Utjecaj stresa na ekspresiju fotosintetskih proteina

Musa, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:694477

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije

Matea Musa

Utjecaj stresa na ekspresiju fotosintetskih proteina

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije

Matea Musa

Utjecaj stresa na ekspresiju fotosintetskih proteina

Diplomski rad

Mentorica: doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik
Komentorica: doc.dr.sc. Selma Mlinarić

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

Utjecaj stresa na ekspresiju fotosintetskih proteina

Matea Musa

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju i Odjelu za biologiju, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku
Mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik
Komentor: doc. dr. sc. Selma Mlinarić

Sažetak

U ovom radu je istraživan utjecaj stresa sušom i visokim intenzitetom svjetlosti na ekspresiju D1 podjedinice fotosustava II (PSII), PsbO podjedinice kisik razvijajućeg kompleksa (OEC) i velike podjedinice (LSU) enzima Rubisco u klijancima ječma (*Hordeum vulgare* L.) kultivara Panonac. Klijanci ječma su izloženi stresu izazvanom sušom u trajanju od 14 dana te visokom intenzitetu svjetlosti u trajanju od 4, odnosno 11 sati u klima komori. Kako bi se odredila količina ispitivanih fotosintetskih proteina, proteini su razdvojeni denaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) nakon čega su prenešeni na nitroceluloznu membranu (Western blot) te detektirani specifičnim protutijelima. Izlaganje stresu izazvanom sušom nije doveo do snažnije degradacije sva tri ispitivana fotosintetska proteina. Izlaganje stresu uzrokovanom visokim intenzitetom svjetlosti pokazao je snažniju degradaciju u odnosu na izlaganje suši za sva tri ispitivana proteina. Kraće izlaganje visokom intenzitetu svjetlosti (4h) izazvalo je jaču degradaciju D1 i LSU podjedinice u odnosu na dugotrajnije izlaganje (11h) ovom tipu stresa. Dobiveni rezultati upućuju na to da je izabrana sorta ječma pokazala manju osjetljivost na sušu u odnosu na visoki intenzitet svjetlosti.

Diplomski rad obuhvaća: *33 stranice, 10 slika, 1 tablicu, 63 literaturna navoda, 2 priloga*
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: D1 / fotosinteza / OEC / Rubisco LSU / suša / visoki intenzitet svjetlosti

Rad je prihvaćen: 19.09.2019.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:
1. doc. dr. sc. Ana Amić, predsjednica
2. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, mentorica i članica
3. doc. dr. sc. Selma Mlinarić, komentorica i članica
4. doc. dr. sc. Lidija Begović, zamjena člana

Rad je pohranjen u: Knjižnica Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD **Diploma Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

Effect of stress on the expression of photosynthetic proteins
Matea Musa

Thesis completed at: Department of Chemistry, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD
Co-mentor: Assist. Prof. Selma Mlinarić, PhD

Abstract:

In this thesis, the effect of stress, trough drought and high light intensity, on the expression of D1 subunit of photosystem II, the PsbO subunit of the oxygen-evolving complex (OEC), and the large subunit (LSU) of the Rubisco enzyme in barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar Panonac was investigated. e. Barley seedlings were exposed to 14 days of drought stress and to high light intensity stress in the climate chamber in duration of 4 and 11 hours. To determine the amount of examined photosynthetic proteins, denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used for their separation followed by the transfer to a nitrocellulose membrane (Western blot) and detection with specific antibodies. Exposure to drought induced stress did not result in significant degradation of any of three examined photosynthetic proteins. Exposure to stress caused by high light intensity showed stronger degradation compared to drought exposure in all three proteins. Shorter exposure to high light intensity (4h) caused more degradation of the D1 and LSU subunits when compared to a longer exposure (11h) to this type of stress. The results obtained indicate that the selected cultivar of barley showed a lower sensitivity to drought compared to the high light intensity stress.

Thesis includes: *33 pages, 10 figures, 1 tables, 63 references, 2 appendices*
Original in: Croatian
Keywords: D1 / photosynthesis / OEC / Rubisco LSU / drought / high light intensity

Thesis accepted: 19.09.2019.

Reviewers
1. Assoc. Prof. Ana Amić, PhD; chair
2. Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD; supervisor and member
3. Assist. Prof. Selma Mlinarić, PhD; co-mentor and member
4. Assist. Prof. Lidija Begović, PhD; substitute member

Thesis deposited in: Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Sadržaj

1. Uvod 1

2. Literaturni pregled 2

2.1. Fotosinteza 2
2.2. Tijek reakcija u fotosintezi 3
2.2.1. Reakcije ovisne o svjetlosti 3
2.2.2. Reakcije neovisne o svjetlosti (Calvinov ciklus) 5
2.3. Stres 6
2.3.1. Utjecaj visokog intenziteta svjetlosti na fotosintezu 7
2.3.2. Utjecaj suše na fotosintezu 7

3. Materijali i metode 9

3.1. Materijali 9
3.1.1. Biljni materijali i opis uzgoja 9
3.1.2. Kemikalije 9
3.1.3. Uređaji 10
3.1.4. Protutijela 11
3.2. Metode 11
3.2.1. Izolacija kloroplasta iz klijanaca ječma 11
3.2.2. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu 12
3.2.3. Western blot metoda 13
3.2.4. Detekcija kemiluminiscencijom 15

4. Rezultati i rasprava 16

4.1. Detekcija proteinskih vrpca u gelu 16
4.2. Utjecaj stresa na količinu D1 proteina 17
4.3. Utjecaj stresa na količinu OEC kompleksa 20
4.4. Utjecaj stresa na količinu enzima Rubisco 22

5. Zaključak 25

6. Literatura 26

7. Dodaci 30

7.1. Popis kratica 30
7.2. Životopis 32

1. Uvod

Fotosinteza je jedan od najvažnijih fizioloških procesa u biljkama. Ovaj proces pokreće energija dobivena iz Sunčeve svjetlosti koja se složenim procesima upotrebljava za sintezu glukoze trošeći vodu i ugljikov (IV) oksid (CO_2) [1]. Na ovaj način dolazi do konstantnog kruženja CO_2 i O_2 [2]. Fotosinteza se odvija u dva procesa, reakcije na svjetlu i reakcije neovisne o svjetlosti [3]. Reakcijama ovisnim o svjetlosti dobiva se kisik, ATP i NADPH. ATP i NADPH se nadalje koriste u reakcijama neovisnim o svjetlosti (Calvinov ciklus) za sintezu organskih molekula iz CO_2[4].

U ovom će se radu proučavati utjecaj stresnih uvjeta na ječam, koji je među najvažnijim žitaricama svijeta. Ječam se uzgaja u razne svrhe, od ishrane životinja i ljudi do pripreme raznovrsnih pića, ima bogatu nutritivnu vrijednost te ima značajnu ulogu u različitim industrijama [5]. Vrlo su često tijekom uzgoja biljke izložene okolišnom stresu koji može značajno utjecati na kvalitetu i količinu uroda ječma. U stresnim uvjetima nastaju povećane količine reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) koje mogu uzrokovati oštećenja biomembrana i makromolekula [6]. Utjecaj stresa ne mora imati nužno isti učinak na sve biljke, već to ovisi o vrsti i genotipu. Suša najčešće ima negativan učinak budući da biljke vodom unose i razne hranjive tvari, stoga dolazi do narušavanja ravnoteže fotosintetskih reakcija. Svjetlosna energija je neophodna za normalno odvijanje fotosinteze, ipak njen prejak intenzitet može naškoditi biljkama [7, 8]. Obično je visok intenzitet svjetlosti popraćen sušom što često uzrokuje zatvaranje puči i povećanu asimilaciju CO_2 [9].

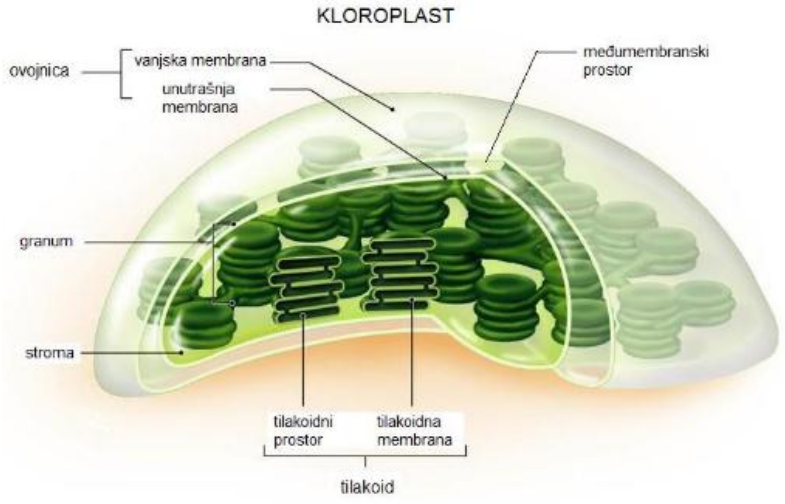
Cilj ovog rada je utvrditi kako će izlaganje stresu, i to stresu izazvanom sušom i povišenim intenzitetom svjetlosti, utjecati na ekspresiju fotosintetskih proteina kod klijanaca ječma.

2. Literaturni pregled

2.1. Fotosinteza

Prema Kozlina (2003) fotosinteza je proces u kojem se uz energiju Sunčevog zračenja anorganske tvari mogu prevesti u organske spojeve [3]. Tijekom fotosinteze odvijaju se reakcije ovisne o svjetlosti i reakcije neovisne o svjetlosti. U svjetlosnim reakcijama, koje se odvijaju u tilakoidima kloroplasta, nastaju ATP i NADH [10]. ATP i NADH nadalje koriste kompleksi u reakcijama neovisnima o svjetlosti, gdje se u konačnici dobiva glukoza koja je glavni produkt fotosinteze. Reakcije neovisne o svjetlosti odvijaju se u stromi kloroplasta [11].

Kloroplasti u kojima se odvija fotosinteza su specijalizirani organeli koji se nalaze u citoplazmi [12]. Mezofil lista biljke može sadržavati od 30 do preko 100 kloroplasta. Kloroplasti se sastoje se od vanjske i unutrašnje membrane, te sustava tilakoidnih membrana [3] (Slika 1.). U unutrašnjosti kloroplasta nalazi se stroma u kojoj se nalaze enzimi, ribosomi, tilakoidi i kružna DNA. Tilakoidi su građeni kao naslage diskova. Diskovi naslagani jedni na druge tvore *granum* [12]. Više grana tilakoida povezuje membranska struktura nazvana stroma tilakoidi. U tilakoidnim membranama razlikuju se tilakoidni i stroma prostor [3, 12]. Matriks membrane čini lipidna faza u kojoj su uronjeni vezani proteini i proteinski kompleksi [3].



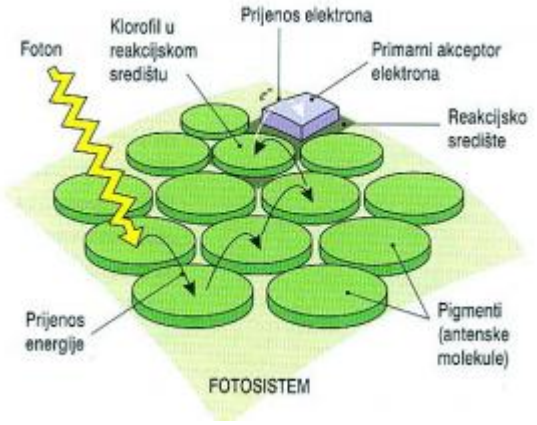
Slika 1. Shematski prikaz strukture kloroplasta [13]. Kloroplast obavijaju vanjska i unutrašnja membrana. Unutrašnjost kloroplasta čini stroma u koju su uklopljeni *grana* i stroma tilakoidi na kojima se odvijaju fotosintetske reakcije.

2.2. Tijek reakcija u fotosintezi

Na tilakoidnim membranama smještena su četiri proteinska kompleksa ključna za odvijanje fotosinteze: fotosustav II (PSII), citokrom b_6f kompleks, fotosustav I (PSI) i ATP sintaza koji su povezani transportnim lancem elektrona [3]. Oba fotosustava su osjetljiva na svijetlost. PSII sadrži poseban par klorofila *a* naziva P680 koji ima apsorpcijski maksimum u području crvene svjetlosti valne duljine 680 nm, dok PSI sadrži poseban par klorofila *a*, koja maksimalno apsorbira tamno crvenu svjetlost valne duljine od 700 nm [3, 11]. P680 i P700 su jednake molekule klorofila ali se razlikuju po vezanim proteinima što utječe na raspodjelu elektrona i razliku u apsorpciji valnih duljina [3, 11].

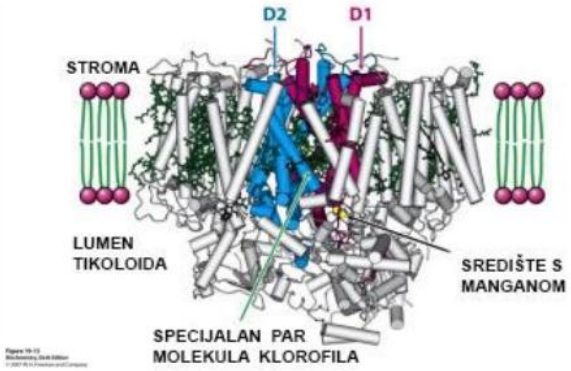
2.2.1. Reakcije ovisne o svjetlosti

U prvom koraku fotosinteze, odnosno u reakcijama ovisnim o svjetlosti koje pokreće Sunčeva svjetlost sudjeluje klorofil *a* smješten u antenama PSII [3] (Slika 2.). Klorofil apsorbira Sunčevu svjetlost u plavom i crvenom dijelu spektra te prelazi u pobuđeno stanje [3, 14]. Klorofil zatim biva ioniziran izbacivanjem elektrona bogatog energijom [14]. Ekscetirani elektron prelazi u višu energetsku razinu, te prolazi kroz lanac prijenosa elektrona gubeći energiju [14]. Izgubljena energija s elektrona koristi se za pumpanje vodikovih iona iz strome u lumen tilakoida. Izbačeni ekscetirani elektron predaje se primarnom akceptoru elektrona, plastokinonu (Q_A) koji se nalazi u reakcijskom središtu PSII [3].



Slika 2. Shematski prikaz građe fotosustava [3]. Fotosustave čine reakcijska središta i antena kompleksi za prikupljanje svjetlosti. Reakcijsko središte čini četiri molekule klorofila *a* i dvije molekule feofitina te molekule primarnog akceptora elektrona.

PSII je veliki transmembranski proteinski kompleks građen od 20 podjedinica. PSII građen je kao dimer od podjedinica D1 i D2 koje čine reakcijsko središte [15] (Slika 3.). Na D1 i D2 vezane su četiri molekule klorofila i dvije molekule feofitina. Na njih su vezane i dvije molekule plastikinona, Q_A je vezan na D2, dok je Q_B vezan na D1. Protein D1 ima važnu ulogu u prijenosu elektrona u transportni lanac elektrona.



Slika 3. Prikaz strukture PSII [16]. Podjedinice D1 (crvene) i D2 (plave) grade heterodimer koji čini reakcijsko središte PSII. Okružene su molekulama klorofila (zeleno). Te su dvije podjedinice međusobno homologne. S obje strane D1 i D2 podjedinica nalaze se podjedinice (sivo) koje imaju šest transmembranskih heliksa. Između D1 i D2 smješten je i specijalni par molekula klorofila u kojem se nalazi mangan.

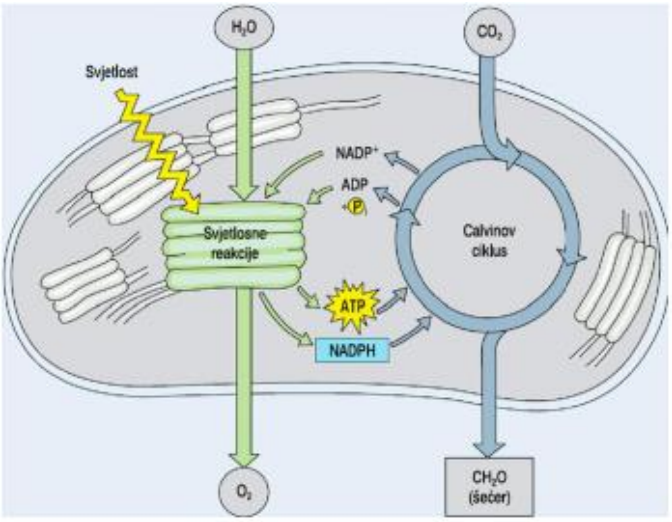
Elektroni se najprije prenose na vezani plastokinon Q_A i dalje na pokretne plastikinone, Q_B. Zatim se elektroni prenose na citokrom b_6f kompleks gdje dolazi do oksidiracije dvije molekule QH pri čemu nastaju 8 protona koji se otpuštaju u lumen tilakoida [15]. Elektroni sa citokroma dolaze na plastocijanin (PC) koji je posljednji prenositelj elektrona između PSII i PSI [3]. Ukupno se reduciraju četiri molekule plastocijanina i prenose se četiri elektrona. PC elektrone prenosi na reakcijski centar PSI, koji nakon primitka elektrona može djelovati kao donor elektrona za nastanak NADPH [3]. Na reakcijski centar PSI dolazi još jedan foton svjetlosti koji elektron opet podiže na višu energetsku razinu, a elektron prolazi kroz lanac prijenosa elektrona sve do molekule feredoksina (Fd). Fd prenosi ukupno četiri elektrona na feredoksin-NADP reduktazu koja provodi $NADP^+$ u 2 molekule NADPH [11].

Elektrone izbačene iz klorofila PSII nadomještaju elektroni nastali oksidacijom vode [17]. Oksidacija vode odvija se u manganovom središtu kisik razvijajućeg kompleksa (engl. *oxygen-evolving complex*, OEC) [18, 19]. Apsorpcijom četiri fotona tijekom reakcija ovisnih o svjetlosti dolazi do gubitka četiri elektrona u manganovom središtu, a sam kompleks se oksidira. OEC je spojen s aminokiselinskim ostacima D1 proteina. Kompleks može postojati u 5 S-stanja nazvanih od S_0 (najviše reducirano stanje) do S_4 (najviše oksidirano stanje) [20]. Povratkom OEC kompleksa u osnovno stanje, otpušta se molekula kisika te četiri protona u lumen tilakoida gdje nastaje gradijent protona [3]. Nastali gradijent protona omogućava sintezu ATP-a. ATP sintazu pokreće protok ukupno 12 protona koji se nalaze u lumenu tilakoida. Uz gradijent od 12 protona sintetiziraju se 3 molekule ATP-a [3].

2.2.2. Reakcije neovisne o svjetlosti (Calvinov ciklus)

Calvinov ciklus, odnosno reakcije neovisne o svjetlosti, odvija se u stromi kloroplasta te obuhvaća reakcije vezanja molekule CO_2 u organske spojeve, odnosno reakcije redukcije CO_2 do ugljikohidrata. U tim reakcijama, kao izvor energije služe ATP i NADPH, koji su nastali u reakcijama ovisnim o svjetlosti, kao što je prikazano na slici 2.4. [3]. Calvinov ciklus započinje djelovanjem enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze (Rubisco) koji fiksira ugljik u obliku CO_2, te na taj način ugljik ulazi u ciklus. Calvinov ciklus se ponavlja dva puta i u konačnici nastaje jedna molekula CO_2 [21]. Sam enzim Rubisco čini oko 50 % ukupnih proteina listova, što ga pak čini

najobilnije zastupljenim proteinom na svijetu [22]. Rubisco grade osam velikih (55 kDa) i osam malih (15 kDa) podjedinica [23].



Slika 4. Tijek reakcije fotosinteze [3]. NADPH i ATP, koji nastaju u reakcijama ovisnim o svjetlosti, troše se u reakcijama neovisnim o svjetlosti pri čemu kao krajnji produkt nastaje glukoza.

2.3. Stres

Čimbenike stresa dijelimo na abiotičke i biotičke. Biotički čimbenici stresa rezultat su djelovanja živih organizama (npr. insekti ili gljive), dok se u abiotički čimbenike stresa ubrajaju djelovanje suše, visokih ili niskih temperatura, teških metala, visokog intenziteta svjetlosti, povećanog salinitet, itd. [24, 25].

Biljke u prirodi su kontinuirano izložene različitim stresnim uvjetima koji mogu uzrokovati oštećenja fotosintetskog aparata te u konačnici dovesti do velikih gubitaka prinosa. Kao posljedica stresa nastaju reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS). PSII je jedan od najosjetljivijih komponenti fotosintetskog aparata. Posljedica utjecaja ROS-a na PSII dovodi do neravnoteže fotosintetskih redoks reakcija, te naposljetku može rezultirati inhibicijom popravka PSII [25, 26].

2.3.1. Utjecaj visokog intenziteta svjetlosti na fotosintezu

Fotosinteza kao izvor energije koristi energiju Sunca [11]. Ipak, kada su biljke izložene povećanom intenzitetu svjetlosti može doći do promjena u ultrastrukturi kloroplasta ili strukturi fotosintetskog aparata. U kloroplastu biljaka izloženih visokom intenzitetu svjetlosti nalazi se manji broj tilakoida i manje klorofila u tilakoidnim membranama, te su grane tilakoida međusobno bliže smještene, a samim time daju i veći omjer klorofila *a* i *b* od biljka koje rastu na niskom intenzitetu svjetlosti [27]. Također, svjetlost visokog intenziteta inducira fotooštećenja kloroplasta i razgradnju fotosintetskih pigmenata što rezultira žućenjem lista biljaka [28]. Kada je intenzitet svjetlosti toliko visok da premašuje kapacitet stvarne potrebe biljaka, dolazi do stvaranja ROS-a, a transportni lanac elektrona postaje blokiran zbog nemogućnosti prijenosa elektrona u transportnom lancu elektrona dalje od primarnog akceptora elektrona Q_A [29].

Biljke imaju nekoliko načina na koji se mogu obraniti od utjecaja visokog intenziteta svjetlosti. Smanjenje antena PSII može dovesti do smanjenja apsorpcije svjetlosti. Prilikom izlaganja biljke povišenom intenzitetu osvjetljenja, sva apsorbirana svjetlosna energija ne može se iskoristiti jer su plastokinoni reducirani, stoga ne mogu primiti elektrone, a suvišak energije može se osloboditi u obliku fluorescencije i topline [27]. Također, vrlo brza sinteza novih proteina u optimalnim uvjetima, pogotovo proteina D1, omogućava biljkama brz oporavak od utjecaja stresa [30]. Kod povećanog intenziteta svjetlosti dolazi i do povećanog udjela citokroma b_6f kompleksa, ATP sintaze i komponenti Calvinovog ciklusa kao Rubisco, što rezultira povećanom asimilacijom CO_2, povećanim prijenosom elektrona i većom koncentracijom klorofila *a* u odnosu na klorofil *b* [31].

2.3.2. Utjecaj suše na fotosintezu

Voda je neophodna za normalan rast i održavanje homeostaze biljke. Utjecaj suše na biljku posljedica je ograničene opskrbe biljke vodom, odnosno nedostatnom količinom raspoložive vode u tlu ili pak kada pri visokim temperaturama biljke transpiracijom gube više vode od količine koju korijen može primiti. Kod biljaka izloženih suši, uz nedostatak vode, dolazi i do nedostatka hranjivih tvari što se na posljetku odražava na raspodjelu asimilata u biljci. Suša rezultira zatvaranjem puči, dovodi do smanjenog intenziteta transpiracije, pada vodnog potencijala, smanjenja intenziteta fotosinteze te inhibicije rasta

biljke [9]. Biljke zatvaraju puči da bi spriječile isušivanje lista i daljnji gubitak vode. Zatvaranjem puči dolazi do opadanja stope iskorištenosti elektrona tijekom fotorespiracije. Istodobno dolazi do povećanja omjera ATP-a i ADP-a [9]. Zatvaranje puči glavni je uzrok smanjenja stope fotosinteze kod blage suše. U tretiranim se biljkama javljaju povećane koncentracije prolina, sorbitola, apscizinske kiseline, manitola, te dolazi do sinteze antioksidansa (askorbat, glutation) i povećane sinteze proteina i mRNA [9]. Tijekom suše dolazi do opadanja aktivnosti proteina i enzima koji sudjeluju u reakcijama ovisnima o svjetlosti, kao i reakcijama Calvinovog ciklusa, što dovodi do nepravilnog funkcioniranja fotosintetskog aparata. Enzim Rubisco je jedan od osjetljivijih komponenti fotosintetskog aparata kojemu se smanjuje aktivnost pod utjecajem suše [32]. Smanjenje koncentracije enzima Rubisco javlja se već kod blage suše, a kao jedna od posljedica utjecaja suše na biljke je i pojava fotoinhibicije koja se očituje u obliku smanjenja stope fotosinteze, smanjenja prijenosa elektrona te pojačanja fosforilacije proteina [32].

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijali i opis uzgoja

U ovom istraživanju korišteni su klijanci ječma (*Hordeum vulgare* L.) kultivara Panonac. Sjeme je sijano u plastične posudice s pripremljenom smjesom zemlje i pijeska u omjeru 3:1. Klijanci su uzgajani u uzgojnoj komori na Odjelu za biologiju tijekom 10 dana u kontroliranim uvjetima: fotoperioda 16/8 sati (svjetlo/tama), temperatura 22 ± 1 °C, intenzitet svjetlosti ~70 $\mu mol_{FOTONA} m^{-2} s^{-1}$. Svih deset dana klijanci ječma bili su redovito zalijevani. Deseti dan uzgoja, dvije posudice s ječmom izložene su suši prestankom zalijevanja kroz 14 dana (TS). Nakon trinaestog dana uzgoja dvije su posude s biljkama izložene uvjetima visokog intenziteta svjetlosti (~800 $\mu mol_{FOTONA} m^{-2} s^{-1}$) u klima komori (Vötsch, Germany) u trajanju od 4 (THL4), odnosno 11 sati (THL11). Svaka skupina tretiranih biljaka imala je kontrolu: kontrola za biljke tretman sušom (KS) i kontrola za tretman visokim intenzitetom svjetlosti (KHL). Potpuno razvijeni listovi klijanaca uzorkovani su i upotrijebljeni za provođenje analiza.

3.1.2. Kemikalije

Tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela korištene su kemikalije različitih proizvođača prema dolje navedenom:

- Sorbitol, $C_6H_{14}O_6$ (Carl Roth Gmbh & Co)
- TRIS (hidroksimetil) aminometan, $C_4H_{11}NO_3$ (Sigma-Aldrich)
- Etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA, $C_{10}H_{16}N_2O_8$ (Carl Roth Gmbh & Co)
- *Coomasie brilliant* plavo (J.T. Baker)
- Natrijev karbonat, Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich)
- Goveđi serum albumin, BSA (VWR Amresco LLC)
- β-merkaptoetanol, C_2H_6OS (Sigma-Aldrich)
- Aceton, C_3H_6O (BDH Prolabo)

- Akrilamid, C_3H_5NO (Sigma-Aldrich)
- *N,N'*-metilenbiskarilamid, $C_7H_{10}N_2O_2$ (Sigma-Aldrich)
- miliQ - H_2O,
- Tetrametiletilendiamin, TEMED, $C_6H_{16}N_2$ (Acros Organics)
- Amonijev persulfat, APS, $(NH_4)_2S_2O_8$ (Acros Organics)
- Natrijev dodecil sulfat, SDS, $NaC_{12}H_{25}SO_4$ (Carl Roth Gmbh & Co)
- Bromfenol modro, $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$ (Fisher)
- Glicin, $C_2H_5NO_2$ (BDH Prolabo)
- Metanol, CH_3OH (Carlo Erba)
- Natrijev klorid, NaCl (Kemika)
- Tween 20 (Kemika)
- Nemasno mlijeko u prahu
- Luminol (Roche)
- Peroksidna otopina (Roche)
- Razvijač (Tetenal)
- Fiksator (Agfa Dentus)
- Proteinski markeri - Prestained Protein Ladder (Thermo scientific)

3.1.3. Uređaji

- Mikser
- Ph-metar (Mettler Toledo)
- Spektrofotometar (Shimadzu, UV-1900)
- Tresalica (PSU-10i, Biosan)
- Centrifuga (Z 326 K, Hermle)
- Termostatska tresalica (Eppendorf)
- Uređaj elektroforezu i prijenos proteina (Mini Protean Tetra System, BIO-RAD)
- Uređaj za napajanje elektroforeze (Power Pac Basic, BIO-RAD)
- Mikropipete promjenjivog volumena (LLG Labware, Ergo One)
- Film (Ultra Cruz Autoradiography Film, Santa Cruz)
- Autoradiografska kazeta (Orthofine Curix Screens, AGFA)
- Denzitrometar (UVITEC Imaging System, Kodak)

3.1.4. Protutijela

- Primarno protutijelo – anti-zečje protutijelo (Agrisera):
  Anti-PsbO (PsbO podjedinica OEC kompleksa)
  Anti-RbcL (velika podjedinica Rubisco)
  Anti-PsbA (podjedinica D1 proteina)
- Sekundarno protutijelo – magareći anti-zečji IgG -HRP (Santa Cruz)

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija kloroplasta iz klijanaca ječma

Za izolaciju kloroplasta, 10 g sitno izrezanih listova ječma pomiješano je u mikseru s 50 mL pufera za izolaciju kloroplasta (330 mM sorbitol, 10mM Na_2CO_3, 0,1 % BSA, 1M TRIS/HCl i 0,2M EDTA, pH = 8,4) te im je dodano 7,5 µL β-merkaptoetanola. Nakon miksanja, dobivena je suspenzija profiltrirana kroz dva sloja gaze (prethodno namočena u vodi) i Miracloth. Odvojeni filtrat potom je centrifugiran 5 min na 3000 rpm. Nakon centrifugiranja, supernatant je dekantiran, a na pelet je dodano 0,5 mL pufera za izolaciju kloroplasta. Pripremljenom filtratu peleta i pufera za izolaciju kloroplasta određena je koncentracija klorofila, kao što je opisano u narednom poglavlju (3.2.1.1.) Uzorak je pohranjen na -20 °C za daljnju analizu. Postupak je proveden jednako za sve vrste uzoraka.

3.2.1.1. Određivanje koncentracije kloroplasta

Koncentracija klorofila određena je metodom prema Arnonu (1949) [33]. Iz uzorka dobivenog prethodno opisanim postupkom uzeto je 20 µL u mikroepruvetu od 2 mL. Uzorku je dodano 2 mL 80 % acetona te je inkubiran na ledu 5 minuta. Nakon inkubacije, uzorak je centrifugiran 5 min na 12 500 rpm. Supernatantu je, na spektrofotometru, izmjerena apsorbancija pri λ = 652 nm [33]. Kao slijepa proba korišten je 80 % aceton. Sadržaj kloroplasta u uzorcima izražen je u mg chl/mL, a izračunat je prema jednadžbi (1):

$$mg\ chl\ /\ mL = \frac{A_{652} \times dil}{34{,}5} \quad (1)$$

pri čemu je razrjeđenje (dil) iznosilo 100 (20 µL uzorka u 2 mL acetona).

3.2.2. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

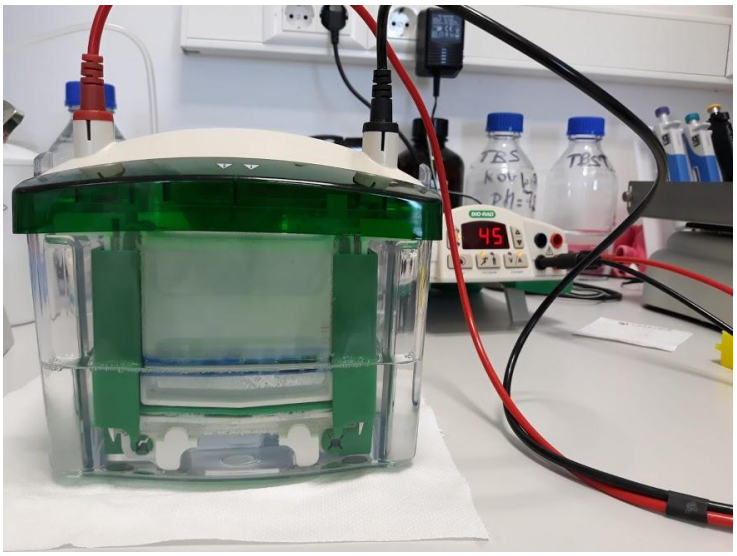
Razdvajanje proteina postignuto je pomoću elektroforeze u poliakrilamidnom gelu elektroforeze uz prisutnost natrijevog dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Diskontinuirana elektroforeza sastoji se od gela za sabijanje i gela za razdvajanje. Nakon prolaska uzorka kroz gel za sabijanje, proteini se koncentriraju u uske vrpce na granici dvaju gelova nakon čega se, prolaskom kroz gel za razdvajanje, razdvajaju na osnovi veličine [34-36].

U ovom radu su korišteni 12 % poliakrilamidni gel za razdvajanje, te 4 % gel za sabijanje pripremljeni prema tablici 1.

Tablica 1. Sastav poliakrilamidnih gelova za SDS-PAGE.

	4 % sabijajući gel	**12 % razdvajajući gel**
30 % akrilamid	0,75 mL	4 mL
dH_2O	3 mL	2,2 mL
1 M Tris pH=6,8	1,3 mL	3,8 mL
10 % SDS	50 µL	100 µL
TEMED	8 µL	5 µL
10 % APS	50 µL	50 µL

U ovom radu, na jažice nanosilo se 10 mg chl/µL uzoraka ječma za ispitivanje D1 proteina, PsbO podjedinice OEC kompleksa i velike podjedinice enzima Rubisco. Prije nanošenja na gel uzorcima je dodan 6x koncentrirani pufer za nanošenje uzorka (375 mM Tris/HCl (pH = 6,8); 9 % SDS; 50 % glicerol; 9 % β-merkaptoetanol; 0,03 % bromfenol plavo) te su zagrijavani 5 min na 96 °C u termostatskoj tresilici. Za provođenje elektroforeze korišten je elektrodni pufer sastava: 19,8 mM Tris; 151,9 mM glicin; 0,1 % SDS; pH = 8,3. Elektroforetsko razdvajanje se provodilo pri naponu od 150 V i jakosti struje od 45 mA u trajanju od 90 min (Slika 5.) [34-36].



Slika 5. Uređaj za provođenje elektroforeze (izvor: M. Musa). U posudi za elektroforezu nalazi se SDS-PAGE pufer i u njega je uronjen stalak s 2 gela. Na svakom gelu nalazi se 10 jažica s uzorcima. Prvih pet jažica sadržavale su 2 mg chl/mL klorofila, a drugih pet jažica sadržavale su 10 mg chl/mL.

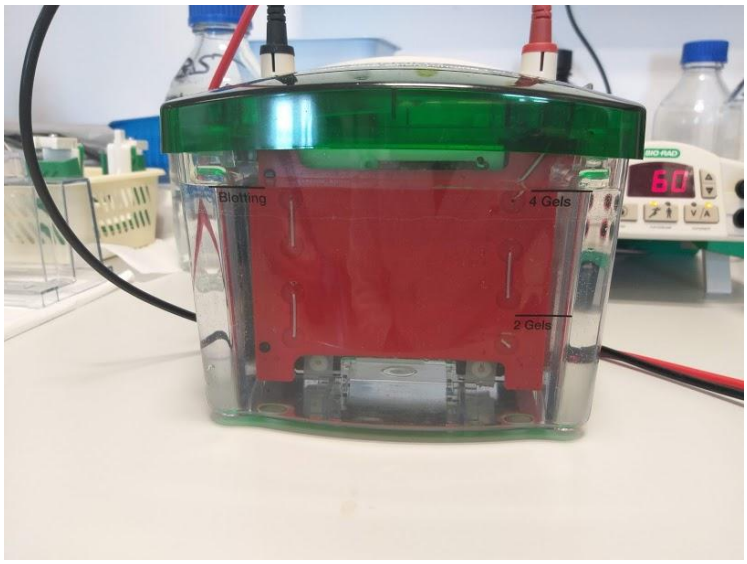
Nakon izvršene elektroforeze vršilo se bojanje gela *Coomassie brilliant* plavom bojom. Ovaj se korak u analizi primjenjuje kako bi se vizualizirale proteinske vrpce u gelu. Nakon elektroforeze, dobiveni gelovi su uronjeni sat vremena u 0,1 % otopinu *Coomassie brilliant* plavog R-250 u smjesi metanol:dH_2O:octena kiselina omjera 1:8:1 (v/v). Nakon inkubacije gel je ispran od viška boje u destiliranoj vodi, te je dodana otopina za odbojavanje (smjesa metanola:dH_2O:octene kiseline u omjeru 1:8:1 (v/v)) [37].

3.2.3. Western blot metoda

Western blot je imunokemijska metoda za detekciju proteina u uzorcima. Nakon SDS-PAGE, proteini se s gela prenose na membranu nakon čega se detektiraju specifičnim protutijelima [38].

Nakon SDS-PAGE, dobiveni gel ispran je u puferu za prijenos (25 mM Tris, 192 mM glicin, 10 % metanol, pH=8,3). U ovom radu je korištena poliviniliden difluorid (PVDF) membrana koja je prethodno inkubirana u metanolu pet minuta, te je isprana i ekvilibrirana

u puferu za prijenos [38]. Kazeta za prijenos pripremljena je prema uputama proizvođača. Transfer je izvršen u posudi za mokri transfer u koju je postavljena kazeta s gelom i membranom, te je dodan pufer za prijenos (Slika 6.). Prijenos se vršio 60 minuta pri struji jakosti od 60 mA i naponu od 40 V.



Slika 6. Uređaj za prijenos proteina na membranu (izvor: M. Musa). U posudi za mokri transfer nalazi se pufer za prijenos u kojeg je uronjen stalak sa kazetama.

3.2.3.1. Imunodetekcija D1 proteina, OEC kompleksa i enzima Rubisco na membrani

Nakon prijenosa proteina, membrana je inkubirana u TBST puferu (engl. *Tris-Buffered Saline and Tween 20*) sastava: 20 mM Tris, 500 mM NaCl i 0,1 % Tween 20; pH = 7,5; uz dodatak 5 % nemasnog mlijeka. Nakon inkubacije u mlijeku, dodano je primarno antitijelo u pripremljeno 5 % nemasno mlijeko otopljeno u TBST puferu, za detekciju sva tri proteina. Za detekciju D1 proteina koristilo se primarno protutijelo (Anti-PsbA, Agrisera) razrijeđeno u 5 % mlijeku u omjeru 1:5000. Za detekciju PsbO podjedinice OEC kompleksa koristilo se primarno protutijelo (Anti-PsbO, Agrisera) razrijeđeno u 5 % mlijeku u omjeru 1:5000. Za detekciju velike podjedinice Rubisco koristilo se primarno antitijelo (Anti-RbcL, Agrisea) otopljeno u omjeru 1:5000 (v/v) u 5 % mlijeku. Membrana je uronjena u pripremljeno primarno protutijelo i ostavljena na inkubaciju 1 sat [39].

Nakon jednog sata inkubacije membrana je ispirana od primarnog antitijela pomoću TBST pufera i to sa po 10 mL jednom u trajanju od 15 minuta i još tri puta po 5 minuta. Ovim je postupkom uklonjeno nevezano protutijelo. Nakon ispiranja, pripremljeno je sekundarno protutijelo – magareći anti-zečji IgG obilježen enzimom peroksidazom iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) razrijeđeno u omjeru 1:10000 s 5 % mlijekom pripremljenim s TBST puferom. Isto se antitijelo u istim omjerima koristilo za detekciju sva tri proteina (D1, OEC i Rubisco). Membrana je inkubirana sa sekundarnim protutijelom jedan sat na sobnoj temperaturi, nakon čega je slijedio postupak ispiranja prema prethodno opisanom postupku. Sva su ispiranja i inkubacije provedeni uz konstantno zibanje na treskalici [39].

3.2.4. Detekcija kemiluminiscencijom

Vizualizacija ispitivanih proteina postignuta je kemiluminiscentnom detekcijom čiji temelj čini reakcija oksidacije luminola u prisustvu peroksida i peroksidaze iz hrena. Luminol prelazi u produkt koji prilikom prelaska u početno stanje emitira svjetlost na mjestima vezanja sekundarnog protutijela.

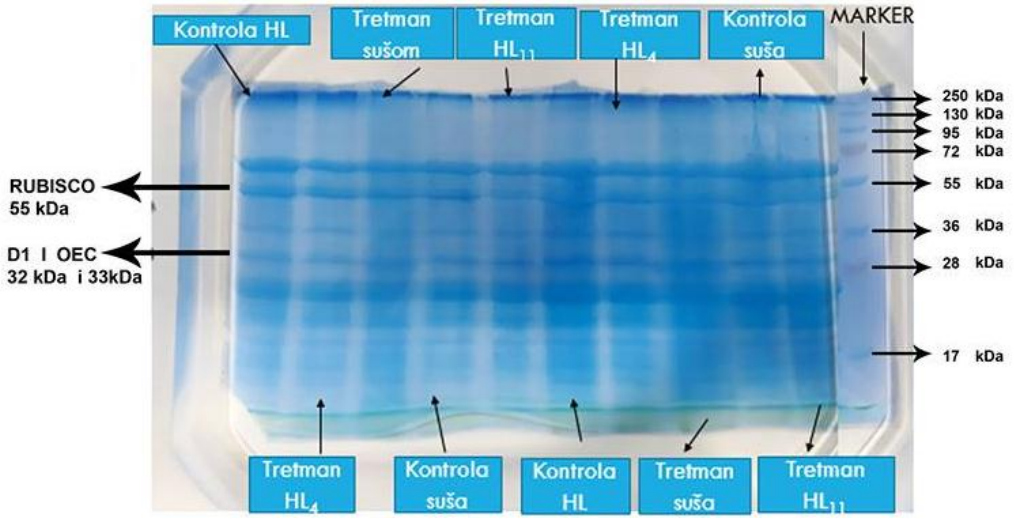
Nakon ispiranja, na membranu je dodan 1 mL smjese luminola i peroksidne otopine (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche) u omjeru 1:1 (v/v). Nakon inkubacije od pet minuta, na membranu, postavljenu u autoradiografsku kazetu je prislonjen rendgenski film. Film je eksponiran oko 60 sekundi nakon čega je razvijen i fiksiran [39]. Film je skeniran, slika filma pohranjena je u jpg-formatu i obrađena denzitometrom. Kao relativne vrijednosti obrađene su Area vrijednosti (*pix*) dobivene metodom denzitometrije.

4. Rezultati i rasprava

Utjecaj stresa izazvanog sušom i povišenim intenzitetom svjetlosti na ekspresiju fotosintetskih proteina, proteina D1 i kompleksa OEC, te enzima Rubisco, ispitivalo se na listovima klijanaca ječma (*Hordeum vulgare* L.) kultivara Panonac.

4.1. Detekcija proteinskih vrpca u gelu

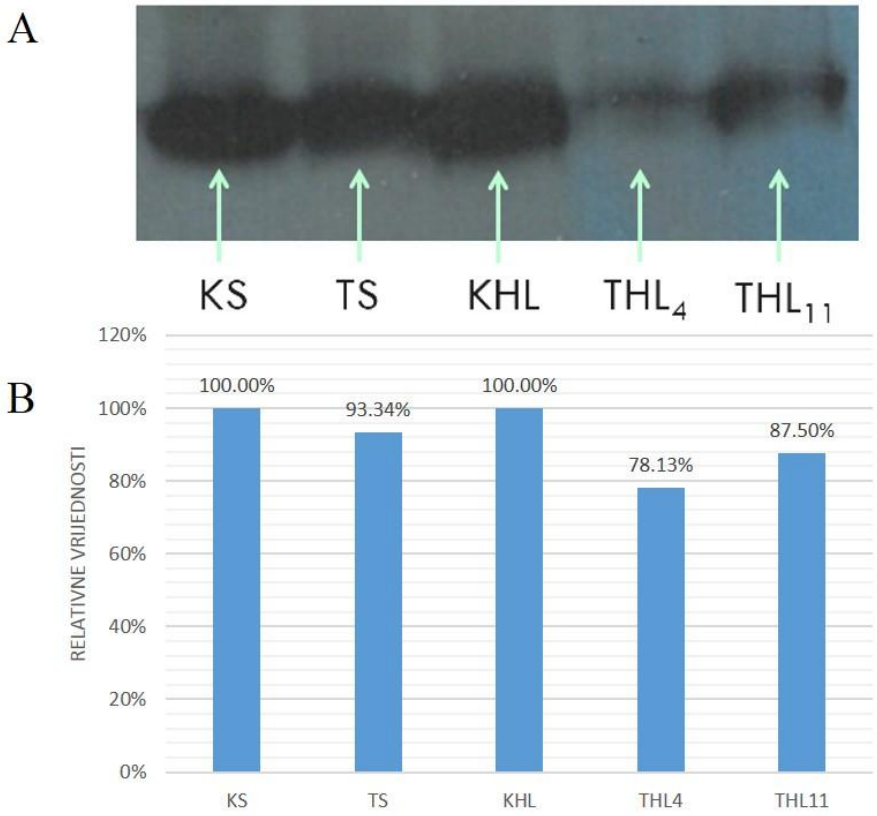
Nakon provedene denaturirajuće elektroforeze (SDS-PAGE), gel je obojan *Coomassie brilliant* plavom bojom. Na obojanom gelu uviđa se da su proteini uspješno razdvojeni. Relativna molekulska masa velike podjedinice (engl. *large subunit*, LSU) enzima Rubisco iznosi 55 kDa čija je proteinska vrpca dobro vidljiva na slici 7. Također, vidljiva je i proteinska vrpca između 28 i 36 kDa za koju je moguće pretpostaviti da se tu nalaze proteinska podjedinica D1 PSII te proteinska podjedinica PsbO OEC kompleksa, budući su molekulske mase te dvije podjedinice slične (32 kDa i 33 kDa). Iz tog je razloga na samom gelu nemoguće razlikovati ta dva proteina. Kako bi se točno odredila količina pojedinog proteina te njihova relativna količina u kontrolnim i tretiranim uzorcima, u sljedećim koracima odrađena je Western blot analiza.



Slika 7. Gel nakon bojanja *Coomassie brilliant* plavom bojom (izvor: M. Musa). Kratice: HL – visok intenzitet svjetlosti, HL_4 – tretman visokim intenzitetom svjetlosti 4 sata, HL_{11} – tretman visokim intenzitetom svjetlosti 11 sati.

4.2. Utjecaj stresa na količinu D1 proteina

Utjecaj stresa izazvanog sušom i visokim intenzitetom svjetlosti na akumulaciju D1 proteinske podjedinice PSII klijanaca ječma prikazano je na slici 8. Među proteinskim vrpcama D1 proteina uočava se jasna razlika između tretiranih i ne tretiranih uzoraka (Slika 8. A). Može se uočiti da je došlo do smanjenja ekspresije D1 podjedinice nakon tretmana stresa sušom (93,34 %) u odnosu na kontrolu (Slika 8. B).



Slika 8. Promjene u akumulaciji D1 proteinske podjedinice PSII u klijancima ječma (*Hordeum vulgare* L.) detektirane kemiluminiscentnom metodom korištenjem specifičnih protutijela (A). Vrijednosti su prikazane kao postotak promjene u odnosu na kontrole KS i KHL (100 %; B). Kratice: KS – kontrola za tretman sušom, TS – tretman sušom, KHL – kontrola za tretman visokim intenzitetom svjetosti, HL_4 – tretman visokim intenzitetom svjetlosti u trajanju od 4 sata, HL_{11} – tretman visokim intenzitetom svjetlosti u trajanju od 11 sati.

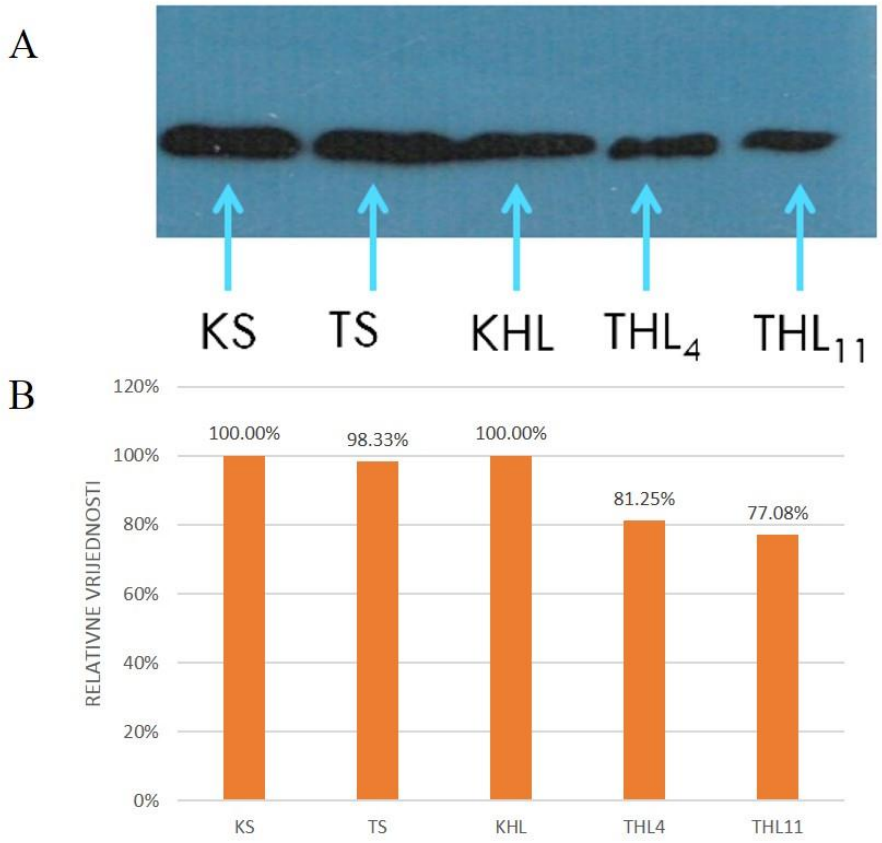
Kod listova klijanaca ječma izloženih suši došlo je do degradacije proteina D1 i smanjenja njegove ekspresije. Poznato je da suša inducira pojačanu razgradnju D1 proteina [40]. U istraživanju Ghotbi-Ravandi i suradnici (2014) prikazali su da stres uzrokovan sušom rezultira smanjenjem sadržaja D1 proteina u dva proučavana genotipa ječma, te da je došlo do ubrzanog procesa fotoinhibicije [41]. To su potvrdili i Yuan i suradnici (2008) koji su prikazali da nedovoljna količina vode uzrokuje smanjen protok elektrona kroz transportni lanac elektrona, te smanjenu koncentraciju D1 i D2 proteina [42]. Moguće je da je tretman sušom u našem slučaju doveo do pojačane degradacije D1 proteina uslijed smanjenog protoka elektrona koji je logična posljedica utjecaja suše. Ipak, točan mehanizam u našem slučaju nije moguće odrediti. Mehanizmi koje dovode do degradacije D1 proteina pod utjecajem suše još uvijek nisu u potpunosti jasni. Smatra se da unutarstanična koncentracija proteina ovisi o brzini sinteze i razgradnje D1 proteina, a prilagodba količine D1 proteina smatra se rezultatom odnosa ove dvije komponente [43]. Pod utjecajem stresa kod biljaka dolazi do povećanja ili smanjena količina proteaza [43]. U prethodno provedenim istraživanjima prikazano je da do degradacije D1 proteina može doći zbog nastanka kisikovih radikala, ali i zbog djelovanja proteaza [42, 44, 45]. Jedan od razloga smanjenja ekspresije proteina D1 povezan je s promjenama u brzini fosforilacije [47]. Fosforilacija posredno sudjeluje i u regulaciji prijenosa energije u PSII budući da prethodi razgradnji D1 proteina te sastavljanju novog reakcijskog središta PSII [40, 43, 46]. Postoji i mogućnost da sam proces fosforilacije regulira ekspresija gena koji kodiraju za proteine smještene u PSII. Ovi mehanizmi mogu djelovati međusobno sinergetski ili neovisno te na taj način utjecati na sintezu i degradaciju D1 proteina [43]. Budući da je fosforilacija uključena u proces degradacije D1 proteina, možemo pretpostaviti da je suša izazvala ubrzanu fosforilaciju i u našem eksperimentu, što može objasniti smanjenu količinu D1 proteina nakon tretmana sušom, u odnosu na kontrolu.

Utjecaj visokog intenziteta svjetlosti na klijance ječma uzrokovao je veće smanjenje ekspresije D1 proteinske podjedinice nego tretman sušom (Slika 8. A). Nakon tretmana visokim intenzitetom svjetlosti u trajanju od četiri sata došlo je do smanjenja akumulacije od gotovo 22 %, dok je nakon 11 sati tretmana došlo do smanjenja od 12,5 % (Slika 8. B). U istraživanju koje su proveli Rintamaki i suradnici (1995) pokazano je da D1 protein pokazuje ovisnost ekspresije o intenzitetu svjetlosti nekoliko puta veću nego što je slučaj kod ostalih kloroplastnih proteina [46]. Prema tome, naši rezultati su u skladu s očekivanjima utjecaja visokog intenziteta na količinu D1 proteina. Mehanizmi kojima dolazi do

degradacije D1 proteina pod utjecajem visokog intenziteta svjetlosti nije u potpunosti poznati. U svom radu, Ohad i suradnici (1990) predložili su da pod utjecajem visokog intenziteta svjetlosti dolazi do konformacijske promjene reakcijskog središta PSII, točnije akceptora elektrona Q_A i Q_B, te da ta konformacijska promjena usporava prijenos elektrona između Q_A i Q_B plastikinona, što u konačnici može rezultirati nepovratnim promjenama na D1 proteinu [48]. U istraživanju Kriger-Liszkay i suradnici (2008) prikazali su da na promjenu ekspresije D1 proteina utječe nastanak reaktivnih vrsta kisika (ROS), odnosno da povećane količine nastalih ROS-ova mogu inhibirati ponovnu sintezu D1 proteina [49]. Iako se prije smatralo da prisutnost ROS-a uzrokuje inaktivaciju reakcijskog centra PSII, u radu Murata i suradnici (2007) pokazali su da ROS djeluju inhibitorno na sintezu proteina, a posebice D1 proteina [50]. Pokazano je da je ključno mjesto oštećenja PSII uzrokovano reaktivnim kisikovim vrstama je oksidacija proteina D1, koja u slučaju intenzivnog stresa može biti ireverzibilna, čime dolazi do smanjene koncentracije D1 proteina [49]. Prema tome, moguće je da je i u našem slučaju došlo do povećane akumulacije ROS-a koji je mogao utjecati na degradaciju D1 proteina. Također, u našem istraživanju, pokazano je da je dulje izlaganje visokom intenzitetu (11 sati) svjetlosti dovelo do manju razgradnje nego nakon 4 sata. Jedan od mogućih razloga takvog rezultata degradacije D1 proteina objašnjen je radu [51] gdje je predloženo da oštećenje D1 proteina započinje kada antene za skupljanje svjetlosti (LHCII) apsorbiraju povećane količine fotona koji se onda ne mogu učinkovito utrošiti u fotokemijskim reakcijama i za fiksaciju CO_2 već se biljka mora riješiti suviška energije. U tom slučaju LHCII kompleksi otpuštaju višak energije u obliku termalne energije ne-fotokemijskim gašenjem, kako bi se smanjilo oštećenje. Nakon prevođenja energije, slijedi fosforilacija i defosforilacija LHCII komponenti, popraćena degradacijom oštećenih kopija D1 proteina i *de novo* sintezu D1 proteina [51]. Prema tome, moguće je da su prilikom duljeg izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti klijanci ječma pojačali mehanizme zaštite u obliku otpuštanja suviška energije, te intenzivirali popravak oštećenih proteina D1.

4.3. Utjecaj stresa na količinu OEC kompleksa

Utjecaj stresa izazvanog sušom i visokim intenzitetom svjetlosti na akumulaciju proteinske podjedinice PsbO OEC kompleksa u klijanacima ječma prikazano je na slici 9. Među proteinskim vrpcama D1 proteina uočava se razlika između tretiranih i ne tretiranih uzoraka izloženih visokom intenzitetu svjetlosti (Slika 9. A). Denzitometrija je pokazala da je došlo do neznatnog smanjenja ekspresije PsbO podjedinice nakon tretmana stresa sušom od samo 1.67 % u odnosu na kontrolu (Slika 9. B).



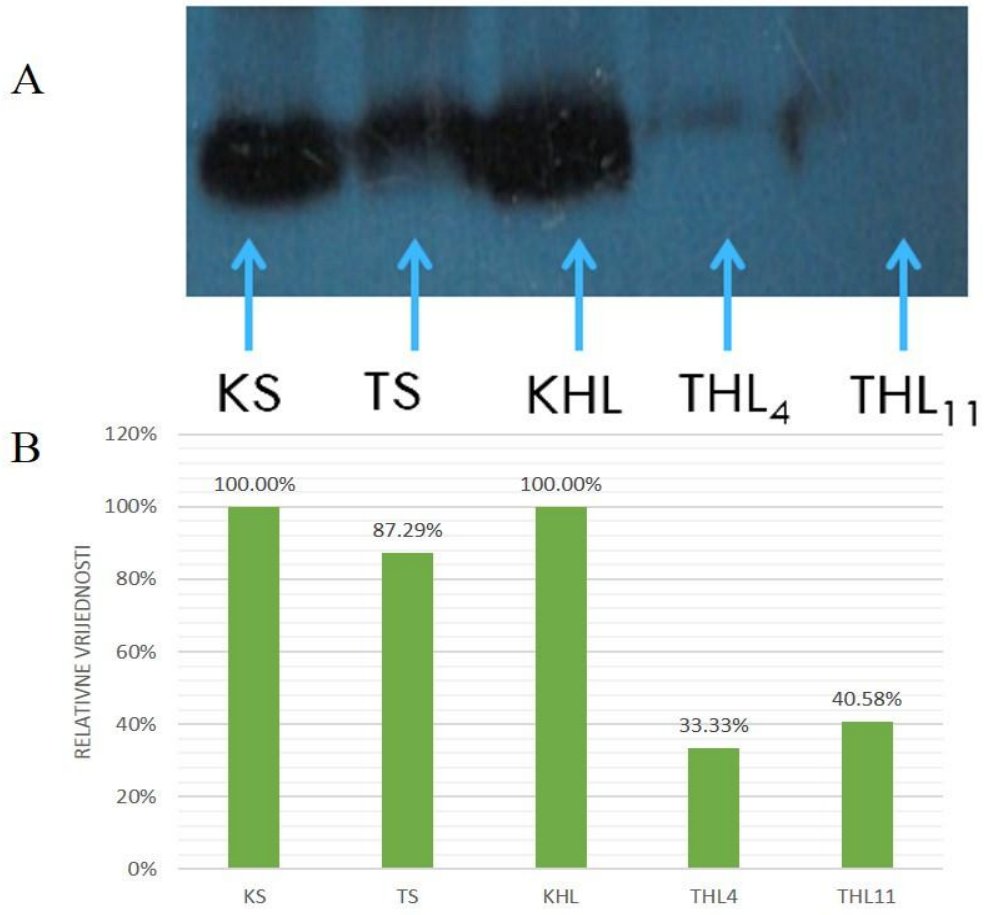
Slika 9. Promjene u akumulaciji proteinske podjedinice PsbO OEC kompleksa u klijancima ječma (*Hordeum vulgare* L.) detektirane kemiluminiscentnom metodom korištenjem specifičnih protutijela (A). Vrijednosti su prikazane kao postotak promjene u odnosu na kontrole KS i KHL (100 %; B). Kratice: KS – kontrola za tretman sušom, TS – tretman sušom, KHL – kontrola za tretman visokim intenzitetom svjetosti, HL_4 – tretman visokim intenzitetom svjetlosti u trajanju od 4 sata, HL_{11} – tretman visokim intenzitetom svjetlosti u trajanju od 11 sati.

U svom istraživanju, Vítámvás i suradnici (2015) pokazali su da je nakon blage suše došlo do povećanje ekspresije PsbO podjedinice kompleksa OEC dok je nakon dužeg izlaganja ječma suši došlo je do smanjenja ekspresije PsbO podjedinice [52]. Također u radu Wendelboe-Nelson i Morrison (2012) predstavili su rezultate u kojima je nakon tretmana sušom na osjetljivom kultivaru ječma došlo do smanjenja ekspresije PsbO podjedinice dok je na otpornijem kultivaru došlo do povećane ekspresije PsbO podjedinice [53]. S obzirom na to da u našem slučaju nije došlo do smanjene ekspresije ove PsbO podjedinice, možemo pretpostaviti da se u našem slučaju radi o kultivaru koji je otporan na sušu.

Nakon izlaganja klijanaca visokom intenzitetu svjetlosti, došlo je do smanjenja ekspresije u donosu na kontrolu. Očekivano, nakon četiri sata izlaganja količina proteinske podjedinice PsbO se smanjila za 18,75 %, a nakon 11 sati za 22,92 % u odnosu na kontrolu. Ipak, to smanjenje nije bilo intenzivno kao u slučaju D1 podjedinice PSII i podjedinice LSU enzima Rubisco. Poznato je da je stabilnost OEC kompleksa povezana s aktivacijom cikličkog transporta elektrona koji se aktivira prilikom izlaganja biljke visokom intenzitetu svjetlosti. Naime, u uvjetima kada količina apsorbirane svjetlosti premaši kapacitet biljke za fotokemijske reakcije, aktivira se ciklički transport elektrona a istovremeno se stvara jači ΔpH gradijent kroz tilakoidnu membrani što stabilizira aktivnost OEC-a [54]. Huang i suradnici (2015) pokazali su da to vrijedi za vrste koje su sposobne prilagoditi se ekstremnim promjenama u okolišu [55]. Prema tome, mogli bismo zaključiti da je i u našem slučaju došlo do aktivacije alternativnog puta prijenosa elektrona u transportni lanac i stabilizacije OEC kompleksa.

4.4. Utjecaj stresa na količinu enzima Rubisco

Utjecaj stresa izazvanog sušom i visokim intenzitetom svjetlosti na akumulaciju velike podjedinice (LSU) enzima Rubisco u klijanacima ječma prikazano je na slici 10. Među proteinskim vrpcama LSU podjedinice enzima Ruboisco uočava se jasna razlika između tretiranih i ne tretiranih uzoraka (Slika 10. A). Također, može se uočiti da je došlo do smanjenja ekspresije LSU podjedinice nakon tretmana stresa sušom (87,29 %) u odnosu na kontrolu (Slika 10. B).



Slika 10. Promjene u akumulaciji proteinske velike podjedinice (LSU) enzima Rubisco u klijancima ječma (*Hordeum vulgare* L.) detektirane kemiluminiscentnom metodom korištenjem specifičnih protutijela (A). Vrijednosti su prikazane kao postotak promjene u odnosu na kontrole KS i KHL (100 %; B). Kratice: KS – kontrola za tretman sušom, TS – tretman sušom, KHL – kontrola za tretman visokim intenzitetom svjetosti, HL_4– tretman visokim intenzitetom svjetlosti u trajanju od 4 sata, HL_{11} – tretman visokim intenzitetom svjetlosti u trajanju od 11 sati.

Poznato je da biljke koje su izložene suši mogu ranije pokazati znakove senescencije [56]. Senescentni listovi sporije asimiliraju CO_2 od zdravih listova, što uzrokuje bržu razgradnju proteina strome u odnosu na proteine smještene u tilakoidnim membranama. Prema tome, senescencija može dovesti do ubrzane razgradnje enzima Rubisco što u konačnici može rezultirati smanjenjem fotosintetske aktivnosti [56]. U slučaju da je količina enzima Rubisco smanjena, smanjuje se i fiksacija CO_2, a time i ukupna fotosintetska aktivnost [57]. Nadalje, suša narušava ravnotežu između stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta i količine antioksidansa. U uvjetima suše dolazi do povećanog nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta, te se inducira oksidativni stres. Istovremeno, biljke zatvaraju svoje puči što dovodi do ograničene fiksacije CO_2, a aktivnost enzima Rubisco se smanjuje [58]. Inmaculada i suradnici (2006) pokazali su u svom radu da je nakon sedam dana tretmana sušom došlo do smanjenja ekspresije velike podjedinice Rubisca [59]. Slično tome, Demirevska i suradnici (2009) pokazali su da je došlo do povećanog nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta i oksidativnog stresa nakon sedam dana tretmana sušom što je uzrokovalo smanjenje ekspresije velike podjedinice Rubisca [60]. Naši rezultati su u skladu s navedenim istraživanjima iako u našem eksperimentu nije došlo intenzivne degradacije podjedinice LSU enzima Rubisco. Prema tome, ovaj rezultat dodatno potvrđuje pretpostavku da je izabrani kultivar ječma otporan na sušu.

S druge strane, utjecaj visokog intenziteta svjetlosti doveo je do intenzivnije degradacije LSU podjedinice enzima Rubisco. Nakon četiri sata tretmana, došlo je do smanjenja akumulacije za 66,67 %, a nakon 11 sati tretmana za 59,15 % (Slika 10. B). Hrstka i suradnici (2007) pokazali su da promjene u okolišnim uvjetima, a posebice u intenzitetu svjetlosti i temperaturi mogu dovesti do smanjenja razine akumulacije enzima Rubisco budući da dolazi do zatvaranja puči, smanjenja koncentracije CO_2 i inhibicije fotosintetskih reakcija, a kao posljedica dolazi do promjene u količini specifičnih šećera koji mogu utjecati na akumulaciju enzima Rubisco [61]. Također, Desimone i suradnici (1996) su pokazali da visoki intenzitet svjetlosti dovodi do povećane akumulacije reaktivnih kisikovih vrsta koji ubrzavaju razgradnju enzima Rubisco [62]. Slično tome, istraživanje koje su proveli Irihimovitch i Shapira (2000) također ukazuje na to da povećana količina reaktivnih kisikovih vrsta dovodi do ubrzane razgradnje enzima Rubisco [63]. Rezultati našeg istraživanja također ukazuju da postoji mogućnost pojačanog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta nakon izlaganja klijanaca ječma visokom intenzitetu svjetlosti. U takvim uvjetima moguće je da je došlo do pojačane razgradnje LSU podjedinice enzima Rubisco. Prema

tome, moguće je da su prilikom duljeg izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti klijanci ječma pojačali mehanizme zaštite u obliku otpuštanja suviška energije te intenzivirali popravak oštećenih fotosintetskih proteina [51].

5. Zaključak

Nakon provedenog istraživanja utjecaja dva tipa stresa, suše i visokog intenziteta na ekspresiju fotosintetskih proteina, i to D1 podjedinice PSII, podjedinice PsbO OEC kompleksa te velike podjedinice (LSU) enzima Rubisco može se zaključiti sljedeće:

1. Stres izazvan sušom doveo je do neznatnog smanjenja sva tri ispitivana fotosintetska proteina, što ukazuje da izabran kultivar ječma nije pokazao osjetljivost na sušu.
2. Tretman visokim intenzitetom svjetlosti izazvao je snažniju degradaciju sva tri ispitivana fotosintetska proteina u odnosu na tretman sušom.
3. Odgovor klijanaca ječma na dva tipa stresa upućuje na to da je izabrana sorta ječma pokazala manju osjetljivost na sušu u odnosu na visoki intenzitet svjetlosti.
4. Kratkotrajno izlaganje visokom intenzitetu svjetlosti (4 sata) je izazvalo snažniju degradaciju D1 podjedinice PSII i LSU podjedinice enzima Rubisco nego dugotrajniji stres (11h) što sugerira na mogućnost aktivacije zaštitnih mehanizama biljke kao odgovor na dugotrajniji stres.

6. Literatura

[1] S. Erling Tjus, B. Lindberg Møller, H. Vibe Scheller, Plant. Physiol. **116** (1998), 755-764.

[2] M.M. Cox, D.L. Nelson, Lehninger Principles of Biochemistry, W.H. Freeman and Company, New York, 2013.

[3] B. Pevalek-Kozlina, Fizologija bilja, Profil, Zagreb, 2003.

[4] M.P. Johnson, Essays Biochem. **60** (2016), 255-273.

[5] T. Blake,V. Blake, J. Bowman, H. Abdel-Haleem, Barley feed uses and quality improvement, Blackwell Publishing, Oxford, 2011.

[6] M.A. Ahanger, N. Singh Tomar, M. Tittal, S. Argal, R.M. Agarwal, Physiol. Mol. Biol. Pla. **23** (2017), 731-744.

[7] P.R. Burkholder, Bot. Rev. **1** (1936), 1-52.

[8] J. Barber, B. Andersson, Trends Biochem. Sci. **17** (1992), 61-66.

[9] V. Vukadinović, I. Jug, B. Đurđević, Ekofiziologija bilja, Gradska tiskara, Osijek, 2014

[10] M.P. Johnson, Photosynthesis. Essays Biochem. **60** (2016), 255-273.

[11] L. Stryer, J.M. Berg, J.L. Tymoczko, Biochemistry, W.H. Freeman, New York, 2002.

[12] G.M. Cooper, R.E. Hausmann, Stanica: Molekularni pristup, Medicinska Naklada, Zagreb, 2010.

[13]http://legacy.hopkinsville.kctcs.edu/instructors/JasonArnold/VLI/Module%202/m2cellstructure/m2cellstructure6.html (5. 9. 2019.).

[14] H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, Molecular Cell Biology, W. H. Freeman, New York, 2000.

[15] L.X. Shi, W.P. Schroder , Biochim. Biophys. Acta **1608** (2004) 75-96.

[16] J. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, Biokemija, W.H. Freeman, New York, 2007.

[17] B. Hankamer, J. Barber, E.J. Boekema, Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Bio. **48** (1997), 641-471.

[18] L. Vogt, D.J. Vinyard, S. Khan, G.W. Brudvig, Curr. Opin, Chem. Biol. **25** (2015),152-158.

[19] T. Schmidt, M. Schaechter, Topics in Ecological and Environmental Microbiology, Academic Press, Cambridge, 2011.

[20] B. Thangaraj, C.M. Ryan, P. Souda, K. Krause, K.F. Faull, A.P.M. Weber, P. Fromme, J.P. Whitelegge, Curr. Treat. Options. Neurol. **2** (2000), 1-4

[21] R. Spreitzer, M. Salvucci, Annu Rev Plant Biol. **53** (2002), 449-475.

[22] J.R. Ellis, Trends Biochem Sci. **4** (1979),241-244.

[23] I. Andersson, J Exp Bot. **59** (2008), 1555-1568.

[24] H.W. Koyro , P. Ahmad , N. Geissler, Abiotic Stress Responses in Plants, Springer, New York, 2012.

[25] M.A. Gururani, J.Ventatesh, L.S.P. Tran, Mol. Plant **8** (2015), 1304-1320.

[26] R. Mittler, Trends Plant Sci. **7** (2002), 405-410.

[27] K.H. Lichtenthaler, S.Burkart, Plant Physiol. **25**(1999), 3-16.

[28] T. Roach, A. Krieger-Liszakay, Curr. Protein Pept. Sci. **15** (2014), 351-362.

[29] M.A. Gururani, J. Ventatesh, L.S.P. Tran, Mol. plant **8** (2015), 1304-1320.

[30] I. Vass, E.M. Aro, Photoinhibition of photosynthetic electron transport, Primary Processes of Photosynthesis: Basic Prinicples and Apparatus, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2008.

[31] S. Baily, E. Thompson, P.J. Nixon, P. Horton, C.W. Mullineauw, C. Robinson, N.H. Mann, J. Biol. Chem. **277** (2002), 2006-2011.

[32] J. Flexas, H. Medrano, Ann. Bot. **88** (2002), 183-189.

[33] D.I. Arnon, Plant Physiol. **24** (1948), 1-15.

[34] U.K. Laemmli, Cah. Rev. The. **227** (1970), 680-685.

[35] J.M. Walker, The protein protocols handbook, Humana Press, Totowa, 2002.

[36] R. Westermeier, Electrophoresis in Practice, Wiley-VCH, Weinhein, 2001.

[37] M.P. Deutscher, Protein Purification, Academic Press, New York, 1990.

[38] A.A. Ristov, Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2007.

[39] D.M. Bollag, M.D. Rozycki, S.J. Edelstein, Protein Methods, Wiley-Liss, Inc, New York, 1996.

[40] M.T. Giardi, A. Cona, B. Geiken,T. Kucera, J. Masojidek, A.K. Matto, Planta **199** (1996), 118-125.

[41] A.A. Ghotbi-Ravandi , M. Shahbazi , M. Shariati, P. Mulo, J. Agro. Crop. Sci. **200** (2014), 403-415.

[42] S. Yuan, N.H. Zhang, W.J. Liu, M.B. Wang, Physiol. Plantarum **125** (2005), 464-473.

[43] M.T. Giardi, Planta **190** (1993), 107-113.

[44] A.K. Mattoo, J.B. Marder, M. Edelman, Cell **56** (1989), 241-246.

[45] J. Barber, B. Andersson, Sci. **17** (1992), 61-66.

[46] E. Rintamaki, R. Kettunen, E. Tyystjarvi, E.M. Aro, Planta **93** (1995), 191-195.

[47] E. Bracht, A. Trebst, Z. Naturforsch **49** (1994), 439-446.

[48] I. Ohad, N. Adir, H. Koike, D.J. Kyle, Y. Inoue, J. Biol. Chem. **265** (1990), 1972-1979.

[49] A. Kriger-Liszkay, C. Fufezan, A. Trebst, Photosynth. Res. **98** (2008), 551-564.

[50] N. Murata, S. Takahashi, Y. Nishiyama, S.I. Allakhverdiev, Biochim. Biophy. Acta **1767** (2007), 414-421.

[51] S. Sasi, J. Venkatesh, R.F. Daneshi, M.A. Gururani, Planta **7** (2018), 1-15.

[52] P. Vítamvás, M.O. Urban, Z. Škodáček, K. Kosova, I. Pitelková, J. Vítámvás, J. Renaut, I.T. Prášil, Front. Plant. Sci. **6** (2015), 1-18

[53] C. Wendelboe-Nelson, P.C. Morris, Proteomics **12** (2012), 3374-3385.

[54] S. Takahashi, S.E. Milward, D.Y. Fan, W.S. Chow, M.R. Badger, Plant Physiol. **149** (2009), 1560-1567.

[55] W. Huang, S.B. Zhang, H. Hu, J. Plant. Res. **128** (2015), 307-315.

[56] S. Gan, R.M. Amasino, Plant Physiol. **113** (1997), 313-319.

[57] P.D.R. van Heerden, J.W. Swanepoel, G.H.J. Krüger, Environ. Exp. Bot. **61** (2007), 124-136.

[58] M. Farooq, A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita, S. Basra, Agron. Sustain. Dev. **29** (2009), 153-188.

[59] J. Inmaculada, R.M. Navarro, C. Lenz, D. Ariza, J. Jorrin, Proteomics **6** (2006), 207-214.

[60] K. Demirevska, D. Zasheva, R. Dimitrov, L. Simova-Stoilova, M. Stamenova, U. Feller, Acta Physiol. Plant **31** (2009), 1129-1138.

[61] M. Hrstka, O. Urban, E. Petriu, L. Babak, Photosynthetica **45** (2007), 334-339.

[62] M. Desimone, A. Henke, E. Wagner, Plant Physiol. **111** (1996), 789-796.

[63] V. Rihimovitch, M. Shapira, J. Biol. Chem. **275** (2000), 16289-16295.

7. Dodaci

7.1. Popis kratica

APS – amonijev peroksodisulfat

ATP – adenozin trifosfat

BSA – goveđi serum albumin

EDTA – etildiamintetraoctena kiselina

Feredoksin – Fd

K_{HL} – kontrolna skupina za tretman visokim intenzitetom

KS – kontrolna skupina za tretman sušom

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

OEC – kisik razvijajuće središte

PC – plastocijanin

PSI – fotosustav I

PSII – fotosustav II

PVDF – poliviniliden fluorid

Q_A – plastikinon Q_A

Q_B – plastikinon Q_B

ROS – reaktivne kisikove vrste

SDS – natrijev dodecil sulfat

SDS PAGE – natrijev dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza

TBS – Tris borat EDTA

TBST – Tris borat EDTA + Tween

TEMED – *N,N,N′,N′*-tetrametiletilendiamin

THL_{11} – tretman visokim intenzitetom svjetlosti 11 sati

THL_4 – tretman visokim intenzitetom svjetlosti 4 sata

TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol

TS – tretman sušom

7.2. Životopis

Osobni podaci	
Ime i prezime	**Matea Musa**
Datum i mjesto rođenja	24. 1. 1996., Koprivnica
Adresa	Starogradska 19, Starigrad, 48000 Koprivnica
e-mail	matea_kc12@hotmail.com
Obrazovanje	
2017. - 2019.	**Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer** Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek
2014. - 2017.	**Preddiplomski sveučilišni studij kemije** Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek Završni rad: Mehanizmi stjecanja otpornosti na antibiotike kod bakterija mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik
2010. - 2014.	Farmaceutski tehničar Srednja škola Koprivnica Trg Slobode 7, 48000 Koprivnica
Radno iskustvo	
rujan 2019. - danas	Studentski posao- administrativni poslovi u uredu Mauthner d.o.o. Đelekovečka cesta 25, 48000 Koprivnica
lipanj 2018. - kolovoz 2018.	Studentski posao- administrativni poslovi u uredu Ameropa Žitni Terminal d.o.o. Vranjički put 16, Vranjic, 21210 Solin
lipanj 2014. – rujan 2014.	Studentski posao prodavača, GLOBALNA HRANA d.o.o., Rudeška cesta 87/a, 10000 Zagreb

Osobne vještine	
Materinski jezik	hrvatski
Računalne vještine	MS Office sustav, služenje internetom i mailom
Vozačka dozvola	B kategorija
Aktivnosti	
2008. – 2019.	Član dobrovoljnog vatrogasnog društva Koprivnica