Identifikacija i kvantifikacija proteina djelomično neuređene tercijarne strukture (IDP) ekotipova uročnjaka (Arabidopsis thaliana L.) nakon izlaganja suši

Bračun, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:350906

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

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Laura Bračun

Identifikacija i kvantifikacija proteina djelomično neuređene tercijarne strukture (IDP) ekotipova uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.) nakon izlaganja suši

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom doc. dr. sc. Dubravka Pavokovića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA PROTEINA DJELOMIČNO NEUREĐENE TERCIJARNE STRUKTURE (IDP) EKOTIPOVA UROČNJAKA (*Arabidopsis thaliana* L.) NAKON IZLAGANJA SUŠI

Laura Bračun

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Republika Hrvatska

Nedostatak vode jedan je od glavnih čimbenika okolišnog stresa, a s obzirom na klimatsku regiju, on može biti dugotrajan ili kratkotrajan i nasumičan. Sesilni organizmi poput biljaka morali su razviti posebne strategije kojima prebrođuju i preživljavaju sušna razdoblja. Neke od tih strategija variraju s obzirom na genotip. U sklopu ovog diplomskog rada, suši su izložena četiri ekotipa biljke *Arabidopsis thaliana*, porijeklom iz četiri različite klimatske regije. Razlike u toleranciji nedostatka vode ustanovljene su na razini proteoma. Uspoređivane su aktivnosti peroksidaze kao izravan pokazatelj jačine oksidativnog stresa, relativne koncentracije Hsp70 (engl. *heat-shock protein*) kao indikatora generalnog stresa, i relativne koncentracije proteina djelomično neuređene strukture (IDP) koji sudjeluju u integraciji signalnih puteva te stoga imaju bitnu ulogu u mnogim biljnim procesima, uključujući one koji odgovaraju na abiotički stres. Utvrđeno je povećanje aktivnosti peroksidaze i ekspresije Hsp70 u sušnim uvjetima u usporedbi s kontrolom. Uočena je i promjena ekspresije nekih IDP u uvjetima suše s obzirom na kontrolu. Također, spektrometrijom masa identificirano je 25 IDP, a potom je razina njihove neuređenosti određena bioinformatičkim alatima. Za 21 protein potvrđeno je da posjeduju barem jednu dugu neuređenu regiju.

(46 stranica, 37 slika, 10 tablica, 49 literaturnih navoda; jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: neuređenost proteina, Hsp70, gvajakol peroksidaza, abiotski stres

Voditelj: dr. sc. Dubravko Pavoković, doc.

Ocjenitelji: dr. sc. Dubravko Pavoković, doc.

dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

dr. sc. Silvija Černi, doc.

Rad prihvaćen: 14.2.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

QUANTIFICATION AND IDENTIFICATION OF INTRINSICALLY DISORDERED PROTEINS (IDPs) IN DIFFERENT ECOTYPES OF *Arabidopsis thaliana* L. AFTER EXPOSURE TO DROUGHT

Laura Bračun

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Republic of Croatia

Water deficit is one of the crucial factors causing environmental stress and it can be, considering a particular climate region, either long-term or short-term and random. Sessile organisms like plants had to develop special strategies in order to overcome and survive periods of drought, some of which vary depending on the genotype. This thesis involves exposure to drought of four different ecotypes of *Arabidopsis thaliana* native to different climate regions and establishing their relative tolerance to water deficit on the level of proteome. We compared peroxidase activities as indicator of oxidative stress and relative concentrations of Hsp70 (heat-shock protein) as indicator of general stress. We also determined relative concentrations of intrinsically disordered proteins (IDPs) as they are involved in integration of various signalling pathways and therefore take part in many plant processes in general, including abiotic stress responses. Compared to control, a rise was shown in both peroxidase activity and Hsp70 expression during drought conditions. Expression of some IDPs also changed after exposure to drought in comparison to control. Also, 25 IDPs were identified by mass spectrometry and their sequence structure disorder has been evaluated by bioinformatic tools. Twenty one of them were confirmed to have at least one long disordered region.

(46 pages, 37 figures, 10 tables, 49 references; original language: Croatian)

Key words: protein disorder, Hsp70, guaiacol peroxidase, abiotic stress

Supervisor: dr. Dubravko Pavoković, Asst. Prof.

Reviewers: dr. Dubravko Pavoković, Asst. Prof.

dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof.

dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Thesis accepted: February 14, 2018

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
1.1. Suša kao abiotički stres 1
1.2. Proteini neuređene tercijarne strukture (IDP) 2
1.3. Obitelj proteina šaperona Hsp70 3
1.4. Obitelj enzima peroksidaza 4
1.5. Ekotipovi biljke Arabidopsis thaliana L. 5
1.6. Ciljevi 5
2. MATERIJALI I METODE 6
2.1. Biljni materijal 6
2.2. Priprema biljnog materijala 6
2.3. Izolacija proteina 8
2.4. Ukoncentriravanje proteina membranskom ultrafiltracijom 9
2.5. Određivanje koncentracije proteina 9
2.6. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze 9
2.7. Analiza ekspresije proteina razdvajanjem natrijev dodecil-sulfat poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE) 10
2.8. Imunodetekcija proteina na membrani 10
2.9. Elektroforeza proteina u dvije dimenzije (2D-PAGE) 11
2.10. Bojanje srebrovim nitratom 13
2.11. Denzitometrijska analiza proteinskih mrlja alatom ImageMaster™ 2D Platinum 13
2.12. Spektrometrija masa 13
2.13. Bioinformatička karakterizacija proteina 15
2.14. Bioinformatička analiza neuređenosti proteina 15
2.14.1. SLIDER 15
2.14.2. PSIPRED v3.3 i DISOPRED3 15
2.14.3. DisEMBL 1.5 15
3. REZULTATI 16
3.1. Aktivnost enzima gvajakol peroksidaze 16
3.2. Relativna kvantifikacija Hsp70 16
3.3. Identifikacija IDP u proteomu vrste Arabidopsis thaliana 17
3.3.1. Diferencijalna ekspresija IDP 17
3.3.2. Identifikacija proteina spektrometrijom masa 18
3.3.3. Denzitometrijska analiza alatom ImageMaster™ 2D Platinum 20
3.4. Bioinformatička analiza neuređenosti 25
4. RASPRAVA 37
5. ZAKLJUČAK 43
6. LITERATURA 44

Popis kratica

2,4-D	diklorofenoksioctena kiselina
A	apsorbancija
AA/Bis	akrilamid/bisakrilamid
ABA	abscizinska kiselina
APS	amonijev persulfat
APX	askorbat peroksidaza
ATP	adenozin trifosfat
BAP	6-benzilaminopurin
BSA	albumin goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*)
CBB	*Coomassie Brilliant Blue* boja
DTT	ditiotreitol
GDC	kompleks glicin dekarboksilaze (engl. *glycine decarboxylase complex*)
GPX	gvajakol peroksidaza
Hsp	protein termičkog šoka (engl. *heat-shock protein*)
IDP	protein nativno neuređene strukture (engl. *intrinsically disordered protein*)
LDR	duga neuređena regija (engl. *long disordered region*)
LTI	induciran niskom temperaturom (engl. *low temperature induced*)
MALDI	matricom pomognuta desorpcija/ionizacija laserom (engl. *laser assisted laser desorption ionization*)
MeCN	acetonitril
MS	spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*)
OEC	kompleks za razvoj kisika (engl. *oxygen evolving complex*)
PAGE	poliakrilamid gel elektroforeza
PVP	polivinil pirolidon
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species*)
RuBisCO	ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza
SDS	natrijev dodecil-sulfat
SOD	superoksid dismutaza
TBS	Tris pufer (engl. *Tris-buffered saline*)
TEMED	tertrametiletilendinamin
TFA	trifluoroctena kiselina

1. UVOD

1.1. Suša kao abiotički stres

Dostupnost vode u okolišu bitna je za rast i razvoj svih organizama. S obzirom na klimatsko područje, godišnje doba i akutne vremenske uvjete, količina i dostupnost vode u okolišu variraju stvarajući kratkotrajne ili dugotrajne sušne uvjete, što je posebno stresno za sesilne organizme poput biljaka koji jednostavno moraju izdržati različite okolišne faktore i promjene. Biljke su stoga razvile složene mehanizme kojima odgovaraju na sušu i deficit vode, a oni uključuju izbjegavanje suše (engl. *drought escape*) gdje biljke završavaju životni ciklus prije nastupanja suhog razdoblja, izbjegavanje dehidracije (engl. *dehydration avoidance*) ili održavanje vodnog potencijala stanica tijekom suhog razdoblja smanjenjem gubitka vode i/ili povećanjem njenog unosa, i toleranciju dehidracije (engl. *dehydration tolerance*) što se svodi na održavanje normalnih staničnih funkcija bez obzira na deficit vode (Harb i sur., 2010).

Stres izazvan sušom nastupa kada stopa transpiracije listovima nadmaši stopu unosa vode korijenom (Lawlor i Cornic, 2002) zbog čega je prvi fizički odgovor biljke na gubitak vode zatvaranje puči izazvan padom vodnog potencijala i biljnim hormonom abscizinskom kiselinom (ABA) (Reddy i sur., 2004). Izravna posljedica zatvaranja puči je smanjen unos CO_2 odnosno pad stanične koncentracije CO_2 što utječe na cijeli metabolizam ugljika i proizvodnju energije; reakcije asimilacije ugljika su limitirane zbog ograničene dostupnosti CO_2 enzimu ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO), raste razina fotorespiracije te se stoga mjenja omjer škroba i saharoze (Kunert i sur., 2015, Reddy i sur., 2004). Ovakva promjena utječe na kretanje slobodnih fosfata (P_i) i njihov slabiji unos u kloroplast zbog čega pada potencijal sinteze ATP-a reakcijama fotosinteze. Pigmenti listova sada hvataju više svjetlosne energije nego što mogu predati dalje što rezultira predajom elektrona vodi i nastankom reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS) poput superoksidnog radikala O_2^- i vodikovog peroksida H_2O_2 (Broin i sur., 2000, Reddy i sur., 2004). ROS nastaju u stanicama i prilikom stanja koja nisu stresna te imaju uloge signalnih molekula, ali njihova povećana koncentracija je zabrinjavajuća jer mogu uzrokovati oštećenja DNA, oksidaciju proteina i peroksidaciju lipida čime onemogućuju normalan rad stanice, i zajednički je simptom mnogih stresova (Kunert i sur., 2015, Reddy i sur., 2004).

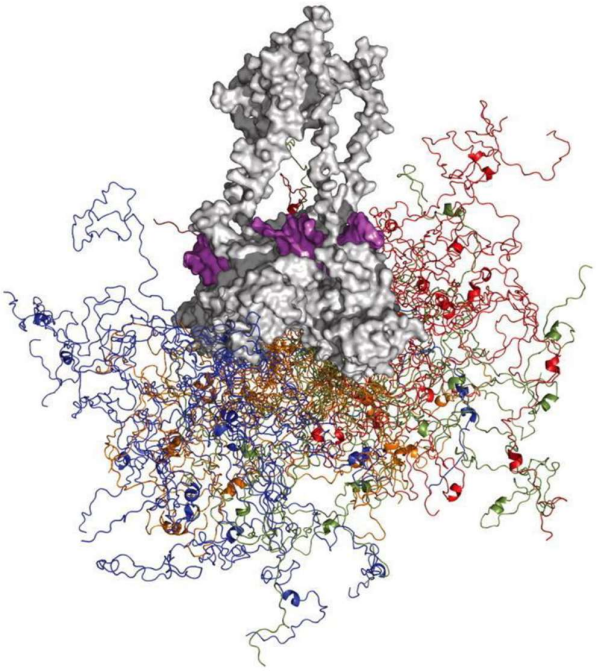
Ipak, biljna stanica ima načine kojima se bori protiv nekontroliranog nastanka i akumulacije ROS. Fotosintetski aparat se štiti razgradnjom dijela klorofila, sintezom protektivnih pigmenata poput karotenoida i ksantofila, inhibicijom fotosustava II i disipacijom viška primljene energije u obliku topline cikličkom fotosintezom (Broin i sur., 2000, Reddy i sur., 2004, Takahashi i sur.,

2009). Povećaju se i ekspresija i aktivnost antioksidativnih enzima koji neutraliziraju ROS uz pomoć svojih antioksidativnih supstrata. Indukcija sustava za antioksidaciju proporcionalna je jačini osjećanog stresa (Harb i sur., 2010).

Biljke počinju osjećati deficit vode vrlo rano otkad suša nastupi, a njihovi stanični i fiziološki odgovori uvelike ovise o samom genotipu organizma. Iako se o njima puno zna na fiziološkoj razini, nedovoljno je poznato na molekularnoj i biokemijskoj razini (Harb i sur., 2010).

1.2. Proteini neuređene tercijarne strukture (IDP)

Poznato je da funkcija proteina polazi od njegove definirane trodimenzionalne strukture. Za dio je struktura proteina ova pretpostavka važeća, ali postoje proteinske regije, ponekad i cijeli proteini, kojima nedostaje stabilna tercijarna struktura u nativnim uvjetima, a ipak obavljaju bitne biološke funkcije (Slika 1.). Stoga je bitno razumjeti način djelovanja, funkcije i mogućnosti ovih nativno neuređenih proteina (engl. *intrinsically disordered proteins*, IDP) i dugih neuređenih regija (engl. *long disordered regions*, LDR).



Slika 1. Primjer proteina neuređene tercijarne strukture. Struktura proteina tumor supresora p53 i njegove nativno neuređene N-terminalne transaktivacijske domene prikazane kao skup od 20 konformacija (preuzeto iz Wells i sur., 2008).

IDP postoje u svim životnim carstvima, a najrašireniji su u eukariotima gdje je bioinformatičkim analizama predviđeno da je 23 do 28% ukupnih proteina većinski neuređeno, a preko 50% ih sadrži LDR (Sun i sur., 2013). U slučaju biljke *Arabidopsis thaliana*, 30% proteoma čine IDP (Covarrubias i sur., 2017).

Neuređene proteinske regije razlikuju se od uređenih odnosno smotanih prema aminokiselinskom sastavu gdje su hidrofobne aminokiseline relativno neprisutne zbog svoje tendencije da formiraju nakupine 'bježeći' od vode te umjesto njih većinu aminokiselinskog slijeda čine one polarne i nabijene zajedno s prolinom (Radivojac i sur., 2007). Ta posebnost u sekvenci omogućila je razvoj raznih algoritama i bioinformatičkih alata za procjenu neuređenosti (He i sur., 2009).

Funkcionalna prednost IDP su mogućnost da ulaze u interakcije s više partnera i to što se smataju tek prilikom vezanja što im omogućuje da akomodiraju različita vezna mjesta različitih interakcijskih partnera. Gubitak konformacijske entropije zbog smatanja prethodno neuređenih regija proteina može odvojiti specifičnost vezanja od afiniteta vezanja rezultirajući visokom specifičnošću, ali niskim afinitetom. To je izrazito bitno za prijelazne interakcije proteina tijekom transdukcije signala. Za signalne kaskade terminacija signala nosi istu važnost kao i njegova aktivacija, stoga je tijekom prijenosa signala esencijano specifično i lako razlučivo vezanje (Sun i sur., 2013). Njihova dinamična struktura također omogućuje IDP i LDR da različito izlažu vezna mjesta za post-translacijske modifikacije zbog čega, osim signalne, imaju i bitnu regulatornu ulogu (Covarrubias i sur., 2017).

Općenito se funkcije neuređenih biljnih proteina mogu klasificirati u pet kategorija: regulacija razvoja, regulacija staničnog ciklusa, regulacija transkripcije, uloga molekularnih šaperona i tolerancija na stres (Liu i sur., 2017). Ova posljednja funkcionalna kategorija posebno je vezana uz biljne IDP, a uključuje proteine koji sudjeluju u prepoznavanju i prijenosu signala eksternih podražaja i sekundarnom metabolizmu, što su sve funkcije potrebne za fenotipsku plastičnost esencijalnu za prilagodbu i preživljavanje biljaka (Covarrubias i sur., 2017).

1.3. Obitelj proteina šaperona Hsp70

Proteini termičkog šoka (engl. *heat shock proteins*, Hsp) molekularni su šaperoni koji reguliraju smatanje, lokalizaciju, akumulaciju i degradaciju proteina kod biljaka i životinja. Smatra se da su zbog svoje uloge održavanja homeostaze proteina uključeni u mnoge stanične procese, što ukazuje i na ulogu tolerancije okolišnih stresova koji ne podrazumijevaju termički šok (Swindell i sur.,

2007). Razumijevanje uloge Hsp-ova tijekom stresnih uvjeta nepovezanih s termičkim šokom može nam pružiti bolji uvid u mehanizme tolerancije mnogih stresova.

Put koji dovodi do ekspresije Hsp nije potpuno objašnjen, ali uključuje percepciju temperature povezanu s nekoliko signalnih puteva koji rezultiraju aktivacijom transkripcijskih faktora za Hsp. Postoji nekoliko razina na kojima se taj molekularni put može preklopiti s odgovorima na stresove nepovezane s temperaturom, a indukcija gena za *Hsp* potvrđena je na razini genske ekspresije u vrsti *Arabidopsis thaliana* za mnoge ne-termičke stresove poput osmotskog, oksidativnog, hladnoće, ranjavanja, jakog svjetla i prisutnosti teških metala (Swindell i sur., 2007).

Sama uloga Hsp u mehanizmima tolerancije ovisi o uvjetima stresa. Tijekom termičkog šoka, konformacija proteina se narušava i oni denaturiraju, a Hsp svojim šaperonskim ulogama sudjeluju u restrukturiranju njihovih nativnih i funkcionalnih oblika, sprječavaju njihovu agregaciju i razgradnju. Stoga njihova protektivna funkcija tijekom drugačijih stresova možda nije potpuno istovjetna. Jedna od mogućnosti je da Hsp služe u obrani od štete nastale akumulacijom ROS (Swindell i sur., 2007).

Obitelj Hsp se može podijeliti u pet skupina s obzirom na veličinu, odnosno masu, i funkciju Hsp, a to su: mali sHsp, Hsp60, Hsp70, Hsp90 i Hsp100. Skupinu Hsp70 čini 18 proteina teških 70kDa. Istraživanja su pokazala da su Hsp70 proteini esencijalni za obranu od okolišnih stresova. Osim temperaturnog šoka tijekom kojeg biljke *A. thaliana* s izrezanim genima za kloroplastne Hsp70 pokazuju defektan fenotip, smanjenu toleranciju na toplinu i veću stopu umiranja, pokazalo se da povećana ekspresija Hsp70 utječe na razvoj biljke i pridonosi toleranciji na abiotičke stresove (*A. thaliana*), razvoju ženskog gametofita (*A. thaliana*), inicijaciji i elongaciji vlakana (pamuk) te obrani od stresa uzrokovanog vodom (duhan) (Yer i sur., 2016).

1.4. Obitelj enzima peroksidaza

Citotoksična svojstva ROS koji nastaju kao nusprodukt metabolizma, u stresnim uvjetima i kao signalne molekule, objašnjavaju evoluciju kompleksnih mehanizama za detoksifikaciju. Jedan od tih mehanizama uključuje peroksidaze, enzime prisutne u gljivama, životinjama i biljkama s ulogom neutralizacije ROS. Askorbat peroksidaza (APX) najvažnija je peroksidaza za detoksifikaciju H_2O_2, a katalizira reakciju redukcije H_2O_2 u vodu na račun askorbata (Uarrota i sur., 2016).

Gvajakol peroksidaze (GPX) locirane su u citosolu, staničnoj stjenki, vakuoli i apoplastu te također sudjeluju u procesima vezanim za oksidativni stres. Sadrže kofaktor hem i najradije

oksidiraju aromatske donore elektrona poput gvajakola ili pirogalola da bi reducirale H_2O_2, iako mogu koristiti i askorbat (Sharma i sur., 2012, Uarrota i sur, 2016). Primjećeno je povećanje aktivnosti GPX tijekom raznih abiotičkih stresova poput suše, hipoksije, povećane koncentracije NaCl i hladnoće (Uarrota i sur., 2016).

1.5. Ekotipovi biljke *Arabidopsis thaliana* L.

Biljka *Arabidopsis thaliana* L. (uročnjak) modelni je organizam u biljnoj i molekularnoj biologiji zbog brzog rasta i kratkog životnog ciklusa te relativno malog genoma. Iako nema direktnu primjenu u poljoprivredi, dobar je predstavnik svih viših biljaka. Velik broj gena Arabidopsisa uključenih u toleranciju stresa uspješno su prenjeli svoje obrambene funkcije u mnoge usjeve pomoću tehnologija genetičkog inženjerstva (Bouchabke i sur., 2008).

Osim istraživanja baziranim na genomu i mutantima, i ona koja pristupaju prirodnoj genetičkoj varijabilnosti uročnjaka dovela su do otkrića novih gena i alela bitnih u adaptaciji biljke na okolišne uvjete. Naime, vrsta *A. thaliana* prirodno raste u različitim klimatskim područjima, te je različito izložena sušnim uvjetima i stresu kojim rezultiraju. Primjerice, ekotip Col je porijeklom iz Sveučilišta u Missouriju, SAD, gdje prevladava vlažna subtropska klima, ekotip Van porijeklom je iz Vancouvera, Kanada, gdje su ljeta umjereno suha, ekotip Ita je porijeklom iz Ibel Tazekka, Maroko, gdje je većinu godine vlažno i hladno, i ekotip Oy je iz Oystese, Norveška, gdje je suho i hladno. S obzirom na prirodno područje rasta, populacije biljaka *A. thaliana* morale bi biti različito prilagođene na nedostatak vode u okolišu. Osim u strategijama kojima se suša izbjegava npr. različitim vremenima cvjetanja, te bi razlike morale biti prisutne i u mehanizmima tolerancije samog stresa tj. u ekspresiji određenih gena i povećanju koncentracije ili aktivnosti nekih proteina (Bouchabke i sur., 2008, Harb i sur., 2010).

1.6. Ciljevi

Uzgojiti četiri različita ekotipa biljke *Arabidopsis thaliana* i izazvati kontrolirani abiotski stres sušom. Analizom proteoma utvrditi razlike u ekpresiji ili aktivnosti proteina koji sudjeluju u odgovorima na druge čimbenike stresa. Izolirati te identificirati IDP koji bi također mogli imati uloge u stresu i istražiti im strukturu.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Biljni materijal

U istraživanju su korištene biljke *Arabidopsis thaliana* slijedećih ekotipova: Col, Oy, Ita (dvije replike ozačene kao Ita i Ita0) i Van (dvije replike označene kao Van i Van0). Ti su ekotipovi prirodno prisutni u različitim klimatskim područjima (Tablica 1.)

Tablica 1. Ekotipovi vrste *Arabidopsis thaliana* korišteni u istraživanju.

Ekotip	Mjesto porjekla	Prosječna godišnja količina padalina
Col	Columbia, SAD	1176 mm
Oy	Oystese, Norveška	1000 mm
Ita	Ibel Tazekka, Maroko	1800 mm
Van	Vancouver, Kanada	1153 mm

2.2. Priprema biljnog materijala

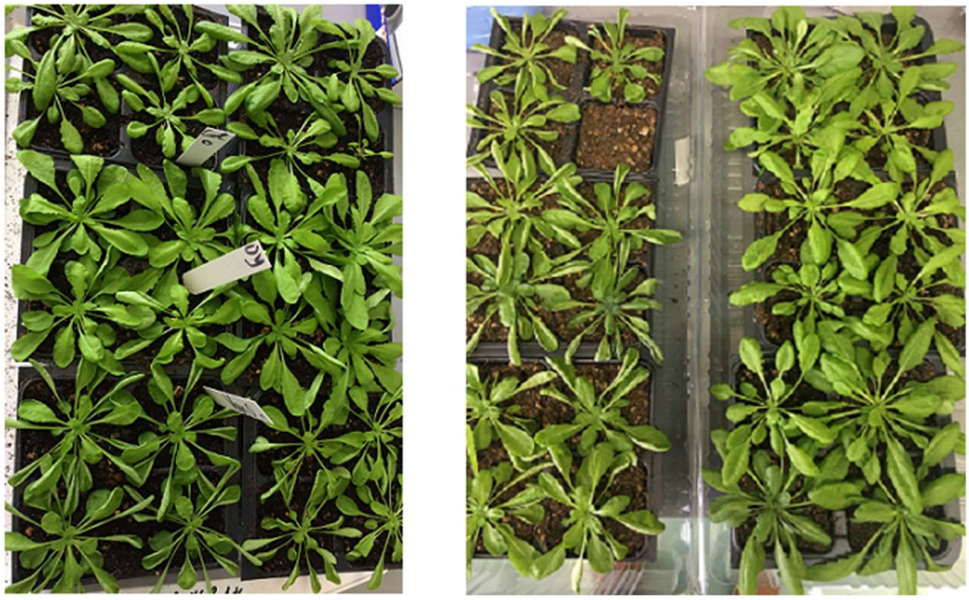
Sjemenke su najprije sterilizirane inkubacijom u 70% etanolu 1 min na tresilici. Etanol je potom odpipetiran, i dodan je 1 mL sterilizacijske otopine (1% Izosan G (w/w), 0,1% mukazol (v/v) u deH_2O) u kojoj sjemenke stoje 10 min. Slijedi centrifugiranje na 10000 × g 1 min te ispiranje 5 puta sterilnom vodom u laminaru s horizontalnim protokom zraka.

Sjemenke su potom nasađene u Petrijeve zdjelice na PG0 hranjive podloge (Tablica 2., Negrutiu i sur., 1975) s međusobnim razmacima otprilike 1 cm. Nakon inicijanog perioda inkubacije (24 h, 4 °C), Petrijeve su zdjelice prebačene u fitotron u uvjete kratkog dana (8 h svjetlo, 16 h mrak), 60% vlage i 24 °C gdje biljke rastu 14 dana dok ne dosegnu veličinu zadovoljavajuću za njihovo presađivanje u zemlju.

Tablica 2. Sastav hranjivog medija PG0.

Makroelementi	**c/mM**	**Organske komponente**	**c/µM**
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	1,81	Inozitol	5,5
KCl	8,05	Vitamin B1	0,03
$(NH_4)_2SO_4$	3,03	Vitamin B6	0,06
$MgSO_4 \times 7H_2O$	2,03	Nikotinska kiselina	0,08
KNO_3	19,8		
$CaCl_2 \times 2H_2O$	2,04		
Mikroelementi	**c/µM**	**Regulatori rasta**	**c/µM**
H_3BO_3	10	2,4-D	0,45
$MnSO_4 \times 2H_2O$	10	BAP	0,44
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	3,7	**Ostale komponente:**	
KI	9,05	Agar-agar	7,5 g/L
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0,1	Saharoza	30 g/L
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,01		
$CoCl_2 \times 6H_2O$	0,01		
Na_2EDTA	100		
$FeSO_4 \times 7H_2O$	100		

Dvadeset i šest dana nakon presađivanja u zemlju, prije nego su biljke procvjetale, odvojeno je 12 biljaka svakog ekotipa koje nisu zaljevane do uzorkovanja dok je preostalih 8 normalno zalijevano (1 L vode na 24 biljke svaka 3 dana). Fotoperiod, jačina svjetlosti i temperatura ostali su isti svim biljkama. Uzorkovanje se vršilo idući dan popodne, tako da je sušni period trajao 36 h neposredno prije. Biljkama (Slika 2.) su odrezane rozete, te su osušene, izvagane i zamrznute u tekućem dušiku. Uzorci su se do izolacije proteina čuvali na -80 °C.



Slika 2. Biljke *Arabidopsis thaliana* prije uzorkovanja. Slika lijevo prikazuje kontolne biljke, a slika desno prikazuje biljke izložene suši.

2.3. Izolacija proteina

Tkivo uzoraka je ohlađeno tekućim dušikom i smrvljeno u fini prah pomoću tarionika i tučka. Za izolaciju ukupnih proteina korišteno je 0,3 g, a za izolaciju IDP 0,6 g tkiva. Na dobiveni biljni prah dodano je 1 mL ekstrakcijskog pufera i polivinilpirolidon (PVP) koliko stane na vrh spatule kako bi se spriječilo djelovanje fenolnih komponenti koje se oslobađaju prilikom homogenizacije. Korištena su dva ekstrakcijska pufera različitih sastava: saharozni pufer (100 mM Tris/HCl, 0,5 M saharoza, 0,1% (w/v) askorbinska kiselina, 0,1% (w/v) cistein-HCl, pH = 8) za uzorke koji će kasnije biti podvrgnuti imunodetekciji na membrani i ditiotreitol (DTT) pufer (50 mM Tris/HCl, 0,75 M NaCl, 2 mM DTT, pH = 7,5) za sve ostale uzorke.

Otopljeni uzorci su iz tarionika dekantirani u tubice te je tarionik ispran s još pripadajućeg pufera do ukupnog volumena homogenata 2 mL. Slijedilo je centrifugiranje 1 h na 20000 × g i 4 °C kako bi se uklonili stanični ostaci. Supernatant je prebačen u nove tubice i sadrži sve proteine tkiva. Uzorci se čuvaju na -20 °C do daljnje analize.

Da bi se izolirali IDP, supernatant dobiven na prethodni način inkubira se 10 min na 100 °C i potom centrifugira 2 h na 25000 × g i 4 °C prema Csizmok i sur. (2006). Uzima se supernatant koji sadrži samo IDP, prebacuje u čiste tubice i pohranjuje na -20 °C.

2.4. Ukoncentriravanje proteina membranskom ultrafiltracijom

Nakon izolacije IDP provedeno je ukoncentriravanje ultrafiltracijom na centrikonima (Amicon 30 kDa, Millipore, Njemačka). Uzorci su prebačeni u posudice za filtrat, centrikone, te centrifugirani 90 minuta na 5000 × g i 4 °C uz miješanje uzoraka svakih 30 min. Prema potrebi, određeni uzorci su ponovno centrifugirani dodatnih 30 min. Ukoncentrirani proteini skupljeni su u tubicu centrifugiranjem 2 min na 500 × g i 4 °C.

2.5. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina svih uzoraka određena je metodom po Bradfordu (1976). Metoda se temelji na vezanju boje *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 na proteine te promjeni boje otopine iz smeđe u plavu. Referentna slijepa proba je sadržavala 20 µL pripadnog ekstrakcijskog pufera i 1 mL Bradford radne otopine (2,85% (v/v) etanol, 5,28% (v/v) H_3PO_4, 6% (v/v) Bradford matične otopine. Sastav Bradford matične otopine bio je 1,17 mg/mL CBB G-250, 32% (v/v) etanol, 57% (v/v) H_3PO_4). Uzorci su sadržavali 20 µL uzorka i 1 mL Bradford radne otopine te su kratko izmješani prije mjerenja absorbancije. Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini od 595 nm korištenjem spektrofotometra (UV/VIS Unicam Spectrometer UV 4, UK). Koncentracija je određena iz apsorbancije prema baždarnom pravcu prethodno napravljenom prema otopini albumina goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA).

2.6. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze

Aktivnost enzima gvajakol peroksidaze (GPX) izravno je proporcionalna jačini oksidativnog stresa (Harb i sur., 2010), a jedna od njenih uloga je redukcija H_2O_2 u vodu uz gvajakol kao donor vodika. U svrhu određivanja aktivnosti gvajakol peroksidaze koristilo se 20 µL uzorka svih proteina u DTT puferu, ili samo pufera u slučaju slijepe probe, i 980 µL reakcijske smjese koja sadrži 50 mM kalij fosfatni pufer pH = 7, 18 mM gvajakol i 0,01% H_2O_2 (dodan neposredno prije upotrebe). Mjerila se apsorbancija (A) na valnoj duljini od 470 nm tijekom 1 min svakih 10 s spektrofotometrom (UV/VIS Unicam Spectrometer UV 4, UK). Aktivnost se računala kao omjer promjene apsorbancije i koncentracije proteina. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije replike ± standardna pogreška.

2.7. Analiza ekspresije proteina razdvajanjem natrijev dodecil-sulfat poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE)

Prije imunodetekcije proteina, uzorke proteina izolirane u saharoznom puferu trebalo je razdvojiti SDS-PAG elektroforezom. Proteini se denaturiraju i na njih se jednoliko vežu molekule detergenta SDS-a dajući im ukupan negativan naboj zbog čega nativni oblik i naboj molekula više ne utječu na razdvajanje, već samo njihova veličina (masa). Uzorci su pripremljeni mješanjem 100 µL uzorka s 25 µL denaturirajućeg pufera (Laemmli pufer: 125 mM Tris pH = 6,8, 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) β-merkaptoetanol, 32% (v/v) glicerol, kap 0,5% otopine bromfenol plave boje) i kuhanjem 5 min na 99 °C. Na poliakrilamidni gel (sastav prema Tablici 3.) naneseno je 20 µg uzorka. Korišten je vertikalni sustav Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad), a debljina gela bila je 0,75 mm. Pufer za elektroforezu (0,25 M Tris/HCl, 1,92 M glicin, 10% (w/v) SDS, pH = 8,3) razrjeđen je 10 puta prije upotrebe. Elektroforeza je išla najprije 60 min na 100 V da rezultat bude što uredniji, a zadnjih 30 min na 150 V kako ne bi trajala dovoljno dugo da proteini difundiraju u okolni gel.

Tablica 3. Sastav gela za SDS-PAGE.

	Gel za razdvajanje (12%)	**Gel za sabijanje (4%)**
reH_2O	3,35 mL	3,050 mL
Tris/HCl	1,5 M; pH 8,8; 2,50 mL	0,5 M; pH 6,8; 1,25 mL
AA/Bis (30%)	4,0 mL	0,665 mL
SDS (10%)	100 µL	50 µL
APS (10%)	50 µL	35 µL
TEMED	5 µL	8 µL

2.8. Imunodetekcija proteina na membrani

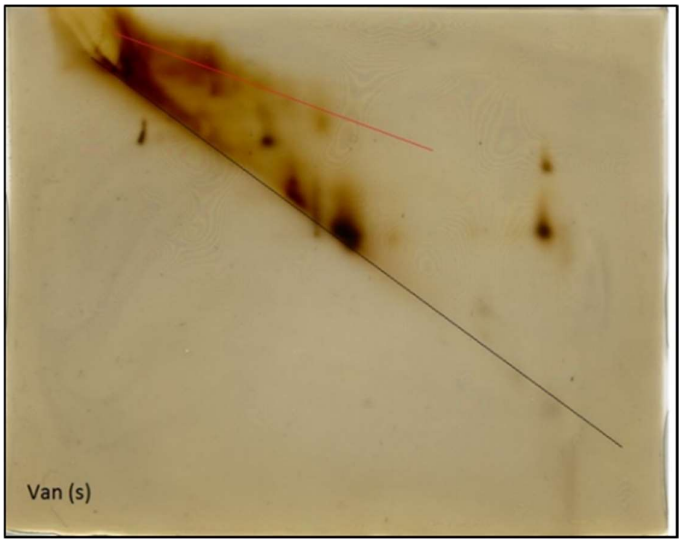
Imunodetekcija proteina na membrani (Western blot) temelji se na prijenosu svih proteina iz gela na membranu i označavanju ciljanih specifičnim protutijelima. U ovom slučaju, protein od interesa bio je Hsp70.

Nakon SDS-PAGE slijedio je mokri prijenos na nitroceluloznu membranu u vertikalnom sustavu za elektroprijenos (Bio-Rad) u puferu za prijenos (28 mM Tris/HCl, 129 mM glicin, 10% (v/v) metanol, pH = 8,3) u trajanju 1 h pri 60 V. Membrana je zatim obojana bojom *Rouge Ponceau*

S da bi se provjerila uspješnost prijenosa i ucrtali bendovi markera te odbojana deH_2O i Tris puferom (engl. *Tris-buffered saline*, TBS, sastav: 0,2 M Tris/HCl, 0,73 M NaCl, pH = 7,5). Membrana je blokirana preko noći u otopini A (10 mM Na_2HPO_4, 1,7 mM KH_2PO_4, 0,13 M NaCl, 2,7 mM KCl, 1% (v/v) *Tween 20*®, 2% (w/v) mlijeko u prahu) na 4 °C. Potom je inkubirana 3 h na sobnoj temperaturi u 10 mL otopine A i primarnog protutijela anti-Hsp70 iz zeca (AS08 371, Agrisera) u omjeru 1:2500. Slijedilo je ispiranje 3 puta u otopini A i inkubacija 1 h u 20 mL otopine A i 2 µL sekundarnog protutijela IgG-HRP (Agrisera). Membrana je potom isprana 2 puta otopinom B (10 mM Na_2HPO_4, 1,7 mM KH_2PO_4, 0,13 M NaCl, 2,7 mM KCl, 1% (v/v) *Tween 20*®) i proteini su detektirani pomoću ECL supstrata (Promega). Vizualizacija se vršila na uređaju za kemiluminiscenciju C-DiGit® (LI-COR Biosciences) softverom Image Studio™ Lite (LI-COR Biosciences), kojim je napravljena i relativna kvantifikacija.

2.9. Elektroforeza proteina u dvije dimenzije (2D-PAGE)

IDP se odvajaju metodom 2D-PAGE koja je u prvoj dimenziji nativna, a u drugoj denaturirajuća. Zbog manjka strukture, IDP bi trebali u obje te dimenzije putovati jednako i po završetku se nalaziti na dijagonali gela dok globularni proteini gube strukturu i gibaju se sporije u drugoj nego u prvoj dimenziji (Slika 3.). Za elektroforezu u obje dimenzije koristi se pufer za nativnu elektroforezu (25 mM Tris/HCl, 125 mM glicin).



Slika 3. Primjer razlike u migraciji IDP i globularnih proteina nakon 2D elektroforeze. Proteini su obojani srebrovim nitratom i označeni tako da crna linija predstavlja dijagonalu na kojoj su smješteni IDP, a crvena područje smještaja zaostalih globularnih proteina. Prikazani su IDP ekotipa Van vrste *A. thaliana* nakon izlaganja stresu sušom.

Prvu dimenziju čini nedenaturirajuća (nativna) elektroforeza prema Laemmliju (1970), a provedena je u Mini-PROTEAN Tetra cell vertikalnom sustavu (Bio-Rad). Gel je bio debljine 1 mm i sastava prema Tablici 4. Naneseno je 20 μg uzoraka. U točan volumen uzorka koji sadrži željenu masu proteina dodano je 2 μL 0,5% otopine bromfenol plave boje i saharoze. Elektroforeza je trajala 30 min na 100 V, pa 50 min na 180 V dok fronta boje nije stigla do kraja gela. Po završetku, rubovi gela gdje nema proteina su odrezani, a gel je potom umočen 15 min u otopini 6 M ureje u nativnom puferu da bi se proteini u gelu denaturirali.

Tablica 4. Sastav gela za nativnu PAGE.

	Gel za razdvajanje (12%)	**Gel za sabijanje (4%)**
reH_2O	3,35	3,05
Tris/HCl	1,5 M; pH 8,8; 2,50 mL	0,5 M; pH 6,8; 1,5 mL
AA/Bis (30%)	4,0 mL	0,665 mL
APS (10%)	50 μL	35 μL
TEMED	5 μL	8 μL

Drugi dio elektroforeze je proveden u gelu s 8 M urejom debljine 1 mm (sastav prema Tablici 5.). Nakon inkubacije u 6 M ureji, gel je izrezan na trakice širine jažica te je svaka od njih stavljena horizontalno na vertikalni denaturirajući gel. Njen je položaj i povezanost s donjim gelom učvršćen nadsvođivanjem 0,5% (w/v) agarozom s par kapi 0,5% (v/v) otopine bromfenol plave boje. Elektroforeza je trajala 20 min na 100 V pa 80 min na 190 V dok fronta boje nije došla do kraja gela. Nakon završetka elektroforeze, gel se preko noći inkubira u fiksativu (50% (v/v) etanol, 12% (v/v) octena kiselina, 0,05% (v/v) formaldehid) na 4 °C kao priprema za bojanje srebrovim nitratom.

Tablica 5. Sastav gela s 8 M urejom.

	Gel za razdvajanje (12%)
ureja	9,61 g
Tris/HCl 1,5 M pH=8.8	5,00 mL
AA/Bis (30%)	8,00 mL
APS (10%)	100 μL
TEMED	7 μL

2.10. Bojanje srebrovim nitratom

Bojanje srebrovim nitratom izvršeno je po Blum i sur. (1987). Proteini vežu ione srebra koji se potom u određenim uvjetima reduciraju tako da nastane vidljiva slika. Metoda je osjetljiva i kompatibilna s daljnjim metodama analize poput spektrometrije masa. Neposredno prije upotrebe, napravljene su otopina 3 (0,04% (w/v) $Na_2O_2S_3 \times 5H_2O$ u reH_2O), otopina 5 (0,2% (w/v) $AgNO_3$, 0,075% formaldehid u reH_2O) i otopina 7 (6% (w/v) Na_2CO_3, 0,05% (v/v) formaldehid, 0,008% (w/v) $Na_2O_2S_3 \times 5H_2O$ u reH_2O).

Nakon inkubacije u fiksativu, gelovi su isprani tri puta po 20 min u 30% etanolu. Jednu minutu inkubiraju se u otopini 3, a zatim su isprani tri puta po 20 s deH_2O. Slijedila je impregnacija srebrovim nitratom 20 min u otopini 5. Gelovi su opet isprani 20 s dva puta u deH_2O i konačno razvijeni u otopini 7. Razvijanje je trajalo 6 min, do zadovoljavajuće obojanosti proteina, a reakcija je zaustavljena STOP otopinom (50% (v/v) etanol, 12% (v/v) octena kiselina). Gelovi su potom skenirani na 400 DPI na 48-bitnom skeneru Epson V700.

2.11. Denzitometrijska analiza proteinskih mrlja alatom ImageMaster™ 2D Platinum

Radi kvantifikacije razlike u jačini ekspresije pojedinih proteina napravljena je denzitometrijska analiza korištenjem softvera ImageMaster™ 2D Platinum (GE Healthcare). Spareni su gelovi koji sadrže uzorke izložene suši i kontrole za isti ekotip. Zatim su podjeljeni na područja od interesa koja su također međusobno sparena s pripadnima. Mjeren je i uspoređen intenzitet svakog područja od interesa.

2.12. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) tehnika je u kojoj se molekule analita ioniziraju, i tako nastali ioni se u plinskoj fazi razdvajaju te detektiraju prema omjeru mase i naboja. Na temelju spektara masa peptida moguća je, između ostalog, identifikacija proteina. Način analize bio je odozdol nagore (engl. *bottom-up*) koji uključuje enzimsko cijepanje proteina u gelu nakon čega se dobiveni peptidni fragmenti analiziraju nekom od MS tehnika, a uspoređivanjem eksperimentalno dobivenih spektara s onima pohranjenim u bazama podataka, moguće je identificirati proteine.

Za analizu spektrometrijom masa izabrani su 2D gelovi Col (kontrola) i Oy (suša) obojani srebrovim nitratom. Proteinske mrlje od interesa najprije su izrezane iz gelova i odvojene u čiste tubice. Da bi digestija u gelu proteinazom bila uspješna, potrebno je od proteina u gelu odvojiti

vezano srebro što je učinjeno prema protokolu komercijalnim kitom ProteoSilver™ Plus Silver Stain Kit (Sigma-Aldrich) koji sadrži otopine za odbojavanje. Komadići gela su zatim dva puta po 5 min isprani ultračistom vodom.

U svaku tubicu s gelom je potom dodano 500 µL pufera (50 mM NH_4HCO_3, pH = 7,8) u kojem se inkubira na tresilici (700 rpm) pri sobnoj temperaturi dva puta po 5 min pa 30 min. Pufer je promjenjen između svake inkubacije. Nakon što se zadnja porcija pufera bacila, na gel je dodano 500 µL otopine 50:50 (v/v) 50 mM NH_4HCO_3/acetonitril (MeCN) u čemu se opet inkubira 30 min na tresilici (700 rpm, sobna temperatura). Ta se otopina također baca nakon inkubacije i zamjenjuje sa 100 µL MeCN u kojem se gel trese (700 rpm, sobna temperatura) 5 min prije nego se ostatak acetonitrila baci i gel osuši u centrifugalnom isparivaču SpeedVac-u. Na tako pripremljene gelove tada je dodano 10 µL tripsina (20 µg/mL, Merck). Inkubacija je trajala 18 h na 37 °C.

Idući dan, tripsinski pufer je odvojen, uzorci su osušeni u SpeedVac-u nakon čega su inkubirani 30 min u 10 µL otopine 50:50 (v/v) 5% trifluoroctena kiselina (TFA)/MeCN u sonikacijskoj (UZV) kupelji radi ekstrakcije peptida iz gela. Zatim su premješteni u termomikser (500 rpm, sobna temperatura) gdje se inkubiraju dodatnih 15 min pa pohranjeni na -80 °C.

Pročišćavanje proteinskih fragmenata vršilo se metodom Zip-Tip. Uzorci su otopljeni u 0,1% TFA. Svaka kolona je najprije kondicionirana ispriranjem tri puta s po 10 µL otopine 80% MeCN, 20% H_2O s 0,1% TFA pa tri puta s po 10 µL 50% MeCN, 50% H_2O s 0,1% TFA i na kraju tri puta s po 10 µL 0,1% TFA. Uzorak je nanesen na kolonu provlačenjem 10 µL uzorka 10 puta kroz Zip-Tip. Kolona se zatim ispire 5 puta s 10 µL 0,1% TFA, a proteini se s nje potom eluiraju uvlačenjem 10 µL otopine 80% MeCN, 20% H_2O s 0,1% TFA i provlačenjem tog istog volumena kroz kolonu 10 puta u novoj tubici. Pročišćeni uzorci se zatim suše u SpeedVac-u.

Uzorci su potom pomješani s matricom (α-cijano-4-hidroksicimetna kiselina, 5 mg/mL) i naneseni na MALDI pločicu. Analiza spektrometrijom masa rađena je na spektrometru masa MALDI TOF/TOF 4800 Plus analyzer (Applied Biosystems, USA) (Pavoković i sur., 2011), a radi identifikacije proteina pretraživala se baza podataka *Arabidopsis thaliana* NCBInr (http://www.matrixscience.com/help/seq_db_setup_nr.html) (23.8.2017.).

2.13. Bioinformatička karakterizacija proteina

Proteini identificirani spektrometrijom masa dalje su analizirani bioinformatičkim alatima. U tu svrhu korišteni su podaci dostupni na mrežnim stranicama NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, 30.10.2017., The National Center for Biotechnology Information) poput aminokiselinske sekvence u FASTA formatu i jedinstvenog identifikacijskog broja (engl. *gi number*) odgovarajućeg zapisa u NCBInr bazi podataka.

2.14. Bioinformatička analiza neuređenosti proteina

2.14.1. SLIDER

SLIDER je bioinformatički alat koji služi za predviđanje postojanja dugih neuređenih regija proteina. Predviđanje se temelji na modelu koji uzima u obzir aminokiselinski sastav unesene proteinske sekvence, njenu kompleksnost i određena fiziokemijska svojstva aminokiselina. Procjene neuređenosti su vršene unošenjem sekvence svakog proteina u FASTA formatu u sučelje na poveznici http://biomine.cs.vcu.edu/servers/SLIDER/ (23.8.2017.) (Peng i sur., 2014).

2.14.2. PSIPRED v3.3 i DISOPRED3

DISOPRED3 alat je za predviđanje neuređenosti proteina. Algoritam DISOPRED3 treniran je na skupovima podataka sačinjenih od proteinskih struktura riješenih kristalografijom X-zrakama. U izlaznim podacima sadržane su i dodatne procjene sekundarne strukture na bazi alata PSIPRED. Procjene su vršene analogno postupku za SLIDER za svaki protein. Alati su dostupni u sklopu servera "PSIPRED Protein Analysis Workbench" na poveznici http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/ (23.8.2017.) (Buchan i sur., 2013).

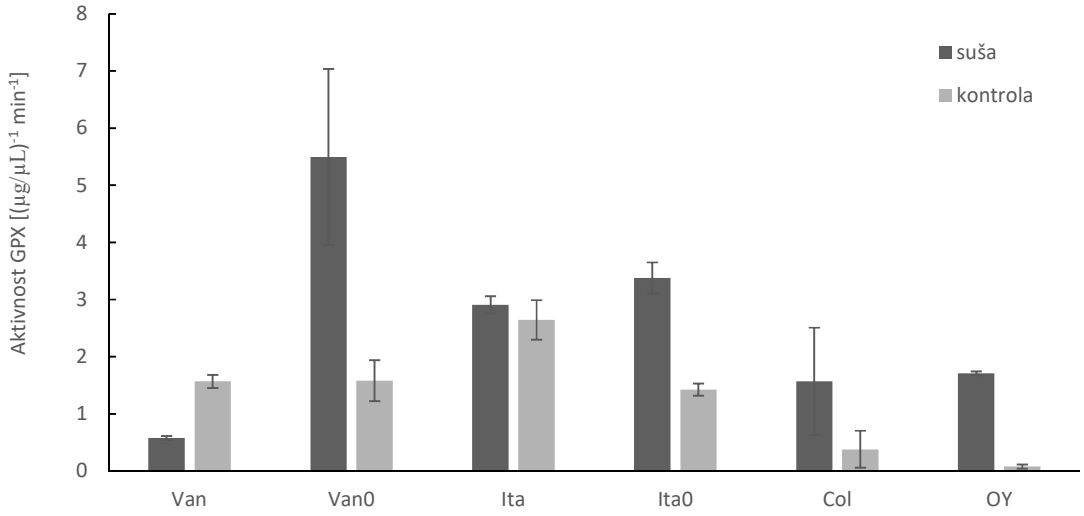
2.14.3. DisEMBL 1.5

DisEMBL je još jedan alat za predviđanje nestrukturiranosti regija proteina s obzirom na njegovu primarnu sekvencu. Parametri prema kojima DisEMBL vrši predviđanje određeni su s obzirom na nekoliko različitih definicija nereda te predstavljaju nov način gledanja na neuređenost baziran na 'vrućim petljama' (engl. *hot loops*), npr. zavojnice s visokim temperaturnim faktorom. Procjene neuređenosti su vršene unošenjem sekvence svakog proteina u FASTA formatu u sučelje na poveznici http://dis.embl.de/ (24.8.2017.) pri standardnim postavkama i invertiranom pozadinom (Linding i sur., 2003).

3. REZULTATI

3.1. Aktivnost enzima gvajakol peroksidaze

Radi usporedbe razine oksidativnog stresa, mjerena je i uspoređivana aktivnost enzima gvajakol peroksidaze (GPX). Značajno povećanje aktivnosti GPX u uvjetima stresa izazvanog sušom s obzirom na kontrolu vidljivo je kod ekotipova Van0, Ita0 i Oy (Slika 4.). Van0 pokazuje otprilike trostruko povećanje aktivnosti GPX, Ita0 dvostruko, a u slučaju ekotipa Oy aktivnost GPX poveća se preko 20 puta u uvjetima stresa. Ekotipovi Ita i Col također bilježe povećanje aktivnosti GPX u stresnim uvjetima, iako se primjenom najnepovoljnijeg slučaja standardne devijacije rezultati ne mogu tako očitati (Slika 4.).

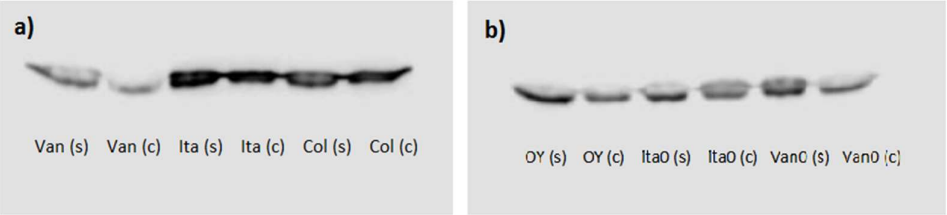


Slika 4. Usporedba aktivnosti GPX različitih ekotipova vrste *Arabidopsis thaliana* nakon izlaganja suši u trajanju od 36 h. Aktivnost GPX izrečena je kao omjer promjene apsorbancije u 1 min i koncentracije proteina. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije replike ± standardna devijacija.

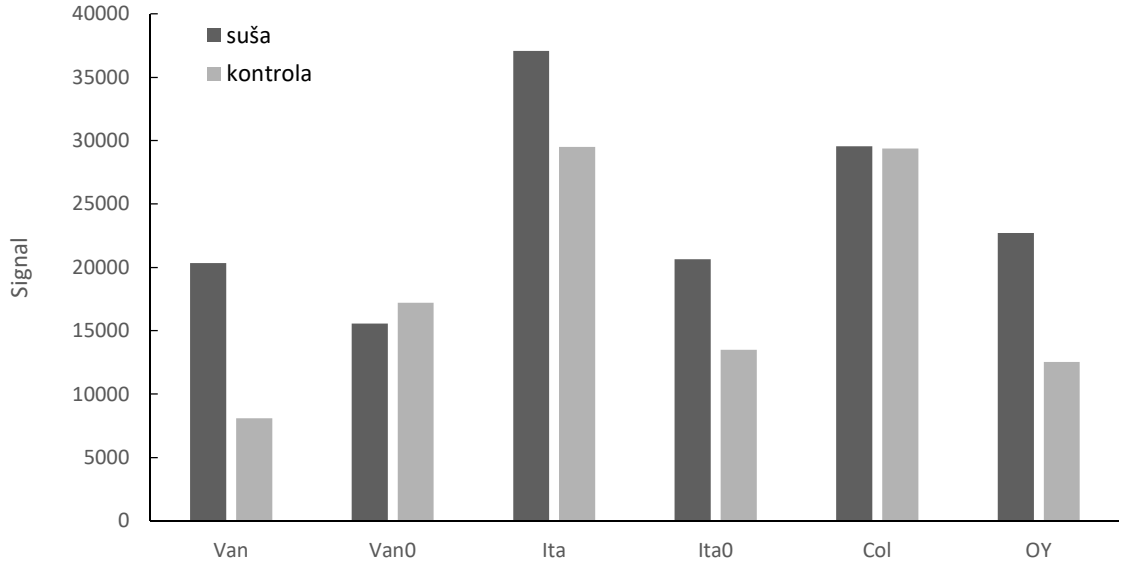
3.2. Relativna kvantifikacija Hsp70

Nakon uspješno provedene SDS-PAG elektroforeze, proteini su preneseni na nitroceluloznu membranu i analizirani imunodetekcijom na gelu pomoću protutijela anti-Hsp70. Vezano protutijelo i, posredno, sam protein Hsp70, vizualizirano je pomoću sekundarnog protutijela IgG-HRP i potom kvantificirano softverom. Nisu pronađene izoforme ili modifikacije Hsp70 niti kod jednog ekotipa, niti u uvjetima suše (Slika 5.). Relativna kvantifikacija je pokazala povećanje ekspresije Hsp70 u uvjetima suše s obzirom na kontrolu u gotovo svim ekotipovima, s izuzetkom ekotipa Van0, gdje je ekspresija Hsp70 malo smanjena, i ekotipa Col, gdje nije bilo razlike (Slika

6.). Iz tehničkih razloga, ova analiza nije ponovljena te nije bila moguća statistička obrada podataka.



Slika 5. Imunodetekcija Hsp70 u različitim ekotipovima vrste *Arabidopsis thaliana* nakon izlaganja suši u trajanju od 36 h. Uzorci prethodno izloženi suši nose oznaku (s) uz ime ekotipa, a kontrole su označene s (c). Slike pod a) i b) predstavljaju različite membrane na koje su se prenosili proteini.



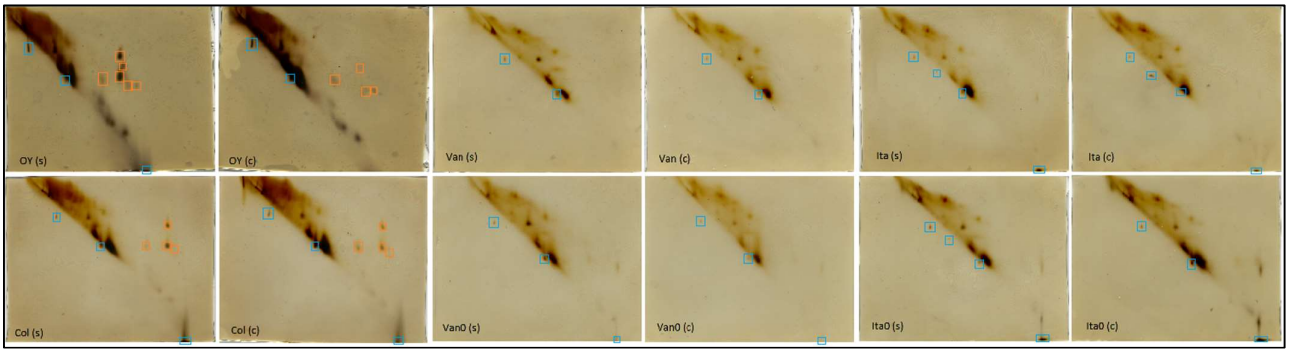
Slika 6. Relativna kvantifikacija proteina Hsp70 u različitim ekotipovima vrste *Arabidopsis thaliana* nakon izlaganja suši u trajanju od 36 h. Rezultati prikazuju intenzitet obojenja očitan s jedne membrane.

3.3. Identifikacija IDP u proteomu vrste *Arabidopsis thaliana*

3.3.1. Diferencijalna ekspresija IDP

IDP su odvojeni od većine globularnih proteina toplinskom denaturacijom, a za svaki ispitivani ekotip provedena je i 2D elektroforeza u nativnim i denaturirajućim uvjetima uzoraka iz biljaka izloženih suši i uzoraka iz biljaka kontrola da bi se što bolje razdvojili IDP. Razdvajanje je bilo uspješno te su vidljive razlike u ekspresiji pojedinih proteina (Slika 7.). Najizraženija je pritom skupina malih globularnih proteina koji su detektirani samo kod ekotipova Oy (6 proteinskih mrlja) i Col (4 proteinske mrlje) te pokazuju jače obojenje u uvjetima stresa. Unutar te skupine, ekotip Oy sadrži dvije jedinstvene proteinske mrlje. Svaki ekotip također eksprimira barem tri proteina koji se brže kreću u denaturirajućim nego u nativnim uvjetima, tj. nalaze se ispod

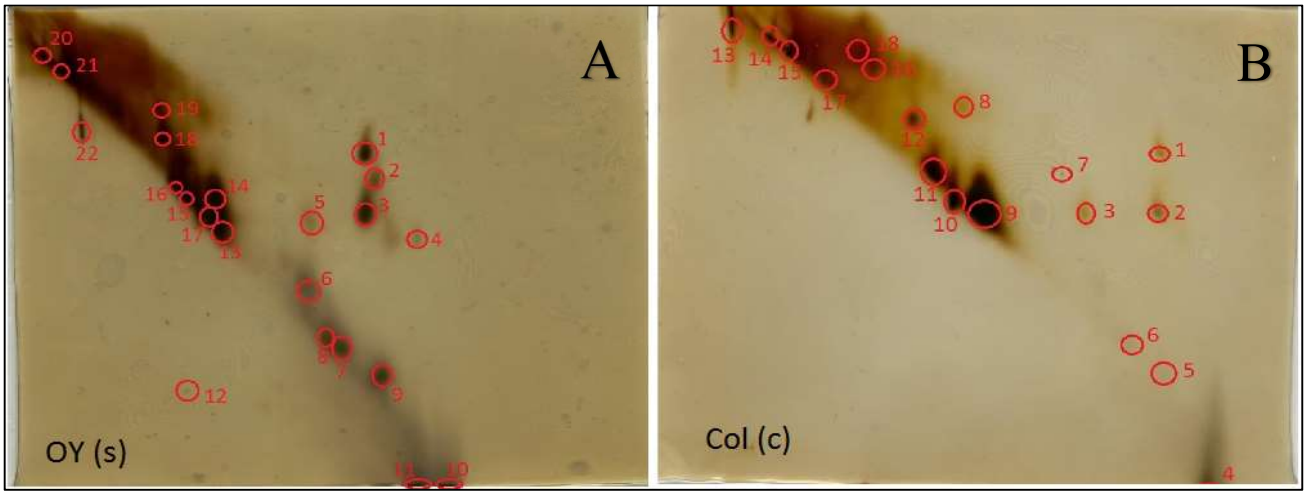
dijagonale gela, a ekotip Ita ima 4 takva proteina, jedan jedinstven. Jedna proteinska mrlja kod svih ekotipova nalazi se između linije na kojoj su smješteni globularni proteini i dijagonale na kojoj su smješteni IDP, ukazujući na protein mješovitog karaktera.



Slika 7. Ekspresija IDP u biljkama *Arabidopsis thaliana*. Termičkom denaturacijom izolirani IDP iz tkiva razdvojeni su 2D elektroforezom u nativnim i denaturirajućim uvjetima te vizualizirani na gelu bojanjem srebrovim nitratom. Gelovi s uzorcima izloženim suši nose oznaku (s) uz ime ekotipa, a kontrole su označene s (c). Narančasto su označeni globularni proteini jedinstveni za ekotipove Col i Oy, a plavo IDP koji se brže kreću u denaturirajućim uvjetima.

3.3.2. Identifikacija proteina spektrometrijom masa

Dva su poliakrilamidna gela izabrana za daljnju analizu spektrometrijom masa, Oy izložen suši i netretirani Col. Izabrani su različiti ekotipovi i različiti uvjeti da bi se identificirao što veći broj jedinstvenih proteina. Na gelovima je odabrano ukupno 40 proteinskih mrlja, 22 ekotipa Oy i 18 ekotipa Col (Slika 8.), iz kojih su izolirani proteini za identifikaciju. Ukupno je pronađeno 40 različitih proteina (Tablice 6. i 7.). Od toga za njih 25 vrijedi da je sigurnost identifikacije veća od 90%, što uvjetuje *protein score* veći od 50 (Tablica 8.).



Slika 8. Proteinske mrlje analizirane spektrometrijom masa. Slika A prikazuje 22 proteinske mrlje odabrane na gelu gdje su razdvojeni IDP iz ekotipa Oy nakon izlaganja suši. Slika B prikazuje 18 proteinskih mrlja odabranih na gelu gdje su razdvojeni IDP ekotipa Col uzgajanog u kontrolnim uvjetima.

Tablica 6. Proteini identificirani u gelu metodom MALDI TOF/TOF, uzorci uročnjaka ekotipa Oy. Navedeni su nazivi proteina i njihovi pristupni brojevi prema dvjema bazama podataka (NCBI/UniProt) te oznaka proteinske mrlje iz koje je protein izoliran. *Protein score* upućuje na podudarnost eksperimentalnih podataka s onima u bazi podataka prema kojoj je protein identificiran te se za svaki *score* veći od 50 uzima da je ona dovoljno dobra.

Broj proteinske mrlje	Identifikacijski broj proteina		Ime proteina	Protein score
	NCBI	UniProt		
1	gi|21592405	AAM64356.1	plastocijanin, predviđen	31
2	gi|42568895	NP_178414.2	embrio defektivni protein 1579	42
3	gi|21592405	AAM64356.1	plastocijanin, predviđen	128
	gi|62321387	BAD94723.1	hipotetski protein	32
4	gi|15234875	NP_194235.1	protein nosač acila 4	42
5	gi|166655	AAA32765.1	kalmodulin-3, djelomičan	156
	gi|18423978	NP_568857.1	Afadin/alfa-aktinin-vezujući protein	39
6	gi|15220428	NP_176906.1	predviđen: F-box protein	30
7	gi|21555170	AAM63795.1	protein sličan prekursoru proteina CP12	34
8	gi|334187136	NP_001190906.1	protein 3A sličan dinaminu	29
9	gi|145323728	NP_001077453.1	protein iz obitelji beta-1,6-N-acetilglukozaminiltransferaza	37
10	gi|15220428	NP_176906.1	predviđen: F-box protein	38
11	gi|42568895	NP_178414.2	embrio defektivni protein 1579	38
12	gi|7629996	CAB88338.1	predviđeni protein	41
13	gi|21592405	AAM64356.1	plastocijanin, predviđen	140
	gi|30692293	NP_850901.1	neokarakterizirani protein	43
14	gi|21592405	AAM64356.1	plastocijanin, predviđen	177
	gi|5689611	CAB51840.1	bakar/cink superoksid dismutaza	60
15	gi|5689611	CAB51840.1	bakar/cink superoksid dismutaza	219
	gi|15223217	NP_174525.1	vjerojatan: protein H2 sustava za cijepanje glicina	75
	gi|15226973	NP_181080.1	protein H kompleksa glicin dekarboksilaze	67
	gi|30689052	NP_850371.1	hladnoćom reguliran protein 15a	30
16	gi|18401659	NP_565666.1	bakar/cink superoksid dismutaza 2	93
	gi|30689052	NP_850371.1	hladnoćom reguliran protein 15a	38
17	gi|21592405	AAM64356.1	plastocijanin, predviđen	147
	gi|9759153	BAB09709.1	neimenovani proteinski produkt	34
18	gi|15222166	NP_172153.1	podjedinica P-1 fotosustava II	66
	gi|42568895	NP_178414.2	embrio defektivni protein 1579	40
19	gi|238480210	NP_001154203.1	tioredoksin M2	84
	gi|186478207	NP_001117239.1	podjedinica P-1 fotosustava II	72
20	gi|15450771	AAK96657.1	niskom temperaturom induciran protein 78	93
	gi|21593220	AAM65169.1	33 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika (OEC) fotosustava II	42
21	gi|21593220	AAM65169.1	33 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika (OEC) fotosustava II	147
	gi|15242045	NP_197572.1	šaperonin 20	80
	gi|186478207	NP_001117239.1	podjedinica P-1 fotosustava II	55
22	gi|18418410	NP_568356.1	embrio defektivni 1241	203
	gi|1747310	BAA09598.1	DNA-vezujući protein sličan Myb-u	55

Tablica 7. Proteini identificirani u gelu metodom MALDI TOF/TOF, uzorci uročnjaka ekotipa Col. Navedeni su nazivi proteina i njihovi pristupni brojevi prema dvjema bazama podataka (NCBI/UniProt) te oznaka proteinske mrlje iz koje je protein izoliran. *Protein score* upućuje na podudarnost eksperimentalnih podataka s onima u bazi podataka prema kojoj je protein identificiran te se za svaki *score* veći od 50 uzima da je ona dovoljno dobra.

Broj proteinske mrlje	Identifikacijski broj proteina		Ime proteina	Protein score
	NCBI	UniProt		
1	gi|21592405	AAM64356.1	plastocijanin, predviđen	114
	gi|8778462	AAF79470.1	F1L3.28	39
2	gi|21592405	AAM64356.1	plastocijanin, predviđen	73
	gi|30692293	NP_850901.1	neokarakterizirani protein	41
3	gi|166655	AAA32765.1	kalmodulin-3, djelomičan	308
	gi|22329394	NP_683283.1	neokarakterizirani protein	38
4	gi|9279741	BAB01367.1	neimenovani protein	44
5	gi|9279741	BAB01367.1	neimenovani protein	40
6	gi|21555170	AAM63795.1	protein sličan prekursoru proteina CP12	46
7	gi|15724168	AAL06476.1	AT5g12140/MXC9_10	50
8	gi|30678634	NP_849585.1	tioredoksin M1	128
	gi|110742393	BAE99119.1	tioredoksin m4	66
	gi|15221284	NP_172695.1	predviđen: kalcij-vezujući protein CML13	59
9	gi|21592405	AAM64356.1	plastocijanin, predviđen	119
	gi|6523846	AAF14882.1	citozin-5 metiltransferaza	30
10	gi|21555836	AAM63945.1	nepoznat	79
	gi|8778462	AAF79470.1	F1L3.28	54
11	gi|15223217	NP_174525.1	vjerojatan: protein H2 sustava za cijepanje glicina	48
12	gi|186478207	NP_001117239.1	podjedinica P-1 fotosustava II	60
13	gi|27752799	AAO19414.1	RuBisCO velika podjedinica, djelomičan (kloroplast)	297
	gi|6056403	AAF02867.1	hipotetski protein	50
14	gi|4583542	CAB40384.1	16 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika	96
	gi|15222166	NP_172153.1	podjedinica P-1 fotosustava II	47
15	gi|4583542	CAB40384.1	16 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika	100
	gi|186478207	NP_001117239.1	podjedinica P-1 fotosustava II	68
	gi|21593220	AAM65169.1	33 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika (OEC) fotosustava II	68
	gi|15242045	NP_197572.1	šaperonin 20	64
16	gi|186478207	NP_001117239.1	podjedinica P-1 fotosustava II	114
	gi|21593220	AAM65169.1	33 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika (OEC) fotosustava II	91
	gi|21617920	AAM66970.1	predviđen: RNA-vezujući protein	60
17	gi|21593220	AAM65169.1	33 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika (OEC) fotosustava II	106
	gi|186478207	NP_001117239.1	podjedinica P-1 fotosustava II	45
18	gi|21593220	AAM65169.1	33 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika (OEC) fotosustava II	711
	gi|15222166	NP_172153.1	podjedinica P-1 fotosustava II	118
	gi|2880056	AAC02750.1	23K protein kompleksa za razvoj kisika fotosustava II, predviđen	63

Tablica 8. Proteini identificirani metodom MALDI TOF/TOF s najmanje 90% sigurnošću (*Protein score* > 50). Navedeni su nazivi proteina i njihovi pristupni brojevi prema dvjema bazama podataka (NCBI/UniProt) te oznake proteinskih mrlja analiziranih 2D gelova koje sadrže dane proteine.

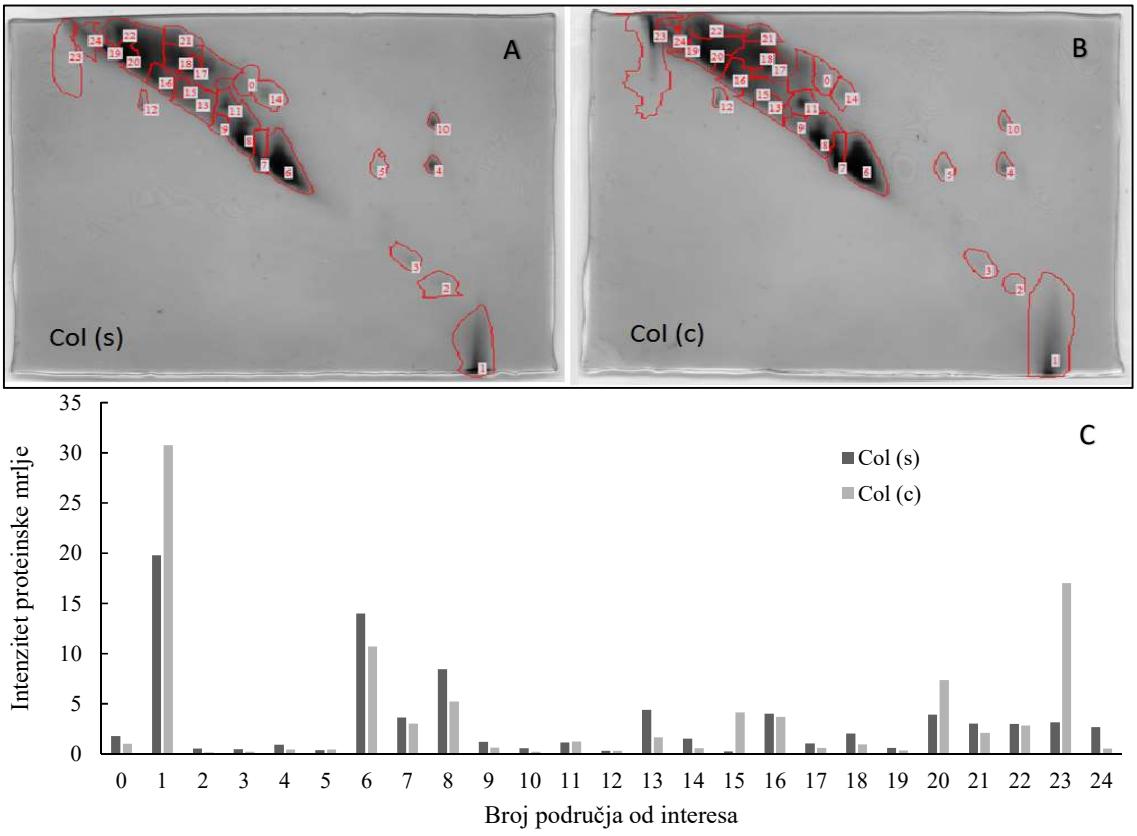
Protein	Identifikacijski kod proteina		Mrlje gdje je identificiran protein	
	NCBI	UniProt	OY (s)	Col (c)
kalmodulin-3, djelomičan	gi|166655	AAA32765.1	5	3
šaperonin 20	gi|15242045	NP_197572.1	21	15
predviđen: kalcij-vezujući protein CML13	gi|15221284	NP_172695.1	-	8
bakar/cink superoksid dismutaza	gi|5689611	CAB51840.1	14, 15	-
bakar/cink superoksid dismutaza 2	gi|18401659	NP_565666.1	16	-
embrio defektivni protein 1241	gi|18418410	NP_568356.1	22	-
F1L3.28	gi|8778462	AAF79470.1	-	10
vjerojatan: protein H2 sustava za cijepanje glicina	gi|15223217	NP_174525.1	15	-
protein H kompleksa glicin dekarboksilaze	gi|15226973	NP_181080.1	15	-
hipotetski protein	gi|6056403	AAF02867.1	-	13
niskom temperaturom induciran protein 78	gi|15450771	AAK96657.1	20	-
DNA-vezujući protein sličan Myb-u	gi|1747310	BAA09598.1	22	-
16 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika	gi|4583542	CAB40384.1	-	14, 15
23K protein kompleksa za razvoj kisika fotosustava II, predviđen	gi|2880056	AAC02750.1	-	18
33 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika (OEC) fotosustava II	gi|21593220	AAM65169.1	21	15, 16, 17, 18
plastocijanin, predviđen	gi|21592405	AAM64356.1	3, 13, 14, 17	1, 2, 9
podjedinica P-1 fotosustava II	gi|15222166	NP_172153.1	18, 16	-
podjedinica P-1 fotosustava II	gi|186478207	NP_001117239.1	19, 21	12, 15, 16
predviđen: RNA-vezujući protein	gi|21617920	AAM66970.1	-	16
RuBisCO velika podjedinica, djelomičan (kloroplast)	gi|27752799	AAO19414.1	-	13
tioredoksin M2	gi|238480210	NP_001154203.1	19	-
tioredoksin M1	gi|30678634	NP_849585.1	-	8
tioredoksin m4	gi|110742393	BAE99119.1	-	8
nepoznat	gi|21555836	AAM63945.1	-	10
AT5g12140/MXC9_10	gi|15724168	AAL06476.1	-	7

Od 25 proteina identificiranih sa zadovoljavajućom sigurnošću, 12 ih sudjeluje u procesima fotosinteze i fotorespiracije (proteini H kompleksa glicin dekarboksilaze/sustava za cijepanje glicina, velika podjedinica ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze (RuBisCO), plastocijanin, tioredoksini m1, m2 i m4, podjedinice P-1 fotosustava II i polipeptidi kompleksa za razvoj kisika fotosustava II od 16, 23 i 33 kDa, Tablica 8.), od čega 5 čine dijelovi fotosustava II. Četiri identificirana proteina spadaju u kategoriju stresnih proteina, a to su šaperonin 20, niskom temperaturom induciran protein 78 i dvije bakar/cink superoksid dismutaze.

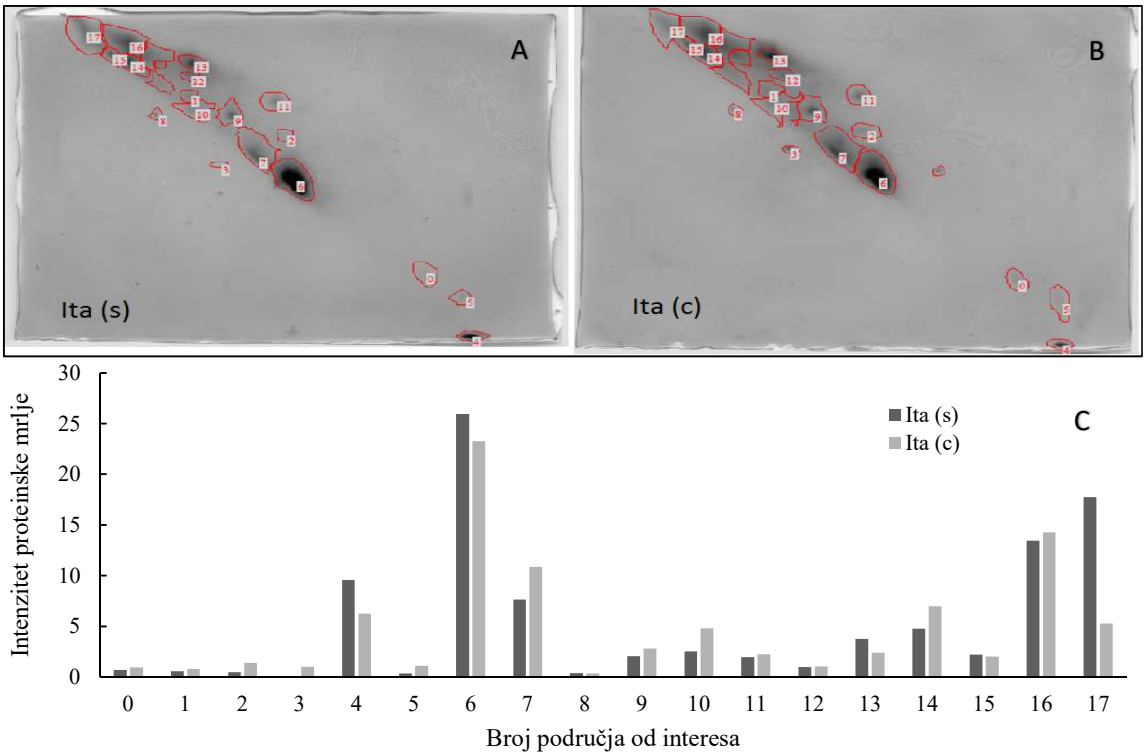
3.3.3. Denzitometrijska analiza alatom ImageMaster™ 2D Platinum

Nakon razdvajanja IDP kombiniranom nativnom i denaturirajućom 2D elektroforezom, gelovi su skenirani i nadalje analizirani softverom ImageMaster™ 2D Platinum. Proteini iz biljaka prethodno izloženih suši i pripadne kontrole su spareni unutar programa te su podjeljeni na područja od interesa koja grubo odgovaraju proteinskim mrljama. Mjereni su i uspoređivani intenziteti svakog područja od interesa (Slike 9.-14.). Ekotipovi Col, Ita i Ita0 pokazuju četiri značajnija povećanja u intenzitetu obojenja tj. ekspresiji proteina prilikom izlaganja suši s obzirom na kontrolu, i četiri značajna smanjenja. Ekotipovi Van i Van0 bilježe šest povećanja u sušnim uvjetima i četiri smanjenja, a ekotip Oy četiri povećanja i čak sedam smanjenja.

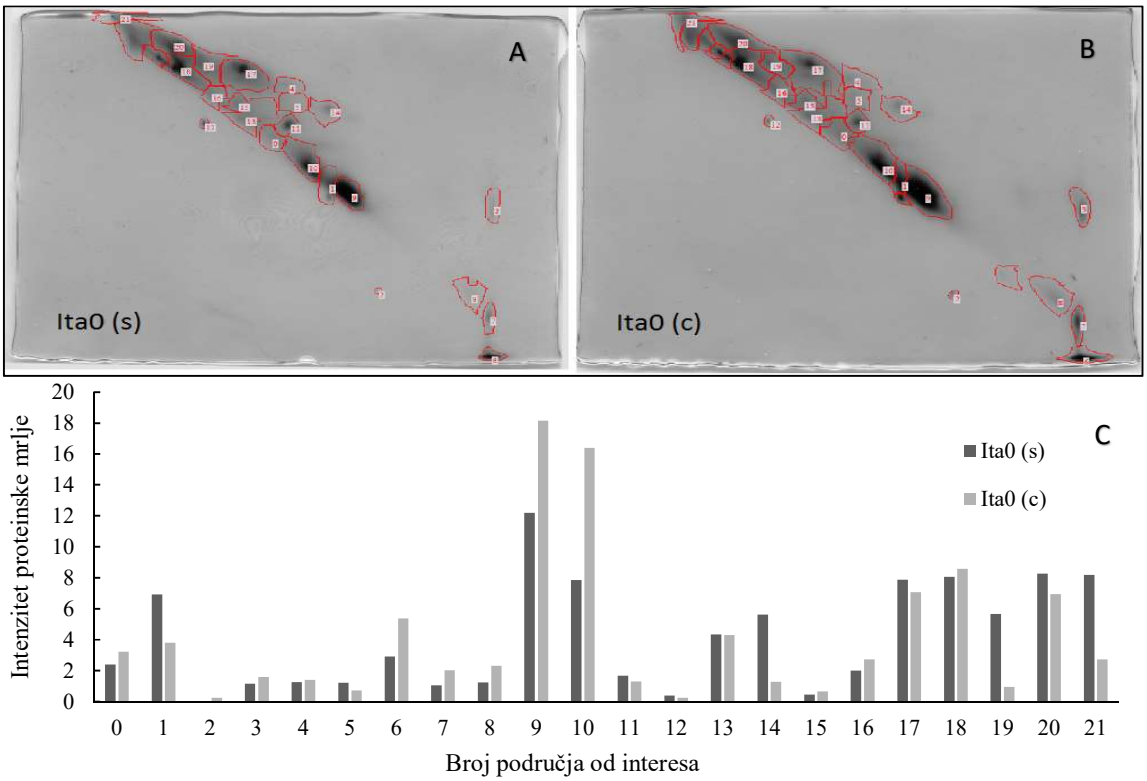
Spareni gelovi tj. uzorci istog ekotipa podjeljeni su na slična područja od interesa (slične veličine i oblika, iste pozicije) i jednako označeni. Međutim, gelovi na kojima su razdvajani proteini drugih ekotipova nose iste oznake (brojeve) za područja od interesa na drugim mjestima i različitog oblika te se ne daju međusobno uspoređivati. Npr. područje 1 ekotipa Oy (Slika 9.) nije ekvivalentno području 1 ekotipa Ita (Slika 10.). Ta područja ponekad sadrže i više proteina te nije uvijek moguće zasebno kvantificirati proteine identificirane spektrometrijom masa. U Tablici 9. navedeni su identificirani proteini i oznake za područja od interesa čijem signalu pridonose za svaki ekotip. Možemo uočiti da su određeni proteini u svim slučajevima kvantificirani zajedno (proteini H kompleksa glicin dekarboksilaze/sustava za cijepanje glicina i bakar/cink superoksid dismutaza 2; šaperonin 20, podjedinica P-1 fotosustava II i 33 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika fotosustava II; embrio defektivni 1241 i DNA-vezujući protein sličan Myb-u; tioredoksini M1, m4 i CML13; nepoznati i F1L3.28; hipotetski protein i RuBisCO).



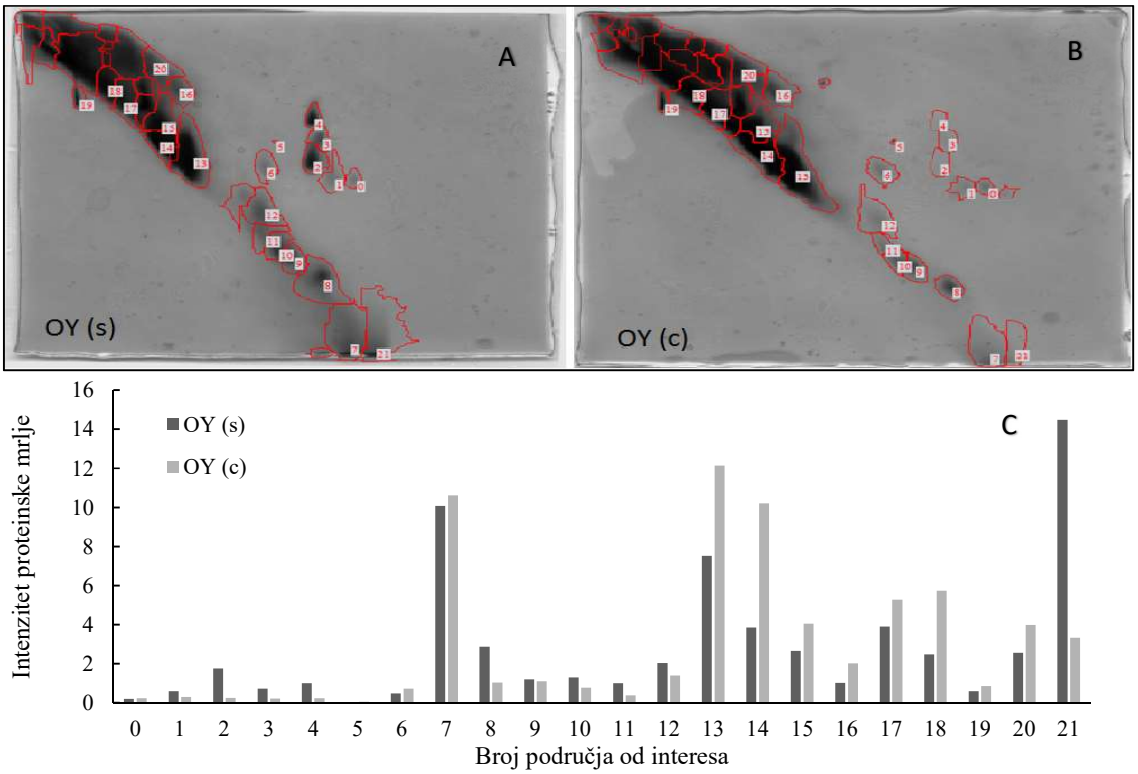
Slika 9. Relativna kvantifikacija IDP ekotipa Col vrste *Arabidopsis thaliana*. Slike pod A i B prikazuju područja od interesa čiji je intenzitet mjeren označena brojevima 0-24; (s) označava proteine iz biljaka prethodno izloženih suši, a (c) proteine iz netretiranih biljaka. Slika pod C prikazuje usporedbu intenziteta obojenja proteina srebrovim nitratom za svako područje od interesa označeno na Slikama A i B.



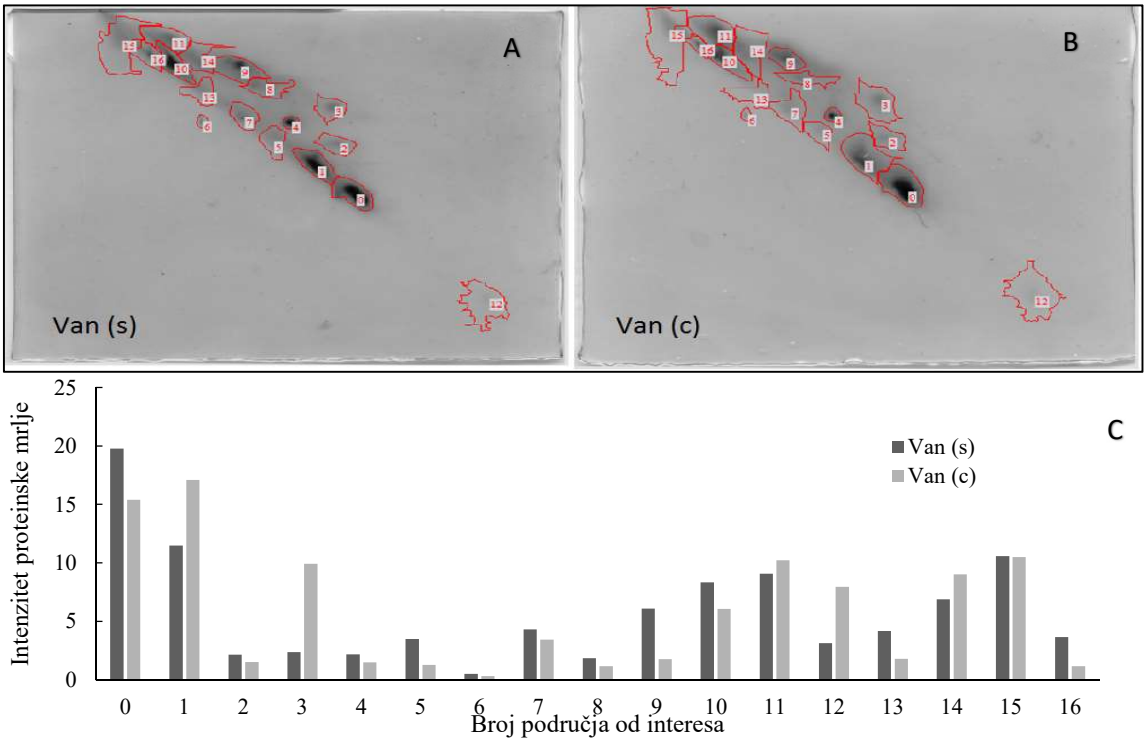
Slika 10. Relativna kvantifikacija IDP ekotipa Ita vrste *Arabidopsis thaliana*. Slike pod A i B prikazuju područja od interesa čiji je intenzitet mjeren označena brojevima 0-17; (s) označava proteine iz biljaka prethodno izloženih suši, a (c) proteine iz netretiranih biljaka. Slika pod C prikazuje usporedbu intenziteta obojenja proteina srebrovim nitratom za svako područje od interesa označeno na Slikama A i B.



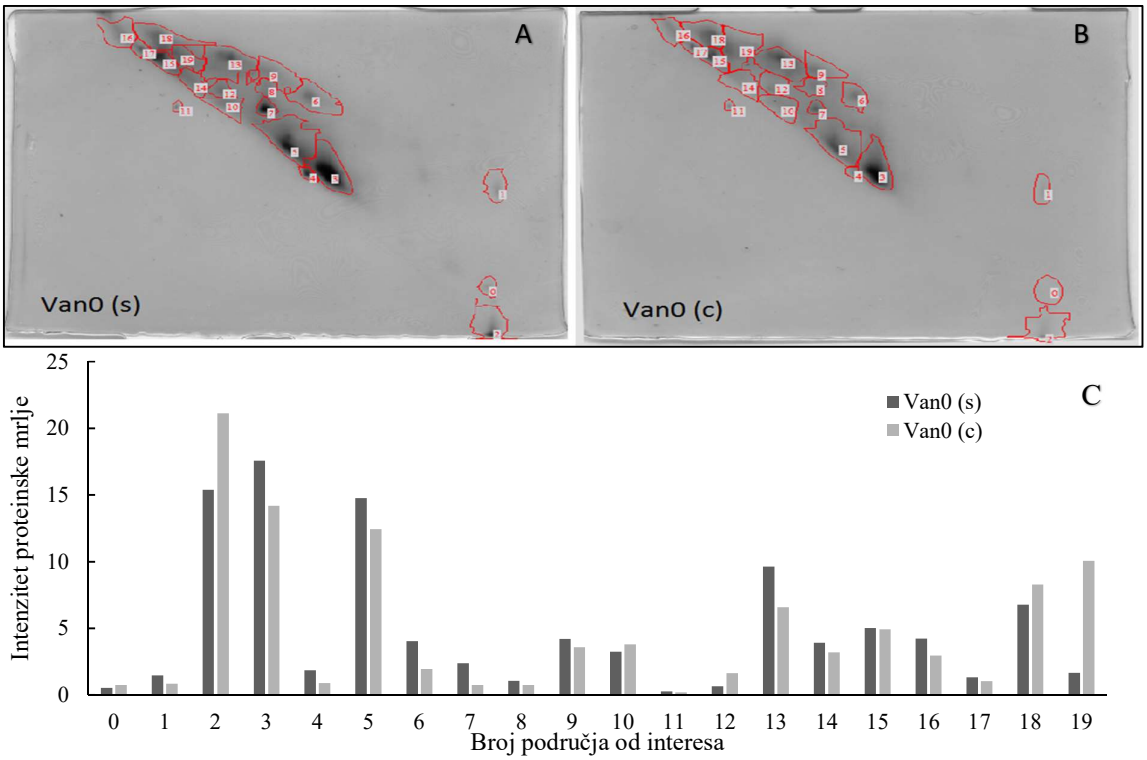
Slika 11. Relativna kvantifikacija IDP ekotipa Ita0 vrste *Arabidopsis thaliana*. Slike pod A i B prikazuju područja od interesa čiji je intenzitet mjeren označena brojevima 0-21; (s) označava proteine iz biljaka prethodno izloženih suši, a (c) proteine iz netretiranih biljaka. Slika pod C prikazuje usporedbu intenziteta obojenja proteina srebrovim nitratom za svako područje od interesa označeno na Slikama A i B.



Slika 12. Relativna kvantifikacija IDP ekotipa Oy vrste *Arabidopsis thaliana*. Slike pod A i B prikazuju područja od interesa čiji je intenzitet mjeren označena brojevima 0-21; (s) označava proteine iz biljaka prethodno izloženih suši, a (c) proteine iz netretiranih biljaka. Slika pod C prikazuje usporedbu intenziteta obojenja proteina srebrovim nitratom za svako područje od interesa označeno na Slikama A i B.



Slika 13. Relativna kvantifikacija IDP ekotipa Van vrste *Arabidopsis thaliana*. Slike pod A i B prikazuju područja od interesa čiji je intenzitet mjeren označena brojevima 0-16; (s) označava proteine iz biljaka prethodno izloženih suši, a (c) proteine iz netretiranih biljaka. Slika pod C prikazuje usporedbu intenziteta obojenja proteina srebrovim nitratom za svako područje od interesa označeno na Slikama A i B.



Slika 14. Relativna kvantifikacija IDP ekotipa Van0 vrste *Arabidopsis thaliana*. Slike pod A i B prikazuju područja od interesa čiji je intenzitet mjeren označena brojevima 0-19; (s) označava proteine iz biljaka prethodno izloženih suši, a (c) proteine iz netretiranih biljaka. Slika pod C prikazuje usporedbu intenziteta obojenja proteina srebrovim nitratom za svako područje od interesa označeno na Slikama A i B.

Tablica 9. Proteini identificirani metodom MALDI TOF/TOF i područja od interesa u kojima se nalaze prilikom relativne kvantifikacije za svaki ekotip. Navedeni su nazivi proteina i njihovi pristupni brojevi prema dvjema bazama podataka (NCBI/UniProt) te oznake područja od interesa čijem signalu pridonose dani proteini za svaki ekotip pri denzitometrijskoj analizi alatom alatom ImageMaster™ 2D Platinum.

Protein	Identifikacijski kod proteina		Broj označenog područja na slici gela koji sadrži dani protein					
	NCBI	UniProt	OY	Col	Ita	Ita0	Van	Van0
kalmodulin-3, djelomičan	gi|166655	AAA32765.1	6	5	-	-	-	-
šaperonin 20	gi|15242045	NP_197572.1	-	19	14	18	10	15
predviđen: kalcij-vezujući protein CML13	gi|15221284	NP_172695.1	16	14	11	14	3	6
bakar/cink superoksid dismutaza	gi|5689611	CAB51840.1	13, 14	-	?	?	-	-
bakar/cink superoksid dismutaza 2	gi|18401659	NP_565666.1	14	8	7	10	1	5
embrio defektivni protein 1241	gi|18418410	NP_568356.1	19	12	8	12	6	11
F1L3.28	gi|8778462	AAF79470.1	14	7	-	1	-	4
vjerojatan: protein H2 sustava za cijepanje glicina	gi|15223217	NP_174525.1	14	8	7	10	1	5
protein H kompleksa glicin dekarboksilaze	gi|15226973	NP_181080.1	14	8	7	10	1	5
hipotetski protein	gi|6056403	AAF02867.1	-	23	17	21	15	16
niskom temperaturom induciran protein 78	gi|15450771	AAK96657.1	-	-	17	21	16	17
DNA-vezujući protein sličan Myb-u	gi|1747310	BAA09598.1	19	12	8	12	6	11
16 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika	gi|4583542	CAB40384.1	-	19, 24	14, 15	18	10, 16	15, 17
23K protein kompleksa za razvoj kisika fotosustava II, predviđen	gi|2880056	AAC02750.1	-	18	13	17	9	13
33 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika (OEC) fotosustava II	gi|21593220	AAM65169.1	18	16, 17, 18, 19, 20	12, 13, 14	16, 17, 18	8, 9, 10, 13	13, 14, 15, 17
plastocijanin, predviđen	gi|21592405	AAM64356.1	2, 13	4, 6	6	9	0	3
podjedinica P-1 fotosustava II	gi|15222166	NP_172153.1	-	11, 18	9, 13	11, 17	4, 9	7, 13
podjedinica P-1 fotosustava II	gi|186478207	NP_001117239.1	-	11, 17, 19, 20	9, 12, 14	5, 11, 17, 18	4, 8, 10	7, 8, 13, 15, 17
predviđen: RNA-vezujući protein	gi|21617920	AAM66970.1	-	17	12	17	8	13
RuBisCO velika podjedinica, djelomičan (kloroplast)	gi|27752799	AAO19414.1	-	23	17	21	15	16
tioredoksin M2	gi|238480210	NP_001154203.1	-	-	-	5	-	8
tioredoksin M1	gi|30678634	NP_849585.1	16	14	11	14	3	6
tioredoksin m4	gi|110742393	BAE99119.1	16	14	11	14	3	6
nepoznat	gi|21555836	AAM63945.1	14	7	-	1	-	4
AT5g12140/MXC9_10	gi|15724168	AAL06476.1	5	-	-	-	-	-

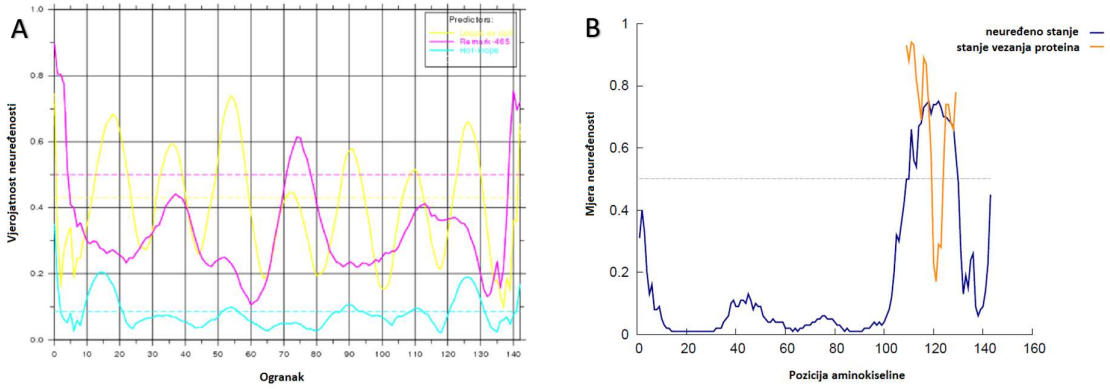
3.4. Bioinformatička analiza neuređenosti

Proteini identificirani spektrometrijom masa obrađeni su trima bioinformatičkim alatima kojima se testirala njihova neuređenost. Proteinske sekvencije su preuzete iz NCBI baze podataka. Ukoliko je sekvencija bila predugačka za pojedini alat, uzet je maksimalan broj aminokiselina koje se mogu obraditi s početka sekvencije, i s kraja sekvencije, tako da su dobivena dva rezultata. DisEMBL i DISOPRED3 daju rezultate svojih obrada u grafičkom formatu (Slike 15.-37.), a SLIDER daje broj između 0 i 1 (Tablica 10.). Što je veći taj broj, predviđena je veća neuređenost sekvencije. Svaki protein koji postiže rezultat iznad 0,5 može se smatrati većinski neuređenim prema SLIDERu, dok DISOPRED3 prikazuje rast i pad neuređenosti strukture s obzirom na slijed aminokiselina gdje se također dijelovi proteinske sekvencije koji premašuju 0,5 smatraju neuređenima. DisEMBL ima različite kriterije za svaku pojedinu strukturnu kategoriju čiju vjerojatnost računa, označene na grafu iscrtkanim vodoravnim linijama. Od identificiranih proteina, najveću neuređenost pokazuje DNA-vezujući protein sličan Myb-u (0,935), a usko ga prate dva proteina nepoznatih funkcija hipotetski protein i nepoznat protein. Visoku vjerojatnost neuređenosti pokazuju i niskom temperaturom induciran protein 78, F1L3.28, embrio defektivni protein 1241, RNA-vezujući protein i 16 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika.

Tablica 10. Neuređenost proteina izračunata pomoću alata SLIDER.

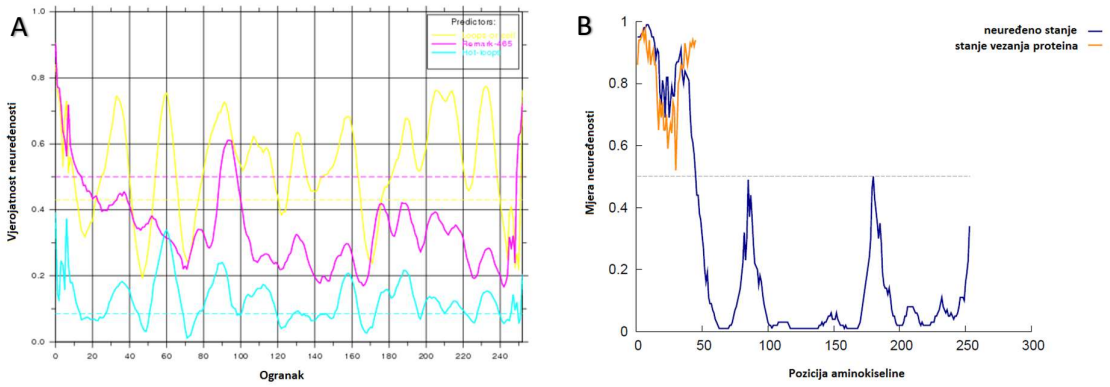
Identifikacijski kod proteina		Ime proteina	Slider
NCBI	UniProt		
gi|166655	AAA32765.1	kalmodulin-3, djelomičan	0,48394233677
gi|15242045	NP_197572.1	šaperonin 20	0,4512916549543488
gi|15221284	NP_172695.1	predviđen: kalcij-vezujući protein CML13	0,4070730909087954
gi|5689611	CAB51840.1	bakar/cink superoksid dismutaza	0,4986083524494169
gi|18401659	NP_565666.1	bakar/cink superoksid dismutaza 2	0,5132722775110983
gi|18418410	NP_568356.1	embrio defektivni protein 1241	0,7581150354944957
gi|8778462	AAF79470.1	F1L3.28	0,7614081160384016 (kraj) 0,5883147943378848 (početak)
gi|15223217	NP_174525.1	vjerojatan: protein H2 sustava za cijepanje glicina	0,5206755301403185
gi|15226973	NP_181080.1	protein H kompleksa glicin dekarboksilaze	0,4741203516672999
gi|6056403	AAF02867.1	hipotetski protein	0,891609712270974 (kraj) 0,875424556106235 (početak)
gi|15450771	AAK96657.1	niskom temperaturom induciran protein 78	0,8535477994070458
gi|1747310	BAA09598.1	DNA-vezujući protein sličan Myb-u	0,9352514936993381
gi|4583542	CAB40384.1	16 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika	0,7354733302979801
gi|2880056	AAC02750.1	23K protein kompleksa za razvoj kisika fotosustava II, predviđen	0,5578291881948247
gi|21593220	AAM65169.1	33 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika (OEC) fotosustava II	0,5115420041141184
gi|21592405	AAM64356.1	plastocijanin, predviđen	0,4768838514521935
gi|15222166	NP_172153.1	podjedinica P-1 fotosustava II	0,5485875452575125
gi|186478207	NP_001117239.1	podjedinica P-1 fotosustava II	0,4463209828025649
gi|21617920	AAM66970.1	predviđen: RNA-vezujući protein	0,6117891820588007
gi|27752799	AAO19414.1	RuBisCO velika podjedinica, djelomičan (kloroplast)	0,505254688047254
gi|238480210	NP_001154203.1	tioredoksin M2	0,2081677686353602
gi|30678634	NP_849585.1	tioredoksin M1	0,4968964202840512
gi|110742393	BAE99119.1	tioredoksin m4	0,5034027750684141
gi|21555836	AAM63945.1	nepoznat	0,8739526155328267
gi|15724168	AAL06476.1	AT5g12140/MXC9_10	0,297346254793049

Kalmodulin-3 ne pokazuje značajnu neuređenost niti prema jednom alatu za predviđanje neuređenosti strukture, iako posjeduje jednu kraću neuređenu regiju u neveznom stanju dugu 20 aminokiselina između stotog i stotridesetog ogranka (Slika 15.B).



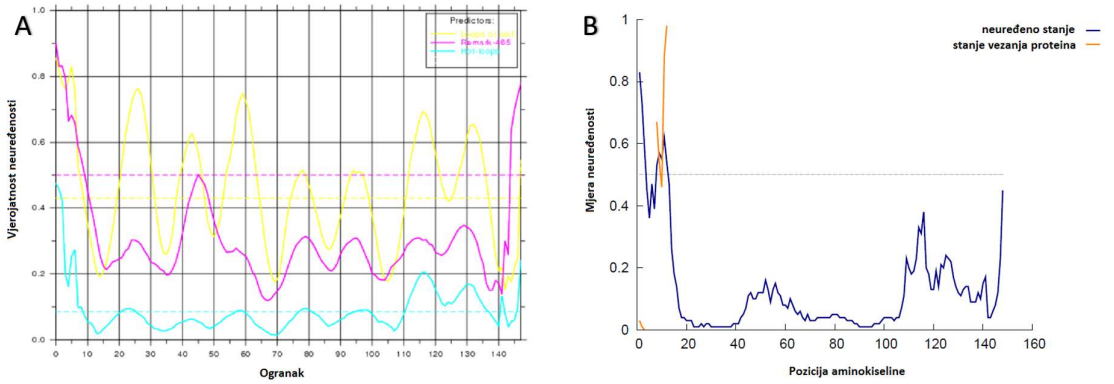
Slika 15. Profil neuređenosti proteina kalmodulin-3. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

Šaperonin 20, iako je većinski strukturiran, posjeduje dugu (50 aminokiselina) neuređenu regiju na početku sekvencije koja sadrži potencijalno vezno mjesto. Neuređenosti na samom N-terminusu pridonose nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama i dinamični okreti, a dalje neuređene sekundarne strukture (Slika 16.).



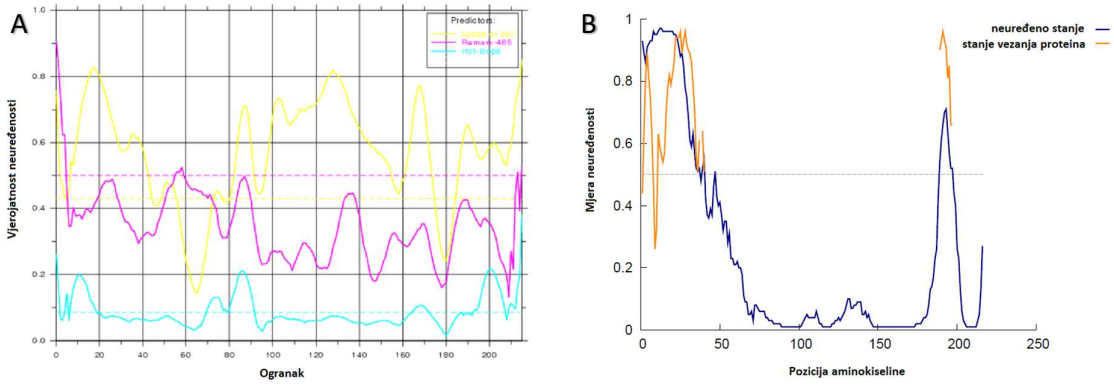
Slika 16. Profil neuređenosti šaperonina 20. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

Kalcij-vezujući protein CML13 ne pokazuje značajnu neuređenost niti prema jednom alatu za predviđanje neuređenosti strukture (Slika 17.).

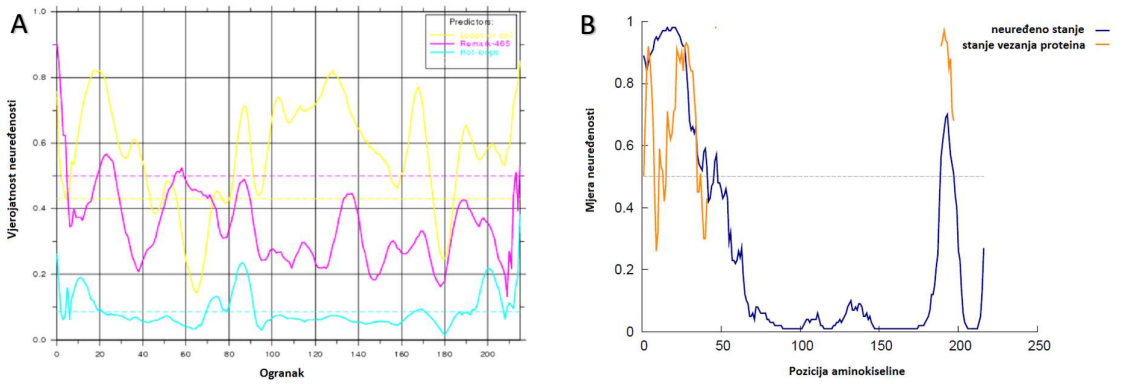


Slika 17. Profil neuređenosti kalcij-vezujućeg proteina CML13. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

Bakar/cink superoksid dismutaza identificirana je u dvije izoforme slične po profilima neuređenosti. Izoforma 2 pokazuje nešto veću neuređenost prema alatu SLIDER (Tablica 10.) koja prema grafičkom alatu DISOPRED3 polazi od područja između 30. i 50. aminokiseline gdje izoforma 2 bilježi malo veću neuređenost. Obje izoforme posjeduju dugu neuređenu regiju an početku sekvencije i kratku neuređenu regiju na kraju. DisEMBL predviđa vjerojatnost postojanja neuređenih sekundarnih struktura i u sredini sekvencije za obje izoforme (Slike 18. i 19.).

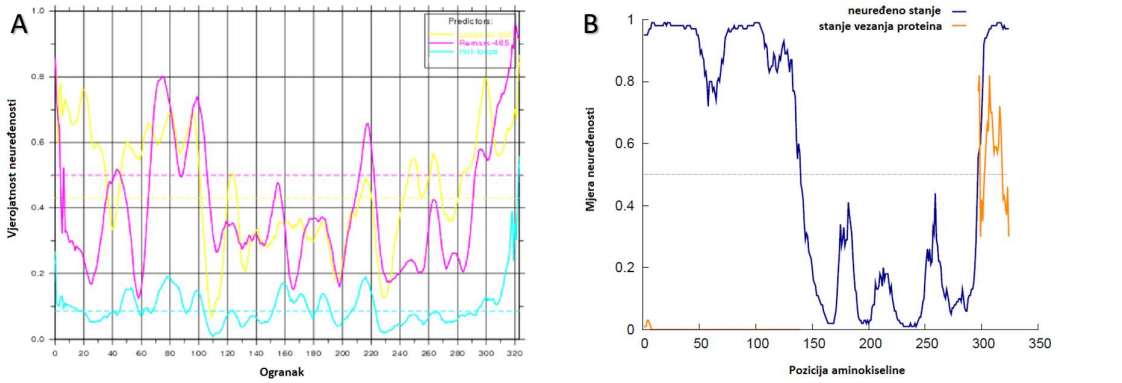


Slika 18. Profil neuređenosti proteina bakar/cink superoksid dismutaza. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.



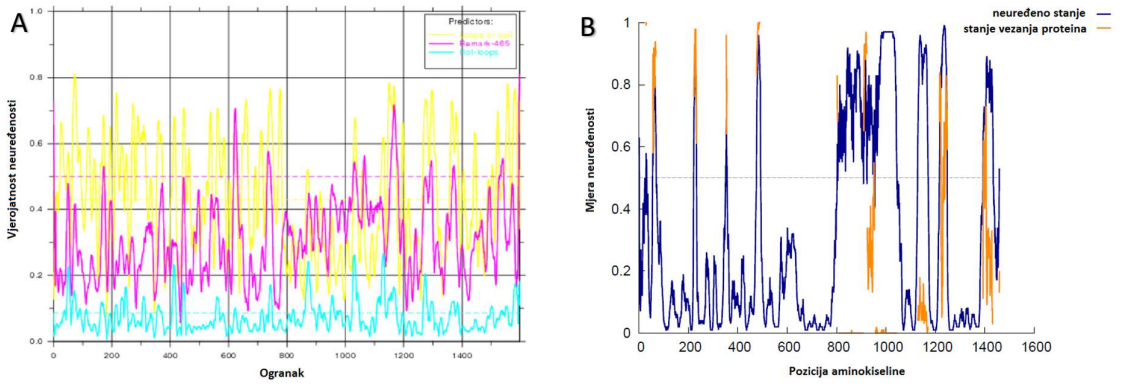
Slika 19. Profil neuređenosti proteina bakar/cink superoksid dismutaza 2. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

Embrio defektivni protein 1241 pokazuje veliku vjerojatnost neuređenosti prema svim korištenim alatima. Duge neuređene regije nalaze se na N-terminusu i C-terminusu, a DisEMBL bilježi i kraću neuređenu sekvenciju između 200. i 220. aminokiseline (Slika 20.).



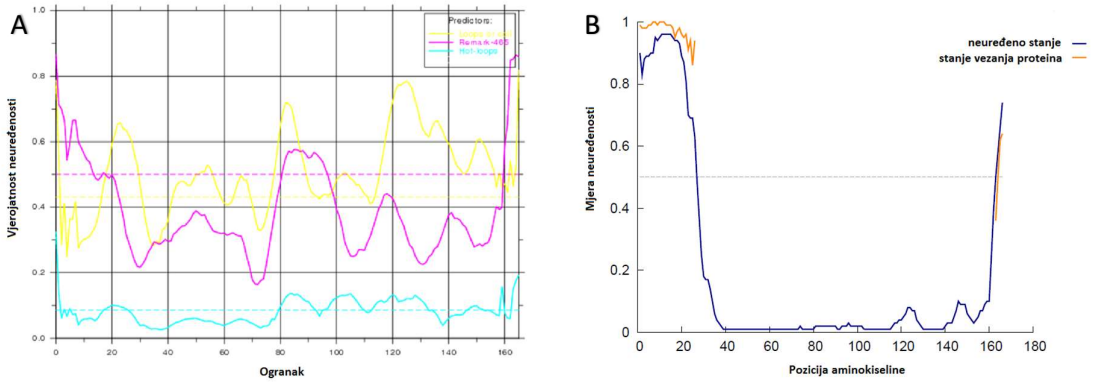
Slika 20. Profil neuređenosti proteina embrio defektivni 1241. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

Protein F1L3.28 dug je preko 1500 aminokiselina i sadrži 8 neuređenih regija, od kojih je ona između 800. i 1000. aminokiseline duga preko 200 ogranaka (Slika 21.). Sve neuređene regije ovog proteina imaju potencijal vezanja. Vjerojatnost neuređenosti veća je na kraju, nego na početku sekvencije proteina (Tablica 10.).

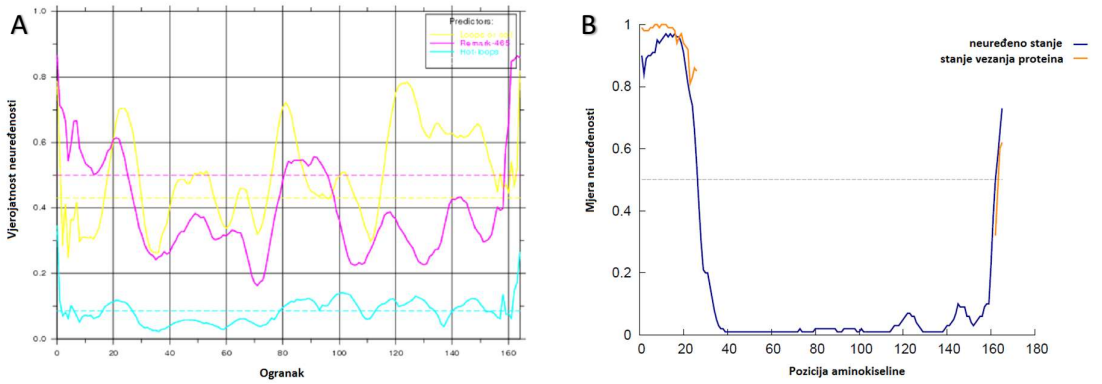


Slika 21. Profil neuređenosti proteina F1L3.28. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

Protein H kompleksa glicin dekarboksilaze identificiran je u dvije izoforme gotovo identičnih profila neuređenosti (Slike 22. i 23.). Iako prema DISOPRED3 ovi proteini imaju samo jednu kratku neuređenu regiju na početku sekvencije, SLIDER predviđa da je neuređenost izoforme 2 vjerojatnija od 50%, a prema DisEMBLu obje izoforme sadrže neuređene sekundarne strukture od 120. do 160. aminokiselinskog ogranka (Slike 22. i 23., Tablica 10.).

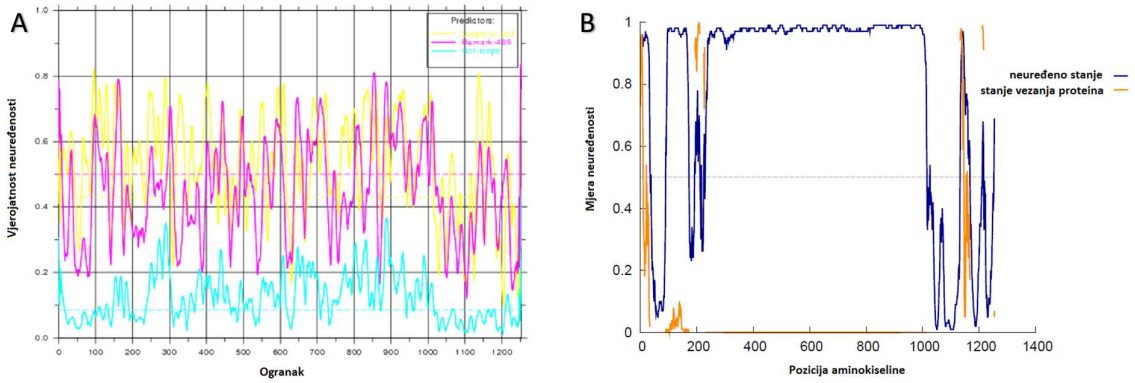


Slika 22. Profil neuređenosti proteina H2 sustava za cijepanje glicina. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.



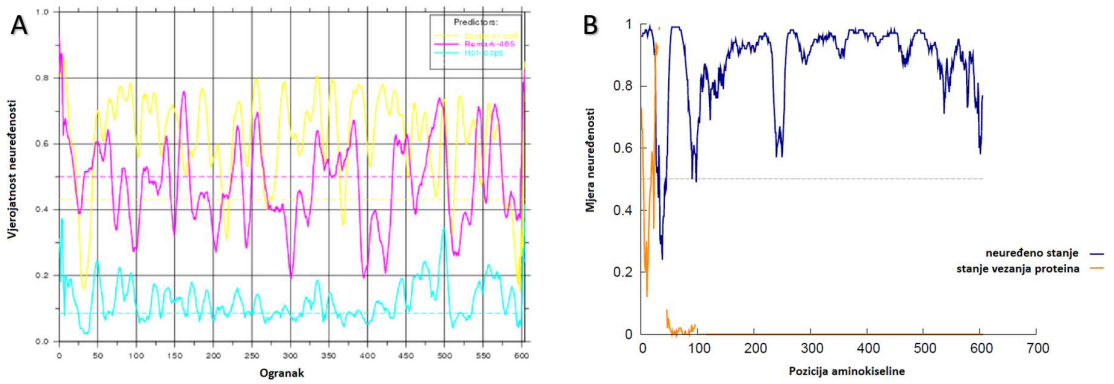
Slika 23. Profil neuređenosti proteina H kompleksa glicin dekarboksilaze. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

Hipotetski protein može se smatrati potpuno neuređenim prema svim korištenim alatima za procjenu neuređenosti sa središnjom neuređenom regijom od preko 700 aminokiselina (Slika 24.). Na gelu se nalazi ispod dijagonale što potvrđuje njegov IDP karakter (Slika 8., Tablica 8.).



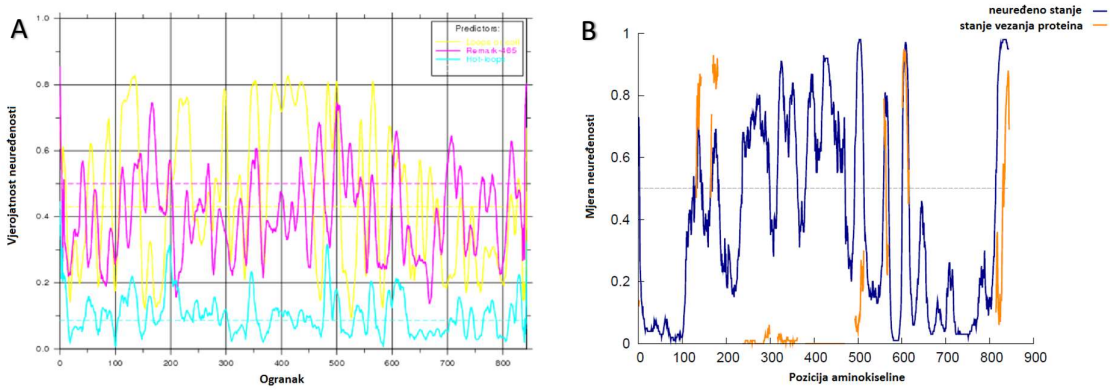
Slika 24. Profil neuređenosti hipotetskog proteina. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

Niskom temperaturom inducirani protein 78 također se može smatrati potpuno neuređenim prema svim korištenim alatima za procjenu neuređenosti. Posjeduje samo jednu kratku strukturiranu regiju oko 50. aminokiseline, a ostatak sekvencije formira neuređene sekundarne strukture i tri veća dinamična okreta (Slika 25.).



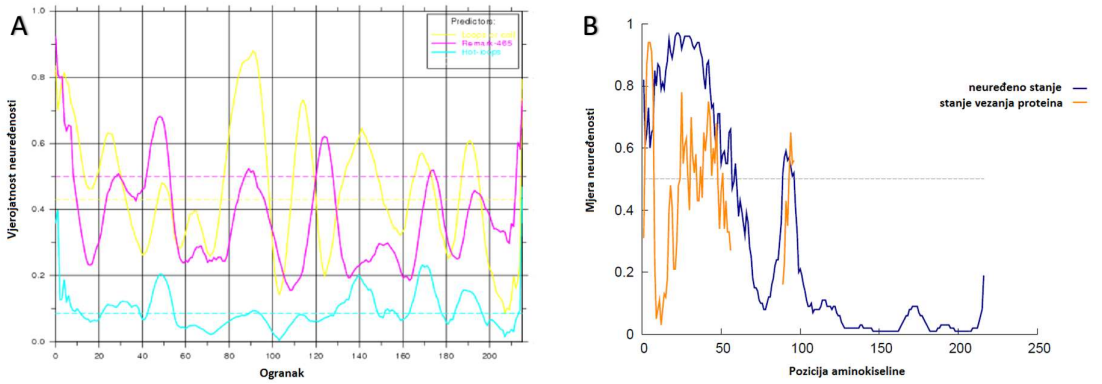
Slika 25. Profil neuređenosti niskom temperaturom induciranog proteina 78. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

DNA-vezujući protein sličan Myb-u sadrži alternirajuće neuređene i uređene segmente gdje neuređeni segmenti prevladavaju u sredini stukture. Na dva mjesta gdje DISOPRED3 predviđa pad vjerojatnosti neuređenosti, DisEMBL predviđa dinamični okret (oko 200. aminokiseline) ili neuređenu sekundarnu strukturu (prije 500. aminokiseline). Početna regija do 100. te regija između 650. i 800. aminokiseline ne pokazuju značajnu neuređenost niti prema jednom od ta dva alata (Slika 26.).



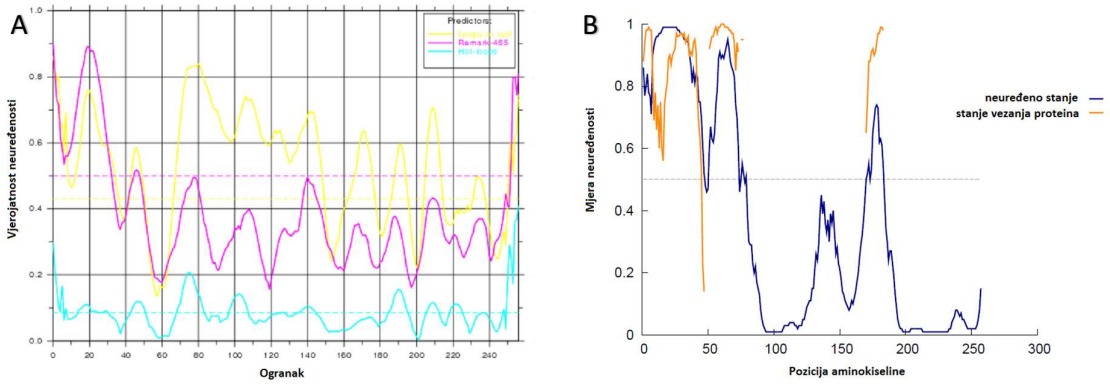
Slika 26. Profil neuređenosti DNA-vezujućeg proteina sličnog Myb-u. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

Profil neuređenosti 16 kDa polipeptida kompleksa za razvoj kisika pokazuje visoku vjerojatnost neuređenosti s jednom dugačkom (preko 50 aminokiselinskih ogranaka) neuređenom regijom na početku sekvencije, i jednom kraćom prije 100. aminokiseline. Obje imaju potencijal vezanja. C-terminalna polovica ne pokazuje vjerojatnost neuređenosti prema DISOPRED3, ali DisEMBL predviđa tri dinamična okreta i/ili neuređene sekundarne elemente nakon 120. aminokiseline (Slika 27.).



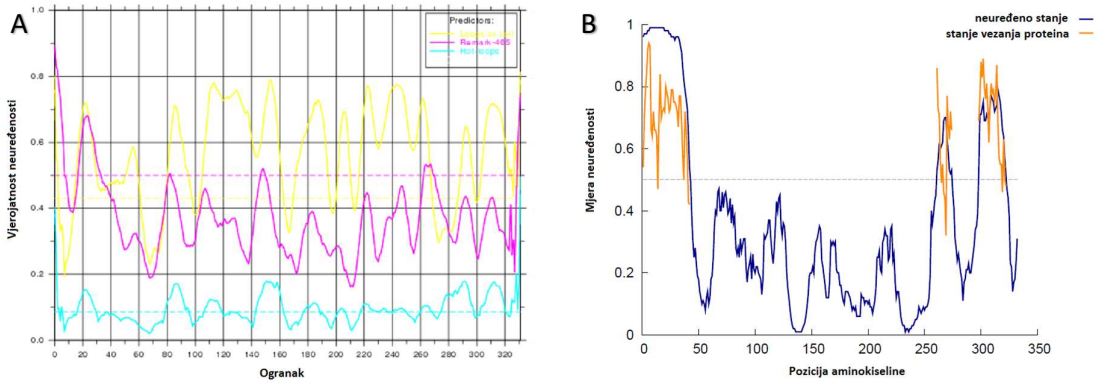
Slika 27. Profil neuređenosti 16 kDa polipeptida kompleksa za razvoj kisika. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

Profil neuređenosti 23K proteina kompleksa za razvoj kisika fotosustava II ukazuje na postojanje tri neuređene regije s potencijalom vezanja unutar strukture. DISOPRED3 ne predviđa neuređenost između 70. i 150. aminokiselinskog ogranka, ali DisEMBL tamo računa vjerojatnost neuređenih sekundarnih struktura (Slika 28.).



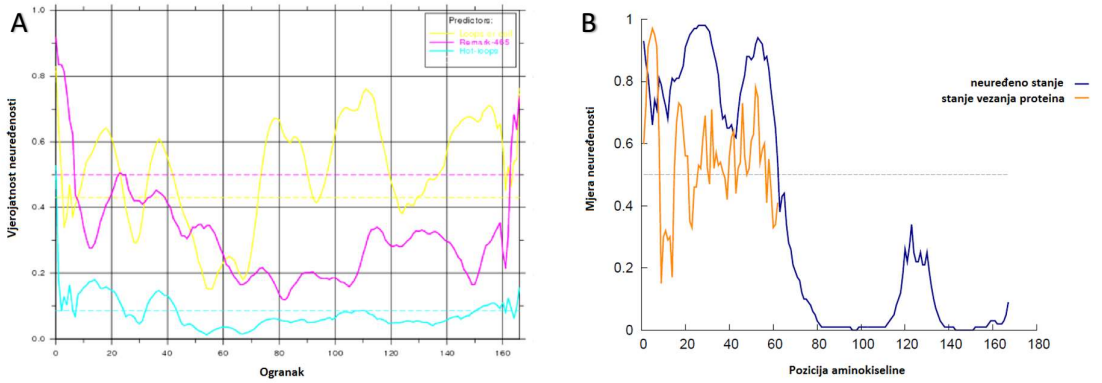
Slika 28. Profil neuređenosti 23K proteina kompleksa za razvoj kisika fotosustava II. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

Neuređene regije 33 kDa polipeptida kompleksa za razvoj kisika (OEC) fotosustava II također sve imaju potencijal vezanja. Najdulja je na samom N-terminusu, a dvije manje nalaze se pri kraju sekvencije proteina. Središnju regiju između 50. i 250. aminokiseline DISOPRED3 smatra većinski strukturiranom, a DisEMBL tamo ipak predviđa postojanje neuređenih sekundarnih elemenata i dinamičnih okreta (Slika 29.).



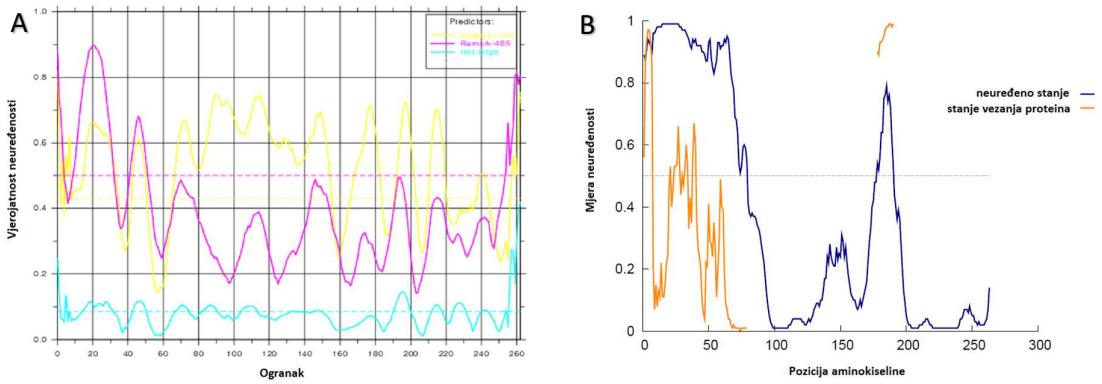
Slika 29. Profil neuređenosti 33 kDa polipeptida kompleksa za razvoj kisika (OEC) fotosustava II. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

Plastocijanin prema alatu DISOPRED3 posjeduje samo jednu dugu neuređenu regiju na početku sekvencije s potencijalom vezanja. DisEMBL i u ovom slučaju predviđa vjerojatnost postojanja tri neuređene sekundarne strukture iza 70. aminokiseline tj. u drugoj polovici sekvencije (Slika 30.).

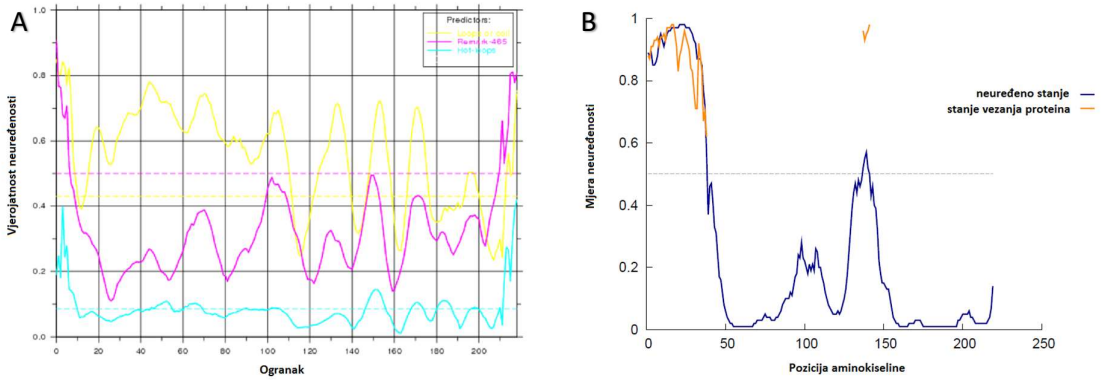


Slika 30. Profil neuređenosti proteina plastocijanin. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

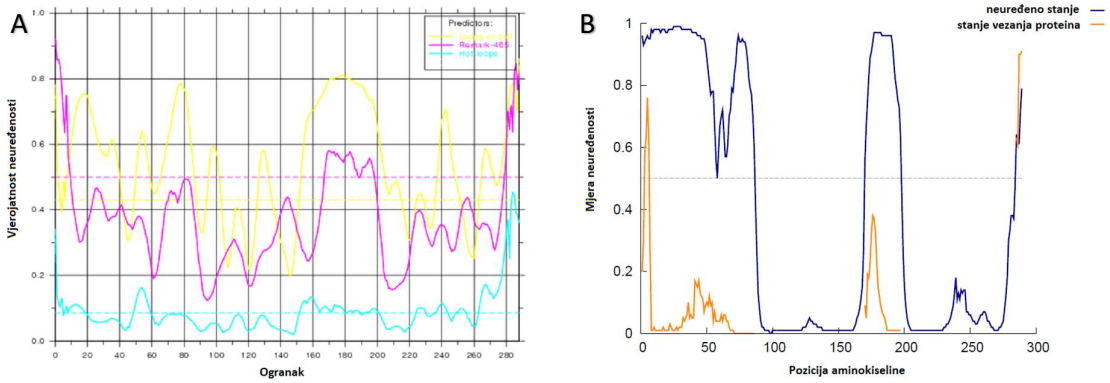
Podjedinica P-1 fotosustava II identificirana je u dvije izoforme od kojih je jedna (gi|15222166) značajno neuređenija od druge (gi|186478207) s duplo duljom neuređenom N-terminalnom regijom i razlikom vjerojatnosti neuređenosti prema SLIDERu od 10% (Slike 31. i 32., Tablica 10.).



Slika 31. Profil neuređenosti podjedinice P-1 fotosustava II (gi15222166). Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.



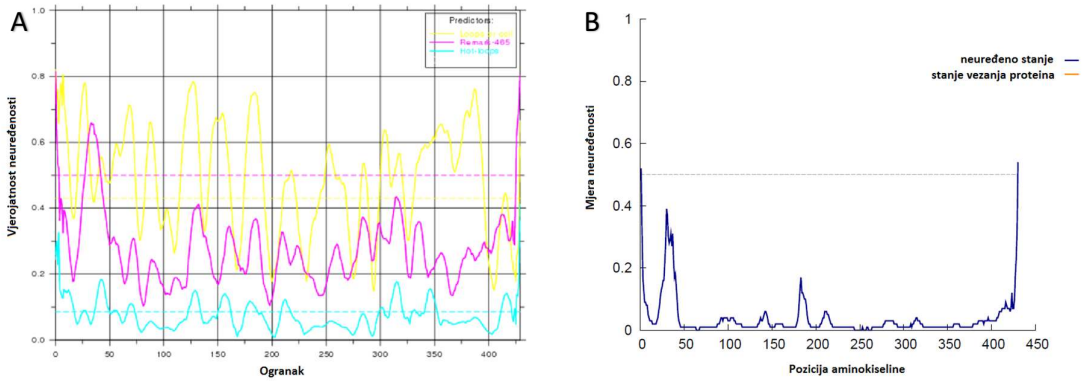
Slika 32. Profil neuređenosti proteina podjedinice P-1 fotosustava II (gi186478207). Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.



Slika 33. Profil neuređenosti RNA-vezujućeg proteina. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

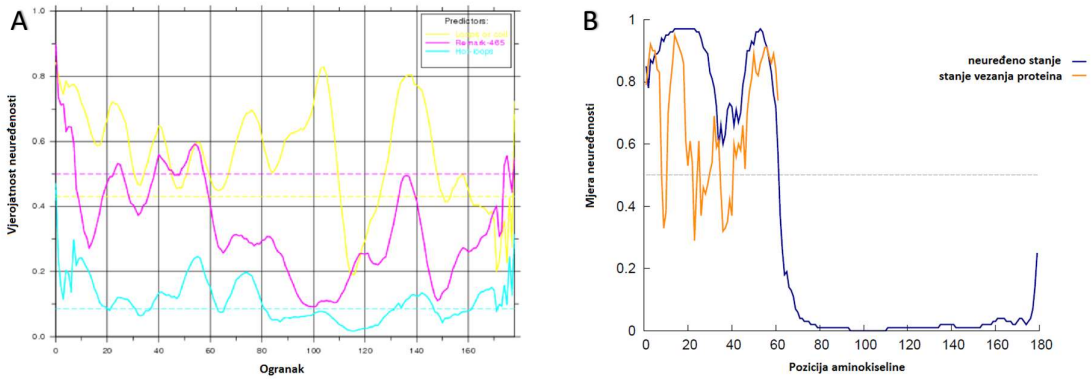
RNA-vezujući protein posjeduje tri velike neuređene regije koje imaju potencijal vezanja duljina od 100, 50 i 30 aminokiselinskih ogranaka i međusobnim razmakom od po 70 (Slika 33.).

Velika podjedinica RuBisCO-a prema alatu DISOPRED3 nema niti jednu nestrukturiranu regiju, iako DisEMBL predviđa postojanje jedne veće neuređene sekundarne stukture između 350. i 400. aminokiseline, a prema SLIDERu je 50% strukture neuređeno (Slika 34., Tablica 10.).

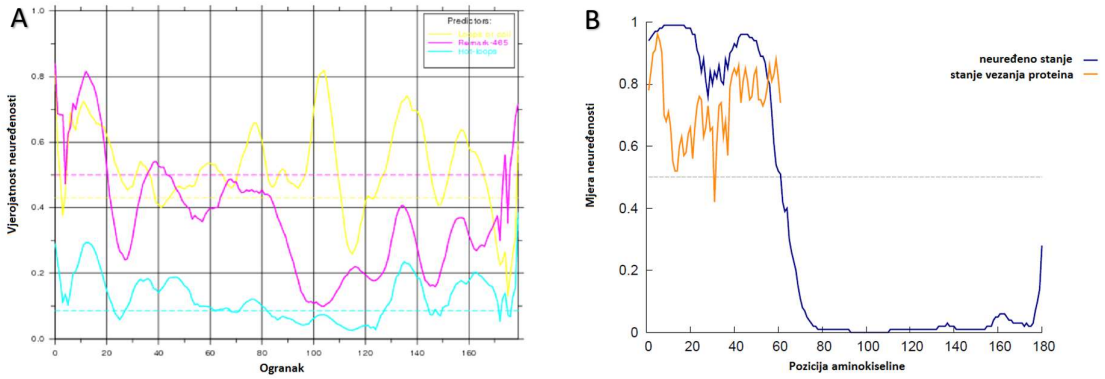


Slika 34. Profil neuređenosti proteina RuBisCO, velika podjedinica (kloroplast). Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

Tioredoksini M1 i m4 imaju slične profile neuređenosti prema svim korištenim alatima procjene. Oba proteina posjeduju neuređenu regiju s potencijalnim veznim mjestom na N-terminusu dugu nešto preko 60 aminokiselinskih ogranaka, a u ostatku sekvencije su strukturirani (Slika 35. i 36.). Tioredoksin M2, za razliku od njih, nije neuređen protein (Tablica 10.).

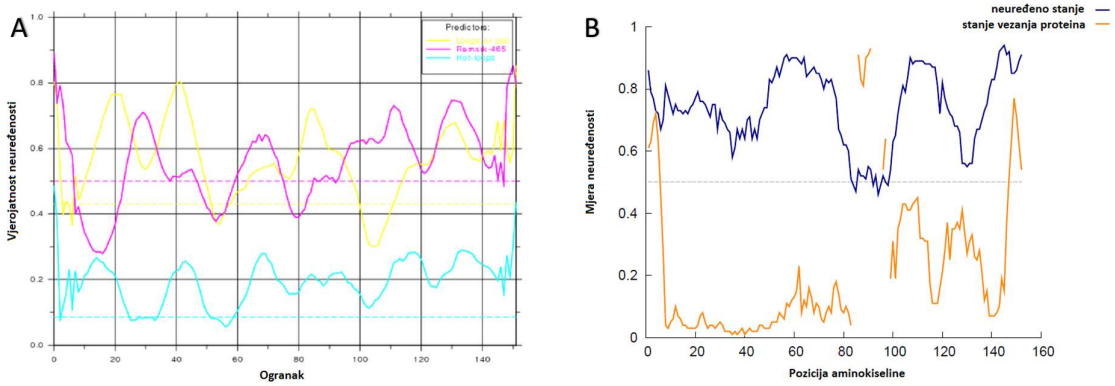


Slika 35. Profil neuređenosti proteina tioredoksin M1. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.



Slika 36. Profil neuređenosti proteina tioredoksin m4. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

Nepoznati protein visoko je neuređen prema svim korištenim alatima. Prema DISOPRED3 potpuno je neuređen kad ne veže supstrat, a u veznom stanju poprima uređene strukture. Prema DisEMBLu N-terminalni dio strukture čine neuređene sekundarne strukture, a C-terminalni dinamični okreti (Slika 37.).



Slika 37. Profil neuređenosti nepoznatog proteina. Slika A prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DisEMBL; žuta linija predstavlja predviđene sekundarne strukture, plava linija dinamične okrete tzv. 'vruće petlje', a ljubičasta nepripisane elektronske gustoće dobivene kristalografijom X-zrakama. Slika B prikazuje profil neuređenosti dobiven alatom DISOPRED3; plava linija označava vjerojatnost neuređenosti slijeda aminokiselina, a narančasta vjerojatnost postojanja veznih mjesta unutar neuređenih regija.

4. RASPRAVA

Ovo se istraživanje bavilo utjecajem suše na ekspresiju i aktivnost proteina različitih ekotipova vrste *Arabidopsis thaliana* te je u sklopu toga provedena analiza aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze GPX i relativna kvantifikacija proteina Hsp70 u uvjetima suše. Zbog njihove uloge u neutralizaciji ROS-ova (Uarrota i sur., 2016, Swindell i sur., 2007), moguće je da u većoj ili manjoj mjeri sudjeluju u odgovoru na razne abiotičke stresove, što u slučaju suše naši rezultati potvrđuju.

Iz rezultata (Slika 3.) je vidljivo da ekotip Oy koji prirodno raste u najsušem području pokazuje najmanju aktivnost gvajakol peroksidaze, ali se ona poveća preko dvadeset puta nakon izlaganja stresu. Ekotipovi Van i Col pokazuju otprilike trostruko povećanje aktivnosti gvajakol peroksidaze, a Ita, koji je u divljini najviše izložen padalinama, tek dvostruko ili manje. Dakle, iako je povećanje aktivnosti GPX općenito prisutan odgovor biljaka *A. thaliana* na sušu, on se razlikuje u intenzitetu među ekotipovima.

Kvantifikacija proteina Hsp70 (Slika 5.) također je u većini slučajeva pokazala blago povećanje Hsp70 prilikom izlaganja suši, s izuzetkom ekotipa Col i jedne zasebno tretirane replike ekotipa Van (Van0), gdje nije bilo razlike. Dva su moguća objašnjenja zašto ekotipovi koji prirodno rastu u klimi s umjerenom količinom padalina imaju najslabiji odgovor. Jedno je da su biljke ekotipa Ita najranije počele osjećati stres i započele s transkripcijom gena *Hsp70*, a biljke ekotipa Oy imaju najjači odgovor. Drugo je da uočene razlike nisu značajne (rezultati su u ovom slučaju dobiveni samo jednom analizom), kao što je slučaj s jasikom gdje se ekspresija Hsp70 ne mijenja tijekom suše (Yer i sur., 2016).

Glavni cilj ovog istraživanja bio je, međutim, identifikacija i karakterizacija novih IDP te njihova razlika u ekspresiji u uvjetima stresa sušom. IDP se smatra protein koji ima barem jednu neuređenu regiju dugu 30 ili više aminokiselina (Peng i sur., 2014). U ovom radu je sa sigurnošću identificirano 25 proteina, od kojih 21 imaju duge nestrukturirane regije. Usporedba spektara masa ekotipova Oy i Col ukazala je i na pojavljivanje tri proteina u dvije različite izoforme.

Jedan od njih je protein Cu/Zn superoksid dismutaza (SOD), enzim prisutan u citoplazmi i kloroplastima. Zaslužan je za katalizu dismutacije toksičnog superoksidnog radikala u O_2 i H_2O_2, što je ujedno i prvi korak obrane stanice od oksidativnog stresa (Bowler i sur., 1994). Ranije je otkriveno da Cu/Zn SOD postoji u dvije različito stabilne izoforme, od kojih je stabilnija prisutna u ekotipu Cvi vrste *A. thaliana* koji prirodno raste u sušnom području (Abarca i sur., 2001). Stabilnost enzima omogućuje manju potrebu za povećanom transkripcijom njegovog gena

prilikom izlaganja oksidativnom stresu. Rezultati spektrometrije masa potvrdili su da je izoenzim identificiran najprije u ekotipu Cvi prisutan i u ekotipu Oy kao bakar/cink superoksid dismutaza s identifikacijskim brojem gi|5689611 (Tablica 6., Slika 8., točke 14 i 15). Iako je ekvivalentna točka analizirana i za ekotip Col (Slika 8., točka 11), tamo nije pronađen takav enzim te nas to navodi na pretpostavku da Col ne eksprimira stabilniji izoenzim. Ekotip Oy, međutim, pokazuje i ekspresiju manje stabilne proteinske izoforme identificirane kao bakar/cink superoksid dismutaza 2 s identifikacijskim brojem gi|18401659 (Tablica 6., Slika 8., točka 16). Za Col ekvivalentna točka nije uzeta pri analizi MS-om pa ovaj izoenzim nije niti mogao biti identificiran, iako je potvrđen drugim istraživanjima (Lin i sur., 1999). Analiza neuređenosti pokazuje da su oba ova izoenzima slično neuređena (Slike 18. i 19.). Značajna razlika nalazi se u području između 30. i 50. aminokiseline gdje je stabilnija izoforma u neveznom stanju uređenija od standardne, a u veznom stanju neuređenija.

Protein H kompleksa glicin dekarboksilaze (ili sustava za cjepanje glicina) je također nađen u dvije izoforme: vjerojatan protein H2 sustava za cijepanje glicina i protein H kompleksa glicin dekarboksilaze (Tablica 8.). Kompleks glicin dekarboksilaze (eng. *glycine decarboxylase complex*, GDC) mitohondrijski je enzim čija aktivnost omogućuje preradu glicina u serin i time sam proces fotorespiracije. Zbog toga što je fotorespiracija najizraženija uloga mitohondrija u stanicama listova koji provode fotosintezu, GDC može sačinjavati i do 50% ukupnih proteina matriksa (Douce i sur., 2001). GDC se sastoji od četiri proteina, gdje je protein H njihova poveznica te također prenosi supstrat od jednog do drugog aktivnog mjesta svojom tzv. 'rukom' koju čini lipoična kiselina (Taylor i sur., 2002). Reaktivnost lipoične kiseline ovisi o redukcijskom potencijalu njenih sumpora te je aktivnost cijelokupnog GDC regulirana samo omjerom NADH i NAD^+ (Douce i sur., 1994). Obje izoforme proteina H koje smo identificirali potvrđene su u ekotipu Oy, a u Col-u je pronađena samo varijanta H2, makar s nezadovoljavajućom sigurnošću. Međutim, ranija su istraživanja potvrdila oba ova izoenzima u ekotipu Col (Theologis i sur., 2000, Lin i sur., 1999) te je moguće da samo nisu bili prisutni u dovoljnoj količini za zadovoljavajuću analizu MS-om. Protein H prema analizi bioinformatičkim alatima u oba slučaja pokazuje posjedovanje samo jedne neuređene regije od nešto manje od 30 aminokiselina na samom C-terminusu. Znamo da se prilikom izlaganja oksidativnom stresu protein H inhibira, ali se njegova količina neznatno smanjuje (Taylor i sur., 2002).

Dvije izoforme proteina H i Cu/Zn SOD 2 nalaze se blizu na gelovima te su obuhvaćeni istim područjem od interesa tijekom relativne kvantifikacije. Uz pretpostavku da se količina proteina H ne mjenja ili blago smanjuje tijekom suše, signal bi trebao biti većinski odraz količine Cu/Zn SOD 2. Zato rezultati nalažu da se kao odgovor na sušu količina Cu/Zn SOD 2 poveća u stanicama

biljaka ekotipova Col i Van. Oy pokazuje smanjenu količinu Cu/Zn SOD 2, ali znamo da posjeduje i stabilniju izoformu ovog enzima. Zanimljivo je primjetiti da ekotip Ita pokazuje smanjenje Cu/Zn SOD 2 kao i Oy. Jedna od mogućnosti zašto se to događa je visoka razina raspada Cu/Zn SOD 2 u interakciji s ROS. Također je moguće da Ita, kao i Oy, posjeduje stabilniju izoformu Cu/Zn SOD jer, iako ne raste na suhom mjestu, raste na hladnom mjestu, a hladnoća je, ipak, abiotički stres.

Identificirana su i četiri proteina kompleksa za razvoj kisika fotosustava II, od kojih svi imaju jednu dugu neuređenu regiju na početku sekvencije veličine između 50 i 100 aminokiselina, ovisno o proteinu. Na tom se mjestu svima nalazi i moguće vezno stanje, kao i u svakoj drugoj većoj nestrukturiranoj regiji ovih proteina, što ukazuje na funkcionalnu ulogu tih regija u djelovanju cijelokupnog kompleksa. Ti proteini su: podjedinica P-1 fotosustava II (u dvije izoforme s identifikacijskim brojevima gi|15222166 i gi|186478207, gdje je potonjoj početna nestrukturirana regija znatno dulja), 33 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika (OEC) fotosustava II, 16 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika i 23K protein kompleksa za razvoj kisika fotosustava II. Fotosustav II je prvi proteinski kompleks u fotosintetskim reakcijama ovisnim o svjetlu koji oduzimanjem elektrona vodi omogućuje ostatak reakcija fotosinteze (Loll i sur., 2005). Sustav za razvoj kisika njegov je dio koji vrši reakciju cijepanja vode. Taj je dio u stalnom kontaktu s ROS i stoga je podložan oštećenju te se podjedinica D1 fotosustava II mora često nanovo sintetizirati i mjenjati, što je ujedno i način kontrole linearne fotosinteze. Pri visokim koncentracijama ROS uzrokovanih abiotičkim stresom, sastavljanje i popravak podjedinice D1 su inhibirani (Gururani i sur., 2015) što dovodi do pada razine fotosinteze. Također, ustanovljeno je da se u stresnim uvjetima smanji transkripcija većine fotosintetskih gena (Chavez i sur., 2009). Svi identificirani proteini zapravo okružuju podjedinicu D1 i neke njihove ustanovljene uloge uključuju regulaciju fosforilacije podjedinice D1 (tj. označavanje njene oštećenosti), sprječavanje nepotrebnih reakcija oštećenog D1, povezivanje i popravak D1, te uloge u razvoju kisika, makar one još nisu dovoljno istražene niti opisane (Gururani i sur., 2015). Ovi su se proteini pojavljivali u više točaka na gelu, vjerojatno zbog postojanja više post-translacijskih modifikacija, izuzev 23K proteina kompleksa za razvoj kisika fotosustava II , koji je bio prisutan u samo jednoj točki u svim ekotipovima, i uglavnom su te proteinske mrlje bile dovoljno blizu jedna drugoj da upadnu u ista interesna područja. Stoga ih je moguće kvantificirati jedino zajedno. Značajno je primjetiti da kod svih ekotipova (izuzev Oy kod kojeg takvo područje nije analizirano) područje koje sadrži sve navedene proteine osim onog mase 16 kDa ima jači signal pri suši. Taj neočekivan porast količine proteina možda se može pripisati samo proteinu 23K jer u ostalim kombinacijama vidimo da je jačina signala ostala slična kao u kontroli.

Plastocijanin je još jedan protein koji sudjeluje u procesu fotosinteze identificiran MS-om kojem je nađena duga neuređena regija od preko 60 aminokiselina na početku sekvencije. Na tom se mjestu nalazi i potencijalno vezno stanje. U fotosintezi plastocijanin sudjeluje u prijenosu elektrona od citokroma b_6f do reakcijskog centra fotosustava I (Freeman i Guss, 2001). Plastocijanin sudjeluje i u cikličkoj verziji fotosinteze iz koje je izbačeno djelovanje o vodi ovisnog i na ROS osjetljivog fotosustava II, i na koju se stanica oslanja pri njegovom prevelikom oštećenju da bi se oslobodila dijela energije koju prima svjetlošću a ne može iskoristiti (Takahashi i sur., 2009). Alternativno ime ovog proteina je protein za popravak/toleranciju oštećenja DNA DRT112 čiji se gen vjerojatno inducira kao odgovor na povećanu koncentraciju H_2O_2 (Cruz de Carvalho, 2008). To se poklapa s rezultatima relativne kvantifikacije jer za većinu istraživanih ekotipova, područje koje sadrži plastocijanin pokazuje jači signal nakon izlaganja suši. Iznimke su ekotip Oy gdje isto područje zahvaća plastocijanin i stabilnu izoformu Cu/Zn SOD te se jačina signala smanjuje u suši, i ekotip Ita gdje rezultati nisu jednoznačni (povećanje kod Ita, smanjenje kod Ita0). Takav rezultat je značajan jer su Cu/Zn SOD i plastocijanin povezani preko metabolizma iona bakra te se u slučaju njegove deficijencije preferira plastocijanin i održavanje fotosinteze na račun ostalih proteina koji vežu bakar. Ranije je na topolama ustanovljeno da je drugačija homeostaza bakra mogući uzrok njihove povećane otpornosti na sušu (Molina-Rueda i sur., 2013).

Od ostalih identificiranih proteina, dugu neuređenu regiju na početku sekvencije imaju dva od tri tioredoksina tioredoksin M1 i tioredoksin m4. Ona je duga 60 aminokiselina i sadrži vezno mjesto. Tioredoksini m locirani su u kloroplastu i sudjeluju u regulaciji enzima uključenih u metabolizam ugljika, ali igraju i ključne uloge u staničnom odgovoru na oksidativni stres mehanizmima antioksidacije (Dos Santos i Rey, 2006). Do sada je ustanovljeno da ekspresija tioredoksina M4 ostaje nepromjenjena pri izlaganju stresu sušom, iako se nekih drugih tioredoksina poveća (Rizhsky i sur., 2002). Pri relativnoj kvantifikaciji, oba navedena tioredoksina, zajedno s proteinom CML13 (nema duge nestrukturirane regije), našli su se u istim područjima mjerenja signala te se mogu kvantificirati jedino zajedno. U većini slučajeva taj je signal jači u uzorcima biljaka prethodno izloženih suši, ali rezultati nisu potpuno jednoznačni. Naime, ekotip Van pokazuje jedno povećanje (Van0) i jedno smanjenje (Van) s obzirom na kontrolu, ekotip Ita jedan porast (Ita0) i jednu stagnaciju (Ita), Col samo porast, a Oy samo pad.

Šaperonin 20 isto tako posjeduje samo jednu nestrukturiranu regiju dugu 50 aminokiselina na početku sekvencije koja ima potencijal vezanja. Osim uloge pomoćnog šaperona gdje osigurava pravilan rad šaperona 60 i sudjelovanja u aktivaciji Fe SOD, nedavno je pretpostavljeno da šaperonin 20 sudjeluje u aktivaciji ekspresije proteina WRKY40 (Zhang i sur., 2014). Transkripcijski faktori s WRKY domenom aktiviraju se kao odgovor na biotičke i abiotičke

stresove, te induciraju razne razvojne promjene (Rushton i sur., 2010). Nažalost, teško je kvantificirati ovaj protein jer se nalazi u točkama s drugim proteinima (33 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika (OEC) fotosustava II, 16 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika, podjedinica P-1 fotosustava II).

Profil neuređenosti embrio defektivnog proteina 1241 pokazuje da posjeduje početnu neuređenu regiju dugu oko 150 aminokiselina i završnu neuređenu regiju dugu 50 aminokiselina koja sadrži potencijalno vezno mjesto. To čini ovaj protein većinski nestrukturiranim. Embrio defektivni protein 1241 dio je kompleksa PAM za translokaciju proteina u mitohondrijski matriks, a također sadrži domenu GrpE koja mu omogućuje vezanje šaperona Hsp70 i pomaganje pri održavanju pravilne strukturiranosti staničnih proteina. Zajedno s njim identificiran je i DNA-vezujući protein sličan Myb-u, drugog imena *Cell division cycle 5-like protein*, koji prema procjeniteljima neuređenosti sadrži barem četiri duge neuređene regije od kojih su tri u sredini sekvencije povezane kratkim strukturiranim segmentima, i jedna na samom kraju. Ovaj protein sadrži dva ponavljanja sekvencije slična MYBu koja imaju evolucijski očuvane uloge u prekrajanju mRNA, kontroli staničnog ciklusa u kontolnoj točki G2/M, a djeluje i kao transkripcijski faktor (Du i sur., 2015). Kroz kontolu transkripcije DNA-vezujući protein sličan Myb-u sudjeluje u mnogim obrambenim odgovorima stanice i stoga je ključan element urođene imunosti biljaka. Proteinska mrlja koja sadrži ova dva proteina nalazi se ispod dijagonale gela što znači da su pokretniji u denaturirajućim nego u nativnim uvjetima. Kvantitativna analiza pokazala je da je zajednička količina ovih proteina ostala ista u sušnim uvjetima kao u kontrolnim kod svih ekotipova.

Još jedan protein koji sudjeluje u urođenoj imunosti biljke, a potvrđen je kao IDP, identificiran je kao RNA-vezujući protein, i riječ je o ribonukleoproteinu CP29B. Nalazi se u kloroplastu gdje sudjeluje u prekrajanju i obradi kloroplastnih RNA, a njegova struktura nalaže da ga može inducirati ABA (Ye i sur., 1991) zbog čega bi mogao biti direktno uključen u stanični odgovor na stres izazvan sušom. CP29B se u ovom slučaju, nažalost, ne može kvantificirati zbog toga što se nalazi u područjima kvantifikacije zajedno s drugim proteinima (33 kDa polipeptid kompleksa za razvoj kisika (OEC) fotosustava II i podjedinica P-1 fotosustava II). Ipak, bioinformatičkim alatima potvrđen je kao IDP s dvije duge neuređene regije, od 100 aminokiselina na početku i oko 50 u sredini, te s kratkim neuređenim završetkom. Predviđeno je i da njegovi dugi neuređeni slijedovi imaju potencijal da se smotaju u vrlo uređene strukture pri vezanju supstrata, što može objasniti zašto se u gelu nalazi iznad dijagonale.

Protein F1L3.28 identificiran je kao miozin-5, a sudjeluje u transportu organela i proteina s obzirom na stanični ciklus, u signalizaciji i morfogenezi (Reddy i Day, 2001). Ovaj se protein u

gelu nalazi točno na dijagonali, što potvrđuje njegov sveukupni IDP karakter, a analize su pokazale da posjeduje četiri značajno velike nestrukturirane regije u drugoj polovici sekvencije, sve s potencijalom smatanja, od kojih je jedna duga preko 200 aminokiselina. Uloga tih regija je vezanje različitih supstrata i vezanje ATP-a (prema *Conserved domains* bazi podataka).

Za razliku od dosad spomenutih djelomično nestrukturiranih proteina, niskom temperaturom induciran protein 78 (engl. *low-temperature-induced*, LTI78) ima u potpunosti neuređenu strukturu prema predviđanjima (preko 0,853 prema SLIDERu), i njegov položaj na dijagonali gela to potvrđuje. Promotor tog gena sadrži elemente koji odgovaraju na dehidraciju i abscizinsku kiselinu (Shinozaki i sur., 2003) te je njegova ekspresija inducirana tijekom suše i ostalih abiotičkih stresova. Njegova funkcija nije potpuno razjašnjena, ali smatra se da sudjeluje u stabilizaciji membrana, ribosoma i citoskeleta te detoksifikaciji. Relativna kvantifikacija pokazuje da područja na gelu svih ekotipova (osim Oy za koji to područje nije kvantificirano) koja sadrže LTI78 imaju jači signal nakon izlaganja suši u usporedbi s kontrolom, od čega ekotip Ita ima najveće povećanje.

Poslijednja dva proteina koja treba prokomentirati su i najzanimljiviji identificirani proteini, jer je o njima poznato vrlo malo. Nepoznat protein (gi|21555836) prema analizi sekvencije pripada obitelji RNaza E/G i također je potpuno nestrukturiran u neveznom obliku. Nepoznato je ima li ulogu u odgovoru na sušu. Pri relativnoj kvantifikaciji, ovaj se protein nalazio u istom području mjerenja kao i F1L3.28 te je njihov zajednički signal jači u uzorcima izloženim suši gotovo svih ekotipova. Iznimka je ekotip Oy gdje su nepoznat protein, F1L3.28 i Cu/Zn SOD 2 kvantificirani skupa te je ukupni signal manji s obzirom na kontrolu. Drugi je hipotetski protein (gi|6056403) koji ne sadrži konzervirane funkcionalne domene. Prema analizi bioinformatičkim alatima, ovaj je protein također većinski nestrukturiran sa središnjom neuređenom regijom od preko 700 aminokiselina. Na gelu se nalazi ispod dijagonale što znači da je pokretniji u denaturirajućim uvjetima. U istoj toj točki, identificirana je i velika podjedinica RuBisCO-a koja nema niti jednu neuređenu regiju, te su ta dva proteina kvantificirana zajedno. Znamo da se u sušnim uvjetima RuBisCO inhibira, ali ne razgrađuje (Vaseva i sur., 2011) pa se promjena signala može pripisati promjenama nepoznatog proteina. Rezultati svejedno nisu uniformni. Kod ekotipa Ita, hipotetski protein i velika podjedinica RuBisCO-a nalaze se u istom području analize kao i LTI78 te je signal jači prilikom izlaganja suši, vjerojatno zaslugom LTI78. U slučaju ekotipa Van, jačina signala hipotetskog proteina i RuBisCO-a ostaje nepromjenjena tijekom suše, a ekotip Col pokazuje puno manji signal u usporedbi s kontrolom. Za ekotip Oy područje koje sadrži hipotetski protein nije analizirano. Valja uzeti u obzir da jačini signala kod nekih proteina mogu pridonositi i neki drugi, neidentificirani proteini.

5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada uspješno je izazvan kontrolirani abiotski stres sušom u četiri različita ekotipa biljaka *Arabidopsis thaliana.* Ekotipovi prirodno rastu na mjestima s različitom količinom padalina. Utvrđeno je da postoji razlika u aktivnosti gvajakol peroksidaze gdje biljke ekotipova navikle na manju količinu vode u okolišu pokazuju manju aktivnost enzima, ali i njeno veće povećanje u sušnim uvjetima. Također se pokazalo da bi proteini Hsp70 mogli imati ulogu u odgovoru na stres izazvan manjkom vode jer se njihova ekspresija povećala u sušnim uvjetima u usporedbi s kontrolom. Uspješno su odvojeni IDP od globularnih proteina te je dokazana promjena ekspresije nekih IDP u sušnim uvjetima s obzirom na kontrolu. Spektrometrijom masa identificirano je 25 proteina s poznatim i manje poznatim ulogama u odgovoru na abiotski stres, od kojih dva imaju potpuno nepoznate uloge. Za 21 protein bioinformatičkim je alatima potvrđeno da posjeduju barem jednu dugu neuređenu regiju.

6. LITERATURA

- Abarca D., Roldan M., Martin M., Sabater B. (2001): *Arabidopsis thaliana* ecotype Cvi shows an increased tolerance to photo-oxidative stress and contains a new chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase isoenzyme. *Journal of Experimental Botany* **52**(360): 1417-1425.
- Blum H., Beier H., Gross H. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**(2): 93-99.
- Bouchabke O., Chang F., Simon M., Voisin R., Pelletier G., Durand-Tardif M. (2008): Natural variation in *Arabidopsis thaliana* as a tool for highlighting differential drought responses. *PLoS ONE* **3**(2): e1705.
- Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., Inze D. (1994): Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Science* **13**: 199-218.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Broin M., Cuine S., Peltier G., Rey P. (2000): Involvment of CDSP 32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants. *FEBS Letters* **467**: 245-248.
- Buchan D., Minneci F., Nugent T., Bryson K., Jones D. (2013): Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research* **41**(W1): W349-W357.
- Chavez M.M., Flexas J., Pinheiro C. (2009): Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant cell. *Annals of Botany* **103**: 551-560.
- Covarrubias A.A., Cuevas-Velazquez C.L., Romero-Perez P.S., Rendon-Luna D.F., Chater C.C.C. (2017): Structural disorder in plant proteins: where plasticity meets sessility. *Cellular and Molecular Life Sciences* **74**(17):3119-3147.
- Cruz de Carvalho M. H. (2008): Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior* **3**(3): 156-165.
- Csizmok V., Szollosi E., Friedrich P., Tompa P. (2006): A novel two-dimensional electrophoresis technique for the identification of intrinsically unstructured proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* **5**: 265–273.
- Dos Santos C.V., Rey P. (2006): Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in Plant Science* **11**(7): 329-334.
- Douce R., Bourguigon J., Neuburger M., Rebeille F. (2001): The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science* **6**: 167-176.
- Douce R., Bourguigon J., Macherel D., Neuburger M. (1994): The glycine decarboxylase system in higher plant mitochondria: structure, function and biogenesis. *Biochemical Society Transactions* **22**: 184-188.
- Du H., Liang Z., Zhao S., Nan M.G., Tran L.S.P., Lu K., Huang Y.B., Li J.N. (2015): The evolutionary history of R2R3-MYB proteins across 50 eukaryotes: new insights into subfamily classification and expansion. *Scientific Reports* **5**: 11037.
- Freeman H.C., Guss J.M. (2001): Plastocyanin. U: Huber R., Poulos T.L., Wieghardt K (ur.) *Handbook of Metalloproteins*. Chichester, UK, Wiley, str. 1153-1169.
- Gururani M.A., Venkatesh J., Tran L.S.P. (2015): Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Molecular Plant* **8**: 1304-1320.
- Harb A., Krishnan A., Ambavaram M.M.R., Pereira A. (2010): Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology* **154**: 1254-1271.
- He B., Wang K.J., Liu Y.L., Xue B., Uversky V.N., Dunker A.K. (2009): Predicting intrinsic disorder in proteins: an overview. *Cell Research* **19**: 929-949.
- Kunert K.J., van Wyk S.G., Cullis C.A., Vorster B.J., Foyer C.H. (2015): Potential use of photocystatins in crop improvement, with a particular focus on legumes. *Journal of Experimental Botany* **66**(12): 3559-3570.

- Laemmli U. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lawlor D.W., Cornic G. (2002): Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* **25**: 275-294.
- Lin X., Kaul S., Rounsley S., Shea T.P., Benito M.I., Town C.D., Fujii C.Y., Mason T., Bowman C.L., Barnstead M., Feldblyum T.V.,Buell C.R., Ketchum K.A., Lee J., Ronning C. M., Koo H.L., Moffat K.S., Cronin L.A., Shen M., Pai G., Van Aken S., Umayam L., Tallon L.J., Gill J.E., Adams M.D., Carrera A.J., Creasy T.H., Goodman H.M., Somerville C.R., Copenhaver G.P., Preuss D., Nierman W.C., White O., Eisen J.A., Salzberg S.L., Fraser C. M., Venter J.C. (1999): Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **402**(6763): 761-768.
- Linding R., Jensen L.J., Diella F., Bork P, Gibson T.J., Russell R.B. (2003): Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure* **11**(11): 1453-1459.
- Liu Y., Wu J., Sun N., Tu C., Shi X., Cheng H., Liu S., Li S., Wang Y., Zheng Y., Uversky V.N. (2017): Intrinsically disordered proteins as important players during desiccation stress of the soybean radicles. *Journal of Proteome Research* **16**(7): 2393-2409.
- Loll B., Kern J., Saenger W., Zouni A., Biesiadka J. (2005): Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 A resolution structure of photosystem II. *Nature* **438**(7070): 1040-1044.
- Molina-Rueda J.J., Tsai C.J., Kirby E.G. (2013): The Populus superoxide dismutase gene family and its responses to drought stress in transgenic Poplar overexpressing a Pine cytosolic glutamine synthetase (GS1a). *PLoS ONE* **8**(2): e56421.
- Negrutiu I., Beeftink F., Jacobs M. (1975): *Arabidopsis thaliana* as a model system in somatic cell genetics I. cell and tissue culture. *Plant Science Letters* **5**(5): 293-304.
- Pavoković D., Poljuha D., Horvatić A., Ljubešić N., Hagège D., Krsnik-Rasol M. (2011): Morphological and proteomic analyses of sugar beet cultures and identifying putative markers for cell differentiation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **108**(1): 111-119.
- Peng Z., Mizianty M.J., Kurgan L.A. (2014): Genome-scale prediction of proteins with long intrinsically disordered regions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **82**(1): 145-158.
- Peng Z., Yan J., Fan X., Mizianty M., Xue B., Wang K., Hu G., Uversky V., Kurgan L. (2014): Exceptionally abundant exceptions: comprehensive characterization of intrinsic disorder in all domains of life. *Cellular and Molecular Life Sciences* **72**(1): 137-151.
- Radivojac P., Iakoucheva L.M., Oldfield C.J., Obradovic Z., Uversky V.N., Dunker A.K. (2007): Intrinsic disorder and functional proteomics. *Biophysical Journal* **92**: 1439-1456.
- Reddy A.R., Chaitanya K.V., Vivekanandan M. (2004): Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* **161**: 1189-1202.
- Reddy A.S.N., Day I.S. (2001): Analysis of the myosins encoded in the recently completed Arabidopsis thaliana genome sequence. *Genome Biology* **2**(7): research0024.1-0024.17.
- Rizhsky L., Liang H., Mittler R. (2002): The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in Tobacco. *Plant Physiology* **130**: 1143-1151.
- Rushton P.J., Somssich I.E., Ringler P., Shen Q.J. (2010): WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* **15**(5): 247-258.
- Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* **2012**:1-26.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M. (2003): Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 410-417.
- Sun X., Rikkerink E.H.A., Jones W.T., Uversky V.N. (2013): Multifarious roles of intrinsic disorder in proteins illustrate its broad impact on plant biology. *The Plant Cell* **25**: 38–55.
- Swindell W.R., Huebner M., Weber A.P. (2007): Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* **8**: 125.
- Takahashi S., Milward S.E., Fan D.Y., Chow W.S., Badger M.R. (2009): How does cyclic electron flow alleviate photoinhibition in Arabidopsis? *Plant Physiology* **149**: 1560-1567.

- Taylor N.L., Day D.A., Millar A.H. (2002): Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxylase. *The Journal of Biological Chemistry* **277**(45): 42663-42668.
- Theologis A., Ecker J.R., Palm C.J., Federspiel N.A., Kaul S., White O., Alonso J., Altafi H., Araujo R., Bowman C.L., Brooks S.Y., Buehler E., Chan A., Chao Q., Chen H., Cheuk R.F., Chin C.W., Chung M.K., Conn L., Conway A.B., Conway A.R., Creasy T.H., Dewar K., Dunn P., Etgu P., Feldblyum T.V., Feng J., Fong B., Fujii C.Y., Gill J.E., Goldsmith A.D., Haas B., Hansen N.F., Hughes B., Huizar L., Hunter J.L., Jenkins J., Johnson-Hopson C., Khan S., Khaykin E., Kim C.J., Koo H.L., Kremenetskaia I., Kurtz D.B., Kwan A., Lam B., Langin-Hooper S., Lee A., Lee J.M., Lenz C.A., Li J.H., Li Y., Lin X., Liu S.X., Liu Z.A., Luros J.S., Maiti R., Marziali A., Militscher J., Miranda M., Nguyen M., Nierman W.C., Osborne B.I., Pai G., Peterson J., Pham P.K., Rizzo M., Rooney T., Rowley D., Sakano H., Salzberg S.L., Schwartz J.R., Shinn P., Southwick A.M., Sun H., Tallon L.J., Tambunga G., Toriumi M.J., Town C.D., Utterback T., Van Aken S., Vaysberg M., Vysotskaia V.S., Walker M., Wu D., Yu G., Fraser C.M., Venter J.C., Davis R.W. (2000): Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**(6814): 816-820.
- Tompa P. (2012): Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends in Biochemical Sciences* **37**(12): 509-516.
- Uarrota V.G., Moresco R., Schmidt E.C., Bouzon Z.L., da Costa Nunes E., de Oliviera Neubert E., Peruch L.A.M., Rocha M., Maraschin M. (2016): The role of ascorbate peroxidase, guaicaol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. *Food Chemistry* **197**: 737-746.
- Vaseva I., Akiscan Y., Demirevska K., Andres I., Feller U. (2011): Drought stress tolerance of red and white clober – comparative analysis of some chaperonins and dehydrins. *Scientia Horticulturae* **130**: 653-659.
- Ye L., Li Y., Fukami-Kobayashi K., Go M., Konishi T., Watanabe A., Sugiura M. (1991): Diversity of a ribonucleoprotein family in tobacco chloroplasts: two new chloroplast ribonucleoproteins and a phylogenetic tree of ten chloroplast RNA-binding domains. *Nucleic Acids Research* **19**(23): 6485-6490.
- Yer E.N., Baloglu M.C., Ziplar U.T., Ayan S., Unver T. (2016): Drought-responsive Hsp70 gene analysis in *Populus* at genome-wide level. *Plant Molecular Biology Reporter* **34**(2): 483-500.
- Zhang X.F., Jiang T., Yu Y.T., Wu Z., Jiang S.C., Lu K., Feng X.J., Liang S., Lu Y.F., Wang X.F., Zhang D.P. (2014): *Arabidopsis* co-chaperonin CPN20 antagonizes Mg-chelatase H subunit to derepress ABA-responsive WRKY40 transcription repressor. *Science China Life Sciences* **57**(1): 11-21.

Životopis:

Rođena sam 22. lipnja 1993. u Zagrebu. Pohađala sam XV. Gimnaziju u Zagrebu i maturirala 2012. godine s odličnim uspjehom. Iste godine upisujem preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Titulu prvostupnika stekla sam 2015. godine s temom "Fotosinteza". Iste godine odrađujem laboratorijsku stručnu praksu gdje se bavim transformacijom i selekcijom bakterija te ekspresijom i pročišćavanjem rekombinantnog biljnog proteina BPM1 pod mentorstvom doc. dr. sc. Nataše Bauer. Nakon završenog preddiplomskog studija upisujem diplomski studij molekularne biologije na PMF-u. U akademskoj godini 2016./2017. provodim jedan semestar na Sveučilištu Južne Češke u Českim Budějovicama u sklopu međunarodnog programa razmjene studenata Erasmus +. Po povratku sa studentske razmjene počinjem s izradom diplomskog rada pod vodstvom doc. dr. sc. Dubravka Pavokovića.