Utjecaj nanočestica i iona srebra na proteom duhana (Nicotiana tabacum L.)

Jarnević, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:933869

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Martina Jarnević

UTJECAJ NANOČESTICA I IONA SREBRA NA PROTEOM DUHANA (*Nicotiana tabacum* L.)

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biljnu proteomiku Zavoda za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Biljane Balen, te u Laboratoriju Centra za proteomiku i spektrometriju masa Instituta Ruđer Bošković, voditelja doc. dr. sc. Maria Cindrića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre edukacije biologije i kemije.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Biljani Balen na trudu, savjetima, pomoći i strpljenju iskazanom tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem doc. dr. sc. Petri Peharec Štefanić na stručnoj pomoći oko provođenja velikog dijela istraživanja i pisanja rada. Hvala joj na strpljenju, povjerenju i beskrajnoj susretljivosti u svakom pogledu.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Mariu Cindriću na pomoći oko analize proteina spektrometrijom masa.

Zahvaljujem osoblju Laboratorija za biljnu proteomiku i Centra za proteomiku i spektrometriju masa zbog poticajne radne atmosfere i pomoći.

Zahvaljujem mojim dragim kolegicama i kolegama bez kojih studentski dani ne bi prošli tako zabavno i lako, čak i onda kad je zaista bilo teško.

I na kraju, veliko hvala mom bratu i mojim roditeljima koji su mi omogućili da upišem fakultet i bili uz mene i u dobrim i lošim trenucima. Hvala im na strpljenju, razumijevanju i potpori.

Martina Jarnević

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

UTJECAJ NANOČESTICA I IONA SREBRA NA PROTEOM DUHANA (*Nicotiana tabacum* L.)

Martina Jarnević
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nanočestice srebra (AgNP) se zbog svojih protubakterijskih i protugljivičnih svojstava sve više koriste u proizvodima široke potrošnje kao i u raznim industrijskim granama. Međutim, zbog svoje velike površine u odnosu na volumen, AgNP su vrlo reaktivne i podložne otpuštanju iona srebra (Ag^+), što potencijalno povećava njihovu toksičnost. Dosada je zabilježen fito-, cito- i genotoksični učinak AgNP na različite biljne i animalne organizme. U ovom diplomskom radu istražen je utjecaj nanočestica srebra stabiliziranih citratom (AgNP-citrat) i srebrovog nitrata ($AgNO_3$), primijenjenih u 100 μM koncentraciji, na ukupne topive proteine klijanaca i odraslih biljaka duhana (*Nicotiana tabacum* L.). Dvodimenzionalnom elektroforezom analizirane su promjene u proteinskim profilima cjelovitih klijanaca te korijena i lista odraslih biljaka nakon navedenih tretmana, a spektrometrijom masa identificirani su proteini različitog stupnja ekspresije. Ustanovljeno je kako su AgNP i $AgNO_3$ izazvali slične promjene u proteinskoj slici određenog tkiva, a razina ekspresije pokazala se ovisnom o razvojnom stadiju duhana. Većina proteina s promijenjenom ekspresijom sudjeluje u metabolizmu ugljikohidrata, fotosintezi, odgovoru na stres i odgovoru na oksidacijski stres. Rezultati su pokazali da AgNP i $AgNO_3$ uglavnom izazivaju povećanu ekspresiju proteina u klijancima duhana, a smanjenu ekspresiju u korijenu i listovima odraslih biljaka. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se klijanci duhana bolje nose sa stresom izazvanim tretmanima sa 100 μM AgNP i $AgNO_3$ u odnosu na odrasle biljke.

(108 stranica, 15 slika, 13 tablica, 109 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: nanočestice srebra, srebrov nitrat, *Nicotiana tabacum*, 2-D elektroforeza, spektrometrija masa

Voditelj: Dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.

Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.

Dr. sc. Vesna Petrović-Peroković, izv. prof.

Rad prihvaćen: 06.07.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

THE IMPACT OF SILVER NANOPARTICLES AND IONS ON TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.) PROTEOME

Martina Jarnević
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Due to its antimicrobial and antifungal properties, silver nanoparticles (AgNPs) are increasingly applied in consumer products as well as in various industries. However, because of their large surface area to volume ratio, AgNPs are highly reactive and subjected to silver ions (Ag^+) release, which potentially increases their toxicity. So far, phyto-, cyto-and genotoxic effects of AgNPs to the various plant and animal organisms were observed. In this graduation thesis, the impact of 100 μM citrate-stabilized AgNPs and silver nitrate ($AgNO_3$) on expression of total soluble proteins of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seedlings and adult plants was examined. Two-dimensional gel electrophoresis was applied to analyse changes in protein profiles of whole tobacco seedlings as well as roots and leaves of adult plants, while mass spectrometry was used to identify proteins with different expression levels. It was revealed that AgNP and $AgNO_3$ induced similar changes in the protein profiles of the certain tissue, while the expression level was found to be dependent on the developmental stage. Most of the proteins with altered expression are involved in the metabolism of carbohydrates, photosynthesis, response to stress and response to oxidative stress. The results showed that AgNP and $AgNO_3$ mostly induced up-regulation of identified proteins in tobacco seedlings, while the protein expression was mainly reduced in the roots and leaves of adult plants. From the obtained results it can be concluded that the tobacco seedlings cope better with the stress induced with 100 μM AgNP and $AgNO_3$ treatments compared to adult plants.

(108 pages, 15 figures, 13 tables, 109 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: silver nanoparticles, silver nitrate, *Nicotiana tabacum*, 2-D electrophoresis, mass spectrometry

Supervisor: Dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.

Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. prof.

Thesis accepted: 06.07.2017.

POPIS KRATICA I SIMBOLA

AA	akrilamid
AgNP	nanočestice srebra
APS	amonijev peroksodisulfat
Bis	N,N'-metilen-bis-akrilamid
bPEI	razgranati polietilenimin
BSA	albumin goveđeg seruma
CBB	*Coomassie Brilliant Blue*
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonijev]-2-hidroksi-1-propansulfonat
CHCA	α-cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina
CTAB	cetiltrimetilamonijev bromid
2D-PAGE	dvodimenzionalna poliakrilamid gel elektroforeza
deH_2O	destilirana voda
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
EtOH	etanol
IEF	izoelektrično fokusiranje
MALDI	matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem
MS	spektometrija masa
MS/MS	tandemska spektometrija masa
PAGE	poliakrilamid gel elektroforeza
PEG	polietilen glikol
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PVP	polivinilpirolidon
reH_2O	redestilirana voda
RP-S	kolona za tekućinsku kromatografiju obrnutih faza
SDS	natrijev dodecil sulfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
TFA	trifluoroctena kiselina
TOF	vrijeme leta
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
UV/VIS	ultraljubičasto zračenje /vidljiva svjetlost

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Nanomaterijali i njihova primjena 1

1.1.1. Nanočestice srebra 2

1.2. Duhan (*Nicotiana tabacum*) kao modelni organizam 3

1.3. Proteomika 4

1.3.1. Dvodimenzionalna gel elektroforeza 4

1.3.2. Spektrometrija masa 5

1.3.3. Proteomika u istraživanjima toksičnosti nanočestica u biljaka 6

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 7

3. MATERIJALI I METODE 8

3.1. Materijal 8

3.1.1. Nanočestice srebra 8

3.1.2. Biljni materijal 8

3.1.2.1. Klijanci 8

3.1.2.2. Odrasle biljke 8

3.2. Metode 10

3.2.1. Fenolna ekstrakcija ukupnih topivih proteina 10

3.2.2. Određivanje koncentracije proteina modificiranom metodom po Bradfordu 12

3.2.3. Rehidracija imobilina 13

3.2.4. Dvodimenzionalna elektroforeza 14

3.2.4.1. Prva dimenzija – Izoelektrično fokusiranje 14

3.2.4.2. Druga dimenzija – SDS-PAGE 14

3.2.5. Vizualizacija razdvojenih proteina bojom *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) 16

3.2.6. Analiza gelova računalnim softverom 17

3.2.7. Spektrometrija masa MALDI-TOF/TOF 17

3.2.7.1. Priprema gelova za digestiju proteina 17

3.2.7.2. Digestija u gelu 17

3.2.7.3. Ekstrakcija iz gela 18
3.2.7.4. Pročišćavanje peptida 19
3.2.7.5. Analiza peptida spektrometrom masa 20
3.2.8. Identifikacija proteina pretraživanjem baza podataka NCBInr i UniProt 21
4. REZULTATI 23
4.1. Identifikacija i kategorizacija proteina 23
4.1.1. Klijanci 23
4.1.2. Korijen 38
4.1.3. List 48
5. RASPRAVA 61
5.1. Promjene u proteomskoj slici klijanaca duhana 61
5.1.1. Proteini vezani uz fotosintezu 61
5.1.2. Proteini vezani uz metabolizam ugljikohidrata 63
5.1.3.Proteini vezani uz stres (abiotički i biotički) 64
5.1.4. Proteini vezani uz odgovor na oksidacijski stres 67
5.1.5. Proteini vezani uz sintezu proteina 68
5.2. Promjene u proteomskoj slici korijena duhana 69
5.2.1. Proteini vezani uz metabolizam ugljikohidrata 69
5.2.2. Proteini vezani uz odgovor na stres (abiotički i biotički) 70
5.2.3. Proteini vezani uz odgovor na oksidacijski stres 71
5.2.4. Proteini vezani uz metabolizam aminokiselina 72
5.3. Promjene u proteomskoj slici lista duhana 73
5.3.1. Proteini vezani uz fotosintezu 73
5.3.2. Proteini vezani uz metabolizam ugljikohidrata 74
5.3.3. Proteini vezani uz odgovor na stres (abiotički i biotički) 75
5.3.4. Proteini vezani uz odgovor na oksidacijski stres 76
5.3.5. Proteini vezani uz sintezu ATP-a 76
6. ZAKLJUČAK 79
7. POPIS LITERATURE 80
8. ŽIVOTOPIS 92

UVOD

1. UVOD

1.1. Nanomaterijali i njihova primjena

Nanotehnologija se bavi projektiranjem funkcionalnih sustava na molekularnoj razini i jedna je od najbrže rastućih grana industrije. Nanomaterijali ili nanostrukture oblici su materije koji sadržavaju čestice kojima je barem jedna dimenzija u području od 0,1 do 100 nm. Nanostrukture razlikujemo po broju dimenzija na nanoskali: jednodimenzijske nanostrukturirane površine koje imaju debljinu površine objekta između 0,1 i 100 nm; dvodimenzijske nanocjevčice promjera između 0,1 i 100 nm; te trodimenzijske kuglaste nanočestice, u kojima je svaka prostorna dimenzija između 0,1 i 100 nm (Ivanković, 2011).

Zbog svojih jedinstvenih kemijskih, električnih, optičkih i fizikalnih svojstva, nanočestice su našle primjenu u raznim područjima znanosti i tehnologije, posebice u polju biomedicine i prirodnih znanosti (mikrokirurška tehnologija, unos lijekova, genska terapija, DNA probe, kontrastni agensi, fluorescentne oznake), agronomije (nanokapsulirani herbicidi i pesticidi), optike i elektronike. Nanočestice su našle primjenu i u mnogim proizvodima široke potrošnje uključujući elektroničke komponente, kozmetiku (kreme za sunčanje), prehrambene proizvode (nanokapsulirani vitamini i antioksidansi), proizvode za čišćenje, filtere za cigarete, antimikrobna vlakna i sprejeve kao i tekstil otporan na mrlje i samočisteće staklo (Savolainen i sur., 2010).

Uz golemi tržišni potencijal nanočestica, one sa sobom donose i nove rizike. Budući da su se zbog velike aktivne površine po volumenu nanočestice pokazale biološki aktivnije od čestica mikrometarskih dimenzija istog kemijskog sastava, posljednjih godina raste broj istraživanja vezanih za štetne učinke njihove primjene na žive organizme, a od posebnog je interesa utjecaj na biljke. Biljke, kao primarni proizvođači, glavni su sudionici ekološkog sustava i imaju važnu ulogu u transportu i bioakumulaciji esencijalnih, ali i toksičnih tvari u hranidbene lance. Rezultati dosadašnjih istraživanja učinaka nanočestica na biljke ukazuju na različite pozitivne i negativne utjecaje. Primjerice, nanočestice titanijeva dioksida pospješuju fotosintezu i metabolizam dušika te tako poboljšavaju rast špinata (Zheng i sur., 2005), dok rezultati istraživanja provedenih na luku (*Allium cepa*) pokazuju da nanočestice srebra izazivaju oksidacijski

stres, citotoksičnost te neke kromosomske aberacije u stanicama korjenčića (Kumari i sur., 2009; Cvjetko i sur., 2017).

1.1.1. Nanočestice srebra

Srebro je metal čija su baktericidna svojstva poznavali i u medicinske svrhe koristili još Feničani, Egipćani i Grci. Pojavom nanotehnologije, uporaba srebra u medicinske svrhe doživljava novi procvat, a nanočestice srebra (AgNP) našle su primjenu i u mnogim drugim područjima ljudske djelatnosti. Baktericidno djelovanje AgNP ukazuje da su bioaktivne tj. da neizbježno reagiraju sa živim organizmima (Haramina, 2008). Na ovaj način AgNP doprinose liječenju infekcija uzrokovanih bakterijama koje su razvile rezistenciju prema uobičajenim antibioticima, što je od velike važnosti s obzirom na to da otpornost bakterija na konvencionalne antibiotike prijeti ljudskom zdravlju diljem svijeta. No, AgNP nisu toksične samo za patogene bakterije, već bi potencijalno mogle negativno utjecati i na korisne bakterije. Osim toga, otkriveno je i da su AgNP otrovne za stanice sisavaca uzgajane u uvjetima *in vitro*. Primjerice, toksično djeluju na staničnu liniju BRL3A jetre štakora (Hussain i sur., 2005), što dovodi u pitanje sigurnost upotrebe lijekova na bazi AgNP.

Biljke kao neizostavna komponenta svakog ekosustava imaju ključnu ulogu u prijenosu nanočestica. Međutim, fitotoksičnost AgNP nedovoljno je istražena. Dosadašnji rezultati istraživanja utjecaja AgNP na biljke pokazali su moguću toksičnost. Primjerice, prema Ma i sur. (2010) AgNP različitih veličina (20-80 nm), kojima su tretirani klijanci uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*), uzrokovale su usporeni rast čak i pri vrlo niskoj koncentraciji (340 g L^{-1}), a povećanjem koncentracije AgNP došlo je do smanjenja biomase i duljine korijena. Nanočestice srebra značajno su utjecale na rast, sadržaj hranjivih tvari i konformaciju makromolekula u klijancima rotkvice (*Raphanus sativus*) (Zuverza-Mena i sur., 2016).

Nanočestice srebra mogu biti stabilizirane različitim organskim omotačima. Najčešće korišteni organski omotači za AgNP su citrat, koji nanočestici daje negativni naboj i polivinilpirolidon (PVP), unutar kojeg nanočestica ostaje gotovo neutralna tj. ima mali negativni naboj. Osim citrata i PVP-a, za stabiliziranje nanočestica srebra koriste se i cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB), polietilen glikol (PEG) i razgranati polietilenimin (eng. *branched PolyEthylenImine*, bPEI); CTAB i bPEI daju jaki pozitivni naboj, dok su

nanočestice stabilizirane omotačem PEG neutralne (bez naboja). Navedeni organski omotači omogućavaju učinkovito raspršenje i stabilnost nanočestica (Silva, 2011). U svom diplomskom radu koristila sam AgNP stabilizirane negativno nabijenim citratnim ionima.

1.2. Duhan (*Nicotiana tabacum*) kao modelni organizam

Duhan (*Nicotiana tabacum* L.) je jednogodišnja, zeljasta biljka iz porodice pomoćnica (Solanaceae) podrijetlom iz južne Amerike. Biljka duhana može narasti od 0,5 m do 3 metra. Ima vretenast, dobro razvijen korijen koji prodire u tlo na dubinu od 1 m do 2 metra i širi se do 80 cm. Stabljika je uspravna, cilindrična, podijeljena na nodije i internodije, prekrivena dlačicama. Zeleni listovi se razvijaju na nodijima, a prekriveni su žljezdanim dlačicama u čijim se glavicama nalaze smole i eterična ulja važna za kvalitetu i aromu duhana. Cvjetovi duhana se nalaze u terminalnim nakupinama, dvospolni su, a boja im može varirati od bijele preko ružičaste do crvene. Plod je okrugli ili ovalni smeđi tobolac u kojemu se nalazi više tisuća sjemenki.

Ekonomski najznačajnija upotreba duhana je u preradi osušenih listova za pušenje i žvakanje. Uživa se zbog specifičnog i kompleksnog fiziološkog djelovanja sastojaka listova na središnji živčani sustav. Od kemijskih sastojaka lista najvažniji je alkaloid nikotin kojeg biljka proizvodi u svom korijenu, a zatim odlaže u listove. Osim nikotina, duhanski dim sadržava još 4000 kemijskih sastojaka, od kojih je oko 400 otrovnih i 43 kancerogenih. Dokazano je da pušenje cigareta, ali i izloženost duhanskom dimu tzv. pasivno pušenje, znatno pridonosi obolijevanju i prijevremenom umiranju od niza bolesti.

Duhan je jedna od najbolje istraženih biljaka te služi kao modelni organizam u eksperimentima zbog ekonomske dostupnosti, ali i zbog kratkog generacijskog vremena te lagane transformacije. Koristi se za istraživanja u biljnoj staničnoj biologiji, kulturi tkiva te molekularnoj biologiji i genetičkom inženjerstvu (Flick i sur., 1984; Brar i sur., 1994). *Nicotiana tabacum* prikladna je vrsta i za istraživanje proteina budući da je genom duhana sekvenciran (Sierro i sur., 2014), što dodatno povećava svestranu upotrebu duhana kao modelnog organizma.

1.3. Proteomika

Proteom je ukupan broj proteina stanice, organa ili organizma te ukazuje na funkciju i modifikacije proteina te kako proteini interferiraju s drugim molekulama. Za razliku od genoma, proteom nije statičan već se mijenja obzirom na vrstu stanice, organa ili organizma, stupanj razvoja kao i na utjecaj okoliša.

Proučavanjem struktura, funkcija, interakcija i ostalih faktora unutar proteoma bavi se proteomika koja objedinjuje veliki broj raznih metoda kojima se proteini razdvajaju iz smjese proteina, te zatim identificiraju i karakteriziraju. Prvi korak u analizi jest razdvajanje željenih proteina iz smjese za što se koriste jednodimenzionalna i dvodimenzionalna elektroforeza u poliakrilamidnom gelu. Za kvalitativnu kao i kvantitativnu analizu proteomskog ekspresijskog profila koriste se mnogi sofisticirani instrumenti te posebni računalni programi. U svrhu identifikacije proteina koriste se metode mikrosekvenciranja i spektrometrije masa. Dobiveni podaci pohranjuju se u posebnim bazama podataka, a međusobne veze proteina, sekvence DNA te podatci o mapiranju obrađuju se bioinformatičkim alatima.

Proteomika ima više specijaliziranih grana pa tako uz analitičku proteomiku, koja se bavi kemijskom analizom proteina, postoji još ekspresijska proteomika (proteomika razlikovnih prikaza), stanično mapiranje (katalogiziranje protein-protein interakcija), karakterizacija proteina i njihovih posttranslacijskih modifikacija, profiliranje eksprimiranih proteina uz pomoć kvantitativnih metoda te identifikacija proteomskih kompleksa.

1.3.1. Dvodimenzionalna gel elektroforeza

Dvodimenzionalna gel elektroforeza (eng. *Two Dimensional – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, 2D-PAGE) metoda je istraživanja proteina koju su prvi samostalno uveli O'Farell i Klose (1975), a uključuje dvije jednodimenzionalne elektroforetske tehnike koje razdvajaju proteine na osnovu različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Najpopularnija metoda dvodimenzionalne elektroforeze je kombinacija izoelektričnog fokusiranja (eng. *IsoElectric Focusing*, IEF) kao prve dimenzije i natrijev dodecil sulfat – poliakrilamid gel elektroforeze (eng. *Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) kao druge dimenzije. Tim tehnikama proteini se razdvajaju

na osnovu naboja (IEF) i mase tj. veličine (SDS-PAGE). 2D-PAGE pogodna je za analizu proteinske ekspresije u cijelim stanicama te u tkivima (Balen i sur., 2011).

1.3.2. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (eng. *Mass Spectrometry*, MS) je instrumentalna analitička metoda kojom se određuje relativna masa i količina iona nastalih ionizacijom atoma i molekula. Koristi se za određivanje strukture organskih tvari, za određivanje slijeda aminokiselina, peptida, oligopeptida, proteina i analizu posttranslacijskih modifikacija (Horvatić i Cindrić, 2008). Prvi spektrometar masa konstruirao je Aston Francis William (1919) i njime pokazao da su gotovo svi kemijski elementi mješavine dvaju ili više izotopa.

Osnovni dijelovi spektrometra masa su ionizator, analizator i detektor. Ovisno o izvedbi instrumenta, uzorak u čvrstom ili tekućem agregatnom stanju uvodi se u izvor ionizacije u kojemu molekule prelaze u plinovito stanje i ioniziraju. Nastali ioni u analizatoru masa razdvajaju se na temelju omjera mase i naboja u vremenu ili prostoru. Nakon detekcije, kojom se bilježi broj iona te omjer mase i naboja iona koji dolaze s detektora, signal se računalno obrađuje što rezultira nastankom spektra masa (Horvatić, 2014).

Spektrometrija masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (eng. *ElectroSpray Ionization*, ESI) ili matricom pomognutu ionizaciju uz desorpciju laserskim zračenjem (eng. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI) postala je važna tehnika u analizi bioloških makromolekula (Galić i Cindrić, 2008). Izuzetna osobina tehnike MALDI je pulsna priroda lasera čije stvaranje "paketa" iona predstavlja odvojene događaje visoke osjetljivosti. MALDI se najčešće povezuje s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta (eng. *Time of Flight*, TOF) i analizatorom kvadrupol-TOF (eng. *Quadrupole-Time of Flight*, Q-TOF) (Galić i Cindrić, 2008). Tehnika MALDI-TOF može biti unaprijeđena dodatkom još jednog analizatora masa, pa se tako ta tehnika naziva MALDI-TOF/TOF, a po brzini rada, točnosti mjerenih masa, kvaliteti MS/MS spektara i osjetljivosti instrumenata uveliko nadmašuje performanse klasičnog instrumenta MALDI-TOF (Galić i Cindrić, 2008). Spektometrija masa postala je nezamjenjiv alat koji se primjenjuje u područjima prirodnih znanosti (kemije, biologije, fizike) kao i u biomedicini, biotehnologiji, ekologiji i farmaceutici.

1.3.3. Proteomika u istraživanjima toksičnosti nanočestica u biljaka

Iako je primjena proteomike doprinijela povećanju spoznaja o odgovoru biljaka na stres izazvan teškim metalima (Hossein i Komatsu, 2013; Cvjetko i sur., 2014), o proteinima koji su uključeni u odgovor na stres uzrokovan nanočesticama metala zna se vrlo malo. Istraživanja utjecaja AgNP na proteom većinom su provedena u animalnim i bakterijskim stanicama (Lok i sur., 2006; Gao i sur., 2011; Jeon i sur., 2011), dok je u svega nekoliko istraživanja koja podastiru rezultate učinaka AgNP u biljnim stanicama analiziran proteom. Primjerice, istraživanje proteoma biljke *Triticum aestivum* L. cv. Blasco, koja je tretirana s AgNP, ukazuje na to da biljka u svom odgovoru na stres pokazuje različitu ekspresiju proteina uključenih u primarni metabolizam, što sugerira da metabolička adaptacija na stres igra važnu ulogu u prilagodbi biljke na stres izazvan nanočesticama srebra (Vannini i sur., 2014). Nadalje, uspoređivanje profila proteoma vrste *Eruca sativa*, koje su bile izložene tretmanima s AgNP ili $AgNO_3$, pokazalo je smanjenje ekspresije proteina nakon tretmana s AgNP u odnosu na $AgNO_3$ (Vannini i sur., 2013). Istim je istraživanjem evidentirano relativno malo preklapanje među proteinima koji su eksprimirani nakon ta dva tipa tretmana, što ukazuje na to da AgNP i ioni Ag^+ (iz $AgNO_3$) uzrokuju različite promjene u proteomu biljke.

Osnovni problem u izvođenju proteomskih istraživanja predstavlja činjenica da mnoge biljne vrste nemaju sekvenciran genom, a proteomski profili nepotpuni su i za modelne biljke. Unatoč nedostacima, postignut je značajan napredak na ovom području, a nova otkrića o odgovoru biljaka na stres izazvan nanočesticama metala mogla bi se koristiti za pronalaženje osjetljivih i selektivnih biomarkera toksičnosti koji bi se mogli koristiti u biomonitoringu okoliša.

CILJ ISTRAŽIVANJA

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

S obzirom na to da se nanočestice srebra danas koriste u mnogim područjima ljudske djelatnosti, postavlja se pitanje sigurnosti njihove upotrebe za ekološke sustave i zdravlje ljudi. Usprkos uporabi AgNP u različitim proizvodima, njihov je ekološki i toksikološki profil prilično neistraženo područje, a njihov utjecaj na biljne vrste tek se nedavno počeo intenzivnije istraživati (Vannini i sur., 2014; Zuverza-Mena i sur., 2016; Cvjetko i sur., 2017). Ovo je istraživanje usmjereno na učinak nanočestica i iona srebra na proteom duhana, a cilj je bio:

1. utvrditi uzrokuje li ispitivana koncentracija AgNP i $AgNO_3$ kvalitativne i/ili kvantitativne promjene u ekspresiji proteina u klijancima duhana i identificirati različito eksprimirane proteine.

2. utvrditi uzrokuje li ispitivana koncentracija AgNP i $AgNO_3$ kvalitativne i/ili kvantitativne promjene u ekspresiji proteina u korijenju odraslih biljaka duhana i identificirati različito eksprimirane proteine.

3. utvrditi uzrokuje li ispitivana koncentracija AgNP i $AgNO_3$ kvalitativne i/ili kvantitativne promjene u ekspresiji proteina u listovima odraslih biljaka duhana i identificirati različito eksprimirane proteine.

4. usporediti utjecaj ispitanih koncentracija AgNP i $AgNO_3$ na proteome duhana različitih razvojnih stadija.

MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Nanočestice srebra

Nanočestice srebra redukcijskim su postupkom pripravljene iz srebrova nitrata ($AgNO_3$), a zatim su stabilizirane pomoću organskog omotača negativno nabijenog citratnog iona. Tako su dobivene negativno nabijene nanočestica srebra (AgNP-citrat). Laboratorijski sintetizirane nanočestice pripremila je dr. sc. Ivana Vinković Vrček s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada.

3.1.2. Biljni materijal

Kao biljni materijal za istraživanje koristila sam duhan (*Nicotiana tabacum*) u dva razvojna stadija (klijanci i odrasle biljke).

3.1.2.1. Klijanci

Za uzgoj klijanaca sjemenke duhana sterilizirala sam inkubacijom u 50%-tnoj (v/v) otopini NaOCl na mješalici u trajanju od 15 minuta. Nakon toga sam ih nekoliko puta isprala autoklaviranom deH_2O te mikropipetom nasadila na sterilizirane krute hranjive podloge MS (Murashige i Skoog, 1962) (Tablica 1), s dodatkom 100 μM AgNP ili 100 μM $AgNO_3$. Kontrolni materijali rasli su na podlozi MS bez dodatka AgNP ili $AgNO_3$. Sjemenke su isklijavale i rasle 30 dana, nakon čega sam tkivo uzorkovala (Biba, 2016) i liofilizirala.

3.1.2.2. Odrasle biljke

Za uzgoj odraslih biljaka, sjemenke duhana sterilizirala sam inkubacijom u 50%-tnoj (v/v) otopini NaOCl na mješalici u trajanju od 15 minuta. Nakon toga sam ih nekoliko puta isprala autoklaviranom deH_2O te pipetom nasadila na sterilne krute hranjive podloge MS. Sjemenke su rasle 60 dana, nakon čega sam izrasle biljke stavila na tretman u svježe pripremljene tekuće podloge MS koje su sadržavale 100 μM AgNP ili 100 μM $AgNO_3$. Kontrolni materijali rasli su na podlozi MS bez dodatka AgNP ili $AgNO_3$. Nakon 7 dana uzorkovala sam tkivo korijena i lista (Bajan, 2017) te ga liofilizirala.

Tablica 1. Sastav podloge po Murashige i Skoog-u (1962) (pH-vrijednost 5,6)

MAKROELEMENTI	mg L^{-1}	mM
KNO_3	1900	18,80
NH_4NO_3	1650	20,60
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	440	2,99
KH_2PO_4	170	1,25
$MgSO4 \times 7\ H_2O$	370	11,50
MIKROELEMENTI	mg L^{-1}	µM
H_3BO_3	6,3	100,0
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	0,025	0,1
KI	0,83	5,0
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	0,25	1,0
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,025	0,1
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	22,3	100,0
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	8,6	29,9
ŽELJEZO	mg L^{-1}	µM
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	27,8	100,0
Na_2EDTA	37,3	100,0
ORGANSKI DODACI	mg L^{-1}	µM
m-inozitol	50	277,5
Tiamin-HCl	0,05	0,15
Saharoza	1500	11,3
MES-kalijeva sol	500	3,77

3.2. Metode

3.2.1. Fenolna ekstrakcija ukupnih topivih proteina

Izvagala sam po 0,15 g liofiliziranog tkiva duhana za svaku repliku (4 replike za tkivo tretirano s AgNP, 4 replike za tkivo tretirano s $AgNO_3$, 4 replike kontrolnog tkiva; ukupno dvanaest uzoraka). Zatim sam pripremila ekstrakcijski pufer (Tablica 2) i pohranila ga u stiropornu posudu s ledom. Za svaku repliku uzoraka načinila sam postupak fenolne ekstrakcije ukupnih topivih proteina prema Pavoković i sur. (2012). Liofilizirano tkivo sam homogenirala tučkom u tarioniku dok nisam dobila potpuno sitan prah. Homogenatu sam dodavala do 6 mL ekstrakcijskog pufera u obrocima po 1 mL, a nakon svakog dodavanja promiješala sam smjesu tučkom. Nakon predzadnjeg dodavanja pufera, jednoličnu smjesu iz tarionika prebacila sam u plastične Falcon tube od 15 mL. Tarionik sam isprala s 1 mL ekstrakcijskog pufera, što sam također prebacila u tubu. Sadržaj tuba promiješala sam na vorteksu (IKA, Njemačka) te ih postavila horizontalno u staklenu posudu s ledom, dodatno prekrila ledom i zatim ih inkubirala 10 min na miješalici. Nakon inkubacije, homogenatu u tubi dodala sam do 6 mL fenola (ispuštajući zrak iz pipete tijekom prolaska kroz zaštitni sloj). Smjesu homogenata i fenola promiješala sam na vorteksu, stavila tube horizontalno u staklenu posudu bez leda i potom 10 min inkubirala na miješalici na sobnoj temperaturi. Homogenat s fenolom sam zatim centrifugirala (centrifuga Sigma 3K30, Sigma, Njemačka) 15 min na 3900 *g* pri +4 °C. Nakon centrifugiranja, fenolnu fazu supernatanta prebacila sam pipetom od 1 mL u čistu Falcon tubu od 15 mL i dodala do 5 mL ekstrakcijskog pufera. Promiješala sam sadržaj na vorteksu, tube ponovno horizontalno položila u posudu s ledom te inkubirala 3 min na miješalici. Sadržaj sam centrifugirala 15 min na 3900 *g* pri +4 °C. Supernatant sam prebacila u čistu Falcon tubu od 15 mL i dodala 4 volumena ledeno hladne precipitacijske otopine (0,1 M amonijev acetat u metanolu, čuva se na -20 °C). Sadržaj sam promiješala invertiranjem tube u ruci i stavila na precipitaciju preko noći na -20 °C.

Tablica 2. Sastav pufera za ekstrakciju ukupnih topivih proteina. (Fenilmetilsulfonil fluorid (eng. *PhenylMethylSulfonyl Fluoride*, PMSF) otopljen u 96% EtOH i 2% β-merkaptoetanol dodaju se neposredno prije upotrebe. Tijekom ekstrakcije proteina, pufer se čuva na ledu.)

Tris	6,057 g
EDTA (kompleksal)	1,8612 g
Saharoza	23,961 g
KCl	0,7456 g
PMSF	0,0174 g
96% EtOH	2 mL
2% β-merkaptoetanol	2 mL
reH_2O	do 100 mL

Istaložene proteine sedimentirala sam centrifugiranjem na 3900 *g* pri +4 °C tijekom 15 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant sam bacila, a talog sam ispirala tri puta s 3 mL ledeno hladne precipitacijske otopine i konačno s 3 mL ledeno hladnog acetona. Tijekom ispiranja taloga, tube sam cijelo vrijeme držala na ledu. Nakon svakog ispiranja, uzorke sam centrifugirala 10 min na 3900 *g* pri +4 °C. Budući da u nastavcima za pipetu ostaje mala količina proteina, iste sam koristila za sva četiri ispiranja taloga. Nakon zadnjeg centrifugiranja, supernatant sam izlila, a tube položila horizontalno u digestor na sobnoj temperaturi kako bi se u njima osušio preostali talog. Na osušeni talog dodala sam 500 µL pufera za izoelektrično fokusiranje (IEF pufer) s dodatkom ditiotreitola (DTT) i amfolita (Tablica 3). Talog sam otapala uvlačenjem i ispuštanjem sadržaja pipetom od 1 mL, pazeći pritom da se ne zapjeni. Nastavke za pipetu sam ostavila u tubama, koje sam stavila u stiroporni stalak i ostavila na tresilici 10 min. Nakon toga sam još jednom ponovila cijeli postupak otapanja taloga. Otopljene taloge sam prebacila u Eppendorf tubice od 1,5 mL i centrifugirala (centrifuga Eppendorf

5417R, Eppendorf, SAD) 5 minuta na 20800 *g* pri sobnoj temperaturi. Supernatant sam prebacila u čiste Eppendorf tubice od 1,5 mL, a talog sam bacila.

Tablica 3. Sastav pufera za izoelektrično fokusiranje (IEF pufer). (Pufer se otpipetiran u alikvote od 1 mL čuva na -20 °C. Ditiotreitol (DTT, 2 mg mL^{-1}) i amfoliti (5,2 µL mL^{-1}) dodaju se u pufer neposredno prije upotrebe.)

Urea	5,4 g
CHAPS	0,2 g
reH_2O	do 10 mL
DTT	20 mg
Amfoliti	52 µL

3.2.2. Određivanje koncentracije proteina modificiranom metodom po Bradfordu

U proteinskim ekstraktima dobivenim fenolnom ekstrakcijom odredila sam koncentraciju proteina modificiranom metodom po Bradfordu (Faurobert i sur., 2007) koja se od originalne (Bradford, 1976) razlikuje po dodatku 0,1 M HCl koja zakiseljuje otopinu, što pospješuje vezanje proteina za boju *Comassie Brilliant Blue* (CBB), koja je sastavni dio Bradford otopine, usprkos interferenciji nekih komponenti IEF pufera (Hamaček, 2016).

Za svaki uzorak u čistim tubama od 15 mL pomiješala sam 10 µL 0,1 M HCl, 20 µL uzorka, 70 µL reH_2O i 3,5 mL Bradford radne otopine (2,85% (v/v) etanol; 5,28% (v/v) H_3PO_4; 6% (v/v) Bradford matična otopina) (Tablica 4). U slijepoj probi zamijenila sam uzorak s IEF puferom. Smjesu sam kratko promiješala na vorteksu i ostavila 10 min u mraku (jer je Bradford otopina osjetljiva na svjetlo), nakon čega sam uzorke prebacila u kivetu. Koncentraciju proteina koja je proporcionalna intenzitetu plavog obojenja nastalog pri reakciji proteina u uzorku s Bradford

reagensom, mjerila sam spektrofotometrom (ATI/Unicam UV/Vis UV4-100, Cambridge, UK) pri valnoj duljini od 595 nm. Očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina albumina goveđeg seruma (eng. *Bovine Serum Albumin*, BSA) poznatih koncentracija pripremljenih u IEF puferu, utvrdila sam koncentraciju proteina u svakom od uzoraka.

Tablica 4. Sastav matične i radne Bradford otopine

BRADFORD MATIČNA OTOPINA, 300 mL		**BRADFORD RADNA OTOPINA, 500 mL**	
96% EtOH	100 mL	96% EtOH	15 mL
88% H_3PO_4	200 mL	88% H_3PO_4	30 mL
CBB G-250	350 mg	Bradford matična otopina	30 mL
		deH_2O	do 500 mL

3.2.3. Rehidracija imobilina

U uzorke, u kojima sam izmjerila koncentraciju proteina dodala sam 5 µL bromfenol plavila, promiješala ih na vorteksu i centrifugirala 5 min na 20800 *g* na sobnoj temperaturi. U posudu za rehidraciju prebacila sam po 400 µL svakog uzorka u pojedinačne jažice i u njih stavila imobiline (eng. *Immobiline DryStrip*) duljine 13 cm s nelinearnim gradijentnim gelom (pH 3-10) okrenutim prema dnu posude pazeći da nema mjehurića zraka. Imobiline uronjene u otopine proteinskih uzoraka prelila sam s 900 µL mineralnog ulja (Immobiline DryStrip Cover Fluid, GE Healthcare, SAD) kako bih spriječila isušivanje gelova i ostavila da se rehidriraju preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi.

3.2.4. Dvodimenzionalna elektroforeza

3.2.4.1. Prva dimenzija – Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje (IEF) je metoda razdvajanja proteina u prisutnosti kontinuiranog gradijenta pH uslijed kojeg proteini, zbog bazičnih i kiselih aminokiselinskih ostataka koji nose naboje, migriraju dok ne dosegnu zonu s vrijednošću pH koja odgovara njihovoj izoelektričnoj točki (Balen i sur., 2011).

Nakon rehidracije, imobiline sam ocijedila na papirnatom ručniku i prebacila na keramičku podlogu uređaja za izoelektrično fokusiranje (model Ettan IPGphor 3, GE, Healthcare, SAD) vodeći računa o dužini i orijentaciji imobilina. Elektrodne papiriće, prethodno navlažene sa 150 µL deH_2O, postavila sam uzdužno pri oba vrha gela tako da je polovica papirića bila na gelu, a pola izvan gela. Zatim sam postavila elektrode, pazeći pritom da ista sjedne i na gel i na elektrodni papirić. Cijelu površinu podloge prelila sam sa 110 mL mineralnog ulja i pokrenula uređaj na Program 3. Kad je izoelektrično fokusiranje završilo ocijedila sam imobiline i spremila ih na -80 °C.

3.2.4.2. Druga dimenzija – SDS-PAGE

Nakon izoelektričnog fokusiranja, proteini su razdvojeni prema njihovoj masi pomoću 12%-tne vertikalne SDS-PAG elektroforeze u uređaju *PROTEAN II xi Cell* (Bio-rad, SAD). Staklene ploče i razmaknice debljine 1 mm sam prije izlijevanja gelova dobro očistila 96%-tnim etanolom, a nakon što sam ih učvrstila, ulijevanjem deH_2O provjerila sam da li sustav curi. Odlila sam vodu, a gelove za drugu dimenziju pripremila sam prema Tablici 5. Otopinu gela izlila sam između dviju staklenih ploča razdvojenih razmaknicama malo ispod ruba manje staklene ploče. Nepolimeriziranu smjesu nadsvodila sam bojom (20%-tni etanol uz dodatak bromfenol plavila) budući da kontakt sa zrakom spriječava polimerizaciju. Staklene ploče s gelovima ostavila sam da se polimeriziraju na sobnoj temperaturi, a polimerizirane gelove spremila sam na +4 °C preko noći.

Tablica 5. Sastav otopine za pripremu gela za SDS-PAGE (12%-tni, 60 mL)

reH_2O	21 mL
1.5 M Tris/HCl, pH 8,8	15 mL
AA/Bis	24 mL
vakuum (2-3 min)	
10% SDS	600 µL
10% APS	300 µL
TEMED	25 µL

Sljedeći dan imobiline sam izvadila s -80 °C i ostavila ih nekoliko min na sobnoj temperaturi. Svaku imobilinsku traku inkubirala sam na tresilici 15 min u 2,5 mL ekvilibracijskog pufera (Tablica 6) s dodatkom 100 mg DTT. Imobiline sam kratko ocijedila na filtar papiru te 15 min inkubirala na tresilici u puferu za ekvilibraciju s dodatkom 125 mg jodacetamida (IAA). Svrha ekvilibracije jest omogućiti proteinima u gelu da u potpunosti reagiraju sa SDS-om da bi pravilno migrirali u drugoj dimenziji dok DTT i IAA sprječavaju renaturaciju proteina (Balen i sur., 2011). Prije postavljanja imobilina na gel, ekvilibrirane imobiline uronila sam u 1 × SDS elektrodni pufer (Tablica 7) i položila ih između dviju staklenih ploča iznad gela. Spatulom namočenom u elektrodni pufer namjestila sam svaki imobilin uz gel da izbjegnem mjehuriće zraka. Na komadić Whatmann filtar papira nanijela sam 3 µL biljega molekulskih masa i postavila ga na gel uz (-) kraj trake. Zatim sam sve zalila 0,5%-tnom otopinom agaroze u elektrodnom puferu s dodatkom bromfenol plavila i pričekala da se stvrdne. Staklene ploče pričvrstila sam na elektrodni nosač te prenijela u kadicu s elektrodnim puferom. Pokrenula sam elektroforezu koja se prvih 45 min odvijala pri naponu od 100 V, a zatim pri naponu od 220 V do kraja elektroforeze (oko 3 h).

Tablica 6. Sastav pufera za ekvilibraciju (50 mL)

Urea	18 g
1.5 M Tris/HCl pH 8,8	1,66 mL
20% SDS	5 mL
reH_2O	do 50 mL

Tablica 7. Sastav 10 × koncentriranog elektrodnog pufera za SDS-PAGE (1 L)

Tris	30 g
Glicin	144 g
SDS	10 g
6 M HCl	do pH 8,3
deH_2O	do 1 L

3.2.5. Vizualizacija razdvojenih proteina bojom *Coomassie Brilliant Blue* (CBB)

Nakon elektroforeze, 2-D gelove prebacila sam u otopinu za bojenje (0,1% (v/v) CBB R-250, 45% (v/v) metanol, 10% (v/v) ledena octena kiselina). Boja CBB R-250 se u kiseloj sredini veže elektrostatskim silama za proteinske amino skupine nakon čega su i proteini i gel plavi (Balen i sur., 2011). Gelove sam inkubirala 90 min na tresilici pri sobnoj temperaturi. Da bi se vizualizirale proteinske mrlje, gelove sam potom stavila na odbojavanje u otopinu za odbojavanje (10% (v/v) octena kiselina, 10% (v/v) etanol), na tresilicu pri sobnoj temperaturi. Otopinu za odbojavanje mijenjala sam nekoliko puta sve dok se pozadina gela nije obezbojila. Nakon toga sam gelove skenirala (skener model

Epson Perfection, V700 Photo, SAD), stavila u otopinu 10%-tne octene kiseline te pohranila na +4 °C do daljnje analize.

3.2.6. Analiza gelova računalnim softverom

Kvantitativni i kvalitativni razlikovni prikaz ekspresijskih profila proteina kontrolnog i tretiranih uzoraka dobila sam analizom gelova računalnim programom Image Master 2D Platinum (GE Healthcare, SAD). Za daljnju analizu spektrometrijom masa na instrumentu MALDI-TOF/TOF odabrala sam proteinske mrlje koje su po postotku volumena bile barem 1,5 × više ili manje izražene u tretmanima u odnosu na kontrolu.

3.2.7. Spektrometrija masa MALDI-TOF/TOF

Spektrometrijom masa moguće je analizirati intaktni protein ili smjesu peptida nastalih digestijom proteina prije analize.

3.2.7.1. Priprema gelova za digestiju proteina

Proteinske mrlje odabrane za analizu spektrometrijom masa izrezala sam iz gelova plastičnim nastavkom za pipetu kojem sam odrezala oko 0,5 cm od vrha. Izrezane komadiće gela stavila sam u 1 mL otopine za odbojavanje (10% (v/v) octena kiselina, 40% (v/v) metanol) u Eppendorf tubicama od 1,5 mL. Komadiće gelova odbojavala sam preko noći na termomikseru (model Termomixer comfort, Eppendorf, Njemačka) na 550 rpm pri sobnoj temperaturi. Komadićima gela koji se nisu obezbojili dodala sam svježu otopinu za odbojavanje te ih zagrijavala u mikrovalnoj pećnici na opciji *defrost* do obezbojenja.

3.2.7.2. Digestija u gelu

Od potpuno odbojenih komadića gela pipetom sam odvojila otopinu za odbojavanje. Budući da je komadić gela bezbojan i sitan, na veći plastični nastavak za pipetu stavila sam manji kako bih osigurala da u njega osim otopine za odbojavanje ne uvučem i gel. Na komadiće gelova dodala sam 500 µL 50 mM pufera amonijevog

hidrogenkarbonata pH-vrijednosti 7,8. Gelovi su inkubirani na sobnoj temperaturi 5 min uz protresanje na 650 rpm u termomikseru. Nakon isteka vremena odvojila sam otopinu i dodala ponovno 500 μL NH_4HCO_3 i inkubirala na termomikseru. Postupak sam ponovila još dva puta, s tim da sam pri zadnjem dodatku otopine uzorak inkubirala 30 min čime se postiže optimalna pH-vrijednost za rad proteaze tripsina. Nakon polusatne inkubacije, uklonila sam otopinu te komadićima gela dodala 500 μL otopine 50:50 (v/v) 50 mM NH_4HCO_3 (pH 7,8)/acetonitril te inkubirala sljedećih 30 min u termomikseru na 650 rpm pri sobnoj temperaturi. Nakon isteka vremena tu sam otopinu bacila, a u Eppendorf tubice dodala 100 μL 100%-tnog acetonitrila. Komadiće gelova sam pri sobnoj temperaturi inkubirala 5 min na termomikseru. Nakon inkubacije u čistom acetonitrilu gel se skupio i pobijelio. Acetonitril sam potom uklonila iz Eppendorf tubica, koje sam stavila na sušenje uparavanjem u vakuum centrifugi (model Concentrator 5301, Eppendorf, Njemačka), 30 min na 45 °C. Osušene gelove prebacila sam u Eppendorf tubice od 200 μL (komadići gelova nakon sušenja su vrlo lagani stoga ovo treba raditi pažljivo) i dodala 10 μL otopine tripsina koncentracije 10 μg mL^{-1} koja je pripremljena otapanjem matične otopine tripsina koncentracije 1 mg mL^{-1} u 25 mM NH_4HCO_3 (pH 7,8). Uzorci su inkubirani preko noći (18 h) na 37 °C u termomikseru na 500 rpm.

3.2.7.3. Ekstrakcija peptida iz gela

Nakon digestije, sadržaj u tubicama centrifugirala sam (model MiniSpin, Eppendorf, Njemačka) nekoliko sekundi kako bih sav pufer s tripsinom sabila na dno tubice. Zatim sam taj isti pufer prebacila u Eppendorf tubice od 1,5 mL i uparavala u vakuum centrifugi 30 min pri 45 °C. Komadićima gela u Eppendorf tubicama od 0,2 mL dodala sam 10 μL otopine za ekstrakciju, tj. 50% (v/v) otopine 5%-tne trifluoroctene kiseline (TFA) u acetonitrilu pa ih inkubirala 30 min u sonikacijskoj kupelji (model Ultrasonic Cell Disruptor XL, Misonix Inc., SAD) pri sobnoj temperaturi. Nakon sonifikacije, Eppendorf tubice od 0,2 mL dodatno sam inkubirala 15 min na termomikseru na 500 rpm pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, ekstrakte sam spojila sa osušenim tripsinskim puferima, a komadiće gela bacila. Ekstrakte peptida stavila sam na sušenje u vakuum centrifugu 30 min pri 45 °C i pospremila ih na -80 °C.

3.2.7.4. Pročišćavanje peptida

Za pročišćavanje peptida koristila sam automatizirani uređaj (model AssayMAP Bravo Automated Liquid Handling Platform, Agilent Technologies, SAD). To je tehnologija za pripremu uzoraka koja koristi kromatografske kolone. Tehnologija AssayMAP ima modificiranu 96-kanalnu robotsku „ruku“ opremljenu s preciznim protočnim špricama koje se spajaju na kromatografske kolone kroz posebnu sondu. Postupak pročišćavanja peptida temelji se na principu tekućinske kromatografije obrnutih faza. Kolona (eng. *Reversed Phase-Small*, RP-S) se kondicionira nizom otapala rastuće polarnosti, nakon čega se na kolonu nanosi uzorak. Peptidi iz uzorka vežu se na čestice punila elektrostatskim interakcijama. Molekule soli koje se ne vežu na punilo ispiru se polarnim otapalom (vodenom otopinom TFA), dok se peptidi eluiraju otapalom manje polarnosti (vodenom otopinom acetonitrila).

Prije pročišćavanja, osušenim peptidima u mikrotitarskoj pločici dodala sam 45 µL 0,1%-tne TFA. Tako pripremljenu pločicu postavila sam u instrument AssayMap te sam pripremila otopine za kondicioniranje kolone (Tablica 8) te eluciju peptida s kolone (Tablica 9). Svaku pripremljenu otopinu otpipetirala sam u plastične nosače (12 *Column Low Profile Polyro Resevoirs*) te postavila u AssayMAp instrument na programom predviđeno mjesto. Također, dodala sam i prazne plastične nosače predviđene za skupljanje organskog otapala s kolone kao i praznu mikotitarsku pločicu za sakupljane pročišćenih peptida (eluat). Naposljetku, instrumentu sam zadala program pročiščćavanja peptida koji je trajao 90 minuta. Kolone su prvo kondicionirane 1 puta sa 100 µL pripremnog pufera brzinom od 300 µL min^{-1}, a potom sa 100 µL ekvilibracijskog pufera brzinom od 10 µL min^{-1}. Potom je uslijedilo nanošenje uzorka (svih 45 µL) brzinom od 5 µL min^{-1}, te elucija peptida u volumenu od 25 µL brzinom od 3 µL min^{-1}. Tako dobivene pročišćene uzorke osušila sam u vakuumskoj centrifugi i koristila za daljnju analizu.

Tablica 8. Sastav otopina za kondicioniranje kolone

EKVILIBRACIJSKI PUFER, 50 mL		**PRIPREMNI PUFER, 50 mL**	
reH_2O	50 mL	Acetonitril	25 mL
TFA	50 µL	reH_2O	25 mL
		TFA	50 µL

Tablica 9. Sastav otopine za eluciju peptida s kolone

Acetonitril	35 mL
reH_2O	15 mL
TFA	50 µL

3.2.7.5. Analiza peptida spektrometrom masa

Pročišćene i osušene peptide resuspendirala sam pipetom u 2 µL matrice α-cijano-4-hidroksicimentne kiseline (CHCA) koncentracije 5 mg mL^{-1}, koja je pripravljena otapanjem u vodenoj otopini acetonitrila (1:1; (v/v)). Uzorke sam nakon otapanja nanijela na MALDI pločicu (inertni nosač od nehrđajućeg čelika) i stavila na sušenje. Tijekom sušenja smjese dolazi do kristalizacije matrice i analita. Aktivna uloga matrice je sublimacija molekula analita okruženih kristalima matrice, desorpcija i ionizacija te u konačnici prijenos protona s matrice na molekule analita. Pločicu sam nakon sušenja na zraku stavila u spektrometar masa MALDI-TOF/TOF (instrument 4800 Plus analyzer, Applied Biosystems, SAD). Parametri analize su prikazani u Tablici 10. Za internu kalibraciju spektra masa (kako bi uklonila „pozadinski šum“) koristila sam signale peptida nastalih autolizom tripsina. Interna kalibracija odvija se tijekom samog

snimanja spektra (pomoću računalnog programa koji je povezan s instrumentom) i točnija je od vanjske kalibracije. Nakon snimanja spektara MS, odabire se deset peptida prekursora s najintenzivnijim signalima, koji se podvrgnu daljnjoj fragmentaciji u instrumentu kako bi se dobio spektar MS/MS.

Tablica 10. Parametri analize peptida spektometrom masa MALDI-TOF/TOF

Tip analize	MS	MS/MS
Detekcija iona	pozitivna	pozitivna
Zrcalo	reflektron	reflektron
Broj snimaka/spektara	80	120
Raspon masa/Da	900-4000	900-4000
Brzina snimanja/Hz	200	200
Kolizijski plin	uključen	uključen

3.2.8. Identifikacija proteina pretraživanjem baza podataka NCBInr i UniProt

Dobivene spektre masa MS/MS koristila sam za daljnju pretragu spektralne baze podataka NCBInr/green plants pomoću specijaliziranog računalnog programa MASCOT (verzija 2.1., Matrix Science, UK). Monoizotopne mase peptida korištene su za MS i MS/MS pretraživanje baze podataka sa slijedećim parametrima pretrage: MS/MS tolerancija mase fragmenta, 0,5 Da; tolerancija mase prekursora, 0,3 Da; maksimalni broj propuštenih cijepanja, 1; i naboj peptida +1. Iz dobivenih spektara MS/MS iščitava se slijed aminokiselina fragmentiranih peptida na temelju razlike u masama između pojedinih signala spektra. Fragmentirane peptide posebni algoritmi računalnog programa (ProteinPilot™ Software, SCIEX, SAD) vezanog uz instrument MALDI-TOF/TOF

preklapaju i slažu u cjelinu. Iz iščitanog aminokiselinskog slijeda uz pomoć alata MASCOT se identificira protein kojem pripada ta sekvenca uspoređivanjem izmjerenih masa signala dobivenih spektara (uzoraka) s teorijski izračunatim masama peptida pohranjenim u bazama podataka.

Nadalje, za svaki identificirani protein, tj. pronađeni homologni protein iz druge biljne vrste, pronašla sam pretragom baze podataka Uniprot biološke procese u kojima protein sudjeluje. Proteine sam zatim kategorizirala prema zajedničkim biološkim procesima.

REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. Identifikacija i kategorizacija proteina

4.1.1. Klijanci

Na gelovima koji su dobiveni 2D-PAG elektroforezom (prva dimenzija – IEF, druga dimenzija – SDS-PAGE) uspoređivala sam ekspresijske profile proteina, vizualizirane bojom CBB, kako bih pronašla različito eksprimirane proteine za analizu spektrometrijom masa. Rezultati kvantitativne obrade 2D-gelova računalnim programom Image Master 2D Platinum prikazani su na slikama 1-3. U Tablici 11 dan je pregled analiziranih proteina s njihovim biološkim kategorijama te razlikovna ekspresija u usporedbi s kontrolom. Od ukupno 66 analiziranih proteinskih mrlja, u 64 su proteini uspješno identificirani, a za dvije mrlje identifikacija nije uspjela (mrlje n.i.-2, Slika 1 te n.i.-1, Slika 3). U klijancima duhana tretiranim s česticama AgNP pojačanu ekspresiju u odnosu na kontrolu pokazale su 32 proteinske mrlje, njih 10 smanjenu ekspresiju, dok su 24 proteina imala jednaku ekspresiju. U klijancima duhana tretiranima s $AgNO_3$ pojačanu ekspresiju pokazalo je 58 proteinskih mrlja, njih 7 smanjenu ekspresiju, dok je samo jedna proteinska mrlja pokazala jednaku ekspresiju kao kontrola.

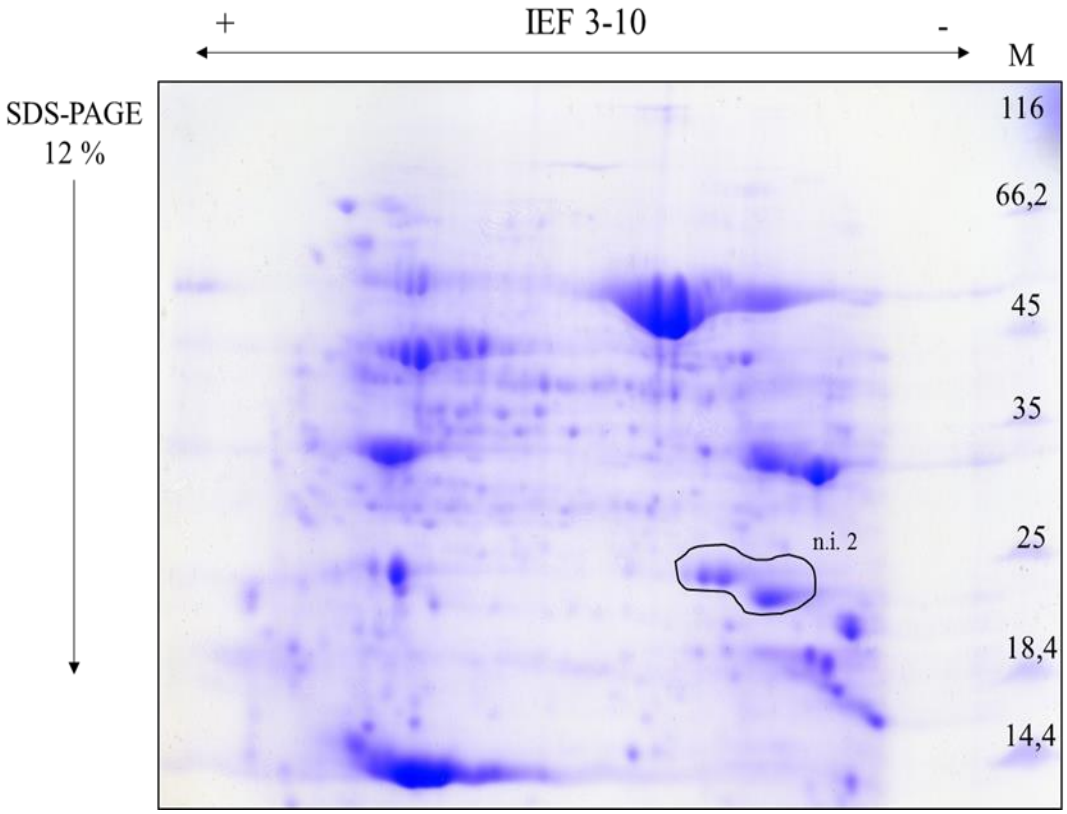
Opisane proteine sam nakon identifikacije sistematizirala prema biološkim procesima u kojim sudjeluju i tako dobila 15 kategorija: Metabolizam nukleotida, Odgovor na stres, Stanične signalne kaskade, Transkripcija molekule RNA, Sinteza ATPa, Biosinteza proteina, Metabolizam ugljikohidrata, Fotorespiracija, Smatanje proteina, Fotosinteza, Odgovor na oksidacijski stres, Metabolizam aminokiseina, Homeostaza staničnih redoks-reakcija, Transport elektrona i Procesiranje molekule RNA (Tablica 11).

Najveći broj proteina svrstala sam unutar kategorija Metabolizam ugljikohidrata (18%) i Fotosinteza (18%). Proteini vezani uz Odgovor na stres čine 11% među ukupnim proteinima kao i proteini vezani uz Smatanje proteina (Slika 4). Identificirani protein predviđen kao nukleozidna difosfat kinaza 1 (mrlja 1), glicinom bogat RNA-vezujući protein (mrlje 3 i 4), identificirani protein predviđen kao ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza velika podjedinica (mrlje 9, 14, 45), kisela hitinaza PR-P (mrlja 25), endohitinaza A (mrlja 42), identificirani protein predviđen kao kloroplastni stromalni 70 kDa protein toplinskog šoka (mrlja 49) te identificirani

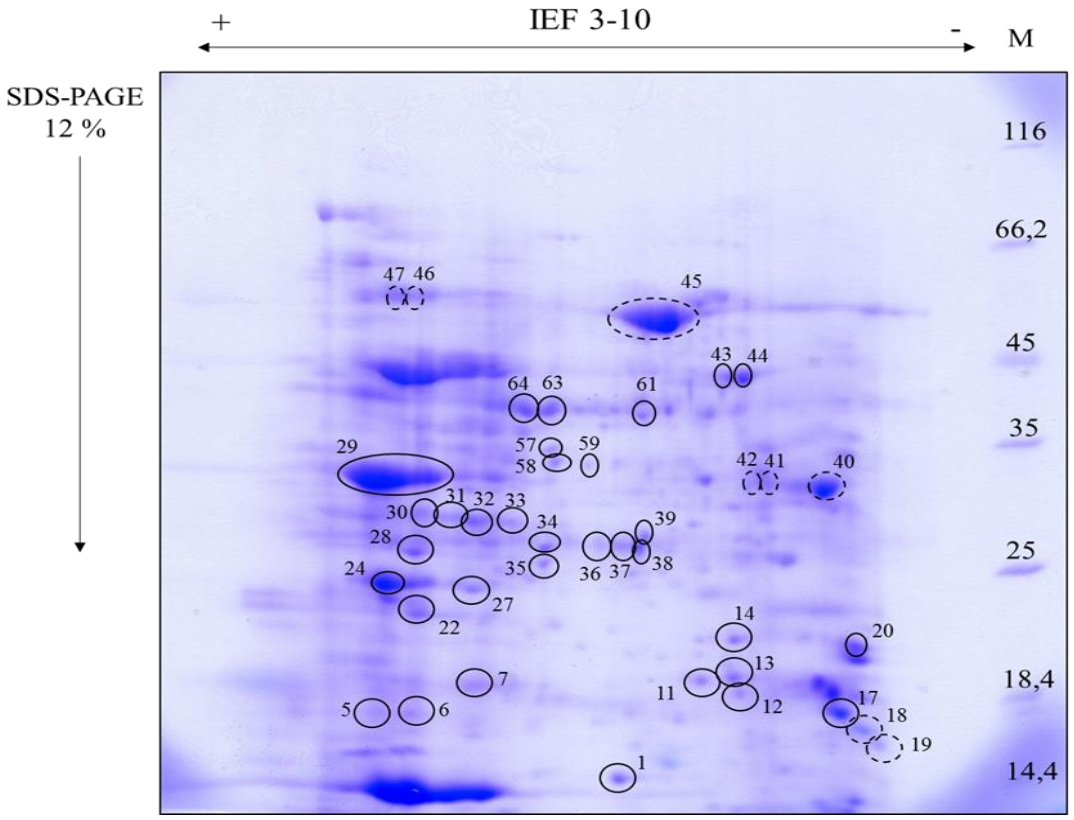
protein predviđen kao kloroplastna feredoksin-NADP reduktaza (mrlja 60) svrstala sam u dvije kategorije bioloških procesa (Tablica 11).

Proučavajući proteinske profile ukupnih topivih proteina tkiva klijanaca duhana tretiranih nanočesticama i ionima srebra uvidjela sam kako najveći broj proteina pokazuje isključivo povećanu ekspresiju (32), nešto je manji broj proteina koji u različitim tretmanima pokazuju različitu ekspresiju (29), dok je broj proteina s isključivo smanjenom ekspresijom vrlo malen (5). Najviše je proteina razlikovne ekspresije u odnosu na kontrolu iz tretmana s $AgNO_3$ (njih 65) (Slika 5).

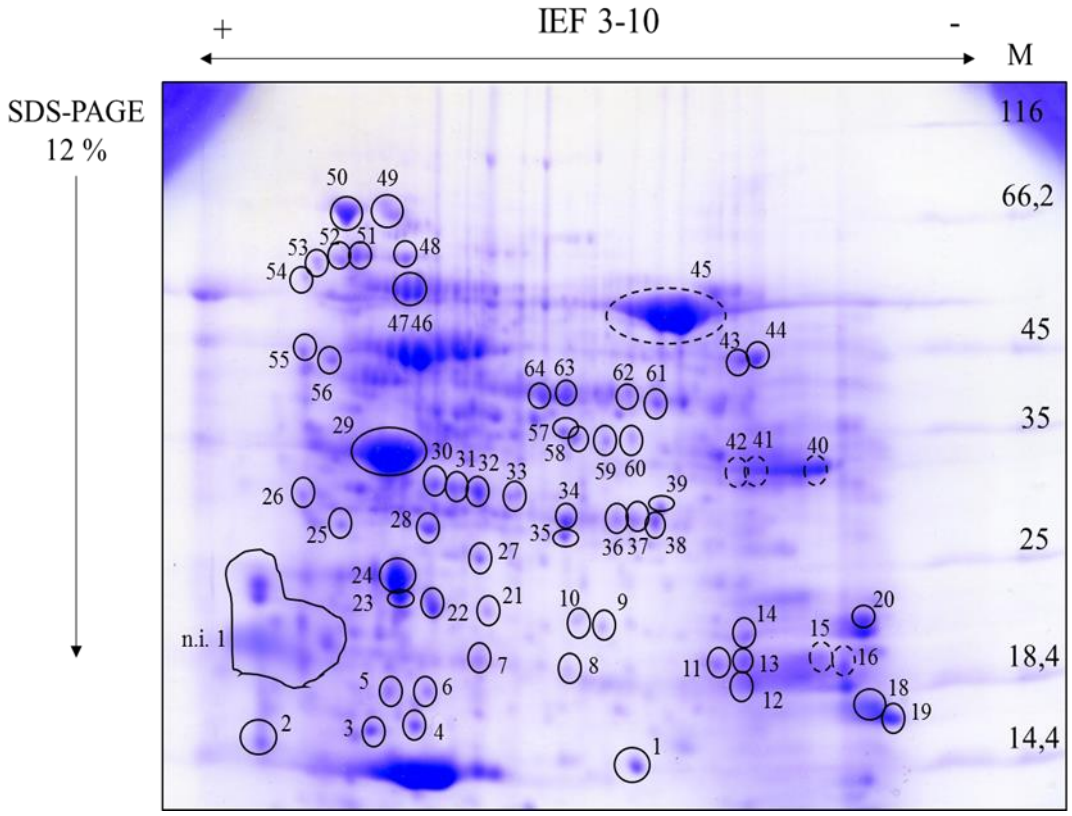
Najveći broj proteina s povećanom ekspresijom iz tretmana s AgNP pripada kategorijama Metabolizam ugljikohidrata i Fotosinteza, dok najveći broj proteina s povećanom ekspresijom iz tretmana s $AgNO_3$ pripada kategorijama Metabolizam ugljikohidrata, Fotosinteza i Odgovor na stres. Slično je i s proteinima sa smanjenom ekspresijom iz oba tretmana. Unutar kategorije Smatanje proteina svi proteini iz tretmana $AgNO_3$ pokazuju povećanu ekspresiju (Slika 5).



Slika 1. Ukupni topivi proteini klijanaca duhana (kontrola) razdvojeni 2D-PAG elektroforezom. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom Image Master 2D Platinum. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove mase, n.i – neidentificirani proteini.



Slika 2. Ukupni topivi proteini klijanaca duhana tretiranih s AgNP razdvojeni 2D-PAG elektroforezom. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom Image Master 2D Platinum. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase. Identificirani proteini označeni su brojevima 1-64. Proteini s povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu označeni su ○, a oni sa smanjenom ⁘ .



Slika 3. Ukupni topivi proteini klijanaca duhana tretiranih s $AgNO_3$ razdvojeni 2D-PAG elektroforezom. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom Image Master 2D Platinum. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase, n.i – neidentificirani proteini. Identificirani proteini označeni su brojevima 1-64. Proteini s povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu označeni su ○, a oni sa smanjenom ⁖ .

Tablica 11. Proteini klijanaca duhana identificirani metodom MALDI TOF/TOF MS/MS. Navedeni su nazivi i pristupni brojevi (NCBI) proteina koji su identificirani uz najveći *score*, biljna vrsta iz koje potječu te molekularna masa i pI navedeni u bazi podataka Uniprot. U slučaju kad nije identificiran protein iz vrste *Nicotiana tabacum*, naveden je i homologni protein iz ove vrste pronađen pomoću alata BLASTp. Biološki procesi u kojima protein sudjeluje navedeni su prema bazi podataka Uniprot. Razlikovna ekspresija izražena je u usporedbi s kontrolom ukoliko je postotak volumena mrlje barem 1,5 × veći (↑) ili manji (↓) nego u kontroli te ako je podjednak (=).

BROJ NA GELU	**NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UNIPROT)**	**VRSTA**	**SCORE**	**MASA PROTEINA (Da)**	**pI**	**BLASTP *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UNIPROT)**	**BIOLOŠKI PROCES(I)**	**RAZLIKOVNA EKSPRESIJA**
1	Nukleozidna difosfat kinaza 1, GI:297809115, XP_002872441.1	*Arabidopsis lyrata subsp. lyrata*	121	16434	6,30	*Predviđen*: Nukleozidna difosfat kinaza 1, GI:1025153435, XP_016467992.1	Metabolizam nukleotida Odgovor na stres (abiotički)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
2	Kalmodulin-2, GI:297822305, XP_002879035	*Arabidopsis lyrata subsp. lyrata*	230	20680	4,69	*Predviđen:* Izoforma X1, protein sličan kalmodulinu-7, XP_016455012.1 *Predviđen:* Izoforma X2, protein sličan kalmodulinu-7, XP_016455013.1	Stanične signalne kaskade	AgNP = $AgNO_3$ ↑
3	Glicinom bogat RNA-vezujući protein, GI:187373099, ACD03270.1	*Nicotiana tabacum*	571	15626	5,23	-	Transkripcija molekule RNA Odgovor na stres (abiotički)	AgNP = $AgNO_3$ ↑
4	Glicinom bogat RNA-vezujući protein, GI:187373099, ACD03270.1	*Nicotiana sylvestris*	142	15652	5,23	-	Transkripcija molekule RNA Odgovor na stres (abiotički)	AgNP = $AgNO_3$ ↑

5	CF1 epsilon podjedinica ATP sintaze (plastid), GI:11465963, NP_054505.1	*Nicotiana tabacum*	78	14607	5,18	-	Sinteza ATPa (povezana s transportom protona)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
6	CF1 epsilon podjedinica ATP sintaze (plastid), GI:11465963, NP_054505.1	*Nicotiana tabacum*	273	14607	5,18	-	Sinteza ATPa (povezana s transportom protona)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
7	Eukariotski elongacijski faktor 5A-1 izoforma 1, GI:590699637, XP_007045975.1	*Theobroma cacao*	106	17470	5,60	*Predviđen:* Eukariotski translacijski elongacijski inicijacijski faktor 5A-2, XP_016504267.1	Biosinteza proteina	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
8	Eukariotski elongacijski faktor 5A-3, GI:568214900 NP_001275165.1	*Solanum tuberosum*	75	17537	5,78	*Predviđen:* Eukariotski elongacijski faktor 5A-3, XP_016465249,1	Biosinteza proteina	AgNP = $AgNO_3$ ↑
9	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza velika podjedinica (kloroplast), GI:429345898, AFZ84631.1	*Nervilia plicata*	102	18528	6,80	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza velika podjedinica, ADT92065,1	Metabolizam ugljikohidrata (Calvinov ciklus) Fotorespiracija	AgNP = $AgNO_3$ ↑
10	Hipotetski protein PHAVU_008G082900g, GI:561013217, ESW12078.1	*Phaseolus vulgaris*	76	25840	8,53	*Predviđen:* Sličan elongacijskom faktoru P, XP_016510296,1	Biosinteza proteina	AgNP = $AgNO_3$ ↑
11	Ciklofilin, GI:583830761, AHI54562.1	*Camellia japonica*	142	28057	9,45	*Predviđen:* Peptidil-prolil cis-trans isomeraza, XP_016481087.1	Smatanje proteina	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
12	*Predviđen:* protein CBSX3 domene CBS, sličan mitohondrijskom GI:565354933, XP_006344361.1	*Solanum tuberosum*	148	23018	9,46	*Predviđen:* domene CBS , sličan mitohondrijskom, XP_016442049.1	Odgovor na stres (abiotički)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

13	Ciklofilin, GI:583830761, AHI54562.1	*Camellia japonica*	175	28057	9,45	*Predviđen:* Peptidil-prolil cis-trans isomeraza, XP_016481087.1	Smatanje proteina	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
14	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza velika podjedinica, parcijalna (kloroplast), GI:379647169, AFD04556.1	*Jatropha capensis*	203	29760	6,35	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza velika podjedinica, NP_054507.1	Metabolizam ugljikohidrata (Calvinov ciklus) Fotorespiracija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
15	PSI-E1=14.4 kda psaE produkt fotosustava I (N-terminalno, parcijalni kloroplastni peptid), GI:544741, AAB29519	*Nicotiana tabacum*	124	Nema podataka	Nema podataka	-	Fotosinteza	AgNP = $AgNO_3$ ↓
16	PSI-E podjedinica fotosustava I, GI:1217601, BAA07667.1	*Nicotiana sylvestris*	373	15224	9,74	*Predviđen:* IV B Kloroplastna podjedinica reakcijskog centra fotosustava I, XP_016496470.1	Fotosinteza	AgNP = $AgNO_3$ ↓
17	PsbQ, GI:62898519, BAD97359.1	*Nicotiana tabacum*	438	24157	9,50	-	Fotosinteza	AgNP ↑ $AgNO_3$ =
18	PsbQ, GI:62898519, BAD97359.1	*Nicotiana tabacum*	438	24157	9,50	-	Fotosinteza	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
19	PsbQ, GI:62898519, BAD97359.1	*Nicotiana tabacum*	438	24157	9,50	-	Fotosinteza	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑

20	PSI-D1 prekursor, GI:407769, BAA02871.1	*Nicotiana sylvestris*	145	23456	9,84	*Predviđen:* Podjedinica II reakcijskog centra fotosustava I, slična kloroplastnoj, XP_016455922.1	Fotosinteza	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
21	23-kDa polipeptid OEC kompleksa fotosustava II, GI:1345550, CAA44292.1	*Nicotiana tabacum*	108	28378	7,63	-	Fotosinteza	AgNP = $AgNO_3$ ↑
22	23 kDa polipeptid WOC kompleksa fotosustava II, GI:1345550, CAA44292.1	*Nicotiana tabacum*	244	28378	7,63	-	Fotosinteza	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
23	23 kDa polipeptid WOC kompleksa fotosustava II, GI:19898, CAA41712	*Nicotiana tabacum*	302	28652	6,84	-	Fotosinteza	AgNP = $AgNO_3$ ↑
24	23 kDa polipeptid WOC kompleksa fotosustava II, GI:396261, CAA45700	*Nicotiana tabacum*	124	21971	5,28	-	Fotosinteza	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
25	Kisela hitinaza PR-P, GI:19771, CAA35790.1	*Nicotiana tabacum*	102	27469	4,89	-	Odgovor na stres (biotički) Metabolizam ugljikohidrata (razgradnja hitina, degradacija polisaharida)	AgNP = $AgNO_3$ ↑
26	Kompleks polipetida u nastajanju alfa lanca, GI:1658271, AAB18266.1	*Nicotiana tabacum*	84	4241	5,0	-	Nema podataka	AgNP = $AgNO_3$ ↑

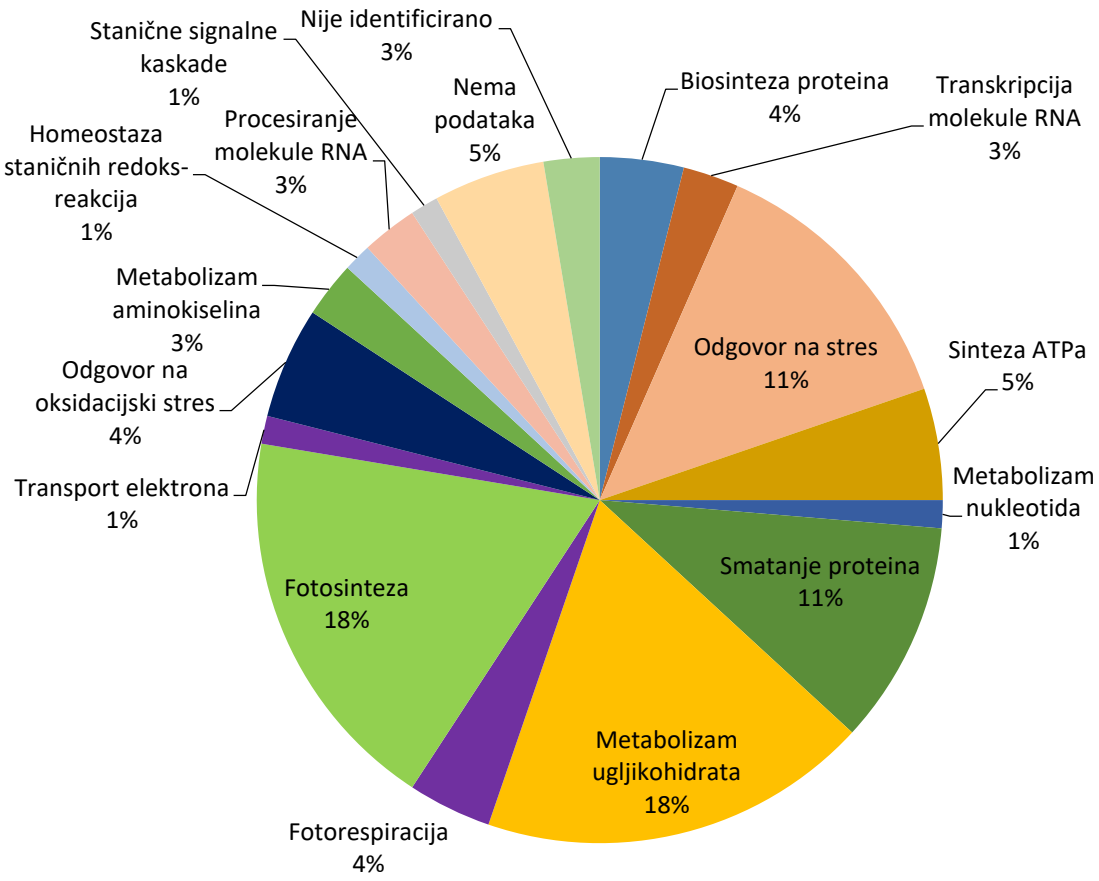
27	Željezo superoksid dismutaza, GI:573885915, AHG12637.1	*Nicotiana tabacum*	241	28338	8,60	-	Odgovor na oksidacijski stres	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
28	Prekursor šaperonina 21, GI:350534934, NP_001234423	*Solanum lycopersicum*	156	26562	6,85	20 kDa šaperonin, kloroplastni GI:1027858547, NP_001313184.1	Smatanje proteina	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
29	33 kDa polipeptid kompleksa OEC fotosustava II, GI:30013657, AAP03871.1	*Nicotiana tabacum*	244	35199	5,60	-	Fotosinteza	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
30	Citosolna askorbat peroksidaza, GI:1389654, BAA12918.1 Askorbat peroksidaza, GI:559005, AAA86689.1	*Nicotiana tabacum*	409 429	27450 27388	5,43 5,43	-	Odgovor na oksidacijski stres	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
31	Askorbat peroksidaza, GI:559005, AAA86689.1 Citosolna askorbat peroksidaza, GI:1389654, BAA12918.1	*Nicotiana tabacum*	429 409	27388 27450	5,43 5,43	-	Odgovor na oksidacijski stres	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
32	Askorbat peroksidaza, GI:559005, AAA86689.1	*Nicotiana tabacum*	409	27388	5,43	-	Odgovor na oksidacijski stres	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
33	Hipotetski protein CICLE_v10012166mg, GI:567873045, XP_006429112.1	*Citrus clementina*	155	36007	9,43	*Predviđen:* Neidentificirani protein sličan At5g02240, XP_016434705.1	Nema podataka	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

34	Izoforma slična citosolnoj trioza fosfat izomerazi, GI:77745458, ABB02628.1	*Solanum tuberosum*	221	27012	5,73	Trioza fosfat izomeraza, slična citosolnoj, NP_001312678.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
35	Predviđeni protein, parcijalni, GI:224124194, XP_002330128.1	*Populus trichocarpa*	87	30546	8,31	*Predviđen:* Kloroplastna ribuloza-fosfat 3-epimeraza, XP_016514719.1	Metabolizam ugljikohidrata (Calvinov ciklus)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
36	Beta ugljična anhidraza, GI:22550386, AAL51055.2	*Nicotiana tabacum*	137	34452	6,19	-	Metabolizam ugljikohidrata (iskorištavanje ugljika)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
37	Beta ugljična anhidraza, GI:22550386, AAL51055.2	*Nicotiana tabacum*	141	34452	6,19	-	Metabolizam ugljikohidrata (iskorištavanje ugljika)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
38	Beta ugljična anhidraza, GI:22550386, AAL51055.2	*Nicotiana tabacum*	194	34452	6,19	-	Metabolizam ugljikohidrata (iskorištavanje ugljika)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
39	Beta ugljična anhidraza, GI:22550386, AAL51055.2	*Nicotiana tabacum*	122	34452	6,19	-	Metabolizam ugljikohidrata (iskorištavanje ugljika)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
40	Bazična beta-1,3-glukanaza, GI:194719371, ACF93731.1	*Nicotiana tabacum*	313	40391	7,10	-	Metabolizam ugljikohidrata	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
41	Bazična beta-1,3-glukanaza, GI:194719371, ACF93731.1	*Nicotiana tabacum*	313	40391	7,10	-	Metabolizam ugljikohidrata	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
42	Endohitinaza A, GI:256133, AAB23374.1	*Nicotiana tabacum*	167	35156	8,40	-	Odgovor na stres (biotički) Metabolizam ugljikohidrata (razgradnja hitina, degradacija polisaharida)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

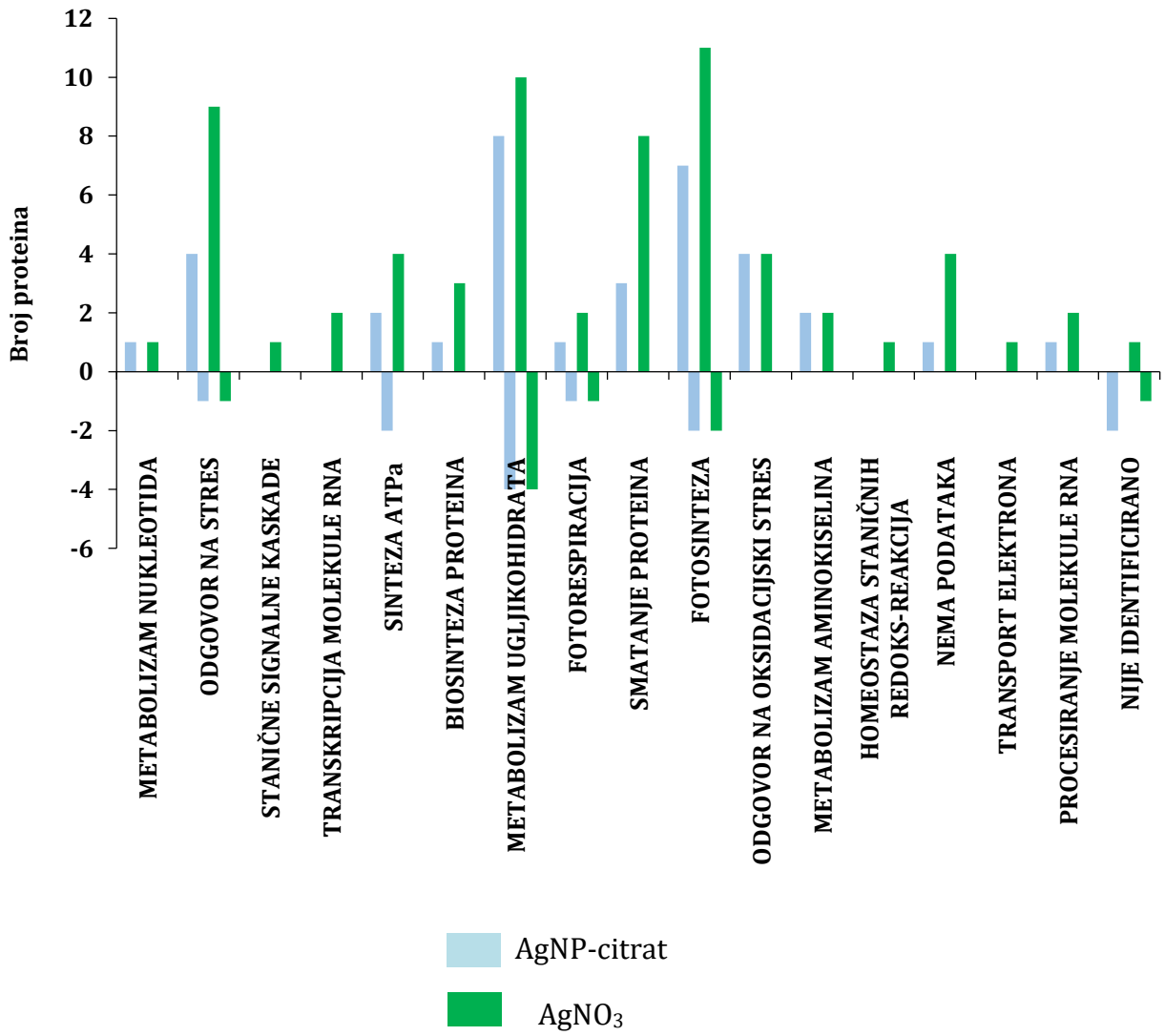
43	*Predviđen*: Aminometiltransferaza, slična mitohondrijskoj, GI:460373793, XP_004232698.1	*Solanum lycopersicum*	234	44294	8,65	*Predviđen:* Mitohondrijska aminometiltransferaza, XP_016485574.1	Metabolizam aminokiselina (katabolički proces glicina)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
44	Mitohondrijska aminometiltransferaza, GI:568214427, NP_001275291.1	*Solanum tuberosum*	289	44277	8,77	*Predviđen:* Mitohondrijska aminometiltransferaza, XP_016485574.1	Metabolizam aminokiselina (katabolički proces glicina)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
45	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza, velika podjedinica, GI:11465965, NP_054507.1	*Nicotiana tabacum*	421	52898	6,41	-	Metabolizam ugljikohidrata (Calvinov ciklus) Fotorespiracija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
46	CF1 beta podjedinica ATP sintaze, GI:81238327, NP_054506.2	*Nicotiana tabacum*	603	53554	5,00	-	Sinteza ATPa (povezana s transportom protona)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
47	CF1 beta podjedinica ATP sintaze, GI:108773137	*Solanum tuberosum*	426	53508	5,35	CF1 beta podjedinica ATP sintaze, GI:81238327, NP_054506.2	Sinteza ATP (povezana s transportom protona)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
48	Beta šaperonin 60, GI:110349923, CAJ19275.1	*Solanum commersonii*	245	63086	6,89	*Predviđen:* Kloroplastna beta 2 podjedinica šaperona 60, XP_016490465.1	Smatanje proteina	AgNP = $AgNO_3$ ↑
49	70 kDa protein toplinskog šoka, GI:2654208, AAB91471.1	*Spinacia oleracea*	786	76141	5,19	*Predviđen:* Kloroplastni stromalni 70 kDa protein toplinskog šoka, XP_016498345.1	Odgovor na stres (abiotički) Smatanje proteina	AgNP = $AgNO_3$ ↑
50	70 kDa protein toplinskog šoka, GI:30025966, AAP04522.1	*Nicotiana tabacum*	489	70876	5,17	-	Odgovor na stres (abiotički)	AgNP = $AgNO_3$ ↑

51	Alfa podjedinica šaperonina 60, GI:163311868, ABY26947.1	*Capsicum annum*	145	61898	5,37	Podjedinica beta 2 šaperonina 60, slična kloroplastnoj, XP_016476095.1	Smatanje proteina	AgNP = $AgNO_3$ ↑
52	*Predviđen:* Protein sličan disulfid izomerazi, GI:565354274, XP_006344041.1	*Solanum tuberosum*	127	54897	4,81	*Predviđen:* Protein sličan disulfid izomerazi, XP_016515375.1	Homeostaza staničnih redoks-reakcija	AgNP = $AgNO_3$ ↑
53	*Predviđen:* Neidentificirani protein sličan At5g39570, GI:565342585, XP_006338424.1	*Solanum tuberosum*	172	40988	4,66	*Predviđen:* Neidentificirani protein sličan At5g39570, XP_016449031.1	Nema podataka	AgNP = $AgNO_3$ ↑
54	Kalretikulin, GI:197717740, ACH72686.1	*Nicotiana tabacum*	112	47442	4,44	-	Smatanje proteina	AgNP = $AgNO_3$ ↑
55	Ankirin ponavljajući protein HBP1, GI:13310811, AAK18619.1	*Nicotiana tabacum*	431	37317	4,45	-	Nema podataka	AgNP = $AgNO_3$ ↑
56	*Vjerojatan:* Peptidil-prolil cis-trans isomeraza, GI:255552604, XP_002517345.1	*Ricinus communis*	91	51180	4,97	*Predviđen:* Kloroplastna peptidil-prolil cis-trans isomeraza CYP38, XP_016463793.1	Smatanje proteina	AgNP = $AgNO_3$ ↑
57	Kloroplastni prekursor feredoxin-$NADP^+$ oksidoreduktaze, GI:6899972, CAB71293.1	*Capsicum annuum*	318	40407	8,55	*Predviđen*: Kloroplastna feredoxin-NADP reduktaza, izoenzim lista, XP_016433650.1	Fotosinteza	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
58	Kloroplastni prekursor feredoxin-$NADP^+$ oksidoreduktaze, GI:6899972, CAB71293.1	*Capsicum annuum*	121	40407	8,55	*Predviđen*: Kloroplastna feredoxin-NADP reduktaza, izoenzim lista, XP_016433650.1	Fotosinteza	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

59	Ribuloza bifosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza 2 (kloroplast), GI:377648386, AFB70996.1	*Nicotiana attenuata*	369	48283	7,58	Kloroplastna ribuloza bifosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza 2, NP_001312578.1	Odgovor na stres (abiotički)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
60	*Predviđen:* Feredoksin-NADP reduktaza, izoenzim lista, slična kloroplastnoj, GI:565347451, XP_006340740.1	*Solanum tuberosum*	315	40457	8,37	*Predviđen:* Kloroplastna feredoksin-NADP reduktaza, izoenzim lista, XP_016433650.1	Fotosinteza	AgNP = $AgNO_3$ ↑
61	*Vjerojatan:* Mitohondrijska NAD-ovisna malat dehidrogenaza, GI:21388544, CAD33240.1	*Solanum tuberosum*	313	36195	8,87	*Predviđen:* Mitohondrijska malat dehidrogenaza, XP_016468597.1	Metabolizam ugljikohidrata (Krebsov ciklus)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
62	Parcijalni prekursor mRNA-vezujućeg proteina, GI:32746733, AAP87140.1	*Nicotiana tabacum*	184	44245	6,51	-	Procesiranje molekule RNA	AgNP = $AgNO_3$ ↑
63	Prekursor mRNA-veznog proteina, parcijalan, GI:32746733, AAP87140.1	*Nicotiana tabacum*	75	44245	6,51	-	Procesiranje molekule RNA	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
64	Ribuloza bifosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza 2 (kloroplast), GI:377648386, AFB70996.1	*Nicotiana attenuata*	189	48283	7,58	Kloroplastna ribuloza bifosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza 2, NP_001312578.1	Odgovor na stres (abiotički)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
n.i.-1	Nije identificiran							AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
n.i.-2	Nije identificiran							AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓



Slika 4. Udio pojedinih kategorija bioloških procesa među ukupnim proteinima klijanaca duhana.



Slika 5. Kategorizacija identificiranih proteina koji se po ekspresiji razlikuju u odnosu na kontrolu u klijancima tretiranim s AgNP ili $AgNO_3$. Na pozitivnoj osi prikazan je broj proteina povećane ekspresije, a na negativnoj osi smanjene.

4.1.2. Korijen

Rezultati kvantitativne obrade 2D-gelova proteina korijena računalnim programom Image Master 2D Platinum prikazani su na slikama 6-8. U Tablici 12 dan je pregled analiziranih proteina s odgovarajućim biološkim procesima te razlikovna ekspresija u usporedbi s kontrolom. Proteini iz 27 mrlja uspješno su identificirani, a za šest identifikacija nije uspjela (mrlje 3, 4, 5, 7, 26, i 33). U tkivu korijena duhana tretiranim s AgNP 11 proteina pokazalo je pojačanu ekspresiju u odnosu na kontrolu,

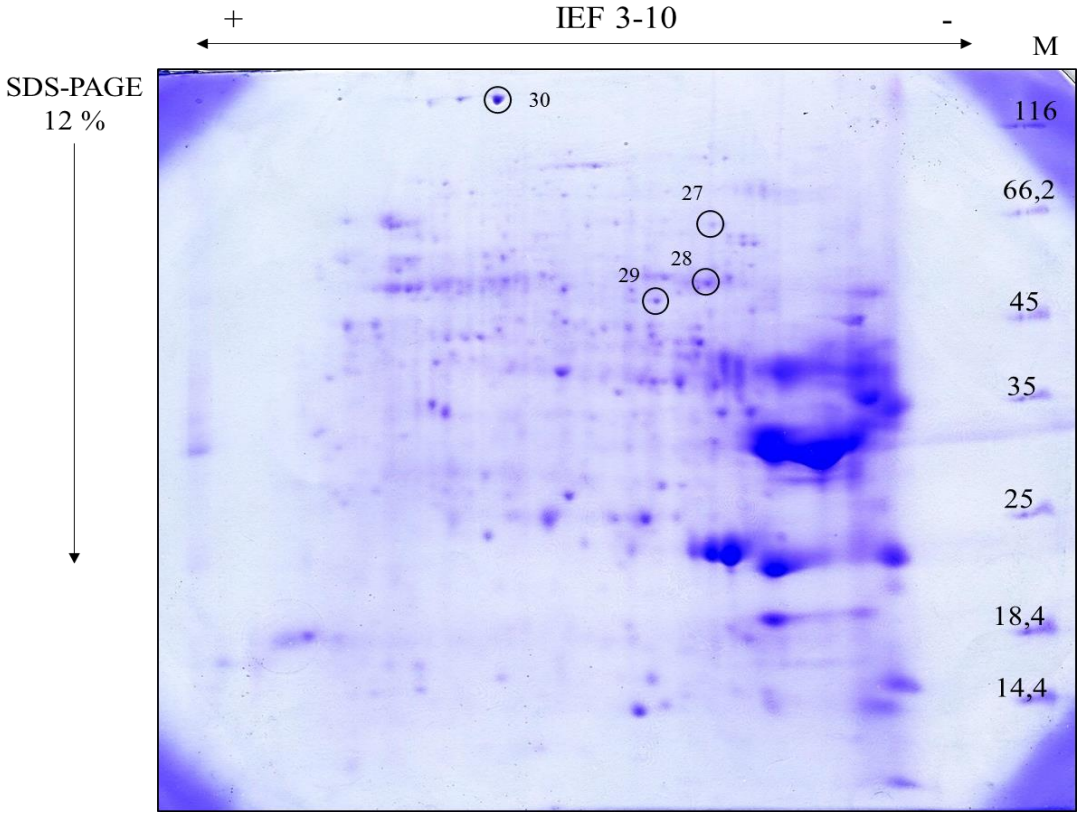
dok su 22 imala smanjenu ekspresiju. U tkivu korijena duhana tretiranim s $AgNO_3$ pojačanu ekspresiju pokazalo je također 11 proteina, njih 18 smanjenu ekspresiju, dok su 4 proteina pokazala jednaku ekspresiju kao i u kontroli.

Opisane sam proteine sistematizirala prema njihovim biološkim procesima i tako dobila 9 kategorija: Obrana od gljivica i bakterija, Sinteza ATPa, Metabolizam nukleotida, Odgovor na stres, Odgovor na oksidacijski stres, Metabolizam ugljikohidrata, Metabolizam aminokiselina, Organizacija kloroplasta, Glikozilacija proteina (Tablica 12).

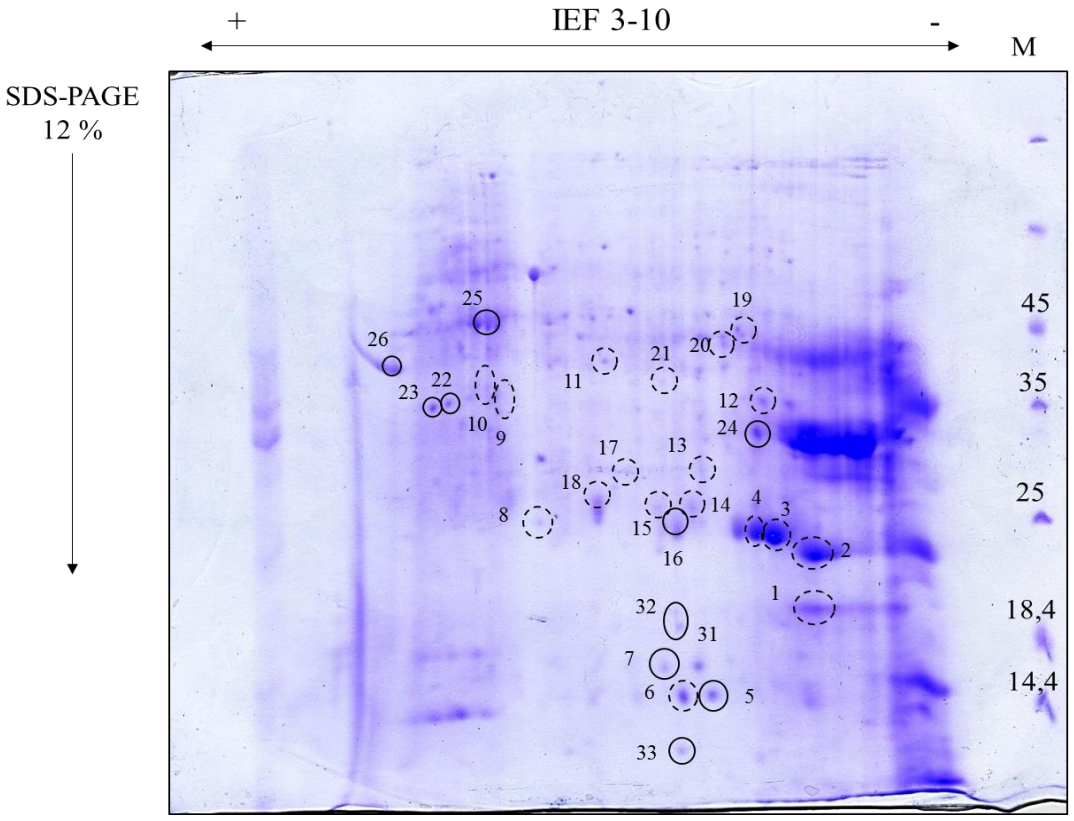
Najveći broj proteina pripada kategoriji Odgovor na stres, njih 20%. Neidentificiranih proteina ima 18% od ukupnog broja, 18% proteina pripada kategoriji Metabolizam ugljikohidrata, a slijedi kategorija Odgovor na oksidacijski stres sa 17% (Slika 8). Identificirani protein predviđen kao protein sličan alfa-manozidazi (mrlja 27) svrstala sam u dvije kategorije (Glikozilacija proteina i Metabolizam ugljikohidrata (metabolizam manoze).

Proučavajući proteinske profile ukupnih topivih proteina tkiva korijena duhana tretiranih nanočesticama i ionima srebra uvidjela sam kako najveći broj proteina pokazuje isključivo smanjenu ekspresiju (18), nešto je manji broj proteina koji u različitim tretmanima pokazuju isključivo povećanuu ekspresiju (10), dok je broj proteina s različitom ekspresijom najmanji (5). Svi proteini iz tretmana s AgNP pokazuju razlikovnu ekspresiju u odnosu na kontrolu (Slika 10).

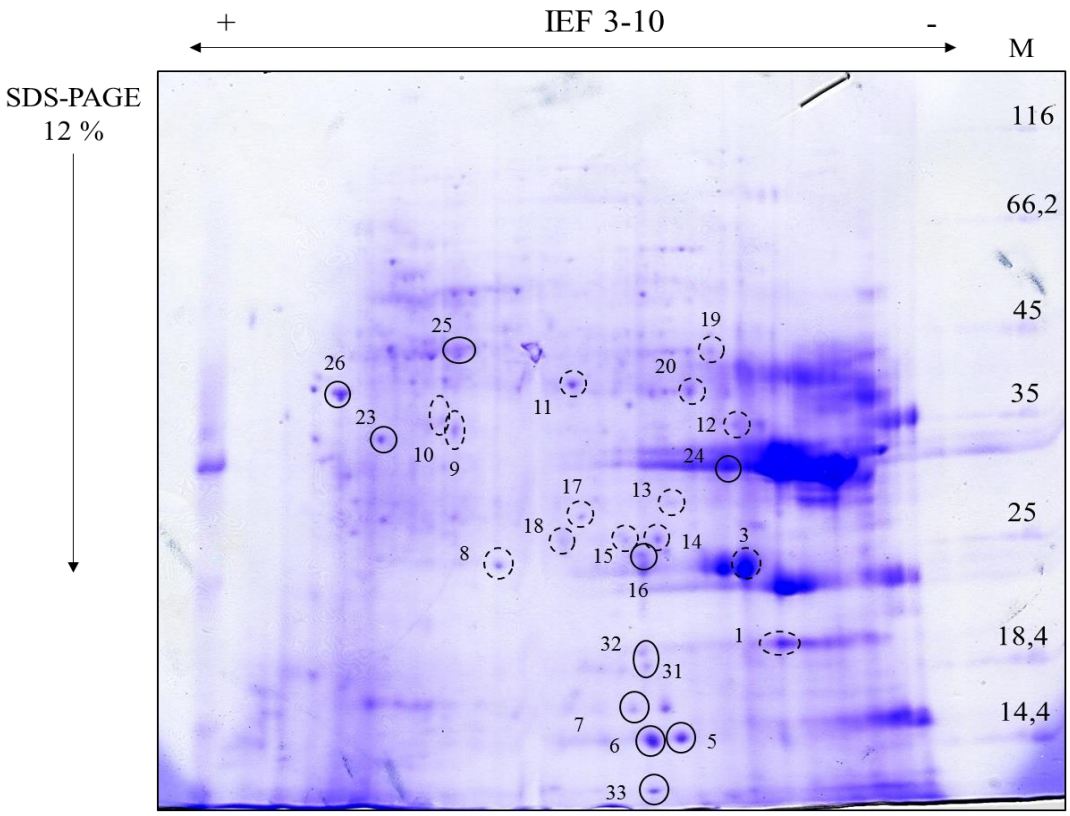
Najveći broj proteina sa smanjenom ekspresijom iz oba tretmana pripada kategorijama Odgovor na stres, Metabolizam ugljikohidrata i Odgovor na oksidacijski stres, dok najveći broj proteina s povećanom ekspresijom iz oba tretmana nije identificiran (Slika 10).



Slika 6. Ukupni topivi proteini korijena biljaka duhana (kontrola), koji su razdvojeni 2D-PAG elektroforezom. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom Image Master 2D Platinum. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase. Identificirani proteini (27-30) s povećanom ekspresijom označeni su ○.



Slika 7. Ukupni topivi proteini korijena biljaka duhana tretiranih s AgNP, koji su razdvojeni 2D-PAG elektroforezom. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom Image Master 2D Platinum. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase. Identificirani proteini označeni su brojevima 1-33. Proteini s povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu označeni su ○, a oni sa smanjenom ⁘ .



Slika 8. Ukupni topivi proteini korijena biljaka duhana tretiranih s $AgNO_3$, koji su razdvojeni 2D-PAG elektroforezom. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom Image Master 2D Platinum. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase. Identificirani proteini označeni su brojevima 1-33. Proteini s povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu označeni su ○, a oni sa smanjenom ⁘ .

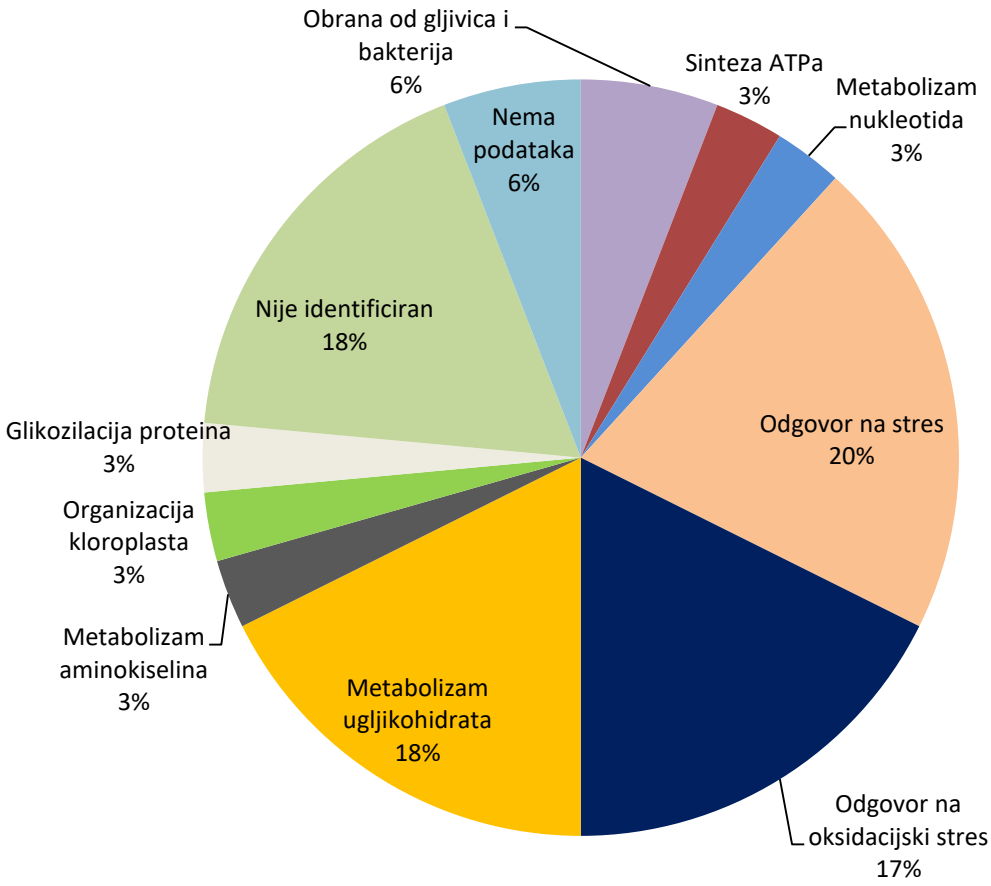
Tablica 12. Proteini korijena duhana identificirani metodom MALDI TOF/TOF MS/MS. Navedeni su nazivi i pristupni brojevi (NCBI) proteina koji su identificirani uz najveći *score*, biljna vrsta iz koje potječu te molekularna masa i pI navedeni u bazi podataka Uniprot. U slučaju kad nije identificiran protein iz vrste *Nicotiana tabacum*, naveden je i homologni protein iz ove vrste pronađen pomoću alata BLASTp. Biološki procesi u kojima protein sudjeluje navedeni su prema bazi podataka Uniprot. Razlikovna ekspresija izražena je u usporedbi s kontrolom ukoliko je postotak volumena mrlje barem 1,5 × veći (↑) ili manji (↓) nego u kontroli te ako je podjednak (=).

BROJ NA GELU	**NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UNIPROT)**	**VRSTA**	**SCORE**	**MASA PROTEINA (Da)**	**pI**	**BLASTP *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UNIPROT)**	**BIOLOŠKI PROCES(I)**	**RAZLIKOVNA EKSPRESIJA**
1	Prekursor protugljivičnog proteina CBP20 induciranog patogenima i ranjavanjem, GI:7547630 AAB29959.2	*Nicotiana tabacum*	75	22168	8,39	-	Obrana od gljivica i bakterija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
2	Osmotin, GI:256135 AAB23375.1	*Nicotiana tabacum*	111	26681	8,13	-	Odgovor na stres (biotički i abiotički)	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
3	Nije identificiran	-	-	-	-	-	-	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
4	Nije identificiran	-	-	-	-	-	-	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
5	Nije identificiran	-	-	-	-	-	-	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
6	Nukleozid difosfat kinaza, GI:350535074 NP_001234174.1	*Solanum lycopersicum*	201	16252	6,30	*Predviđena:* Nukleozid difosfat kinaza, XP_016467992.1	Metabolizam nukleotida Odgovor na stres (abiotički)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑

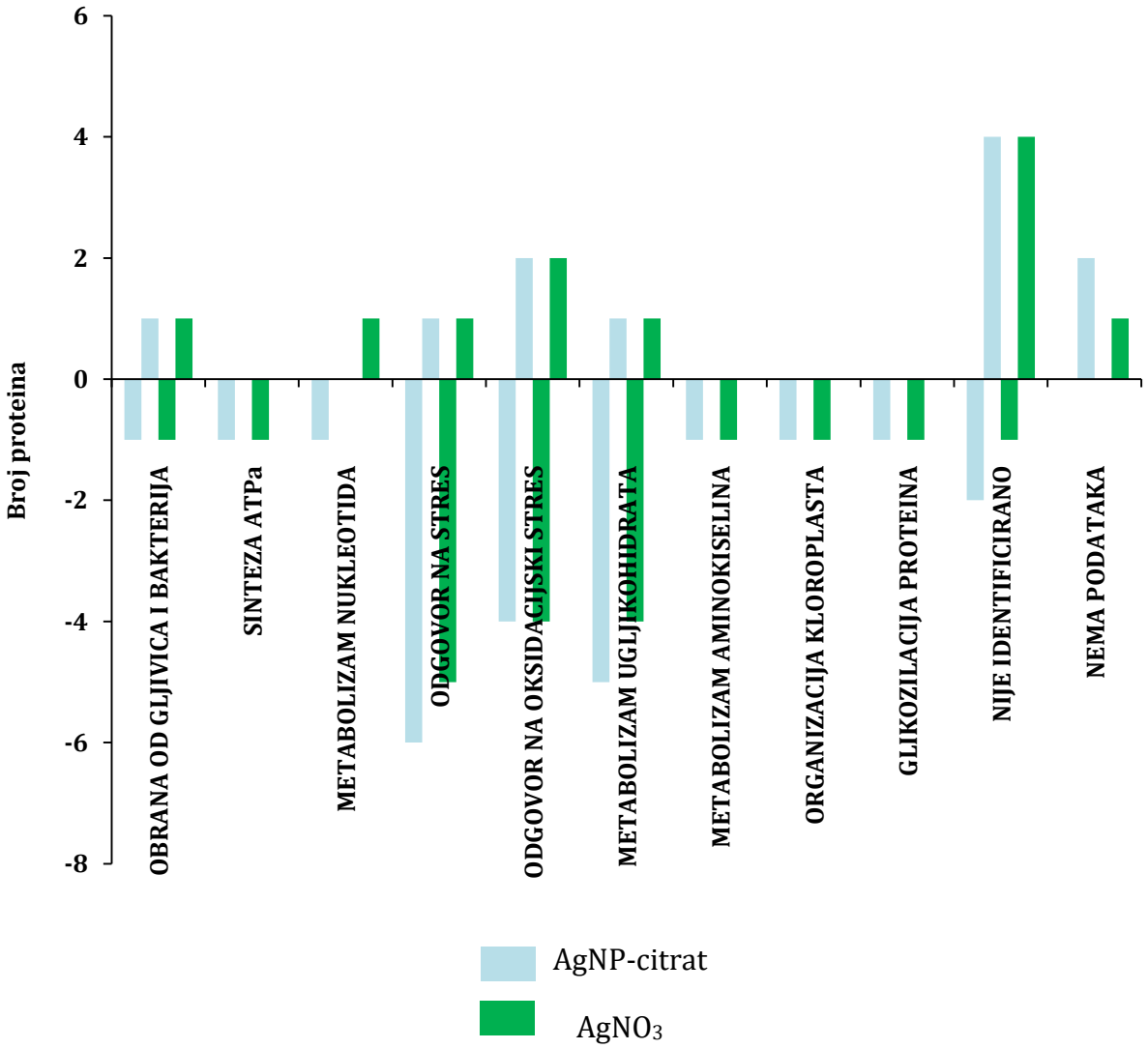
7	Nije identificiran	-	-	-	-	-	-	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
8	Željezo superoksid dismutaza, GI:573885915 AHG12637.1	*Nicotiana tabacum*	85	28338	8,60	-	Odgovor na oksidacijski stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
9	Vacuole-associated annexin VCaB42, GI:4580920 AAD24540.1	*Nicotiana tabacum*	81	35938	5,34	-	Odgovor na stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
10	Annexin, GI:2467255 CAA75214.1	*Nicotiana tabacum*	201	35950	5,38	-	Odgovor na stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
11	Vjerojatna mitohondrijska malat dehidrogenaza, GI:48375044 AAT42189.1	*Nicotiana tabacum*	199	22037	7,64	-	Metabolizam ugljikohidrata (Krebsov ciklus)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
12	*Predviđen:* Sličan anionskoj peroksidazi 2 povezanoj sa suberinizacijom, GI:565352690 XP_006343273.1	*Solanum tuberosum*	89	36319	6,32	*Predviđen:* Sličan anionskoj peroksidazi 1 povezanoj sa suberinizacijom, XP_016472675.1	Odgovor na oksidacijski stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
13	*Predviđen:* Moguća 24 kDa podjedinica ATP sintaze, mitohondrijska, GI:460415839 XP_004253261.1	*Solanum lycopersicum*	136	27713	8,69	*Predviđen:* Moguća 24 kDa podjedinica ATP sintaze, mitohondrijska, XP_016487066.1	Sinteza ATPa (povezana s transportom protona)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
14	Mogući prekursor receptora *Rhicadhesin*, GI:255582405 XP_002531991.1	*Ricinus communis*	129	21177	8,74	Potporodica 1 proteina *germin-like,* XP_016470784.1	Odgovor na stres (biotički i abiotički)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

15	Mogući prekursor receptora *Rhicadhesin*, GI:255582405 XP_002531991.1	*Ricinus communis*	129	21177	8,74	Potporodica 1 proteina *germin-like,* XP_016470784.1	Odgovor na stres (biotički i abiotički)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
16	Mangan superoksid dismutaza, GI:17227134 AAL38023.1	*Nicotiana tabacum*	78	10723	6,76	-	Odgovor na oksidacijski stres	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
17	Izoforma slična citosolnoj trioza fosfat izomerazi, GI:77745458, ABB02628.1	*Solanum tuberosum*	199	27012	5,73	Trioza fosfat izomeraza, slična citosolnoj, NP_001312678.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
18	Mogući prekursor receptora *Rhicadhesin*, GI:255582405 XP_002531991.1	*Ricinus communis*	129	21177	8,74	Potporodica 1 proteina *germin-like,* XP_016470784.1	Odgovor na stres (biotički i abiotički)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
19	Glutamat dehidrogenaza, GI:20873461 CAD12373.1	*Nicotiana tabacum*	122	44588	6,57	-	Metabolizam aminokiselina	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
20	Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, GI:157042763 ABV02033.1	*Nicotiana langsdorffii x Nicotiana sanderae*	171	37021	6,62	*Predviđena:* Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, citosolna, XP_016498743.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
21	Moguća mitohondrijska malat dehidrogenaza, GI:48375044 AAT42189.1	*Nicotiana tabacum*	180	22037	7,64	-	Metabolizam ugljikohidrata (Krebsov ciklus)	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
22	*Predviđen:* Sličan proteinu A vanjske membrane, GI:449470698 XP_004153053.1	*Cucumis sativus*	247	Nema jasnih podataka	Nema jasnih podataka	-	Nema podataka	AgNP ↑ $AgNO_3$ =
23	*Predviđen:* Sličan proteinu A vanjske membrane, GI:449470698 XP_004153053.1	*Cucumis sativus*	131	Nema jasnih podataka	Nema jasnih podataka	-	Nema podataka	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

24	Bazična beta-1,3-glukanaza, GI:194719371 ACF93731.1	*Nicotiana tabacum*	103	40391	7,10	-	Metabolizam ugljikohidrata (hidroliza polisaharida)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
25	Monodehidroaskorbat reduktaza, GI:113472842 ABI35909.1	*Rheum australe*	87	47325	5,63	*Predviđen:* Monodehidroaskorbat reduktaza, XP_016455903.1	Odgovor na oksidacijski stres	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
26	Nije identificiran	-	-	-	-	-	-	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
27	*Predviđen:* Sličan lizosomalnoj alfa-manozidazi, GI:565399766 XP_006365417.1	*Solanum tuberosum*	179	116406	6,43	*Predviđen:* Slična alfa-manozidazi, XP_016465882.1	Glikozilacija proteina Metabolizam ugljikohidrata (metabolizam manoze)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
28	Katalaza koja veže salicilnu kiselinu, parcijalna GI:436478 AAC48918.1	*Nicotiana tabacum*	198	56824	6,60	-	Odgovor na oksidacijski stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
29	Monodehidroaskorbat reduktaza, GI:548578462 AGX01486.1	*Nicotiana tabacum*	326	52056	8,09	-	Odgovor na oksidacijski stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
30	Protein CHUP1, GI:357488243 XP_003614409.1	*Medicago truncatula*	75	111254	5,34	Protein CHUP1, sličan kloroplastnom, XP_016454270.1	Organizacija kloroplasta	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
31	Protein 1B povezan s patogenezom, GI:357446179	*Medicago truncatula*	80	Nema podataka	Nema podataka	-	Odgovor na stres (biotički i abiotički)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
32	Prekursor protugljivičnog proteina CBP20 koji je induciran patogenima i ranjavanjem, GI:7547630 AAB29959.2	*Nicotiana tabacum*	80	22168	8,39	-	Obrana od gljivica i bakterija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
33	Nije identificiran	-	-	-	-	-	-	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑



Slika 9. Udio pojedinih kategorija bioloških procesa među ukupnim proteinima tkiva korijena duhana.



Slika 10. Kategorizacija identificiranih proteina koji se po ekspresiji razlikuju u odnosu na kontrolu u tkivu korijena odraslih biljaka duhana tretiranih s AgNP ili $AgNO_3$. Na pozitivnoj osi prikazan je broj proteina povećane ekspresije, a na negativnoj osi smanjene.

4.1.3. List

Rezultati kvantitativne obrade 2D-gelova, koji prikazuju proteina lista, računalnim programom Image Master 2D Platinum prikazani su na slikama 11-13. U Tablici 13 dan je pregled proteina s pripadajućim biološkim procesima te razlikovna ekspresija u usporedbi s kontrolom. Od ukupno analiziranih 41 proteina, 38 je uspješno identificirano, a za tri proteina identifikacija nije uspjela (mrlje 39, 40, 41). U tkivu lista

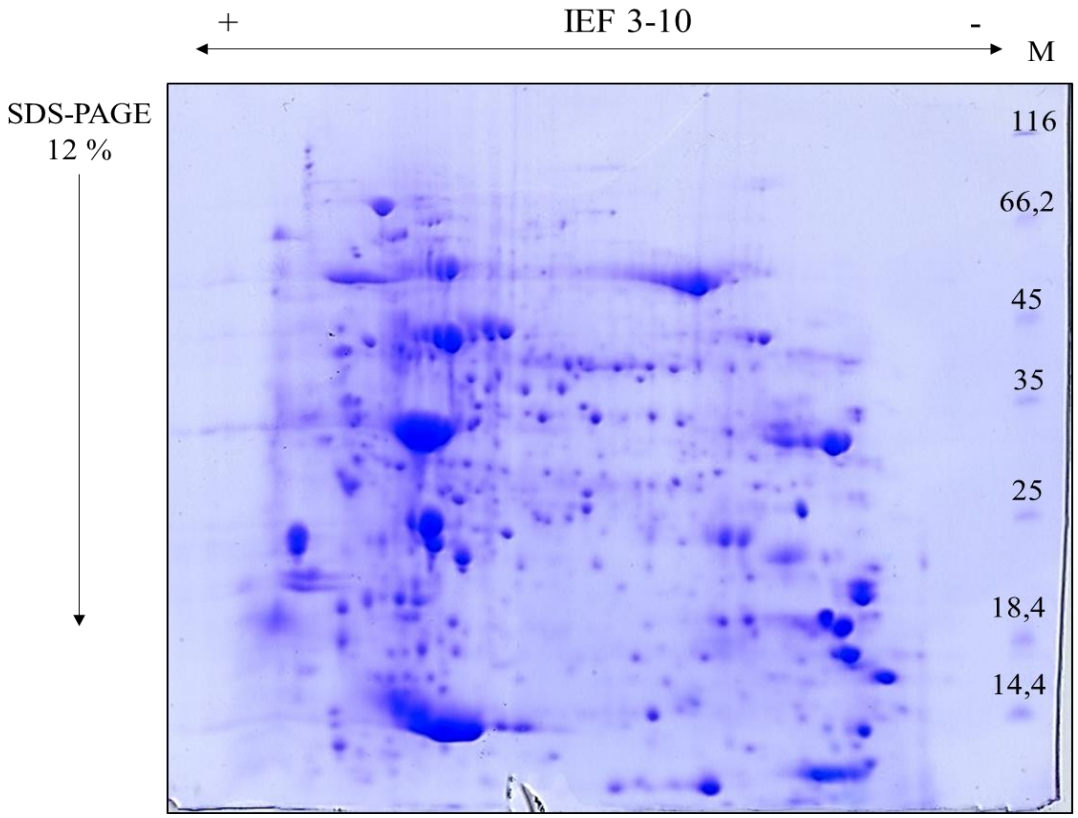
biljaka duhana tretiranih s AgNP, 7 proteina pokazalo je pojačanu ekspresiju u odnosu na kontrolu, 30 ih je imalo smanjenu ekspresiju, dok su četiri proteina pokazala jednaku ekspresiju kao u kontroli. U tkivu lista biljke tretirane s $AgNO_3$ pojačanu ekspresiju pokazalo je 12 proteina, njih 14 imalo je smanjenu ekspresiju, dok je 15 proteina pokazalo istu ekspresiju kao i u kontroli.

Opisane sam proteine sistematizirala prema njihovim biološkim procesima i tako dobila 15 kategorija: Sklapanje fotosustava II, Transkripcija molekule RNA, Odgovor na stres, Sinteza ATPa, Metabolizam nukleotida, Smatanje proteina, Metabolizam ugljikohidrata, Fotorespiracija, Fotosinteza, Obrana od gljivica i bakterija, Odgovor na oksidacijski stres, Metabolizam aminokiselina, Translacija, Post-transkripcijska kontrola molekule RNA, Proteoliza (Tablica 13).

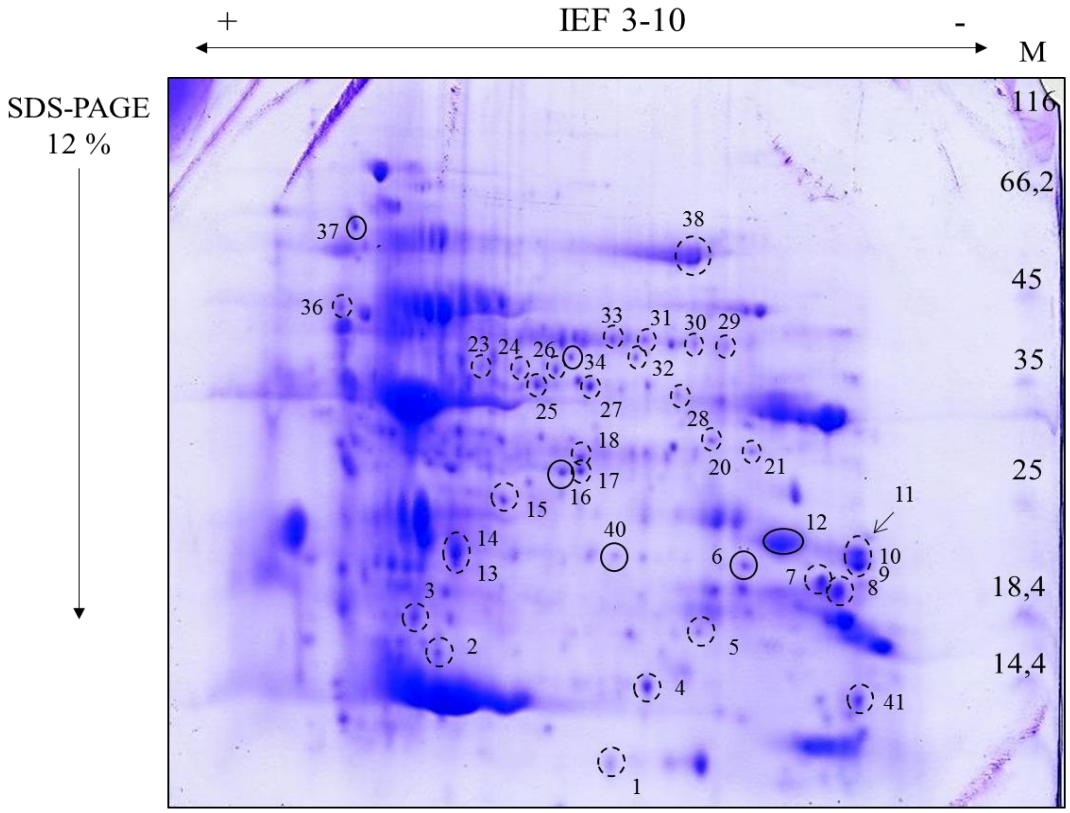
Najveći broj proteina svrstala sam unutar kategorije Metabolizam ugljikohidrata, njih 27%. Proteini vezani uz fotosintezu čine 20% među ukupnim proteinima, a slijede proteini vezani uz odgovor na stres (11%) (Slika 14). Glicinom bogat RNA-vezujući protein (mrlja 2) te identificirani protein predviđen kao nukleozidna difosfat kinaza 1 (mrlja 4) odnosno ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza velika podjedinica (mrlje 6 i 38) svrstala sam u dvije kategorije.

Proučavajući proteinske profile ukupnih topivih proteina tkiva lista duhana tretiranih nanočesticama i ionima srebra uvidjela sam kako najveći broj proteina pokazuje različitu ekspresiju (24), manji je broj proteina koji u različitim tretmanima pokazuju isključivo smanjenu ekspresiju (13), dok je najmanji broj proteina s isključivo povećanom ekspresijom (4). Najviše je proteina razlikovne ekspresije u odnosu na kontrolu iz tretmana s AgNP (njih 37) (Slika 15).

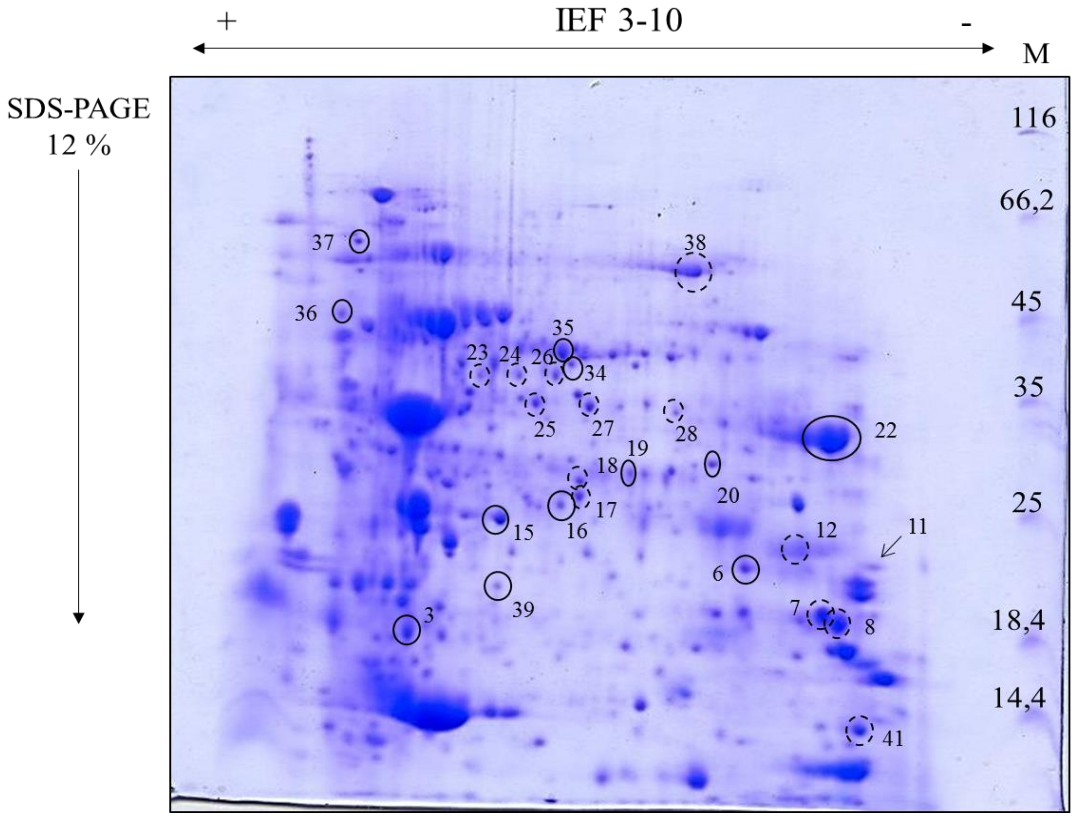
Najveći broj proteina sa smanjenom ekspresijom iz oba tretmana pripada kategorijama Metabolizam ugljikohidrata i Fotosinteza. Najveći broj proteina s povećanom ekspresijom iz tretmana s AgNP pripada kategoriji Odgovor na stres, dok najveći broj proteina s povećanom ekspresijom iz tretmana s $AgNO_3$ pripada kategorijama Metabolizam ugljikohidrata i Odgovor na stres (Slika 15).



Slika 11. Ukupni topivi proteini lista biljke duhana (kontrola), koji su razdvojeni 2D-PAG elektroforezom. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom Image Master 2D Platinum. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase.



Slika 12. Ukupni topivi proteini lista biljke duhana tretirane s AgNP, koji su razdvojeni 2D-PAG elektroforezom. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom Image Master 2D Platinum. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase. Identificirani proteini označeni su brojevima 1-41. Proteini s povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu označeni su ○, a oni sa smanjenom ⁘ .



Slika 13. Ukupni topivi proteini lista biljke duhana tretirane s $AgNO_3$, koji su razdvojeni 2-PAG elektroforezom. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom Image Master 2D Platinum. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase. Identificirani proteini označeni su brojevima 1-41. Proteini s povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu označeni su ○, a oni sa smanjenom ⁖ .

Tablica 13. Proteini lista biljke duhana identificirani metodom MALDI TOF/TOF MS/MS. Navedeni su nazivi i pristupni brojevi (NCBI) proteina koji su identificirani uz najveći *score*, biljna vrsta iz koje potječu te molekularna masa i pI navedeni u bazi podataka Uniprot. U slučaju kad nije identificiran protein iz vrste *Nicotiana tabacum*, naveden je i homologni protein iz ove vrste pronađen pomoću alata BLASTp. Biološki procesi u kojima protein sudjeluje navedeni su prema bazi podataka Uniprot. Razlikovna ekspresija izražena je u usporedbi s kontrolom ukoliko je postotak volumena mrlje barem 1,5 × veći (↑) ili manji (↓) nego u kontroli te ako je podjednak (=).

BROJ NA GELU	**NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UNIPROT)**	**VRSTA**	**SCORE**	**MASA PROTEINA (Da)**	**pI**	**BLASTP *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UNIPROT)**	**BIOLOŠKI PROCES(I)**	**RAZLIKOVNA EKSPRESIJA**
1	11 kDa protein fotosustava II, GI:226491700, NP_001147626.1	*Zea mays*	114	17359	9,98	*Predviđen:* Protein za popravak fotosustava II, PSB27-H1, XP_016514812.1	Sklapanje fotosustava II	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
2	Glicinom bogat RNA-vezujući protein, GI:187373099, ACD03270.1	*Nicotiana tabacum*	155	15652	5,23	-	Transkripcija molekule RNA Odgovor na stres (abiotički)	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
3	CF1 epsilon podjedinica ATP sintaze, GI:11465963, NP_054505.1	*Nicotiana tabacum*	103	14607	5,18	-	Sinteza ATPa (povezana s transportom protona)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
4	Nukleozidna difosfat kinaza 1, GI:297809115, XP_002872441.1	*Arabidopsis lyrata subsp. lyrata*	121	16434	6,30	*Predviđen*: Nukleozidna difosfat kinaza 1, GI:1025153435, XP_016467992.1	Metabolizam nukleotida Odgovor na stres (abiotički)	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
5	Peptidil-prolil cis-trans isomeraza, ciklofilin tip proteina, GI:224072532, XP_002303772.1	*Populus trichocarpa*	96	28565	9,51	*Predviđen*: Peptidil-prolil cis-trans isomeraza, XP_016481087.1	Smatanje proteina	AgNP ↓ $AgNO_3$ =

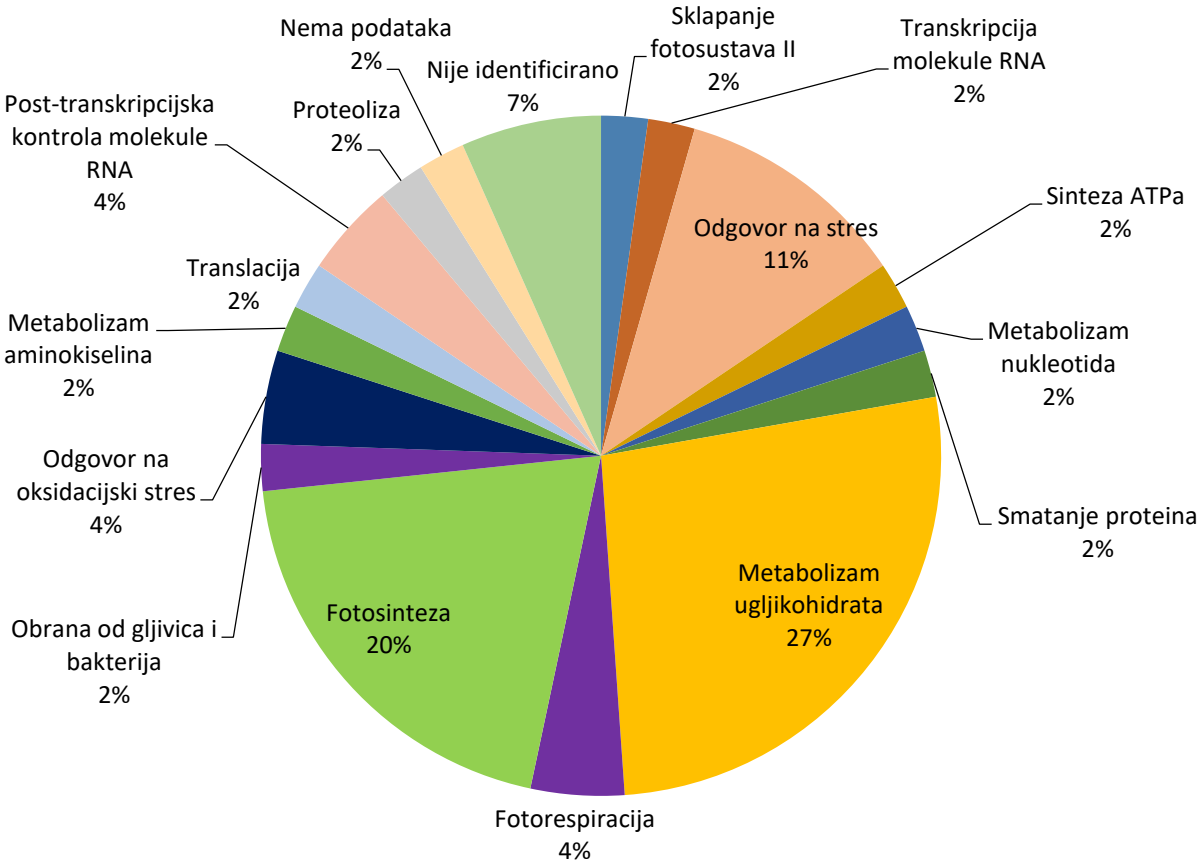
6	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza velika podjedinica, parcijalna (kloroplast), GI:145568107, ABP82410.1	*Ulva pertusa*	75	43780	6,18	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza velika podjedinica, NP_054507.1	Metabolizam ugljikohidrata (Calvinov ckilus) Fotorespiracija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
7	PSI-E1=14.4 kda psaE produkt fotosustava I (N-terminalni, parcijalni kloroplastni peptid), GI:544741, AAB29519	*Nicotiana tabacum*	124	Nema podataka	Nema podataka	-	Fotosinteza	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
8	Podjedinica PSI-E fotosustava I, GI:1217601, BAA07667.1	*Nicotiana sylvestris*	130	15224	9,74	*Predviđen:* IV B podjedinica IVB reakcijskog centra fotosustava I, kloroplastna, XP_016496470.1	Fotosinteza	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
9	Podjedinica II reakcijskog centra fotosustava I, kloroplastna, GI: 474150013, EMS56878.1	*Triticum urartu*	130	17704	9,77	*Predviđen:* podjedinica II reakcijskog centra fotosustava I, slična kloroplastnoj, XP_016505719.1	Fotosinteza	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
10	PSI-D1 prekursor, GI:407769, BAA02871.1	*Nicotiana sylvestris*	145	23456	9,84	*Predviđen:* Podjedinica II reakcijskog centra fotosustava I, slična kloroplastnoj, XP_016455922.1	Fotosinteza	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
11	Prekursor protugljivičnog proteina CBP20 koji je induciran patogenima i ranjavanjem, GI:7547630, AAB29959.2	*Nicotiana tabacum*	131	22168	8,39	-	Obrana od gljivica i bakterija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

12	Osmotin, GI:256135, AAB23375.1	*Nicotiana tabacum*	75	26681	8,13	-	Odgovor na stres (biotički i abiotički)	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↓
13	23-kDa polipeptid kompleksa OEC fotosustava II, GI:1345550, CAA44292.1	*Nicotiana tabacum*	325	28378	7,63	-	Fotosinteza	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
14	23-kDa polipeptid kompleksa OEC fotosustava II, GI:1345550, CAA44292.1	*Nicotiana tabacum*	306	28378	7,63	-	Fotosinteza	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
15	Željezo superoksid dismutaza, GI:573885915, AHG12637.1	*Nicotiana tabacum*	175	28338	8,60	-	Odgovor na oksidacijski stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
16	*Predviđen:* Klorofil a-b vezujući protein 8, sličan kloroplastnom, GI:460412884, XP_004251826.1	*Solanum lycopersicum*	75	29278	8,61	*Predviđen:* Klorofil a-b vezujući protein 8, kloroplastni, XP_016457506.1	Fotosinteza	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
17	*Predviđen:* Ribuloza-fosfat 3-epimeraza, kloroplastna, GI:565398028, XP_006364582.1	*Solanum tuberosum*	84	30343	7,72	*Predviđen:* Ribuloza-fosfat 3-epimeraza, kloroplastna, XP_016514719.1	Metabolizam ugljikohidrata (Calvinov ciklus)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
18	Trioza fosfat izomeraza slična citosolnoj izoformi, GI:77745458, ABB02628.1	*Solanum tuberosum*	225	27012	5,73	Trioza fosfat izomeraza, NP_001312678.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
19	Beta ugljična anhidraza, GI:22550386, AAL51055.2	*Nicotiana tabacum*	82	34452	6,19	-	Metabolizam ugljikohidrata (iskorištavanje ugljika)	AgNP = $AgNO_3$ ↑

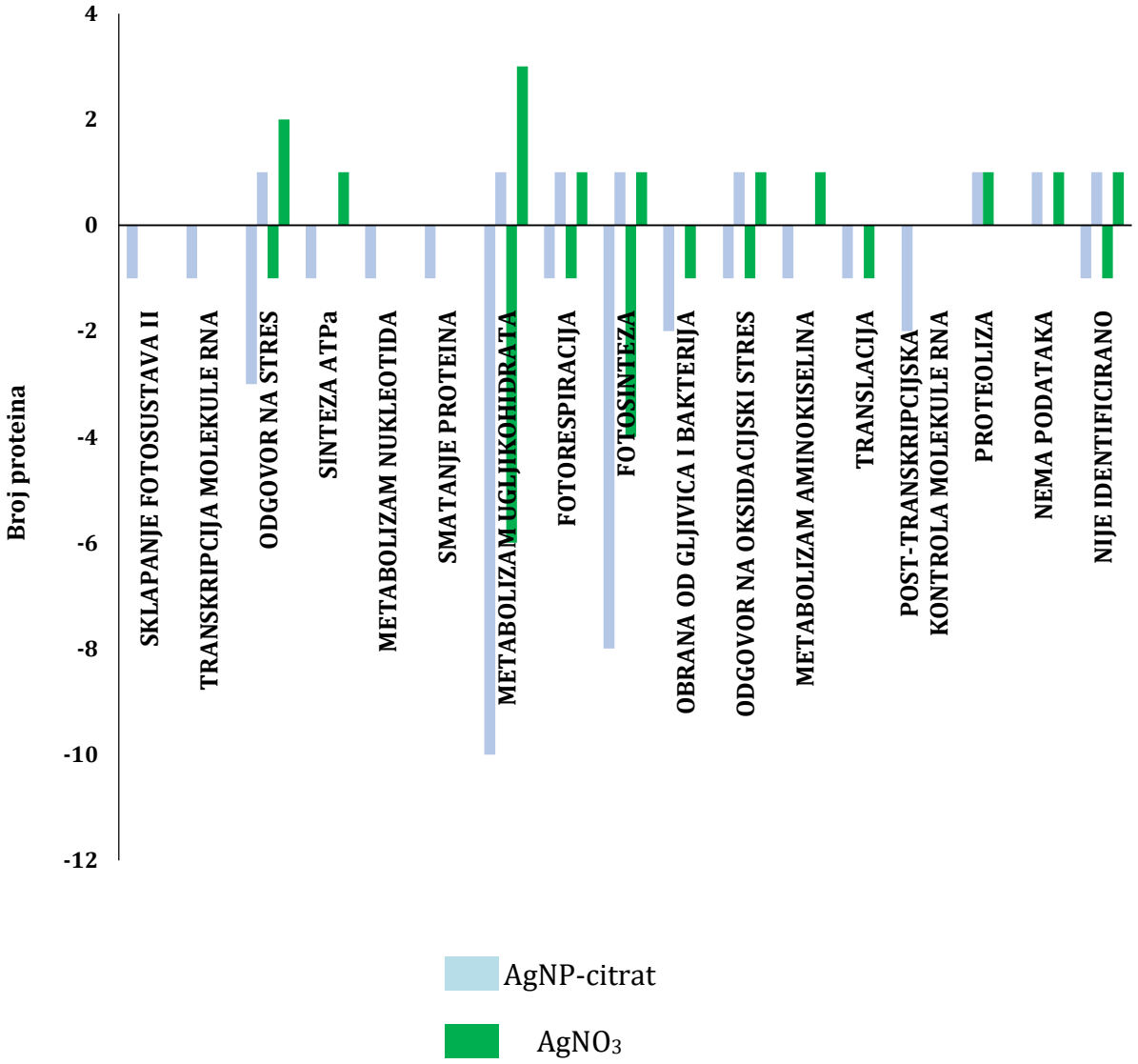
20	*Predviđen*: Aminometiltransferaza, mitohondrijska, GI:460373793, XP_004232698.1	*Solanum lycopersicum*	227	44294	8,65	*Predviđen:* Mitohondrijska aminometiltransferaza, XP_016485574.1	Metabolizam aminokiselina (katabolički proces glicina)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
21	*Predviđen:* Sličan glutation S-transferazi, GI: 565351224, JAP20994.1	*Solanum tuberosum*		26661	6,19	*Predviđen:* Sličan glutation S-transferazi, XP_016455705.1	Odgovor na oksidacijski stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
22	Bazična beta-1,3-glukanaza, GI:194719371, ACF93731.1	*Nicotiana tabacum*	308	40391	7,10	-	Metabolizam ugljikohidrata (hidroliza polisaharida)	AgNP = $AgNO_3$ ↑
23	Plastidna aldolaza, GI:294440432, ADE74633.1	*Nicotiana tabacum*	276	42806	6,38	-	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
24	Plastidna aldolaza NPALDP1, GI:4827251, BAA77604.1	*Nicotiana paniculata*	331	42574	6,92	*Predviđen:* Fruktoza-bisfosfat aldolaza 1, kloroplastna, XP_016505617.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
25	*Predviđen:* Feredoksin-NADP reduktaza, izoenzim lista, slična kloroplastnoj, GI:565347451, XP_006340740.1	*Solanum tuberosum*	247	40457	8,37	*Predviđen:* Kloroplastna feredoksin-NADP reduktaza, izoenzim lista, XP_016433650.1	Fotosinteza (transport elektrona)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
26	Plastidna aldolaza NPALDP1, GI:4827251, BAA77604.1	*Nicotiana paniculata*	410	42574	6,92	*Predviđen:* Fruktoza-bisfosfat aldolaza 1, kloroplastna, XP_016505617.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
27	*Predviđen:* Feredoksin-NADP reduktaza, izoenzim lista, slična kloroplastnoj, GI:565347451, XP_006340740.1	*Solanum tuberosum*	174	40457	8,37	*Predviđen:* Kloroplastna feredoksin-NADP reduktaza, izoenzim lista, XP_016433650.1	Fotosinteza	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

28	*Predviđen:* 30S ribosomalni protein S5, kloroplastni, GI:460374193, XP_004232896.1	*Solanum lycopersicum*	142	33372	8,87	*Predviđen:* 30S ribosomalni protein S5, kloroplastni, XP_016507755.1	Translacija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
29	Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, GI:157042763, ABV02033.1	*Nicotiana langsdorffii x Nicotiana sanderae*	146	37021	6,62	*Predviđena:* Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, citosolna, XP_016498743.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
30	Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, GI:157042763, ABV02033.1	*Nicotiana langsdorffii x Nicotiana sanderae*	139	37021	6,62	*Predviđena:* Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, citosolna XP_016498743.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
31	Prekursor mRNA-vezujućeg proteina, djelomičan, GI:32746733, AAP87140.1	*Nicotiana tabacum*	92	44245	6,51	-	Post-transkripcijska kontrola molekule RNA	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
32	Moguća mitohondrijska malat dehidrogenaza, djelomična GI:48375044, AAT42189.1	*Nicotiana tabacum*		22037	7,64	-	Metabolizam ugljikohidrata (Krebsov ciklus)	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
33	Prekursor mRNA-veznog proteina, djelomičan GI:32746733, AAP87140.1	*Nicotiana tabacum*	107	44245	6,51	-	Post-transkripcijska kontrola molekule RNA	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
34	*Predviđen:* Sličan proteazi Do 1, kloroplastni, GI:565342861, XP_006338559.1	*Solanum tuberosum*	335	45671	6,45	*Predviđen:* Proteaza Do 1, kloroplastna, XP_016443403.1	Proteoliza	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

35	Ribuloza bisfosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza 2 (kloroplast), GI:377648386, AFB70996.1	*Nicotiana attenuata*	104	48283	7,58	*Predviđen:* Ribuloza bisfosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza 2 sličan kloroplastnom, XP_016477286.1	Odgovor na stres (abiotički)	AgNP = $AgNO_3$ ↑
36	Ankirin-ponavljajući protein HBP1, GI:13310811, AAK18619.1	*Nicotiana tabacum*	201	37317	4,45	-	Odgovor na stres (biotički i abiotički)	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
37	*Predviđen:* Sličan nekarakteriziranom proteinu At5g39570, GI:565342585, XP_006338424.1	*Solanum tuberosum*	102	40988	4,66	*Predviđen:* Sličan nekarakteriziranom proteinu At5g39570, XP_016449031.1	Nema podataka	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
38	Produkt gena rbcL (kloroplast), GI:351653887, YP_004891612.1	*Nicotiana undulata*	369	52912	6,29	Ribuloza 1-5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza velika podjedinica, NP_054507.1	Metabolizam ugljikohidrata (Calvinov ciklus) Fotorespiracija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
39	Nije identificiran	-	-	-	-	-	-	AgNP = $AgNO_3$ ↑
40	Nije identificiran	-	-	-	-	-	-	AgNP ↑ $AgNO_3$ =
41	Nije identificiran	-	-	-	-	-	-	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓



Slika 14. Udio pojedinih kategorija među ukupnim proteinima tkiva lista duhana.



Slika 15. Kategorizacija identificiranih proteina koji se po ekspresiji razlikuju u odnosu na kontrolu u tkivu lista odraslih biljaka duhana tretiranih s AgNP ili $AgNO_3$. Na pozitivnoj osi prikazan je broj proteina povećane ekspresije, a na negativnoj osi smanjene.

RASPRAVA

5. RASPRAVA

Posljednjih godina raste broj istraživanja, izvještaja i znanstvenih publikacija o mogućim opasnostima primjene nanomaterijala. U ovom je radu istraživan utjecaj nanočestica srebra na kvantitativne promjene u ekspresiji proteina u klijancima te listovima i korijenju odraslih biljaka duhana te je dana usporedba utjecaja ispitane koncentracije (100 μM) AgNP i $AgNO_3$ na proteom duhana različitih razvojnih stadija.

5.1. Promjene u proteomskoj slici klijanaca duhana

Proučavajući proteinske profile ukupnih topivih proteina svih tkiva duhana tretiranih sa AgNP i $AgNO_3$ uvidjela sam kako je najveći broj proteina identificiran u klijancima duhana. Najveći broj identificiranih proteina klijanaca pokazuje povećanu ekspresiju u odgovoru na tretman sa AgNP. Svi identificirani proteini klijanaca iz tretmana s $AgNO_3$ pokazuju povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu. Najveći broj proteina s povećanom ekspresijom iz tretmana sa AgNP pripada kategorijama Metabolizam ugljikohidrata i Fotosinteza, dok najveći broj proteina s povećanom ekspresijom iz tretmana s $AgNO_3$ pripada kategorijama Metabolizam ugljikohidrata, Fotosinteza i Odgovor na stres (Tablica 11). Na neke od identificiranih proteina detaljnije ću se osvrnuti.

5.1.1. Proteini vezani uz fotosintezu

Prema očekivanjima, fotosinteza se pokazala kao jedan od važnih bioloških procesa na koje su izlaganja klijanca duhana tretmanima sa AgNP i $AgNO_3$ imala najveći utjecaj. Kategorija je predstavljena s proteinima koji pripadaju i fotosustavu I (engl. *photosystem* I, PSI) i fotosustavu II (eng. *photosystem* II, PS II). Već sama zastupljenost proteina vezanih uz fotosintezu u proteomu cjelovitih klijanaca ukazuje na to da su proteini izdanka s listićima zasjenili proteine korijena. Unatoč važnosti skupine proteina koji sudjeluju u fotosintezi i njihovoj zastupljenosti u mojim rezultatima, njihova uloga u odgovoru na tretmane srebrom do sada nije istražena. Jedino su Mustafa i sur. (2015) u proteomu klijanaca soje identificirali nekoliko podjedinica PSII, čija je ekspresija bila promijenjena zbog tretmana sa AgNP, no to nisu bili isti proteini čija se ekspresija promijenila u klijancima duhana u mome istraživanju. Protein PsaE (protein br. 15 i 16,

Tablica 11), smješten na reducirajućem kraju PSI sa stromalne strane i uključen u prihvaćanje topivih akceptora elektrona (osobito feredoksina) (Sétif i sur., 2002), pokazao je smanjenu ekspresiju u tretmanu sa $AgNO_3$ u odnosu na kontrolu i tretman sa AgNP. Istraživanja Jeanjean i sur. (2008) na stanicama cijanobakterije *Synechocystis* sp. pokazala su da ovaj protein ima važnu ulogu u detoksifikaciji ROS i sprečavanju fotooksidacijskog oštećenja, dok su Pineda i sur. (2010) utvrdili smanjenu ekspresiju ovog proteina nakon infekcije biljke *Nicotiana benthamiana* virusom *Pepper mild mottle tobamovirus*, što ukazuje da je navedeni protein važan u odgovoru biljke na stresne okolišne uvjete. S druge strane, protein PsaD (protein br. 20, Tablica 11), koji stvara komplekse s feredoksinom i feredoksin-oksidoreduktazom u PSI, bio je pojačano eksprimiran nakon oba tipa tretmana. Moguće je da je smanjeni transport elektrona zbog slabije ekspresije proteina PsaE potaknuo sintezu proteina PsaD kako bi se povećao broj molekula feredoksina, koji ima ključnu ulogu u transportu elektrona.

Protein fotosustava II PsbQ (proteini br. 17-19, Tablica 11), pokazao je pojačanu ekspresiju nakon tretmana sa $AgNO_3$. U radu Tamburion i sur. (2017) zabilježena je pojačana ekspresija ovog proteina u proteomu kloroplasta rajčice nakon izlaganja stresu sušom, što je u skladu s mojim rezultatima. Pojačana sinteza ovog proteina ukazuje na to da klijanci duhana pokušavaju održati energetsku homeostazu. S druge strane, tretmani sa AgNP izazvali su smanjenu ekspresiju proteina PsbQ, što ukazuje na djelomično oštećenje PSII te na smanjenje toka elektrona sa PSII na PSI, vjerojatno zbog pojačanog stvaranja ROS tijekom izlaganja klijanaca nanosrebru (Biba, 2016). Moji rezultati u skladu sa rezultaima dobivenim u istraživanju Kumar i sur. (2017) na vrsti *Zostera muelleri*. I proteini porodice PsbP (proteini br. 21-24, Tablica 11), koji pripadaju kompleksu fotosustava PSII koji katalizira oksidaciju vode (eng. *water oxydizing complex*, WOC ili eng. *oxygen evolving complex*, OEC) tj. cijepanje H_2O na O_2 i 4 H^+, pokazali su pojačanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana. Ishihara i sur. (2007) utvrdili su da je protein PsbP-like 1 (PPL1) iz vrste *Arabidopsis thaliana* potreban za učinkoviti popravak svjetlošću oštećenog PSII, a Gururani i sur. (2015) navode da fotoinhibicija izazvana abiotičkim stresom dovodi do promjena u ekspresiji ovog proteina.

5.1.2. Proteini vezani uz metabolizam ugljikohidrata

Kada se biljne stanice nalaze pod utjecajem stresnih čimbenika, njihov bazalni metabolizam i aktivnosti enzima mogu se narušiti i oštetiti, zbog čega biljke moraju učvrstiti mehanizme otpornosti na stres. Takvi procesi zahtijevaju dodatne zalihe energije, što dovodi do pojačane aktivnosti enzima uključenih u metabolizam ugljikohidrata (Vinocur, 2005).

Velika podjedinica enzima ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza (Rubisco) identificirana je na 3 različita mjesta (proteini br. 9, 14 i 45, Tablica 11) s promijenjenom ekspresijom u oba tipa tretmana, iako je ekspresija proteina br. 9 i 14 bila pojačana, a proteina br. 45 smanjena u odnosu na kontrolu. Smanjena ekspresija proteina Rubisco u skladu je s rezultatima Kosove i sur. (2013), koji su pokazali da abiotički stres dovodi do smanjenja asimilacije CO_2, a smanjena stopa asimilacije CO_2 odražava se smanjenjem količine enzima Rubisco. Povećana količina proteina br. 9 i 14 vjerojatno je rezultat degradacije proteina Rubisco. Naime, ako se usporede molekulske mase identificiranih proteina, uočava se da je masa proteina br. 9 (oko 18,5 kDa) i 14 (oko 29,7 kDa) znantno manja od molekulske mase velike podjedinice enzima Rubisco (oko 56 kDa), dok jedino protein br. 45 po molekulskoj masi (oko 53 kDa) odgovara nativnom proteinu. Poznato je da proizvod razgradnje enzima ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaze/oksigenaze ima manju molekulsku masu od nativnog proteina (Taylor i sur., 2009). Degradacija enzima Rubisco zabilježena je i u šećernoj repi (Hajheidari i sur., 2005) i riži (Salekdeh i sur., 2002) pod utjecajem vodnog stresa. Istraživanje Rogić i sur. (2015) pokazalo je da oksidacijski stres dovodi do ubrzne degradacije proteina Rubisco, što je u skladu s mojim rezultatima jer je u prijašnjem istraživanju dokazana prisutnost oksidacijskog stresa u klijacima duhana tretiranima sa AgNP i $AgNO_3$ (Biba, 2016).

Ugljična anhidraza je metaloenzim koji sadrži cink, a katalizira reverzibilnu pretvorbu HCO_3^- u CO_2, kako bi se osiguralala dovoljna količina CO_2 koju će fiksirati enzim Rubisco. Više biljke sadrže tri evolucijski različite porodice ovog enzima: alfa, beta i epsilon. Beta ugljična anhidraza u duhanu i uročnjaku identificirana je kao protein koji ima antioksidacijsku ulogu pri abiotičkom stresu (Slaymaker i sur., 2002) i tijekom virusne infekcije (Wang i sur., 2009). U mom eksperimentu s klijancima, beta ugljična anhidraza identificirana je na 4 mjesta (proteini br. 36-39, Tablica 11), a ekspresija je

bila povećana u oba tipa tretmana. Poznato je da različiti čimbenici abiotičkog stresa povećavaju sintezu ovog enzima; pokazano je da salinitet i osmotski stres rezultiraju povećanjem ukupne enzimske aktivnosti beta ugljične anhidraze i razine mRNA koja kodira predviđenu kloroplastnu izoformu (Yu i sur., 2007). Rezultati istraživanja koja su proveli Vannini i sur. (2013) djelomično su u skladu sa mojim rezultatima; naime, izlaganje biljke *Eruca sativa* tretmanu sa $AgNO_3$ uzrokovalo je specifično povećanje ekspresije ugljične anhidraze, dok tretmani sa AgNP nisu izazvali promjene u odnosu na kontrolu. Povećana ekspresija ovog enzima mogla bi biti posljedica degradacije i smanjene aktivnosti enzima Rubisco.

Trioza fosfat izomeraza (eng. *triose phosphate isomerase*, TPI) katalizira reverzibilnu konverziju izomera trioza fosfata (dihidroksiaceton fosfata i D-gliceraldehid 3-fosfata). U dosadašnjim radovima dokazano da joj je ekspresija inducirana sušom i solnim stresom (Riccardi i sur., 1998; Salekdeh, 2002; Yan i sur., 2005). U mom istraživanju protein br. 34 (Tablica 11) identificiran je kao citosolna trioza fosfat izomeraza, čija je ekspresija bila povećana nakon oba tipa tretmana.

Protein br. 61 (Tablica 11) identificiran je kao malat dehidrogenaza (eng. *malate dehydrogenase*, MDH), enzim koji katalizira posljednju reakciju Krebsovog ciklusa, oksidaciju malata u oksaloacetat, čime se isti regenerira i ulazi u novi ciklus. Wang i sur. (2016) dokazali su da povećana ekspresija citosolne malat-dehidrogenaze doprinosi povećanoj toleranciji na solni i temperaturni stresa u jabuci i to putem regulacije redukcijskog stanja i količine salicilne kiseline u biljci. U radu Vannini i sur. (2014) također je zabilježena povećana ekspresija citoplazmatske malat dehidrogenaze u korijenu pšenice u tretmanu s AgNP. U mom eksperimentu s klijancima ekspresija je bila povećana nakon oba tipa tretmana.

5.1.3. Proteini vezani uz stres (abiotički i biotički)

Svi su živi organizmi izloženi utjecaju različitih tipova stresa koji mogu biti rezultat biotičkih i abiotičkih čimbenika. Biljke, kao sesilni organizmi, nemaju mogućnost učinkovitog izbjegavanja izvora stresa pa su morale razviti mnoge prilagodbe na promijenjive okolišne uvjete. Različite vrste abiotičkog i biotičkog stresa mogu u biljci uzrokovati denaturaciju i gubitak biološke aktivnosti proteina. U takvim

uvjetima, da bi neutralizirale utjecaj stresa, biljke mogu mijenjati ekspresiju gena i akumulaciju proteina (Yan i sur., 2005).

Rubisco aktivaza je ATP-azni protein koji katalizira karbamilaciju aktivnog mjesta enzima Rubisco s CO_2. Proteini br. 59 i 64 (Tablica 11) identificirani su kao kloroplastna ribuloza bifosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza 2. Ekspresija ove izoforme Rubisco aktivaze bila je povećana je nakon oba tipa tretmana. Fukayama i sur. (2012) dokazali su da prekomjerna ekspresija Rubisco aktivaze smanjuje kapacitet asimilacije CO_2 smanjivanjem sadržaja Rubisco-a u listovima riže. Moji rezultati su u skladu s tim, budući da je i ekspresija velike podjedinice enzima Rubisco (protein br. 45, Tablica 11) bila smanjena u odnosu na kontrolu.

Protein br. 1 (Tablica 11), identificiran kao nukleozid difosfat kinaza 1 (NDP kinaza 1), pokazao je povećanu ekspresiju u oba tipa tretmana. Utvrđeno je da NDP kinaze reguliraju redoks stanje stanice i povećavaju toleranciju na višestruki stres u transgeničnim biljkama Arabidopsisa (Moon i sur., 2003). Rogić i sur. (2015) uočili su da je ekspresija adenozin kinaze 2 bila povećana u tumorskom tkivu kaktusa tretiranom manitolom, a pojačana sinteza ovog proteina bila je povišena i tijekom izloženosti različitih biljnih vrsta solnom stresu (Weretilnyk i sur., 2001; Aghaei i sur., 2008; Sobhanian i sur. 2010). Osim kategorije Odgovor na stres (abiotički), ovaj protein svrstala sam i u kategoriju Metabolizam nukleotida jer ima ključnu ulogu u sintezi nukleozid trifosfata.

Protein br. 49 (Tablica 11) identificiran je kao kloroplastni stromalni protein toplinskog šoka od 70 kDa. Njegova je ekspresija bila nepromijenjena u tretmanu s AgNP, ali povećana nakon izlaganja klijanaca ionskom srebru, $AgNO_3$. Proteini toplinskog šoka (eng. *heat shock proteins*, HSPs) štite stanice od različitih stresnih stanja. Iako su proteini HSP prvotno identificirani kao proteini čija ekspresija ovisi o toplinskom stresu, njihova se uloga pokazala važna i u ostalim stresnim stanjima, poput suše, povišenog saliniteta ili infekcija patogena (Boston i sur., 1996; Bhattarai i sur., 2007; Breiman, 2014; Rogić i sur., 2015). Sva ta stanja uzrokuju djelomično razmatanje proteina što može dovesti do smanjenja njihove funkcije. Stoga sam ovaj protein osim u kategoriju Odgovor na stres (abiotički), svrstala i u kategoriju Smatanje proteina. Naime, porodice Hsp70 i Hsp60 sprečavaju agregaciju stresom denaturiranih ili nascentnih

proteina te na taj način pomažu u pravilnom smatanju i slaganju drugih proteina (Sharma i sur., 2010; Finka i sur., 2011).

Glicinom bogati RNA-vezujući protein (eng. *glycine-rich RNA-binding protein*, GRP) (proteini br. 3 i 4, Tablica 11) nije pokazao promjenu u ekspresiji nakon tretmana s AgNP, dok je nakon izlaganja klijanca ionskom srebru ekspresija bila povećana u odnosu na kontrolu. Istraživanja Kim i sur. (2008) pokazala su da GRP7 ima učinak na odgovor biljke *A. thaliana* na stres izazvan sušom, povišenim salinitetom te hladnoćom. Također se pokazalo da je mRNA ovog proteina pojačano eksprimirana u odgovoru duhana na vodni stres, sušu, solni stres te izloženost hladnoći ili vrućini (Lee i sur. 2009). Osim u kategoriju Odgovor na stres (abiotički), ovaj protein svrstala sam i u kategoriju Transkripcija molekule RNA jer veže jednolančanu RNA i DNA i uključen je u alternativni splicing molekule mRNA.

U kategoriju Odgovor na stres (abiotički) svrstala sam i predviđeni protein CBSX3 koji sadrži domene cistationin β-sintaze (eng. *cystathionine beta synthase*, CBS) (protein br. 12, Tablica 11). Njegova ekspresija bila je povišena u odgovoru i na AgNP i na $AgNO_3$. O skupini proteina s CBS domenama zna se vrlo malo, a pretpostavlja se da reguliraju enzimsku aktivnost tioredoksina te tako održavaju homeostazu staničnih redoks-reakcija i sudjeluju u biljnom razvoju i odgovoru na stres (Yoo i sur. 2011). Mitohondrijski CBSX3 mogao bi imati ulogu u različitom odgovoru biljaka na stres uzrokovan ionima i nanočesticama srebra (Banić, 2017).

Vannini i sur. (2014) pokazali su da tretmani sa AgNP i $AgNO_3$ mijenjaju ekspresiju nekih hitinaza i proteina povezanih s patogenezom (PR), proteina za koje se smatra da su primarno uključeni u odgovor biljke na biotički stres. Međutim, promijenjena ekspresija tih proteina zabilježena je i u korijenu nekih biljaka izloženih različitim koncentracijama metala (Beáta i Ildikó, 2011). Ovi podaci iz literature djelomično su u skladu s mojim rezultatima; naime, ekspresija kisele hitinaze PR-P (protein br. 25, Tablica 11) ostala je nepromjenjena nakon tretmana sa AgNP u odnosu na kontrolu, dok sam nakon tretmana sa $AgNO_3$ zabilježila povećanu ekspresiju. S druge strane, ekspresija endohitinaze A (protein br. 42, Tablica 11) bila je smanjena nakon oba tipa tretmana.

5.1.4. Proteini vezani uz odgovor na oksidacijski stres

Oksidacijski stres definiran je kao pojava neravnoteže oksidansa i antioksidansa u smjeru oksidansa, što može uzrokovati štetu u stanici (Sies, 1985). Oksidansi, koji u biljnoj stanici nastaju u procesu aerobnog metabolizma, skup su međuprodukata oksidacije vode do molekularnog kisika u fotosintetskom transportnom lancu elektrona (Arora i sur., 2002). Takvi međuprodukti tvore reaktivne oblike kisika (ROS) kao što su superoksidni radikal (O_2^-), singletni kisik ($^1O_2$), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikal (OH^-). Kada koncentracija ROS nadmaši obrambeni antioksidacijski kapacitet stanice, javlja se oksidacijski stres. Oksidacijski stres je glavni čimbenik oštećenja u biljkama, a javlja se kao posljedica izlaganja biljke stresnim uvjetima kao što su povišeni salinitet, temperaturni ekstremi, suša, teški metali i dr. (Balen i sur., 2011; Cvjetko i sur., 2014; Rogić i sur., 2015). Očituje se u oštećenjima membranskih lipida, oksidaciji proteina te aktivaciji antioksidacijskog sustava obrane u biljnim stanicama. Kako bi se obranile od stresa i štetnih učinaka toksičnih reaktivnih oblika kisika, biljke su uz neenzimatski sustav, razvile i enzimatski antioksidacijski obrambeni sustav koji uključuje superoksid dismutazu (SOD), katalazu (CAT), askorbat peroksidazu (APX), pirogalol peroksidazu (PPX), glutation reduktazu (GR), monodehidroaskorbat reduktazu (MDHAR), dehidroaskorbat reduktazu (DHAR), glutation S-transferazu (GST) i glutation peroksidazu (GPX).

Superoksid dismutaza (SOD) je metaloenzim koji djeluje na superoksidni radikal. S obzirom da se je to prvi oblik ROS koji se formira u mnogim biološkim sustavima kao produkt jednovalentne redukcije kisika, SOD možemo smatrati primarnom obranom protiv kisikovih radikala. Na temelju metala koji se nalazi u aktivnom mjestu, superoksid dismutaze se dijele u četiri skupine: željezo (Fe-SOD), mangan (Mn-SOD), nikal (Ni^{3+}-SOD) i bakar-cink (Cu/Zn-SOD) superoksid dismutaze, a može ih se naći u različitim odjeljcima unutar stanice (Ahmad i sur., 2010). Nakon tretmana nanočesticama srebra i ionskim srebrom povećanje aktivnosti SOD nađeno je u klijancima vrste *Ricinus communis* (Yasur i Rani, 2013). Ipak, razlika u aktivnosti antioksidacijskih enzima ne mora odražavati razliku u njihovoj ekspresiji, no ekspresija se u ovom kontekstu tek rijetko istražuje. U proteomu korijena biljke *Eruca sativa* izložene tretmanima sa AgNP i $AgNO_3$ identificirana je SOD, čija je ekspresija bila povećana u oba tipa tretmana u odnosu na kontrolu (Vaninni i sur. 2013). Među proteinskim biljezima identificiranim u

mom eksperimentu nalazi se željezo superoksid dismutaza (protein br. 27, Tablica 11), a njegova je ekspresija bila povišena nakon tretmana i s AgNP i s $AgNO_3$. Pojačana ekspresija ovog proteina u skladu je s povećanom aktivnošću SOD spektrofotometrijski izmjerenom u prethodnom istraživanju utjecaja AgNP i $AgNO_3$ na klijance duhana (Biba, 2016).

Askorbat peroksidaza ima ključnu ulogu u uklanjanju vodikovog peroksida, nastalog u biljnoj stanici uslijed procesa lipidne peroksidacije (Štefan i sur., 2007), pretvarajući ga u vodu (Ahmad i sur., 2010). Povećanje ekspresije APX povezano je s kontrolom regulacije razine H_2O_2 u procesu oksidacijskog stresa potaknutog metalima (Quereshi i sur. 2005). Hatami i Ghorbanpour (2013) zabilježili su povećanje aktivnosti APX u listovima *Pelargonium zonale* nakon tretmana s AgNP, a Qin i sur. (2005) u *Fragaria x ananassa* te Cvjetko i sur. (2017) u korjenčićima luka nakon tretmana s $AgNO_3$. U mom eksperimentu identificirana su dva izozima APX (proteini br. 30, 31 i 32, Tablica 11), čija je ekspresija bila povećana u odgovoru na tretmane nanočesticama i ionskim srebrom. Pojačana ekspresija ovog enzima također je u skladu s povećanom aktivnošću APX spektrofotometrijski izmjerenom u ranije izvedenom istraživanju (Biba, 2016).

5.1.5. Proteini vezani uz sintezu proteina

Da bi odgovorili na specifične stresore, biljke moraju regulirati proces sinteze proteina. U svom eksperimentu identificirala sam tri elongacijska faktora koje sam svrstala u kategoriju Biosinteza proteina.

Protein br. 7 (Tablica 11), identificiran kao eukariotski translacijski elongacijski inicijacijski faktor 5A-2, jedini je pokazao povećanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana. Vannini i sur. (2014) uočili su povećanu ekspresiju eukariotskog translacijskog inicijacijskog faktora 5A-2 i 60S kiselog ribosomalnog proteina PO u klijancima pšenice tretiranim sa AgNP. Ti su enzimi uključeni u sintezu proteina u korijenu. Eukariotski inicijacijski faktor 5A2 uključen je u selektivnu translaciju mRNA i može igrati važnu ulogu u prilagodbi biljaka prema promjenjivim uvjetima okoline (Wang i sur., 2012).

Ekspresija proteina sličnog elongacijskom faktoru P (protein br. 10, Tablica 11) te eukariotskog translacijskog inicijacijskog faktora 5A-3 (protein br. 8, Tablica 11) nije

bila promijenjena nakon tretmana sa AgNP u odnosu na kontrolu, dok je nakon tretmana sa $AgNO_3$ bila povećana.

5.2. Promjene u proteomskoj slici korijena duhana

Svi identificirani proteini iz tretmana sa AgNP pokazuju razlikovnu ekspresiju u odnosu na kontrolu, ipak među njima je najveći broj proteina korijena sa smanjenom ekspresijom u odgovoru na tretman AgNP. Više od polovice identificiranih proteina iz tretmana sa $AgNO_3$ također pokazuju smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu. Najveći broj proteina sa smanjenom ekspresijom iz oba tretmana pripada kategorijama Odgovor na stres, Metabolizam ugljikohidrata i Odgovor na oksidacijski stres (Tablica 12). Na neke od identificiranih proteina detaljnije ću se osvrnuti.

5.2.1. Proteini vezani uz metabolizam ugljikohidrata

Trioza fosfat izomeraza (TPI) katalizira reverzibilnu konverziju izomera trioza fosfata (dihidroksiaceton fosfata i D-gliceraldehid 3-fosfata). U mom istraživanju protein br. 17 (Tablica 12) identificiran je kao citosolna trioza fosfat izomeraza, a ekspresija je bila smanjena nakon oba tipa tretmana. Isti protein identificiran je i u klijancima nakon oba tipa tretmana i to sa povećanom ekspresijom, što ukazuje na to da tkiva iste biljne vrste koja se razlikuju po starosti i stupnju razvitka mogu dati drugačiji odgovor na isti stresor, a u skladu je s podacima iz literature (Synková i Valcke, 2001; Upadhyaya i sur., 2015). Istraživanja Dorion i sur. (2012) pokazala su da smanjenje ekspresije citosolne TPI u korijenu krumpira ima veliki utjecaj na promjenu distribucije ugljika u primarnom metabolizmu biljaka.

Protein br. 20 (Tablica 12), koji je identificiran kao predviđena citosolna gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, pokazao je smanjenu ekspresiju nakon oba tipa tretmana. Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (eng. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPD) je ključni enzim u glikolizi koji katalizira prvi korak zamjene D-gliceraldehid 3-fosfata u 3-fosfo-D-glicerol fosfat. GAPD se može okarakterizirati kao multifunkcionalni protein koji pokazuje funkcijsku raznovrsnost u biljkama (Rius i sur., 2008; Bronwyn i sur., 2009). Gancedo i Flores (2008) dokazali su kako taj enzim glikolitičkog puta ima i ulogu u drugim, nemetaboličkim procesima zvanima

moonlighting functions. Jedna od uloga pripisana tom proteinu je i sudjelovanje u odgovoru stanice na oksidacijski stres (Sirover, 2011). Otkriveno je kako GAPD reagira s H_2O_2 u vrsti *A. thaliana* pa Hancock i sur. (2005) pretpostavljaju da navedeni enzim posreduje u signalnom putu ROS koji djeluju kao signalne molekule (Mittler, 2002) za ekspresiju gena uključenih u biosintezu antioksidacijskih enzima i drugih molekula uključenih u obranu biljke. Rogić i sur. (2015) detektirali su smanjenu ekspresiju ovog enzima nakon izlaganja tumorskog tkiva kaktusa *Mamillaria gracilis* solnom stresu.

Malat dehidrogenaza (protein br. 11 i 21, Tablica 12), enzim identificiran u sva tri tkiva duhana, u korijenu je kao odgovor na oba tipa tretmana pokazao smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu. U eksperimentu s klijancima ekspresija ovog proteina bila je povećana nakon oba tipa tretmana. Tkiva iste biljne vrste koja se razlikuju po starosti i stupnju razvitka mogu dati drugačiji odgovor na isti stresor (Synková i Valcke, 2001; Upadhyaya i sur., 2015), pa je to mogući razlog navedene razlikovne ekspresije. Nadalje, smanjena aktivnost MDH izmjerena je u korijenu krastavca nakon hipoksije (He i sur., 2015) te korijenu vrste *Lotus japonicas* nakon vodnog stresa (Rocha i sur., 2010).

5.2.2. Proteini vezani uz odgovor na stres (abiotički i biotički)

Osmotin je protein induciran stresom koji pripada porodici proteina vezanih uz patogene, *pathogenesis-related (PR)-5 family*, koji sudjeluje u toleranciji na različite vrste abiotičkog i biotičkog stresa u biljaka, a protektivna uloga osmotina obuhvaća povišenu temperaturu, hladnoću, salinitet i sušu (Kumar i sur., 2015). Za vrijeme stresa, osmotin pomaže u akumulaciji osmolita prolina, koji neutralizira ROS i slobodne radikale (Kishor i Sreenivasulu., 2014). U mom istraživanju, protein br. 2 (Tablica 12) identificiran je kao osmotin, koji je pokazao smanjenu ekspresiju nakon tretmana sa AgNP. Ekspresija osmotina u biljkama izloženim stresu metalima do sada nije istražena.

Aneksini su porodica membranskih proteina ovisna o ionima Ca^2 , a imaju ulogu u transportu i organizaciji membrana te regulaciji aktivnosti ionskih kanala i metabolizmu fosfolipida (Gerke i Moss, 2002). Nadalje, za neke članove ove porodice proteina iz biljke *A. thaliana* utvrđeno je i da mogu imati ulogu peroksidaza i sudjelovati u nadvladavanju oksidacijskog stresa (Gorecka i sur., 2005) te da igraju važnu ulogu na odgovoru na različite tipove abiotičkog stresa (Gorecka i sur., 2007; Jami i sur., 2008; Rubio i sur., 2009). U mom istraživanju identificirane su dvije izoforme ovog proteina (proteini br. 9 i

10, Tablica 12). Ekspresije obje izoforme smanjene su nakon oba tipa tretmana. U radu Clark i sur. (2009) autori navode da su tijekom izlaganja biljke stresnim uvjetima neki aneksini pojačano eksprimirani, a drugi smanjene ekspresije u odnosu na kontrolu te stoga uloga pojedinačnog proteina ove porodice može biti različita za određeni tip stresa.

U ovu kategoriju proteina svrstala sam i protein potporodice 1 germin-like, (proteini br. 14,15 i 16, Tablica 12). Članovi superporodice *germin-like* su prisutni u različitim biljnim vrstama i igraju ulogu u biljnom razvoju i odgovoru biljke na stresne uvjete (Wang i sur., 2013). Ekspresija ovog proteina bila je smanjena nakon oba tipa tretmana u odnosu na kontrolu, što pokazuje da je korijen biljaka duhana bio izložen vrlo jakom stresu.

Protein br. 6 (Tablica 12) identificiran je kao nukleozid difosfat kinaza 1 (NDP kinaza 1) s promijenjenom ekspresijom u oba tretmana srebrom. Uključenost ovog proteina u odgovor na abiotički stres opisala sam u poglavlju 5.1.3.

5.2.3. Proteini vezani uz odgovor na oksidacijski stres

Prvu crtu obrane od ROS čini skupina enzima superoksid dismutaza (SOD), koje pomoću metalnih kofaktora reduciraju visoko reaktivni peroksidni radikal u slabije reaktivni H_2O_2. Različiti stanični odjeljci imaju različite tipove SOD: one sa željeznim kofaktorom (Fe-SOD) lokalizirane su u kloroplastima, s manganskim kofaktorom (Mn-SOD) nalaze se u mitohondrijima i peroksisomima, a izoforme SOD s kofaktorima bakra i cinka (Cu/Zn-SOD) prisutne su u gotovo svakom staničnom odjeljku te u izvanstaničnom prostoru (Alscher i sur. 2002). Među proteinskim biljezima identificiranim u korijenu duhana nalazi se Fe-SOD (protein br. 8, Tablica 12), čija je ekspresija bila smanjena nakon oba tipa tretmana. Isti protein identificiran je u klijancima duhana, međutim s pojačanom ekspresijom za oba tretmana. S druge strane, protein br. 16 (Tablica 12), identificiran u korijenu kao Mn-SOD, imao je povećanu ekspresiju nakon tretmana i sa AgNP i sa $AgNO_3$. Povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima događa se kada je biljka pod blagim stresom protiv kojeg se uspješno može boriti, dok konstantan ili jaki stres uzrokuje smanjenje aktivnosti, kao što navode Qian i sur. (2013) u svom istraživanju na biljci *A. thaliana*. Smanjena aktivnost enzima SOD zabilježena je u korijenju odraslih biljaka koje su bile izložene tretmanima sa 100 μM AgNP i $AgNO_3$ (Bajan, 2017).

Smanjenje aktivnosti SOD ukazuje na zasićenje antioksidacijskog sustava zbog velike koncentracije ROS (Van der Lubben i sur., 2003), i pokazatelj je oksidacijskog stresa pa se na taj način može objasniti smanjenje ekspresije za Fe-SOD u tkivu korijena. Osim toga, ovakvi rezultati mogu biti posljedica različitog odgovora pojedinih izoformi SOD jer rezultati istraživanja drugih autora pokazuju da različiti geni za SOD pokazuju različit ekspresijiski profil u odgovoru biljke na različite vrste okolišnog stresa (Lu i sur., 2011; Feng i sur., 2016).

Protein br. 12 (Tablica 12) identificiran kao protein sličan anionskoj peroksidazi 1 povezanoj sa suberinizacijom, proteini br. 25 i 29 (Tablica 12) identificirani kao monodehidroaskorbat reduktaza te protein br. 28 (Tablica 12) identificiran kao katalaza, također pripadaju antioksidacijskim enzimima. Proteini br. 12 , 28 i 29 pokazali su smanjenu ekspresiju nakon tretmana i sa AgNP i sa $AgNO_3$, što također govori u prilog zasićenju antioksidacijskog sustava zbog velike koncentracije ROS-a. Ovi rezultati u skladu su s rezultatima prethodnog istraživanja u kojem je u korijenju biljaka duhana nakon tretmana sa 100 μM AgNP i $AgNO_3$ izmjerena povećana razina ROS-a i smanjena aktivnost pirogalol i askorbat peroksidaze (Bajan, 2017).

5.2.4. Proteini vezani uz metabolizam aminokiselina

Glutamat dehidrogenaza igra važnu ulogu u detekciji povećane koncentracija ROS u stanici i koji sukladno tome modulira odgovor te iste stanice (Skopelitis i sur., 2006), a obavlja funkciju metaboliziranja suviška amonijevih iona stvaranjem glutamata. Nastali glutamat može dalje ići u sintezu prolina koji sudjeluje u regulaciji osmolarnosti u stresnim uvjetima (Skopelitis i sur., 2006). Gouia i sur. (2003) istražili su utjecaj kadmija na aktivnosti enzima uključenih u metabolizam aminokiselina graha, pri čemu su detektirali izrazito pojačanu aktivnost glutamat dehidrogenaze. Moji rezultati odstupaju od tih podataka jer je ekspresija glutamat dehidrogenaze (protein br. 19, Tablica 12) u oba tipa tretmana smanjena. S druge strane, rezultati mog istraživanja u skladu su s rezultatima Zhang i sur. (2014), gdje je tretman sa 100 μM bakrom značajno smanjio aktivnost glutamat dehidrogenaze u korijenu biljke *Luffa cylindrica*.

5.2.5. Proteini vezani uz obranu od gljivica i bakterija

U ovoj kategoriji identificiran je prekursor protugljivičnog proteina CBP20 induciranog patogenima i ranjavanjem kao protein br. 1 i 32 (Tablica 12), s dvoznačnim odgovorom na primijenjene tretmane. Ovaj protein se pojačano sintetizira kada je korijen biljke napadnut gljivicama i bakterijama. No, Hansel i sur. (1999) pokazali su da je sinteza proteina CBP20 inducirana i teškim metalima, osobito cinkovim kloridom, te da je ekspresija ovog proteina regulirana transkripcijski i posttranskripcijski te količina proteina ne odgovara uvijek količini sintetizirane mRNA. Pojačana ekspresija proteina povezanih s patogenezom (eng. *pathogenesis related,* PR) otkrivena je i u novijim istraživanjima utjecaja teških metala na biljke (Aina i sur., 2007; Bah i sur., 2010).

U ovoj skupini identificiran je i protein 1B povezan s patogenezom (eng. *pathogenesis-related protein 1B*) (protein br. 31, Tablica 12), koji se također pojačano eksprimira pri izloženosti biljke biotičkom ili abiotičkom stresu, što je u skladu s rezultatima koje sam dobila u svom istraživanju za oba tipa tretmana.

5.3. Promjene u proteomskoj slici lista duhana

Među identificiranim proteinima lista duha najveći je broj proteina sa smanjenom ekspresijom u odgovoru na tretman sa AgNP. Što se tiče tretmana s $AgNO_3$, prevladavaju proteini koji pokazuju smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu. Najveći broj proteina sa smanjenom ekspresijom iz oba tretmana pripada kategorijama Metabolizam ugljikohidrata i Fotosinteza. Na neke od identificiranih proteina detaljnije ću se osvrnuti.

5.3.1. Proteini vezani uz fotosintezu

Prema očekivanjima, fotosinteza se kao i u klijancima i ovdje pokazala kao jedan od važnih bioloških procesa na koje su izlaganja biljaka duhana tretmanima sa AgNP i $AgNO_3$ imala najveći utjecaj. Kategorija je predstavljena s proteinima koji pripadaju i PSI i PSII. Ukupno je devet identificiranih proteina svrstanih u ovu kategoriju (proteini br. 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 25 i 27, Tablica 13), a njih osam pokazalo je smanjenu ekspresiju u odgovoru na tretman sa AgNP. Svih osam proteina sa smanjenom ekspresijom nakon tretmana identificirano je i u tkivu klijanaca te je njihova važnost i uloga u odgovoru na stresne uvjete opisana u poglavlju 5.1.1. Protein koji u klijancima nije identificiran i

jedini je pokazao povećanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana je kloroplastni klorofil a-b vezujući protein 8 koji pripada porodici klorofil a-b vezujućih proteina (eng. *light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins*, LHCB), koji je prisutan kao komponenta i PSI i PSII. Xu i sur. (2012) pokazali su da proteini porodice LHCB igraju važnu ulogu u singalnom putu apscizinske kiseline moduliranjem homeostaze molekula ROS-a. Povećana količina proteina LHC pronađena je nakon izlaganja biljaka kombiniranom stresu hladnoća/svjetlo te hladnoća/mrak (Soitamo i sur., 2008).

5.3.2. Proteini vezani uz metabolizam ugljikohidrata

Velika podjedinica enzima ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza (Rubisco) identificirana je na 2 različita mjesta (proteini br. 6 i 38, Tablica 13) s promijenjenom ekspresijom u oba tipa tretmana, iako je ekspresija proteina br. 6 bila pojačana, a proteina br. 38 smanjena u odnosu na kontrolu. Povećana količina proteina br. 6 vjerojatno je rezultat degradacije proteina Rubisco. Degradacija enzima Rubisco zabilježena je i u istraživanju klijanaca i opisana je u poglavlju 5.1.2.

Kloroplastna ribuloza-fosfat-3-epimeraza (protein br. 17, Tablica 13) je enzim Calvinovog ciklusa, koji je u stanicama lista odrasle biljke duhana imao smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu nakon oba tipa tretmana, dok u klijancima nije identificiran. Akumulacija ovog proteina zabilježena je nakon izlaganja stanica modrozelene alge *Synechocystis* sp. povišenom salinitetu (Tripathi i Muller, 2015) , dok su smanjenu ekspresiju ribuloza-fosfat-3-epimeraze pokazali Uberegui i sur. (2015) u biljci *A. thaliana* u uvjetima pojačane svjetlosti, što pokazuje da je ekspresija ovog proteina pod utjecajem okolišnih čimbenika.

Beta ugljična anhidraza osim u klijancima, identificirana je i među proteinima lista (protein br. 19, Tablica 13). Ekspresija ovog proteina ostala je nepromijenjena nakon tretmana sa AgNP, dok je nakon tretmana sa $AgNO_3$ ekspresija bila povišena. Detaljan opis uloge ovog enzima dan je u poglavlju 5.1.2., a moji rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja koja su proveli Vannini i sur. (2013).

Plastidna aldolaza (u bazi UniProt imenovana kao fruktoza 1,6-bisfosfat aldolaza), koja katalizira reverzibilnu reakciju razgradnje fruktoza 1,6-bisfosfata u dihidroksiaceton fosfat, identificirana je kao proteini br. 23, 24, 26 (Tablica 13). Prema

Zeng i sur. (2015) plastidna aldolaza i njena povećana aktivnost igraju važnu ulogu u odgovoru na solni stres u vrsti *Camellia oleifera*, što nije u skladu s rezultatima mog istraživanja budući da je ekspresija ovog proteina bila smanjena u oba tipa tretmana. No, istraživanja Lu i sur. (2012) pokazuju da je ovaj protein kodiran većim brojem gena te da različite izoforme reagiraju različitim stupnjem ekspresije, ovisno o vrsti primijenjenog abiotičkog stresa.

Kao i u klijancima i korijenu, trioza fosfat izomeraza (TPI) identificirana je i među proteinima lista duhana (protein br. 18, Tablica 13), a ekspresija je bila smanjena nakon oba tipa tretmana. U klijancima je nakon oba tipa tretmana zabilježena povećana ekspresija, dok je u korijenu u oba tipa tretmana ekspresija bila smanjena. Ovo je još jedan primjer kako tkiva iste biljne vrste, koja se razlikuju po starosti i stupnju razvitka mogu dati drugačiji odgovor na isti stresor (Synková i Valcke, 2001; Upadhyaya i sur., 2015).

Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (proteini br. 29 i 30, Tablica 13) u tkivu lista duhana pokazala je smanjenu ekspresiju nakon tretmana sa AgNP. Ovaj protein zastupljen je i opisan među proteinima korijena u poglavlju 5.2.2, a odgovor na tretman sa AgNP također je smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu.

Protein br. 32 (Tablica 13) identificiran je kao moguća mitohondrijska malat dehidrogenaza (MDH), enzim Krebsovog ciklusa, koji je nakon tretmana sa AgNP pokazao smanjenu ekspresiju, dok nakon tretmana sa $AgNO_3$ nije bilo promjena. S druge strane, isti protein (br. 11, Tablica 12) identificiran je u tkivu korijena sa smanjenom ekspresijom u oba tipa tretmana. Detaljan opis uloge i funkcije enzima MDH dan je u poglavlju 5.1.2.

5.3.3. Proteini vezani uz odgovor na stres (abiotički i biotički)

Osmotin pripada porodici proteina povezanoj s patogenezom (PR)-5, koja pruža toleranciju na biotički i abiotički stres u biljkama. Pokazano je da se osmotin nakuplja u netretiranim stanicama i kulturi stanica tretiranih s NaCl (Singh i sur. , 1987; Bressan i sur., 1987). To ukazuje da bi normalna razina osmotina mogla biti važna za normano funkcioniranje stanica koje nisu izložene stresu. U mom eksperimentu zabilježena je povišena ekspresija osmotina (protein broj 12, Tablica 13) za tretman sa AgNP, dok je

nakon tretmana sa $AgNO_3$ bila smanjena. Isti protein identificiran je među proteinima korijena duhana, gdje je kao odgovor na AgNP ekspresija proteina bila smanjena (poglavlje 52.2).

Glicinom bogati RNA-vezujući protein (protein br. 2, Tablica 13) pokazao je smanjenu ekspresiju nakon tretmana sa AgNP, dok je nakon izlaganja biljke $AgNO_3$ ekspresija u ostala nepromijenjena u odnosu na kontrolu. Isti protein identificiran je i u klijancima gdje nije pokazao promjenu u ekspresiji nakon tretmana sa AgNP, dok je nakon izlaganja klijanca $AgNO_3$ ekspresija bila povećana u odnosu na kontrolu. Mogući uzrok različitog odgovora na isti izvor stresa jest razlika u starosti i stupnju razvitka tkiva (Synková i Valcke, 2001; Upadhyaya i sur., 2015).

5.3.4. Proteini vezani uz odgovor na oksidacijski stres

Pod brojem 21 (Tablica 13) identificiran je protein sličan glutation S-transferazi. Vannini i sur. (2014) zabilježili su nakupljanje glutation S-transferaze u korijenu pšenice tretirane sa AgNP. Isti učinak primijećen je i u nekoliko biljnih vrsta u uvjetima stresa uzrokovanog teškim metalima (Hossain i sur., 2012), dok je u proteomu biljke *Eruca sativa* zabilježena povećana ekspresija u tretmanu sa $AgNO_3$ (Vannini i sur., 2013). Međutim, u mom istraživanje ekspresija ovog proteina smanjena je u odgovoru na tretman sa AgNP, a nepromjenjena u odgovoru na tretman sa $AgNO_3$. Do smanjenja aktivnosti antioksidacijskih enzima može doći ako se ioni metala vežu na ključna mjesta u enzimu. Razlog smanjene ekspresije može biti oslobađanje iona Ag^+.

5.3.5. Proteini vezani uz sintezu ATP-a

ATP sintaza je važan enzim koji proizvodi energiju u obliku ATP-a. Sastoji se od dvije regije, FO i F1. Podjedinice alfa i beta čine srž katalitičke regije F1. Rotacija centralnog dijela-γ podjedinice naspram alfa i beta podjedinice koji je okružuju dovodi do hidrolize ATP-a na tri razdvojena katalitička mjesta na beta podjedinici. CF1 epsilon podjedinica kloroplastne ATP sintaze važna je za transport protona i dio je rotacijskog mehanizma, a identificirana je kao protein br. 3 (Tablica 13), koji je pokazao smanjenu ekspresiju nakon tretmana sa AgNP, a povećanu nakon tretmana sa $AgNO_3$. Isti protein identificiran je i u klijancima (proteini br. 5 i 6, Tablica 11), gdje je ekspresija bila povišena nakon oba tipa tretmana. Vannini i sur. (2013) objavili su da je izlaganje vrste *Eruca sativa* tretmanu sa $AgNO_3$ uzrokovalo je specifično povećanje ekspresije nekoliko

proteina koji su uključeni u proizvodnju energije uključujući i podjedinice ATP sintaze plastida i mitohondrija. Ova povišena ekspresija može pomoći stanicama da proizvedu više energije kako bi olakšale odgovor na stres izazvan ionima srebra.

Identificirane proteine u proteinskim profilima klijanaca, korijena i lista duhana tretiranih nanočesticama i ionima srebra svrstala sam prema biološkim procesima i analizirala njihove ekspresije. Povećanu ekspresiju u odgovoru na AgNP najviše pokazuju proteini klijanaca duhana. Smanjena ekspresija u odgovoru na AgNP prevladava u korijenu i listovima duhana. Tretman otopinom $AgNO_3$, tj. ionima srebra, uzrokovao je najviše promjena u sva tri tipa tkiva, odnosno ekspresija najvećeg broja različitih proteina pokazala se drugačijom nego u kontroli. Među proteinima s razlikovnom ekspresijom najviše je onih koji su na neki način povezani s odgovorom na stresne čimbenike, te održavanjem homeostaze u stresnim uvjetima.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da su AgNP i $AgNO_3$ toksični za oba razvojna stadija duhana jer dovode do povećanog stvaranja kisikovih radikala, što je pokazano i u prethodnim istraživanjima mjerenjem razine ROS-a (Biba, 2016; Bajan, 2017), a potvrđeno je identifikacijom različito eksprimiranih proteina. No, rezultati ovog istraživanja također ukazuju da su i klijanci i odrasle biljke duhana sposobni aktivirati antioksidacijske enzime koji razgrađuju ROS, iako ne jednako uspješno. S obzirom da je u klijanaca zabilježena povećana ekspresija većine identificiranih proteina, to navodi na zaključak da se klijanci uspješnije nose sa ovim stresnim uvjetima, kojima su bili izloženi od stadija sjemenke 30 dana. S druge strane, odrasle biljke koje su bile izložene istim stresnim uvjetima kao i klijanci, ali u odraslom stadiju i kroz period od 7 dana, pokazale su smanjenu ekspresiju velikog broja proteina, osobito u korijenu koji je bio u direktnom kontaktu s testnim otopinama, što navodi na zaključak da je primijenjeni stres bio prejak i uzrokovao inhibiciju velikog broja proteina koji imaju uloge u odgovoru na stresne okolišne uvjete.

Za konačne potvrde o utjecaju AgNP na proteom duhana svakako su potrebna daljnja istraživanja. Sama identifikacija i kvantifikacija proteina nije dovoljna da se do kraja razjasne mehanizmi koje biljka koristi u odgovoru na stres, odnosno u obrani od istog. Zbog toga bi znanstvena istraživanja trebalo nastaviti analizama proteinskog

statusa stanice; lokalizacije, modifikacije, interakcije, aktivnosti i funkcije određenih proteina.

ZAKLJUČAK

6. ZAKLJUČAK

1. Tretmani s AgNP i $AgNO_3$ uzrokuju slične promjene u proteomu klijanaca duhana, uglavnom kroz pojačanu ekspresiju proteina, koji su najčešće vezani uz fotosintezu, metabolizam ugljikohidrata i odgovor na stres. U slučaju nekoliko proteina postoji razlika u odgovoru na tretmane s AgNP i $AgNO_3$.

2. Tretmani s AgNP i $AgNO_3$ uzrokuju slične promjene u proteomu korijena duhana, uglavnom kroz smanjenje ekspresije proteina, koji su najčešće vezani uz odgovor na stres, metabolizam ugljikohidrata i odgovor na oksidacijski stres. Svi proteini iz tretmana s AgNP pokazuju razlikovnu ekspresiju u odnosu na kontrolu.

3. Tretmani s AgNP i $AgNO_3$ uzrokuju slične promjene u proteomu lista duhana, uglavnom kroz smanjenje ekspresije proteina, koji su najčešće vezani uz metabolizam ugljikohidrata i fotosintezu.

4. Usporedbom odgovora klijanaca s odraslim biljkama može se zaključiti da se klijanci uspješnije nose sa stresom izazvanim tretmanima s AgNP i $AgNO_3$ u odnosu na odrasle biljke.

POPIS LITERATURE

7. POPIS LITERATURE

Aghaei, K., Ehsanpour, A.A., Komatsu, S. (2008): Proteome analysis of potato under salt tress. J. Proteome. Res. 7: 4858–4868

Ahmad, P., Jaleel, C.A., Salem, M.A., Nabi, G., Sharma, S. (2010): Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. Crit. Rev. Biotechnol. 30(3): 161-175.

Aina, R., Labra, M., Fumagalli, P., Vannini, C., Marsoni, M., Cucchi, U., Bracale, M., Sgorbati, S., Citterio, S. (2007): Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. Environ. Exp. Bot. 59(3): 381-392.

Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. J. Exp. Bot. 372(53): 1331-1341.

Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. (2002): Oxidative stress and antioxidative systems in plants. Curr. Sci. 82: 1227-1238.

Bah, A.M., Sun, H., Chen, F., Zhou, J., Dai, H., Zhang, G., Wu, F. (2010): Comparative proteomic analysis *of Typha angustifolia* leaf under chromium, cadmium and lead stress. J. Hazard Mater. 184(1-3): 191-203.

Bajan, Ž. (2017): Oksidacijski stres u biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L.) izloženim nanočesticama srebra. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Balen, B., Pavoković, D., Peharec Štefanić, P., Krsnik-Rasol, M. (2011a): Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Sveučilišni priručnik, Zagreb, Hrvatska sveučilišna naklada

Balen, B., Tkalec, M., Sikić, S., Tolić, S., Cvjetko, P., Pavlica, M., Vidaković-Cifrek, Z. (2011b): Biochemical responses of *Lemna minor* experimentally exposed to cadmium and zinc. Ecotoxicology 20(4): 815-826.

Banić, E. (2017): Promjene u ultrastrukturi, proteomu i fotosintetskoj učinkovitosti klijanaca duhana (*Nicotiana tabacum* L.) pod utjecajem nanočestica i iona srebra. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Beáta, P., Ildikó, M. (2011): Plant defense against heavy metals: the involvement of pathogenesis-related (PR) proteins. U: Awaad, A.S., Kaushik, G., Govil, J.N., urednici. Recent progress in medicinal plants. Vol. 31: Mechanism and action of phytoconstituents. New Delhi: Studium Press (India) Pvt. Ltd. p. 179–205.

Bhattarai, K.K., Li, Q., Liu, Y., Dinesh-Kumar, S.P., Kaloshian, I. (2007): The MI-1-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1. Plant Physiol. 144: 312–323.

Biba, R. (2016): Utjecaj nanočestica srebra na pojavu oksidacijskog stresa i ekspresiju proteina u klijancima duhana (*Nicotiana tabacum*). Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Boston, R.S., Viitanen, P.V., Vierling, E. (1996): Molecular chaperones and protein folding in plants. Plant Mol. Biol. 32: 191-222.

Brar, D.S., Khush., G.S. (1994): Cell and tissue culture for plant improvement. U: Basra AS (ur.) Mechanisms for plant growth and improved productivity – Modern approaches. New York, Mercel Dekker Inc, 229-278.

Breiman, A. (2014): Plant Hsp90 and its co-chaperones. Curr. Protein. Pept. Sci. 15: 232-244.

Bressan, R.A., Singh, N.K., Handa, A.K., Mount, R., Clithero, J., Hasegawa, P.M. (1987): Stability of altered genetic expression in cultured plant cells adapted to salt, u: Drought Resistance in Plants, Physiological and Genetic Aspects eds Monti L., Porceddu E., urednik. (Brussels: EEC) 41–58.

Clark, G., Konopka-Postupolska, D., Hennig, J., Roux, S. (2010): Is annexin 1 a multifunctional protein during stress responses? Plant Signal Behav.. 5(3): 303-307.

Cvjetko, P., Milošić, A., Domijan, A.M., Vinković Vrček, I., Tolić, S., Peharec Štefanić, P., Letofsky-Papst, I., Tkalec, M., Balen, B. (2017): Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. Ecotoxicol. Environ. Saf. 137: 18–28.

Cvjetko, P., Zovko, M., Balen, B. (2014): Proteomics of heavy metal toxicity in plants. Arh. Hig. Rada. Toksikol. 65: 1-18.

Dorion, S., Clendenning, A., Jeukens, J., Salas, J.J., Parveen, N., Haner, A.A., Law, R.D., Force, E.M., Rivoal, J. (2012): A large decrease of cytosolic triosephosphate isomerase in transgenic potato roots affects the distribution of carbon in primary metabolism. Planta 236(4): 1177-90.

Faurobert, M., Pelpoir, E., Chaib, J. (2007): Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. Methods Mol. Biol. 335: 9-14.

Feng, K., Yu, J., Cheng, Y., Ruan, M., Wang, R., Ye, Q., Zhou, G., Li, Z., Yao, Z., Yang, Y., Zheng, Q., Wan, H. (2016): The SOD gene family in tomato: identification, phylogenetic relationships, and expression patterns. Front. Plant Sci. 7: 1279.

Finka, A., Mattoo, R.U.H., Goloubinoff, P. (2011): Meta-analysis of heatand chemically upregulated chaperone genes in plant and human cells. Cell Stress Chaperones 16: 15–31

Flick, C.E., Evans, D.A. (1984): Tobacco. U: Sharp WR, Evans DA, Ammirato PV, Yamada Y (ur.) Hand book of plant cell culture. London, Collier Macmillan Publishers, 606-630.

Fukayama, H. et al. (2012): Overexpression of rubisco activase decreases the photosynthetic CO_2 assimilation rate by reducing Rubisco content in rice leaves. Plant Cell Physiol. 53: 976–986.

Gancedo, C., Flores, C. (2008): Moonlighting proteins in yeasts. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72: 197–210.

Gao, J.T., Guimera, R., Li, H., Pinto, I.M., Sales-Pardo, M., Wai, S.C., Rubinstein, B., Li, R. (2011): Modular coherence of protein dynamics in yeast cell polarity system. Proc. Natl. Acad. Sci. 108(18): 7647-7652.

Gerke, V., Moss, S. E. (2002): Annexins: from structure to function. Physiol. Rev. 82: 331–371.

Gorecka, K.M., Konopka-Postupolska, D., Hennig, J., Buchet, R., Pikula, S. (2005): Peroxidase activity of annexin 1 from *Arabidopsis thaliana*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 336: 868-875.

Gorecka, K.M,, Thouverey, C., Buchet, R., Pikula, S. (2007): Potential role of annexin AnnAt1 from *Arabidopsis thaliana* in pH-mediated cellular response to environmental stimuli. Plant Cell Physiol. 48: 792-803.

Gururani, M.A., Venkatesh, J., Phan Tran, L.-S. (2015): Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. Molecular. Plant 9: 1304-1320.

Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., Sadeghian, S.Y., Ober, E.S., Salekdeh, G.H. (2005): Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. Proteomics 5: 950–960

Hamaček, L. (2016): Promjene u ultrastrukturi i proteomu stanica korijena luka (*Allium cepa* L.) pod utjecajem nanočestica i iona srebra. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Hancock, J.T., Henson, D., Nyirenda, M., Desikan, R., Harrison, J., Lewis, M., Hughes, J., Neill, S.J. (2005). Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. Plant Physiol. Biochem. 43: 828–835.

Haramina, T. (2008): Rizici uporabe nanočestica, Polimeri. 29(2): 115.

Hatami, M., Ghorbanpour, M. (2013): Effect of nanosilver on physiological performance of Pelargonium plants exposed to dark storage. J. Hortic. Res. 21(1): 15-20.

He, L., Li, B., Lu, X., Yuan, L., Yang, Y., Yuan, Y., Du, J., Guo, S. (2015): The effect of exogenous calcium on mitochondria, respiratory metabolism enzymes and ion transport in cucumber roots under hypoxia. Sci. Rep. 25;5: 11391.

Horvatić, A. (2014): Spektrometrija masa fragmenata peptidnih iona nastalih djelovanjem radikala. Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Horvatić, A., Cindrić, M. (2008): Analiza farmaceutskih peptida spektrometrijom masa. Znanstveni rad, Medicina: glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora, Podružnica Rijeka. 45(3): 258-263.

Hossain, A.M., Piyatida, P.A., Teixeira da Silva, J., Fujita, M. (2012): Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. J. Bot. http://dx.doi.org/10.1155/2012/872875, Article ID 872875.

Hossain, Z., Komatsu, S. (2013): Contribution of proteomic studies towards understanding plant heavy metal stress response. Front. Plant Sci. 3: 310.

Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., Schlager, J.J. (2005): In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicol. In Vitro 19(1) 9: 975-983.

Ishihara, S., Takabayashi, A., Ido, K., Endo, T., Ifuku, K., Sato, F. (2007): Distinct functions for the two PsbP-like proteins PPL1 and PPL2 in the chloroplast lumen of *Arabidopsis*. Plant Physiol. 145: 668–679.

Jami, S.K., Clark, G.B., Turlapati, S.A., Handley, C.A., Roux, S.J., Kirti, P.B. (2008): Ectopic expression of an annexin from *Brassica juncea* confers tolerance to abiotic and biotic stress treatments in transgenic tobacco. Plant Physiol. Biochem. 46: 1019-30.

Jeanjean, R., Latifi, A., Matthijs C.P., H., Havaux,, M. (2008): The PsaE subunit of photosystem I prevents light-induced formation of reduced oxygen species in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biochim. Biophys. Acta 1777: 308–316.

Jeon, Y.M., Pa, S.K., Lee, M.Y. (2011): Proteomic analysis of hepatotoxicity induced by titanium nanoparticles in mouse liver. J. Korean. Soc. Appl. Biol. Chem. 54: 852–859.

Kim, J.S., Jung, H.J., Lee, H.J., Kim, K.A., Goh, C.H., Woo, Y., Oh, S.H., Han, Y.S., Kang, H. (2008): Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 55(3):455-66.

Kishor, P. B. K., Sreenivasulu, N. (2014). Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? Plant Cell Environ. 37:300–311.

Kosova, K., Prasil, I.T., Vítámvás, P. (2013): Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition. Int. J. Mol. Sci. 14:6757–6789.

Kumar, M., Padula, P.M., Davey, P., Pernice, M., Jiang, Z., Sablok, G., Contreras-Porcia, L., Ralph J.P. (2017): Proteome analysis reveals extensive light stress-response reprogramming in the seagrass *Zostera muelleri* (Alismatales, Zosteraceae) metabolism. Front. Plant Sci. 7: 2023.

Kumari, M., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2009): Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. Sci. Total. Environ. 407: 5243-5246.

Kumar, A.S., Kumari, H.P., Kumar, S.G., Mohanalatha, C., Kavi Kishor, P.B. (2015): Osmotin: a plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin. Front. Plant Sci. 6: 163.

Lee, M.O., Kim, K., P., Kim, B., Hahn, J.S., Hong, C.B. (2009): Flooding stress-induced Glycine-rich RNA-binding protein from *Nicotiana tabacum*. Mol. Cells 27: 47-54.

Lok, C.N., Ho, C.M., Chen, R., He, Q.Y., Yu, W.Y., Sun, H., Tam, P.K., Chiu, J.F., Che, C.M. (2006): Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. J. Proteome Res. 5(4): 916-924.

Lu, Y., Feng, Z., Bian, L., Xie, H., Liang, J. (2011): miR398 regulation in rice of the responses to abiotic and biotic stresses depends on CSD1 and CSD2 expression. Funct. Plant Biol. 38: 44–53.

Lu, W., Tang, X., Huo, Y., Xu, R., Qi, S., Huang, J., Zheng, C., Wu, C.A. (2012): Identification and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase genes in *Arabidopsis* reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses. Gene 503(1): 65-74.

Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., Kolmakov, A. (2010): Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. Sci. Total. Environ. 408: 3053–3061.

Mittler, R. (2002): Oxidative stress, antioxidans and stress tolerance. Trends. Plant Sci. 7: 405-410.

Moon, H., Lee, B., Choi, G., Shin, D., Prasad, D.T., Lee, O., Kwak, S.S., Kim, D.H., Nam, J., Bahk, J., Hong, J.C., Lee, S.Y., Cho, M.J., Lim, C.O., Yun, D.J. (2003): NDP kinase 2 interacts

with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(1): 358-63.

Mustafa G., Sakata K., Hossain Z., Komatsu S. (2015): Proteomic study on the effects of silver nanoparticles on soybean under flooding stress. J. Proteomics 122: 100-118.

Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15: 473-479.

Pavoković, D., Križnik, B., Krsnik-Rasol, M. (2012): Evaluation of protein extraction methods for proteomic analysis of non-model recalcitrant plant tissues. Croat. Chem. Acta 85: 177–183.

Pineda, M,. Sajnani, C., Barón, M. (2010): Changes induced by the *Pepper mild mottle tobamovirus* on the chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana*. Photosynth. Res. 103:31–45.

Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L., Fu, Z. (2013): Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ion on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. J. Environ. Sci. 25(9): 1947-1956.

Qin, Y., Zhang, S., Zhang, Lm Zhu, D., Syed, A. (2005): Response of in vitro strawberry to silver nitrate ($AgNO_3$). J. Hortic. Sci. 40: 747-751.

Qureshi, M.I., Israr, M., Abdin, M.Z., Iqbal, M. (2005). Responses of *Artemisia annua* L. to lead and salt-induced oxidative stress. Environ. Exp. Bot. 53: 185-193.

Riccardi, F., Gazeau, P., de Vienne, D., Zivy, M. (1998): Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification. Plant Physiol. 117: 1253–1263.

Rius, S.P., Casati, P., Iglesias, A.A., Gomez-Casati, D.F. (2008): Characterization of *Arabidopsis* lines deficient in GAPC-1, a cytosolic NAD-dependent glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. Plant Physiol. 148: 1655-1667.

Rocha, M., Licausi, F., Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A.R., van Dongen, J.T. (2010): Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine

aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. Plant Physiol. 152(3): 1501-13.

Rogić, T., Horvatić, A., Tkalec, M., Cindrić. M., Balen, B. (2015): Proteomic analysis of *Mammillaria gracilis* Pfeiff. in vitro-grown cultures exposed to iso-osmotic NaCl mannitol. Plant Cell Tissue Organ Cult. 122: 127-146.

Rubio, L., Laohavisit, A., Mortimer, J.C., Dark, A., Davies, J.M. (2009): Salt stress signalling involves ATP release and *Arabidopsis* annexin 1. Comp. Biochem. Physiol. Part. A: Mol. Integr. Physiol. 153: 193-194.

Salekdeh, G.H., Siopongco, J., Wade, L.J., Ghareyazie, B., Bennett, J. (2002): Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. Proteomics 2: 1131–1145.

Savolainen, K., Alenius, H., Norppa, H., Pylkkänen, L., Tuomi, T., Kasper, G. (2010): Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies-A review. Toxicology 269: 92-104.

Sétif, P., Fischer, N., Lagoutte, B., Bottin, H., Rochaix, J.D. (2002): The ferredoxin docking site of photosystem I, Biochim. Biophys. Acta 1555: 204–209.

Sharma, S.K., De Los Rios, P., Christen, P., Lustig, A., Goloubinoff, P. (2010): The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase. Nat. Chem. Biol. 6: 914–920.

Sierro, N., Battey, J.N., Ouadi, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., Goepfert, S., Peitsch, M.C., Ivanov, N.V. (2014): The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. Nat. Commun. 5: 3833.

Sies, H. (1985): Oxidative stress, Introductory remarks. U: Sies H (ur.) Oxidative Stress. London, Academic Press. 1-8.

Silva, T.U. (2011): An evaluation of coating material dependent toxicity of silver nanoparticles. ETD Paper. 1229.

Singh, N.K., Bracker, C.A., Hasegawa, P.M., Handa, A.K., Buckel, S., Hermodson, M.A. (1987): Characterization of osmotin: a thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. Plant Physiol. 85: 529–536.

Sirover, M.A. (2011): On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. Biochim. Biophys. Acta 1810: 741–751.

Skopelitis, D.S., Paranychianakis, N.V., Paschalidis, K.A., Pliakonis, E.D., Delis, I.D., Yakoumakis, D.I., Kouvarakis, A., Papadakis, A.K., Stephanou, E.G., Roubelakis-Angelakis, K.A. (2006): Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. Plant Cell 18: 2767–2781.

Slaymaker, D.H., Navarre, D.A., Clark, D., del Pozo, O., Martin, G.B., Klessig, D.F. (2002): The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 11640–11645.

Sobhanian, H., Razavizadeh, R., Nanjo, Y., Ehsanpour, A.A., Jazii, F.R., Motamed, N. (2010): Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. Proteome Sci. 8: 19–25.

Soitamo, A.J., Piippo, M., Allahverdiyeva, Y., Battchikova, N., Aro, E.M. (2008): Light has a specific role in modulating *Arabidopsis* gene expression at low temperature. BMC Plant Biol. 8: 13.

Synková, H., Valcke, R. (2001): Response to mild water stress in transgenic Pssu-ipt tobacco. Physiol. Plant 112(4): 513-523.

Štefan, L., Tepšić, T., Zavidić, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007): Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. Medicina, 43: 84-93.

Tamburino, R., Vitale, M., Ruggiero, A., Sassi, M., Sannino, L., Arena, S., Costa, A., Batelli, G., Zambrano, N., Scaloni, A., Grillo, S., Scotti, N. (2017): Chloroplast proteome response to drought stress and recovery in tomato (*Solanumlycopersicum* L.). BMC Plant Biol. 17:40.

Taylor, N.L., Tan, Y.F., Jacoby, R.P., Millar, H.A. (2009): Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. J. Proteomics 72: 367–378.

Uberegui, E., Hall, M., Lorenzo, Ó., Schröder, W.P., Balsera, M. (2015): An *Arabidopsis* soluble chloroplast proteomic analysis reveals the participation of the Executer pathway in response to increased light conditions. J. Exp. Bot. 66(7): 2067-77.

Van der Lubben, I.M., Kersten, G., Fretz, M.M., Beuvery, C., Coos Verhoef, J., Junginger, H.E. (2003): Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. Vaccine, 28: 1400-1408.

Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., Prinsi, B., Marsoni, M., Espen, L., Bracale, M. (2013): Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. PLOS ONE 8:e6875 doi: 10.1371/journal.pone.0068752

Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., De Mattia, F., Bruni, I., Marsoni, M., Bracale, M. (2014): Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings. J. Plant Physiol. 171(13): 1142–1148.

Vinocur, B., Altman, A. (2005): Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. Curr. Opin. Biotechnol. 6: 123–132.

Wang, L., Xu, C., Wang, C., Wang, Y. (2012): Characterization of a eukaryotic translation initiation factor 5A homolog from *Tamarix androssowii* involved in plant abiotic stress tolerance. BMC Plant Biol. 12:118–24.

Wang, Q.J., Feechan, A., Yun, B.W., Shafiei, R., Hofmann, A., Taylor, P., Xue, P., Yang, F.Q., Xie, Z.S., Pallas, J.A. (2009): S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. J. Biol. Chem. 284: 2131–2137.

Wang, Q.J., Sun, H., Dong, Q.L., Sun, T.Y., Jin, Z.X., Hao, Y.J., Yao, Y.X. (2016): The enhancement of tolerance to salt and cold stresses by modifying the redox state and salicylic acid content via the cytosolic malate dehydrogenase gene in transgenic apple plants. Plant Biotechnol. J. 1-12.

Wang, T., Chen, X., Zhu, F., Li, H., Li, L., Yang, Q., Chi, X., Yu, S. Liang, X. (2013): Characterization of peanut germin-like proteins, AhGLPs in plant development and defense. PLoS One. 8(4): e61722. doi: 10.1371/journal.pone.0061722.

Weretilnyk, E.A., Alexander, K.J., Drebenstedt, M., Snider, J.D., Summers, P.S., Moffatt, B.A. (2001): Maintaining methylation activities during salt atress. The involvement of adenosine kinase. Plant Physiol. 125: 856–865

Upadhyaya, H., Roy, J., Dutta, S. (2015): Age dependent biochemical responses in *Camellia sinensis*. FBLS. 3(2): 39-43

Xu, Y. H., Liu, R., Yan, L., Liu, Z.Q., Jiang, S.C., Shen, Y.Y., Wang, X.F., Zhang, D.P. (2012): Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis*. J. Exp. Bot. 63 (3): 1095-1106.

Yan, S., Tang, Z., Su, W., Sun, W. (2005): Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. Proteomics 5: 235–244.

Yasur, J., Rani, P.U. (2013): Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 20: 8636-8648.

Yoo, K.S., Ok, S.H., Jeong, B.C., Jung, K.W., Cui, M.H., Hyoung, S., Lee, M.R., Song, H.K., Shin, J.S. (2011): Single cystathionine β-synthase domain–containing proteins modulate development by regulating the thioredoxin system in *Arabidopsis*. Plant Cell 23: 3577-3594.

Yu, S., Zhang, X., Guan, Q., Takano, T., and Liu, S. (2007): Expression of a carbonic anhydrase gene is induced by environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.). Biotechnol. Lett. 29:89–94.

Zeng, Y., Tan, X., Zhang, L., Long, H., Wang, B., L, Z., Yuan, Z. (2015): A fructose-1,6-biphosphate aldolase gene from *Camellia oleifera*: molecular characterization and impact on salt stress tolerance. Mol. Breed. 35: 17.

Zhang, L., He, X., Chen, M., An, R., An, X., Li, J. (2014): Responses of nitrogen metabolism to copper stress in *Luffa cylindrica* roots. J. Plant Nutr. Soil. Sci. 14 (3): 616-624

Zheng, L., Hong, F.S., Lu, S.P., Liu, C. (2005): Effect of nano-TiO_2 on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. Biol. Trace. Elem. Res. 104: 83-92.

Zuverza-Mena, N., Armendariz, R., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. (2016): Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: root growth reduction and modifications in the nutritional value. Front. Plant Sci. 7: 90.

ŽIVOTOPIS

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13. travnja 1992. godine u Ogulinu. Osnovnu školu Lucije Capan završila sam u Tounju. 2007. godine upisala sam Prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Karlovcu. Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2011. godine. Tijekom ljetnog semestra akademske godine 2015/2016. bila sam demonstratorica na praktikumu Uvoda u proteomiku. Na završnoj godini studija pohađala sam metodičku praksu nastave biologije u OŠ Antuna Kovačića, Kotarnica u Zagrebu te metodičku praksu kemije u V. gimnaziji i II. gimnaziji u Zagrebu. Izvan fakulteta radila sam u udruzi Svjetionik života koja za cilj ima uspostavljenje kvalitete života romskoj djeci i djeci bez odgovarajuće roditeljske podrške.