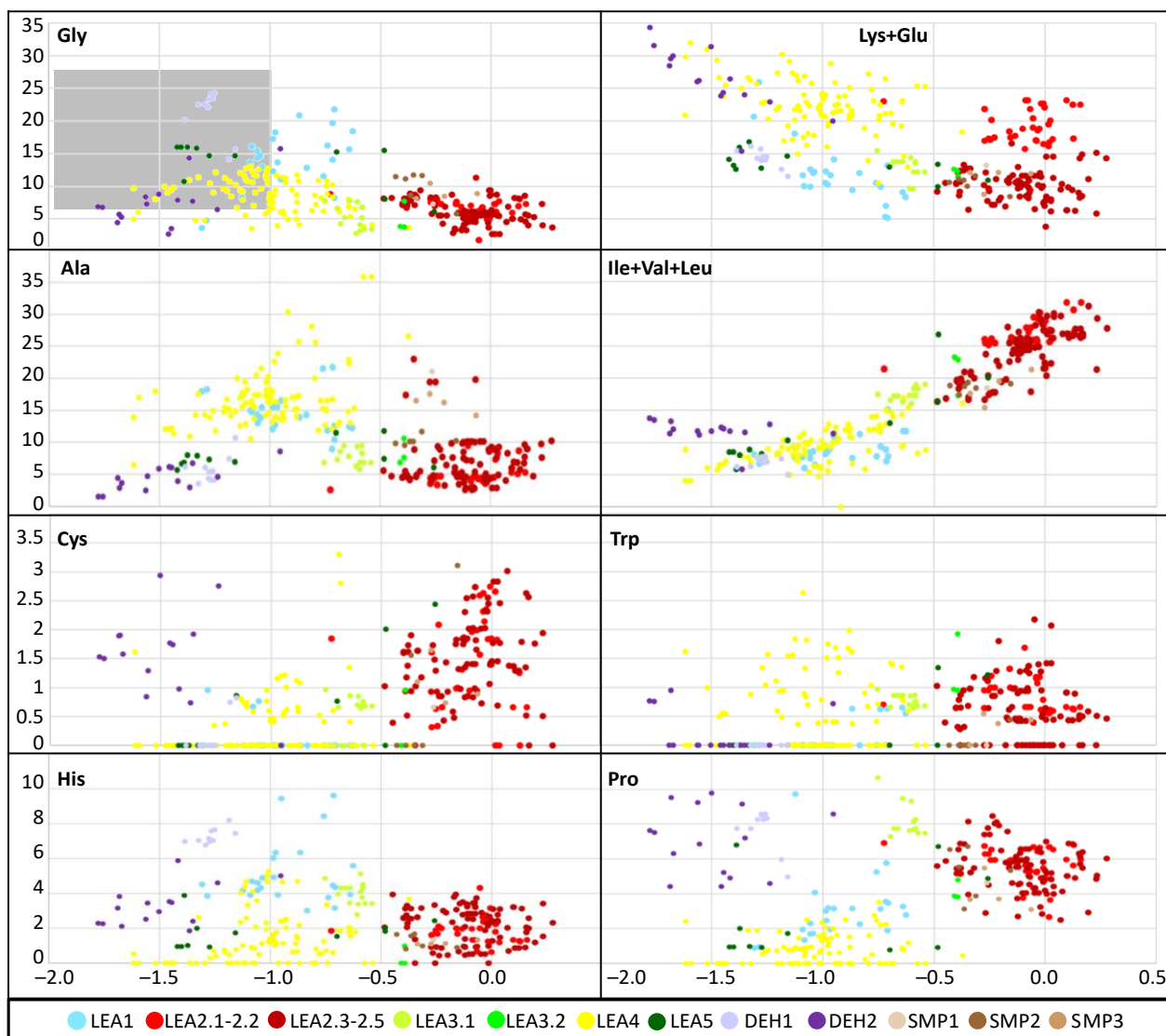
Proteini koji pripadaju LEA1 i LEA2 grupi imaju najvišu prosečnu pI vrednost (8,2–8,4), dok SMP grupa proteina ima najnižu pI (4,9; tabela 9). Vrednosti *GRAVY* indeksa su negativne za sve LEA proteine iz ramonde, osim za neke članove LEA2 grupe, iako je prosečna vrednost ove najhidrofobnije grupe bila –0,09 (tabela 9). Na osnovu *GRAVY* vrednosti dehidrini čine najhidrofilniju grupu, sa najnegativnijim *GRAVY* indeksom, a zatim slede članovi proteinskih grupa LEA5 i LEA4.

Prosečan aminokiselinski sastav za svaku grupu LEA proteina iz srpske ramonde prikazan je u tabeli 9 i prilogu 12.

Tabela 9. Karakteristike LEA proteina iz biljke *R. serbica* na osnovu aminokiselinske sekvence. Fizičko-hemijski parametri svakog LEA proteina izračunati su korišćenjem *ExPASy* online servera i *GRAVY* kalkulatora. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ standardnu grešku, dok različita slova označavaju statistički značajne razlike između različitih grupa porodice LEA proteina ($p < 0,05$), prema Tukijevom *post-hoc* testu.

LEA grupa	Broj ak	Izračunata pI	Mw (kDa)	GRAVY	Aminokiselinski (ak) sastav				
				Indeks					
					%	%	%	%	%
					Naelektrisane	Polarne	Nepolarne	Aromatične	Cistein
LEA1	139 $\pm$ 5	8,2 $\pm$ 0,4 ^d	14,4 $\pm$ 0,5 ^a	-0,93 $\pm$ 0,05 ^b	23,2 $\pm$ 1,3 ^a	33,2 $\pm$ 0,9 ^{c,d}	40,5 $\pm$ 0,8 ^c	5,1 $\pm$ 0,5 ^a	0,10 $\pm$ 0,06 ^a
LEA2	226 $\pm$ 5	8,4 $\pm$ 0,3 ^d	25,2 $\pm$ 0,7 ^b	-0,09 $\pm$ 0,03 ^e	21,4 $\pm$ 0,5 ^a	29,3 $\pm$ 0,5 ^{b,c}	38,8 $\pm$ 0,4 ^{b,c}	9,7 $\pm$ 0,2 ^c	1,66 $\pm$ 0,10 ^c
LEA3	126 $\pm$ 5	7,0 $\pm$ 0,4 ^{b,c,d}	14,0 $\pm$ 0,6 ^a	-0,59 $\pm$ 0,03 ^c	23,6 $\pm$ 0,5 ^a	35,6 $\pm$ 1,0 ^d	32,3 $\pm$ 0,8 ^a	10,5 $\pm$ 0,4 ^c	0,56 $\pm$ 0,09 ^{a,b}
LEA4	187 $\pm$ 7	6,1 $\pm$ 0,2 ^{a,b}	17,9 $\pm$ 0,9 ^a	-1,01 $\pm$ 0,03 ^b	35,2 $\pm$ 0,6 ^{b,c}	23,6 $\pm$ 0,5 ^a	36,7 $\pm$ 0,5 ^b	3,7 $\pm$ 0,2 ^a	0,33 $\pm$ 0,06 ^{a,b}
LEA5	118 $\pm$ 7	8,1 $\pm$ 0,5 ^{c,d}	12,7 $\pm$ 0,8 ^a	-1,02 $\pm$ 0,14 ^b	30,0 $\pm$ 1,4 ^b	29,2 $\pm$ 1,7 ^{b,c}	36,9 $\pm$ 1,7 ^{b,c}	4,7 $\pm$ 0,9 ^a	0,56 $\pm$ 0,28 ^{a,b}
Dehidrini	143 $\pm$ 9	6,7 $\pm$ 0,5 ^{b,c}	15,6 $\pm$ 1,0 ^a	-1,40 $\pm$ 0,05 ^a	37,2 $\pm$ 2,7 ^c	28,7 $\pm$ 1,5 ^{b,c}	29,3 $\pm$ 1,5 ^a	9,5 $\pm$ 0,5 ^c	1,00 $\pm$ 0,19 ^{b,c}
SMP	157 $\pm$ 15	4,9 $\pm$ 0,3 ^a	16,4 $\pm$ 1,6 ^a	-0,27 $\pm$ 0,04 ^d	22,9 $\pm$ 0,8 ^a	26,9 $\pm$ 1,3 ^{a,b}	46,6 $\pm$ 1,0 ^d	6,8 $\pm$ 0,4 ^b	0,88 $\pm$ 0,21 ^b

Udeo cisteina je generalno nizak kod svih identifikovanih LEA proteina. Članovi LEA2 proteinske grupe i pojedini dehidrini sadrže najviše cisteina, dok je njegov procenat najniži kod proteina koji pripadaju LEA1 i LEA4 proteinskim grupama (slika 34 i prilog 12).



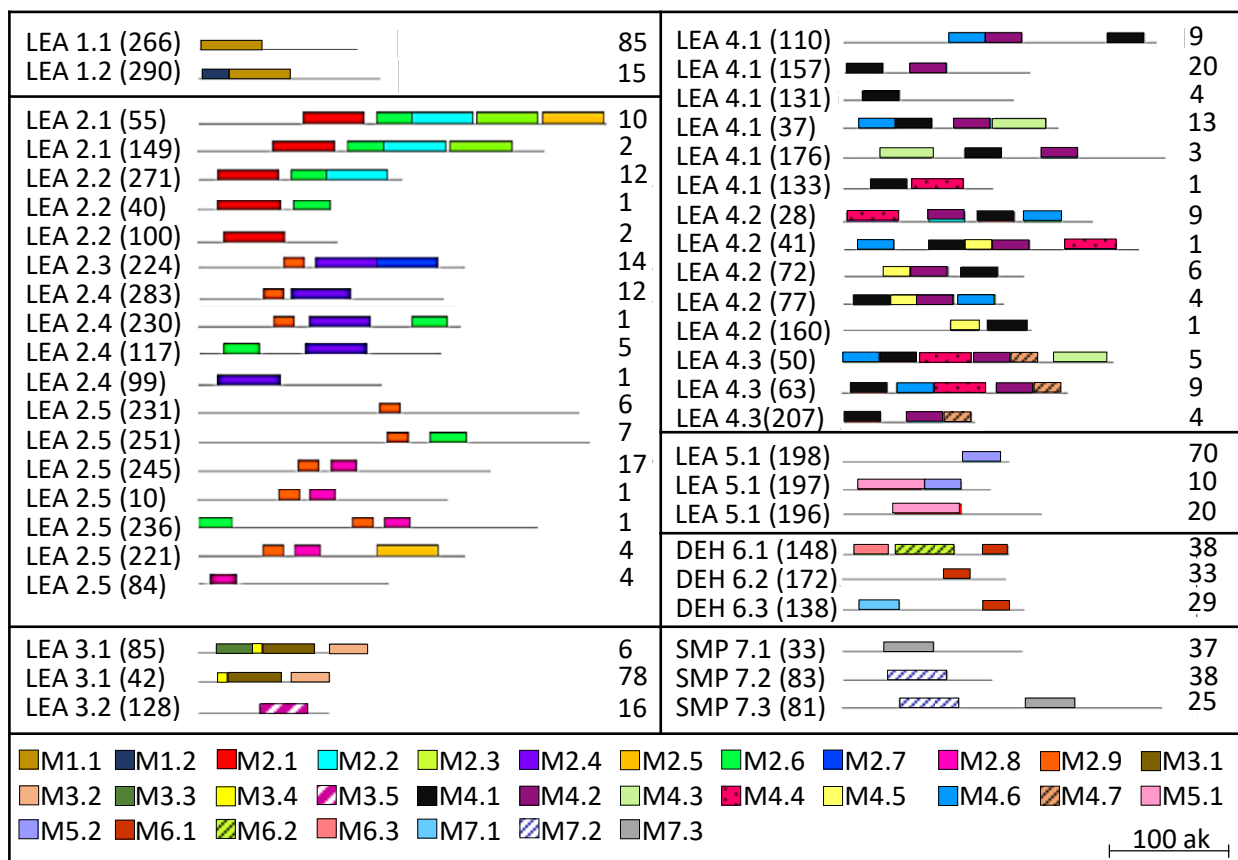
Slika 34. Procenat odabranih aminokiselina u odnosu na vrednost *GRAVY* indeksa LEA proteina srpske ramonde. Sivi kvadrat na grafiku označen sa „Gly“ označava hidrofilne.

Procenat naelektrisanih aminokiselina je najveći kod dehidrina, a zatim kod proteina LEA4 grupe (tabela 9). Shodno tome, dehidrini i proteini LEA4 grupe imaju najveći sadržaj lizina (13–17 %), glutamata (do 18 %) i aspartata (do 10 %) u poređenju sa ostalim LEA proteinskim grupama. Udeo aminokiselina razgranatog lanca (izoleucina, valina i leucina) je najviši u LEA2 proteinskoj grupi. Veoma visok sadržaj alanina (do 20 %) pronađen je u LEA4, SMP i LEA1 proteinskim grupama. Prolin je najzastupljeniji u dehidrinima i LEA3 proteinskoj grupi. Udeo histidina je najveći kod dehidrina, zatim kod proteina koji pripadaju LEA1 grupi (slika 34).

Među LEA proteinima ramonde, sadržaj glicina je najviši u proteinskim grupama DEH1, LEA1 i LEA5. Sadržaj triptofana je generalno nizak kod svih LEA proteina, a najviši u LEA2, LEA3 i LEA4 proteinskim grupama (~1 % ukupne sekvence).

2.4.2.2 Analiza konzerviranih motiva LEA proteina iz srpske ramonde

Radi boljeg razumevanja strukturnih razlika LEA proteina srpske ramonde, analizirani su njihovi konzervirani motivi (slika 35). Detaljni prikaz za svaki LEA protein prikazan je u prilogima 15–21.



Slika 35. Motivi predviđeni MEME alatom reprezentativnih LEA proteina iz svake grupe i podgrupe. Broj u zagradi predstavlja RsLEA kod proteina (prilog 14). Konsenzus sekvenca svakog motiva se nalazi u tabeli 10. Brojevi na kraju sekvence predstavljaju procenat LEA proteina sa datim aminokiselinskim obrascem. Linija označava 100 aminokiselina.

Tabela 10. Konsenzus sekvence različitih motiva svake LEA proteinske grupe srpske ramonde. Slova različitih veličina u *MEME* logotipovima konsenzusnih sekvenci označavaju verovatnoće pojavljivanja pojedinačnih aminokiselinskih (ak) ostataka. Važni delovi su istaknuti podebljanim fontom. Boja u logotipu označava tipove ak: polarne nenaelektrisane, zelena; pozitivno naelektrisane, crvena; negativno naelektrisane, roze; nepolarne, plava; Gly, narandžasta; Pro, žuta; His, svetloružičasta; Tyr, zeleno-plava.

Grupa	Motiv	Br. ak	e-vrednost motiva	Konsenzusna sekvence	Gravy vrednost	Logotipovi konsenzus sekvence
LEA1	M1.1	50	$1,25e^{-52}$	TKATVQEKA EQMKTRDPLQKEMATQKKEAKIQEAER QKQEARQQNSAAKH	-1,786	
	M1.2	21	$3,8e^{-21}$	MQAAKETAANVAASANS GMEK	-0,352	
LEA2	M2.1	50	$5,4e^{-55}$	IEETIGFGKPTADVTDVLDKINLEKADYVVDVLVKN PYPIPIPLIDINY	0,048	
	M2.2	50	$2,7e^{-55}$	KSTYADIGPGWIIPYRLKVDLIVDVPVFGRLTLPLEKK GEIPIYPKPDID	-0,018	
	M2.3	50	$5,1e^{-63}$	IRFDKFSFEETVATLHLKLENKNDFDLGLKDLDYEVW LCNVSIGGAYMKK	-0,268	
	M2.4	50	$1,1e^{-44}$	TLNLTVTVRNPNFYSIKYDSSTVSIGYRG NKLGRVTIP AGRIGARSSQ RV	-0,328	
	M2.5	50	$1,9e^{-64}$	ITFRPKDFGSALWDMIRGKGTGYTIKGNINVDTPFGF MKLPISKEGGTTC	-0,238	
	M2.6	29	$1,9e^{-34}$	SGLIPDAGSLKAHGSTTVKVPICLIYDDI	0,444	

Tabela 10. Nastavak

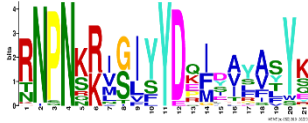
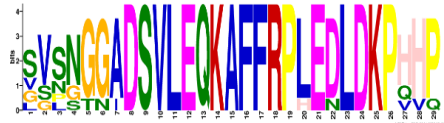
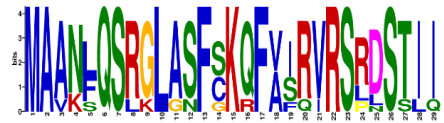
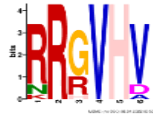
LEA2	M2.7	50	$3,1e^{-57}$	NATLQLERVEIMSDVILLLEDLAKGEIMFDTEVDISGK LRVFFFDLPLKT	0,376	
	M2.8	21	$1,6e^{-22}$	RNPKNRIGIYYDQIDAYASYK	-1,200	
	M2.9	24	$1,2e^{-28}$	GGGKRINDKGWPECNVIMEEGKYD	-1,204	
LEA3	M3.1	41	$1,8e^{-53}$	TYDKNPDEEHAFSAVVPDNVIPPQTQQYWAPHPKTG VFGPA	-0,817	
	M3.2	29	$1,6e^{-36}$	SVSNGGADSVLEQKAFFRPLEDLDKPHHP	-0,766	
	M3.3	29	$2,4e^{-35}$	MAANLQSRGLASFSKQFVIRVRSRDSTII	0,048	
	M3.4	50	$1,9e^{-48}$	IRMLNKESEEPTKISWVPDPVTGYRPNKATEIDAA ELRRILIKDNTRR	-0,994	
	M3.5	6	$1,e^{-8}$	RRGVHV	-0,700	

Tabela 10. Nastavak

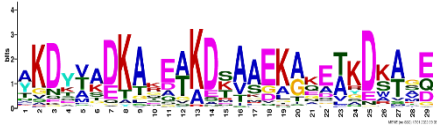
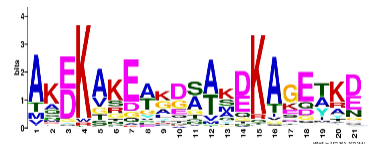
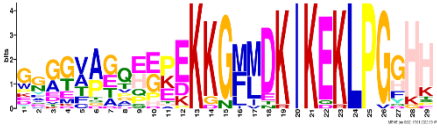
LEA4	M4.1	29	$8,5e^{-29}$	AKDYVADKAKEAKDSAAEKAKETKDKAGE	−1,617	
	M4.2	29		IIGSLIGTVQGTVEHAKEAVLGKSQEASE	0,059	
	M4.3	36		AKMKAEDTTEAAKETYEETKENARKKMEEMKIVGE G	−1,962	
	M4.4	21		AKEKAKEAKDSAKDKAGETKD	−1,438	
LEA5	M5.1	50	$1,8e^{-60}$	QDKRAELDAKASQGETVVPGGTGGKSLEAQEHLAEG RSKGGQTRKEQMGT	−1,228	
	M5.2	21	$3,4e^{-36}$	YQEMGRKGGLSSNDKSGAERAE EEGITID	−1,256	
Dehidrini	M6.1	29	$2,3e^{-30}$	GGGGVAGQEEPEKKGMMDKIKEKLPGGHH	−1,214	

Tabela 10. Nastavak

Dehidrini	M6.2	29	$8,4e^{-33}$	GPTTGPPKHRRSGSSSSSSSEDDGMGGRR	−1,679	
	M6.3	29	$7,2e^{-37}$	MAEYGGNYGNETKQTDEYGNPVHHPQGGG	−1,559	
	M6.4	21	$5,4e^{-23}$	KGLKDKIKEKLPGGKKETEPP	−1,710	
SMP	M7.1	50	$3,5e^{-60}$	PQDAATMQAAENSVLGQTQKGGVAATMQSAANRNE RAGVVGHNDVTDIIS	−0,402	
	M7.2	41	$1,3e^{-48}$	SAAGDKPVDESDAAAIQAAEARATGLGRVVPGGLGA EAKSA	−0,090	

Proteinsku grupu LEA1 čine LEA proteine slične dužine (prilog 12), koji u većini slučajeva (80 %) sadrže dva visoko konzervirana motiva: M1.1 i M1.2 (slika 35 i prilog 15). Ova dva motiva su prema *Pfam* bazi podataka prepoznata kao „LEA1“ domeni. Članovi ove grupe su dalje klasifikovani u tri proteinske podgrupe: LEA1.1 (sa M1.1 i M1.2 motivima), LEA1.2 (samo M1.1 motiv) i LEA1.3 (samo M1.2 motiv). Prvi, M1.1 motiv, sadrži 50 aminokiselina sa tri visoko konzervirana ostatka lizina prisutna u gotovo svim članovima LEA1 proteinske grupe i sedam visoko konzerviranih, naizmeničnih ostataka asparaginske i glutaminske kiseline (tabela 10). Takođe, konsenzus sekvenca M1.1 motiva sadrži 20 naelektrisanih aminokiselina od ukupno 50, a vrednost *GRAVY* indeksa ukazuje na to da je ovaj motiv veoma hidrofilan. Drugi, M1.2 motiv obuhvata 21 aminokiselinu, uključujući dva lizina, dva glutamata, jedan glicin i sedam alanina.

Prema homolognim motivima, najveća LEA proteinska grupa, LEA2, je podeljena u pet proteinskih podgrupa: LEA2.1, LEA2.2, LEA2.3, LEA2.4 i LEA2.5. U ovoj grupi je identifikovano devet motiva (tabela 10 i prilog 16). Motivi M2.2, M2.3, M2.4, M2.5 i M2.8 prema *Pfam* bazi podataka sadrže „LEA2“ domene proteinske grupe. Proteinska podgrupa LEA2.2 sadrži motive M2.1, M2.2 i M2.6, dok „proširena“ podgrupa LEA2.1 sadrži i dodatne motive: M2.3 i M2.5. Pored toga, svi proteini koji pripadaju proteinskoj podgrupi LEA2.3 uključuju motiv M2.4, dok članovi dva klastera unutar ove podgrupe imaju dodatne motive M2.6 ili M2.7 (slika 35). Motivi M2.6 i M2.7 sa dominantnim nepolarnim ostacima su najhidrofobniji među svim LEA motivima pronađenim u LEA proteinima srpske ramonde (tabela 9). Motiv M2.9 je specifičan za proteinsku podgrupu LEA2.4, iako neki članovi ove podgrupe takođe sadrže motiv M2.6. Proteini unutar podgrupe LEA2.5 razlikuju se od ostalih članova LEA2 grupe po prisustvu motiva M2.8 (prilog 16).

Grupa proteina LEA3 bila je podeljena u dve podgrupe: LEA3.1 i LEA3.2 (slika 35). Sa izuzetkom RsLEA_42, četiri visoko konzervirana motiva (M3.1, M3.2, M3.3 i M3.5) su pronađena u grupi LEA3.1 (prilog 17). Zanimljivo, motivi M3.1 i M3.2 su bogati prolinom i glicinom i sadrže deset skoro potpuno konzerviranih naelektrisanih aminokiselina (tabela 10). Pored toga, motiv M3.1 sadrži konzervirani triptofanski ostatak. Motiv M3.3 (29 aminokiselina), bogat serinom, argininom i alifatičnim aminokiselinama, sličan je motivu M3.2, dok su dominantni ostaci u kratkom motivu M3.5 (šest aminokiselina) arginin, histidin i valin. Tri LEA3.2 proteina sadrže motiv M3.4 prepoznat kao „LEA3“ proteinski domen od strane *Pfam* baze podataka (tabela 10).

Četiri karakteristična motiva identifikovana su u porodici proteina LEA4 (tabela 10 i prilog 18). Svi članovi grupe LEA4 sadrže motiv M4.1, bogat naelektrisanim aminokiselinama. Članovi proteinske podgrupe LEA4.1 sadrže najzastupljeniji LEA motiv: M4.3 (vrednost *GRAVY* indeksa = -1,96), dok se proteinska podgrupa LEA4.2 odlikuje motivom M4.2. Svi ostali članovi LEA4 proteinske grupe su klasifikovani kao LEA4.3 (slika 34 i prilog 18). Osim M4.2, svi motivi koji su identifikovani u grupi proteina LEA4 odlikuju se visokom polarnošću i sadržajem naelektrisanih aminokiselina (>50 %), posebno lizinom (20-33 %; tabela 10). Zaista, gotovo četvrtina članova proteinske grupe LEA4 sadrži barem jedan od dva motiva: arginin-tirozin-serin ili region bogat lizinom. Na osnovu *Pfam* baze podataka, „LEA“ proteinski domeni pronađeni su u motivima M4.1 i M4.4.

Samo 11 LEA proteina čini proteinsku grupu LEA5 (prilozi 15 i 19), od kojih se devet odlikuje visoko konzerviranim motivom M5.1 (slika 35 i tabela 10). U osam LEA proteina iz ove grupe nalazi se motiv M5.2 sa veoma konzerviranim glicinskim ostatkom i naelektrisanim ostacima. U vezi s tim, *GRAVY* indeks ova dva motiva (gotovo -1,2; tabela 10) ukazuje na njihovu visoku polarnost.

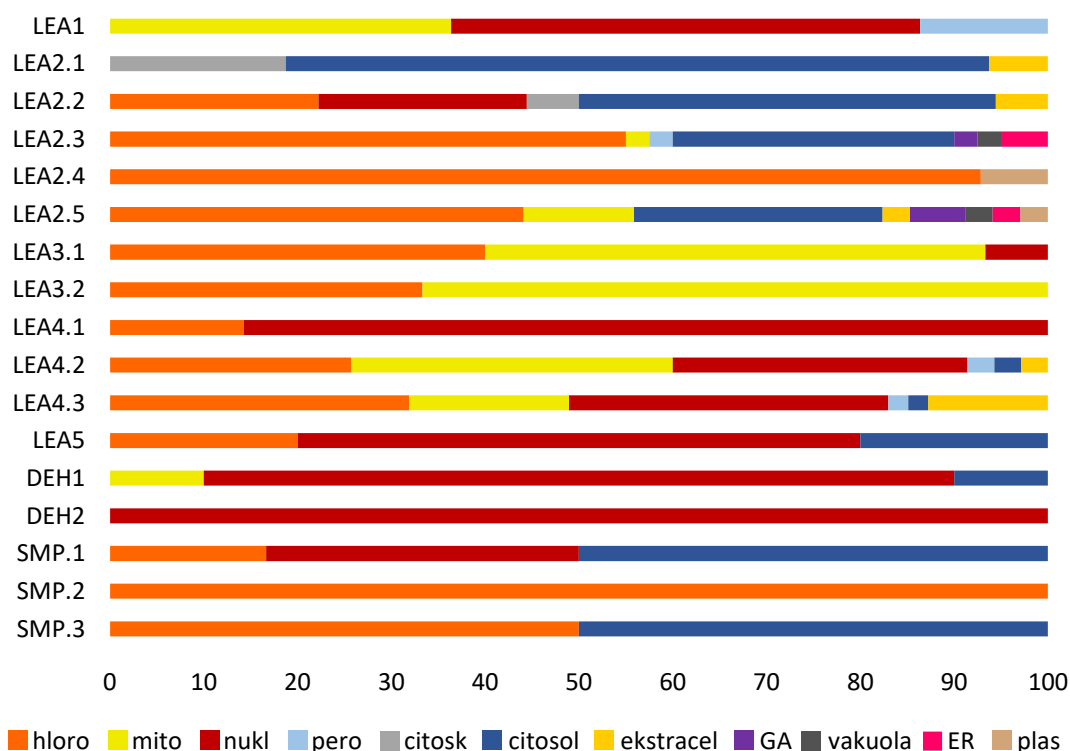
Na osnovu homologije motiva, dehidrini su grupisani u dve podgrupe: DEH1 i DEH2, koje su sadržale četiri različita polarna motiva (M6.1–M6.4; slika 34; prilog 20). Članovi podgrupe DEH1 su definisani motivom M6.3, koji je bogat glicinom, prolinom i tirozinom, kao i negativno naelektrisanim aminokiselinama (slika 35 i tabela 10). Ovaj motiv sadrži tzv. Y-segment: DEYGNP

(tabela 10). Za gotovo 84 % dehidrina iz srpske ramonde karakterističan je motiv M6.1 koji obuhvata lizinski (K)-segment: KKG[_N][MF]M[DE]KIKEK (tabela 10 i prilog 22). Visoko konzervirani motiv M6.2 je pretežno sastavljen od osam serina (S-segment), šest glicina, tri prolina i osam naelektrisanih aminokiselinskih ostataka. Kod dehidrina preovlađujući S-segment je SGSSSSSSS (naročito u podgrupi DEH1 proteina), iako su kod njih detektovani i motivi S7, S8, i TGSSSSSSS (prilog 22). Konzervirani motiv M6.4 je uglavnom sastavljen od naelektrisanih aminokiselina, prolina i glicina, slično drugim motivima u ovoj porodici. Motivi M6.1, M6.2, i M6.4 prema *Pfam* bazi podataka obuhvataju domen proteinske porodice „dehidrin“. Uzimajući sve u obzir, svi dehidrini identifikovani u srpskoj ramondi sadrže barem jedan segment koji određuje familiju dehidrina (prilog 22).

Proteini sazrevanja semena grupisani su u tri podgrupe: SMP1, SMP2 i SMP3, u zavisnosti od prisustva ili odsustva dva detektovana motiva: M7.1 i M7.2 (sika 35 i prilog 21). Motiv M7.1 podrazumeva sedam potpuno konzerviranih alanina, tri valina i četiri glicina, kao i pet negativno naelektrisanih ostataka u svim proteinima. Kraći motiv M7.2 uglavnom obuhvata aminokiseline alifatičnog niza (posebno alanin i valin), što uslovljava gotovo pozitivnu vrednost *GRAVY* indeksa. Oba motiva su prepoznata kao domeni proteinske porodice „SMP“ od strane *Pfam* baze podataka.

2.4.2.3 Ćelijska kompartmentalizacija LEA proteina srpske ramonde

Određivanje unutarćelijske lokalizacije proteina od suštinskog je značaja za razumevanje njegove fiziološke funkcije. Poznavanje preciznog mesta u ćeliji pruža uvid u biološku ulogu proteina, olakšava identifikaciju potencijalnih interakcionih partnera i rasvetljava njihovo učešće u specifičnim metaboličkim putevima. Pored toga, *in silico* predviđanje subćelijske distribucije predstavlja nezaobilazan korak u strateškom planiranju i dizajnu daljih eksperimenata.



Slika 36. Raspodela predviđene unutarćelijske lokalizacije LEA proteina za svaku LEA podgrupu. Rezultati su dati u procentima. hlora, hloroplast; mito, mitohondrije; nukl, jedro; pero, peroksizomi; citosk, citoskelet; ekstracel, ekstraćelijski matriks; GA, Goldžijev aparat; ER, endoplazmatični retikulum; plas, plastidi.

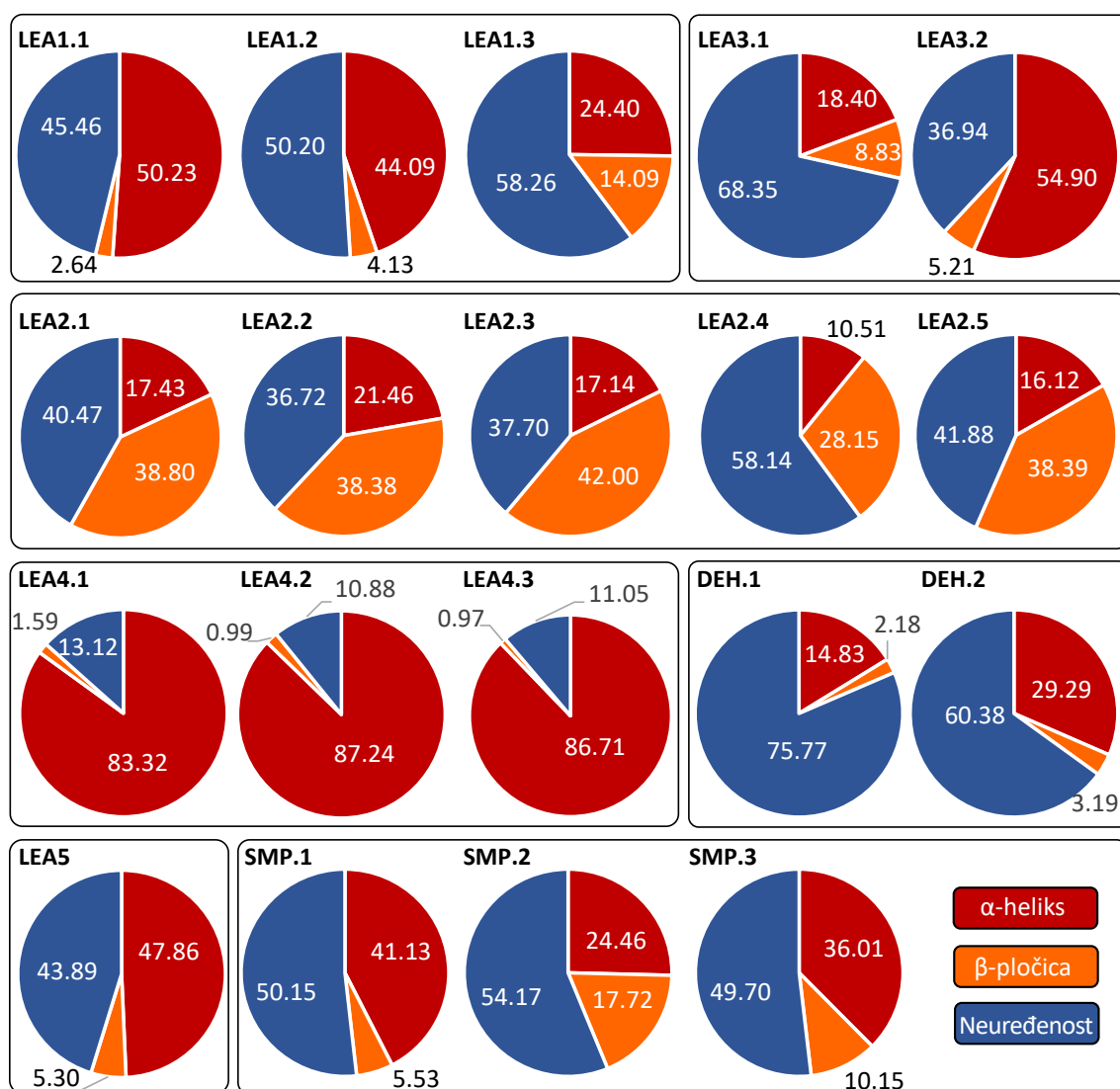
Grupe LEA proteina su se razlikovale i u pogledu predviđene unutarćelijske kompartmentalizacije (slika 36). *In silico* analiza pomoću softvera za predikciju lokalizacije predvidela je da se većina LEA

proteina nalazi u hloroplastu (98), jedru (87), citoplazmi (52) i mitohondrijama (48; slika 36; za svaki pojedinačan LEA protein, rezultati su prikazani u prilogu 13).

Više od jedne trećine proteina LEA1 i LEA3 grupe bi trebalo da se nalazi u mitohondrijama. Proteini koji pripadaju grupama LEA1, LEA4.1, LEA5 i dehidrinima su predviđeni da se nalaze u jedru. Predviđeno je da su proteini koji pripadaju SMP2, SMP3, LEA3, LEA2.3, LEA2.4 i LEA2.5 grupama i podgrupama uglavnom hloroplastni. Nasuprot tome, za više od 30 % članova proteinskih podgrupa LEA2.1, LEA2.2, LEA2.3, SMP1 i SMP3 je predviđeno da su citosolni (slika 36). Značajno je da je za jedanaest anotiranih LEA proteina koji pripadaju podgrupama LEA2.1, LEA2.2, LEA2.5, LEA4.2 i LEA4.3 predviđeno da su ekstracelularni.

2.4.3 *In silico* strukturna analiza LEA proteina

Sekundarna struktura, neuređenost i agregacioni potencijal LEA proteina direktno zavise od toga kojoj grupi pripadaju (prilog 14). Pet softvera za predviđanje sekundarne strukture proteina pokazalo je da više od 30 % identifikovanih LEA proteina ima veliku verovatnoću formiranja α -heliksa (>70 % sekvence), dok je za gotovo 35 % svih identifikovanih LEA proteina bilo predviđeno formiranje β -pločica koje čine najmanje 30 % sekvence.



Slika 37. Prosečna predviđena verovatnoća za zauzimanje različitih sekundarnih struktura svake grupe i podgrupe LEA proteina iz srpske ramonde, prema korišćenim softverima za predikciju (*PsiPred*, *Sopma*, *FELLS*, *Phyre2*, i *JPred4*).

Kompjuterska analiza je ukazala na visoku neuređenost (>50 % sekvence) kod skoro 25 % LEA proteina identifikovanih u listovima srpske ramonde. Proteinska grupa LEA4 pokazuje visoku sklonost ka formiranju α -heliksa (u rasponu od 71–97 % sekvence). U proseku, za samo 1 % sekvence proteina ove grupe je predviđeno da formiraju β -pločice (slika 37), što se takođe može primetiti i kod dehidrina i većine proteina koji pripadaju LEA1 grupi. Suprotno tome, grupa LEA2, posebno podgrupa LEA2.3, pokazuje visoku verovatnoću formiranja β -pločica (prilog 14). Uočena je pozitivna korelacija između procenta neuređenosti i dužine sekvence među podgrupama porodice proteina LEA2. Na primer, proteini podgrupe LEA2.4 sa prosečnom dužinom od 298 aminokiselina imaju predviđenu sklonost ka neuređenosti za 58 % sekvence. Prirodno neuređena konformacija je predviđena i za dehidrine (posebno podgrupu DEH1, 76 % sekvence), LEA3 proteine (63 %) i SMP (51 %, prilog 14).

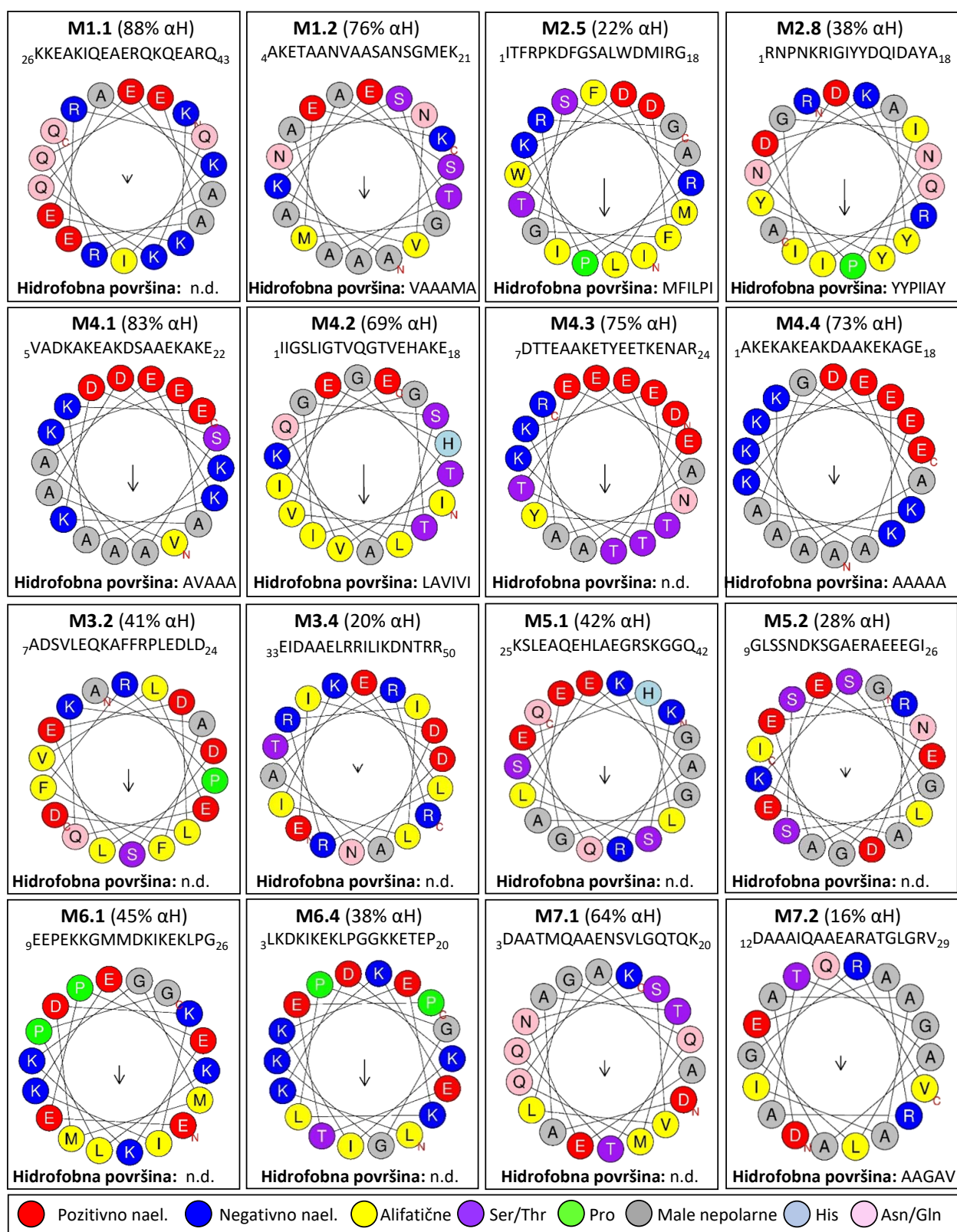
Radi dobijanja više informacija o α -heliksima u motivima koji su identifikovani u LEA proteinima, analizirana je njihova polarnost (tabela 10). Motiv M1.1 pokazuje visoku verovatnoću da formira naelektrisan α -heliks, koji sadrži i pozitivno i negativno naelektrisanu stranu, dok je za M1.2 pokazano prisustvo hidrofobne površine (slika 38). Za motive M2.5 i M2.8 je malo verovatno da mogu da zauzimaju strukturu amfipatičnog α -heliksa. Što se tiče LEA3 grupe proteina, jedina dva motiva koja su predviđena za formiranje α -heliksa su M3.2 i M3.4, ali bez formiranja hidrofobnih površina. Za sva četiri motiva u LEA4 proteinskoj grupi predviđena je visoka verovatnoća uvijanja u α -heliksnu strukturu (slika 38). Prema *HeliQuest* rezultatima, svi osim motiva M4.2, imaju potencijal da formiraju negativno naelektrisanu površinu, dok je u motivima M4.1, M4.2, i M4.4 predviđeno postojanje i hidrofobne strane (A-tip α -heliksa). Suprotno tome, za motive M5.1 i M5.2 formiranje α -heliksa sa hidrofobnom površinom nije verovatno. Samo dva motiva karakteristična za dehidrine, M6.1 i M6.4 pokazuju tendenciju da formiraju α -helikse, dok je u motivima M6.2 i M6.3 neuređena konformacija dominantna za više od 94 % sekvence. Pored toga, oba motiva, koja su identifikovana u SMP proteinskoj grupi, mogu da formiraju α -helikse sa visokom verovatnoćom, dok motiv M7.2 ima tendenciju formiranja hidrofobne površine (slika 38).

Uprkos niskoj sklonosti ka formiranju α -heliksne konformacije, prisustvo barem jednog transmembranskog heliksa (TMH) unutar LEA2 grupe je predviđeno softverima *TMHMM* i *FELLS* (prilog 14). Predikcija je pokazala da gotovo svi LEA proteini koji pripadaju podgrupama LEA2.3–5, imaju tendenciju da formiraju barem jedan TMH sačinjen od oko 20 aminokiselina, dok je za sedam proteina grupe LEA2.3 primećen još jedan TMH (ukupno dva). Ukupno je identifikovano 32 različita i hidrofobna TMH domena u okviru 87 proteina koji pripadaju LEA2 grupi proteina (prilozi 23 i 24). S druge strane, nije predviđeno formiranje transmembranskih domena kod SMP, dehidrina, LEA1, LEA3, i LEA5 proteinskih grupa (prilog 14).

Pored ova tri glavna elementa sekundarne strukture proteina, analizirana je i neuređenost. Nekoliko bioinformatičkih alata je predvidelo neuređenu strukturu za više od 50 % sekvence kod više od 55 % identifikovanih LEA proteina (prilog 14). Zaista, za više od 92 % LEA proteina srpske ramonde (s izuzetkom LEA2 grupe) predikcija je pokazala visoku neuređenost. Poređenje sedam grupa LEA proteina pokazano je da, u proseku, dehidrini (posebno članovi DEH1) i LEA1 proteini imaju najveću neuređenost (87–97 % sekvence), zatim slede proteini grupa LEA4 (80–83 % sekvence) i LEA5 (prilog 14). Suprotno tome, članovi LEA2 proteinske porodice imaju najjači hidrofobni efekat i najniži stepen neuređenosti (22 % sekvence).

Predstavljeni podaci su u pozitivnoj korelaciji sa predikovanim brojem i veličinom globularnih domena (prilog 14). Predviđeno je da svi članovi LEA2 grupe formiraju po jedan globularni domen, koji zauzima između 94 % i 96 % sekvence u slučaju svih LEA2 proteina, osim podgrupe LEA2.4. Nasuprot tome, nijedan globularni domen nije bio predviđen među dehidrinima, LEA1 i LEA4.1. U okviru podgrupe LEA4.2, kod 11 od 35 članova, i unutar podgrupe LEA4.3, kod 7 od 47 članova, bioinformatička analiza je predvidela formiranje jednog globularnog domena. Za gotovo 83 % članova porodice proteina LEA3 predviđeno je da se uvijaju u jedan globularni domen, dok je za 35

% proteina koji pripadaju SMP grupi predviđeno da su strukturno organizovani u jedan ili dva globularna domena.



Slika 38. Modelovanje α -heliksa detektovanih MEME motiva LEA proteina srpske ramonde. Heliksna projekcija je napravljena pomoću HeliQuest softvera (Gautier i sar. 2008). Svaki krug zavojnice se sastoji od 11 aminokiselina. Strelica pokazuje heliksni hidrofobni momenat. α H, predviđeni procenat zastupljenosti α -heliksa prema FELLs softveru; n.d., nije detektovano.

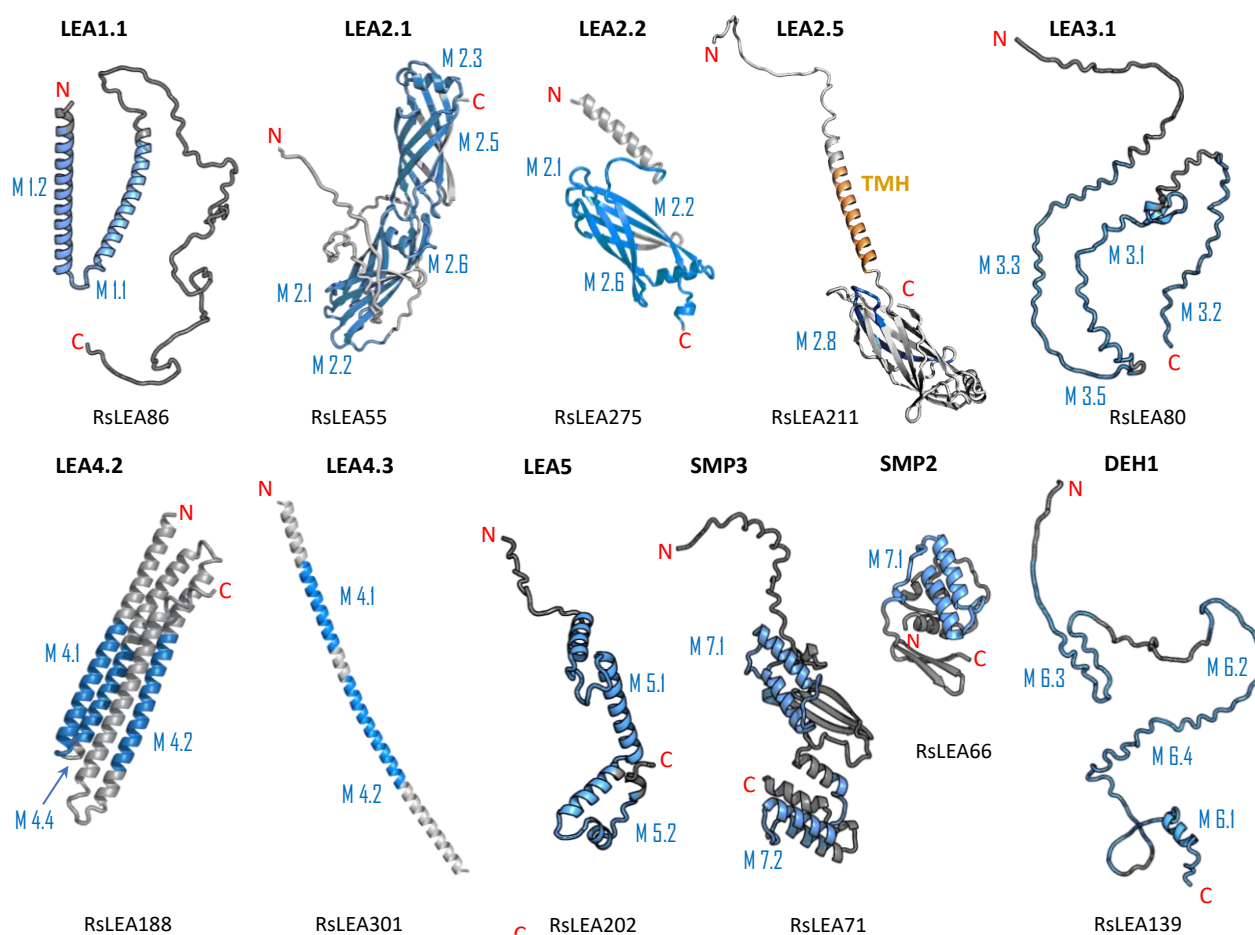
Dobijene *in silico* informacije su ključne za razumevanje funkcije LEA proteina i njihovog eventualnog prelaska iz neuređene u uređenu strukturu tokom desikacije. Kako bi se dobio uvid u strukturne osobine LEA proteina, korišćenjem *AlphaFold3* programa predviđena je struktura sedam predstavnika LEA proteinskih grupa (slika 39 i prilog 25).

Kao što je već pokazano prediktorima sekundarne strukture, u RsLEA86 proteinu, članu LEA1 grupe, uočeno je prisustvo dva karakteristična α -heliksna motiva, M1.2 i M1.1 na N-terminusu, i neuređena struktura na C-terminusu. Šesnaest članova LEA2.1 predstavljeno je proteinom RsLEA55, koji sadrži M2.1, M2.2, M2.3, M2.5 i M2.6 motive najverovatnije organizovane u dva uzastopna „ β -bure“ domena na C-terminusu, dok je N-terminus neuređene strukture (slika 39). Za protein RsLEA211, predstavnik članova podgrupa LEA2.3, LEA2.4 i LEA2.5 predviđen je hidrofobni TMH praćen globularnom „ β -bure“ strukturom (slika 38). Razlike u strukturama proteina koji pripadaju gore navedenim podgrupama LEA2 proteinske grupe ogledaju se u N-terminalnoj neuređenosti, čija dužina varira u zavisnosti od dužine sekvence proteina.

Pored toga, članovi podgrupe LEA2.2, predstavljeni sa RsLEA275, takođe imaju tendenciju da formiraju „ β -bure“ strukturni domen na C-terminusu, dok na N-terminusu, dobijeni modeli ukazuju na visoku verovatnoću postojanja α -heliksa sastavljenog od 20 aminokiselinskih ostataka, slično kraćim članovima podgrupa LEA2.3–2.5. Suprotno ovim proteinima, α -heliks proteina RsLEA275 (LEA 2.2 protein) je najverovatnije amfipatičan, sa neto naelektrisanjem od +3, zbog prisustva četiri lizinska, jednog argininskog, jednog glutamatskog i jednog asparaginskog ostatka.

Osim grupa LEA1 i LEA2, pozitivna korelacija između rezultata predikcije sekundarne strukture i 3D modela pokazana je i za dehidrine, SMP, kao i proteine LEA4 i LEA5 grupe (slika 39). Visoka neuređenost bila je karakteristična za dehidrine, što je potvrđeno 3D modelom predstavnika RsLEA139 i višim vrednostima predviđene greške poravnanja (eng. *predicted aligned error*, PAE; prilog 25). Strukturne razlike unutar SMP grupe su ilustrovane kroz dva predstavnika: kraći RsLEA66 najverovatnije sadrži samo motiv M7.1, uvijen u kompaktni globularni domen koji uključuje sve tri sekundarne strukture, dok duži RsLEA71 sadrži oba motiva M7.1 i M7.2, kao i N-terminalnu neuređenost.

Izuzetno visoka verovatnoća formiranja α -heliksa, posebno A-tipa α -heliksa (prema *HeliQuest* softveru) pokazana je za članove grupe LEA4, RsLEA188 i RsLEA301. Članove LEA5 proteinske grupe predstavlja RsLEA202 protein, kod kog je pomoću *AlphaFold3* softvera pokazana skoro jednaka distribucija α -heliksa i neuređene strukture, uz vrlo mali procenat β -pločica i odsustvo globularnog domena. Kao predstavnik LEA3 grupe, RsLEA80 je uglavnom neuređen sa visokom PAE vrednošću (slika 39 i prilog 25).

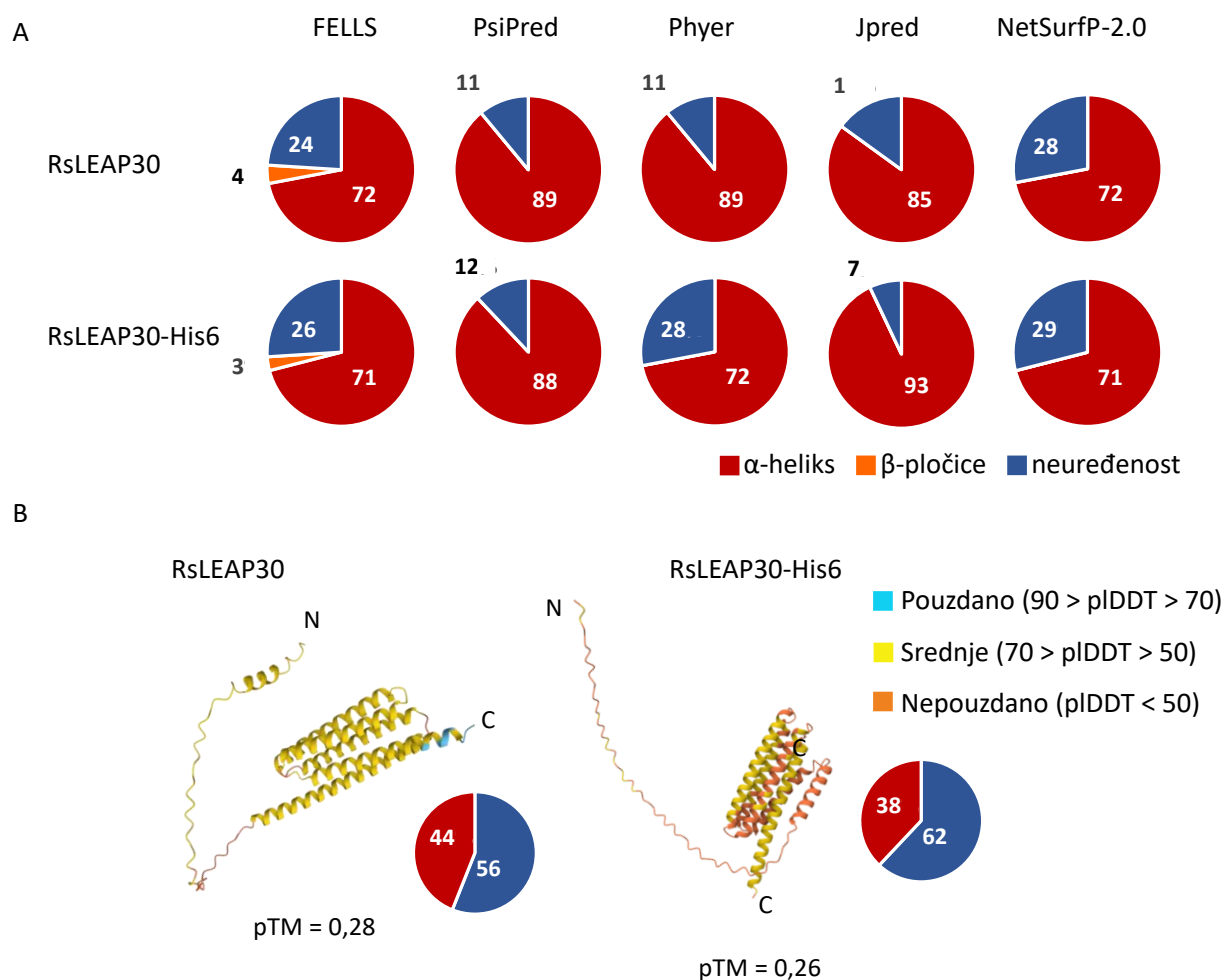


Slika 39. *AlphaFold3* predikcije 3D struktura reprezentativnih LEA proteina svake proteinske LEA grupe iz srpske ramonde. MEME motivi su označeni plavom bojom, transmembranski α -heliks (TMH) je obojen narandžastom bojom.

2.4.1 *In silico* procena uticaja His6 taga na strukturu LEA4 proteina

Na osnovu dobijenih podataka diferencijalne transkriptomike, proteomike i modelovanja strukture ramondinih LEA proteina, ova doktorska disertacija je usmerena na pripadnike LEA4.3 proteinske familije, jer je njihova sinteza bila najviše stimulirana tokom desikacije, što upućuje na njihovu značajnu ulogu u toleranciji na desikaciju (TD). Dodatno, *in silico* analizama strukture i lokacije je pokazano da mnogi proteini LEA4.3 grupe sadrže domene koji mogu da formiraju A-tip α -heliksa, što upućuje na njihovo specifično interagovanje sa amfipatičnim lipidnim dvoslojima, ali i sa specifičnim nepolarnim i/ili naelektrisanim površinama određenih proteina, polimera ili nukleinskih kiselina.

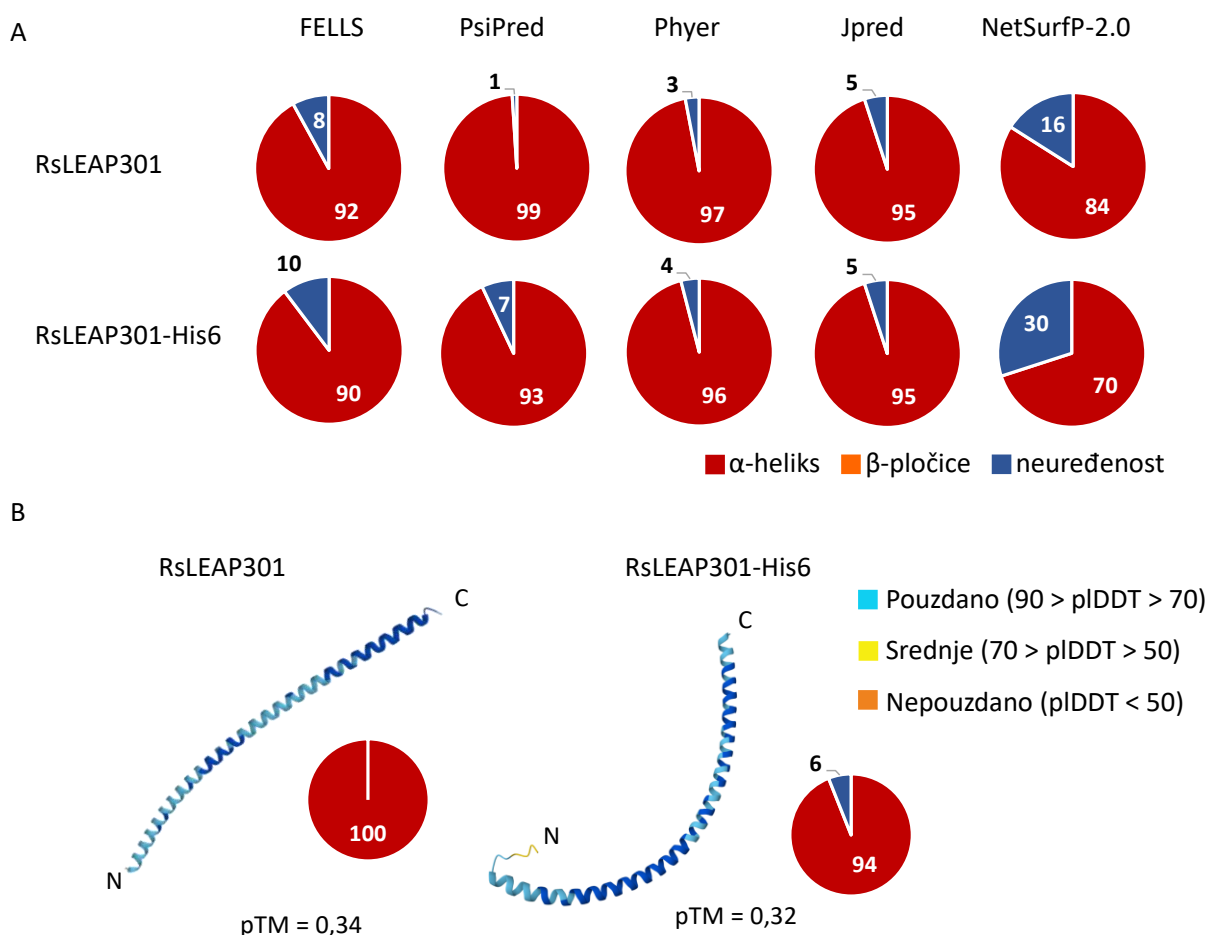
Na osnovu navedenih argumenata, odabrana su tri predstavnika LEA4.3 grupe, koja su proizvedena tehnikom rekombinantne DNK, kako bi se postigao visok prinos neophodan za buduće *in vitro* strukturne analize. Kako je za ove *in vitro* analize (nužne za buduću funkcionalnu karakterizaciju), neophodna visoka čistoća datog proteina, proizvedeni proteini su sadržali His-tag. Prisustvo His-taga značajno olakšava prečišćavanje rekombinantnih proteina koristeći imobilizovanu metal afinitetnu hromatografiju (IMAC), gde se dobija značajna količina relativno čistog proteina u jednom koraku. Nedostatak ove strategije je to što His-tag, odnosno dodatnih šest histidinskih ostataka može da ima uticaj na njihovu nativnu strukturu. Zato je bilo presudno da se pre proizvodnje, ispita uticaj His-taga na nativnu strukturu odabranih LEA4 proteina.



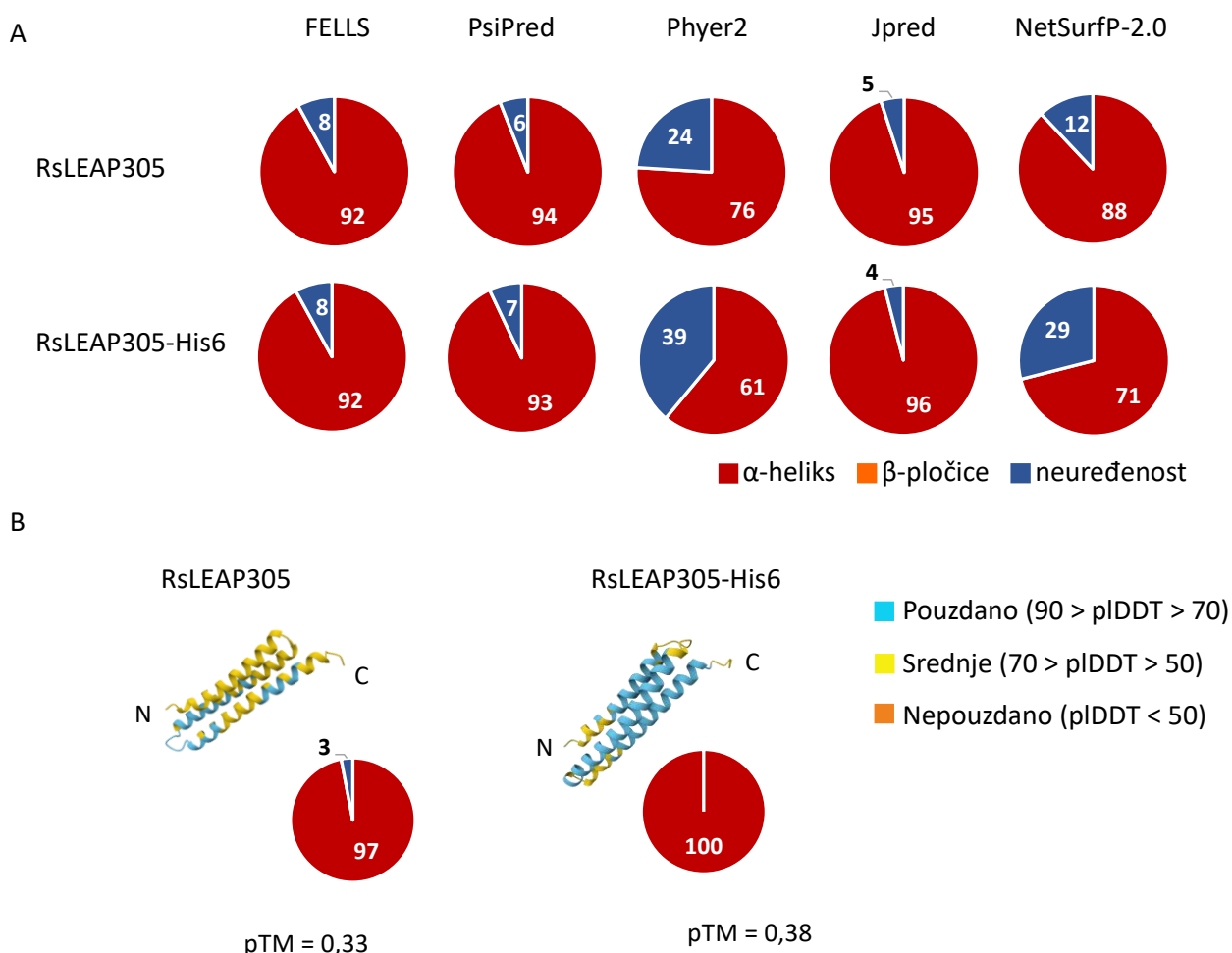
Slika 40. Analiza predviđanja sekundarne (A) i 3D (B) strukture RsLEAP30 i RsLEAP30-His6 proteina. Procenat sekundarne strukture (α -heliks, β -pločice i neuređenost) prema sledećih pet prediktora: *FELLS*, *PSIPRED*, *Phyre2*, *Jpred4*, *NetSurfP*. Predviđeni 3D modeli RsLEAP30 i RsLEAP30-His6, nivo pouzdanosti i doprinos elemenata sekundarne strukture (α -heliks i nasumična zavojnica) prema *AlphaFold3*. pLDDT, mera lokalne pouzdanosti po aminokiselinskom ostatku; pTM, predviđeni rezultat modelovanja po templatu.

Predviđanja su pokazala da u slučaju sva tri proteina, ne dolazi do značajne promene u strukturi što se može primetiti prema izračunatom procentu sekundarne strukture (slike 40, 41, 42). Najveće promene pokazuje softver *Phyre2* za RsLEA30 i RsLEA305 proteine sa i bez His-tag-a, kada se poredi procenat sekundarne strukture, međutim ta razlika nije veća od 20 %. Takođe, predviđanje lokalizacije je pokazalo da se RsLEA30 protein zajedno sa RsLEA301 proteinom nalazi u hloroplastima, dok se RsLEA305 nalazi u jedru.

Kako je *in silico* pokazano da His-tag malo ili nimalo utiče na strukturu proteina, sva tri odabrana proteina su proizvedena sa His-tagom.



Slika 41. Analiza predviđanja sekundarne (A) i 3D (B) strukture proteina RsLEAP301 i RsLEAP301-His6 proteina. Procenat sekundarne strukture (α -heliks, β -pločice i neuređenost) prema sledećih pet prediktora: *FELLS*, *PSIPRED*, *Phyre2*, *Jpred4*, *NetSurfP*. Predviđeni 3D modeli RsLEAP301 i RsLEAP301-His6 proteina, nivo pouzdanosti i doprinos elemenata sekundarne strukture (α -heliks i nasumična zavojnica) prema *AlphaFold3*. pI_{DDT}, mera lokalne pouzdanosti po aminokiselinskom ostatku; pTM, predviđeni rezultat modelovanja po templatu.

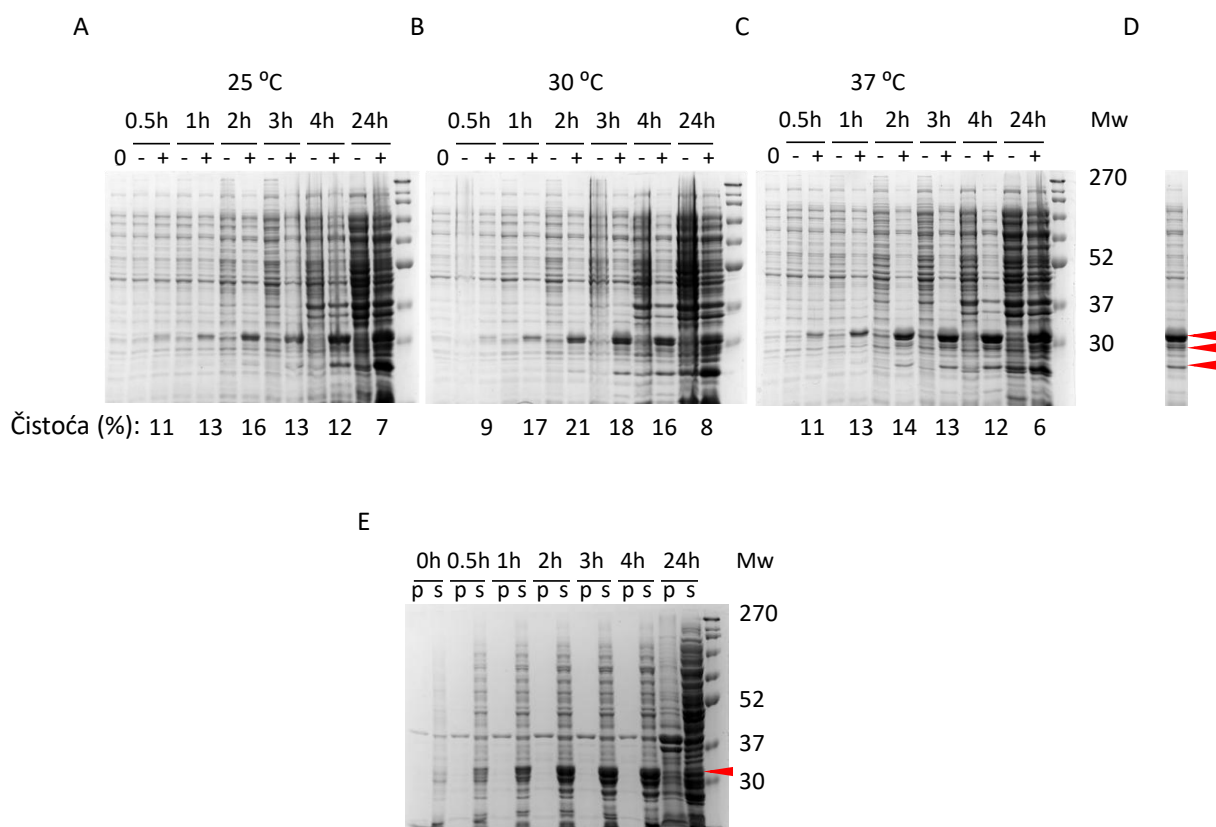


Slika 42. Analiza predviđanja sekundarne (A) i 3D (B) strukture RsLEAP305 i RsLEAP305-His6 proteina. Procenat sekundarne strukture (α -heliks, β -pločice i neuređenost) prema sledećih pet prediktora: *FELLS*, *PSIPRED*, *Phyre2*, *Jpred4*, *NetSurfP*. Predviđeni 3D modeli RsLEAP305 i RsLEAP305-His6 proteina, nivo pouzdanosti i doprinos elemenata sekundarne strukture (α -heliks i nasumična zavojnica) prema *AlphaFold3*. pLDDT – mera lokalne pouzdanosti po aminokiselinskom ostatku; pTM, predviđeni rezultat modelovanja po templatu.

2.4.4 Proizvodnja odabranih LEA4 proteina tehnologijom rekombinantne DNK

Jedan od ciljeva ove teze je bila strukturna i funkcionalna karakterizacija LEA proteina. LEA proteini su proizvedeni tehnologijom rekombinantne DNK u *E. coli* ćelijama. Sva tri proteina su obeležena hekso His-tagom, i strukturno *in vitro* okarakterisana koristeći spektroskopiju cirkularnog dihroizma (CD), a pretpostavljena im je i zaštitna fiziološka uloga tokom desikacije. Urađena je optimizacija proizvodnje RsLEA30-His6 proteina, i taj protokol je uspešno primenjen i na proizvodnju RsLEA301-His6 i RsLEA305-His6 proteina.

Ekspresija RsLEA30-His6 proteina (teorijska Mw: 28 kDa) rađena je u *E. coli* BL21(DE3). Analiza ekspresionog profila RsLEA30-His6 proteina, natrijum-dodecil-sulfat poliakrilamidnom gel elektroforezom (SDS-PAGE) pokazala je prisustvo tri proteinske trake (slike 43, B i C). Traka niže pokretljivosti (RsLEA30-His6_H) odgovarala je masi od 31,2 kDa, traka srednje pokretljivosti, RsLEA30-His6_M, odgovarala je masi od 29,5 kDa, dok je traka najviše pokretljivosti (RsLEA30-His6_L) odgovarala masi od 25,6 kDa. Ove trake nisu bile prisutne u neindukovanoj kontroli.



Slika 43. Optimizacija proizvodnje RsLEA30-His6 proteina tokom perioda od 24 h na temperaturama od 25 °C (A), 30 °C (B) i 37 °C (C). Količine RsLEA30-His6 proteina i ukupnih proteina *E. coli* kvantifikovane su pomoću *ImageJ* softvera. Oznaka: „0“ predstavlja proteine iz *E. coli* uzorkovane pre indukcije; „–“ uslovi bez dodatog IPTG; „+“ indukcija u prisustvu 1 mM IPTG; dok Mw označava molekulske markere (MWP06, NIPPON Genetics, Düren, Nemačka). Čistoća RsLEA30-His6 proteina izražena je kao odnos RsLEA30-His6 proteina prema ukupnim proteinima *E. coli*. Razdvajanje tri proteinske forme RsLEA30-His6 dobijenih na 37 °C, tri sata nakon dodatka IPTG (D). Tri proteinske forme RsLEA30-His6_H, RsLEA30-His6_M i RsLEA30-His6_L su označene crvenim strelicama. Provera solubilnosti RsLEA30-His6 tokom 24 h inkubacije na 37 °C (E), p, pelet; s, supernatant.

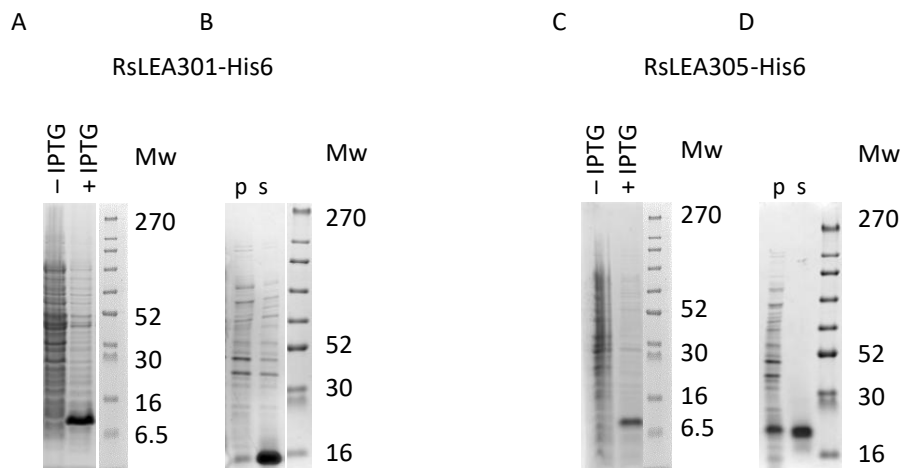
Zatim su optimizovani uslovi ekspresije (temperatura i vreme indukcije) za proizvodnju RsLEA30-His6 proteina na maloj skali. Na 25 °C, 30 °C i 37 °C dobijen je sličan prinos RsLEA30 (slike 43A, B, i C). Najveći nivo ekspresije primećen je nakon 24 h od indukcije (prilog 26), međutim, to je rezultiralo i značajnim porastom ostalih proteina *E. coli* na svim temperaturama. Najveći odnos RsLEA30-His6 proteina u poređenju sa ostalim proteinima domaćina primećen je nakon drugog i trećeg sata indukcije na 30 °C (slika 43B). Na 37 °C nakon tri i četiri sata dostignuta je najveća količina željenog proteina (64 % i 76 %, redom) uz sličan odnos RsLEA30-His6 proteina u odnosu na ukupne proteine *E. coli* (prilog 26).

Na osnovu prikazanih rezultata, trosatna indukcija na 37 °C je određena kao optimalni uslov za proizvodnju RsLEA30-His6 proteina u *E. coli* BL21 (DE3).

Da bi se proverila solubilnost eksprimiranog RsLEA30-His6 proteina pri optimalnim uslovima, talozi ćelija prikupljeni u različitim vremenskim intervalima su resuspendovani, lizirani i centrifugirani. Supernatanti i talozi su elektroforetski razdvajani, čime je pokazano je da se sve RsLEA30-His6 proteinske forme nalaze u solubilnoj frakciji, bez obzira na dužinu trajanja inkubacije (slika 43E).

Optimizovani protokol za proizvodnju RsLEA30-His6 (inkubacija 3 h nakon dodatka IPTG, na 37 °C), je primenjen i za proizvodnju druga dva proteina srpske ramonde obeležena His-tagom:

RsLEA301-His6 i RsLEA305-His6. Prinos i solubilnost ovih proteina proveravani su na isti način kao i u slučaju RsLEA30-His6 proteina (slika 44).



Slika 44. Provera ekspresije (A i C) i solubilnosti (B i D) RsLEA301-His6 i RsLEA305-His6 proteina. Mw, molekularni markeri (MWP06, NIPPON Genetics, Düren, Nemačka). p, pelet; s, supernatant; „–“ uslovi bez dodatog IPTG; „+“ indukcija u prisustvu 1 mM IPTG.

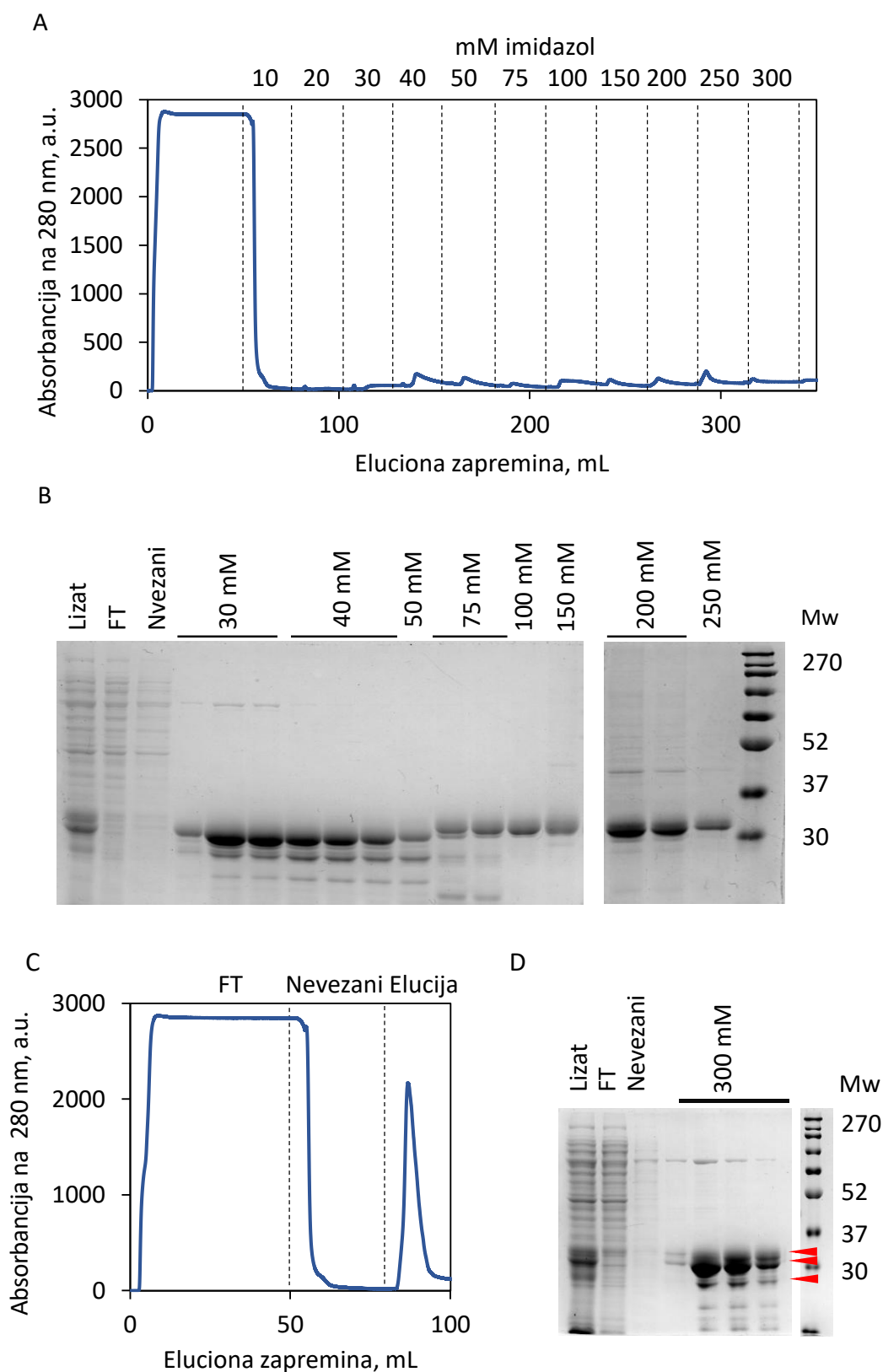
Dobijena je zadovoljavajuća ekspresija i RsLEA301 i RsLEA305 proteina, a takođe je pokazano da se oba proteina nalaze u solubilnoj frakciji (slike 44B i 44D)

2.4.5 Hromatografsko prečišćavanje odabranih LEA4 proteina

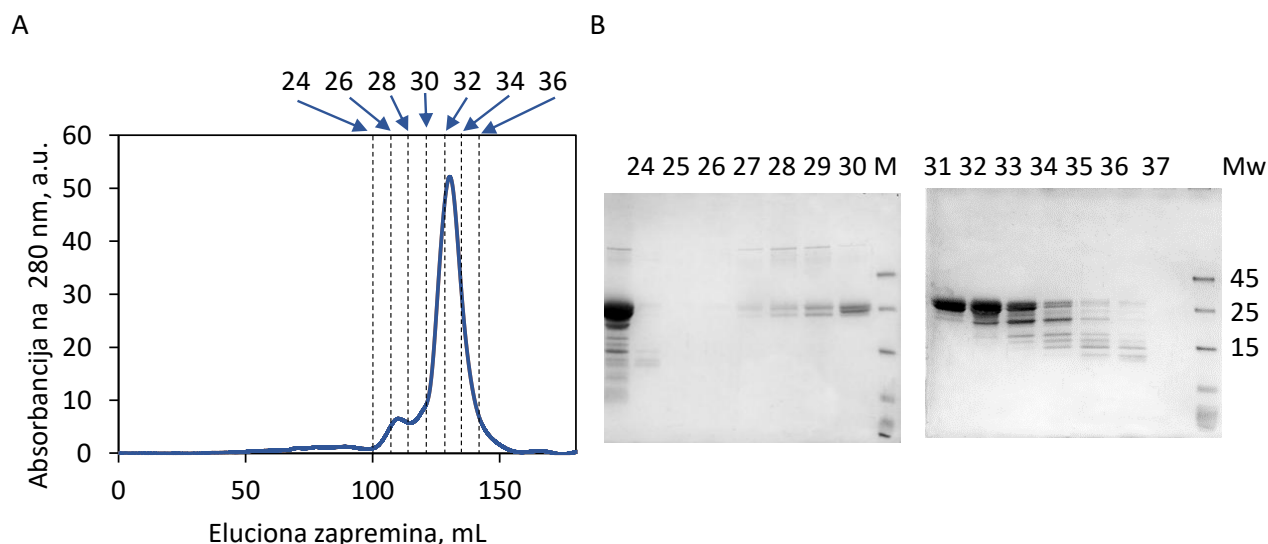
Sva tri proteina su obeležena His-tagom, te je za prečišćavanje izabrana IMAC hromatografija. Najpre je optimizovano hromatografsko prečišćavanje RsLEA30-His6 proteina, gde je pored IMAC korišćena i gel filtracija. Prečišćavanje RsLEA301-His6 i RsLEA305-His6 proteina je postignuto u jednom koraku, jer su dobijeni proteini pokazali zadovoljavajuću čistoću.

Kako bi se dobio što veći prinos RsLEA30-His6 proteina u prvom koraku prečišćavanja, uslovi eluiranja IMAC (gradijent 10–300 mM imidazola u ekvibracionom puferu) su optimizovani (slike 45A i 45B). Gradijentno eluiranje sa 30–50 mM imidazolom rezultiralo je eluiranjem proteina niske molekulske mase iz *E. coli*, zajedno sa proteinskim formama RsLEA30-His6_L i RsLEA30-His6_M. Pri koncentraciji imidazola od 75 mM, protein RsLEA30-His6_M je eluiran zajedno sa RsLEA30-His6_H formom. Najviši prinos RsLEA30-His6_H proteina postignut je elucijom imidazolom u koncentracijama iznad 200 mM (slika 45B).

Na osnovu prethodne optimizacije, izabrana je izokratska elucija 300 mM imidazolom (slike 45C i 45D), čime je bio obezbeđen visok prinos sve tri RsLEA30-His6 proteinske forme. Kao dodatni korak prečišćavanja i daljeg razdvajanja RsLEA30-His6_L, RsLEA30-His6_M i RsLEA30-His6_H formi na osnovu veličine, urađena je gel filtracija (slika 46). Ovo je omogućilo razdvajanje frakcija koje sadrže trake koje odgovaraju RsLEA30-His6_L, RsLEA30-His6_M i RsLEA30-His6_H proteinskim formama (slika 46).



Slika 45. Prečišćavanje RsLEA30-His6 proteina. IMAC optimizacija RsLEA30-His6 proteina (A) i SDS-denaturišući elektroforegram prikupljenih frakcija sa IMAC razdvajanja (B). Reprezentativni IMAC hromatogram elucije RsLEA30-His6 proteina. Pik koji sadrži RsLEA30-His6 proteinsku formu eluiran je 300 mM imidazolom (C); i SDS-denaturišući elektroforegram prikupljenih frakcija sa gel filtracije (D). Mw, molekularni markeri (MWP06, NIPPON Genetics, Duren, Nemačka), FT, frakcija koja je prošla kroz kolonu tokom nanošenja uzorka (eng. *flow-through*), “mM” predstavlja koncentraciju imidazola u elucionom puferu.



Slika 46. Drugi korak prečišćavanja tri forme RsLEA30-His6 proteina gel filtracionom hromatografijom. Hromatogram nakon gel filtracije za RsLEA30-His6 protein (A) i SDS-PAGE elektroforegram prikupljenih frakcija (B). Mw, molekularni markeri (MBS355494, MyBioSource, San Diego, Kalifornija).

Nakon elektroforetskog razdvajanja, frakcija iz najintenzivnijeg pika gel filtracije (frakcija 31) pokazala je dve trake koje blisko migriraju, i odgovaraju RsLEA30-His6_M i RsLEA30-His6_H proteinskim formama.

Tabela 11. Tabela prečišćavanja RsLEA30-His6 iz *E. coli*. Vrednosti su predstavljene kao prosečan broj grama proteina po gramu vlažne biomase $\pm$ standardna greška za tri nezavisne ekspresije i prečišćavanja.

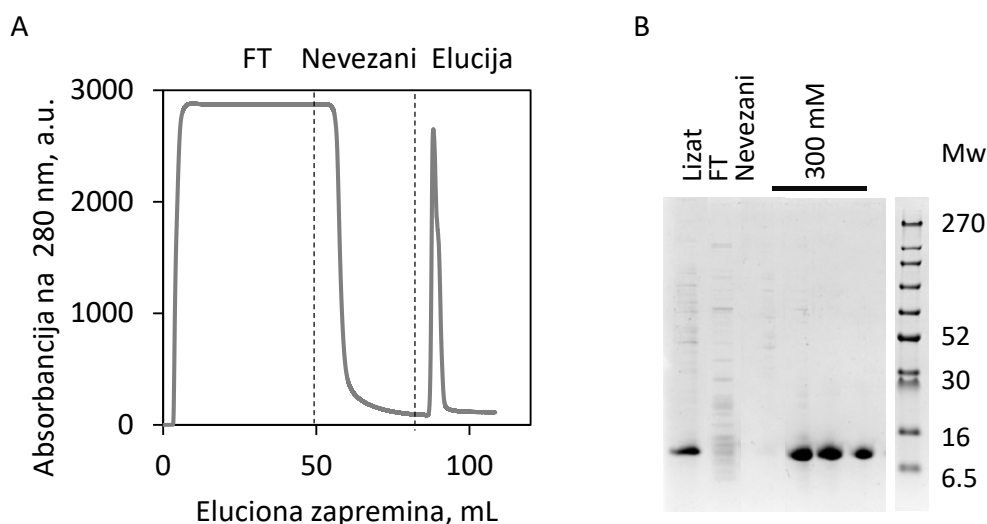
Frakcija	Ukupna masa proteina (mg)	Čistoća (%) ^a	Masa RsLEA30 (mg)	Prinos (%)
Lizat	21,1 $\pm$ 2,0	50,0 $\pm$ 5,1	10,6 $\pm$ 1,2	100,0
300 mM imidazol ^b	2,8 $\pm$ 0,4	71,4 $\pm$ 3,8	2,1 $\pm$ 0,3	19,8 $\pm$ 2,1
Frakcija 31 (GF ^c)	0,5 $\pm$ 0,1	97,0 $\pm$ 3,2	0,5 $\pm$ 0,1	4,4 $\pm$ 0,6

^a Čistoća RsLEA30-His6 tokom svakog koraka je određivana na osnovu SDS-elektroforegrama.

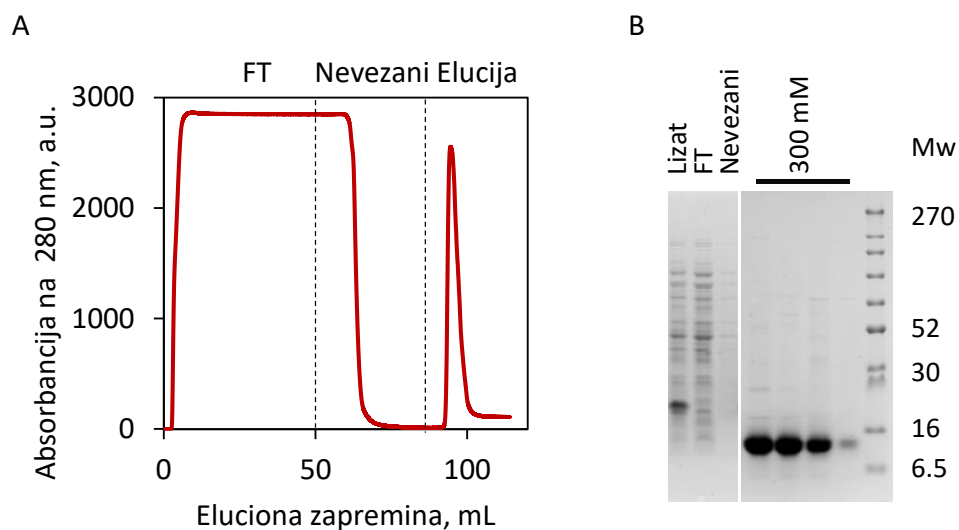
^b Spojene su frakcije dobijene elucijom u prisustvu 300 mM imidazola (slika 45D).

^c Gel filtracija

Konačno, dobijen je RsLEA30-His6, čistoće preko 95 % sa prinosom od 4 % (tabela 11).



Slika 47. Hromatografsko prečišćavanje RsLEA301-His6 proteina. Reprezentativni hromatogram (A) i SDS-PAGE elektroforegram prikupljenih frakcija (B). Mw, molekularni markeri (MWP06, NIPPON Genetics, Düren, Nemačka).



Slika 48. Hromatografsko prečišćavanje RsLEA305-His6 proteina. Reprezentativni hromatogram (A) i SDS-denaturišući elektroforegram prikupljenih frakcija (B). Mw, molekularni markeri (MWP06, NIPPON Genetics, Düren, Nemačka).

Rekombinantno proizvedeni i obeleženi proteini RsLEA301-His6 i RsLEA305 su, takođe, prečišćeni koristeći IMAC (slike 47 i 48). Nakon nanošenja uzorka i ispiranja nevezanih proteina, oba proteina su eluirana 300 mM imidazolom u ekvibracionom puferu (50 mM Tris pufer, pH 8,0).

Tabela 12. Tabela prečišćavanja RsLEA301-His6 i RsLEA305-His6 proteina iz *E. coli*. Vrednosti su predstavljene kao prosečan broj grama po gramu vlažne biomase $\pm$ standardna greška za tri nezavisne ekspresije i prečišćavanja.

Frakcija	Ukupna masa proteina (mg)	Čistoća (%) ^a	Masa proteina (mg)	Prinos (%)
RsLEA301-His6				
Lizat	42,3 $\pm$ 3,9	60,5 $\pm$ 2,8	25,4 $\pm$ 1,2	100,0
300 mM imidazol ^b	12,4 $\pm$ 0,2	95,7 $\pm$ 2,1	11,8 $\pm$ 0,7	46,9 $\pm$ 2,5
RsLEA305-His6				
Lizat	45,5 $\pm$ 5,0	59,2 $\pm$ 1,7	27,0 $\pm$ 3,0	100,0
300 mM imidazol ^b	7,3 $\pm$ 0,6	96,0 $\pm$ 2,1	7,0 $\pm$ 0,4	26,2 $\pm$ 3,0

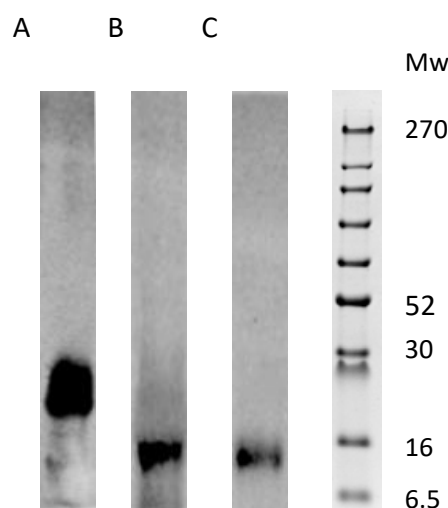
^a Čistoća proteina tokom svakog koraka je određivana na osnovu SDS-PAGE elektroforegrama.

^b Frakcije dobijene elucijom 300 mM imidazolom su spojene (slike 47B i 48B).

Kako su dobijeni proteini zadovoljavajuće čistoće (RsLEA301-His6 čistoće 95 % i RsLEA305-His6 čistoće 96 %) i visokog prinosa (RsLEA301-His6 protein 46 % i RsLEA305-His6 protein 26 %), dalja optimizacija proizvodnje i prečišćavanja nije rađena (tabela 12).

2.4.6 Validacija odabranih LEA4 proteina

Prisustvo His-taga je potvrđeno Vestern blot analizom (slika 49), a tačna masa je analizirana korišćenjem gel filtracije u kombinaciji sa rasipanjem svetlosti pod različitim uglovima (eng. *size exclusion chromatography-multiangle light scattering, SEC-MALS*). Takođe, sekvenca je potvrđena masenom spektrometrijom (MS).



Slika 49. Vestern blot analiza tri LEA proteina RsLEA30-His6 (A), RsLEA301-His6 (B) i RsLEA305-His6 (C), pomoću anti-His antitela. Mw, molekulski markeri (MWP06, NIPPON Genetics, Düren, Nemačka).

Tačna i precizna masa proteina RsLEA30-His6 iz frakcije 31, određena *SEC-MALS* analizom, iznosila je 24,64 $\pm$ 2,37 kDa, što značajno odstupa od teorijske molekulske mase proteina RsLEA30-His6 (28 kDa). Analiza čistih frakcija eluiranih 300 mM imidazolom, nakon rasoljavanja, pokazala

je masu od $12,2 \pm 2,1$ kDa za RsLEA301-His6 protein i $10,9 \pm 3,5$ kDa za RsLEA305-His6 protein, što je u skladu sa njihovim teorijskim masama (11,5 i 11,2 kDa, redom).

Za dalju karakterizaciju dve izoforme RsLEA30-His6 proteina, kao i za potvrdu sekvence RsLEA301-His6 i RsLEA305-His6 proteina korišćen je „*bottom-up*“ proteomski pristup pomoću MS. Ova analiza je potvrdila 95 % aminokiselinske sekvence proteina RsLEA30-His6H i 90 % aminokiselinske sekvence proteina RsLEA30-His6M. Pošto je kod obe izoforme pokrivenost sekvence bila veća od 90 %, frakcija 31 je smatrana pogodnom za dalju analizu. Čiste frakcije eluirane 300 mM imidazolom, RsLEA301-His6 i RsLEA305-His6, pokazale su pokrivenost teorijske sekvence od 51 % i 94 %, redom.

2.4.7 Strukturna karakterizacija odabranih LEA4 proteina *in vitro*

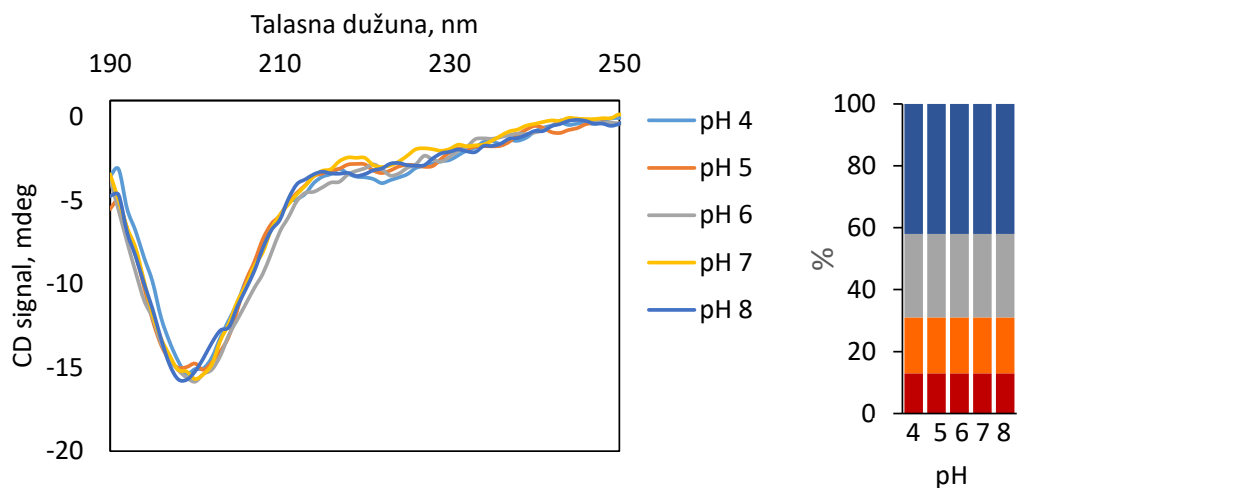
2.4.6.1 Analiza strukture LEA4 proteina spektroskopijom cirkularnog dihiroizma (CD)

Za eksperimentalno određivanje sekundarne strukture proizvedenih LEA4 proteina korišćena je spektroskopija cirkularnog dihiroizma (CD). Ispitane su sekundarne strukture sva tri dobijena RsLEA rekombinantna proteina pri različitim vrednostima pH (pH 4–8), u okruženju koje imitira membranu (SDS micelle, u koncentraciji SDS od 0,03 %) i u simuliranim uslovima desikacije, odnosno smanjenog prisustva vode (2,2,2-trifluoroetanol; TFE).

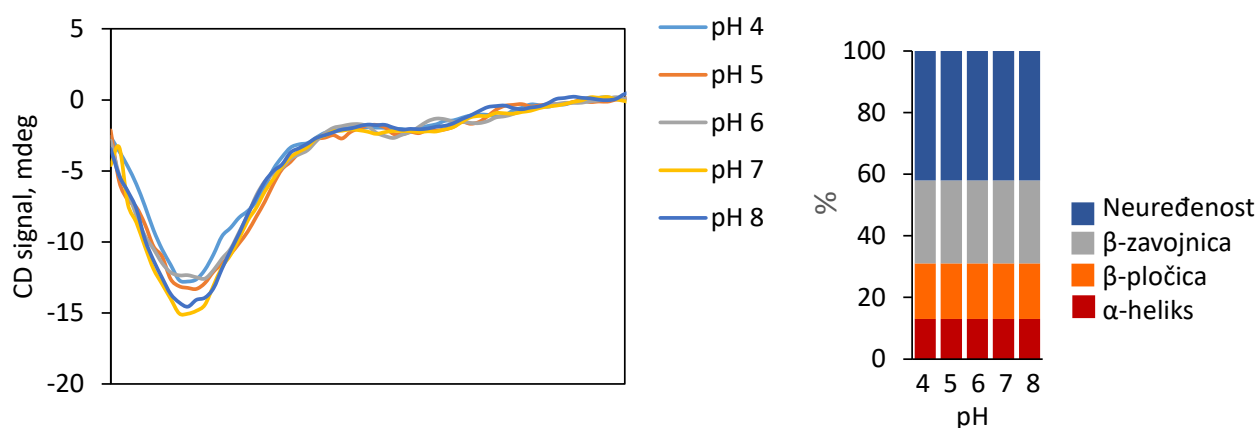
2.4.6.1.1 Uticaj različitih pH vrednosti na strukturu RsLEA proteina

Pri optimalnim fiziološkim uslovima (potpuna hidratacija), bez obzira na ispitivane pH vrednosti (4–8), CD spektri sva tri proteina su pokazali tipičan obrazac neuređenih proteina sa jednim upadljivim minimumom oko 200 nm i drugim, blažim minimumom na 222 nm, koji je karakterističan za α -helikse. Procenat sekundarnih struktura za sva tri proteina je izračunat pomoću *DichroIDP* softvera. Prema dobijenim CD spektrima i proračunu, 13 %, 27 %, 18 % i 42 % sekvenci sva tri proteina formira α -helikse, β -zavijutke, β -pločice i neuređene strukture, redom (slika 50), pri fiziološkim uslovima u pH opsegu od 4 do 8.

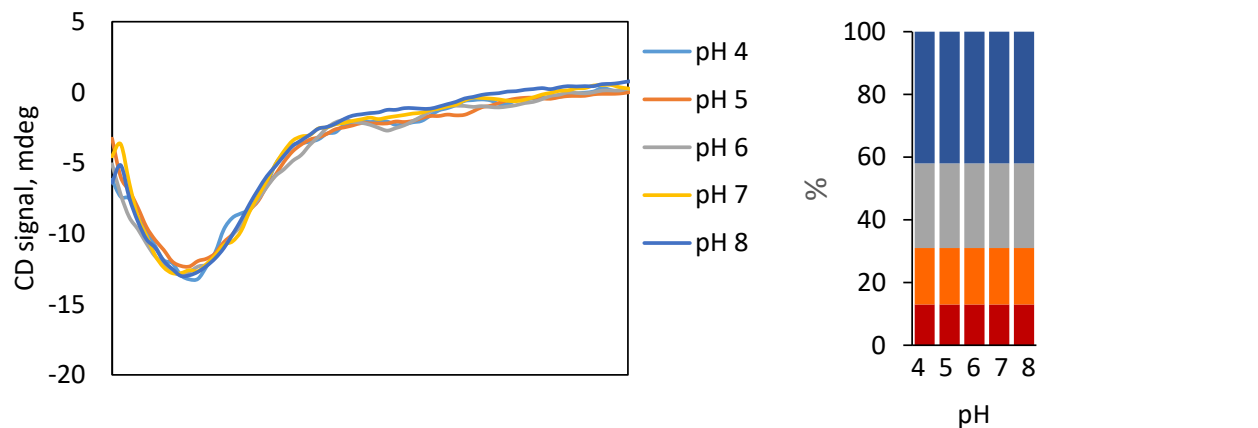
A



B



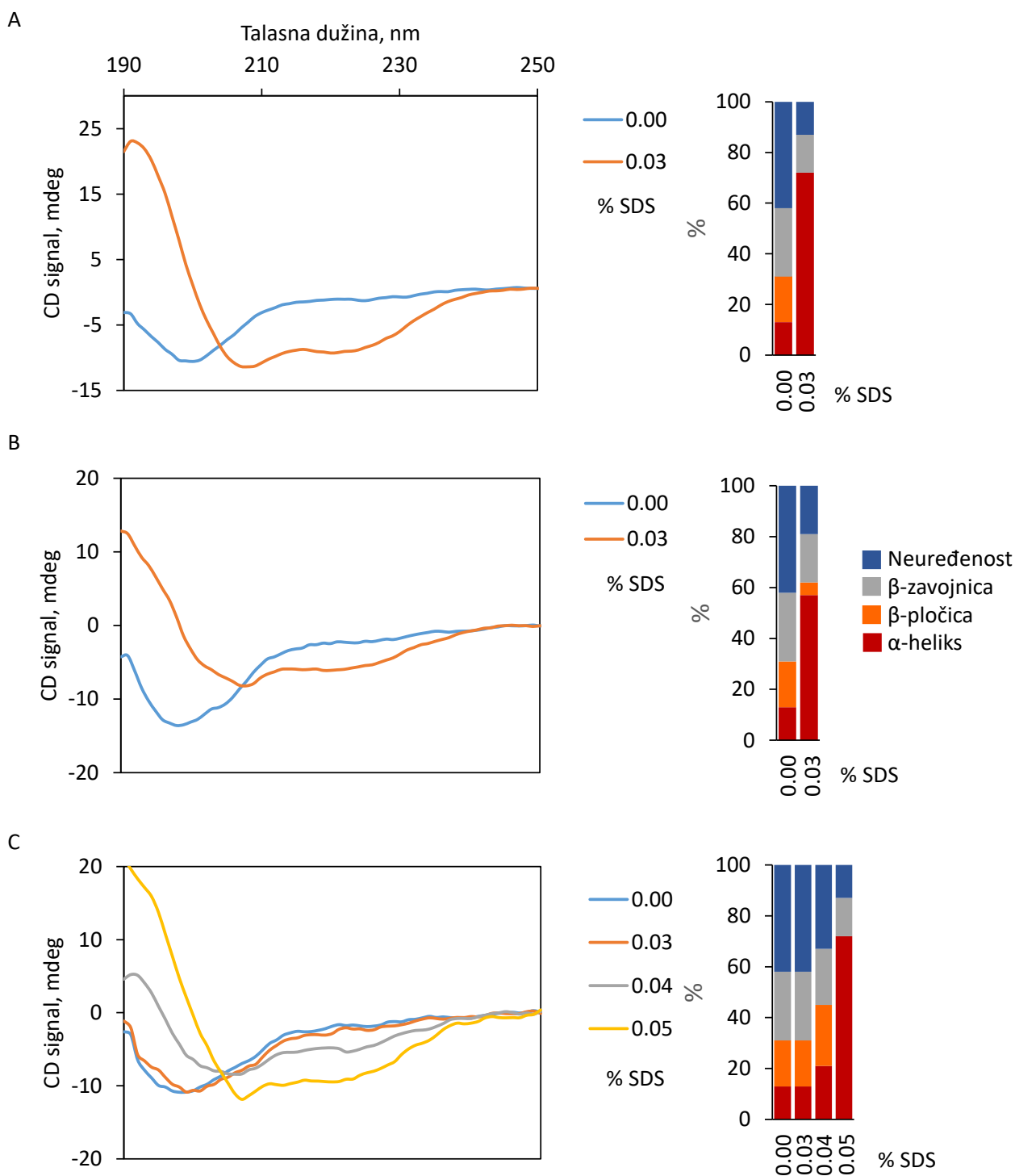
C



Slika 50. Uticaj različitih pH vrednosti na strukturu LEA proteina srpske ramonde: RsLEA30-His6 (A), RsLEA301-His6 (B) i RsLEA305-His6 (C). Procenat sekundarne strukture je određen *DichroIDP* softverom.

2.4.6.1.2 Uticaj prisustva membranskog mimetika na strukturu RsLEA4 proteina

Detedžent SDS je korišćen kao mimetik membrane. U njegovom prisustvu dolazi do značajnih promena u spektrima svih ispitivanih proteina (slika 51). U spektrima sva tri proteina, uočavaju se minimumi oko 209 nm i 220 nm. preciznije, primećeno je formiranje dva minimuma na 208 i 220 nm za RsLEA30-His6 protein, i 209 i 219 nm za RsLEA301-His6 protein tipična za α -heliks, što je tipično za α -heliks i u skladu sa proračunima dobijenim *DichroIDP* softverom.

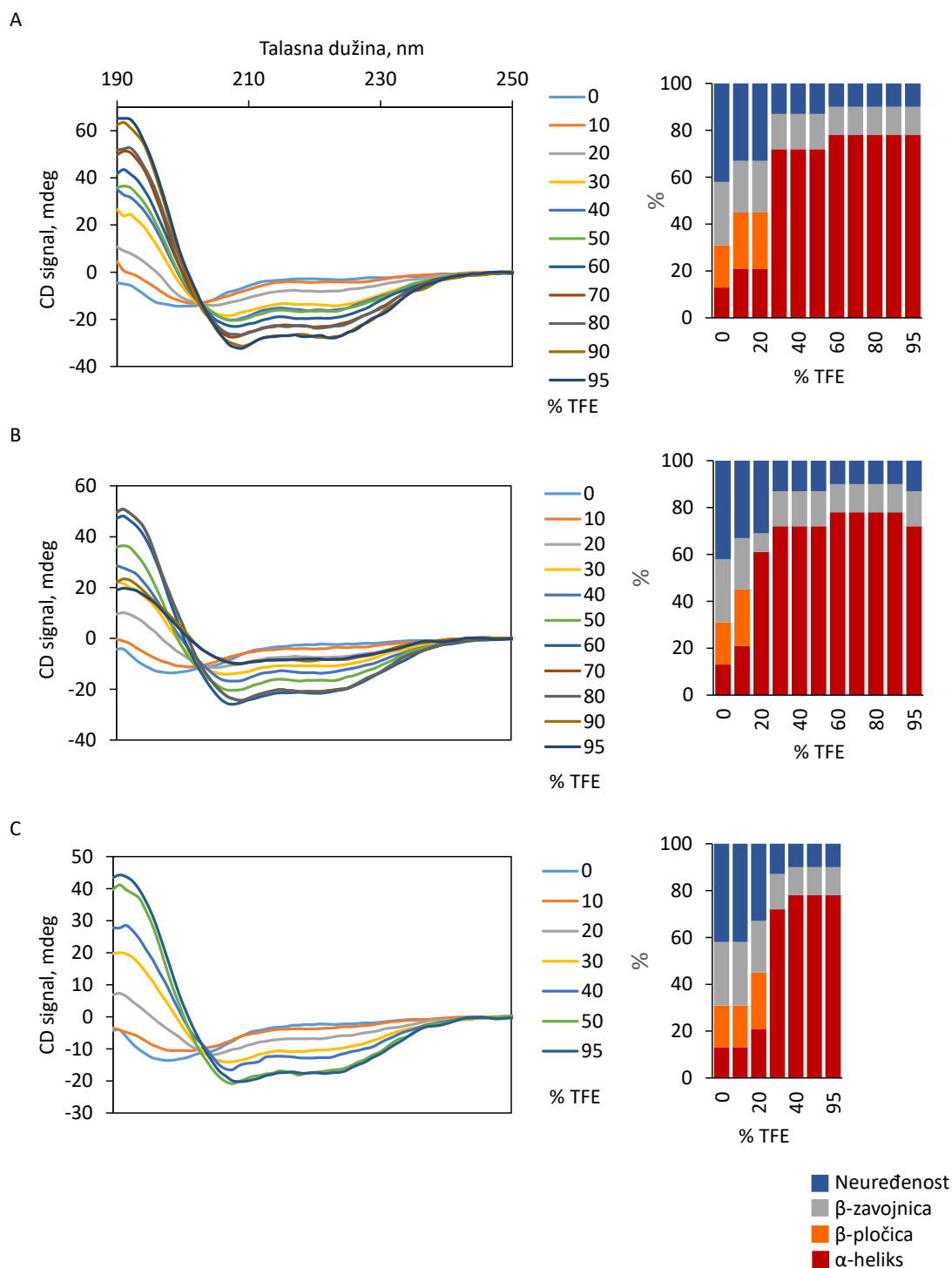


Slika 51. Uticaj prisustva membranskog mimetika na strukturu proteina ramonde RsLEA30-His6 (A), RsLEA301-His6 (B) i RsLEA305-His6 (C). Procenat sekundarne strukture je određen *DichroIDP* softverom.

Pri koncentraciji SDS od 0,03 %, kod RsLEA30-His6 72 % sekvence formira α -heliks (slika 51A), dok kod RsLEA301 taj udeo iznosi 74 % (slika 51B), Interesantno je da pri istoj koncentraciji SDS, spektri RsLEA305-His6 proteina ne pokazuju značajne promene. Tek se pri koncentracijama SDS većim od 0,04 % formira α -heliks (21 %), dok pri 0,05 % SDS taj procenat raste do 72 % (slika 51C).

2.4.6.1.3 Uticaj smanjene dostupnosti vode na strukturu RsLEA4 proteina

Za simulaciju uslova desikacije, sva tri LEA4 proteina ramonde su rastvorena u gradijentu koncentracija TFE. Kao posledica postepenog povećanja sadržaja TFE (posebno iznad 20 % za RsLEA301-His6 i 30 % za RsLEA30-His6 proteine), na CD spektrima sva tri proteina uočava se prelaz iz neuređene strukture u α -heliks. To se manifestuje kroz pomeranje minimuma sa 200 nm ka višim talasnim dužinama i konačno formiranje dva minimuma na oko 208 nm i 222 nm (RsLEA30-His6 protein, slika 52A), odnosno 208 i 219 nm (RsLEA301-His6, slika 52B).



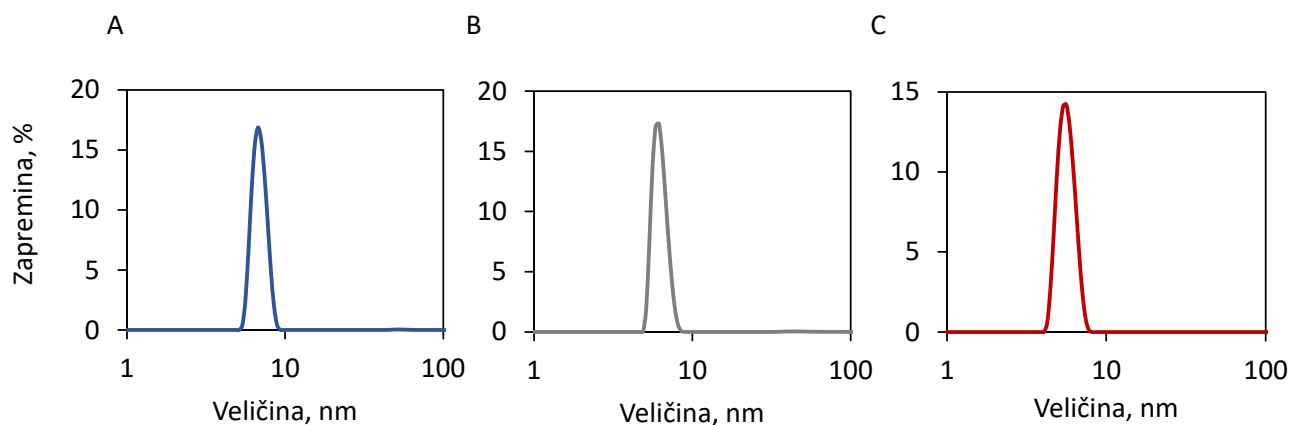
Slika 52. Uticaj smanjene dostupnosti vode na strukturu LEA proteina srpske ramonde: RsLEA30-His6 (A), RsLEA301-His6 (B) i RsLEA305-His6 (C). Procenat sekundarne strukture je evaluiran korišćenjem *DichroIDP* softvera.

Izračunati procenti sekundarnih struktura ukazuju na povećanje α -heliksniha na račun neuređenih elemenata kod RsLEA30-His6 proteina, gde je sa 30 % TFE zastupljenost α -heliksa iznosila 72 %, a sa 60 % TFE, ovaj udeo je porastao na 78 % (slika 52A). Značajno je pomenuti da kod RsLEA301-His6 proteina, već pri koncentraciji TFE od 20 % zabeleženo je 61 % α -heliksa, dok pri 50 % TFE procenat udela α -heliksa raste do 78 % (slika 52B).

Kao i kod prethodna dva proteina, i kod RsLEA305-His6 proteina dolazi do promene strukture sa povećanjem sadržaja TFE, gde neuređeni delovi prelaze u α -heliks, naročito pri koncentracijama većim od 30 %, kada se jasno izdvajaju minimumi na 208 i 219 nm (slika 52C). Analiza sekundarne strukture pokazala je porast udela α -heliksa i smanjenje neuređenih segmenata: na 30 % TFE formira se 72 % α -heliksa, dok je pri 40 % TFE taj udeo dostigao 78 % (slika 52C), taj udeo je ostao i pri koncentraciji TFE od 95 %.

2.4.6.2 Određivanje hidrodinamičkog radijusa LEA4 proteina metodom dinamičkog rasipanja svetlosti (DLS)

Hidrodinamički radijusi RsLEA30-His6, RsLEA301-His6 i RsLEA305-His6 proteina su određeni u 50 mM Tris puferu (pH 8,0) pri temperaturi od 25 °C. Dobijena prosečna veličina čestice za RsLEA30-His6 protein iznosi 6,75 nm, dok je za RsLEA301-His6 i RsLEA305-His6 proteine iznosi 5,88 i 5,36 nm, redom (slika 53).



Slika 53. Raspodela prosečne veličine čestica proteina srpske ramonde RsLEA30-His6 (A), RsLEA301-His6 (B), RsLEA3305-His6 (C), snimljena koristeći DLS metod.

3. DISKUSIJA

Predstavljeni rezultati deo su sveobuhvatne studije metaboličkih procesa uključenih u mehanizam tolerancije na desikaciju i naknadnog oporavka srpske ramonde, endemske biljke vaskrsnice. Kao tercijarni relik, srpska ramonda predstavlja odličan model za proučavanje vegetativne tolerancije na desikaciju (TD), fenomena koji se smatra ključnim korakom u evoluciji ranih kopnenih biljaka (Oliver i sar. 2005; Barthlott et al. 2022). Rezultati ove teze pokazali su da desikacija izaziva globalne metaboličke promene u listovima ramonde koje čine osnovu jedinstvene strategije tolerancije na vegetativnu desikaciju.

S obzirom na to da genom ramonde još uvek nije sekvenciran, generisanje pouzdane baze transkriptoma koje je ovde sprovedeno po prvi put, predstavljalo je preduslov za dalja proteomska i transkriptomaska istraživanja. Ova novoformirana baza obuhvata 68694 anotirana gena, čime je postavljen temelj za funkcionalnu genomiku ove vrste.

3.1 Glavni metabolički procesi odgovorni za toleranciju ramonde na desikaciju

3.1.1 Promene u fotosintetskim procesima ramonde tokom desikacije

Kao tipična homoiohlorofilna biljka otporna na desikaciju, srpska ramonda zadržava oko 63 % hlorofila *a*, kao i značajan deo hlorofila *b* i karotenoida, održavajući konstantan odnos hlorofila *a/b* (slika 10, Dražić i sar. 1999; Degl'Innocentii sar. 2008). Ova strategija joj omogućava brzi oporavak fotosinteze nakon rehidracije, ali istovremeno povećava rizik od prekomerne akumulacije ROS u PET lancu. Analiza transkriptoma i proteoma u ovoj studiji, pokazala je snažno smanjenje proteinskih subjedinica kompleksa za sakupljanje svetlosti, kao i proteina PS I, PS II i Rubisco tokom desikacije, što je u skladu sa podacima dobijenim iz dehidratiranih listova homoiohlorofilne biljke *C. plantagineum* (Xu i sar. 2021).

Glavna komponenta PS II je OEC, gde se odvija fotoliza vode. Proteini koji se nalaze u lumenu tilakoida i stabilizuju OEC poznati su kao „*oxygen-evolution enhancers*” (OEE). Poznato je da su fotosinteza i respiracija posebno podložne oksidativnom stresu tokom desikacije (Farrant 2000). Fiksacija CO₂ je ograničena usled zatvorenih stoma, što dovodi do preterano redukovano PET lanca (Xu i sar. 2021). U takvim uslovima se povećava prelazak elektrona na kiseonik u okviru Melerove reakcije na PS I, gde kiseonik služi kao akceptor elektrona iz PS I, umesto NADP⁺ (Challabathula i sar. 2018). Kod srpske ramonde, tri od četiri OEE proteina, kao i OEC prekursora su bila više zastupljena u DL nego u HL (slika 8), što je zabeleženo tokom desikacije i rehidracije kod fenotipski ramondi slične biljke vaskrsnice *B. hygrometrica* (Jiang i sar. 2007).

Na početku desikacije ramonde, fotohemijska efikasnost PS II (Φ_{Po}) bila je blago smanjena (slika 10), kao što je prethodno već pokazano kako za *R. serbica* (Rakić i sar. 2015) tako i za *H. rhodopensis* (Mihailova i sar. 2020). Međutim, kod druge biljke vaskrsnice *B. hygrometrica*, Φ_{Po} nije bio značajno pogođen na početku desikacije (Jiang i sar 2007). OJIP analiza brze kinetike fluorescencije hlorofila je pokazala da tokom desikacije kod srpske ramonde dolazi do smanjenja broja reakcionih centara u PS II, bez uticaja na P700 (PS I). Ovo se poklapa sa pokazanom inhibicijom aktivnosti PS II primećenom tokom desikacije kod *B. hygrometrica* (Jiang i sar. 2007) i sa kinetikom fluorescencije hlorofila snimljenom kod *H. rhodopensis* (Strasser i sar. 2010).

Sve u svemu, ova redistribucija prenosa elektrona sa linearnog PET na CET oko PS I indukovana dehidracijom predstavlja važan deo mehanizma odbrane PS II od pojačanog ekscitacionog pritiska, uz istovremeno održavanje fotosintetske sinteze ATP. Opisan prelazak sa linearnog PET na CET je predložen kao zaštitni mehanizam i kod drugih biljaka vaskrsnica, kao što su *Paraboea rufescens*

(Huang i sar 2000), *B. hygrometrica* (Tan i sar. 2017), *H. rhodopensis* (Mladenov i sar 2015) i *C. plantagineum* (Xu i sar. 2021).

3.1.2 Promene u energetskom metabolizmu tokom desikacije srpske ramonde

Ukupno smanjenje nivoa akumuliranih iRNK i/ili proteina uključenih u glikolizu u DL srpske ramonde je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim za biljnu vrstu *C. plantagineum* izloženu desikaciji (Xu i sar. 2021). Smanjena prisutnost tri izoforme PEPK tokom desikacije u listovima ramonde sugerise na umanjen fluks ugljenika iz procesa razgradnje glukoze/fruktoze u CTK. Dok pojačana ekspresija gena koji kodiraju šest malat-dehidrogenaza tokom rane desikacije kod biljke *C. plantagineum* (Xu i sar. 2021) upućuje na prelazak sa C3 na CAM fotosintezu (Markovska i sar. 1997), kod srpske ramonde je detektovan niži sadržaj dve izoforme malat-dehidrogenaze i dve izoforme malatnog enzima zavisnog od NAD. Ovi podaci sugerisu da je potrebno sprovesti dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo da li ramonda tokom desikacije prelazi na CAM metabolizam kao strategiju očuvanja ugljenika ili primenjuje drugačiji vid metaboličke kontrole.

Posebno je zanimljivo dvostruko povećanje količine enzima ALDH3 tokom desikacije (prilog 4). Slično ovde prikazanim rezultatima, Kirch i sar. (2001) su prijavili pojačanu sintezu plastidne ALDH3 tokom desikacije biljke *C. plantagineum*. Pomenuta ALDH3 pripada specifičnoj klasi biljnih ALDH i ima važnu ulogu u detoksikaciji, jer može dalje oksidovati aldehide srednje veličine koji su nastali peroksidacijom plastidnih lipida. Ovakva akumulacija ALDH3 u DL srpske ramonde ukazuje na snažan odbrambeni odgovor usmeren ka očuvanju integriteta hloroplastnih membrana od moguće lipidne peroksidacije izazvane akumulacijom ROS.

3.1.3 Odgovor osmoprotektanata tokom desikacije srpske ramonde

Adaptacija na gubitak vode u ćelijama podrazumeva povećanu biosintezu osmoprotektanata, kao što su prolin, šećerni alkoholi, saharoza, rafinoza i trehaloza koji se akumuliraju u mnogim tkivima (Farrant i Moore 2011; Olvera-Carrillo i sar. 2010). Kod srpske ramonde, koncentracija većine analiziranih solubilnih šećera, odnosno šećera rastvorljivih u vodi, bila je značajno povećana u DL u poređenju sa HL (tabela 2). Saharoza je identifikovana kao najzastupljeniji šećer rastvorljiv u vodi u listovima ramonde i akumulirala se tokom desikacije, kako je prethodno prijavljeno i u Živković i sar. (2005). Saharoza ima ključnu ulogu u osmotskoj zaštiti pri desikaciji i procesu vitifikacije citosola koje sprečava kolaps ćelijskih struktura (Oliver i sar. 2020). Prikazani rezultati se poklapaju sa podacima o povećanoj ekspresiji gena i povišenoj zastupljenosti proteina poput saharoza-sintaze (Ngwarai 2014), heksokinaze (Whittaker i sar. 2001), galaktinol-sintaze (Peters i sar. 2007) i mio-inozitol-1-fosfat-sintaze, koji su zabeleženi kod vrste *Xerophyta viscosa* (Lehner i sar. 2008). Slično kao kod srpske ramonde, koncentracije manitola, maltoze, galaktitola i trehaloze bile su povećane i u desikovanim listovima biljke *C. plantagineum* (Xu i sar. 2021).

Pored uloge osmoprotektanata, oligosaharidi mogu imati značajnu signalnu i antioksidativnu funkciju. Trehaloza i trehaloza-6-fosfat deluju kao signalni molekuli koji regulišu balans između razgradnje i biosinteze skroba (Vidović i sar. 2015). Blagi porast odnosa koncentracija glukoze i fruktoze u DL ukazuje na intenzivniju razgradnju skroba u poređenju sa hidrolizom saharoze. Ovo je u pozitivnoj korelaciji sa detektovanim povišenim koncentracijama maltoze i povećanom zastupljenosti enzima uključenih u katabolizam skroba (prilog 4). Pored toga, sadržaj rafinoze i nekoliko šećernih alkohola, koji mogu da uklanjaju HO[•] (Nishizawa i sar. 2008), znatno se povećao tokom desikacije srpske ramonde. Akumulacija prolina, važnog osmoprotektanta, takođe je u pozitivnoj korelaciji sa povećanom ekspresijom desikacijom indukovanih gena uključenih u njegovu biosintezu u DL srpske ramonde (prilog 3). Ovakva koordinisana metabolička reakcija omogućava biljci ne samo osmotsko prilagođavanje, već i očuvanje resursa za brzu reaktivaciju metabolizma nakon rehidratacije.

3.1.4 Metabolizam antioksidanata i fenola tokom desikacije srpske ramonde

Desikacija značajno utiče na komponente antioksidativnog sistema. Sve tri klase enzima SOD, Cu/Zn, Mn i Fe su identifikovane u listovima ramonde putem transkriptomске i proteomske analize, ali su samo četiri hloroplastne Cu/Zn SOD izoforme bile više zastupljene u DL u poređenju sa HL.

Glavni sistem za uklanjanje H_2O_2 u hloroplastima predstavlja Asc-GSH ciklus. Iako je povećana aktivnost APX tokom desikacije zabeležena kod biljaka vaskrsnice *C. wilmsii* i *X. viscosa* (Ingram i Bartels 1996), u listovima srpske ramonde u ovoj studiji nije uočen porast zastupljenosti ovog ključnog enzima Asc-GSH ciklusa. Imajući u vidu smanjenu zastupljenost enzimskih komponenti Asc-GSH ciklusa (slika 7), kao i tioredoksina, peroksiredoksina i glutathion-peroksidaza, uloga hloroplastnih Cu/Zn SOD postaje posebno važna za dismutaciju $O_2^{\bullet-}$ do H_2O_2 tokom desikacije. Štaviše, uloga 2-cistein peroksiredoksina kao glavne komponente „voda-voda“ ciklusa nameće se kao efikasna alternativa tilakoidnoj APX (Dietz i sar. 2016).

Listovi srpske ramonde su generalno izuzetno bogati fenolnim jedinjenjima (Gođevac i sar. 2022). Akumulacija polifenola u njenim listovima tokom desikacije, oksidativnog stresa prilikom rehidratacije, kao i tokom izlaganja UV-B zračenju je već detektovana (Vidović i sar. 2017; Veljović-Jovanović i sar. 2008; Sgherri i sar. 2004). Zajedno sa Asc, oko 40 % desikacijom indukovanih fenola (prilog 5) može doprineti uklanjanju H_2O_2 putem POD u vakuolama i apoplastu (Kukavica i sar. 2009).

Značajna akumulacija PPO izoformi pokazana u ovoj disertaciji u skladu je sa već pokazanim višestrukim povećanjem PPO aktivnosti i indukcijom novih PPO izoformi (Veljović-Jovanović i sar. 2008). Uz indukovane PPO, dve identifikovane kinon-oksidoreduktaze bi takođe mogle biti uključene u relaksaciju prekomerno redukovanoг PET lanca tokom desikacije. Pored toga, povećanje nivoa PPO proteina i njihove aktivnosti se smatra jednim od prvih odgovora na desikaciju i u listovima biljke vaskrsnice *B. hygrometrica* (Jiang i sar. 2007).

PPO je lokalizovana u lumenu tilakoida (Boeckx i sar. 2015), te je fizički odvojena od vakuole i apoplasta gde su smešteni njeni glavni endogeni supstrati (kafena i hlorogenska kiselina u slučaju PPO srpske ramonde; Veljović-Jovanović i sar. 2008). Njihova bliska fizička povezanost sa fotosistemima potkrepljuje hipotezu da PPO funkcioniše kao kiseonični pufer, trošeći kiseonik za generisanje o-difenola iz monofenola i njihovu dalju oksidaciju o-difenola u o-hinone (Boeckx i sar. 2015). Dodatno, PPO u kombinaciji sa Meler-peroksidaznom aktivnosti, može da koristi elektrone sa o-difenola za redukciju dehidroaskorbata u Asc. Ovaj mehanizam integrisan sa Asc-GSH ciklusom može favorizovati oksidaciju NADPH i na taj način relaksirati prekomerno redukovani plastohinonski rezervoar, sprečavajući foto-oštećenja.

3.1.5 Proteostatski odgovor tokom desikacije srpske ramonde

Sadržaj proteina u ćeliji direktno zavisi od ravnoteže između njihove biosinteze i degradacije u lizozomima i proteazomima (Ross i sar. 2021). Dobijeni proteomski podaci u ovoj studiji su nedvosmisleno pokazali povećanu translaciju proteina tokom desikacije. Pojačana sinteza proteina u ranim fazama desikacije je ranije prijavljena kod biljke vaskrsnice *B. hygrometrica* (Cuevas-Velazquez i sar. 2016), dok su procesi fosforilacije i defosforilacije proteina, kao ključni regulatorni mehanizmi, bili intenzivirani u biljci vaskrsnici *C. plantagineum* (Jiang i sar. 2007).

U listovima srpske ramonde, zastupljenost većine konstitutivnih proteina uključenih u fotosintezu, produkciju energije i inicijalno remodelovanje ćelijskog zida bila je snižena u DL. Nasuprot tome, 24 LEA proteina, šest GLP, tri PPO i četiri Cu/ZnSOD-a su bili značajno akumulirani u DL (slika 8). Prema tome, može se pretpostaviti da se visokozastupljeni fotosintetski proteini, kao i strukturni proteini ćelijskog zida (ekspanzini i ekstenzini) bogati prolinom, glicinom i polarnim aminokiselinama, ciljano recikliraju kroz proteazome kako bi se omogućili građivni elementi za brzu

de novo sintezu zaštitnih LEA proteina. Ovaj proces je podržan značajnom akumulacijom šaperona i ribozomalnih proteina u listovima ramonde tokom desikacije (Slika 8), koji osiguravaju pravilno savijanje i stabilnost novoformiranih proteina u uslovima ekstremnog gubitka vode.

3.2 Značaj akumulacije LEA proteina u srpskoj ramondi tokom desikacije: potencijalna fiziološka funkcija na osnovu strukturnih karakteristika

3.2.1 Promene u sadržaju i profilu LEA proteina tokom desikacije srpske ramonde

Indukcija ekspresije LEA proteina se smatra ključnim korakom vegetativne tolerancije na desikaciju biljaka vaskrsnica (Farrant 2007, Dirk 2020). Studije izvođene na nekoliko rekombinantno proizvedenih LEA proteina iz različitih vrsta, uključujući i model vrstu *A. thaliana*, ukazale su na njihovu višestruku ulogu u vezivanju vode, sekvestraciji jona, kao i stabilizaciji membrana i enzima tokom zamrzavanja ili desikacije (Candat 2014, Koag 2009).

U ovoj studiji, je identifikovano 433 transkripta koji kodiraju LEA proteine u listovima ramonde. Od toga je 88 gena bilo diferencijalno eksprimirano, pri čemu je 76 % bilo povećano, dok je 24 % bilo suprimirano tokom desikacije. Proteomska analiza je pokazala značajan porast zastupljenosti 24 LEA proteina u DL (prilog 4).

Analizom homologije aminokiselinskih sekvenci je utvrđeno da LEA proteini imaju najveći stepen sličnosti sa LEA proteinima biljke *Striga asiatica*, biljkom koja nije u bliskoj taksonomskoj vezi sa srpskom ramondom, ali je tolerantna na desikaciju i preferira relativno suva i neplodna tla Afrike i Azije. Zanimljivo je da je *S. asiatica* ABA-nesenzitivna biljka, koja održava stome otvorenim čak i u uslovima suše (Fujioka i sar. 2019).

Klasifikacija LEA proteina varira u literaturi poslednje tri decenije u zavisnosti od korišćenih kriterijuma (tabela 1; Hundertmark i Hinch 2008; Bies-Ethève i sar. 2008; Battaglia i sar. 2008; Bray i sar. 1993; Dure i sar. 1989). Dok su Hundertmark i Hinch (2008) u model vrsti *A. thaliana* identifikovali 51 LEA protein i podelili ih u devet grupa: LEA1-5, dehidrini, SMP, PvLEA18 i AtM, u pamuku je čak 242 LEA proteina identifikovano i klasifikovano u osam grupa, od LEA1 do LEA6, uključujući i dehidrine i SMP (Magwanga i sar. 2018). Interesantno je da grupa LEA6 proteina nije prisutna kod srpske ramonde (tabela 7), što je karakteristika zajednička sa pirinčem (Wang i sar. 2007). Poređenje sa drugim biljkama vaskrsnicama naglašava kompleksnost odgovora kod srpske ramonde; dok je da je u genomu biljke vaskrsnice *C. songorica* identifikovano samo 44 LEA gena (Muvunyi i sar. 2018), kod druge dve biljke vaskrsnice: *C. plantagineum* i *D. hygrometricum* prijavljeno je samo 16, odnosno 21 LEA protein. Ovako visok broj identifikovanih transkripata u našoj studiji sugerše izuzetno diversifikovan zaštitni sistem kod srpske ramonde

U skladu sa podacima dobijenim za srpsku ramundu predstavljenim u ovoj studiji, najprisutnija grupa LEA proteina kod pamuka je bila LEA2 (Magwanga i sar. 2018), obuhvatajući 65 % svih LEA proteina u dok kod srpske ramonde ona čini 40 %. Štaviše, u nedavnim sveobuhvatnim analizama 60 biljnih genoma (koji nisu uključivali biljke vaskrsnice), takođe je potvrđeno da je familija LEA2 najbrojnija (oko 65%), dok je LEA5 mala familija sa udelom od svega 3,2%, što je u saglasnosti sa nalazima predstavljenim u ovoj tezi (Artur i sar. 2019). Filogenetska analiza LEA proteina srpske ramonde pokazala je da su grupa LEA2 i podgrupa LEA3.1 proteina pojavile kao poslednje u evolucionom nizu (pod)grupa LEA proteina (prilog 7). Veliki broj paraloga — blisko povezanih gena sa sličnim motivima — mogao bi biti posledica dupliranja celog genoma i endoreplikacije u genomu srpske ramonde, što je česta pojava kod tercijarnih relikata (Nagaraju i sar. 2019). Ovo dodatno naglašava značaj velike raznolikosti LEA proteina drevne srpske ramonde, u poređenju sa ostalim biljnim vrstama, uključujući i vaskrsnice, koja je očuvana tokom evolucije (Candat i sar. 2014).

Literaturni podaci ukazuju na to da se biljni LEA proteini mogu naći u različitim unutarćelijskim odeljcima, uključujući citosol (Ingram i sar. 1996), hloroplaste (Ndong i sar. 2002), mitohondrije

(Tolleteer i sar. 2010) i jedro (Wise i sar. 2004; Hara i sar. 2009). U ovoj studiji je po prvi put sprovedena kompjuterska predikcija lokalizacije LEA proteina ramonde (korišćenjem softvera *WoLF PSORT*, *pProwler* i *TargetP*), koja je pokazala njihovo prisustvo u svim ćelijskim odeljcima. Posebno je značajan rezultat, po prvi put prikazan u ovoj tezi, koji dokazuje prisustvo članova grupe LEA4 u ćelijskom zidu listova jedne biljke vaskrsnice, uz njihovu izrazitu indukciju tokom desikacije (slika 22; tabela 5). Do sada su jedini LEA proteini detektovani u apoplastnom prostoru bili članovi grupe LEA1 kod biljke vaskrsnice *X. humilis* (XhLEA1-4S1 i XhLEA1-1S2; Ginbot, 2011), dok je za proteine XsLEA4-8 i XsLEA4-12 kod vrste *X. viscosa* predviđena, ali ne i eksperimentalno potvrđena lokalizacija u ćelijskom zidu (Artur i sar. 2019).

Sveprisutna distribucija LEA proteina u listovima srpske ramonde omogućava stabilizaciju makromolekula u celoj ćeliji, što je neophodno za uspešnu TD. Iako kompjuterske predikcije unutarćelijske lokalizacije proteina pružaju važne uvide za buduće *in vivo* eksperimente, treba napomenuti da visoka tačnost predviđanja zavisi od algoritama i specifičnosti model sistema.

3.2.2 Karakterizacija pojedinačnih grupa LEA proteina srpske ramonde – *in silico* pristup

Iako je opštepoznato da su LEA proteini ključni činioci tolerancije na vegetativnu desikaciju, mehanizmi njihovog delovanja još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (Dirk i sar. 2020; Zhang i sar. 2018). Jedan od ciljeva ove teze je bio da se na osnovu fizičko-hemijskih i strukturnih svojstava, kao i nivoa ekspresije odnosno zastupljenosti, predlože moguće fiziološke funkcije LEA proteina svake podgrupe tokom desikacije. Visoka strukturna fleksibilnost karakteristična za prirodno neuređene proteine otežava eksperimentalno određivanje njihove trodimenzionalne strukture, čemu svedoči relativno mali broj deponovanih struktura ovakvih proteina u *Protein Data Bank (PDB)* bazi podataka (Berman i sar. 2000). Stoga *in silico* analiza prirodno neuređenih proteina predstavlja esencijalan alat u predikciji i evaluaciji njihove sekundarne strukture i funkcionalnih domena.

3.2.2.1 Dehidrini

Dehidrini se karakterišu prisustvom visoko konzerviranog polilizinskog, tzv. K-segmenta (EKKGIMDKIKEKLPG; Hundertmark i Hinch 2008; Bhattacharya i sar. 2019; Mouillon i sar. 2006; Koag i sar. 2009), koji je identifikovan i u proteinima DEH1 podgrupe srpske ramonde (prilog 22). Eksperimentalno je potvrđeno da je K-segment ključan za interakciju sa anjonskim fosfolipidnim vezikulama (Koag i sar. 2009) i predloženo je da služi kao „polarni patent- zatvarač“ u interakciji sa DNK (Wise i sar. 2004). Takođe, visok sadržaj lizina, detektovan u članovima proteinskih grupa DEH i LEA4, je u pozitivnoj korelaciji sa predviđenom, pretežno jedarnom lokalizacijom (slika 36).

Dehidrini srpske ramonde su takođe bogati histidinskim ostacima, što je u skladu sa dehidrinima iz model biljke *A. thaliana* (Koag i sar. 2009) i biljke *Citrus unshiu* (Hara i sar. 2009). Histidinski ostaci preko imidazolske grupe koordinišu katjone metala (kao što su: Fe^{3+} , Ni^{2+} i Cu^{2+}), koji su često u interakciji sa negativno naelektrisanim makromolekulima (Ueda i sar. 2003; Hanin i sar. 2011). Zaista, heliranje Zn^{2+} histidinskim ostacima predstavlja preduslov za efikasno vezivanje dehidrina za DNK (Hara i sar. 2009).

Dodatno, dehidrini sadrže tirozinske i serinske (Y- i S-) segmente, (služe i kao mesta fosforilacije) koji se takođe koriste za njihovu klasifikaciju (Nagaraju i sar. 2019; Muvunyi i sar. 2018; Malik i sar. 2017). Oba ova segmenta su pronađena kod dehidrina srpske ramonde, posebno u DEH1 proteinskoj podgrupi (prilog 22). Pokazano je da je fosforilovani S-segment odgovoran za translokaciju dehidrina iz citoplazme u jedro (Goday i sar. 1994), a takođe povećava kapacitet proteina da vezuje Ca^{2+} (Alsheikh i sar. 2003).

Od svih LEA proteina ramonde, dehidrini (naročito članovi DEH1 podgrupe) imaju najveću sklonost ka zauzimanju neuređene strukture (prilog 26). Ovo je u skladu s literaturnim podacima, po kojima dehidrini imaju visoku konformacionu dinamiku u rastvoru (Malik i sar. 2017), dok u kontaktu sa

lipidnim membranama mogu da formiraju delimičnu heliksnu strukturu (Clarke i sar. 2015). Za protein RsLEA139 je predviđeno da je skoro potpuno neuređen u vodenom rastvoru (97 %; slika 39), što sugerise na njegovu moguću ulogu u LLPS, i posledično formiranje proteinskih kondenzata. Slično ponašanje je eksperimentalno potvrđeno i za dva LEA proteina biljke *A. thaliana*, čija je struktura takođe predviđena da bude gotovo potpuno neuređena (Ginsawaeng i sar. 2021). Prema tome, protein RsLEA139, koji je pojačano eksprimiran tokom desikacije i predviđen da se nalazi u jedru, mogao bi biti uključen u dinamiku nastajanja jedarnih biokondenzata, kao što su jedarna telašca i hromatinske strukture (Peng i sar. 2019), predstavljajući tako deo regulatornog mehanizma ekspresije gena tokom desikacije.

Svi članovi DEH1 proteinske grupe, kao i sedam DEH2 proteina označeni su kao hidrofilini (sadržaj glicina > 6 %; GRAVY indeks < 1; slika 34, Jaspard i Hunault 2014). Šest od deset članova gena DEH1 i jedan DEH2 značajno su povećani tokom desikacije, što ukazuje da imaju značajnu ulogu u zaštiti ćelijskih komponenti pri osmotskom stresu (Battaglie i sar. 2008; Malik i sar. 2017). Iako njihova precizna biohemijska funkcija *in vivo*, ostaje predmet budućih istraživanja, *in vitro* studije su pokazale da dehidrini mogu da deluju kao „molekulski štitovi“, sprečavajući agregaciju proteina, inaktivaciju enzima i destabilizaciju DNK i membrana tokom izlaganja ekstremnim temperaturnim oscilacijama (Liu i sar. 2017; Graether i sar. 2014).

3.2.2.2 LEA1 proteini

Članovi LEA1 grupe proteina srpske ramonde karakterišu se visokom hidrofilnošću i strukturnom neuređenošću. Proteini ove grupe sadrže visok procenat glicina, lizina i glutamata, slično kao i ista grupa LEA proteina kod model biljke *A. thaliana* (Hundertmark i Hinch 2008). Članovi ove grupe ramondinih LEA proteina imaju visoku sklonost ka formiranju amfipatičnih α -heliksa na N-terminalnom delu i neuređenih struktura na C-terminusu (slika 38 i 39), što je u skladu sa već opisanim strukturnim svojstvima (Battaglia i sar. 2008). Usled tranzicije N-terminusa u α -helikalne strukture pri nedostatku vode, kao i njihove pojačane akumulacije u biljnim ćelijama kao odgovor na stres sušom, LEA1 proteini služe kao modeli za proučavanje prirodno neuređenih proteina u biljkama (Olvera-Carrillo i sar. 2010; Cuevas-Velazquez i sar. 2017).

Amfipatični α -heliks omogućava članovima ove grupe da stabilizuju ćelijske membrane kao periferni membranski proteini kroz interakcije sa nepolarnim repovima masnih kiselina i sa fosfatima fosfolipida (preko lizinskih ostataka). Na primer, dominantno eksprimirani RsLEA86 protein, sličan pomenutim BhLEA proteinima, može biti uključen u zaštitu unutrašnje mitohondrijalne membrane tokom desikacije. Kod biljke *A. thaliana* strukturni prelaz iz neuređene konformacije LEA1 proteina u vodenom rastvoru u α -heliks u uslovima smanjene količine vode se smatra ključnim za klijanje semena (Thomas 2020).

U ovoj disertaciji je pokazano da polovina transkriptata koji kodiraju proteine koji pripadaju LEA1 proteinskoj grupi ramonde biva povećano eksprimirana tokom desikacije. Među njima, pet je bilo predviđeno da se nalazi u mitohondrijama, pet u jedru, a dva u peroksizomima. Studije na duvanu su pokazale da prekomerna ekspresija LEA1 gena doprinosi toleranciji na sušu kroz očuvanje integriteta fotosintetskog aparata i efikasnije uklanjanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), uz smanjenje permeabilnosti membrana. Zanimljivo je da su tri LEA1 proteina ramonde (RsLEA86, RsLEA104 i RsLEA263) pokazala visoku homologiju sa dva BhLEA proteina koji su zastupljeni tokom desikacije kod srodne biljke vaskrsnice *B. hygrometrica* (Liu i sar. 2007). Homologni segmenti: MQ[AT][VA]KQK[VM]S[ND][AS]AA[AST]AKE[HR]VD[VI][ML]KAKA[EQ] pripadaju M1.2 motivu (tabela 9) koji je sadržan u 20 LEA1 proteina remonde, ali i u LEA1 proteinu biljke vaskrsnice *C. plantagineum*, eksprimiranog tokom desikacije (Liu i sar. 2007).

3.2.2.3 LEA2 proteini

LEA2 i LEA4 predstavljaju dve najbrojnije LEA proteinske grupe kod srpske ramonde, za razliku od dehidrina i LEA4 proteinskih grupa kod model vrste *A. thaliana* (Hundertmark i Hinch 2008). Za razliku od ostalih LEA proteina ramonde, članovi porodice LEA2 proteina imaju visok potencijal za uvijanje u definisane globularne domene (slika 39). Ova osobina proističe iz visokog sadržaja nepolarnih aminokiselina i cisteina (1,4-2,0 %), koji omogućava stabilizaciju strukture putem disulfidnih mostova, što je potvrđeno i u studiji u kojoj su analizirani LEA proteini iz 60 biljnih vrsta (Artur i sar. 2019).

Proteini grupe LEA2 se fundamentalno razlikuju od drugih LEA proteina po svojoj visokoj hidrofobnosti, prisustvu atipičnog *WHy* domena (eng. *water stress and hypersensitive response*, *WHy*), kao i najvišem udelu aminokiselinskih ostataka nedostupnih rastvaraču, što podrazumeva formiranje kompaktnih, globularnih domena (Jiang i sar. 2017). Interesantno je da su ovi proteini kod srpske ramonde pokazali slabu homologiju sa onima kod biljke *A. thaliana* i planinskog pamuka, što potvrđuje da je LEA2 grupa evoluciono najdivergentnija među biljnim vrstama (Artur i sar. 2019).

Odbrambene funkcije članova porodice proteina LEA2 povezane su sa salinitetom, smrzavanjem, toplotom, UV zračenjem, osmotskim i oksidativnim stresom *in vitro* (Jiang i sar. 2017). Za većinu članova ove grupe (podgrupe LEA2.3–2.5) predviđena je kompleksna struktura koja uključuje neuređene N-terminalne regione, transmembranske helikse i kompaktne „β-bure” domene na C-terminusu (slika 39 i prilog 24). Prema predikcijama, ovi proteini se prvenstveno nalaze u hloroplastima (slika 36), tačnije unutar tilakoida gde mogu stabilizovati posebno važne fotosintetske komponente. Takođe, veoma zastupljeni argininski ostaci u LEA proteinima ove grupe mogu dodatno interagovati sa negativno naelektrisanim fosfolipidima, slično kako je prijavljeno za LEA2 proteine i anjonske fosfolipidne vezikule kod kukuruza (Koag i sar. 2009).

Međutim, prilikom desikacije, samo šest od 88 članova podgrupa LEA2.3–LEA2.5 je bilo povećano (četiri hloroplastna, jedan ekstracelularni i jedan vakuolarni LEA protein), dok je 16 proteina (od kojih sedam iz hloroplasta) bilo smanjeno. Ovakav trend sugerise da, uprkos prisustvu LEA2 proteina, druge grupe poput LEA4 i SMP preuzimaju primarnu ulogu u zaštiti hloroplastnih membrana tokom ekstremnog isušivanja.

Uzimajući u obzir sve iznete argumente, LEA2 proteinska grupa srpske ramonde predstavlja krajnje hidrofobnu i nekarakterističnu grupu LEA proteina, sa pretežno definisanom sekundarnom strukturom u vodenom rastvoru što je izuzetak u odnosu na tipično neuređene LEA proteine.

3.2.2.4 LEA3 proteini

Grupa LEA3 proteina srpske ramonde predstavlja jednu od malobrojnih grupa, obuhvatajući samo 18 relativno kratkih (103–156 aminokiselina) proteina, što je u dobroj korelaciji sa podacima o LEA3 proteinima iz drugih biljnih vrsta (Singh i sar. 2020). Prosečan GRAVY indeks za članove LEA3 grupe je –0,59; dok je njihova najistaknutija karakteristika visok sadržaj triptofana i prolina, posebno uočen u podgrupi LEA3.2. Triptofan je potpuno konzerviran u motivima M3.1 i M3.5, karakterističnim za članove proteina LEA3.1 i LEA3.2, redom (prilog 17). Konzervirani W-motiv: W[VMTA]P[DH][PE][VKR]TG[YIGF][YWF][RYFT]P[EKA][NGT], deo M3.1 motiva srpske ramonde (tabela 9), identifikovan je u 458 LEA proteina poreklom iz 116 biljnih vrsta (Singh i sar. 2020). U slučaju reprezentativnog RsLEA202 proteina, predviđeno je da motiv M3.1 formira α-heliks smešten bliže C-terminusu (slika 39), slično kao u podgrupi LEA3.2 prikazanoj u studiji Singh i sar. (2020). Navedena studija je takođe identifikovala RRGYAAAA motiv označen kao M3.5 i segment DAAELR identifikovan u motivu M3.4 LEA3 proteina ramonde (tabela 9).

In silico predikcija lokalizacije proteina koji pripadaju LEA3 grupi ukazuje na njihovo prisustvo uglavnom u mitohondrijama i hloroplastima, što se poklapa sa predviđanjima za članove porodice

LEA3 kod model biljke *A. thaliana* (Candat i sar. 2014). Štaviše, RRGYAAAA motiv može služiti kao signal za usmeravanje članova LEA3 proteinske grupe u mitohondrije (Singh i sar. 2020). Ovo se takođe podudara sa predikcijom sekundarne strukture, budući da biljni mitohondrijalni signalni peptidi često poseduju aminokiselinsku sekvencu koja ima veliku verovatnoću formiranja α -heliksa.

Preliminarni biofizički rezultati za LEA3 proteine biljke *A. thaliana* ukazuju na postojanje neuređenih struktura u vodenom rastvoru (Singh i sar. 2020), što se vrlo dobro poklapa sa predviđanjima za LEA3 grupu srpske ramonde, posebno podgrupu LEA3.2. Interesantno je da je nakon desikacije, uočen porast ekspresije samo jednog člana LEA3 grupe (hloroplastni protein), dok su tri gena (posebno mitohondrijalnog RsLEA128 proteina) bila značajno suprimirana, čija je predviđena lokalizacija bila u mitohondrijama. Pojačano eksprimirani LEA3 kod biljke *A. thaliana* doprineo je poboljšanoj toleranciji na oksidativni stres i sušu, dok grupa proteina LEA3 kukuruza može da stabilizuje membrane i proteine tokom izlaganja niskim temperaturama i osmotskom stresu (Liu i sar. 2021).

3.2.2.5 LEA4 proteini

Najupečatljivije karakteristike članova LEA4 grupe srpske ramonde su izuzetna hidrofilnost i visok udeo lizina, glutamata i aspartata, praćeni velikom verovatnoćom formiranja α -heliksa (kod određenih članova i preko 90 % sekvence, slike 36 i 38). Iako se radi o veoma hidrofilnoj proteinskoj grupi, identifikovan je neočekivano visok sadržaj alanina, posebno u LEA4.3 podgrupi (18 %), što se može povezati sa stabilizacijom heliksne strukture, predviđenih za članove ove grupe. Poznato je da je alanin aminokiselina koja inicira uvijanje proteina u α -heliks (Scholtz i sar. 1992). Slična situacija je primećena kod članova proteinske grupe LEA6 u pšenici (PF02987, analogno sa LEA4 proteinskom grupom srpske ramonde, Bhattacharya i sar. 2019).

Motivi karakteristični za LEA4 proteinsku grupu imaju tendenciju ka uvijanju u A-tip α -heliksa (prisutnih u motivima M4.3 i M4.4) koje odlikuje precizna prostorna razdvojenost pozitivnih, negativnih i hidrofobnih strana (slika 38). *In silico* analiza pokazala je i da svi članovi LEA4 proteinske grupe biljke *A. thaliana* imaju tendenciju zauzimanja A-tipa α -heliksa (Candat i sar. 2014). Hidrofobna strana A-tipa α -heliksa može da se orijentiše prema nepolarnim repovima masnih kiselina spoljašnje ćelijske membrane (u slučaju ekstracelularnih LEA4 proteina) ili unutrašnje mitohondrijalne ili peroksizomalne membrane (mitohondrijalni i peroksizomalni LEA4 proteini), dok pozitivna strana na ovim heliksima može formirati elektrostatičke interakcije sa negativno naelektrisanim fosfatnim grupama fosfolipida. Na ovaj način, kao periferni membranski proteini, oni mogu stabilizovati membranu, kao što je pokazano *in vitro* studijama sa *A. thaliana* LEA4 proteinima koji formiraju A-tip α -heliksa (Thalhammer i sar. 2010) ili da, poput onih identifikovanih u mitohondrijama graška, interaguju sa membranama i stabilizuju ih tokom desikacije (Tolter i sar. 2010).

Proteini koji pripadaju LEA4 grupi iz biljke *A. thaliana* su pokazali sposobnost uvijanja u α -heliks pri uslovima smanjene količine vode, što je ključno za sprečavanje inaktivacije i/ili agregacije laktat dehidrogenaze *in vitro* (Cuevas-Velazquez i sar. 2017). Posebno interesantan kandidat je RsLEA188 protein, koji se visoko eksprimira tokom desikacije i lokalizuje u jedru. Sa predviđenim heliksnim potencijalom od čak 95% duž cele sekvence, ovaj protein bi mogao igrati ključnu ulogu u zaštiti genetičkog materijala kroz stabilizaciju negativno naelektrisane fosfatne kičme DNK.

3.2.2.6 LEA5 proteini

Slično kao i kod pšenice (Bhattacharya i sar. 2019), proteini srpske ramonde koji sadrže LEA5 domen (PF00477) karakterišu se najmanjom molekulskom masom (tabela 8). Ovo je u skladu sa podacima za pamuk i model biljku *A. thaliana*, gde LEA5 proteini takođe čine brojčano manju, ali strukturno specifičnu grupu kratkih polipeptida (Hundertmark i Hinch 2008; Magwanga i sar. 2018). Međutim, za razliku od uglavnom kisele LEA5 proteine pšenice, članovi ove proteinske grupe srpske ramonde su bazni (pI~8,1).

Geni koji kodiraju LEA5 proteine pokazali su najviši relativni porast ekspresije tokom desikacije u poređenju sa svim ostalim LEA grupama kod srpske ramonde. Nivo transkripata povećan je kod sedam od ukupno jedanaest gena, pri čemu je za većinu njih predviđena nuklearna lokalizacija. Posebno se izdvaja najviše eksprimiran LEA transkript RsLEA202 proteina, predviđenog da bude u jedru, i uglavnom sastavljenog od α -heliksa i neuređenih struktura.

3.2.2.7 Proteini sazrevanja semena (SMP)

Proteinska grupa SMP predstavlja najkiseliju LEA proteinsku grupu srpske ramonde (pI~4,8; tabela 8), što je trend uočen i kod biljke *Pennisetum glaucum* (Divya i sar. 2021).

Sa evolutivnog aspekta, pretpostavlja se da je SMP proteinska grupa nastala rano u razvoju biljaka (zajedno sa članovima LEA5 proteinske grupe), dok su se druge LEA proteinske grupe pojavile kasnije tokom evolucije biljaka (Artur i sar. 2019). Ovo je moglo imati veliki uticaj tokom kolonizacije kopnenih staništa od strane embriofita. Grupa SMP je takođe detektovana u račićima koji su tolerantni na desikaciju, poput vrste *A. franciscana* (Belott i sar. 2020).

In silico analiza SMP ramonde ukazuje na njihovu primarnu lokalizaciju u hloroplastima, ali takođe i u citoplazmi i jedru (slika 36). Novija istraživanja su pokazala da SMP domen (PF04927), pronađen u AfLEA6 proteinu promoviše LLPS *in vivo*, formirajući proteinske kondenzate koji povećavaju viskoznost citoplazme te tako doprinose toleranciji na desikaciju račića *A. franciscana* (Belott i sar. 2020). Ovaj koncept je posebno relevantan za srpsku ramonu, jer članovi njenih SMP2 i SMP3 podgrupa poseduju motiv M7.1 (slika 35), koji je identičan onom kod račića *A. franciscana*. Transkriptomski profil otkriva da su sedam hloroplastnih i tri citosolna člana grupe SMP bila povećana u DL u poređenju sa HL kod srpske ramonde. Reprezentativni RsLEA71 protein, najverovatnije lociran u citoplazmi i indukovano desikacijom, pripada SMP3 podgrupi i sadrži M7.1 i M7.2 motive koji mogu formirati strukturu amfipatičnog α -heliksa. Na taj način ovaj protein može doprineti toleranciji na desikaciju na dva načina: indirektno putem LLPS procesa i stvaranjem proteinskih kondenzata (poput AfLEA6), ali i direktnim putem kroz interakcije sa membranama organela. Zaštitna uloga članova ove SMP grupe protiv stresa izazvanog visokim salinitetom je dodatno potkrepljena studijama na halofitnoj biljci *C. rosea* (Lin i sar. 2021).

Rezultati koji su prikazani u okviru ove teze ukazali su na strukturne, fizičko-hemijske, prostorne i fiziološke razlike između sedam grupa LEA proteina ramonde. Ova detaljna funkcionalna diskusija je naglasila svojstva onih LEA proteinskih grupa koja bi mogla imati značaj tokom tolerancije na desikaciju. U poređenju sa vrstama biljaka osetljivim na isušivanje, ali i biljkama vaskrslicama poput *C. plantagineum* i *B. hygrometrica* izuzetno visok broj identifikovanih LEA proteina u srpskoj ramondi ukazuje na fantastičnu evolutivnu adaptiranost ove drevne vrste na isušivanje.

Svakako treba imati u vidu da su dobijeni rezultati zasnovani na *in silico* analizama, te je neophodna njihova dalja eksperimentalna validacija. Ipak, oni predstavljaju esencijalnu polaznu tačku za buduća istraživanja usmerena ka razjašnjavanju molekularnih mehanizma delovanja LEA proteina na ćelijskom nivou, sa posebnim akcentom na funkcionalni značaj njihove strukturne fleksibilnosti.

3.2.3 Karakterizacija rekombinantno proizvedenih LEA proteina srpske ramonde – *in vitro* pristup

U cilju eksperimentalne validacije prethodno dobijenih *in silico* rezultata, odabrana su tri člana LEA4 proteinske grupe koji su pokazali najviši nivo ekspresije tokom desikacije. Prvi kandidat, RsLEA30 protein, izabran je zbog značajne akumulacije u listovima ramonde na nivou transkripta i proteina tokom isušivanja. Slično tome, RsLEA301 protein je selektovan zbog izrazito visoke ekspresije transkripta, dok je zajedno sa proteinom RsLEA305 uvršten u analizu zbog izuzetnog potencijala za formiranje amfipatičnih α -heliksa (posebno A-tipa), uz zadržavanje karakteristika strukturne neuređenosti.

Predviđena hloroplastna lokalizacija za RsLEA30 i RsLEA301 proteine ukazuje na njihovu ključnu ulogu u toleranciji na desikaciju kroz protekciju tilakoida, kao i pripadajućih proteinskih kompleksa i membranskih sistema. S druge strane, za RsLEA305 protein je predviđena jedarna lokalizacija, što sugerise njegovu funkciju u očuvanju strukturnog integriteta DNK. Takođe, sva tri proteina imaju potencijal za učešće u LLPS procesu i formiranje biomolekulskih kondenzata.

Pre same proizvodnje ova tri navedena proteina, urađena je *in silico* procena uticaja histidinskog taga (His-taga) na njihovu nativnu konformaciju. Analiza udela elemenata sekundarne strukture pokazala je da prisustvo His-taga ima minimalan i zanemarljiv efekat na predviđenu konformaciju odabranih LEA4 proteina (slike 40, 41 i 42). Ovakav rezultat je i u saglasnosti sa kristalografskim studijama koje potvrđuju da kratki afinitetni tagovi (obično oko 10 aminokiselina) generalno ne narušavaju strukturu nativnog proteina, posebno kod polipeptida prosečne dužine od oko 350 aminokiselina (Carson i sar. 2007). Štaviše, veoma je retko da His tag poprimi uređenu strukturu čime je opravdana njihova primena u ovoj studiji.

Sva tri odabrana proteina su proizvedena rekombinantno u ekspresionom sistemu *E. coli* BL21 (DE3) kao nativni proteini sa His-tagom na C-terminusu. Prisustvo His-taga je omogućilo efikasno prečišćavanje proteina RsLEA301-His6 i RsLEA305-His6 koristeći IMAC, dok je za RsLEA30-His6 protein bila potrebna i dodatna faza prečišćavanja gel filtracijom. Postignuti prinosi prečišćenih proteina iznosili su: 4,4 % za RsLEA30-His6 protein; 26 % za RsLEA305-His6 protein i 46 % za RsLEA301-His6 protein. Čistoća sva tri proteina je bila preko 95 %, a njihove sekvence su potvrđene masenom spektrometrijom. Ovako definisani parametri čistoće i prinosa omogućili su dalju strukturnu karakterizaciju.

CD spektroskopijom u fiziološkim uslovima (pH 7), pokazano je da je struktura ova tri LEA proteina primarno neuređena što potvrđuje prethodno dobijene *in silico* rezultate. Ovi nalazi su u skladu sa podacima za LEA protein Dsp16 (dehidrin) iz *C. plantagenium* (Lisse i sar. 1999), kao i za rekombinantno proizvedeni LEA proteini monokotiledone poikilohlorofilne biljke vaskrsnice *X. schlechteri*, koji su takođe pretežno neuređeni u vodenom rastvoru (Artur i sar. 2019).

Kako je ranije navedeno, RsLEA305 protein je verovatno jedarni protein (gde je pH~7), dok bi RsLEA30 i RsLEA301 proteini trebalo da budu locirani u hloroplastima, gde pH varira od 5 do 6 u lumen, preko 7,0–7,4 u međumembranskom prostoru, do približno 8 u stromi. Iako konformacione promene u prirodno neuređenim proteinima mogu biti izazvane faktorima sredine kao što je pH (Uversky i sar. 2009), u slučaju ova tri LEA proteina ramonde, pH vrednost nije uticala na njihovu neuređenost (slika 50).

Sa ciljem da se testira strukturno ponašanje LEA proteina ramonde na progresivno smanjenje sadržaja vode u ćeliji, primenjen je gradijentni dodatak trifluoroetanol (TFE) kao *in vitro* simulacija uslova desikacije. Postepeni prelazak sva tri LEA4 proteina iz pretežno neuređene u dominantno α -heliksnu konformaciju pri povećanju količine TFE (do 78 %, slika 52), može se smatrati njihovim fiziološkim odgovorom tokom desikacije. TFE indukuje uvijanje polipeptidnog lanca promovišući desolvataciju njegove „kičme“ i smanjujući fleksibilnost njenih segmenata (Kentsis i sar. 1998). Smanjenje dielektrične konstante rastvarača u mikroomolini peptidnog lanca u prisustvu TFE (Mehrnejad i sar. 2007), olakšava formiranje intramolekulskih vodoničnih veza na račun vodoničnih veza između polipeptidnog lanca i vode, što se može fizički i konceptualno povezati sa efektima desikacije (Bremer i sar. 2017). Kontinuirano povećanje udela α -heliksa sa smanjenjem potencijala vode izazvanim povećanjem sadržaja TFE, opisan je u slučaju članova LEA4 proteinske grupe iz biljke *A. thaliana* (Cuevas-Velazquez i sar. 2016), kao i kod proteina Dsp16 iz biljke *C. plantagenium* (Lisse i sar. 1999).

U prisustvu mimetika membrane (1 mM SDS) ispitivani LEA proteini (posebno proteini RsLEA30-His6 i RsLEA301-His6) prelaze iz neuređene u uređenu α -heliksnu konformaciju (slika 51). Upoređivanjem eksperimentalnih podataka sa bioinformatičkim predikcijama, uočava se da regioni

sa najvećom tendencijom ka uvijanju poseduju značajan afinitet za formiranje amfipatičnih heliksa A-tipa. Slična strukturna adaptacija zabeležena je i kod rekombinantnih LEA1 proteina vrste *X. schlechteri* u hidrofobnim, acetonitrilnim, rastvorima (Lisse i sar. 1999).

Prikazana strukturna plastičnost i konformacioni dualitet odabranih LEA proteina predstavljaju suštinu njihove zaštitne uloge u očuvanju integriteta membrana, posebno tilakoida u hloroplastima (proteini RsLEA30 i RsLEA301) u uslovima desikacije. Potencijal proteina RsLEA30, RsLEA301 i RsLEA305 da usvoje dominantno α -heliksne strukture tokom desikacije (*in silico* i *in vitro*), omogućava im interakcije sa fosfolipidima. Pozitivno naelektrisana strana heliksa ovih LEA proteina može ostvariti elektrostatičke interakcije sa negativno naelektrisanim fosfatnim grupama lipidnog dvosloja, dok njihova hidrofobna strana interaguje sa lancima masnih kiselina (Bremer i sar. 2017). Na ovaj način, ispitivani LEA proteini ramonde mogu da funkcionišu kao dinamički molekularni štitovi koji stabilizuju ćelijske komponente tokom desikacije.

Međutim, važno je istaći da se unutrašnja membrana hloroplasta, etioplasta i proplastida, kao i tilakoidna membrana, pretežno sastoje od neutralnih galaktolipida, dok fosfolipidi čine svega 8–10% ukupnog lipidnog sastava (Candat i sar. 2014). Ovakav specifičan sastav ukazuje na to da interakcija sa hloroplastnim membranama može biti sporedna uloga RsLEA30 i RsLEA301 proteina, a da se njihova primarna uloga verovatno ogleda u njihovoj interakciji (preko A-tipa α -heliksa) sa proteinima osetljivim na desikaciju unutar hloroplasta, a naročito sa komponentama PET lanca. Ovo je od presudnog značaja za srpsku ramonu koja, kao homoiohlorofilna vrsta, mora očuvati integritet fotosintetskog aparata kako bi neposredno nakon rehidratacije uspostavila metaboličku aktivnost.

S obzirom na to da je za protein RsLEA305 predviđena nuklearna lokalizacija, na osnovu njegovog strukturnog ponašanja dokumentovanog *in vitro* u ovoj tezi, on može ostvarivati različite protektivne funkcije: stabilizaciju DNK i sprečavanje agregacije proteina, koordinativno vezivanje metalnih jona (čime se preveniraju oksidativna oštećenja DNK molekula), kao i učešće u LLPS procesima (Yang i sar. 2021). Sposobnost formiranja LLPS biokondenzata eksperimentalno je potvrđena u slučaju tri prirodno neuređena LEA4 proteina model biljke *A. thaliana* (Ginsawaeng i sar. 2021; Borrelil i sar. 2002).

Pored pomenutih uloga tokom smanjenog sadržaja vode u ćeliji, prirodno neuređeni proteini mogu doprineti toleranciji na još jedan specifičan način. Naime, u hidratisanom stanju, polipeptidna kičma RsLEA30-His6, RsLEA301-His6, i RsLEA305-His6 proteina favorizuje formiranje intermolekulskih interakcija (vodoničnih veza) sa okolnom („strukturnom“) vodom, u odnosu na intramolekulske interakcije. Kako se količina vode smanjuje, termodinamički se forsiraju unutarproteinske, a zatim i međuproteinske interakcije što dovodi do oslobađanja molekula „strukturne“ vode, koja tada postaje dostupna drugim ćelijskim strukturama (Yoneda i sar. 2017; Ferreira i sar. 2018). S obzirom na to da su LEA4 proteini ramonde pokazali ovaj prelaz upravo u uslovima smanjenog vodenog sadržaja, jedna od njihovih ključnih funkcija može biti upravo uloga „rezervoara“ koji distribuira „strukturnu“ vodu esencijalnim makromolekulima tokom desikacije.

3.3 Remodelovanje komponenti ćelijskog zida tokom desikacije

Za održavanje strukturnog integriteta ćelije tokom desikacije kod biljaka vaskrsnica neophodno je precizno koordinisanje promena u arhitekturi i sastavu ćelijskog zida, koje kontrolišu njegovu plastičnost bez izazivanja trajnih oštećenja. Mikroskopska vizualizacija tkiva desikovanih listova srpske ramonde bojenjem toluidinskim plavim u ovoj studiji, otkrila je karakterističnu deformaciju ćelija epidermisa i mezofila, uz očuvan, naboran i uvučen, ali kontinuiran ćelijski zid i intaktnu plazmalemu (slika 12). Slične strukturne promene primećene su i tokom desikacije u biljkama vaskrsnicama *C. wilmsii* (Vicre i sar. 2004) i *M. flabellifolius* (Moore i sar. 2006). Već 48 sati nakon rehidratacije, ćelije mezofila i epidermisa prethodno desikovanih listova srpske ramonde u potpunosti vraćaju svoj prvobitan oblik (slika 12), što potvrđuje izuzetnu reverzibilnost procesa, sličnu onoj prijavljenoj kod vrste *C. plantagineum* (Chen i sar. 2020). Opisana plastičnost u organizaciji strukture

ćelijskog zida na histološkom nivou jeste posledica brzog remodelovanja njegovih komponenti — polisaharida (pektina, arabinogalaktana, ksiloglukana), i strukturnih proteina (ekspanzina, arabinana, proteina bogatih prolinom i glicinom) kao i stepena lignifikacije (Gechev i sar. 2012; Moore i sar. 2013). Tokom desikacije, ne samo što dolazi do promene sadržaja i hemijske modifikacije ovih komponenti, već nastupa i njihova reorganizacija u prostoru, što utiče na mehaničku čvrstinu i poroznost ćelijskog zida.

FTIR spektroskopija frakcija ćelijskog zida listova ramonde potvrdila je postojanje izražene reverzibilne plastičnosti na nivou glavnih polimera zida. Statistički značajne razlike uočene isključivo u oblasti od 970 do 1200 cm^{-1} potvrđuju da su upravo polisaharidi matriksa (pektini i hemiceluloze) ključni činioci u odgovoru biljke *R. serbica* na desikaciju i na proces rehidratacije. PCA analiza jasno razdvaja uzorke HL od ostalih faza (slika 32), dok grupisanje uzoraka iz rane rehidratacije (R1) sa suvim stanjem (DL) ukazuje na to da je prvi sat nedovoljan da se uoče strukturne razlike u sastavu i organizaciji ovih komponenta.

U potpuno hidratisanom stanju listova ramonde (HL), uočena je najveća zastupljenost traka koje odgovaraju pektinu (1015, 1035, 955 cm^{-1} , slika 31), što zid čini maksimalno fleksibilnim. S obzirom na to da je pektin najhidrofilnija komponenta, njegov profil u HL uzorcima direktno odražava visoku hidrataciju matriksa; molekuli vode smešteni između pektinskih lanaca obezbeđuju njihovu karakterističnu konformaciju i neophodnu elastičnost.

Međutim, tokom desikacije (DL), intenzitet traka za pektine, ksiloglukane i celulozu značajno opada (što je potvrđeno u obe eksperimentalne postavke), ukazujući na duboko remodelovanje skeleta zida. Pad sadržaja celuloze tokom desikacije (trake 1150 i 990 cm^{-1} , slika 31) u pozitivnoj je korelaciji sa smanjenom ekspresijom celuloza-sintaze (slika 8). Iako se ukupna količina celuloze smanjuje, moguće je da se njeni lanci, zajedno sa hemicelulozom, pod dejstvom gubitka vode međusobno približavaju (Moore i sar. 2013). Ovo bi omogućilo formiranje jačih intermolekulskih vodoničnih veza, što bi dovelo do kontrolisanog sabijanja (očvršćavanja) ćelijskog zida, omogućavajući ćeliji da izdrži negativan hidraulički pritisak bez gubitka strukturalnog kontinuiteta.

Proces rehidratacije (R1–R3) postepeno vraća elastičnost zidu, što se jasno vidi kroz porast intenziteta specifičnih traka. Interesantno je da rezultati iz ove teze ukazuju na smanjenje sadržaja ksiloglukana (1150 i 1075 cm^{-1} , slika 30), što je u suprotnosti sa nalazima kod biljaka *C. wilmsii* i *C. plantagineum* gde je zabeležen njegov porast (Vicré i sar. 1999; Moore i sar. 2024). Zanimljivo je da su određene frakcije pektina (1050 i 1097 cm^{-1}) dostigle svoj maksimum već u ranim fazama rehidratacije, detektuju FTIR. Ovo sugerise da rehidratacija i desikacija ne podrazumevaju samo prost porast ili smanjenje sadržaja pektina, već variranja u količini dostupnih karboksilnih grupa (demetilesterifikovanih) koje se zapravo detektuju FTIR analizom. Prema tome, ne radi se samo o prostom povratku na staro, već o dinamičnom procesu u kojem pektini, zavisno od stepena metilacije, bivaju različito hidratizirani i geliraju, te utiču na raspored celuloznih vlakana i vezivanje Ca^{2+} jona čime direktno kontrolišu očvršćavanje ili olabavlivanje celokupnog zida.

Rezultati transkriptomike i proteomike dodatno su potvrdili izuzetno kompleksnu i finu regulaciju procesa ojačavanja i oslabljivanja ćelijskog zida baziranu na dinamičnoj metilesterifikaciji pektinskih polimera. Dok je kod vrste *C. plantagineum* identifikovan samo jedan PME transkript povišen tokom desikacije (Jung i sar. 2020), analiza diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) u ovoj disertaciji identifikovala je čak 33 PME transkripta i 48 transkripata inhibitora PME (prilog 3). Istovremeno, analizom diferencijalno zastupljenih proteina listova srpske ramonde, pronađene su tri PME, povećane u DL u odnosu na HL. Ovako visok diverzitet i specifičan obrazac ekspresije i zastupljenosti različitih izoformi sugerisu postojanje precizno „orkestriranog“ mehanizma kontrole arhitekture zida, gde istovremeno prisustvo enzima i njihovih inhibitora omogućava lokalizovano i kontrolisano savijanje ćelijskog zida bez gubitka njegovog integriteta. Povećan nivo demetilesterifikovanog pektina, koji je takođe pokazan kod vrsta roda *Craterostigma* (Vicré i sar.

1999; 2004; Jung i sar. 2019), potvrđuje da je modifikacija pektina univerzalna strategija biljaka vaskrsnica, ali da srpska ramonda koristi specifičan i izuzetno bogat repertoar regulatornih proteina kako bi taj proces precizno kontrolisala.

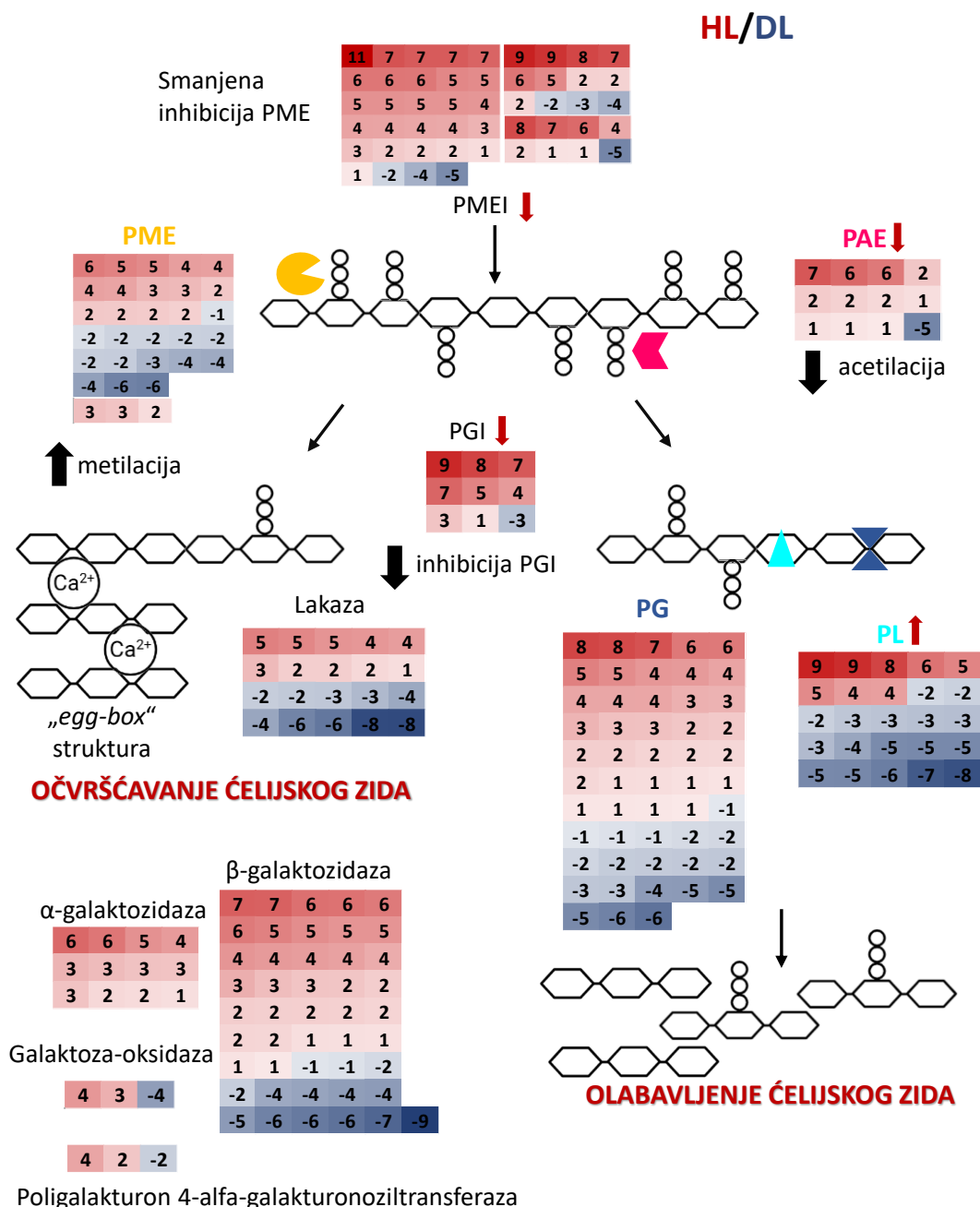
Posebno su indikativni rezultati dobijeni selektivnijim proteomskim pristupom. Naime, analiza jonski vezanih proteina ćelijskog zida nije otkrila prisustvo PME, što ukazuje da su detektovane izoforme PME solubilne u apoplastnoj tečnosti (Wu i sar. 2018). Ovakva lokalizacija bi mogla omogućiti šire i manje selektivno delovanje enzima na polisaharidni matriks u poređenju sa enzimima koji su čvrsto vezani za zid i tako specifični za date segmente zida.

Važno je naglasiti da stepen metilesterifikacija i acilovanja ne uslovljava direktno stepen rigidnosti zida; ključna determinanta njegovih mehaničkih svojstava je prostorni raspored ovih modifikacija i njihova interakcija sa Ca^{2+} . Dok demetilesterifikacija specifičnih segmenata HG dovodi do očvršćavanja zida putem umrežavanja posredovanog Ca^{2+} , nasumična demetilacija posredovana pektin-lijazama i poligalakturonazama zapravo doprinosi njegovom olabavljanju (Wormit i Usadel 2018).

Finalno, rezultati transkriptomike i proteomike u okviru ove teze ukazuju na povišenu zastupljenost PME enzima i njihovu istovremeno smanjenu inhibiciju usled niske ekspresije velikog broja inhibitora (PMEI) u DL (slika 54). Ovakav profil sugerise da PME deluju nasumično na lance HG, čime se izbegava stvaranje krutih linearnih blokova neophodnih za formiranje kalcijumovih mostova i „egg-box“ struktura. Umesto očvršćavanja, ovakva modifikacija čini pektinski lanac dostupnijim degradirajućim enzimima. Dodatno, povišena ekspresija pektin-lijaza (PL) u DL, uz prisustvo specifičnih izoformi poligalakturonaza (PG) koje su povišene u stanju isušivanja, upućuje na intenzivnu hidrolizu glikozidnih veza. Ovim procesom se direktno slabi polisaharidni matriks, usled čega ćelijski zid postaje „mekši“ i porozniji, što je preduslov za njegovu naboranu deformaciju. Ovu aktivnost dodatno podstiče smanjena zastupljenost inhibitora poligalakturonaza (PGI, slika 54) u DL, čime se oslobađa aktivnost PG enzima u pravcu degradacije pektina.

S druge strane, primećena smanjena ekspresija većine izoformi pektin-acetilesteraza (PAE) u DL vodi ka povećanju stepena acilacije pektina. S obzirom na to da visoka acilacija može ograničiti pristup degradirajućim enzimima (PG i PL) njihovom supstratu, ovaj mehanizam verovatno služi kao „kočnica“ koja usporava proces olabavljanja zida, osiguravajući da degradacija pektina ostane u granicama koje ne ugrožavaju strukturni integritet ćelije.

Pored kompleksne ravnoteže između PME i njihovih inhibitora, dodatni nivo regulacije remodelovanja arhitekture ćelijskog zida kod srpske ramonde verovatno ostvaruju serin-proteaze. Kako kod *A. thaliana* subtilizini vrše post-translacionu aktivaciju PME (Levesque-Tremblay i sar. 2015), povećana zastupljenost ekstracelularne proteaze nalik subtilizinu (Rs_39172) za 50 % u DL sugerise da srpska ramonda koristi višeslojni sistem (enzim–inhibitor–proteaza) za finu modulaciju elastičnosti apoplasta, omogućavajući dinamičan odgovor na mehanički stres izazvan gubitkom turgora.



Slika 54. Shematski prikaz diferencijalno zastupljenih gena uključenih u remodelovanje ćelijskog zida. Prikazane su različite izoforme ključnih enzima, gde brojevi u okvirima označavaju zaokružene vrednosti odnosa nivoa ekspresije u hidratiranim listovima u odnosu na desikovane (HL/DL). Toplotna mapa (engl. *heat map*) olakšava vizuelizaciju relativne ekspresije: gradijent tamnocrvene boje označava povišen nivo ekspresije u hidratisanom stanju, dok gradijent tamnoplave boje ukazuje na značajno viši nivo ekspresije u desikovanim listovima. PME, pektin metilesteraze; PMEI, inhibitor PME; PAE, pektin acetilesteraza; PG, poligalakturonaza; PGI, inhibitor PG; PL, pektin lijaze.

U tom kontekstu, pojedine biljke vaskrsnice akumuliraju arabinozom bogate polimere (pektin-arabinane, AGP i arabinoksilane), dok neke, kao što su vrste *Craterostigma*, prilagođavaju plastičnost ćelijskog zida menjajući sadržaj ksiloglukana i stepen metilacije pektina kako bi omogućile fleksibilnost zida tokom desikacije (Moore et al. 2013; Jung et al. 2019). Moore i sar. 2006 su stoga predložili arabinane povezane sa RG-I i AGP kao „pektinske plastifikatore“ koji štite zid od mehaničkih tenzija izazvanih desikacijom kod biljke vaskrsnice *M. flabellifolia*. Ukupna transkriptomika srpske ramonde predstavljena u ovoj tezi, je potvrdila ovu strategiju, pokazujući značajno povećanje transkripata koji kodiraju ekspanzine, prolin bogate proteine, glicin bogate proteine, kao i AGP. Ovi nalazi su u skladu sa studijama na biljci *C. plantagineum*, koji sugerišu da

ekspanzini mogu biti pojačano regulisani tokom desikacije i da igraju važnu ulogu u vegetativnoj toleranciji na desikaciju kod biljaka vaskrsnice (Jones i McQueen-Mason 2004).

Posebno je interesantna dinamika ekstenzina uočena na poprečnim presecima listova ramonde, čiji signal slabi tokom rehidratacije (slika 29). Ovo je verovatno posledica neophodnog povećanja fleksibilnosti i poroznosti zida kako bi se omogućilo širenje ćelije i rast njenog volumena pri povratku turgora. Istovremeno, intenzivniji signal nisko-metilesterifikovanog HG nakon ponovnog zalivanja ukazuje na to da demetilacija pektina igra ključnu ulogu u fazi oporavka, verovatno stabilizujući zid vezivanjem sa Ca^{2+} u trenutku naglog ulaska vode. Na ovu strukturnu stabilnost nadovezuje se i uloga AGP epitopa (prepoznatih JIM13 antitelom, slika 29), koji su lokalizovani u citoplazmi uz samu plazmalemu, što je u skladu sa nalazima kod vrste *M. flabellifolius* (Moore i sar. 2006). Ova podudarnost ukazuje na ulogu AGP proteina u održavanju integriteta veze između plazmaleme i ćelijskog zida tokom ekstremnih mehaničkih stresova kojima je izložena srpska ramonda tokom ciklusa desikacije i rehidratacije.

Zanimljivo je da su polisaharidi i transkripti koji kodiraju proteine ćelijskog zida (npr. ekspanzini, ekstenzini, poznati i kao glikoproteini bogati prolinom i hidroksiprolinom) bili smanjeni (neki potpuno izostali) u DL srpske ramonde (slika 8, prilog 3). Dok su ekstenzini uključeni u zadebljavanje i unakrsno povezivanje polimera, ekspanzini učestvuju u pH-zavisnom olabavljenju zida. Identifikovana akumulacija proteina bogatih glicinom u srpskoj ramondi, (poput CpGRP1 i BhGRP1 kod *C. plantagineum* i *B. hygrometrica*) verovatno služi kao kompenzacija koja povećava fleksibilnost u odsustvu klasičnih strukturnih elemenata.

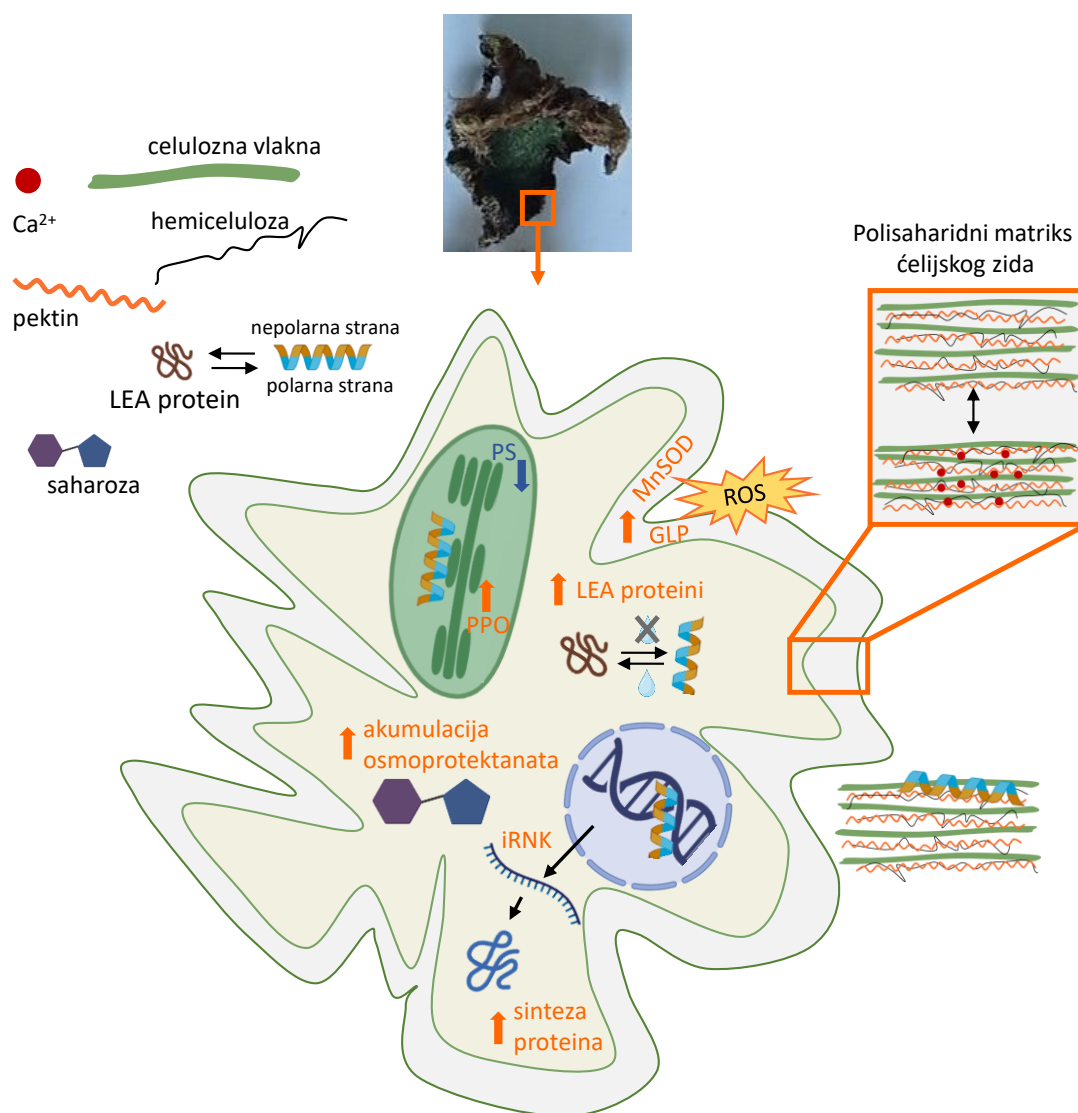
Još jedna od značajnih promena identifikovanih tokom desikacije u listovima srpske ramonde bila je povećana zastupljenost sedam različitih proteina nalik džermin proteinima (GLP). Džermin proteini i GLP su multifunkcionalni apoplastni glikoproteini koji mogu ispoljavati aktivnost oksalat-oksidadze, MnSOD, ADP glukozo-pirofosfataze/fosfodiesteraze i/ili PPO (Pei i sar. 2019). Sličan porast sadržaja GLP_5A proteina primećen je u desikovanim listovima biljke vaskrsnice *B. hygrometrica* (Wang i sar. 2009). Kao odgovor na desikaciju kod druge biljke vaskrsnice *C. plantagineum*, indukovani protein ćelijskog zida CpGLP_1 je pokazao SOD aktivnost i interakciju sa pektinima, što sugerise njegovu ulogu u regulaciji nivoa $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2$ (Jung i sar. 2019). Filogenetska analiza i poređenje sekvenci pokazali su 28 – 39 % identičnosti i 48-61 % homologije između CpGLP1 i sedam desikacijom indukovanih GLP srpske ramonde (prilog 8). Prema tome, moguće je da GLP srpske ramonde na osnovu sopstvene SOD aktivnosti mogu biti važni proizvođači H_2O_2 u ćelijskom zidu, doprinoseći njegovom strukturnom remodelovanju tokom desikacije

Specifično usmerena proteomika ćelijskog zida (tabela 5) identifikovala je pet statistički značajnih diferencijalno zastupljenih proteina, od kojih dva pripadaju LEA proteinima (više zastupljeni u DL nego u HL). Ovo ponovo stavlja akcenat na LEA proteine i njihovu fundamentalnu ulogu u desikaciji. Iako njihovo prisustvo u ćelijskom zidu nije tipično (do sada pokazano samo za dva LEA1 proteina biljke *X. humilis*). Kompjuterska predviđanja ukazuju na visoku verovatnoću prisustva većine proteina LEA4 grupe pšenice u ćelijskom zidu (Liu i sar. 2021), kao i nekoliko GmLEA4 proteina soje (Guo i sar. 2023). Ovde identifikovana akumulacija dva LEA4 proteina tokom desikacije (tabela 5), koji su najverovatnije jonski vezani za ćelijski zid, mogu imati ulogu „molekulskog štita“, čuvajući nativnu strukturu enzima zaduženih za remodelovanje zida tokom kritičnih faza uvijanja i ponovnog širenja kada se zapremina ćelije ponovo povećava.

Zaključno, tokom desikacije ćelije srpske ramonde smanjuju zapreminu uz nabiranje zida, čija se čvrstina precizno menja enzimskim ili neenzimskim delovanjem na polisaharidne komponente, posebno na pektin, ali i uz učešće strukturnih proteina. Takođe, dolazi do povećanja gustine celuloznih i hemiceluloznih vlakana, što dovodi do ojačavanja ćelijskog zida. Rehidratacija zatim vraća elastičnost ćelijskog zida kroz porast visoko metilesterifikovanog HG i smanjenje AGP, dok

LEA proteini u samom zidu osiguravaju da ovaj ciklus prođe bez trajnih oštećenja po ćelijsku arhitekturu.

Sumarno, rezultati ove disertacije ukazuju na to da je tolerancija srpske ramonde na desikaciju specifična za datu biljnu vrstu (slika 55). To je kompleksan i strogo orkestriran proces koji se zasniva na prelasku u stanje metaboličkog „mirovanja” kroz efikasnu inhibiciju fotosinteze i aktivaciju alternativnih energetskih puteva. Ključnu ulogu u očuvanju ćelijske homeostaze tokom desikacije igra dinamična, najverovatnije, post-transkripciona regulacija sinteze osmoprotektivnih šećera, remodelovanje ćelijskog zida i značajna akumulacija strukturno plastičnih LEA4 proteina. Ovi proteini funkcionišu kao „molekulski štitovi” stabilizujući ključne proteine, nukleinske kiseline i membrane svojim konformacionim prelaskom u amfipatične α -helikse. Istovremeno, kontrolisano hemijsko remodelovanje ćelijskog zida, uz učešće redoks-enzima i pektin-metilesteraza, koje rezultira smanjenjem sadržaja specifičnih arabinogalaktanskih proteina i porasta sadržaja visoko metilovanog homogalakturonana, čini ćelijski zid fleksibilnijim i elastičnijim tokom ciklusa isušivanja i brze rehidracije. Ovako integrisan, mehanizam zaštite na više molekularnih nivoa potvrđuje da je strategija preživljavanja srpske ramonde rezultat fine koordinacije molekularnih štitova i arhitektonske plastičnosti ćelijskog zida.



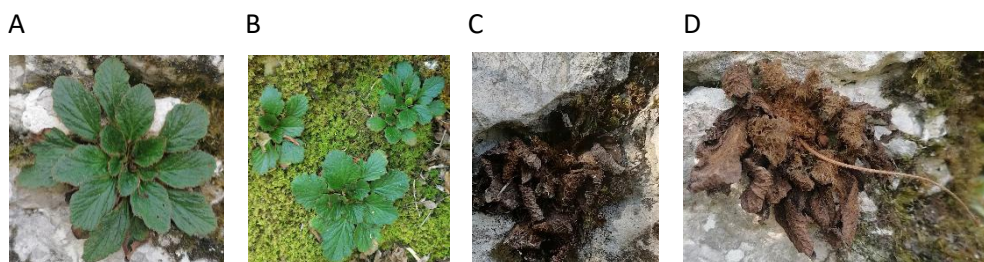
Slika 55. Shematski prikaz glavnih metaboličkih procesa uključenih u proces tolerancije na desikaciju kod srpske ramonde. GLP, proteini nalik džerminama; MnSOD, Mn superoksid-dismutaza; PPO, polifenol-oksidaze; PS, fotosinteza; PME, pektin-metilesteraze; ROS, reaktivne kiseonične vrste (hidroksil-radikal i vodonik-peroksid).

4. EKSPERIMENTALNI DEO

U ovom poglavlju predstavljeni su detaljni protokoli svih eksperimentalnih postavki i primenjenih metoda, uključujući mikrobiološke, molekularno-genetičke, molekularno-biološke, biohemijske, spektroskopske, analitičke, statističke i bioinformatičke analize.

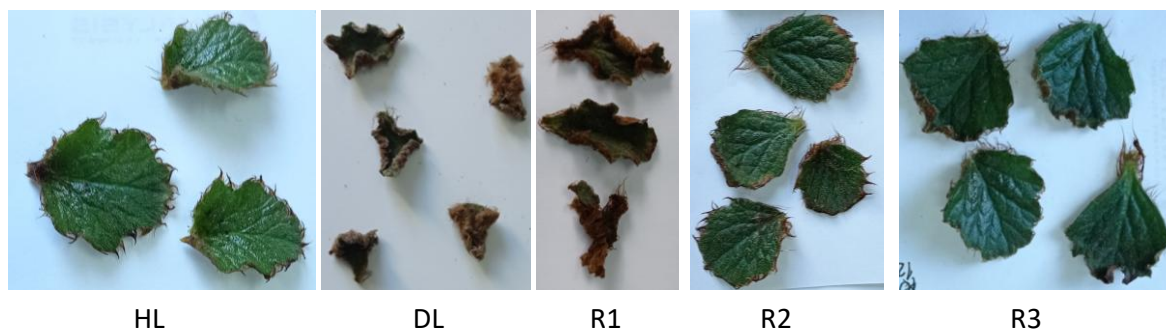
4.1 Biljni materijal i eksperimentalna postavka

Srpska ramonda (*Ramonda serbica* Pančić) uzorkovana je sa prirodnog staništa u Sićevačkoj klisuri, uz poštovanje svih pravnih propisa i odobrenja Republike Srbije koji se odnose na ugrožene vrste (slika 56).



Slika 56. *Ramonda serbica* Panč. u prirodnom staništu u potpuno hidratisanom (A, B) i desikovanom (C, D) stanju.

Eksperiment je postavljen prema Veljović i sar. (2008). Prva eksperimentalna postavka obuhvatila je uzorkovanje potpuno hidratisanih listovi (HL), a nakon desikacije i potpuno desikovanih listova (DL). Druga eksperimentalna postavka je pored HL i DL uključila i uzorke nakon ponovnog zalivanja posle 1 h, 24 h i 48 h (slika 57). Listovi su odmah smrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80°C (TwinGuard ULT Freezers, MDF-DU702VX, phcbi, Tokio, Japan) do daljih analiza.



Slika 57. Uzorkovani listovi srpske ramonde.

4.2 Metode

4.2.1 Merenje relativnog sadržaja vode (RSV) u listovima srpske ramonde

Zreli i potpuno razvijeni listovi, ujednačene veličine, odabrani su iz središnjeg dela rozete potpuno hidratisanih biljaka (HL), dehidratiranih biljaka (DL), kao i biljaka nakon 1 h (R1), 24 h (R2) i 48 h (R3) od ponovnog zalivanja. RSV je izračunat prema formuli: $100 \times [(\text{hidratirana masa} - \text{dehidratirana masa}) / (\text{zasićena hidratirana masa} - \text{dehidratirana masa})]$ kako je opisano u Veljović i sar. (2008). Listovi su isečeni i stavljani u kesice, kako bi se sprečilo isparavanje vode. Zasićena hidratirana masa je merena nakon rehidracije u vodi tokom 24 sata na 20°C u mraku, dok je dehidratirana masa merena nakon sušenja na 80°C u trajanju od 36 sati.

4.2.2 Analiza parametara brze kinetike fluorescencije hlorofila (OJIP) u listovima srpske ramonde

OJIP parametri opisuju kvantni prinos fluksa elektronskog transporta PS II do akceptora PS I; $\Phi_{P_0} = 1 - F_0/F_m$, maksimalni kvantni prinos primarne PS II fotohemije; $\Phi_{ET20} = 1 - F_j/F_m$, kvantni prinos fluksa elektronskog transporta od Q_A do Q_B ; $\Phi_{RE10} = 1 - F_i/F_m$, kvantni prinos fluksa elektronskog transporta dok je PS I elektron-akceptor; J^{abs}/RC , prosečan apsorbovani fluks fotona po PS II reakcionom centru. Potpuno hidratizirani listovi su isečeni i stavljeni u mernu komoru, kako je opisano u radu Kuper i sar. (2019). Ukratko, nakon adaptacije na mrak u trajanju od 5 minuta, OJIP je meren pomoću *FluorCam 7* sistema (PSI, Brno, Češka). Svi snimci su analizirani pomoću *FluorCam 7* softvera (PSI, Brno, Češka). Nakon prvog merenja, deset listova je polako osušeno do postizanja $57 \pm 4\%$ i $38 \pm 8\%$ RSV, a zatim je OJIP ponovo izmeren pod gore pomenutim uslovima, dok je preostalih pet listova ostalo u hidratiziranim uslovima. Listovi su čuvani u komori za rast sa 16/8 sati (dan/noć), vlažnošću od 60 % i temperaturom od 21–24 °C. Maksimalni intenzitet fotosintetski aktivnog zračenja (PAR) bio je $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nakon toga, listovi su brzo zamrznuti u tečnom azotu i liofilizovani.

4.2.3 Analiza fotosintetskih pigmenata iz listova srpske ramonde

Oko 10 – 15 mg sprasenog tkiva listova je korišćeno za ekstrakciju fotosintetskih pigmenata pomoću 100 % acetona. Koncentracije hlorofila *a* (C_a), hlorofila *b* (C_b) i karotenoida (C_{x+c}) su određene na osnovu apsorpcije na 663 nm, 645 nm i 470 nm, prema jednačinama koje su dali Lichtenthaler i Wellburn (1983), koristeći *Lambda 750* spektrofotometar (Perkin-Elmer, Masačusets, SAD).

$$\begin{aligned}C_a &= 11,75 \cdot A_{663} - 2,35 \cdot A_{645} \\C_b &= 18,61 \cdot A_{645} - 3,96 \cdot A_{663} \\C_{x+c} &= \frac{1000 \cdot A_{470} - 2,27 \cdot C_a - 81,4 \cdot C_b}{227}\end{aligned}$$

Rezultati su izraženi u $\mu\text{g g}_{\text{suva masa}}^{-1}$.

4.2.4 De novo transkriptomaska analiza HL i DL srpske ramonde

Transkriptomaska analiza HL i DL srpske ramonde obuhvatila je sekvenciranje obogaćene iRNK. Metoda RNA-Seq izvedena je na *Illumina HiSeq 4000* platformi (Illumina Inc., Kalifornija, SAD) od strane Novogen kompanije (Kembridž, Velika Britanija). Prvi korak je bio izolovanje i provera kvaliteta RNK molekula, nakon čega je urađeno obogaćivanje iRNK, konstrukcija cDNK biblioteke i na kraju sekvenciranje. Obrada sirovih podataka se sastojala u spajanju *de novo* transkriptoma i funkcionalne anotacije sekvenci, nakon čega su analizirani DEG uz funkcionalno obogaćenje dobijene biblioteke anotiranih gena.

4.2.4.1 Izolovanje RNK iz listova srpske ramonde

Kako bi se dobilo sekvenciranje dobrog kvaliteta i dubine čitanja bilo je neophodno izolovati RNK visokog kvaliteta i čistoće iz HL i DL uzoraka. Preduzeti su svi neophodni koraci kako bi se sprečila degradacija RNK molekula. Homogenizacija tkiva listova (0,2 g) je rađena uz pomoć avana i tučka u tečnom azotu, nakon čega je u uzorak dodat TRIzol rastvor, u odnosu 1:5 i 1:10 (w/v) za HL i DL, redom. Posle završene inkubacije u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi, dodato je 200 μL hladne smeše hloroforma i izoamil-alkohola u odnosu 24:1 (v/v). Smeša je zatim vorteksovana 20 sekundi, inkubirana 3 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirana na 12000 x *g* tokom 10 minuta na 4 °C. Gornja, vodena faza pažljivo je izdvojena (~700 μL), a zatim je dodato pola zapremine (~350 μL) rastvora za taloženje RNK (0,8 M natrijum-citrat koji sadrži 0,4 M natrijum-hlorid i 0,8 M hlorovodoničnu kiselinu), kao i pola zapremine izopropanola. Smeša je kratko promešana, i nakon 30 minuta inkubacije na –20 °C, centrifugirana je pri 12000 x *g* tokom 10 minuta na 4 °C. Dobijeni talog RNK ispran je 1 mL 70 % etanola, osušen na vazduhu, i na kraju resuspendovan u 20 μL vode bez RNaze.

4.2.4.2 Provera kvaliteta RNK

Pre konstrukcije cDNK biblioteke svi uzorci koji su bili analizirani prošli su kroz sledeća tri koraka: (i) analizu na spektrofotometru za mikrolitarske zapremine (provera čistoće RNK, $A_{260/280}$); (ii) elektroforezu na agaroznom gelu (ispitivanje degradacije i moguće kontaminacije RNK); (iii) analizu na *Agilent 2100* uređaju (provera integriteta RNK).

4.2.4.3 Obogaćivanje iRNK, konstrukcija cDNK biblioteke i Illumina sekvenciranje

Nakon provere kvaliteta, za obogaćivanje iRNK korišćene su oligo(dT) kuglice. Obogaćena iRNK je zatim fragmentisana i cDNK je sintetisana pomoću nasumičnih heksamera u procesu reverzne transkripcije. Kada je završena sinteza prvog lanca dodat je pufer za sintezu drugog lanca, zajedno sa nukleozid trifosfatima (dNTP), RNazom, i polimerazom I iz *Escherichia coli*. Biblioteka cDNK je dobijena nakon jednog ciklusa prečišćavanja, reparacije krajeva, dodavanja poli-A repa, ligacije adaptera za sekvenciranje, selekcije po veličini i obogaćivanja lančanom reakcijom polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR). Koncentracija i kvalitet cDNK biblioteke je određeni su pomoću *Qubit 2.0* uređaja (Life Technologies, Kalifornija, SAD), nakon čega je razblažena do $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, a veličina i integritet izolovane RNK je proverena na *Agilent 2100* bioanalizatoru (Agilent Technologies, Valdbron, Nemačka). Preciznija koncentracija cDNK biblioteke je određena korišćenjem kvantitativnog PCR (eng. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR, Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD). Biblioteke cDNK su procesuirane i uzorci su sekvencirani na *Illumina HiSeq 4000* platformi (Illumina Inc., Kalifornija, SAD).

4.2.4.4 Spajanje de novo transkriptoma

Sirova očitavanja dobijena sa *Illumina* platforme transformisana su u sekvencionu očitavanja putem *base calling* procesa (u FASTQ formatu). Dobijena očitavanja su dalje obrađena pomoću internih skripti Novogene kompanije kako bi se uklonila ona koja sadrže sekvence adaptera, poli-N sekvence, kao i očitavanja niskog kvaliteta. Nakon filtriranja, izračunati su Q20, Q30 i GC sadržaj za čiste podatke.

Visokokvalitetni čisti podaci su zatim korišćeni za *de novo* sklapanje transkriptoma pomoću *Trinity* softvera (Grabher i sar. 2011). Ponovljeni transkripti uklonjeni su metodom *Corset* (Davidson i sar. 2014). Najduži transkripti iz svakog klastera izabrani su kao unigeni. Hijerarhijsko klasterovanje je izvršeno na osnovu višestrukih mapiranja i obrazaca ekspresije.

4.2.4.5 Anotacija dobijenih proteinskih sekvenci

Funkcionalna anotacija dobijenih sekvenci sprovedena je korišćenjem sledećih baza podataka: *NCBI NR* (ne-redundantne proteinske sekvence), *NCBI NT* (ne-redundantne nukleotidne sekvence), *Pfam* (baza proteinskih familija), *KOG/COG* (klasteri ortolognih grupa proteina), *Swiss-Prot*, *KEGG*.

4.2.4.6 Diferencijalna analiza ekspresije gena

Za identifikaciju DEG između HL i DL srpske ramonde, nivo ekspresije svakog transkripta je izračunat prema metodi *FPKM* (eng. *fragments per kilobase of target transcript length per million reads mapped*). Nivoi ekspresije gena su procenjeni metodom *RSEM* (eng. *RNA-Seq by expectation-maximization*, Li i Dewey 2011) za svaki uzorak tako što su čisti podaci mapirani nazad na sklopljeni transkriptom, a broj očitavanja za svaki gen je dobijen iz rezultata mapiranja. Pre analize DEG, brojevi očitavanja su normalizovani pomoću *edgeR* programa korišćenjem faktora skaliranja za svaku sekvenciranu biblioteku. Analiza DEG između HL i DL je sprovedena korišćenjem *DEGseq R* paketa. Vrednosti *p* su korigovane korišćenjem *Benjamini-Hochberg* metode. Korigovana *p*-vrednost $< 0,005$ i apsolutna vrednost $\log_2 \text{fold change} \geq 2$ su bili uslovi za značajnu diferencijalnu ekspresiju.

4.2.4.7 Funkcionalno obogaćivanje

Analiza funkcionalnog obogaćivanja, uključujući *GO* i *KEGG* termine, sprovedena je u poređenju sa pozadinom kompletnog transkriptoma. *GO* analiza obogaćivanja diferencijalno eksprimiranih gena je realizovana korišćenjem *GOseq R* paketa, uz korekciju pristrasnosti dužine gena. *GO* termini sa korigovanom *p*-vrednošću manjom od 0,05 smatrani su statistički značajno obogaćenim. Statistička analiza DEG obogaćivanja u *KEGG* putevima sprovedena je korišćenjem *KOBAS* softvera (Xie 2011).

4.2.5 Proteomska analiza ukupnog proteinskog ekstrakta HL i DL srpske ramonde

Kvantitativna diferencijalna proteomska analiza ekstrakta ukupnih proteina iz listova ramonde izvedena je uz pomoć hemijskog izotopskog obeležavanja, u ovom slučaju šestokanalnim *Tandem Mass Tag* () obeleživačem.

4.2.5.1 TMT Ekstrakcija proteina iz listova srpske ramonde

Uzorkovani su listovi srpske ramonde, sa četiri biljke (3-4 lista po biljci). Biološke replike za svaku grupu su homogenizovane tučkom u avanu u prisustvu tečnog azota, a zatim su ekstrahovani proteini po prethodno optimizovanom protokolu (Vidović i sar. 2020). Prema ovom protokolu, proteini su najpre taloženi dodatkom 10 % trihlorsirćetne kiseline (eng. *trichloroacetic acid*, *TCA*, *EMSURE ACS grade*, kat. br. 100807, čistoća $\geq 99,5$ %, Merck, Darmštadt, Nemačka) u acetonu u prisustvu 0,07 % 2-merkaptometanola (kat. br. 444203, čistoća ≥ 99 %, Merck, Darmštadt, Nemačka), a zatim centrifugirani na 16000 $\times g$, na 4 °C tokom 10 minuta. Dodatno taloženje je izvršeno 80 % metanolom koji je sadržao 0,1 M amonijum-acetat. Dobijeni talozi su isprani 80 % acetonom i pod strujom argona, nakon čega su proteini ekstrahovani jednakom zapreminskom smešom pufera (50 mM Tris pufer, pH 8,0 sa etilendiamintetrasirćetnom kiselinom, EDTA, 2 mM fenilmetilsulfonil-fluoridom, PMSF i 30 % saharozom) i fenola ekvilibrisanog pomoću tris(hidroksimetil)aminometan (Tris, pH 8,0) pufera. Donja vodena faza je sadržala soli, ugljene hidrate, glikozilovana fenolna jedinjenja, nukleinske kiseline i nerastvorive ostatke ćelija, dok je gornja, fenolna faza sadržala proteine, hidrofobna fenolna jedinjenja, lipide, pigmente hlorofil i karotenoide. Fenolna faza je dalje korišćena za precipitaciju proteina 80 % metanolom koji je sadržao 0,1 M amonijum-acetat. Nakon ispiranja dobijenog taloga acetonom, proteini su resuspendovani u 0,1 M Tris puferu, (pH 7,5) koji je sadržao 7 M ureu, 0,4 % 3-[(3-holamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonat (CHAPS), 2 mM EDTA i 20 mM ditiotritol (DTT).

4.2.5.2 Digestija tripsinom, redukcija i alkilovanje

Svaki uzorak (50 μg proteina) je pripremljen pomoću *FASP* (eng. *Filter-Aided Sample Preparation*) metode (Vivacon, limit: 10 kDa), kao što je opisano u radu Vidović i sar. (2020). Proteini su redukovani (50 mM DTT u 50 mM amonijum-hidrogenkarbonat inkubirano je 30 minuta na 56 °C), zatim alkilovani (50 mM 2-jodoacetamid u 50 mM amonijum-hidrogenkarbonatu, inkubirano je 20 minuta na 37 °C u mraku) i podvrgnuti tripsinskoj digestiji tokom noći (odnos enzima i proteina je bio 1:100). Dobijeni peptidi su rastvoreni u 0,1 % mravljoj kiselini, prečišćeni pomoću C18 kolona (Sep-Pack, C18, Waters, Milford, SAD), i upareni korišćenjem rotacionog vakuum uparivača, nakon čega su resuspendovani su u rastvoru 0,1 % mravlje kiseline do finalne koncentracije 0,25 $\mu g \mu L^{-1}$.

4.2.5.3 TMT obeležavanje

Prečišćeni peptidi su označeni šestokanalnim *TMT* reagensom (Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD; tagovi 126, 127 i 128 za HL i 129, 130 i 131 za DL) prema protokolu proizvođača. Ukratko, 8 μL svakog *TMT* obeleživača (0,8 mg u 40 μL acetonitrila) je dodato svakom ekstraktu peptida (Ebinezar i sar 2020). Reakcioni rastvor je inkubiran na sobnoj temperaturi 1 h, a reakcija je zaustavljena dodavanjem 8 μL 5 % (w/v) hidroksilamina. Nakon prečišćavanja pomoću *zip-tip* C18 nastavaka, efikasnost obeležavanja je proverena pomoću tečne hromatografije kuplovane sa tandem

masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Dobijeni podaci su pretraživani pomoću *Mascot* pretraživača postavljajući *TMT* obeležavanje kao promenljivu modifikaciju. Svi peptidi su bili modifikovani na N-terminusu i lizinskom ostatku, nakon čega je svih šest označenih uzoraka pomešano u jednakim količinama i upareno na rotacionom vakuum uparivaču.

4.2.5.4 Frakcionisanje jakim katjonskim jonoizmenjivačem

Da bi se smanjila kompleksnost mešavine peptida i povećala MS detekcija, obeleženi i prečišćeni peptidi su frakcionisani pomoću jakog katjonskog jonoizmenjivača (eng. *strong cation exchange*, SCX), koristeći SCX kertridž (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD) i prateći protokol proizvođača. Pomešani obeleženi peptidi su resuspendovani u 500 µL pufera (5 mM kalijum-dihidrogenfosfat, 25 % acetonitril, pH 2,9) i naneti na kertridž. Obeleženi peptidi su eluirani u šest koraka uz rastući gradijent koncentracije kalijum-hlorida (50, 100, 150, 200, 250 i 350 mM) pri brzini protoka od 50 µL min⁻¹ (Ebinezar i sar 2020). Svaka frakcija je uparena uz pomoć vakuuma, resuspendovana u 0,1 % mravljoj kiselini i rasoljena korišćenjem C18 kolona. Rasoljeni uzorci su osušeni pod vakuumom i neposredno pre analize resuspendovani u 0,1 % mravljoj kiselini do procenjene koncentracije od 1 mg mL⁻¹ neposredno pre analize.

4.2.5.5 Tečna hromatografija kuplovana sa tandem masenomnom spektrometrijom (LC-MS/MS)

Peptidi svih bioloških replika (po četiri uzorka za HL i DL) analizirani su *Ultimate 3000 nano-LC* sistemom (Dionex-Thermo Fisher Scientific, Kalifornija, SAD) kuplovanim sa *LTQ-Orbitrap XL* masenim spektrometrom (MS, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka) prema metodi opisanoj u radovima Borgo i sar (2017) i Ebinezar i sar. (2020). Ukratko, peptidi (1 µg) su naneti na hromatografsku kolonu (*PicoFrit*, unutrašnji dijametar 75 µm, 15 µm Tip, New Objective) pakovanu sa C18 matriksom (Aeris Peptide 3.6 µm XBC18, Phenomenex), i razdvojeni korišćenjem linearnog gradijenta acetonitrila (od 3 % do 50 %) pri brzini protoka od 250 nL min⁻¹, tokom 90 min. Napon i temperatura su podešeni na 1,2–1,3 kV, odnosno 200 °C. MS spektri su snimljeni u pozitivnom režimu jonizacije, sa opsegom skeniranja *m/z* vrednosti od 300 do 1700 Da. Prvo je urađeno kompletno skeniranje pri visokoj rezoluciji (60000) na *Orbitrap* MS uređaju, nakon čega su usledila MS/MS skeniranja na tri najintenzivnija jona sa dva tipa fragmentacije, koliziono indukovana disocijacija (eng. *collision-induced dissociation*, CID za identifikaciju) i koliziona disocijacija visoke energije (eng. *higher-energy collisional dissociation*, HCD, za kvantifikaciju).

4.2.5.6 Obrada podataka

Podaci su pretraživani pomoću *Proteome Discoverer* softvera (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka), mapiranje i moguće protein-protein interakcije, kao i vizuelizacija rađeni su u softverima *Mapman* i *STRING*. Svi peptidi identifikovani sa dva jedinstvena peptida i visokom pouzdanošću (99 %) su korišćeni za generisanje liste isključenih jona, a zatim su svi uzorci (po četiri za HL i DL) ponovo analizirani pod identičnim instrumentalnim i hromatografskim uslovima, osim što je promenjen spisak isključenih jona.

Sirovi fajlovi su analizirani pomoću *Proteome Discoverer* 1.4 softvera (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka) i pretraživani korišćenjem *Sequest HT* (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka) i *Mascot Search Engine* (Matrix Science, London, UK) programa za identifikaciju proteina. Rezultati su filtrirani tako da se isključe spektri koji sadrže manje od pet pikova i manje od 50 jona. Podaci su pretraživani naspram *RNA-Seq* baze podataka za listove *R. serbica* (205636 sekvenci) i uračunate su sekvence najčešćih kontaminacija za proteomske eksperimente. Limiti za peptide i fragmente su postavljeni na 10 ppm i 0,6 Da, respektivno. Specifičnost enzima tripsina je podešena do dva propuštene mesta sečenja. Karbamid-metil-cistein i šestokanalni *TMT* obeleženi na N-terminusu i ostacima lizina, postavljeni su kao fiksne modifikacije, dok je oksidacija metionina postavljena kao promenljiva peptidna modifikacija. Rezultati dobijeni sa oba pretraživača su kombinovani u jedan izlazni fajl pomoću *Proteome Discoverer* softvera. Kao pozitivni rezultati uzeti

su samo proteini identifikovani sa najmanje dva jedinstvena peptida i kvantifikovani sa najmanje dva nezavisna peptida. Diferencijalno zastupljeni proteini (eng. *differentially abundant proteins*, DAP) su mapirani u metaboličke puteve pomoću *Mapman 3.6.0RC1* softvera (Thimm i sar 2004). Funkcionalna klasifikacija korišćenjem *TAIR* kodova izvršena je ručno. Unutarćelijske lokacije identifikovanih DAP su pretpostavljena pomoću *TargetP 1.1* servera (Emanuelsson i sar. 2007) i *Protein Prowler Subcellular Localisation Predictor* verzije 1.2. Da bi se predvidela specifična kompartmentalizacija svakog LEA proteina, korišćen je *WoLF-PSORT* alat. Korišćenjem *STRING* verzije 11.5, analizirane su protein-protein interakcije, da bi se ispitali svi mogući partnerski proteini uključeni u interakcije.

4.2.6 Kvalitativna i kvantitativna analiza solubilnih šećera iz listova srpske ramonde

Sadržaj rastvorljivih ugljenih hidrata meren je prema Vidović i sar. (2015). Oko 0,1 g smrznutog biljnog tkiva je homogenizovano u tečnom azotu, ekstrahovano u 1 mL dejonizovane vode i stavljeno u ultrazvučno kupatilo na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta. Uzorci su centrifugirani pri 14000 x *g* tokom 10 minuta na 4 °C. Reekstrakcija iz taloga je urađena metanolom na gore opisan način. Dobijeni supernatanti su spojeni za dalju analizu. Hromatografska separacija je izvršena korišćenjem *DIONEX ICS 3000 DP* tečnog hromatografskog sistema (Dionex, Sunnyvale, Kalifornija, SAD). Ugljeni hidrati su razdvojeni na *CarboPac® PA100* pelikularnoj anjonizmenjivačkoj koloni (4 × 250 mm; Dionex, Sunnyvale, Kalifornija, SAD) na 30 °C. Rastvor A – 600 mM natrijum hidroksid, rastvor B – 500 mM natrijum-acetat, rastvor C – dejonizovana voda. Pre početka analize svakog uzorka, sistem je ekvilibrisan tokom 15 minuta rastvorom 15 % A i 85 % C. Injektovanje uzorka (25 µL) je rađeno pomoću *ICS AS-DV 50* autosemplera (Dionex). Elektrohemijski detektor je imao radnu Ag elektrodu, dok je Ag/AgCl elektroda korišćena kao referentna.

Mobilna faza je pratila linearni gradijent pri protoku od 0,7 mL min⁻¹:

- 0–5 minuta, 15 % A, 85 % C;
- 5–12 minuta, 15 % A, 2 % B, 83 % C;
- 12–20 minuta, 15 % A, 4 % B, 81 % C;
- 20–30 minuta, 20 % A, 20 % B 60 % C.

4.2.7 Analiza fenolnih jedinjenja iz listova srpske ramonde

Smrznuti HL (~100 mg) i DL (~50 mg) srpske ramonde su homogenizovani u tečnom azotu, i ekstrahovani u metanolu sa 0,1 % HCl (1-10 w/v) tokom 50 minuta, na ledu, u mraku i uz mešanje. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 16000 x *g*, na 4 °C. Odvojen je supernatant, a reekstrakcija taloga je urađena na opisani način dva puta. Dobijeni supernatanti (600 µL) su pomešani sa dejonizovanom vodom (400 µL) i hloroformom (600 µL), ostavljeni 45 minuta u mraku na 4 °C uz mešanje. Nakon centrifugiranja (10 minuta na 16000 x *g*, na 4 °C), odvojen je gornji vodeni sloj i podeljen na dva jednaka dela. Prvi deo je korišćen za analizu fenolnih glikozida, dok je druga polovina hidrolizovana radi detekcije aglikona, 60 minuta na 85 °C u 2 M HCl. Ekstrakti su čuvani na –20 °C do analize. Analiza je izvršena tečnom hromatografijom visokih preformansi (eng. *high-performance liquid chromatography*, HPLC; (LC-20AB Prominence HPLC, Shimadzu, Kjoto, Japan) koristeći 250 × 4,6 mm, 5,0 µm, *Luna C18* reverzno-faznu kolonu (Phenomenex Ltd. Torans, USA). Fenolna jedinjenja su razdvojena pri protoku od 1 mL min⁻¹ smešom eluenata A (acetonitril) i B (sirćetna kiselina/acetonitril/fosforna kiselina/voda: 10,0/5,0/0,1/84,9, v/v/v/v) na 25 °C. Fenolna jedinjenja su eluirana pri sledećem protokolu:

- 0–5 minuta, 100 % B (izokratsko eluiranje);
- 5–25 minuta, 100–80 % B (linearni gradijent);
- 25–30 minuta, 80–60 % B (linearni gradijent);
- 35–40 minuta, 60–100 % B (linearni gradijent).

Fenolna jedinjenja su analizirana pomoću *SPD-M20A Photot Diode Array Prominence* i fluorescentnog detektora *RF-10-AXL* (Shimadzu, Kjoto, Japan). Hromatogrami su snimani na različitim talasnim dužinama u zavisnosti od apsorpcionog maksimuma za datu grupu fenolnih jedinjenja: antocijani (520 nm), flavon-3-oli (360 nm), flavoni (340 nm), hidroksicinamati (320 nm), katehini, hidroksibenzoeve kiseline i njihovi derivati (289 nm). Kvantifikacija je izvršena na osnovu površine pikova koristeći *Shimadzu LC Solution* softver (Shimadzu, Kyoto, Japan).

4.2.8 FTIR analiza polimera ćelijskog zida iz listova srpske ramonde

Ćelijski zid HL i DL srpske ramonde, je izolovan prema proceduri opisanoj u Živanović i sar. (2021). Listovi su samleveni u avanu sa tučkom u tečnom azotu i ekstrahovani 80 % metanolom (1:8, w/v) uz mućkanje tokom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Homogenat je centrifugiran pri 1000 x *g* tokom 20 minuta na sobnoj temperaturi, a pelet je ispran dva puta 80 % metanolom. Talog je resuspendovan u 1 M NaCl sa 0,5 % Triton X-100 i centrifugiran pri 1000 x *g* tokom 20 minuta na sobnoj temperaturi. Talog je ispran destilovanom vodom, jednom apsolutnim metanolom i dva puta acetonom. Serija ekstrakcija organskim rastvaračima urađena je kako bi se iz homogenizovanog uzorka uklonili pigmenti, alkaloidi, tanini, rastvorljivi šećeri i drugi metaboliti male molekulske mase. Prečišćeni ćelijski zid je osušen i korišćen za strukturne analize. Korišćenjem infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR) određen je profil komponenti ćelijskog zida HL, DL, R1, R2 i R3 uzoraka srpske ramonde. Uzorci su analizirani FTIR spektrometrom *Nicolet™ Summit* u kombinaciji sa *Everest™* dijamantskim ATR dodatkom. Spektri su zabeleženi kao prosek 64 skeniranja po uzorku. Obrada spektralnih podataka i analiza glavnih komponenti (PCA) sprovedeni su u softverskom programu *Quasar*. Prethodna obrada spektra obuhvatila je sledeće korake: izgladivanje *Savitzky-Golay* algoritmom (prozor = 5 tačaka), korekciju bazne linije metodom „*rubberband*“, normalizaciju spektra primenom *SNV* (eng. *standard normal variate*, *SNV*), kao i korekciju rasipanja primenom *MSC* (eng. *multiplicative scatter correction*, *MSC*) metode.

Nakon predobrade spektralnih podataka u programu *Quasar*, urađena je analiza glavnih komponenti (PCA). Pre finalne analize izvršena je optimizacija izbora spektralnog regiona i strategije predobrade.

4.2.9 Analiza glikoproteina ćelijskog zida listova srpske ramonde *in situ* konfokalnom mikroskopijom

4.2.9.1 Priprema biljnog tkiva za imunofluorescentno bojenje

Praćenje promena u lokalizaciji komponenti ćelijskog zida *in situ*, rađeno je imunofluorescentnim bojenjem. Prvo su 1x1 mm komadi srpske listova ramonde isečeni i na njih je dodat rastvor paraformaldehida (2 %) i glutaraldehida (2,5 %) u natrijum-fosfatnom puferu (pH 7,4) sa fiziološkim rastvorom (eng. *phosphate buffered saline*, *PBS*). Tkivo je stavljeno pod podpritisku (oko 0,7 bar) sedam puta sa pauzama od 10 minuta nakon svakog izlaganja podpritisku. Nakon fiksiranja, tkivo je isprano tri puta u puferu, u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi, potom su uzorci isprani destilovanom vodom tri puta, pri istim uslovima. Proces dehidracije uzoraka je urađen serijom ispiranja rastvorima sa gradijentno rastućom koncentracijom etanola (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 96 %). Svako ispiranje je trajalo 15 minuta na sobnoj temperaturi. Finalno, tkivo je isprano 99,8 % etanolom dva puta po 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, etanol je zamenjen mešavinom rastvora 3:1, 1:1 i 1:3 etanola 99,8 % i *LR White* smole, u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi, a zatim je korišćena 100 % smola preko noći na 4 °C. Rastvor smole je zamenjen i ostavljen 8 h na sobnoj temperaturi. Uzorci su enkapsulirani u želatinske kapsule i započet je proces polimerizacije u trajanju od 48 h na 55 °C u pećnici.

4.2.9.2 Imunofluorescentno bojenje i konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija

Nakon završene polimerizacije isečeni su preseći (1 μm), koristeći dijamantski nož ultramikrotoma i stavljeni su na mikroskopske pločice imobilizovane polilizinom i osušene na 45 °C. Svaka pločica je prvo pokvašena PBS u trajanju od 15 minuta, blokiranje je izvršeno 2 % rastvorom BSA u PBS (30 minuta), nakon čega je isprana istim puferom (15 minuta) na sobnoj temperaturi. Za detekciju komponenti ćelijskog zida korišćena su primarna monoklonska antitela specifična za različite komponente ćelijskog zida (JIM13 – galaktozil ostatak AGP, LM1 – ekstenzin, LM2 – glukuronil ostatak AGP, LM16 – RGI galaktozil ostatak, LM19 – neesterifikovani HG, LM20 metil-esterifikovani HG). Primarno antitelo (razblaženje 1:50) je dodato u 0,1 % rastvora BSA u PBS i inkubirano je preko noći na 4 °C i sledećeg dana još 15 minuta na sobnoj temperaturi. Pločica je ispirana četiri puta PBS rastvorom na sobnoj temperaturi tokom 20 minuta. Sekundarno antitelo obeleženo fluorescentnom bojom je razblaženo (1:200) 0,1 % rastvorom BSA u PBS i inkubirano je preko noći na 4 °C i ponovo još 15 minuta sledećeg dana na sobnoj temperaturi. Rastvor je uklonjen i preseći su isprani dva puta sa PBS (15 minuta, sobna temperatura) i pet puta destilovanom vodom (10 minuta, sobna temperatura). Preseći su obojeni *Calcofluor White* bojom za kontrastiranje slike, i vizuelizovani su koristeći konfokalnu skenirajuću mikroskopiju. Kontrolni preseći su pripremljeni bez inkubacije sa primarnim antitelom, analize su izvršene u triplikatu za svaku biološku repliku.

4.2.10 Analiza histoloških promena ćelijskog zida listova srpske ramonde optičkom mikroskopijom

Tkivo je pripremljeno na isti način kao za imunofluorescentno bojenje (poglavljje 4.2.10.1), ali bez inkubacije antitelima. Nakon ispiranja pločica u PBS i vodi, preparati su bojeni 0,5% rastvorom toluidin plavog u vodi, u trajanju od 30 sekundi u cilju vizualizacije anatomskih promena lista biljke tokom desikacije. Posmatranje i fotografisanje izvršeno je korišćenjem *Olympus BX51* mikroskopa sa *FluoView v.5.0* softverom (Olympus Corporation, Tokio, Japan).

4.2.11 Ekstrakcija i analiza fenolnih jedinjenja vezanih za ćelijski zid listova srpske ramonde

Talozi preostali nakon ekstrakcije i reekstrakcije rastvorljivih fenolnih jedinjenja (poglavljje 4.2.8) isprani su tri puta metanolom. Fenolna jedinjenja vezana za ćelijski zid su izolovana alkalnom hidrolizom u 1 M NaOH dobijenih taloga, inkubiranjem na 80 °C, sat vremena a zatim preko noći na sobnoj temperaturi. Ovako hidrolizovani uzorci su neutralisani koncentrovanim rastvorom HCl i analizirani HPLC kuplovanom sa fotodiodnim detektorom (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD). Fenolna jedinjenja su razdvojena koristeći 250 $\times$ 4,6 mm, 5,0 mm, Luna C18 revezno-faznu kolonu (Phenomenex Ltd. Torrance, Kalifornija, SAD). Uslovi eluiranja i detekcije su bili isti kao i u poglavljju 4.2.8.

4.2.12. Proteomska analiza frakcija obogaćenih ćelijskim zidom listova srpske ramonde

4.2.12.1 Ekstrakcija proteina ćelijskog zida listova srpske ramonde

U cilju dobijanja proteinskih frakcija sa što višim sadržajem proteina ćelijskog zida, isprobana su dva protokola: (i) fenolom-potpomognuta ekstrakcija ukupnih proteina listova (Faurobert i sar. 2007); i (ii) ekstrakcija proteina iz prethodno izolovanih frakcija ćelijskog zida (Printz i sar. 2015).

Fenolom-potpomognuta ekstrakcija ukupnih proteina listova je rađena prema modifikovanom protokolu Faurobert i sar. (2007). Homogenizovano biljno tkivo u tečnom azotu je resuspendovano u ekstrakcionom puferu 0,5 M Tris puffer (pH 7,5) koji je sadržao i 50 mM EDTA, 0,7 M saharozu, 0,1 M KCl, 10 mM tioureu, 1 % DTT) uz mešanje. U smešu je dodata jednaka zapremina fenola puferisanog Tris puferom (pH 8,0) 30 minuta na 4 °C. Nakon toga dobijena emulzija je centrifugirana 30 minuta na 6000 $\times g$. Gornja fenolna faza je pažljivo prebačena u novu epruvetu i reekstrahovana istom zapreminom ekstrakcionog pufera, pri istim uslovima kao prvi put. Dobijeni supernatant je ukapavan u falkon sa pet puta većom zapreminom ledeno hladnog metanola koji je sadržao 0,1 M

amonijum-acetat. Uzorci su inkubirani preko noći na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega su centrifugirani 20 minuta na $6000 \times g$ na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dobijeni talozi su isprani ledeno hladnim metanolom, zatim ledeno hladnim acetonom, da bi na kraju bili osušeni na vazduhu.

Ekstrakcija proteina iz prethodno izolovanih frakcija ćelijskog zida prema protokolu datom od strane Printz i sar. (2015) je najpre podrazumevala homogenizaciju uzorka listova u tečnom azotu i resuspendovanje homogenizovanog uzorka u startnom izoosmotskom puferu (5 mM natrijum-acetat, pH 4,6 uz prisustvo 0,4 M saharoze, 20 mM askorbata i 10 mM tris(2-karboksietil)fosfina) kako bi se sprečilo pucanje ćelija i organela i u daljem radu sprečila kontaminacija frakcija ćelijskog zida. Nakon tridesetominutne ekstrakcije, uz mešanje na ledu, uzorci su centrifugirani 20 minuta na $11000 \times g$ na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Postupak je ponovljen na isti način sa startnim puferom koji je ovaj put sadržao 0,6 M saharozu, a zatim i sa 1 M saharozom, sa ciljem da se uklone i svi proteini unutar organela. Nakon toga uzorci su ispirani startnim puferom bez saharoze tri puta po 30 minuta, kako bi se dobile frakcije obogaćene ćelijskim zidom. Naredni koraci, koji su se odnosili na ekstrakciju proteina koji su jonskim (elektrostatičkim) interakcijama vezani za naelektrisane komponente ćelijskog zida (kao na primer pektinske karboksilne grupe) sprovedeni su uz mućkanje na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega je usledilo centrifugiranje u trajanju od 15 minuta na $1000 \times g$, na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prva frakcija ćelijskog zida je ekstrahovana 200 mM kalcijum-hloridom u startnom puferu (dva puta po 30 minuta, ekstrakcija proteina najslabije vezanih za ćelijski zid), zatim druga frakcija 50 mM EGTA u startnom puferu (dva puta po 60 minuta, dolazi do olabavlivanja pektina i ekstrakcije proteina koji su bili vezani sa njim), i na kraju su uzorci ostavljeni u 3 M litijum-hloridu preko noći (treća frakcija, ekstrakcija proteina koji su čvršće jonski vezani za ćelijski zid). Sve frakcije su liofilizovane i čuvane na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analiza.

4.2.12.2 Priprema uzoraka

Talozi dobijeni fenol-potpomognutom ekstrakcijom su resuspendovani u rastvoru sa 6 M ureom, 2 M tiouream, 10 mM DTT, 30 mM Tris puferom (pH 8,5) i 0,1 % RapiGest deterdžentom (Waters, Masačusets, SAD). Nakon određivanja koncentracija koristeći 2-D QuantKit (GE Healthcare, Čikago, Ilinois, SAD), proteini su inkubirani na sobnoj temperaturi 30 minuta, a zatim alkilovani sa 50 mM jodoacetamidom tokom 60 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Smeša je zatim razblažena deset puta u 50 mM amonijum-hidrogenkarbonatnom puferu kako bi se smanjile ukupne koncentracije uree i tiouree, a zatim su proteini digestovani tripsinom (800 ng, Promega, Madison, Viskonsin, SAD) preko noći na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dobijeni peptidi su prečišćeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi (eng. *solid phase extraction*, SPE) korišćenjem C18 kolone (Phenomenex), pri čemu je rastvor za ispiranje sadržao 0,06 % sirćetne kiseline i 3 % acetonitrila. Nakon eluiranja sa 0,6 % sirćetnom kiselinom i 70 % acetonitrilom, peptidi su osušeni na rotacionom vakuum uparivaču.

4.2.12.3 „In gel“ digestija proteina iz prethodno izolovanih frakcija ćelijskog zida

Uzorci dobijeni ekstrakcijom proteina iz prethodno izolovanih frakcija ćelijskog zida su razdvojeni korišćenjem kratkotrajne SDS-PAGE, tako da je front razdvajanja proteina bio oko 1,5 cm. Dobijene trake su isečene na 3 uzdužna jednaka dela, a srednja traka je zatim isečena na šest delova, jednakih kvadrata sa osnovom od oko 1-1,5 cm koji su prebačeni u epruvetu od 1,5 mL i prekriveni sa 30 μL rastvora 10 % sirćetne kiseline, 40 % etanola u destilovanoj vodi. Rastvor treba u potpunosti da prekrije komadiće gela, kako bi se gel dehidratirao. Tečnost je uklonjena i dodato je 30 μL 25 mM amonijum-hidrogenkarbonatnog pufera pH 8,0 koji je sadržao 25 % acetonitril (rastvor A), inkubirano je 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je uklonjena sva tečnost. Prethodna dva koraka su ponovljena tri puta, nakon čega su komadići gela dehidratirani u potpunosti sa acetonitrilom i redukovani dodatkom 50 μL sveže napravljenog rastvora 10 mM DTT (tako da svi komadi gela budu prekriveni) tokom 45 minuta na $56\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon toga, opet je uklonjena sva tečnost i alkilovanje je urađeno dodatkom 40 μL sveže napravljenog rastvora 55 mM jodoacetamida tokom 45 minuta inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon toga, višak tečnosti je uklonjen i

komadići gela su isprani sa 30 μL rastvora A, a potom i dehidrirani sa acetonitrilom. U dehidratisane komadiće gelova dodato je 100 ng tripsina, nakon što je gel nabubrio i pokupio tečnost dodato je još 50 μL rastvora A. Po završetku prekonoćne inkubacije na 37 °C, epruvete su kratko centrifugirane, supernatant je prebačen u novu čistu epruvetu, a u komadiće gela dodato je još 10 μL rastvora A, koji je inkubiran 10 minuta na sobnoj temperaturi i novodobijeni supernatant je spojen sa prethodnim supernatantom. Dodatna ekstrakcija peptida iz komadića gelova urađena je dodatkom 50 μL rastvora 0,5 % trifluorsirćetne kiseline i 50 % rastvora acetonitrila u vodi uz inkubaciju tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Dobijeni supernatant je pridružen prethodno dobijenim supernatantima. Na kraju, kako bi se kvantitativno ekstrahovali svi peptidi iz seckanog gela, dodato je još 30 μL acetonitrila, inkubirano je 15 minuta, i dobijeni supernatant je pridružen prethodno dobijenim supernatantima. Spojeni supernatanti su upareni na rotacionom vakuum uparivaču.

4.2.12.4 Razdvajanje peptida i identifikacija pomoću MS

U cilju dobijanja što optimalnijih rezultata, urađena je provera kvaliteta jednog uzorka (provera određivanja koncentracije, čistoće peptida, efikasnosti digestije, očekivanih rezultata). Dobijeni talozi peptida su resuspendovani u 20 μL pufera za uzorke (2% acetonitril, 0,1% mravlja kiselina u vodi), a 100 ng proteina po uzorku je razdvajana najpre na kratkom gradijentu koristeći *timsTOF Pro* maseni spektrometar kuplovan sa *nanoElute* tečnom hromatografijom (Bruker Daltonik GmbH, Nemačka), kako bi se proverio kvalitet uzoraka. Injektovano je 1 μL uzorka na *trap* kolonu (Acclaim PepMap C18, dimenzija 0,1 mm $\times$ 20 mm, 5 μm , veličina pora 100 Å, Thermo Fisher Scientific) i ispirano puferom za uzorke (5 μL).

Peptidi su finalno razdvojeni na *Aurora* C18 koloni (dimenzije 75 μm $\times$ 250 mm, 1,6 μm , veličina pora 120 Å, Ion Opticks, Australija) koristeći *timsTOF Pro* maseni spektrometar kuplovan sa *nanoElute* tečnom hromatografijom (Bruker Daltonik GmbH, Nemačka) pri protoku od 200 nL min⁻¹ koristeći sistem sa dva pufera na 50 °C. Eluent A – 0,1 % mravlja kiselina u vodi, eluent B – 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu. Gradijent razdvajanja je bio sledeći:

- 0–5 minuta, 1–5 % B;
- 5–19 minuta, 55 –13 % 2–5 % B;
- 19–26 minuta, 13 –19 % 2 –5 % B;
- 26–30 minuta, 19 –22 % 2 –5 % B;
- 30–37 minuta, 95 % B.

Jonizacija peptida je izvršena korišćenjem *CaptiveSpray* nanoelektrosprej jonskog izvora (Bruker Daltonik GmbH) pri naponu od 1,6 kV, temperaturi izvora od 180 °C i protoku suvog gasa od 3 L min⁻¹.

Prikupljanje podataka je obavljeno u *DDA-PASEF* (eng. *data-dependent acquisition - parallel accumulation-serial fragmentation*) režimu korišćenjem *oTof Control* 6.0.3 (Bruker) softvera. Opseg *m/z* je bio podešen od 100 do 1700. Opseg mobilnosti jona je bio 0,7 do 1,1 V·s(cm²)⁻¹ Ko⁻¹ u trajanju od 166 ms. Fragmentacija je izvedena energetskim prelazom od 20 do 59 eV za prekursore sa naelektrisanjem od 0 do 5 uz prag intenziteta od 1000 cts s⁻¹ (eng. *count per second*, cts) i ciljanim intenzitetom od 20000 cts s⁻¹ u 6 *PASEF* skanova koristeći isti oseg mobilnosti. *PASEF* skan je ponovljen šest puta. Aktivna ekskluzija je bila podešena na 24 s. Ukupan ciklus trajao je 1,3 sekunde.

4.2.12.5 Pretraga baze i identifikacija proteina

Pretraga baze podataka je izvedena korišćenjem *X!Tandem Alanine* softvera (2017.2.1.4, Craig i Beavis 2004) koristeći *R. serbica* transkriptomsku bazu podataka dobijenu prethodno opisanom *de novo* transkriptomskom analizom i deponovanom na: <https://zenodo.org/record/6341873> i internu bazu kontaminanata. Digestija *in silico* je izvedena korišćenjem tripsina (hidroliza posle lizina i arginina, osim ako sledi prolin) uz dozvoljeno jedno propušteno mesto sečenja. Karboksamidometilovanje cisteinskih ostataka je bila podešena kao statička modifikacija, dok su oksidacija metionina, hidrosilacija prolina, N-terminalno acilovanje proteina sa ili bez uklanjanja

prvog metionina, piroglutamat sa N-terminalnog glutamina i ciklizacija glutaminske kiseline bile podešene kao moguće modifikacije. Proteini su identifikovani korišćenjem *i2MassChrQ* softver (verzija 1.0.18; Langella i sar. 2024). Detaljnija analiza je izvedena uz dozvoljena tri propuštena mesta sečenja tripsinom, i uz deamidaciju glutamina i asparagina kao potencijalne modifikacije. Selektovani su proteini sa *e*-vrednošću proteina manjom od 0,00001, a koji su sadržali najmanje dva različita peptida sa *e*-vrednošću manjom od 0,01. Proteini identifikovani u bazi kontaminanata uklonjeni su nakon inferencije. Proteini su kvantifikovani korišćenjem *masschroq* softver (verzija 2.4.30, Valot i sar. 2011). Masena preciznost je podešena na 20 ppm, a kvantifikacija je izvedena na nivou od 80 % teorijskog prirodnog izotopskog profila.

4.2.12.6 Obrada podataka

Nakon dobijene liste detektovanih i anotiranih proteina iz uzoraka proteina iz frakcija obogaćenih ćelijskim zidom, potencijalni kontaminanti iz drugih ćelijskih kompartmenata su udaljeni kroz poseban korak, ručno. Detektovani proteini su bili anotirani da li potiču iz ćelijskog zida, na osnovu sledeća tri kriterijuma: (i) prisustva signalnog peptida na osnovu *TargetP* analize (Almagro Armenteros i sar. 2019), koja ukazuje da je protein sekretorni, odnosno da se transportuje u apoplast i/ili ćelijski zid; (ii) homologije sekvence od 70 % sa dobijenim proteinima za koje je *TargetP* predvideo signalni peptid; i (iii) anotirana identifikacija proteina da bude navedena u bazi proteina za koje je eksperimentalno potvrđeno da se nalaze u ćelijskom zidu prema Albenne i sar. (2013).

Nakon dobijene liste sa proteinima anotiranim da se nalaze u ćelijskom zidu, pristupilo se dvema metodama obrade eksperimentalno identifikovanih peptida na osnovu: (i) ekstrakcije jonskih hromatograma (eng. *extracted ion chromatogram*, XIC); i (ii) broja spektara (eng. *spectral count*, SC). Obrada podataka je u oba slučaja urađena korišćenjem skripti R programskog jezika (verzija 4.2.0; Balliau i sar. 2025), koje su pratile program *MCQR* softver tok (Balliau i sar. 2025). Uzorkovane tačke HL (hidratisani listovi), DL (desikovani listovi), R1 (listovi nakon 1 h od ponovnog zalivanja) i R3 (listovi nakon 2 dana od ponovnog zalivanja) su sadržale po četiri biološke replike, dok je za R2 (listovi nakon jednog dana od ponovnog zalivanja) bilo tri.

Ekstrakcija jonskih hromatograma (XIC)

Nakon ekstrakcije jonskih hromatograma, dobijeni podaci su podrgrgnuti višestepenom postupku obrade. Prvi korak obuhvatio je kontrolu kvaliteta i filtriranje peptida primenom sledećih kriterijuma, gde su isključene *m/z* vrednosti: (i) sa širinom hromatografskog pika većom od 200 sekundi u bilo kojem injektovanom uzorku (filter 1); (ii) sa standardnom devijacijom retencionog vremena većom od 20 s (filter 2); (iii) sa retencionim vremenima između 0 i 850 s; i (iv) proteina koji nemaju jedinstvene peptide (filter 4). Kako bismo utvrdili koji je najoptimalniji način normalizacije dobijenih rezultata, isprobane su različite metode (procenat, razlika medijana, razlika medijana retencionog vremena, medijana i medijana retencionih vremena). Za ovaj set podataka metoda izbora je bila medijana (medijana intenziteta MS merenja oduzima se od intenziteta svakog *m/z* peptide, a zatim se medijana intenziteta celokupnog eksperimenta dodaje intenzitetima *m/z* peptida). Nakon normalizacije, u daljoj analizi spojeni su uzorci HL i R3 (48 h od zalivanja) kao i DL i R1 (1 h od zalivanja), a R2 (24 h od zalivanja) je ostavljena kao nezavisna grupa kako bi se stekao uticaj o dinamici procesa oporavka. Dodatno filtriranje je izvršeno uklanjanjem *m/z* vrednosti: (i) koje predstavljaju proteine koji se javljaju samo u 25 % uzoraka unutar definisanih grupa (filter 5); (ii) koje nemaju minimalan koeficijent korelacije od 0,5 sa peptidima koji su dodeljeni istom proteinu (filter 6); i (iii) koje predstavljaju proteine kvantifikovane sa manje od dva jedinstvena peptida (filter 7). Izostajanje vrednosti za određene proteine u jednom uzorku je nadomešćeno imputacijom. Korišćena je *k*-NN (eng. *k-nearest neighbors*, *k*-NN) metoda imputacije. Pre primene statističkih testova, izvršena je deskriptivna analiza i distribucija varijanse, eliminisani su proteini sa niskim varijacijama u zastupljenosti. Korišćen je kriterijum da odnos maksimalne i minimalne vrednosti (eng. *fold change*) zastupljenosti bude veći od 1,5. Statistička značajnost razlika između tri grupe

ispitivana je jednofaktorskom ANOVA, a nakon toga *Tukey HSD post hoc* testom. Nivo statističke značajnosti podešen je na $p < 0,05$.

Broj spektara (SC)

Obrada podataka baziranih na broju spektara je takođe sprovedena korišćenjem R programskog jezika. Postupak je obuhvatio inicijalnu kontrolu kvaliteta podataka, nakon čega je primenjena normalizacija metodom procenta, jer se radi o pristupu gde su rezultati celi brojevi. Ova metoda podrazumeva da se svaki pojedinačni broj spektara za protein u jednom uzorku podeli sa ukupnim brojem spektara detektovanim u istom uzorku, a zatim pomnoži sa 100. Na ovaj način, vrednosti za sve proteine u uzorku postaju procenat od ukupnog broja spektara u tom uzorku. Nakon normalizacije je izvršeno filtriranje proteina primenom strožih kriterijuma: (i) uklanjanje proteina sa manje od 5 spektara (filter 8). Nakon ovoga sprovedena je deskriptivna analiza, kao i distribucija varijanse. Odbačeni su proteini identifikovani XIC metodom. Testiranje statističkih hipoteza urađeno je jednofaktorskom ANOVA testom, a nakon toga *Tukey HSD post hoc* testom ($p < 0,05$). Konačno, iz finalnog skupa podataka isključeni su proteini koji su već identifikovani XIC metodologijom, čime je obezbeđena komplementarnost i međusobna validacija rezultata dobijenih na osnovu dve različite kvantitativne strategije.

4.2.13 Proizvodnja tri LEA4 proteina srpske ramonde

U svrhu daljeg razumevanja mehanizama TD srpske ramonde, proizvedena su tri LEA proteina koji pripadaju LEA4 proteinskoj familiji, čije su se strukturne i funkcionalne karakteristike naknadno ispitivane. Proteini RsLEA30, RsLEA301 i RsLEA305 (sekvence sva tri proteina je na slici 58) su proizvedeni u *E. coli*, korišćenjem rekombinantne DNK tehnologije. Nakon optimizacije produkcije i prečišćavanja RsLEA30 proteina, slični protokoli su primenjeni i na preostala dva proteina. Njihove sekvence su potvrđena masenom spektrometrijom i Vestern blot analizom sa antitelom specifičnim na His-tag, dok je molekulska masa određena SEC-MALS. Prečišćeni proteini su dalje okarakterisani, primenom CD i DLS analiza pod različitim uslovima.

```
>RsLEAP30-His6
MAAMFVAKTT VLNLSNSLSA NYPSPPIRPK VSRVSFTTPN YPAVKVPHAT DGSKDYSFNF
DETVKNTQDS MNESFDKKE KGREVENAE ENAQSWDKA SDATSRTSDK ASEATDRAAE
SAHDLQ GKAK ETLGDINEKG KEKLGASDK ANEIKGKTQN SAGNMADKAK DFARGTEDRA
KGAGETVVDK TKQAAGVVAD MTKDFATGAK ENTEWTVDTA ADAARSAGER AKQTGEKIRD
TVVGKADEAE SKRHHHHHH
>RsLEAP301-His6
RKAQEKSGEV SDKAYEMRDK SQESAGNVTE KAKYYAQDTV ERAKAAAGTV VDKTKETAGT
VADRTKGVAD GAKENTERAG DMTADATRSV GEDAKHTAEK LHHHHHH
>RsLEAP305-His6
QAASDTGAYA SDTARSAYDK TAQAASDTGA YAQDTAKSAY DKTAQAGTYA QDSAKSAYDK
TAQAASDTGA YAQDTAKSAY DKTAQAGTYA QDSAKSAYDK TAAHHHHHH
```

Slika 58. Proteinske sekvence rekombinantno proizvedenih LEA proteina. Slova narandžaste boje predstavlja sekvencu LEA proteina, plava His-tag.

4.2.13.1 Vektor i konstrukti

Vektor pET24a (shematski prikaz vektora dat je u prilogu 27) za ekspresiju RsLEA30 proteina sa insertom (His)₈-tag-GBP-polilinker-TEV_specifično_mesto-sekvencu_RsLEA30 je naručen od strane kompanije *SynBio* (Nju Džerzi, SAD), i korišćen je kao templat za pravljenje RsLEA30 gena sa C-terminalnim heksahistidinskim tagom (His-tag). Direktni prajmer za isecanje dela: (His)₈-tag-GBP-polilinker-TEV_specifično_mesto i ubacivanje RsLEA30 sekvence sa C-terminalnim His-tagom u pET24a(+) je sadržao *NdeI* restrikciono mesto, a reverzni *XhoI*, His-tag i stop kodon (sekvence prajmera su date u prilogu 28). Prajmere za ubacivanje u pET24a(+) vektor je dizajnirala Dr Jelena Radosavljević. Svi ostali geni (*RsLEA301* i *RsLEA305*) sa C-terminalnim heksahistidinskim tagom su naručeni od iste kompanije već uklonirani u pET24a(+) vektor.

Prvi korak je bila ekstrakcija plazmida sa papira, tako što je 100 μL ekstrakcionog pufera nanoseno na papir, i inkubirano 10 minuta na 37 °C. Nakon toga, centrifugiranjem na sobnoj temperaturi na 15000 x *g* je od ostataka papira odvojen ekstrakt plazmida, sa kojom je dalje rađena transformacija *E. coli* DH5 α soja.

4.2.13.2 Transformacija

Kalcijum kompetentne ćelije su dobijene inkubiranjem bakterija (sa optičkom gustoćom 0,4) u hladnom rastvoru kalcijum-hlorida, čime se menja propustljivost ćelijskog zida. U 70 μL sveže pripremljenih kompetentnih ćelija *E. coli* DH5 α dodato je 20 μL ekstrahovanog plazmida, promešano i inkubirano 30 minuta na ledu, a zatim je smeša prebačena u termoblok na 42 °C na jedan minut. Nakon toga su ćelije inkubirane u frižideru 10 minuta na ledu, dodat im je 1 mL LB (Luria-Bertani) podloge bez antibiotika i inkubirane su 1 h na orbitalnom šejkeru, 180 obrtaja u minuti (eng. *rotation per minute*, rpm), na 37 °C. Po završetku inkubiranja, ćelije su odvojene od ostatka medijuma centrifugiranjem 5 minuta na 5000 x *g*. Veći deo supernatanta je odbačen, dok je sa ostatkom (oko 200 μL) resuspendovan talog ćelija. Resuspendovane ćelije su zasejane ezom po Drigalskom na Petri šolje sa LB agarom i kanamicinom (60 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Petri šolje su inkubirane na 37 °C, 16 sati. Za transformaciju *E. coli* BL21(DE3) ćelija je korišćen isti protokol uz modifikaciju zapremine dodatog izolovanog plazmida (2 μL).

4.2.13.3 Izolovanje plazmida

Jedna transformisana *E. coli* kolonija sa Petri šolje je zasejana u 5 mL tečnog LB medijuma sa kanamicinom (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Nakon 16 sati plazmid je izolovan komercijalnim *GeneJET Plasmid Miniprep* kitom (Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD) prema uputstvu proizvođača. Ukratko, 5 mL prekonoćne kulture je centrifugirano, nakon čega je dodat pufer I, koji je sadržao RNazu A. Ćelije su potpuno resuspendovane vorteksovanjem, dodat je pufer II iz kita i polako je promućkano. Nakon bazne lize ćelija, smeša je neutralisana dodatkom pufera III i još jednom promućkana. Dobijeni rastvor je centrifugiran, bistri supernatant je prebačen na *GenJet* kolonu sa kolekcionom epruvetom Kolona sa kolekcionom epruvetom je centrifugirana, kako bi ceo lizat prošao kroz kolonu. Naneto je 500 μL pufera za ispiranje na kolonu i centrifugirano je 1 minut, na sobnoj temperaturi, postupak je ponovljen još jednom. Nakon sušenja matriksa centrifugiranjem, kolona je stavljena u novu, čistu epruvetu, dodato je 50 μL pufera za eluiranje i inkubirano je 15 minuta na 37 °C, a potom je centrifugirano kako bi se sakupili izolovani plazmidi. Dobijeni plazmidi su dalje analizirani elektroforetski na 1 % agaroznom gelu i na spektrofotometru za mikrolitarske zapremine (BioSpec-nano, Shimadzu, Kjoto, Japan) i čuvani na -20 °C do dalje upotrebe.

4.2.13.4 Optimizacija ekspresije RsLEA30 proteina srpske ramonde

Za ekspresiju proteina kalcijum-kompetentne *E. coli* BL21(DE3) ćelije su transformisane vektorom pET24a(+) koji je sadržao konstrukt RsLEA30. Pojedinačna transformisana kolonija gajena je preko noći u 10 mL LB medijuma sa dodatkom 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kanamicina i 0,25 % glicerola na 37 °C uz orbitalno mešanje na 200 rpm. Prekonoćna kultura je zatim razblažena u odnosu 1:10 u LB medijumu sa 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kanamicina i 0,25 % glicerola, a zatim gajena na 37 °C sve dok optička gustina na 600 nm (OD_{600}) nije dostigla vrednost između 0,6 i 0,8. Odvojen je alikvot neindukovane kulture i sačuvan kao kontrola, dok je ekspresija ciljanog gena indukovana pomoću IPTG, čija je finalna koncentracija u medijumu bila 1 mM. Indukovane kulture zajedno sa neindukovanim, su inkubirane na 25 °C, 30 °C i 37 °C uz mešanje na orbitalnom šejkeru (200 rpm). Alikvoti indukovanih i neindukovanih kultura su sakupljeni u različitim vremenskim tačkama (30 min, 1, 2, 3, 4 i 24 sata). Za analizu optimizacije ekspresije, ćelije su prikupljene centrifugiranjem pri 4000 x *g* tokom 5 minuta, dobijeni talog je resuspendovan u 180 μL Laemli pufera i inkubiran preko noći na 25 °C. Uzorci su potom centrifugirani pri 15000 x *g* tokom 10 minuta, i supernatant je analiziran SDS-PAGE, kako je opisano u radu Vidović i sar. (2016). Optimizovan protokol za produkciju RsLEA30-His6 proteina je primenjen i na proizvodnju RsLEA301-His6 i RsLEA305-His6 proteina.

4.2.13.5 SDS-PAGE i Vestern blot

Elektroforetsko razdvajanje proteina lizata *E. coli* BL21(DE3) je rađeno na 12 % poliakrilamidnim gelovima, u Tris-glicinskom (za RsLEAP30-His6 protein) i tricinskom (RsLEA301-His6 i RsLEA305-His6 proteine) puferom sistemu. Gelovi su bojeni *Coomassie Brilliant Blue G250* bojom, po standardnoj proceduri opisanoj u Winklera i sar. (2007). Za Vestern blot analizu, proteini su transferovani na poliviniliden-difluoridnu (PVDF) membranu prethodno navlaženu Tris-glicin puferom (pH 8,3) sa 20 % metanola i 0,01 % SDS, koristeći *semi-dry* metod, strujom od 1,5 mA (cm²)⁻¹ tokom 45 minuta. Svi naredni koraci osim bojenja membrane su rađeni pomoću vakuum-potpomognutog sistema SNAP i.d.® 2.0 *Protein Detection System* za Vestern blot (Millipore, Masačusets, SAD). Nakon blokiranja membrana sa 0,5 % odmašćenim mlekom u prahu rastvorenim u TBST puferu (fiziološki rastvor puferisan Tris puferom pH 7,2 sa 0,1 % Tween 20), membrane su inkubirane sa primarnim mišjim monoklonskim anti-heksa-His antitelima (Takara Bio, 631212), razblaženim 1:5000 u TBST puferu sa 0,5 % odmašćenim mlekom u prahu tokom deset minuta. Nakon četiri ispiranja u TBST, membrane su dalje inkubirane sa sekundarnim anti-mišjim IgG antitelom konjugovanim sa peroksidazom rena (HRP; Sigma-Aldrich, A9044), razblaženim 1:80000 tokom deset minuta. Nakon dodatna dva ispiranja u TBST, proteini sa His-tagom detektovani su pomoću *Immobilon Western Chemiluminescent HRP* supstrata koji sadrži luminol i vodonik-peroksid (Millipore, Masačusets, SAD) i vizualizovani pomoću *ChemiDoc Imaging System* gel skenera (Bio-Rad). Kvantifikacija traka proteina na gelu izvršena je pomoću *ImageJ* softvera (Schneider i sar. 2012).

4.2.13.6 Testiranje rastvorljivosti rekombinantnih proteina

Da bi se procenila solubilnost rekombinantnih LEA proteina, talozi ćelija *E. coli*, dobijeni nakon inkubacije u prethodno optimizovanim uslovima (od 1 mL kulture, nakon centrifugiranja), resuspendovani su u 180 µL 50 mM Tris pufera (pH 8,0) i lizirani ultrazvučnom sondom u trajanju od 5 sekundi pri amplitudi sonde od 10 mikrona (Soniprep 150, MSE Crowley, London, Velika Britanija) na ledu. Sonifikacija je ponovljena tri puta. Lizati su zatim centrifugirani pri 15000 x *g* u trajanju od 10 minuta na 4 °C, a talozi i supernatanti su razdvojeni i resuspendovani u 180 µL Laemli pufera, inkubirani preko noći na 25 °C, i ponovo centrifugiran pri 15000 x *g* tokom 10 minuta. Jednake zapremine dobijenih supernatanta su nanošene na SDS-PAGE gel.

4.2.13.7 Proizvodnja veće količine proteina

Za dobijanje veće količine sva tri LEA proteina neophodne za dalje analize, prekonoćne kulture *E. coli* BL21(DE3) koje su sadržale odgovarajuće konstrukte korišćene su za inokulaciju 400 mL LB medijuma sa dodatkom kanamicina (50 µg mL⁻¹) u erlenmajerima zapremine 2 L. Kulture su inkubirane uz mešanje na 200 rpm na prethodno optimizovanoj temperaturi. Kada je optička gustina (OD₆₀₀) bila između 0,6 i 0,8 ekspresija gena je indukovana u prisustvu 1 mM IPTG, pod optimalnim uslovima. Čelije su zatim prikupljene centrifugiranjem pri 4000 x *g*, resuspendovane u puferu za liziranje (odnos masa:zapremina 1:7), koji je sadržao 50 mM Tris (pH 8,0) i *cOmplete EDTA-free* koktel inhibitora proteaza (Merck, Darmstadt, Nemačka). Liziranje je rađeno ultrazvučnom sondom (Soniprep 150, MSE Crowley, London, Velika Britanija, 12 ciklusa po 20 sekundi na ledu, sa pauzama od 20 sekundi između ciklusa). Nakon toga, ćelijski ostaci i nelizirane ćelije su uklonjene centrifugiranjem pri 17000 x *g* tokom 20 minuta na 4 °C.

4.2.14 Hromatografsko prečišćavanje LEA4 proteina srpske ramonde

Lizati koji su sadržali LEA proteine srpske ramonde su filtrirani kroz 0,45 µm, i 0,22 µm filtere pre nego što su naneti na 5 mL *HisTrap HP* kolonu sa imobilizovanim niklom (Cytiva, Masačusets, SAD) pomoću *AKTA Go™* sistema za prečišćavanje proteina (Cytiva, Masačusets, SAD). Ukupno 50 mL filtriranog lizata je nanoseno na kolonu prethodno ekvilibrisanu 50 mM Tris (pH 8,0) puferom. Vezani proteini su eluirani rastućim gradijantom imidazola (10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250

i 300 mM) pri protoku od 2 mL min⁻¹ kako bi se odredila optimalna koncentracija imidazola za eluiranje rekombinantnih RsLEA30-His6, RsLEA301-His6 i RsLEA305-His6 proteina. Eluiranje je praćeno preko apsorbancije na 280 nm i sakupljene su frakcije od 2 mL. Eluirane frakcije su analizirane putem SDS-PAGE. Odabrane frakcije su spojene, imidazol je uklonjen dijalizom prvo naspram 50 mM Tris (pH 8,0) pufera, a zatim naspram dejonizovane vode, nakon čega je usledila liofilizacija.

Frakcije proteini RsLEA301-His6 i RsLEA305-His6 eluirane sa kolone su bile zadovoljavajuće čistoće, dok je RsLEA30-His6 zahtevao dalje prečišćavanje na koloni za gel filtracionu hromatografiju (16/100, 17104402, Cytiva, Masačusets, SAD punjenoj sa *HiLoad Superdex 75 prep grade* matriksom). Ovaj matriks je prethodno ekvilibrisan 50 mM Tris (pH 7,5) puferom, a razdvajanje proteina zasnovano je na molekulskoj masi pri protoku od 2 mL min⁻¹. Frakcije koje su prikupljene dijalizovane su naspram *MilliQ* vode, analizirane putem SDS-PAGE, liofilizovane i čuvane na -80 °C do upotrebe. Svi hromatografski postupci prečišćavanja su ponovljeni u najmanje tri nezavisne replike, a prikazane su tabele prečišćavanja i reprezentativni hromatogrami.

4.2.15 Gel filtracija u kombinaciji sa rasipanjem svetlosti pod različitim uglovima (SEC-MALS)

Molekulske mase prečišćenih LEA4 proteina određene su pomoću statičkog rasipanja svetlosti korišćenjem *Dawn Heleos II MALS* uređaja (Wyatt Technology Europe, Nemačka), povezanog sa HPLC sistemom (Alliance e2695, Milford, Masačusets, SAD). Odabrane proteinske frakcije su filtrirane kroz 0,1 µm centrifugalne filtere (Millipore, Masačusets, SAD), a 50 µL svakog uzorka je injektovano na *Superdex 75 Increase 10/300* kolonu (Cytiva, Masačusets, SAD). Proteini su eluirani sa 50 mM Tris (pH 7,5). Izračunavanje molekulske mase je izvršeno korišćenjem *ASTRA 6* softvera (Wyatt Technology Europe, Nemačka), prema uputstvu proizvođača.

4.2.16 Validacija aminokiselinske sekvence rekombinantno proizvedenih LEA4 proteina pomoću MS

Proteinske trake sa gela su isečene i usitnjene u komadiće 1 x 1 mm novootvorenim skalpelom i prenesene u epruvetu od 1,5 mL. Komadići gela su obezbojeni sa 10% sirćetne kiseline i 40% etanola, a zatim dehidrirani mešavinom 1:1 50 mM amonijum-hidrogenkarbonata i acetonitril. Redukcija je izvršena sa 10 mM DTT, a alkilovanje 55 mM jodoacetamidom. Nakon digestije tripsinom (100 ng) preko noći na 37 °C, proteini su ekstrahovani 0,5 % TCA u 50 % acetonitrilu i upareni su pomoću rotacionog vakuum uparivača. Suvi uzorci su resuspendovani u vodenom rastvoru 2 % acetonitrila i 0,1 % mravlje kiseline i injektovani u *Qexactive MS* sistem kuplovan sa *Vanquish Neo HPLC* sistemom (Thermo Fisher Scientific).

Dobijeni peptidi su injektovani na *PepMap™ 100 C18* kolonu (dužina 150 mm, unutrašnji prečnik 0,1 mm, veličina čestica 5 µm, Thermo Fisher Scientific, 164199) tokom 5 minuta pomoću 0,1 % mravlje kiseline u vodi. Za eluiranje peptida korišćeni su sledeći sistem: rastvor A – 0,1 % mravlja kiselina u vodi i rastvor B – 0,1 % mravlja kiselina u 80 % acetonitrilu. Razdvajanje peptida je izvedeno gradijentnom elucijom:

- 0–1 minuta, 2,0–2,0 %;
- 1–43 minuta, 2,0–37,5 %;
- 43–45 minuta, 37,5–100,0 %;
- 45–55 minuta, 100,0 %;
- 55–56 minuta, 100,0–2,0 %;
- 56–61 minuta, 2,0 % eluenta B.

Pretraga baze podataka je izvršena korišćenjem *X!Tandem* (verzija 201.2.1.4; Craig i Beavis 2004).

4.2.17 Određivanje strukture LEA proteina spektroskopijom cirkularnog dihroizma

Određivanje sekundarne strukture rekombinantno proizvedenih LEA4 proteina je rađeno spektroskopijom cirkularnog dihroizma (CD) korišćenjem *Chirascan* CD spektroskopa (Applied Photophysics, Lederhed, Velika Britanija) opremljenog Peltierovim temperaturnim modulom. Liofilizovani uzorci LEA proteina su resuspendovani u *MilliQ* vodi do koncentracije od 178 μM (koncentrovani rastvor). Za CD merenja, radni rastvori proteina su pripremljeni razblaživanjem gore pomenutog koncentrovanog rastvora u 10 mM natrijum-fosfatnim puferima pH opsega 4-8, kako bi se postigla finalna koncentracija LEA proteina od 5 μM . Spektralni podaci su snimljeni u opsegu od 240 do 190 nm u 1 mm-kvarenim kivetama (Hellma, Milhajm, Nemačka) na 25 °C, u rezoluciji od 1 nm, sa brzinom skeniranja od 1 nm min⁻¹, intervalu uzorkovanja od 1 s i širinom opsega od 1 nm. Dobijeni spektri su predstavljali prosečan rezultat od tri skeniranja. Sadržaj elemenata sekundarne strukture sva tri LEA4 proteina izračunat je korišćenjem *DichroIDP* softvera (Miles i sar. 2023).

4.2.18 Određivanje hidrodinamičkog radijusa LEA proteina dinamičkim rasipanjem svetlosti

Hidrodinamički radijus rekombinantnih LEA4 proteina je određen pomoću dinamičkog rasipanja svetlosti (eng. *dynamic light scattering*, DLS) korišćenjem uređaja *Malvern Zetasizer Nano ZS* (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Velika Britanija). Korišćen je He–Ne laserski izvor ($\lambda = 633$ nm) pri uglu rasipanja od 173°. Koncentracija proteina filtriranih kroz membranu veličine pora 0.22 μm , bila je 1 mg mL⁻¹.

4.2.19 Merenje koncentracije proteina

Koncentracije proteina u svim frakcijama i uzorcima određivane su Bradfordovim testom (1976) pomoću temperaturno-kontrolisanog spektrofotometra (Infinite 200 PRO, TECAN, Manedorf, Švajcarska) na talasnoj dužini od 595 nm. Merenja su izvođena u triplikatu u mikrotitar pločama sa 96 bunara.

4.2.20 Statističke analize primenjene u eksperimentalnom radu

Da bi se testirale značajne razlike u sadržaju fenolnih jedinjenja, šećera, hlorofila, aktivnosti enzima, kao i parametara fluorescencije hlorofila između HL i DL, korišćen je *Mann–Whitney U/t-test*, a prag značajnosti je postavljen na 0,05.

4.2.21 Identifikacija i *in silico* karakterizacija LEA proteina

4.2.21.1 Identifikacija i klasifikacije LEA proteina na osnovu transkriptomskih podataka

Sekvence LEA proteina srpske ramonde dobijene transkriptomikom pretražene su naspram *NCBI NR* proteinske baze korišćenjem alata za poravnanje sekvenci (*BLAST*, Camacho i sar. 2009). Pretraga je bila ograničena na taksonomsku grupu kopnenih biljaka (taxID 3193). U razmatranje su uzete samo potpune sekvence sa *e*-vrednošću manjom od 10⁻⁶ i identitetom sekvenci većim od 90 %. Anotacije su proveravane ručno. Jedinstvena lista LEA proteina iz srpske ramonde generisana je ručnim sortiranjem anotiranih LEA sekvenci korišćenjem baza *Pfam* (Bateman i sar. 2002), *InterPro* (Mulder i sar. 2003) i *Panther* (Mi i sar. 2021) kako bi se potvrdilo prisustvo LEA domena. Za dobijanje informacija o funkcionalnim domenima iz baze *Pfam*, korišćen je *HMMPfam* sa pragom *e*-vrednosti od 10⁻⁵. U procesu anotacije proteina koji su pripadali LEA2 grupi uzeta je u obzir i *Phyre2* anotacija (Kelley i sar. 2015), sa visokom pouzdanošću i pokrivenošću poravnanja za rešene strukture proteina, pomoću nuklearne magnetne rezonance (NMR) At2g46140.1 i At1g01470). Na kraju, proteini kraći od 100 aminokiselina nisu uključeni u finalnu listu LEA proteina.

4.2.21.2 Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika LEA proteina srpske ramonde

Fizičko-hemijske osobine LEA proteina pronađenih u srpskoj ramondi, određene su izračunavanjem dužine sekvence, izoelektrične tačke (pI), aminokiselinskog sastava i molekulske mase proteina

pomoću *ExPasy ProtParam* servera (http://web.expasy.org/compute_pi/, pristupljeno 8. februara 2022). Procena prosečne hidrofobnosti (*GRAVY* indeks), kao parametra hidrofobnosti i rastvorljivosti proteina, urađena je korišćenjem *GRAVY* kalkulatora (<http://www.gravy-calculator.de/>, pristupljeno 8. februara 2022). Negativna *GRAVY* vrednost ukazuje na hidrofilne, dok pozitivna označava hidrofobnije proteine.

4.2.21.3 Određivanje konzerviranih motiva LEA proteina biljke *R. serbica*

Za identifikaciju konzerviranih proteinskih motiva korišćen je alat *MEME* (eng. *Multiple Em for Motif Elicitation*, Bailey i sar. 2019). Alat *MEME* je pokrenut pri sledećim uslovima: distribucija motiva je bila podešena na nula ili jedno pojavljivanje po sekvenci i pretraživano je između 3 i 15 različitih motiva (u zavisnosti od grupe LEA proteina). Minimalni broj aminokiselina u motivu je bio šest, dok je maksimalni pedeset. Svi ostali parametri bili su podešeni prema inicijalnim, automatskim vrednostima. Dobijeni rezultati su eksportovani i vizuelizovani softverom *iTOL* (Letunic i sar. 2021), kako bi se utvrdila veza sa filogenetskim stablom za svaku grupu LEA proteinske porodice zasebno.

4.2.22 Filogenetska analiza i funkcionalna anotacija LEA proteina

4.2.22.1 Filogenetska analiza LEA proteina srpske ramonde

Kako bi se ispitala evolutivna srodnost između LEA proteina iz srpske ramonde, konstruisano je filogenetsko stablo. Višestruko poravnanje kompletnih sekvenci LEA proteina srpske ramonde izvršeno je korišćenjem *MAFFT* v7 softvera (Katoh i sar. 2013) pomoću metode *L-INS-i*, sa 1000 iteracija poboljšanja i *BLOSUM62* matricom bodovanja. Filogenetsko stablo je napravljeno pomoću *EMBL-EBI Simple Phylogeny* alata (Saitou i sar. 1978), metodom najbližeg suseda (*neighbour-joining*) sa podrazumevanim parametrima. Za prikaz i anotaciju stabla korišćen je softver *iTOL – Interactive Tree Of Life* v6.5 (Letunic i sar. 2021). Uporedna analiza homologije članova specifičnih LEA proteinskih familija iz biljke *R. serbica* sa odgovarajućim LEA grupama biljaka *A. thaliana* i *G. hirsutum* (Hundertmark i Hinch 2008, Magwanga i sar. 2018) sprovedena je pomoću *MAFFT* alata, korišćenjem automatski detektovanog algoritma za poravnanje i poređenje parova sekvenci. Na kraju, upoređen je prosečan identitet sekvenci unutar specifične LEA familije između ovih vrsta.

4.2.22.2 Unutarćelijska lokalizacija LEA proteina

Predikcija lokalizacije LEA proteina unutar ćelije izvršena je korišćenjem *TargetP1.1* servera (Emanuelsson i sar. 2007) i *Protein Prowler Subcellular Localisation Predictor* verzije 1.2 (Bodén i Hawkins 2005). Za predikciju specifične kompartmentalizacije svakog LEA proteina korišćen je alat *WoLF-PSORT* (Horton i sar. 2007).

4.2.22.3 Statistička analiza in silico parametara

Tukijev *post hoc* test korišćen je za ispitivanje značajnih razlika u izračunatim parametrima proteina među različitim grupama LEA proteinskih porodica, pomoću *IBM SPSS* statističkog softvera (verzija 20.0, IBM Corp., Armonk, NY, SAD). Prag značajnosti bio je postavljen na 0,05. Standardna greška srednje vrednosti u poređenju sličnosti među vrstama izračunata je korišćenjem statističkog modula *SciPy* (Virtanen i sar. 2020).

4.2.23 Predviđanje sekundarne strukture LEA proteina

Predikcija sekundarne strukture LEA proteina srpske ramonde izvršena je korišćenjem sledećih prediktora: (i) *Sopma* (Geourjon i Deléage 1995), (ii) *PsiPred* (Jones 1999), (iii) *Phyre2* (Kelley i sar. 2015), (iv) *FELLS* (Piovesan i sar. 2017) i (v) *JPred4* (Drozdetskiy i sar. 2015).

Mogućnosti formiranja transmembranskih α -heliksa (TMH) identifikovanih LEA proteina analizirane su pomoću *TMHMM* prediktora (Krogh i sar. 2001). Srednje vrednosti hidrofobnosti i amfipatičnosti predviđenih α -heliksa konzerviranih motiva izračunate su analitičkom procedurom

HeliQuest veb servera (Gautier i sar. 2008). Distribucija aminokiselina i procena amfipatičnosti za α -helikse u konzerviranim motivima svake LEA proteinske familije prikazane su u dijagramima. Postojanje prirodno neuređenih regiona u LEA proteinima srpske ramonde procenjeno je pomoću prediktora za neuređenost, i to: *FELLS* (Piovesan i sar. 2017), *IUPred3* (Erdős i sar. 2021) i dve *ESpritz* metode. Prva *ESpritz* metoda, *ESpritz-DisProt*, zasnovana je na višestrukom poravnanju sekvence ciljnog LEA proteina i proteina iz *DisProt* baze podataka (Pollastri i sar. 2002). *DisProt* baza je pretražena ručno i nju čine delimično ili potpuno neuređeni proteini (Sickmeier i sar. 2007). Druga metoda, *ESpritz-X*, oslanja se na kristalne strukture dobijene kristalografijom X-zracima iz PDB baze podataka (Mika i Rost 2005), gde se ostaci koji nemaju koordinatne podatke za bilo koji od α -C atoma peptidnih lanaca anotiraju kao nestrukturisani.

4.2.24 Predviđanje 3D strukture LEA proteina *AlphaFold3* serverom

Struktura LEA proteina sa i bez His-taga je modelovana pomoću *AlphaFold3* softvera (Abramson i sar. 2024), svi parametri bili su podešeni prema podrazumevanim, odnosno inicijalnim vrednostima.

5. ZAKLJUČAK

Ova doktorska disertacija predstavlja sveobuhvatnu analizu reprogramiranja metaboličkih puteva u listovima srpske ramonde do kojih dolazi tokom desikacije i oporavka. Prikazane su promene profila ekspresije gena i proteina, promena sadržaja i sastava rastvorljivih ugljenih hidrata i fenolnih jedinjenja, sa posebnim osvrtom na strukturu i funkciju LEA proteina i na remodelovanje arhitekture ćelijskog zida.

Glavni zaključak koji se može izvesti iz sprovedene studije je da tolerancija na desikaciju kod srpske ramonde predstavlja proces koji je strogo specifičan za datu biljnu vrstu, i uključuje kompleksne i vremenski orkestrirane odgovore na nivou gena, proteina i metabolita u celoj ćeliji.

Konkretni zaključci ove disertacije su:

1. **Inhibicija fotosinteze i metabolička adaptacija:** Desikacija primarno uzrokuje pad kvantnog prinosa fotosistema II usled gubitka aktivnih reakcionih centara i degradacije fotosintetskih pigmenata i proteina. Ovaj energetski deficit biljka kompenzuje aktivacijom alternativnih metaboličkih puteva, poput fermentacije i intenzivnije razgradnje saharoze.
2. **Zaštita ćelijske homeostaze:** Integrativna transkriptomaska i proteomska analiza ukazuje na ključnu ulogu LEA proteina, ali i C1 metabolizma, metabolizma azota i hema, kao i biosinteze skroba, sinteza proteina generalno kao i njihovo uvijanje u nativnu konformaciju značajno umanjuju nastala oštećenja i doprinose očuvanju osnovnih ćelijskih funkcija u uslovima desikacije.
3. **Akumulacija osmoprotektanata:** Akumulacija specifičnih oligosaharida (stahioza, melibioza, gentiobioza) i šećernih alkohola (manitol) predstavlja ključnu strategiju preživljavanja. Diskrepancija između nivoa transkripata i proteina sugerise da je metabolizam ugljenih hidrata pod snažnom posttranskripcionom kontrolom radi brze akumulacije osmoprotektanata.
4. **Identifikacija i karakterizacija LEA proteina srpske ramonde:** Po prvi put su identifikovana 433 LEA proteina iz listova srpske ramonde, koji su klasifikovani i *in silico* strukturno analizirani kako bi se odabrali kandidati sa značajnom ulogom u toleranciji na desikaciju. Uspešno je optimizovan protokol za proizvodnju LEA proteina tehnologijom rekombinantne DNK i nekoliko hromatografskih tehnika, koji je omogućio dobijanje proteina visoke čistoće koja je omogućila proučavanja njihovog strukturnog ponašanja tokom desikacije.
5. **Strukturna plastičnost i uloge dehidrina i LEA4 proteina:** Strukturna plastičnost dehidrina i LEA4 proteina, ogleda se u njihovoj sposobnosti prelaska iz neuređene konformacije u konformacije bogate amfipatičnim α -heliksima pri niskom sadržaju vode, omogućava stabilizaciju makromolekula i membrana uz istovremeno oslobađanje „strukturne vode”.
6. **Modifikacija ćelijskog zida kao odgovor na stres:** Smanjenje zapremine ćelija prati kontrolisano nabiranje ćelijskog zida bez gubitka kontinuiteta. Ovaj proces je diktiran demetilesterifikacijom pektina (pomoću PME) i enzimskom regulacijom reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), čime se modifikuju debljina i poroznost zida.
7. **Reverzibilnost i elastičnost pri rehidrataciji:** Proces oporavka karakteriše remodelovanje ćelijskog zida kroz smanjenje arabinogalaktanskih proteina i povećanje visokometilesterifikovanog homogalakturonana. Ove promene obnavljaju fleksibilnost i elastičnost zida, omogućavajući povratak ćelije u nativno hidratizano stanje.

LITERATURA

- Abramson J, Adler J, Dunger J, i sar. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024;630:493–500.
- Albenne C, Canut H, Jamet E. Plant cell wall proteomics: The leadership of *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*. 2013;4:111.
- Alcantara S, Teodoro GS, Drequeceler K, Ackerly DD, Oliveira RS. Carbon assimilation and habitat segregation in resurrection plants: A comparison between desiccation- and non-desiccation-tolerant species of *Neotropical Velloziaceae* (Pandanales). *Funct Ecol*. 2015;29(12):1499–1512.
- Ali F, Wharton DA. Infective juveniles of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, produce cryoprotectants in response to freezing and cold acclimation. *PLoS ONE*. 2015;10:e0141810.
- Almagro Armenteros JJ, Salvatore M, Emanuelsson O, Winther O, von Heijne G, Elofsson A, Nielsen H. Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Sci Alliance*. 2019;2(5):e201900429.
- Alonso-Simón A, García-Angulo P, Mérida H, Encina A, Álvarez JM, Acebes JL. The use of FTIR spectroscopy to monitor modifications in plant cell wall architecture caused by cellulose biosynthesis inhibitors. *Plant Signal Behav*. 2011;6(8):1104–10
- Alpert P, Oliver MJ. “Drying without drying.” In: Black M, Pritchard HW, editors. Desiccation and plant survival. Wallingford, UK: Oxford University Press; 2002. p. 3–44.
- Alsheikh MK, Heyen BJ, Randall SK. Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *J Biol Chem*. 2003;278:40882–9.
- Altunoglu YC, Baloglu MC, Baloglu P, Yer EN, Kara S. Genome-wide identification and comparative expression analysis of LEA genes in watermelon and melon genomes. *Physiol Mol Biol Plants*. 2017;23(1):5.
- Artur MA, Rienstra J, Dennis TJ, Farrant JM, Ligterink W, Hilhorst H. Structural plasticity of intrinsically disordered LEA proteins from *Xerophyta schlechteri* provides protection *in vitro* and *in vivo*. *Front Plant Sci*. 2019;10:1272.
- Artur MAS, Zhao T, Ligterink W, Schranz E, Hilhorst HWM. Dissecting the genomic diversification of late embryogenesis abundant (LEA) protein gene families in plants. *Genome Biol Evol*. 2019;11:459–71.
- Augusti A, Scartazza A, Navari-Izzo F, Sgherri CLM, Stevanović B, Brugnoli E. Photosystem II photochemical efficiency, zeaxanthin and antioxidant contents in the poikilohydric *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Photosynth Res*. 2001;67:79–88.
- Banerjee A, Roychoudhury A. Group II late embryogenesis abundant (LEA) proteins: structural and functional aspects in plant abiotic stress. *Plant Growth Regul*. 2016;79:1–17.
- Bartels D, Hanke C, Schneider K, Michel D, Salamini F. A desiccation-related ELIP-like gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* is regulated by light and ABA. *EMBO J*. 1992;11:2771–2778.
- Bartels D, Hussain SS. Resurrection plants: Physiology and molecular biology. In: Lüttge U, Beyschlag W, Cushman JC, editors. *Plant desiccation tolerance*. Ecological Studies, vol 215. Berlin: Springer; 2011. p. 339–364.
- Barthlott W, Büdel B, Mail M, Neumann KM, Bartels D, Fischer E. Superhydrophobic terrestrial cyanobacteria and land plant transition. *Front Plant Sci*. 2022;13:880439.
- Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Ewlinger L, Eddy SR, i sar. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:276–80.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcíarrubio A, Campos F, Covarrubias AA. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol*. 2008;148:6–24.

- Belott C, Janis B, Menze MA. Liquid–liquid phase separation promotes animal desiccation tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117:27676–84.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. RCSB Protein Data Bank: structural biology views for basic and applied research. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:235–42.
- Bhattacharya S, Dhar S, Banerjee A, Ray S. Structural, functional, and evolutionary analysis of late embryogenesis abundant proteins (LEA) in *Triticum aestivum*: a detailed molecular-level biochemistry using an *in silico* approach. *Comput Biol Chem*. 2019;82:9–24.
- Bies-Ethève N, Gaubier-Comella P, Debures A, Lasserre E, Jobet E, Raynal M, Cooke R, Delseny M. Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. 2008 May;67(1–2):107–124. doi: 10.1007/s11103-008-9304-x. Epub 2008 Feb 12.
- Blomstedt CK, Rosati VC, Møller BL, Gleadow R. Counting the costs: nitrogen partitioning in *Sorghum* mutants. *Funct Plant Biol*. 2018;45:705–718.
- Boeckx T, Winters AL, Webb KJ, Kingston-Smith AH. Polyphenol oxidase in leaves: is there any significance to the chloroplastic localization? *J Exp Bot*. 2015;66:3571–9.
- Borgo C, Franchin C, Scalco S, Bosello-Travain V, Donella-Deana A, Arrigoni G, et al. Generation and quantitative proteomics analysis of CK2 α '^(-/-) cells. *Sci Rep*. 2017;7:42409.
- Borrell A, Cutanda MC, Lumbreras V, Pujal J, Goday A, Culiáñez-Macià FA, Pagès M. *Arabidopsis thaliana* *atrab28*: a nuclear targeted protein related to germination and toxic cation tolerance. *Plant Mol Biol*. 2002;50(2):249–259.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
- Bray EA. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol*. 1993;103:1035–40.
- Bremer A, Wolff M, Thalhammer A, Hincha DK. Folding of intrinsically disordered plant LEA proteins is driven by glycerol-induced crowding and the presence of membranes. *FEBS J*. 2017;284:919–36.
- Caffall KH, Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr Res*. 2009 Sep 28;344(14):1879–1900.
- Candat A, Paszkiewicz G, Neveu M, Gautier R, Logan DC, Avelange-Macherel MH, Macherel D. The ubiquitous distribution of late embryogenesis abundant proteins across cell compartments in *Arabidopsis* offers tailored protection against abiotic stress. *Plant Cell*. 2014;26:3148–66.
- Carson M, Johnson DH, McDonald H, Brouillette C, DeLucas LJ. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2007;63:295–301.
- Challabathula D, Bartels D. Desiccation tolerance in resurrection plants: new insights from transcriptome, proteome and metabolome analysis. *Front Plant Sci*. 2013;4:482.
- Challabathula D, Puthur JT, Bartels D. Surviving metabolic arrest: photosynthesis during desiccation and rehydration in resurrection plants. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1365:89–99.
- Challabathula D, Zhang Q, Bartels D. Protection of photosynthesis in desiccation-tolerant resurrection plants. *J Plant Physiol*. 2018;227:84–92.
- Chandra J, Keshavkant S. Desiccation-induced ROS accumulation and lipid catabolism in recalcitrant seeds. *Physiol Mol Biol Plants*. 2018;24:75–87.
- Chen Y, Li C, Zhang B, Yi J, Yang Y, Kong C, Lei C, Gong M. The role of the late embryogenesis-abundant (LEA) protein family in development and the abiotic stress response: a comprehensive expression analysis of potato. *Genes*. 2019;10:148.
- Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J*. 2017 Jun;90(5):856–867.
- Clarke MW, Boddington KF, Warnica JM, Atkinson J, McKenna S, Madge J, Barker CH, Graether SP. Structural and functional insights into the cryoprotection of membranes by the intrinsically disordered dehydrins. *J Biol Chem*. 2015;290:26900–13.

- Collett HM, Butowt R, Smith J, Farrant J, Illing N. Photosynthetic genes are differentially transcribed during the dehydration–rehydration cycle in the resurrection plant *Xerophyta humilis*. *J Exp Bot*. 2003;54:2543–55.
- Craig R, Beavis RC. TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics*. 2004;20(9):1466–7.
- Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Aurell Wistrom C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J*. 1987;242:1–10
- Crowe JH, Crowe LM. Membranes in anhydrobiotic organisms. In: Leopold AC, editor. *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*. Ithaca, NY: Cornell University Press; 1986. p. 188–209.
- Cuevas-Velazquez CL, Reyes JL, Covarrubias AA. Group 4 late embryogenesis abundant proteins as a model to study intrinsically disordered proteins in plants. *Plant Signal Behav*. 2017;12:10893–903.
- Cuevas-Velazquez CL, Saab-Rincón G, Reyes JL, Covarrubias AA. The unstructured N-terminal region of Arabidopsis group 4 late embryogenesis abundant (LEA) proteins is required for folding and for chaperone-like activity under water deficit. *J Biol Chem*. 2016;291:10893–903.
- Davidson NM, Oshlack A. Corset: enabling differential gene expression analysis for *de novo* assembled transcriptomes. *Genome Biol*. 2014;15:410.
- Davies KJA, Delsignore ME, Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II Modification of amino acids. *J Biol Chem*. 1987;262:9902–9907.
- De Storme N, Geelen D. Callose homeostasis at plasmodesmata: molecular regulators and developmental relevance. *Front Plant Sci*. 2014;5:138.
- Degl'Innocenti E, Guidi L, Stevanovic B, Navari F. CO₂ fixation and chlorophyll a fluorescence in leaves of *Ramonda serbica* during a dehydration-rehydration cycle. *J Plant Physiol*. 2008;165:723–33.
- Deng L, Trepas X, Butler JP, Millet E, Morgan KG, Weitz DA, Fredberg JJ. Fast and slow dynamics of the cytoskeleton. *Nat Mater*. 2006 Aug;5(8):636–640.
- Dietz KJ, Jacob S, Oelze ML, Laxa M, Tognetti V, de Miranda SM, Baier M, Finkemeier I. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J Exp Bot*. 2016;57:1697–709.
- Dinakar C, Bartels D. Desiccation tolerance in resurrection plants: new insights from transcriptome, proteome, and metabolome analysis. *Front Plant Sci*. 2013;4:482.
- Dinakar C, Djilianov D, Bartels D. Photosynthesis in desiccation-tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Sci*. 2012;182:29–41.
- Dirk LMA, Abdel CG, Ahmad I, Neta ICS, Pereira CC, Pereira FECB, Unêda-Trevisoli SH, Pinheiro DG, Downie AB. Late embryogenesis abundant protein–client protein interactions. *Plants*. 2020;9:814.
- Divya K, Palakolanu SR, Kavi Kishor P, Rajesh AS, Vadez V, Sharma KK, Mathur PB. Functional characterization of late embryogenesis abundant genes and promoters in pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) for abiotic stress tolerance. *Physiol Plant*. 2021;173:1616–28.
- Dörmann P, Benning C. Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci*. 2002 Mar;7(3):112–118.
- Dražić G, Mihailović N, Stevanović B. Chlorophyll metabolism in leaves of higher poikilohydric plants *Ramonda serbica* Panč. and *Ramonda nathaliae* Panč. et Petrov. during dehydration and rehydration. *J Plant Physiol*. 1999;154:379–84.
- Drozdetskiy A, Cole C, Procter J, Barton GJ. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W389–94.
- Du B, Rennenberg H. Physiological responses of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) to water deficit and recovery. *S Afr J Bot*. 2018;119:212–218.

- Dure L, Crouch M, Harada J, i sar. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Biol.* 1989;12:475–486.
- Dure L, Greenway SC, Galau GA. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry.* 1981;20:4162–4168.
- Dure L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J.* 1993;3:363–9.
- Ebinezer LB, Franchin C, Trentin AR, Carletti P, Trevisan S, Agrawal GK, Quaggiotti S, Arrigoni G, Masi A. Quantitative proteomics of maize roots treated with a protein hydrolysate: a comparative study with transcriptomics highlights the molecular mechanisms responsive to biostimulants. *J Agric Food Chem.* 2020;68:7541–53.
- Erdős G, Pajkos M, Dosztányi Z. IUPred3: prediction of protein disorder enhanced with unambiguous experimental annotation and visualization of evolutionary conservation. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W297–303.
- Farrant JM, Brandt W, Lindsey GG. An overview of mechanisms of desiccation tolerance in selected angiosperm resurrection plants. *Plant Stress.* 2007;1:72–84.
- Farrant JM, Cooper K, Hilgart A, i sar. A molecular physiological review of vegetative desiccation tolerance in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker). *Planta.* 2015;242:407–426.
- Farrant JM, Cooper K, Nell H. Desiccation tolerance. In: Shabala S, editor. *Plant Stress Physiology.* Cambridge: CABI Publishing; 2012. p. 238–265.
- Farrant JM, Hilhorst HWM. What is dry? Exploring metabolism and molecular mobility at extremely low water contents. *J Exp Bot.* 2021;72:1507–10.
- Farrant JM, Moore JP. Programming desiccation tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2011;14:340–5.
- Farrant JM, van der Willigen C, Loffell DA, Bartsch S, Whittaker A. An investigation into the role of light during desiccation of three angiosperm resurrection plants. *Plant Cell Environ.* 2003;26:1275–1286.
- Farrant JM. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecol.* 2000;151:29–39.
- Farrant JM. Mechanisms of desiccation tolerance in angiosperm resurrection plants. *Plant Stress.* 2007;1:72–84.
- Faurobert M, Pelpoir E, Chaïb J. Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods Mol Biol.* 2007;355:9–14.
- Ferreira LA, Walczyk Mooradally A, Zaslavsky B, Uversky VN, Graether SP. Effect of an intrinsically disordered plant stress protein on the properties of water. *Biophys J.* 2018;115(9):1696–1706.
- Fujioka H, Samejima H, Suzuki H, Mizutani M, Okamoto M, Sugimoto Y. Aberrant protein phosphatase 2C leads to abscisic acid insensitivity and high transpiration in parasitic *Striga*. *Nat Plants.* 2019;5:258–62.
- Gao S, Gao J, Zhu X, Song Y, Li Z, Ren G, Zhou X, Kuai B. ABF2, ABF3, and ABF4 promote ABA-mediated chlorophyll degradation and leaf senescence by transcriptional activation of chlorophyll catabolic genes and senescence-associated genes in *Arabidopsis*. *Mol Plant.* 2016 Sep;9(9):1272–1285.
- Gautier R, Douguet D, Antonny B, Drin G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics.* 2008;24(18):2101–2.
- Gechev T, Lyall R, Petrov V, Bartels D. Systems biology of resurrection plants. *Cell Mol Life Sci.* 2021 Oct;78(19–20):6365–6394.
- Gechev TS, Benina M, Obata T, Tohge T, Sujeeth N, Minkov I, Hille J, Temanni MR, Marriott AS, Bergström E, Thomas-Oates J, Antonio C, Mueller-Roeber B, Schippers JH, Fernie AR, Toneva V. Molecular mechanisms of desiccation tolerance in the resurrection glacial relic *Haberlea rhodopensis*. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Feb;70(4):689–709.

- Gechev TS, Dinakar C, Benina M, Toneva V, Bartels D. Molecular mechanisms of desiccation tolerance in resurrection plants. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:3175–86.
- Georgieva K, Dagnon S, Gesheva E, i sar. Antioxidant defense during desiccation of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Plant Physiol Biochem.* 2017;114:51–59.
- Geourjon C, Deléage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci.* 1995;11(6):681–4.
- Giarola V, Hou Q, Bartels D. Angiosperm plant desiccation tolerance: hints from transcriptomics and genome sequencing. *Trends Plant Sci.* 2017;22:705–717.
- Giarola V, Krey S, von den Driesch B, Bartels D. The *Craterostigma plantagineum* glycine-rich protein CpGRP1 interacts with a cell wall-associated protein kinase 1 (CpWAK1) and accumulates in leaf cell walls during dehydration. *New Phytol.* 2016;210:535–50.
- Ginbot ZG. Characterization of two, desiccation linked, group 1 LEA proteins from the resurrection plant *Xerophyta humilis* [PhD thesis]. Cape Town: University of Cape Town; 2011.
- Ginsawaeng O, Heise C, Sangwan R, Karcher D, Hernández-Sánchez IE, Sampathkumar A, Zuther E. Subcellular localization of seed-expressed LEA_4 proteins reveals liquid–liquid phase separation for LEA9 and for LEA48 homo- and LEA42-LEA48 heterodimers. *Biomolecules.* 2021;11:1770.
- Goday A, Jensen AB, Culiáñez-Macià FA, Mar Albà M, Figueras M, Serratos J, Torrent M, Pagès M. The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell.* 1994;6:351–60.
- Gođevac D, Ivanović S, Simić K, Anđelković B, Jovanović Ž, Rakić T. Metabolomics study of the desiccation and recovery process in the resurrection plants *Ramonda serbica* and *R. nathaliae*. *Phytochem Anal.* 2022;33(6):961–970.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 2011 May 15;29(7):644–652.
- Graether SP, Boddington KF. Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Front Plant Sci.* 2014;5:576.
- Guo C, Luo Y, Gao M, Yi S, Li T, Yang B, Li Z. Phylogenomics and the flowering plant tree of life. *J Integr Plant Biol.* 2023;65(2):299–323.
- Hamann T. The plant cell wall integrity maintenance mechanism—a case study of a cell wall–plasma membrane signaling network. *Phytochemistry.* 2015 Apr;112:100–109.
- Hand SC, Menze MA, Toner M, Boswell L, Moore D. LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:115–134.
- Hanin M, Brini F, Ebel C, Toda Y, Takeda S, Masmoudi K. Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signal Behav.* 2011;6:1503–9.
- Hara M, Fujinaga M, Kuboi T. Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiol Biochem.* 2004 Jul-Aug;42(7–8):657–662.
- Hara M, Shinoda Y, Tanaka Y, Kuboi T. DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. *Plant Cell Environ.* 2009;32:532–41.
- Heber U. Conservation and dissipation of light energy in desiccation-tolerant photoautotrophs, two sides of the same coin. *Photosynth Res.* 2012;113:5–13.
- Huang J, Hirji R, Adam L, Rozwadowski KL, Hammerlindl JK, Keller WA, Selvaraj G. Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol.* 2000;122:747–756.

- Hughes CS, Moggridge S, Müller T, Sorensen PH, Morin GB, Krijgsveld J. Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nat Protoc.* 2019;14(1):68–85.
- Hundertmark M, Dimova R, Lengefeld J, Seckler R, Hinch DK. The intrinsically disordered late embryogenesis abundant protein LEA18 from *Arabidopsis thaliana* modulates membrane stability through binding and folding. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1808:446–53.
- Hundertmark M, Hinch DK. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics.* 2008;9:118.
- Ingle RA, Collett H, Cooper K, Takahashi Y, Farrant JM, Illing N. Chloroplast biogenesis during rehydration of the resurrection plant *Xerophyta humilis*: parallels to the etioplast–chloroplast transition. *Plant Cell Environ.* 2008;31(12):1813–1824.
- Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol.* 1996;47:377–403.
- Jamet E, Dunand C. Plant Cell Wall Proteins and Development. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2731.
- Janis B, Belott C, Brockman T, Menze MA. Functional and conformational plasticity of an animal group 1 LEA protein. *Biomolecules.* 2022;12(3):425.
- Jaspard E, Hunault G. Comparison of amino acids physico-chemical properties and usage of late embryogenesis abundant proteins, hydrophilins and WHy domain. *PLoS One.* 2014;9:e109570.
- Jiang G, Wang Z, Shang H, Yang W, Hu Z, Phillips J, Deng X. Proteome analysis of leaves from the resurrection plant *Boea hygrometrica* in response to dehydration and rehydration. *Planta.* 2007;225:1405–20.
- Jiang Q, Li X, Niu F, Sun X, Hu Z, Zhang H. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of wheat roots in response to salt stress. *Proteomics.* 2017;17:1600265.
- Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol.* 1999;292:195–202.
- Jones L, McQueen-Mason S. A role for expansins in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *FEBS Lett.* 2004;559(1–3):61–65.
- Jovanović Ž, Rakić T, Stevanović B, Radović S. Proteolysis plays a role in desiccation tolerance of resurrection plants. In: *Proceedings of the 5th Slovenian Symposium on Plant Biology with International Participation*; 2010; Ljubljana, Slovenia. p. 21.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021;596:583–589.
- Jung NU, Giarola V, Chen P, Knox JP, Bartels D. *Craterostigma plantagineum* cell wall composition is remodelled during desiccation and the glycine-rich protein CpGRP1 interacts with pectins through clustered arginines. *Plant J.* 2019;100:661–76.
- Jung NU. Molecular and biochemical studies of the *Craterostigma plantagineum* cell wall during dehydration and rehydration [PhD thesis]. Bonn (DE): Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn; 2020 Feb 11.
- Kačuráková M, Wilson R. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydr Polym.* 2001;44:291–303.
- Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013;30:772–80.
- Kavi Kishor PB, Sangam S, Amrutha RN, Sri Laxmi P, Naidu KR, Rao KRSS, i sar. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci.* 2005;88:424–438.
- Kelley L, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* 2015;10:845–858.
- Kentsis A, Sosnick TR. Trifluoroethanol promotes helix formation by destabilizing backbone exposure: desolvation rather than native hydrogen bonding defines the kinetic pathway of dimeric coiled-coil folding. *Biochemistry.* 1998;37:14613–14622.

- Kirch HH, Nair A, Bartels D. Novel ABA- and dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2001;28:555–67.
- Koag MC, Wilkens S, Fenton RD, Resnik J, Vo E, Close TJ. The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. *Plant Physiol*. 2009;150:1503–14.
- Kranner I, Colville L. Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environ Exp Bot*. 2011;72(1):93–105.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. 2001;305:567–80.
- Kukavica B, Mojović M, Vučinić Ž, Maksimović V, Takahama U, Veljović-Jovanović S. Generation of hydroxyl radical in isolated pea root cell wall and the role of cell wall-bound peroxidase, Mn-SOD and phenolics in their production. *Plant Cell Physiol*. 2009;50:304–317.
- Küpper H, Benedikty Z, Morina F, Andresen E, Mishra A, Trtílek M. Analysis of OJIP chlorophyll fluorescence kinetics and QA reoxidation kinetics by direct fast imaging. *Plant Physiol*. 2019;179(2):369–381.
- Kurepa J, Smalle JA. Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie*. 2008;90:324–335.
- Langella O, Renne T, Balliau T, Davanture M, Brehmer S, Zivy M, i sar. Full native timsTOF PASEF-enabled quantitative proteomics with the i2MassChroQ software package. *J Proteome Res*. 2024;23:3353–66.
- Laxa M, Liebthal M, Telman W, Chibani K, Dietz KJ. The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(4):94.
- Lazarević M, Siljak-Yakovlev S, Lazarević P, Stevanović B, Stevanović V. Pollen and seed morphology of resurrection plants from the genus *Ramonda* (Gesneriaceae): relationship with ploidy level and relevance to their ecology and identification. *Turk J Bot*. 2013;37:872–85.
- Le Gall H, Philippe F, Domon JM, Gillet F, Pelloux J, Rayon C. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants (Basel)*. 2015;4(1):112–166.
- LeBlanc BM, Hand SC. Target enzymes are stabilized by AfrLEA6 and a gain of α -helix coincides with protection by a group 3 LEA protein during incremental drying. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2021;1869(6):140642.
- Lehner A, Chopera D, Peters S, Keller F, Mundree S, Thomson J, i sar. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa*: cloning, expression, characterisation and role of XvINO1. *Funct Plant Biol*. 2008;35:26–39.
- Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res*. 2021;49:293–6.
- Levitt J. *Responses of plants to environmental stresses*. Vol. 2. New York: Academic Press; 1987.
- Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinform*. 2011;12:323.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans*. 1983;11:591–2.
- Lisse T, Bartels D, Kalbitzer HR, Jaenicke R. The recombinant dehydrin-like desiccation stress protein from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* displays no defined three-dimensional structure in its native state. *Biol Chem*. 1999;377:555–561.
- Liu H, Xing M, Yang W, Mu X, Wang X, Lu F, i sar. Genome-wide identification of and functional insights into the LEA gene family in bread wheat. *Sci Rep*. 2019;9:13375.

- Liu JG, Zhang Z, Qin QL, Peng RH, Xiong AS, Chen JM, i sar. Isolation and characterization of a cDNA encoding an EREBP/AP2-type protein, RCBF2, in *Oryza sativa*. *Biotechnol Lett*. 2007;29:165–173.
- Liu Y, Song Q, Li D, Yang X. Multifunctional roles of plant dehydrins in response to environmental stresses. *Front Plant Sci*. 2017;8:1018–22.
- Liu Z, Shen C, Chen R, Fu Z, Deng X, Xi R. Combination of transcriptomic, biochemical, and physiological analyses reveals sugar metabolism in *Camellia drupifera* fruit. *Front Plant Sci*. 2024;15:1424284.
- Magwanga RO, Lu P, Kirungu JN, Lu H, Wang X, Cai X, Zhou Z, Zhang Z, Salih H, Wang K, et al. Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) protein family and their role in drought stress tolerance in upland cotton. *BMC Genet*. 2018;19:6–37.
- Malik AA, Veltri M, Boddington KF, Singh KK, Graether SP. Genome analysis of conserved dehydrin motifs in vascular plants. *Front Plant Sci*. 2017;8:709–27.
- Markovska Y, Tsonev T, Kimenov G. Regulation of CAM and respiratory recycling by water supply in higher poikilohydric plants—*Haberlea rhodopensis* Friv. and *Ramonda serbica* Panc., at transition from biosis to anabiosis and vice versa. *Bot Acta*. 1997;110:18–24.
- Martinelli T. In situ localization of glucose and sucrose in dehydrating leaves of *Sporobolus stapfianus*. *J Plant Physiol*. 2008;165(6):580–587.
- Mehrnejad F, Naderi-Manesh H, Ranjbar B. Structural properties of magainin in water, TFE/water and aqueous urea solutions. *Proteins*. 2007;67:931–940.
- Mi H, Ebert D, Muruganujan A, Mills C, Albou LP, Mushayamaha T, Thomas PD. PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API. *Nucleic Acids Res*. 2021;49:D394–403.
- Mihailova G, Christov NK, Sárvári É, Solti Á, Hembrom R, Solymosi K, i sar. Reactivation of the photosynthetic apparatus of resurrection plant *Haberlea rhodopensis* during the early phase of recovery from drought- and freezing-induced desiccation. *Plants*. 2022;11(17):2185.
- Mihailova G, Vasileva I, Gigova L, Gesheva E, Simova-Stoilova L, Georgieva K. Antioxidant defense during recovery of resurrection plant *Haberlea rhodopensis* from drought- and freezing-induced desiccation. *Plants*. 2022;11(2):175.
- Mika S, Rost B. NMPdb: database of nuclear matrix proteins. *Nucleic Acids Res*. 2005;3:D160–3.
- Miles AJ, Drew ED, Wallace BA. DichroIDP: analysis of intrinsically disordered proteins by circular dichroism spectroscopy. *Commun Biol*. 2023;6:823.
- Milić D, Živanović B, Samardžić J, Nikolić N, Cukier C, Limami AM, i sar. Carbon and nitrogen allocation between the sink and source leaf tissue in response to the excess excitation energy conditions. *Int J Mol Sci*. 2023;24:2269.
- Mladenov P, Finazzi G, Bligny R, Moyankova D, Zasheva D, Boisson AM, Brugière S, Krasteva V, Alipieva K, Simova S, i sar. In vivo spectroscopy and NMR metabolite fingerprinting approaches to connect the dynamics of photosynthetic and metabolic phenotypes in resurrection plant *Haberlea rhodopensis* during desiccation and recovery. *Front Plant Sci*. 2015;6:564–78.
- Moore JP, Kuhlman B, Hansen J, Gomez L, Jørgensen B, Bartels D. Cell wall profiling of the resurrection plants *Craterostigma plantagineum* and *Lindernia brevidens* and their desiccation-sensitive relative *Lindernia subracemosa*. *Plants*. 2024;13(16):2235.
- Moore JP, Nguema-Ona E, Chevalier L, Lindsey GG, Brandt WF, Lerouge P, i sar. Response of the leaf cell wall to desiccation in *Myrothamnus flabellifolius*. *Plant Physiol*. 2006;141:651–662.
- Moore JP, Nguema-Ona EE, Vicré-Gibouin M, Sørensen I, Willats WG, Driouich A, Farrant JM. Arabinose-rich polymers as an evolutionary strategy to plasticize resurrection plant cell walls against desiccation. *Planta*. 2013;237:739–54.

- Moore JP, Vitré-Gibouin M, Farrant JM, Driouch A. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiol Plant*. 2008;134:237–45.
- Mouillon JM, Gustafsson P, Harryson P. Structural investigation of disordered stress proteins: comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments. *Plant Physiol*. 2006;141:638–50.
- Mulder NJ, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Barrell D, Bateman A, Binns D, Biswas M, Bradley P, Bork P, et al. The InterPro Database, 2003: increased coverage and new features. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:315–8.
- Muvunyi BP, Yan Q, Wu F, Min X, Yan ZZ, Kanzana G, Wang Y, Zhang J. Mining late embryogenesis abundant (LEA) family genes in *Cleistogenes songorica*, a xerophyte perennial desert plant. *Int J Mol Sci*. 2018;19:3430–45.
- Nagaraju M, Kumar SA, Reddy PS, Kumar A, Rao DM, Kavi Kishor PB. Genome-scale identification, classification, and tissue-specific expression analysis of late embryogenesis abundant (LEA) genes under abiotic stress conditions in *Sorghum bicolor* L. *PLoS One*. 2019;14:e0209980.
- Navari-Izzo F, Quartacci MF, Pinzino C, Rascio N, Vazzana C, Sgherri CLM. Protein dynamics in thylakoids of the desiccation-tolerant plant *Boea hygroskopica* during dehydration and rehydration. *Plant Physiol*. 2000;124(3):1427–1436.
- NDong C, Danyluk J, Wilson KE, Pocock T, Huner NP, Sarhan F. Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins: molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiol*. 2002;129:1368–78.
- Ngwarai MR. Isolation and characterisation of a sucrose synthase gene from *Xerophyta viscosa*. Honours thesis. Cape Town: University of Cape Town; 2014.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol*. 2008;147:1251–63.
- Oliver MJ, Farrant JM, Hilhorst HWM, Mundree S, Williams B, Bewley JD. Desiccation tolerance: avoiding cellular damage during drying and rehydration. *Annu Rev Plant Biol*. 2020;71:435–460.
- Oliver MJ, Velten J, Mishler BD. Desiccation tolerance in bryophytes. *Integr Comp Biol*. 2005;45(5):788–799.
- Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes JL, Garcíarrubio A, Covarrubias AA. Functional analysis of group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2010;154:373–90.
- Olvera-Carrillo Y, Reyes JL, Covarrubias AA. Late embryogenesis abundant proteins: versatile players in the plant adaptation to water-limiting environments. *Plant Signal Behav*. 2011;6:586–9.
- Pandey V, Ranjan S, Deeba F, Pandey AK, Singh R, Shirke PA, Pathre UV. Desiccation-induced physiological and biochemical changes in resurrection plant *Selaginella bryopteris*. *J Plant Physiol*. 2010;167(16):1351–1359.
- Park YB, Cosgrove DJ. Xyloglucan and its interactions with other components of the growing cell wall. *Plant Cell Physiol*. 2015;56(2):180–194.
- Paynel F, Schaumann A, Arkoun M, Douchiche O, Morvan C. Temporal regulation of cell-wall pectin methylesterase and peroxidase isoforms in cadmium-treated flax hypocotyl. *Ann Bot*. 2009;104(7):1363–1372.
- Peeva V, Cornic G. Leaf photosynthesis of *Haberlea rhodopensis* before and during drought. *Environ Exp Bot*. 2009;65(2–3):310–318.
- Pei Y, Li X, Zhu Y, Ge X, Sun Y, Liu N, Jia Y, Li F, Hou Y. GhABP19, a novel germin-like protein from *Gossypium hirsutum*, plays an important role in regulating resistance to *Verticillium* and *Fusarium* wilt pathogens. *Front Plant Sci*. 2019;10:583–601.
- Peng A, Weber SC. Evidence for and against liquid–liquid phase separation in the nucleus. *Noncoding RNA*. 2019;5:50–64.

- Peters S, Mundree S, Thomson J, Farrant J, Keller F. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides accumulate in leaves in response to water deficit. *J Exp Bot*. 2007;58:1947–1956.
- Phillips JR, Fischer E, Baron M, den Dries NV, Facchinelli F, Kutzer M, Rahmanzadeh R, Remus D, Bartels D. *Lindernia brevidens*: a novel desiccation-tolerant vascular plant, endemic to ancient tropical rainforests. *Plant J*. 2008;54(5):938–948.
- Pilling E, Höfte H. Feedback from the wall. *Curr Opin Plant Biol*. 2003;6(6):611–616.
- Piovesan D, Walsh I, Minervini G, Tosatto SCE. FIELDS: fast estimator of latent local structure. *Bioinformatics*. 2017;33:1889–91.
- Pollastri G, Przybylski D, Rost B, Baldi P. Improving the prediction of protein secondary structure in three and eight classes using recurrent neural networks and profiles. *Proteins*. 2002;47:228–35.
- Porembski S. Evolution, diversity and habitats of poikilohydrous plants. In: Lüttge U, Beck E, Bartels D, editors. Plant desiccation tolerance. Berlin: Springer; 2011. p. 139–156.
- Printz B, Wienkoop S, Sergeant K, Lutts S, Hausman JF, Renaut J. An improved protocol to study the plant cell wall proteome. *Front Plant Sci*. 2015;6:237.
- Quartacci MF, Cosi E, Navari-Izzo F. Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *J Exp Bot*. 2001;52(354):77–84.
- Quartacci MF, Glišić O, Stevanović B, Navari-Izzo F. Plasma membrane lipids in the resurrection plant *Ramonda serbica* following dehydration and rehydration. *J Exp Bot*. 2002;53:2159–2166.
- Rakić T, Gajić G, Lazarević M, Stevanović B. Effects of different light intensities, CO₂ concentrations, temperatures and drought stress on photosynthetic activity in two paleoendemic resurrection plant species *Ramonda serbica* and *R. nathaliae*. *Environ Exp Bot*. 2014;109:63–72.
- Rakić T, Lazarević M, Jovanović ZS, Radović S, Siljak-Yakovlev S, Stevanović B, Stevanović V. Resurrection plants of the genus *Ramonda*: prospective survival strategies—unlock further capacity of adaptation or embark on the path of evolution? *Front Plant Sci*. 2014;4:550–60.
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol*. 2004;161(11):1189–1202.
- Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell*. 2010;40(2):253–266.
- Ross AB, Langer JD, Jovanovic M. Proteome turnover in the spotlight: approaches, applications, and perspectives. *Mol Cell Proteomics*. 2021;20:100016.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4:406–25.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:671–675.
- Scholtz JM, Baldwin RL. The mechanism of alpha-helix formation by peptides. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1992;21:95–118.
- Scott P. Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. *Ann Bot*. 2000;85:159–66.
- Seifert GJ, Blaukopf C. Irritable walls: the plant extracellular matrix and signaling. *Plant Physiol*. 2010;153(2):467–478.
- Sgherri C, Stevanovic B, Navari-Izzo F. Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Physiol Plant*. 2004;122:478–85.
- Shimizu T, Kanamori Y, Furuki T, Kikawada T, Okuda T, Takahashi T, Mihara H, Sakurai M. Desiccation-induced structuralization and glass formation of group 3 late embryogenesis abundant protein model peptides. *Biochemistry*. 2010;49(6):1093–1104.

- Sickmeier M, Hamilton JA, LeGall T, Vacic V, Cortese MS, Tantos A, Szabo B, Tompa P, Chen J, Uversky VN, i sar. DisProt: the database of disordered proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:D786–93.
- Simmons TJ, Mortimer JC, Bernardinelli OD, Pöppler AC, Brown SP, DeAzevedo ER, Dupree R, Dupree P. Folding of xylan onto cellulose fibrils in plant cell walls revealed by solid-state NMR. *Nat Commun.* 2016;7:13902.
- Singh KK, Graether SP. Conserved sequence motifs in the abiotic stress response protein late embryogenesis abundant 3. *PLoS One.* 2020;15:e0237177.
- Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr Opin Plant Biol.* 2010;13:274–279.
- Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol.* 2000;3(3):229–235.
- Staehelin LA, Moore I. The plant Golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1995;46:261–288.
- Sterling JD, Quigley HF, Orellana A, Mohnen D. The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme α -(1,4)-galacturonosyltransferase is located in the lumen of the Golgi. *Plant Physiol.* 2001;127:360–371.
- Stevanović B, Ahn Thu PT, de Paula FM, da Silva JV. Effects of dehydration and rehydration on the polar lipid and fatty acid composition of *Ramonda* species. *Can J Bot.* 1992;70:107–113. doi:10.1139/b92-015.
- Stevanović V, Niketić M, Stevanović B. Chorological differentiation of the endemic and relic species *Ramonda serbica* and *R. nathaliae* (Gesneriaceae) on the Balkan Peninsula. *Bot Chron.* 1991;10:507–515.
- Strasser R, Altmann F, Steinkellner H. Controlled glycosylation of plant-produced recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol.* 2014;30:95–100.
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Qiang S, Goltsev V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2010;1797:1313–26.
- Suberkropp K. Pectin-degrading enzymes: polygalacturonase and pectin lyase. In: Bärlocher F, Gessner M, Graça M, editors. *Methods to Study Litter Decomposition*. Cham: Springer; 2020.
- Tan T, Sun Y, Luo S, Zhang C, Zhou H, Lin H. Efficient modulation of the photosynthetic apparatus confers desiccation tolerance in the resurrection plant *Boea hygrometrica*. *Plant Cell Physiol.* 2017;58:1976–90.
- Tebele SM, Marks RA, Farrant JM. Two decades of desiccation biology: a systematic review of the best studied angiosperm resurrection plants. *Plants (Basel).* 2021;10(12):2784.
- Tenhaken R. Cell wall remodeling under abiotic stress. *Front Plant Sci.* 2015;5:771.
- Thalhammer A, Hundertmark M, Popova AV, Seckler R, Hinch DK. Interaction of two intrinsically disordered plant stress proteins (COR15A and COR15B) with lipid membranes in the dry state. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1798:1812–20.
- Thomas HJ, Bjorkman AD, Elmendorf SC, Kattge J, Diaz S, Vellend M, Blok D, Cornelissen JH, Forbes BC, Henry GH, Hollister RD, Normand S, Prevéy JS, Rixen C, Wilmking M, Wipf S, Cornwell WK, Beck PS, De Vries FT. Global plant trait relationships extend to the climatic extremes of the tundra biome. *Nat Commun.* 2020;11(1):1351.
- Thomson WW, Platt KA. Conservation of cell order in desiccated mesophyll of *Selaginella lepidophylla* (Hook and Grev.) *Spring. Ann Bot.* 1997;79(4):439–447.
- Tolleter D, Hinch DK, Macherel D. A mitochondrial late embryogenesis abundant protein stabilizes model membranes in the dry state. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1798:1926–33.
- Tunnacliffe A, Wise MJ. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften.* 2007 Oct;94(10):791–812.

- Ueda EK, Gout PW, Morganti L. Current and prospective applications of metal ion–protein binding. *J Chromatogr A*. 2003;988:1–23.
- Valot B, Langella O, Nano E, Zivy M. MassChroQ: a versatile tool for mass spectrometry quantification. *Proteomics*. 2011;11:3572–7.
- Van den Ende W, Valluru R. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *J Exp Bot*. 2009;60(1):9–18.
- VanBuren R, Pardo J, Man Wai C, Evans S, Bartels D. Massive tandem proliferation of ELIPs supports convergent evolution of desiccation tolerance across land plants. *Plant Physiol*. 2019 Mar;179(3):1040–1049.
- Veljović-Jovanović S, Kukavica B, Navari-Izzo F. Characterization of polyphenol oxidase changes induced by desiccation of *Ramonda serbica* leaves. *Physiol Plant*. 2008;132:407–16.
- Vicré M, Lerouxel O, Farrant J, Lerouge P, Driouich A. Composition and desiccation-induced alterations of the cell wall in the resurrection plant *Craterostigma wilmsii*. *Physiol Plant*. 2004;120(2):229–239.
- Vicré M, Sherwin HW, Driouich A, Jaffer MA, Farrant JM. Cell wall characteristics and structure of hydrated and dry leaves of the resurrection plant *Craterostigma wilmsii*: a microscopical study. *Plant Physiol*. 1999;155:719–726.
- Vidović M, Franchin C, Morina F, Veljović-Jovanović S, Masi A, Arrigoni G. Efficient protein extraction for shotgun proteomics from hydrated and desiccated leaves of resurrection *Ramonda serbica* plants. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412:8299–312.
- Vidović M, Morina F, Milić S, Albert A, Zechmann B, Tosti T, Winkler JB, Jovanović SV. Carbon allocation from source to sink leaf tissue in relation to flavonoid biosynthesis in variegated *Pelargonium zonale* under UV-B radiation and high PAR intensity. *Plant Physiol Biochem*. 2015;93:44–55.
- Vidović M, Morina F, Milić-Komić S, Vuleta A, Zechmann B, Prokić Lj, Veljović-Jovanović S. Characterisation of antioxidants in photosynthetic and non-photosynthetic leaf tissues of variegated *Pelargonium zonale* plants. *Plant Biol (Stuttg)*. 2016 Jul;18(4):669–680.
- Vidović M, Morina F, Veljović-Jovanović S. Stimulation of various phenolics in plants under ambient UV-B radiation. In: Singh VP, Singh S, Prasad SM, Parihar P, editors. *UV-B Radiation: From Environmental Stressor to Regulator of Plant Growth*. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell; 2017. p. 9–56.
- Vieira EA, Da Silva GM, Gaspar M, Braga MR, Caldeira CF. Surviving water scarcity: Seasonal contrasts in drought and desiccation tolerance of co-occurring *Barbacenia gentianoides* and *Vellozia caruncularis*. *Front Plant Sci*. 2025;16:1642013.
- Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D, Burovski E, Peterson P, Weckesser W, Bright J, et al. SciPy 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods*. 2020;17:261–72.
- Vogel J. Unique aspects of the grass cell wall. *Curr Opin Plant Biol*. 2008;11:301–307.
- Voxeur A, Höfte H. Cell wall integrity signaling in plants: To grow or not to grow that's the question. *Glycobiology*. 2016 Sep;26(9):950–960.
- Walters C, Farrant JM, Pammenter NW, Berjak P. Desiccation stress and damage. In: Black M, Pritchard HW, editors. *Desiccation and Survival in Plants: Drying without Dying*. Wallington, UK: CABI Publishing; 2002. p. 263–282.
- Wang L, Shang H, Liu Y, Zheng M, Wu R, Phillips J, Bartels D, Deng X. A role for a cell wall-localized glycine-rich protein in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Boea hygrometrica*. *Plant Biol*. 2009;11:837–48.
- Wang W, Gao T, Chen J, Yang J, Huang H, Yu Y. The late embryogenesis abundant gene family in tea plant (*Camellia sinensis*): Genome-wide characterization and expression analysis in response to cold and dehydration stress. *Plant Physiol Biochem*. 2019;135:277–86.
- Wang XS, Zhu HB, Jin GL, Liu HL, Wu WR, Zhu J. Genome-scale identification and analysis of LEA genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci*. 2007;172:414–20.

- Wharton DA. Anhydrobiosis. *Volume 25, Issue 23*, pR1114–R1116, Dec 07, 2015.
- Whittaker A, Bochicchio A, Vazzana C, Lindsey G, Farrant J. Changes in leaf hexokinase activity and metabolite levels in response to drying in the desiccation-tolerant species *Sporobolus stapfianus* and *Xerophyta viscosa*. *J Exp Bot*. 2001;52:961–969.
- Wise MJ, Tunnacliffe A. POPP the question: What do LEA proteins do? *Trends Plant Sci*. 2004;9:13–7.
- Wise MJ. LEAping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinform*. 2003;4:52–71.
- Wolf S, Mouille G, Pelloux J. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol Plant*. 2009 Sep;2(5):851–860.
- Wormit A, Usadel B. The multifaceted role of pectin methylesterase inhibitors (PMEIs). *Int J Mol Sci*. 2018;19:2878.
- Wu S, Ning F, Zhang Q, Wu X, Wang W. Enhancing omics research of crop responses to drought under field conditions. *Front Plant Sci*. 2017;8:174.
- Wu SW, Hu CX, Tan QL, Xu SJ, Sun XC. Nitric oxide mediates molybdenum-induced antioxidant defense in wheat under drought stress. *Front Plant Sci*. 2017;8:1085.
- Wu X, Gong F, Yang L, Hu X, Tai F, Wang W. Proteomic analysis reveals differential accumulation of small heat shock proteins and late embryogenesis abundant proteins between ABA-deficient mutant vp5 seeds and wild-type Vp5 seeds in maize. *Front Plant Sci*. 2015;5:801.
- Xu X, Legay S, Sergeant K, Zorzan S, Leclercq CC, Charton S, Giarola V, Liu X, Challabathula D, Renaut J, i sar. Molecular insights into plant desiccation tolerance: transcriptomics, proteomics and targeted metabolite profiling in *Craterostigma plantagineum*. *Plant J*. 2021;107:377–98.
- Yang EJ, Oh YA, Lee ES, Park AR, Cho SK, Yoo YJ, Park OK. Oxygen-evolving enhancer protein 2 is phosphorylated by glycine-rich protein 3/wall-associated kinase 1 in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305:862–8.
- Yang J, Sardar HS, McGovern KR, Zhang Y, Showalter AM. A lysine-rich arabinogalactan protein in *Arabidopsis* is essential for plant growth and development, including cell division and expansion. *Plant J*. 2007;49:629–640.
- Yang X, Lu M, Wang Y, Wang Y, Liu Z, Chen S. Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*. 2021;7:50.
- Yobi A, Schlauch KA, Tillett RL, Yim WC, Espinoza C, Wone BW, Cushman JC, Oliver MJ. *Sporobolus stapfianus*: Insights into desiccation tolerance in the resurrection grasses from linking transcriptomics to metabolomics. *BMC Plant Biol*. 2017 Mar 28;17(1):67.
- Yoneda JS, Miles AJ, Ulian Araujo AP, Wallace BA. Differential dehydration effects on globular proteins and intrinsically disordered proteins during film formation. *Protein Sci*. 2017;26(4):718–726.
- Yoshida S, Uemura M. Responses of the plasma membrane to cold acclimation and freezing stress. In: Larsson C, Moller IM, editors. *The Plant Plasma Membrane*. Berlin: Springer-Verlag; 1990. p. 293–319.
- Yurina NP. Heat shock proteins in plant protection from oxidative stress. *Mol Biol*. 2023 Nov-Dec;57(6):949–964.
- Zabackis E, Huang J, Müller B, Darvill AG, Albersheim P. Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiol*. 1995 Apr;107(4):1129–1138.
- Zhang Q, Bartels D. Molecular responses to dehydration and desiccation in desiccation-tolerant angiosperm plants. *J Exp Bot*. 2018;69:3211–22.

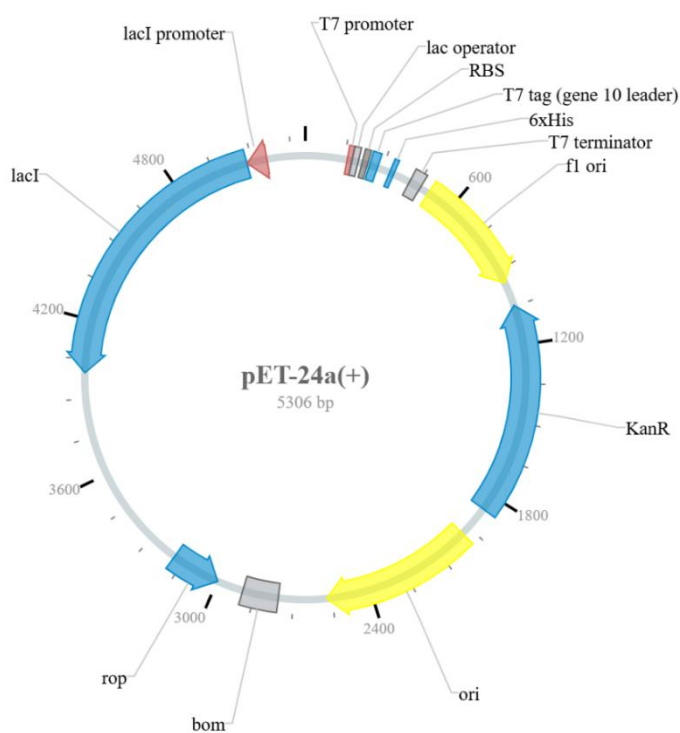
- Zhu Y, Wang B, Phillips J, Zhang ZN, Du H, Xu T, Huang LC, Zhang XF, Xu GH, Li WL, i sar. Global transcriptome analysis reveals acclimation-primed processes involved in the acquisition of desiccation tolerance in *Boea hygrometrica*. *Plant Cell Physiol*. 2015;56:1429–41.
- Živanović B, Milić-Komić S, Nikolić N, Mutavdžić D, Srećković T, Veljović-Jovanović S, Prokić L. Differential response of two tomato genotypes, wild type cv. Ailsa Craig and its ABA-deficient mutant *flacca*, to short-termed drought cycles. *Plants*. 2021;10:2308.
- Živković T, Quartacci MF, Stevanović B, Marinone F, Navari-Izzo F. Low molecular weight substances in the poikilohydric plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Plant Sci*. 2005;168:105–11.

PRILOZI

Zbog obimnosti podataka, prilozi od jedan do devet se nalaze u okviru rada Vidović i sar. 2022 i mogu se pronaći na sledećem linku: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/plants11091199/s1>. Prilozi od devet do 26 su objavljeni u okviru rada Pantelić i sar. 2022 i mogu se pogledati na sledećem linku: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23073547/s1>.

- Prilog 1** – dodatna tabela S1, Vidović i sar. 2022
- Prilog 2** – dodatna slika S1, Vidović i sar. 2022
- Prilog 3** – dodatna tabela S4, Vidović i sar. 2022
- Prilog 4** – dodatna tabela S5, Vidović i sar. 2022
- Prilog 5** – dodatna tabela S6, Vidović i sar. 2022
- Prilog 6** – dodatna tabela S2, Vidović i sar. 2022
- Prilog 7** – dodatna slika S2, Vidović i sar. 2022
- Prilog 8** – dodatna slika S3, Vidović i sar. 2022
- Prilog 9** – dodatna tabela S7, Vidović i sar. 2022
- Prilog 10** – dodatna tabela S1, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 11** – dodatna slika S1, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 12** – dodatna tabela S2, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 13** – dodatna slika S2, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 14** – dodatna tabela S3, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 15** – dodatna slika S4, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 16** – dodatna slika S5, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 17** – dodatna slika S6, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 18** – dodatna slika S7, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 19** – dodatna slika S8, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 20** – dodatna slika S9, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 21** – dodatna slika S10, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 22** – dodatna tabela S4, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 23** – dodatna tabela S5, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 24** – dodatna slika S11, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 25** – dodatna slika S12, Pantelić i sar. 2022
- Prilog 26** – dodatna tabela S3, Pantelić i sar. 2025

Prilog 27 – shema korišćenog vektora pET24a(+)



Prilog 28 – sekvence prajmera

Direktni prajmer:

5'-CATATGGCGGCGATGTTTCGTTGCAAAAACGACCGTGTAAATTTGTC - 3'

Reverzni prajmer:

5'-GCAGAGTCTAAACGGCATCACCATCATCACCCTGAATTCTCGAG - 3'

BIOGRAFIJA

Ana Pantelić je rođena 12.05.1997. godine u Šapcu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne akademske studije biohemije upisala je 2016. godine na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 2020. godine sa prosečnom ocenom 8,15 i ocenom 10 na završnom radu pod naslovom „Optimizacija uslova ekspresije humanog α -sinukleina fuzionisanog sa mCerulean3 fluorescentnim proteinom u bakteriji *Escherichia coli*“, pod mentorstvom doc. dr Jelene Radosavljević. Iste godine je upisala master akademske studije biohemije, koje je završila 2021. godine sa prosečnom ocenom 9,15 i ocenom 10 na završnom radu „Optimizacija protokola za proizvodnju proteina zastupljenog u kasnoj fazi embriogeneze kod biljke *Ramonda serbica* u bakteriji *Escherichia coli* rekombinantnom DNK tehnologijom“, pod mentorstvom doc. dr Jelene Radosavljević i naučnog savetnika dr Marije Vidović (Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, IMGGI, Univerzitet u Beogradu). Godine 2021. je na Hemijskom fakultetu, upisala doktorske akademske studije biohemije. Doktorsku tezu započela je pod mentorstvom dr Vidović i dr Ljubodraga Vujisića (Hemijski Fakultet). Zaposlena je kao istraživač pripravnik od 2021. godine, a od maja 2024. godine kao istraživač saradnik. Ana Pantelić je rukovodila jedan i učestvovala na tri projekta dokaza koncepta, PROMIS i IDEJA projekata, kao i ZeNCure *Horizon* projekta i dve bilateralne saradnje. Deo istraživanja radila je na Institutu za agrofiziku, u Lublinu, Poljska; Nacionalnom hemijskom institutu, u Ljubljani; Univerzitetu u Kopenhagenu, kao i na Institutu za eksperimentalnu fiziku, u Košicama, Slovačka.

Objavljeni radovi u sklopu disertacije u vodećim međunarodnim časopisima (M21):

Pantelić A, Ilin T, Milić D, Gradišar H, Radosavljević J, Vidović M. Structural flexibility of a recombinant intrinsically disordered LEA protein from *Ramonda serbica*. *Sci Rep*. 2025;15(1):34808. doi: 10.1038/s41598-025-18648-w.

Vidović M, Battisti I, Pantelić A, Morina F, Arrigoni G, Masi A, Veljović Jovanović S. Desiccation Tolerance in *Ramonda serbica* Panc.: An Integrative Transcriptomic, Proteomic, Metabolite and Photosynthetic Study. *Plants*. 2022;11(9):1199. doi: 10.3390/plants11091199.

Pantelić A, Stevanović S, Komić SM, Kilibarda N, Vidović M. *In Silico* Characterisation of the Late Embryogenesis Abundant (LEA) Protein Families and Their Role in Desiccation Tolerance in *Ramonda serbica* Panc. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7):3547. doi: 10.3390/ijms23073547.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora **Ana Pantelić**

Broj indeksa **DB02/2021**

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Identifikacija i karakterizacija LEA proteina i metaboličkih puteva odgovornih za toleranciju na desikaciju biljke *Ramonda serbica* Pančić

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da disertacija u celini, ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristola intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Ana Pantelić**

Broj indeksa **DB02/2021**

Studijski program **Biohemija**

Naslov rada **Identifikacija i karakterizacija LEA proteina i metaboličkih puteva odgovornih za toleranciju na desikaciju biljke *Ramonda serbica* Pančić**

Mentori **dr Ljubodrag Vujisić, dr Marija Vidović**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković" da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Identifikacija i karakterizacija LEA proteina i metaboličkih puteva odgovornih za toleranciju na desikaciju biljke *Ramonda serbica* Pančić

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)**
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, _____

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.