Molekularna analiza elemenata interakcije FNR-TROL

Rac, Anja

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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:217:383022

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

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Anja Rac

Molekularna analiza elemenata interakcije FNR-TROL

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Anja Rac

Molekularna analiza elemenata interakcije FNR-TROL

Doktorski rad

Mentor: dr. sc. Hrvoje Fulgosi

Zagreb, 2021.

University of Zagreb

Faculty of Science

Divison of Biology

Anja Rac

Molecular analysis of the FNR-TROL interaction elements

Doctoral thesis

Supervisor: dr. sc. Hrvoje Fulgosi

Zagreb, 2021.

Ovaj doktorski rad izrađen je na Institutu Ruđer Bošković, u Laboratoriju za molekularnu biljnu biologiju i biotehnologiju Zavoda za molekularnu biologiju pod vodstvom dr. sc. Hrvoja Fulgosija, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem dr.sc. Hrvoju Fulgosiju na savjetima, uputama i pomoći pri izradi ovog doktorskog rada.

Također zahvaljujem dr.sc. Lei Vojta na nesebičnim savjetima i pomoći.

Hvala kolegici Luciji Horvat na svemu ☺.

Hvala Vedrani i Maji na savjetima za što uspješnije druženje s kvascima.

Hvala mojoj obitelji na strpljenju i podršci.

Hvala Tomislavu što je sve ovo izgurao samnom i vjerovao u mene i kad ja to nisam.

Tata, knjižica je gotova!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek **Doktorski rad**

Molekularna analiza elemenata interakcije FNR-TROL

Anja Rac

Institut Ruđer Bošković

U ovom doktorskom radu istražena je uloga interakcije FNR-TROL u transportnom lancu elektrona na tilakoidima u kloroplastu. Feredoksin-$NADP^+$ oksidoreduktaza (FNR) je protein koji katalizira posljednji korak u transportu elektrona- prijenos elektrona s reduciranog feredoksina na $NADP^+$ pri čemu nastaje NADPH. Nalazi se u obliku topljivih izoformi ili vezan za tilakoidnu membranu čineći proteinske komplekse s proteinima Tic62 i TROL. U svrhu istraživanja utjecaja kompleksa s proteinom TROL korištene su mutantne biljke *Arabidopsis thaliana* koje nisu eksprimirale protein TROL, ali su sadržavale FNR1 izoformu iz C4 biljke kukuruza, koja je pokazala pojačan afinitet za vezanje u komplekse s proteinom TROL. Te su biljke križane s mutantnim biljkama koje su sadržavale TROL s izmijenjenim ili uklonjenim aminokiselinama rodanazne domene za koju se smatra da ima važnu ulogu u signalizaciji otpuštanja i vezanja proteina FNR čime regulira tok elektrona u transportnom lancu. Kvantitativna i kvalitativna analiza jačine interakcija proteina TROL s izoformama proteina FNR1 iz kukuruza i graška provedena je sustavom dvaju hibrida kvasaca te praćena testovima aktivnosti X-alpha i beta galaktozidaze. Provjera interakcije proteina u kvascima pokazala je snažnije interakcije proteina TROL i Tic62 s FNR1 izoformom kukuruza u odnosu na one s FNR1 izoformom graška. Utjecaj izmijenjenih domena proteina TROL i interakcija s kukuruznim proteinom FNR1 ispitan je Westernskom metodom otiska, određivanjem koncentracije pigmenata te analizom anatomske strukture i ultrastrukture listova.Pokazano je da je kukuruzni FNR1 vezan na tilakoidima samo kod križanca kod kojeg nije bilo promjene u domeni RHO što upućuje na neospornu važnost lumenalne domene RHO u transmembranskoj signalizaciji vezanja i otpuštanja proteina FNR na stromalnoj strani tilakoida. Daljnja istraživanja i rasvjetljavanje puta prijenosa signala povezanog s domenom RHO mogao bi doprinijeti razumijevanju alternativne raspodjele elektrona u fotosintezi vaskularnih biljaka.

102 stranice, 34 slike, 12 tablica, 118 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: fotosinteza, transportni lanac elektrona, FNR, TROL, proteinska interakcija

Mentor: dr. sc. Hrvoje Fulgosi, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju

Ocjenjivači: dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izvanredni profesor

dr. sc. Đurđica Ugarković, redoviti profesor

dr.sc. Lea Vojta, viši znanstveni suradnik

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology **Doctoral thesis**

Molecular analysis of the FNR-TROL interaction elements

Anja Rac

Ruđer Bošković Institute

In this thesis, the role of the FNR-TROL interaction in electron transport chain on thylakoid membranes was investigated. Ferredoxin-$NADP^+$ oxidoreductase (FNR) catalyses the last step in electron transport chain from reduced ferredoxin to $NADP^+$ forming NADPH. FNR isoforms can be found as soluble, or form protein complexes with proteins Tic62 or TROL on thylakoid membranes. To investigate complex with TROL protein *A. thaliana trol* plants which do not express protein TROL but contain C4 maize FNR1, which showed enhanced binding affinity to TROL, were crossed with mutant plants in which RHO domain of TROL protein has been modified. RHO domain is considered as important in FNR binding and release signaling, therefore modifications in mutant plants included changed or deleted aminoacids. Qualitative and quantitative analysis of binding maize and pea FNR1 into complexes with TROL was investigated with Yeast two hybrid screening following X-alpha and beta galactosidase activity assays. Assays have shown stronger interactions between TROL and Tic62 with maize FNR1 in relation to interactions with pea FNR1. Effect of changed RHO domain and interaction with maize FNR1 were investigated with Western blot coupled with ECL, by measuring pigment concentration, and by comparing anatomical leaf structure and ultrastructure. Maize FNR1 was found on thylakoids only in mutant line in which RHO domain wasn't modified. This result implies an important role of RHO domain on transmembrane signaling from lumenal side to stromal side of thyakoids and it's effect on FNR-TROL interactions. Future investigations on lumenal mechanism that triggers transmembrane signal via RHO domain might give better understanding of this signal pathways in alternative electron transport chain.

102 pages, 34 figures, 12 tables, 118 references, original in Croatian

Key words: photosynthesis, electron transport chain, FNR, TROL, protein interaction

Supervisor: Hrvoje Fulgosi, Ph.D., Scientific advisor with tenure

Reviewers: Željka Vidaković-Cifrek, Ph. D., Assoc. Prof.

Đurđica Ugarković, Ph.D., Adj. Prof.

Lea Vojta, Ph.D., Senior research associate

Popis kratica

ADP	adenozin difosfat
AGP	arabinogalaktani
APX	askorbat peroksidaza
ATP	adenozin trifosfat
CO_2	ugljikov dioksid
COP1	*eng*. Constitutively photomorphogenic 1
cpDNA	*eng*. chloroplast DNA
Chl *a*, *b*	klorofil *a*, *b*
Cyt b_6f	citokrom b_6f kompleks
2-CYSPRX	2-cistein peroksiredoksini
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EPR	elektronska paramagnetska rezonancija
FAD	flavin adenin nukleotid
Fd	feredoksin
FNR	feredoksin-$NADP^+$ oksidoreduktaza
GSH	glutation
H_2O_2	vodikov peroksid
kb	10^3 parova baza
kDa	kilodalton
KO	*eng.* knock-out (nul-mutanta)
ITEP	C-terminalna domena proteina TROL
LHCII	*eng.* Light harvesting complex (kompleks antena) II
3-MP-STR	3-merkaptopiruvat sumporne transferaze
$NADP^+$	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (oksidirani oblik)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (reducirani oblik)

NPQ	*eng.* non-photochemical quenching (nefotokemijsko prigušivanje)
OAA	oksaloacetat
O_2	kisik
$^1O_2$	singletni kisik
O_2^-	superoksidni radikal
OD	*eng.* optical density (optička gustoća)
bp	*eng*. base pare (broj parova baza)
PC	plastocijanin
PEPE	poliprolinska domena proteina TROL
PEPC	fosfoenol piruvat karboksilaza
PQ	plastokinon
PQH_2	reducirani plastokinon
PRX	peroksidaze
PsFNR1	izoforma proteina FNR iz graška (*Pisum sativum*)
PSI	fotosustav I
PSII	fotosustav II
RHO	rodanazna domena proteina TROL
ROS	*eng*. reactive oxygen species
Rubisco	ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza
rpm	*eng*. rotation per minute
SDS	natrijev dodecil-sulfat
SOD	superoksid dismutaza
STR	sumporne transferaze
TAE	tris-acetatni-EDTA pufer
Tic	*eng*. translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts
Toc	*eng*. translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts
TROL	thylakoid rhodanase-like protein
TROL OX	mutantna linija *A. thaliana* s pojačanom ekspresijom proteina TROL

trol	mutantna linija *A. thaliana* koja ne eksprimira TROL
TRX	tioredoksin
UV	ultraljubičasto zračenje
UVR8	*eng*. UV resistance locus 8
ZmFNR1	izoforma proteina FNR iz kukuruza (*Zea mays*)
WT	*eng.* divlji tip; *A. thaliana* (L.) Heynh., ekotip Columbia (Col-0)

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. LITERATURNI PREGLED 4

2.1. Fotosinteza 5

2.2. Fotosintetski proteinski kompleksi 6

2.2.1. Fotosustav II 6

2.2.2. Fotosustav I 8

2.2.3. Citokrom b_6f kompleks 8

2.2.4. ATP sintaza 8

2.2.5. Transportni lanac elektrona 9

2.2.6. Protein FNR 11

2.3. Plastidi 13

2.3.1. Razvoj i teorija nastanka plastida 13

2.3.2. Razvoj i dijeljenje kloroplasta te unos proteina u kloroplaste 14

2.3.3. Protein Tic62 16

2.3.4. Biogeneza tilakoida i klorofila 16

2.4. Genom kloroplasta i komunikacija s jezgrom 18

2.4.1. Reaktivni kisikovi oblici 19

2.4.2 Identifikacija i kvantifikacija reaktivnih kisikovih radikala elektronskom paramagnetskom rezonancijom (EPR) 21

2.5. Učinkovitost C4 tipa fotosinteze 21

2.5.1. Anatomske i funkcionalne promjene lista ovisno o tipu fotosinteze 22

2.6. Rodanaze 24

2.6.1. Protein TROL 27

3. MATERIJALI I METODE 29

3.1. Vektori, bakterijski sojevi, sojevi kvasca i biljni materijal 30

3.1.1. Plazmidni vektori 30

3.1.2. Bakterijski sojevi 32
3.1.3. Sojevi kvasca 32
3.1.4. Biljni materijal 32
3.2. Antibiotici 35
3.3. Mediji za uzgoj kvasaca i bakterija 35
3.4. Transformacija i priprema bakterija 36
3.5. Transformacija kvasaca 37
3.6. Ispitivanje proteinskih interakcija 38
3.6.1. Sustav dvaju hibrida kvasaca (Y2H) 38
3.6.2. X-alfa-galaktozidazni test 38
3.6.3. Beta galaktozidazni test 39
3.7 Lančana reakcija polimeraze (PCR) 40
3.7.1. Početnice i DNA standard 40
3.7.2. Lančana reakcija polimeraze *Phire Plant* metodom 43
3.8. Restrikcijska razgradnja 45
3.9. Ligacija 46
3.10. Pročišćavanje DNA 46
3.11. Određivanje primarnog slijeda DNA 47
3.12. Križanje biljaka 48
3.13. Uzgoj biljaka 53
3.14. Metode analize DNA i proteina 54
3.14.1. Izolacija plazmidne DNA 54
3.14.2. Izolacija ukupnih proteina iz biljnog tkiva 54
3.14.3. Elektroforeza na agaroznom gelu 54
3.14.4. Poliakrilamidna denaturirajuća elektroforeza 55
3.14.5. Westernska metoda otiska (*Western blot*) i imunodetekcija 56
3.14.6. Izolacija kloroplasta i tilakoida 57
3.14.7. Određivanje koncentracije klorofila 58
3.14.8. Priprema biljnih ekstrakata i određivanje fotosintetskih pigmenata spektrofotometrijom 58
3.15. Elektronska i svjetlosna mikroskopija 60
3.15.1. Određivanje ultrastrukture kloroplasta 60
3.15.2. Anatomska analiza lista poludebelim prerezom 61

3.16. Elektronska paramagnetska rezonancija (EPR) 62
3.17. Statistička obrada podataka 63
4. REZULTATI 63
4.1. Kvalitativna i kvantitativna provjera interakcija FNR-TROL kod C3 i C4 biljaka 64
4.1.1. Konstrukcija vektora pGADZmFNR1FLAGHA 64
4.1.2. Sustav dvaju hibrida kvasaca 66
4.1.3. Kvantifikacija interakcija X-alfa-galaktozidaznim i beta galaktozidaznim testom 67
4.2. Konstrukcija biljnih mutantnih linija ZmFNR1FLAGHA koje sadrže izmijenjeni protein TROL i ZmFNR1 69
4.2.1. Križanje, uzgoj i selekcija mutantnih linija 69
4.3. Fenotipska, strukturna i ultrastrukturna analiza mutanti biljaka *A. thaliana* 72
4.3.1. Fenotip mutanti biljaka *A. thaliana* 72
4.3.2. Morfometrija listova mutantnih linija 73
4.3.3. Anatomska struktura lisnog tkiva mutantnih linija 74
4.3.4. Ultrastruktura kloroplasta mutantnih linija 75
4.4. Analiza pigmenata 76
4.4.1. Analiza pigmenata mutantnih linija uzgojenih pod UV osvjetljenjem 76
4.4.2. Analiza pigmenata mutantnih linija uzgojenih pod osvjetljenjem bez UV komponente 78
4.5. Analiza interakcije ZmFNR-a s proteinom TROL i njegovim mutantama 80
4.6. Elektronska paramagnetska rezonancija (EPR) 82
5. RASPRAVA 84
6. ZAKLJUČAK 91
7. POPIS LITERATURE 92
Životopis VI

1. UVOD

Fotosinteza je visoko regulirani složeni biološki proces koji omogućava život na Zemlji. Asimilacija ugljikova dioksida u organski spoj je ključna reakcija u biosintezi ugljikohidrata, međutim proces fotosinteze se sastoji od brojnih reakcija. One uključuju prikupljanje svjetlosne energije, pretvorbu svjetlosne energije u energiju kemijskih veza, prijenos pobuđenih elektrona od vode do $NADP^+$, sinteza ATP-a te brojne druge reakcije (1). Fotosinteza se u vaskularnim biljkama odvija u specijaliziranim staničnim organelima kloroplastima. Kloroplasti posjeduju vlastiti genom (cpDNA), ali su koordinirani s ekspresijom gena jezgre stanice u kojoj se nalaze (2). Fotosintezu možemo podijeliti na dvije skupine reakcija: svjetlosne reakcije i Calvinov ciklus. U svjetlosnim reakcijama na tilakoidnim membranama dolazi do sinteze ATP-a i NADPH koji se u Calvinovom ciklusu, u stromi, koriste kao izvori energije i redukcijski agensi u procesu fiksacije ugljika. Proteinski kompleksi koji sudjeluju kao glavni posrednici u transportu elektrona na tilakoidnim membranama su fotosustav I (PSI), fotosustav II (PSII) i citokrom b_6f kompleks (3). S obzirom da su biljke sesilni organizmi, svaka promjena okolišnih uvjeta zahtjeva prilagodbe pri čemu cijeli sustav mora biti dinamički i energetski usklađen.

Biljka *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) pripada porodici Brassicaceae, a rasprostranjena je u Sjevernoj Americi, Aziji te Europi. Zbog malenog genoma od svega 5 kromosoma i oko 25498 gena (4) te kratkog životnog ciklusa postala je modelni organizam, a sekvenciranjem genoma ove biljke omogućena su detaljna istraživanja i identifikacija gena i njihovih produkata.

Protein TROL sudjeluje u dinamičkom vezanju proteina FNR na stromalnu stranu tilakoidnih membrane i time u regulaciji linearnog toka elektrona i stvaranja NADPH (5). TROL je transmembranski protein čiji je C-terminalni završetak smješten u stromi i karakterizira ga hidrofobna ITEP domena. Neaktivna domena RHO (rodanazna domena) smještena je u lumenu. Između ITEP i rodanazne domene nalazi se transmembranska regija te strukturno važna domena bogata prolinima nazvana PEPE (6). Zbog brojnih prolina koji potiču zakretanje polipeptidnog lanca omogućeno je izvijanje i okretanje C-terminalne regije koja tako sudjeluje u dinamičkom vezanju i otpuštanju FNR-a te u regulaciji toka elektrona.

FNR je flavoenzim koji katalizira reverzibilni neciklički prijenos elektrona s reduciranog feredoksina (Fd) na $NADP^+$ pri čemu nastaje NADPH. Nalazi se u fotosintetizirajućim tkivima slobodan u stromi ili vezan na tilakodinu membranu, a prisutan je i u nefotosintetskim plastidima. FNR je kodiran s jednim do tri gena koji dijele 80% sličnosti u primarnom nukleotidnom slijedu.

Dinamička interakcija proteina FNR i TROL omogućuje sintezu NADPH u linearnom toku elektrona koji je neophodan u fiksaciji ugljika. Kao poveznica svjetlosnih reakcija na tilakoidima i kemijskih reakcija u stromi, interakcija proteina FNR i TROL usmjerava elektrone na $NADP^+$, a dođe li do narušavanja dinamike interakcija, elektroni se dalje prenose alternativnim putevima. Istraživanjem ove interakcije možemo doći do važnih evolucijskih spoznaja, ali i otvoriti mogućnost za razvoj biljaka koje će biti otpornije na sušu, svjetlosni stres i povišeni salinitet te proizvoditi veću biomasu.

Cilj ovog doktorskog rada je istražiti i razjasniti ulogu interakcije FNR-TROL u fotosintetskom prijenosu elektrona :

a) Kvantitativnom i kvalitativnom analizom jačine interakcija FNR-TROL

Interakcije proteina FNR1 iz kukuruza označenog biljezima FLAG i HA (ZmFNR1) i FNR1 iz graška (PsFNR1) s proteinom TROL bit će ispitane pomoću sustava dvaju hibrida kvasca te alfa galaktozidaznog i beta galaktozidaznog testa.

b) Konstrukcijom mutantnih linija biljke *A. thaliana* koje sadrže protein TROL s izmijenjenim ili uklonjenim aminokiselinama u domeni RHO i egzogeni ZmFNR1 iz kukuruza.

Križanjem biljaka koje sadrže kukuruzni FNR1 označen biljezima FLAG i HA i ne eksprimiraju protein TROL (linija ZmFNR1FLAGHA) te mutantnih linija koje sadrže izmijenjen protein TROL u domeni RHO konstruirat će se križanci koji će sadržavati endogeni FNR1 i egzogeni ZmFNR1 te izmijenjen TROL u RHO domeni. Uspješnost križanja i selekcija ovih dvostrukih mutanti ispitivat će se *Plant Phire* metodom lančane reakcije polimerazom, Westernskom metodom otiska i kemiluminiscencijom.

c) Ispitivanjem utjecaja izmijenjene domene RHO na interakciju FNR-TROL

Na konstruiranim križancima ZmFNR1WT, ZmFNR1D207E, ZmFNR1D207N te ZmFNR1ΔRHO Westernskom metodom otiska i kemiluminiscencijom istražit će se prisutnost proteina ZmFNR1 na tilakoidnim membranama.

d) Analizom ultrastrukture kloroplasta, anatomske strukture lista i sastava pigmenata križanaca u odnosu na divlji tip *A. thaliana* (WT)

Anatomska struktura lista križanaca u odnosu na WT ispitat će se pomoću poludebelih prereza listova dok će se ultrastruktura kloroplasta istražiti transmisijskim elektronskim mikroskopom. Također, bit će određen sastav pigmenata križanaca uzgojenih na svjetlosti sa i bez UV komponente.

e) Ispitivanjem utjecaja interakcija FNR-TROL na kloroplastni metabolizam

Elektronskom paramagnetskom rezonancijom (EPR) analizirat će se utjecaj interakcije FNR-TROL na kloroplastni metabolizam, odnosno stvaranje superoksidnog radikala kod WT biljaka i linije koja pojačano eksprimira protein TROL (TROL OX).

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Fotosinteza

Fotosinteza je jedinstven i složen biološki proces koji omogućava aerobni život na Zemlji. Sakupljanje svjetlosne energije i prijenos elektrona transportnim lancem na tilakoidima omogućuje nastanak NADPH i ATP-a. Oni se zatim koriste u Calvinovom ciklusu kao izvori energije i redukcijski agensi kojima se CO_2, asimiliran pomoću enzima Rubisco, reducira do ugljikohidrata (1).

Prema fosilnim nalazima starim 3,5 milijardi godina, smatra se da su organizmi slični cijanobakterijama najraniji fotosintetski oblici života (7). No, šire prihvaćena teorija zastupa tezu da su anoksigene fotosintetske bakterije prvi fotosintetizirajući oblici života te su koristile vodik kao izvor elektrona u fiksaciji ugljika. Kod prokariotskih organizama samo cijanobakterije provode oksigenu fotosintezu, a sadrže dva fotosustava: tip I (Fe-S) i tip II (kvinonskog tipa). Anoksigenu fotosintezu provode proteobakterije ili purpurne bakterije (sadrže samo pojednostavljeni tip PSI), zelene ne-sumporne bakterije (sadrže pojednostavljeni PSII), heliobakterije (pojednostavljeni PSI) te zelene sumporne bakterije (sadrže pojednostavljeni PSI). Te bakterije apsorbiraju svjetlost različitih frekvencija s obzirom da posjeduju različiti bakterioklorofil, dok cijanobakterije sadrže klorofil *a* (8).

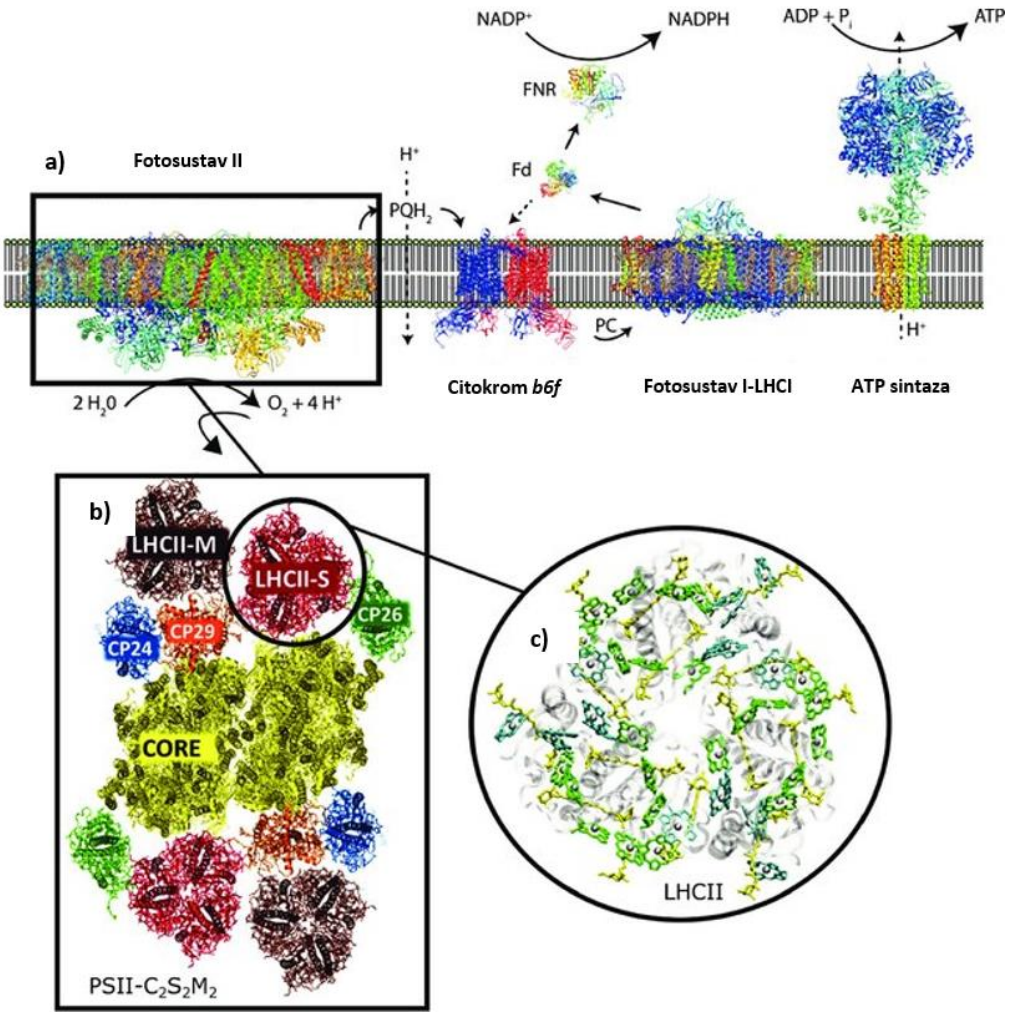
Istraživanja evolucije reakcijskih centara rezultiralo je razvojem dvaju teoretskih modela: model fuzije te model selektivnog gubitka (9). Model selektivnog gubitka se temelji na postojanju fotosintetskih organizama sličnih cijanobakterijama koji su sadržavali oba reakcijska centra. Evolucijskim razvojem došlo je do postupnog gubitka jednog reakcijskog centra i do razvoja anoksigenih fotosintetskih bakterija koje sadrže jedan reakcijski centar. Model fuzije ukazuje na neovisan razvitak rekacijskih centara u različitim linijama prije nego su prešli u jednu liniju koja sadrži oba centra (9). Prilagodbom iskorištavanja vode kao donora elektrona i proizvodnje kisika kao nusprodukta dogodio se vrlo važan korak u evoluciji fotosintetskih organizama i to prije otprilike 2,45 milijardi godina.

2.2. Fotosintetski proteinski kompleksi

Svjetlosne reakcije na tilakoidnim membranama kloroplasta odvijaju se putem četiri glavna proteinska kompleksa: PSI, PSII, Cyt b_6f te ATP sintaze (Slika 1). PSI i PSII sadrže pigmente pomoću kojih se apsorbira svjetlosna energija koja dovodi do pobude klorofila u reakcijskom središtu i transporta elektrona putem prijenosnika duž tilakoidne membrane. Donor elektrona je voda koja oksidacijom pomoću PSII daje molekularni kisik i $4H^+$. Elektroni se prenose pomoću plastokinola (PQ) i Cyt b_6f kompleksa do plastocijanina (PC) te preko PSI do Fd, pri čemu se stvara elektrokemijski potencijal koji omogućava sintezu ATP-a pomoću ATP-sintaze (10).

2.2.1. Fotosustav II

PSII se sastoji od četiri velike integralne membranske podjedinice PsbA (D1), PsbB (D2), PsbC i PsbD, tri izvan membranske PsbO, PsbP i PsbQ te velikog broja malih podjedinica (11) (Slika 1). D1 i D2 čine rekacijsko središte okruženo antenama. Ovi proteini posjeduju poseban par molekula klorofila *a* P680 koji maksimalno apsorbira crvenu svjetlost valne duljine 680 nm te dvije molekule feofitina a koje sudjeluju u prijenosu elektrona. Na ovaj reakcijski centar vezani su periferni antenski kompleksi LHCII te manji Lhcb4, Lhcb5 i Lhcb6. Nakon pobude P680 elektroni se prenose sa feofitina na PQ, koji nakon što primi dva elektrona prelazi u PQH_2. Prijenosom elektrona na feofitin *a* P680 postaje jak oksidans i prima elektrone koji nastaju cijepanjem molekula vode u lumenu tilakoida pomoću specijaliziranog kompleksa proteina (*water-splitting complex*). Četiri elektrona iz molekule vode tvore dva PQH2, a četiri protona ostaju u lumenu tilakoida i doprinose formiranju gradijenta protona koji služi za pokretanje ATP sintaze.



Slika 1. Fotosintetski aparat viših biljaka.a) Tilakoidna membrana s glavnim proteinskim kompleksima svjetlosnih reakcija. b) PSII. c) LHCII, zeleno: klorofil *a*, plavo: klorofil *b*, žuto: karotenoidi. Slika preuzeta i prilagođena iz (12).

2.2.2. Fotosustav I

PSI se sastoji se od dvije velike podjedinice PsaA i PsaB, izvan membranskih podjedinica PsaC, PsaD, PsaE i PsaN te integralnih membranskih podjedinica PsaF, PsaI, PsaJ, PsaK te PsaL. LHCI je periferni antenski kompleks koji se sastoji od 4 polipeptida, a sadrži klorofile *a* i *b* te ksantofile (11). Nakon što se svjetlost apsorbira pomoću sustava antenskih pigmenata, pobudna energija se prenosi u reakcijsko središte PSI koje sadrži klorofil *a* koji maksimalno apsorbira na valnoj duljini od 700 nm.

2.2.3. Citokrom b_6f kompleks

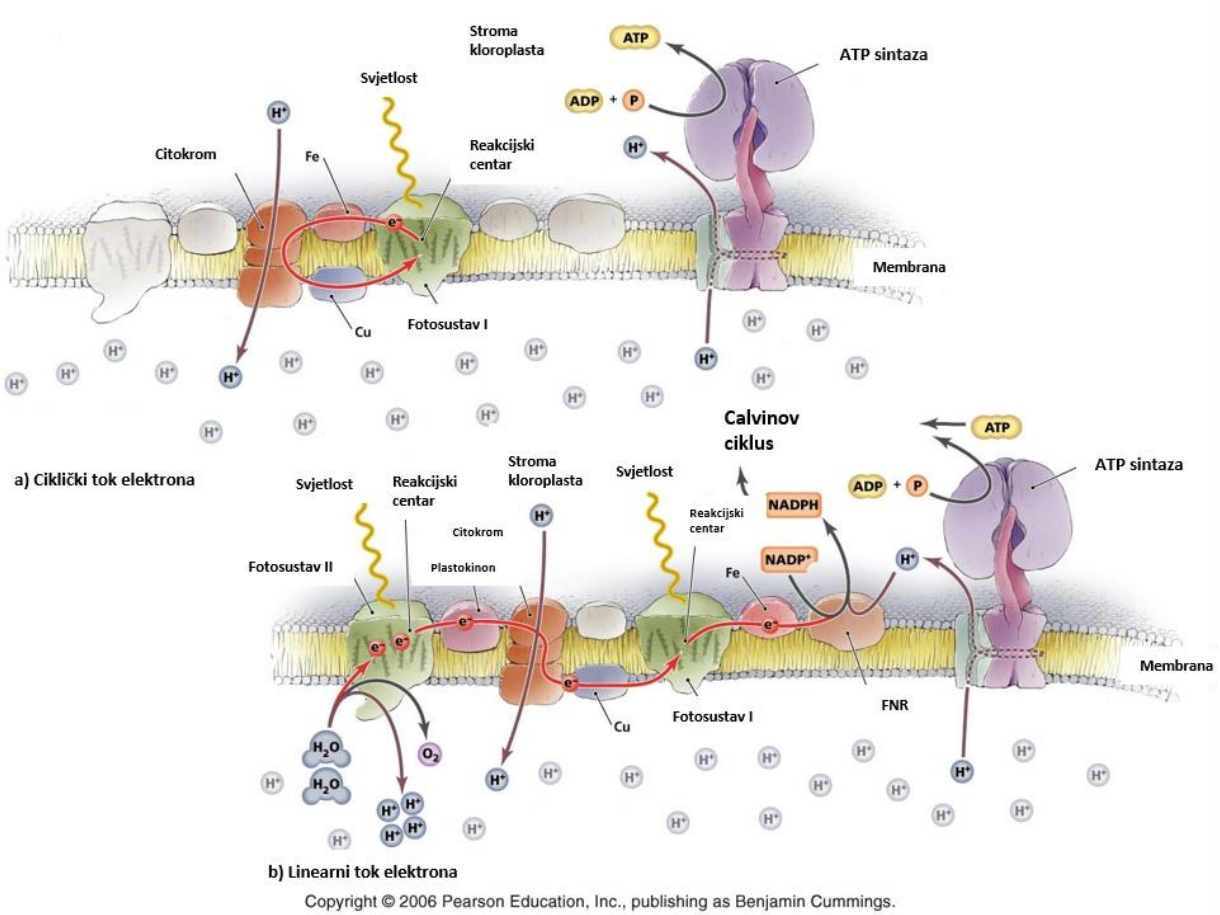
Citokrom b_6f je integralni membranski kompleks proteina građen od ukupno 8 podjedinica (11), od čega su 4 velike (podjedinica IV, cyt *f*, cyt *b6*, Rieske željezo sumporni protein), a 4 male (PetG, PetL, PetM, PetN). Citokrom b_6f katalizira prijenos elektrona sa PQH_2 na PC koji zatim prenosi elektrone na PSI.

2.2.4. ATP sintaza

F-ATPaza ili ATP sintaza koristi energiju transmembranskog gradijenta iona H^+ za sintezu ATP-a iz ADP-a i fosfata. Nalazi se u tilakoidnim membranama kloroplasta, unutarnjim membranama mitohondrija i u plazma membrani bakterija (13). Građena je od dvije podjedinice F0 i F1. F0 se nalazi na strani visokog elektrokemijskog potencijala protona (prema tilakoidnom lumenu), a F1 na strani niskog elektrokemijskog potencijala protona (prema stromi). Protok H^+ se odvija u F0 podjedinici dok se u podjedinici F1 odvija sinteza ATP-a uz rotaciju heksamernog rotora kojeg čine tri katalitičke β-podjedinice i 3 α-podjedinice bez katalitičke aktivnosti (11,13).

2.2.5. Transportni lanac elektrona

Ovisno o redoks stanju i energetskim potrebama biljke, razlikujemo linearni i ciklički tok elektrona svjetlosnih reakcija. Linearni tok karakterizira stvaranje NADPH i ATP-a prijenosom elektrona putem tri veća kompleksa fotosintetskog lanca: PSII, Cyt b_6f i PSI (14), dok se ciklički prijenos odvija putem PSI i Cyt b_6f (14) bez sinteze NADPH (Slika 2). U stabilnim uvjetima uz prisustvo CO_2 zastupljeniji je linearni tok elektrona. Smatra se da je glavna funkcija cikličkog toka elektrona povećanje koncentracije ATP-a koji limitira Calvinov ciklus nakon razdoblja tame (16) te prilagodbe biljaka na stresne uvjete (17). PC je univerzalni donor elektrona za PSI kod vaskularnih biljaka. Vezno mjesto za PC promjenjivo je ovisno o vrsti, a kod vaskularnih biljaka je visoko konzervirano i nalazi se na podjedinici PsaF smještenoj u blizini P700. Vezno mjesto za Fd se nalazi na stromalnoj strani tilakoidne membrane. Fd (red) pomoću enzima FNR reducira $NADP^+$, tioredoksin pomoću tioredoksin reduktaze te služi kao donor elektrona enzimima poput nitrit reduktaze i glutamat sintaze (18).



Slika 2. a) Ciklički tok elektrona u kojem sudjeluje samo PSI i nastaje ATP. Preuzeto i prilagođeno iz: (Web izvor 1) b) Linearni (neciklički) tok elektrona u kojem sudjeluju oba fotosustava pri čemu nastaju ATP i NADPH. Preuzeto i prilagođeno iz: (Web izvor 2).

2.2.6. Protein FNR

FNR je flavoenzim koji katalizira posljednji korak u fotosintetskom lancu transporta elektrona, tj. reverzibilni neciklički prijenos elektrona s reduciranog feredoksina na $NADP^+$ koristeći FAD kofaktor pri čemu nastaje NADPH prema reakciji:

$$2Fd(red) + NADP^+ + H^+ \rightarrow 2Fd(ox) + NADPH$$

FNR se nalazi i u nefotosintetskim plastidima gdje sudjeluje u fiksaciji i redukciji dušika, desaturaciji masnih kiselina te oksidaciji metana (19). Može biti vezan u proteinske komplekse na tilakoidnoj membrani ili topljiv u stromi. Molekularna masa FNR-a je od 35-45 kDa, a građen je od dvije domene koje su međusobno povezane petljom. Tako razlikujemo FAD vezujuću domenu na N-terminalnom završetku proteina te $NADP^+$ vezujuću domenu na C-terminalnom završetku. Prisutan je u tkivno specifičnim izoformama (20), a glavne funkcije su mu osigurati reducirane donore elektrona u reakcijama fiksacije CO_2, N_2, reakcijama oksidativnog stresa (21) i biosintezi izoprenoida, a uključen je i u regulaciji cikličkog transporta elektrona (22). Također sudjeluje u obrani biljaka od oksidativnog stresa regeneracijom reduciranog glutationa pomoću glutation reduktaze ovisne o NADPH (23).

Mutante *A. thaliana* koje su eksprimirale ZmFNR1 vezan za membranu te one koje su eksprimirale ZmFNR3 koji je primarno u topljivom obliku, pokazale su da vezani FNR ima veći utjecaj na otpornost biljaka na stres, a kod obje je mutante zabilježen i utjecaj na gensku ekspresiju te pojačana otpornost na visok intenzitet svjetlosti (24). Naime, povećana koncentracija vezanog FNR-a kod ZmFNR1 mutanti, a nešto manje kod ZmFNR3 mutanti je značajno smanjila nastanak O_2^- i uzrokovala veću redukciju NADP(H) i glutationa. Dodavanjem topivog FNR-a *fnr1* mutantama koje ne eksprimiraju FNR1 došlo je do značajnog povećanja nastanka O_2^- (24). Mutante *trol* kojima nedostaje protein TROL imaju i smanjen udio vezanog FNR-a, a stvaraju manje O_2^- radikala (5). Dakle, veću učinkovitost u sprječavanju nastanka O_2^- ima FNR otpušten sa tilakodnih membrana jer se elektroni se vrlo efikasno prenose i na alternativne akceptore.

FNR se u proteinskim kompleksima na tilakoidnoj membrani može naći vezan u obliku dimera na dva proteina: Tic62 i TROL (25, 26, 6). FNR-vezujuća domena je identične građe kod oba spomenuta proteina, a karakteriziraju ju brojni serinski i prolinski ostaci. Interakcija s proteinom TROL ima važnu fotosintetsku funkciju jer omogućuje linearan transport elektrona i nastanak NADPH (6), dok ona s proteinom Tic62 ima funkciju stabilizacije FNR-a (26).

Kloroplasti biljke *A. thaliana* sadrže dvije izoforme FNR-a: AtFNR1 i AtFNR2, dok kloroplasti kukuruza imaju tri izoforme ZmFNR1, ZmFNR2 i ZmFNR3. AtFNR1 je izoforma vezana za membranu dok se za AtFNR2 smatra da sudjeluje u retrogradnoj signalizaciji (27). ZmFNR1 je izoforma vezana za tilakoidnu mebranu, ZmFNR3 je topljivi protein, a ZmFNR2 je izoforma prisutna i u vezanom i slobodnom obliku. Kukuruz pripada C4 biljkama i posjeduje dva tipa fotosintetskih stanica: stanice mezofila i štapićaste stanice (28). Stanice mezofila provode linearni transport elektrona, a štapićaste ciklički transport elektrona pri kojem ne nastaje NADPH. ZmFNR1 izoforma je jednako zastupljena i u štapićastim i u stanicama mezofila, dok je u štapićastim zastupljeniji topljivi oblik FNR-a, što odgovara fotosintetskim potrebama stanice. Izoforme se razlikuju po strukturoj građi N-terminalnog kraja proteina koja omogućuje ili onemogućuje vezanje na membranu (29).

Vezani FNR pokazuje veću aktivnost u redukciji $NADP^+$ nego slobodni FNR (30), a s obzirom da je FNR oksidoreduktaza, reakcija može ići i u smjeru oksidacije NADPH, što je pokazano na cijanobakterijama (31) kod kojih topljivi FNR reducira koristeći NADPH u heterotrofnim uvjetima. Također, nije svaki membranski vezan FNR uključen u transport elektrona, a najbolji primjer za to je proteinski kompleks sa proteinomTic62 (26).

2.3. Plastidi

Plastidi variraju u svojim funkcijama i smještaju unutar biljnih tkiva i organa. Tako razlikujemo kromoplaste koji daju boju plodovima i cvjetovima, a karakterizira ih snažna proizvodnja karotenoida te varijacije u stupnju obojenosti. Funkcija im je spremanje pigmenata i obojenje tkiva (32). Amiloplasti ne sadrže pigmente, imaju skladišnu funkciju u korijenju i nesintetskim dijelovima biljke, a služe i kao statoliti u stanicama korijenove kape i usmjeravaju rast korijena (33). Etioplasti se nalaze u kotiledonima sjemenki uzgajanih u mraku i važan su prijelazni oblik prema razvoju kloroplasta. Ne sadrže klorofil, ali imaju jako puno protoklorofilida i prolamelarno tijelo koje je oblik skladištenja membranskih lipida. Pod utjecajem svjetlosti dolazi do procesa prelaska prolamelarnog tijela u tilakoide. Kloroplasti su fotosintetski aktivni, morfološki ih karakteriziraju tilakodine membrane, a strukturne i funkcionalne varijacije ovise o tipu fotosinteze (C3/C4, CAM) (34).

2.3.1. Razvoj i teorija nastanka plastida

Nastanak plastida objašnjava endosimbiotska teorija čiji su začetnici ruski biolog Constantin Mereschkowsky, a kasnije i američka biologinja Lynn Margulis. Prema teoriji plastidi potječu iz prokariota sličnih cijanobakterijama i nefotosintetskog domaćina koji je imao jezgru, citoskelet i mitohondrije (35). Za prve endosimbionte je karakteristična dvostruka membrana koja potječe od gram negativnih cijanobakterija, a pronađena je u glaukofitama te crvenim i zelenim algama. Uspostavljanje stabilne endosimbioze bio je dug proces prilagodbe u kojem je došlo do horizontalnog prijenosa gena iz prokariota sličnih cijanobakterijama u jezgru domaćina. Visokokonzervirani manji set gena se zadržao u genomu plastida (36) dok je većina proteoma plastida kodirana u jezgri i mora se unijeti u organel (37). Istraživanjem genoma plastida je pokazano da je transfer gena bio skoro završen prije nego što je došlo do divergencije endosimbionta u crvene i zelene alge te glaukofite (38). Postoji nekoliko teorija koje objašnjavaju zašto plastidi uopće imaju genom i zašto su zadržani baš određeni geni. Jedna od teorija predlaže da se neki proteini ne bi mogli transportirati u organel. Druga predlaže da su geni zadržani zbog

učinkovite regulacije redoks reakcija (39), a treća da bi se prijenosom gena u jezgru izgubio regulatorni mehanizam sinteze i formiranja tilakoidnih membrane te da su geni sačuvani u organelu modifikacijom kodona koji su bili barijera u funkcionalnom prijenosu gena.

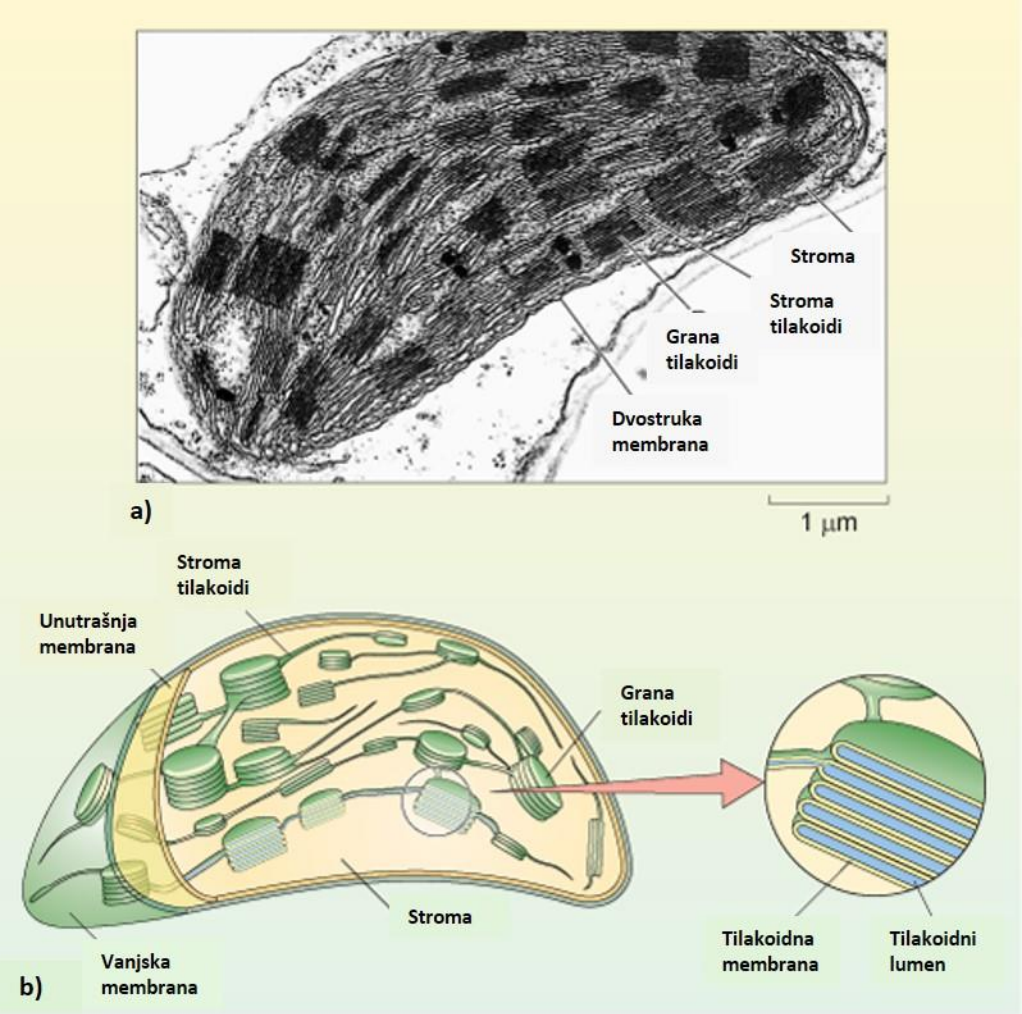
2.3.2. Razvoj i dijeljenje kloroplasta te unos proteina u kloroplaste

Kod biljke *A. thaliana*, kao i velike većine kritosjemenjača, plastidi se nasljeđuju uniparentalno citoplazmom jajne stanice u obliku prekursora- proplastida. Početna faza razvoja sjemena u tami je skotomorfogeneza (34), a karakterizira ju razvoj eoplasta u etioplaste u kotiledonima, a oni se u hipokotilu i korijenu razvijaju u različite tipove bezbojnih leukoplasta. Etioplasti predstavljaju međuoblik u biogenezi kloroplasta. Pod utjecajem svjetlosti dolazi do aktivacije fotomorfogeneze pomoću fotoreceptornih proteina fitokroma i kriptokroma koji dovode do ekspresije gena u jezgri koji kodiraju kloroplastne proteine. Paralelno dolazi do formiranja tilakoidnih membrana i indukcije sinteze klorofila. U slučaju klijanja na svjetlu, preskače se proces skotomorfogeneze i eoplasti kotiledona se diferenciraju direktno u kloroplaste.

Kloroplasti se dijele samostalnom diobom formiranjem unutrašnjih i vanjskih kontraktilnih prstena, ali njihov broj ovisi o veličini stanice pa tako stanica mezofila *A. thaliana* može sadržavati više od 100 kloroplasta (41). Dijeliti se može i razvijeni kloroplast, no ipak se najčešće dijele proplastidi, etioplasti i mladi kloroplasti. Razvijeni kloroplast čine unutrašnja i vanjska membrane te sustav tilakodinih membrana smještenih u stromi kloroplasta. Tilakoidne membrane mogu biti u obliku plosnatih i sabijenih grana tilakoida ili stroma tilakoida koji međusobno povezuju grana tilakoide (Slika 3). Prostor omeđen tilakoidnim membranama potpuno je odvojen od kloroplastne strome, a naziva se tilakoidni lumen.

Unos proteina u kloroplaste je nužan proces već kod same biogeneze. Većina proteina unosi se pomoću Toc (Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts) i Tic (Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts) kompleksa smještenih na vanjskoj, odnosno unutrašnjoj membrani kloroplasta. Komponente ovih kompleksa su većinom supstratno specifične, a regulirane su svjetlošću. Da bi došlo do uspješnog unosa proteina, važno je da protein sadrži N-terminalni tranzitni peptid koji ga usmjerava prema organelu, ali i da ne dođe do

preranog smatanja proteina. Tranzitni peptid uklanja peptidaza tijekom ili nakon unosa proteina (2).



Slika 3. Građa kloroplasta. a) Elektronska mikrografija kloroplasta s prikazanom dvostrukom membranom, stromom te grana i stroma tilakoidima. b) Shematski prikaz građe kloroplasta. Slika preuzeta i prilagođena iz: (Web izvor 3).

2.3.3. Protein Tic62

Tic62 je podjedinica Tic kompleksa koji omogućava unos prekursora proteina kodiranih u jezgri zajedno sa Toc kompleksom preko dvostruke membrane organela (25). Uz Tic55 i Tic32 spada u redoks aktivne podjedinice i u obitelj dehidrogenaza (42, 43). Tic62 se smatra redoks senzorom zato što povezuje stromu i unutrašnju ovojnicu ovisno o $NADP^+$/NADPH omjeru, ali i zbog redoks ovisne interakcije s FNR-om. Sastoji se od dvije podjedinice: konzervirane N-terminalne regije koja sadrži dehidrogenaznu domenu i C-terminalne regije koja sadrži ponavljanja bogata serinom i prolinom te interagira sa FNR-om. Tilakoidni Tic62-FNR kompleksi su uključeni u dinamičke procese regulirane svjetlošću i stromalnim pH, ali ne sudjeluju u transportu elektrona (26).

2.3.4. Biogeneza tilakoida i klorofila

Tilakoidne membrane iznimno su bogate galaktolipidima koji su neophodni za izgradnju tilakoida, a sintetiziraju se u membranama kloroplasta (44). Proplastidi sadrže protilakoide koji su ishodište sinteze tilakoida. Do diferencijacije na grana i stroma tilakoide dolazi kasnije u razvoju kloroplasta tako da mladi kloroplasti sadrže perforirane tilakoide koji nisu zbijeni ni složeni kao u grana tilakoidima (39). PSII i LHCII najčešće nalazimo na membranama grana tilakoida, a PSI i ATP-azu u membranama stroma tilakoida dok je cyt b_6f kompleks jednoliko raspoređen (11). Grana tilakoidi sadrže više klorofila, oko 80%, gdje PSI i PSII vrše linearni transport elektrona, dok je oko 20% klorofila zastupljeno u stroma tilakoidima gdje PSI sudjeluje u cikličkom transportu elektrona. Veliki broj procesa u biogenezi kloroplasta je međusobno ovisan. Na primjer, LHCII se sastoji od nekoliko LHC-vezujućih proteina koji se unose u kloroplast i pravilno smataju samo uz prisutnost klorofila sintetiziranog na unutrašnjoj membrani. Nadalje, svaki nedostatak u biosintezi masti ugrožava zastupljenost klorofila i proteinskih kompleksa koji sudjeluju u prijenosu elektrona jer nije moguće pravilno formiranje tilakoidnih membrana (45).

Biogeneza klorofila se oslanja na biosintezu tetrapirola, a započinje sa δ-aminolevulinskom kiselinom koja nastaje iz L-glutamata. Ključni korak je nastajanje Mg-protoporfirina IX u čiji se

prsten kelatazom ugrađuje magnezijev atom i time omogućava daljnje korake sinteze protoklorofilida *a*. On se kod kritosjemenjača reducira do klorofila *a* reakcijom koja je ovisna o svjetlosti, dok se kod golosjemenjača i algi reducira neovisno o svjetlosti. Dalje esterifikacijom dolazi do sinteze klorofila *a*, dok se klorofil *b* sintetizira iz klorofila *a* prevođenjem metilne u formilnu skupinu (39). Klorofil *a* maksimalno apsorbira svjetlost na 430 i 662 nm, a klorofil *b* na 453 i 643 nm.

2.4. Genom kloroplasta i komunikacija s jezgrom

U biljci *A. thaliana* čak 2100 kloroplastnih proteina kodirano je u jezgri, a 117 u kloroplastnom genomu. Kao posljedica endosimbioze došlo je do razvoja kontrole ekspresije kloroplastnih gena preko gena u jezgri odnosno razvoja anterogradnog signalnog puta. Kasnije je došlo i do razvoja retrogradnih signala kojim kloroplasti, ovisno o razvojnim i metaboličkim stanjima, mogu regulirati ekspresiju gena u jezgri koji kodiraju proteine lokalizirane u kloroplastu (46). Ako sjemenke tretiramo kemijskim inhibitorom biogeneze kloroplasta, razina transkripcije gena u jezgri je smanjena što ukazuje da retrogradni signal sprječava ekspresiju gena u slučaju kad je kloroplast oštećen (47). Retrogradne signale možemo podijeliti u dvije kategorije: biogeni i operacijski signali. Biogeni iz plastida koordiniraju ekspresiju fotosintetskih gena vezanih za sazrijevanje organela u zreli fotosintetski aktivan kloroplast izbjegavajući tako oksidativnu štetu (47). Operacijski signali koriste se za signaliziranje stresa i omogućavaju fotosintetski aktivnim kloroplastima odgovor na promjene u okolišu kao što su jak intenzitet svjetlosti i visoke temperature. Ovakvi stresni uvjeti dovode do inhibicije transportnog lanca elektrona i nakupljanja viška elektrona što uzrokuje nastanak H_2O_2 i $^1O_2$ na PSI i PSII, a nakupljanje tih reaktivnih jedinki dovodi do oštećenja DNA, proteina i lipida (48).

2.4.1. Reaktivni kisikovi oblici

Glavni izvor reaktivnih kisikovih radikala (reactive oxygen species, ROS) u biljkama je fotosintetski transportni lanac elektrona, a nastaju pod utjecajem različitih okolišnih stresova. Biljke su razvile mehanizme kojima izbjegavaju stvaranje ROS-a ili ga učinkovito uklanjaju. Nefotokemijsko gašenje/utišavanje (non-photochemical quenching, NPQ) je mehanizam sprječavanja nastanka ROS rasipanjem viška pobudne energije u obliku topline pomoću zaštitnih pigmenata ksantofila. Nakon nastanka ROS-a dolazi do aktivacije antioksidativnih enzima katalaze, peroksidaze, askorbat-peroksidaze, glutation-reduktaze, a važnu ulogu u uklanjanu ROS-a imaju i metaboliti askorbat, glutation, karotenoidi i tokoferol.

Tiol-disulfidni sustav koristi se za koordinaciju omjera NADPH i ATP i udjela iskoristivosti NAPDH i ATP u asimilaciji ugljika preko tioredoksina (TRX). Reducirani oblix TRX-a reducira disulfidne mostove ciljanih proteina Calvinova ciklusa (49). Redukcija TRX-a može ići Fd-ovisnim putem ili NADPH-ovisnim putem. Fd-ovisni put pokreće reducirani Fd, a aktivira fruktoza-1,6-bisfosfatazu, ribuloza-5-fosfat kinazu, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (51), ali regulira i ATP sintazu (52), enzime koji sudjeluju u skladištenju škroba (48) te biosintezu klorofila (53). NADPH-ovisni put također aktivira enzime Calvinova ciklusa, a oba sustava zajedno djeluju s 2-cistein peroksiredoksinom (2-CYSPRX) kao dvokomponentni sustav detoksifikacije vodikovog peroksida (H_2O_2) (54). Nakupljanje H_2O_2 u kloroplastima se sprječava složenim sustavom koji uključuje enzime TRX i 2-CYSPRX, ali i askorbat-peroksidazu (APX) te antioksidans askorbat koji provodi signale i kontrolira akumulaciju ROS-a (55).

O_2^- jedinke se prevode u H_2O_2 pomoću superoksid dismutaze (SOD), a H_2O_2 se dalje može reducirati u vodu kloroplastnim APX i peroksidazama (PRX). Proces je poznat kao Mehlerova reakcija u kojoj se troše dva elektrona za proizvodnju molekule H_2O_2 i dva elektrona za prevođenje H_2O_2 u H_2O uz rasipanje viška pobudne energije. Mehlerova reakcija također omogućava ciklički tok elektrona kad nema drugih slobodnih primatelja elektrona, ali i štiti PSII od oštećenja (56).

Mehlerova reakcija je signalni mehanizam kod kojeg je H_2O_2 mjera aktivnosti transporta elektrona, ali i signalni put jer se H_2O_2 prenosi stromulima do jezgre kao retrogradni signal (57). Također, nakupljanje H_2O_2 je mjera viška pobudne energije (58) i smatra se signalnom

molekulom za aktivaciju aklimatizacije na visok intenzitet svjetlosti utječući na redoks stanje jezgre i transkripciju gena (59). S obzirom na to, konstrukcija biljaka s povećanim antioksidativnim kapacitetom može povećati otpornost na visok intenzitet svjetlosti i druge oblike stresa.

B-karoten, askorbat, tokoferol i glutation su vrlo efiksani u uklanjanju $^1O_2$. Radikali O_2^- i H_2O_2 najviše nastaju na stromalnoj strani PSI, dok kod PSII na grana tilakoidima nastaje $^1O_2$. H_2O_2 i $^1O_2$ su neovisni redoks signali i pokretači ekspresije gena u jezgri. Suvišak svjetlosti dovodi do pobude tripletnog stanja klorofila u antenama i reakcijskim centrima PSII i klorofil kao takav može reagirati s kisikom pri čemu nastaje $^1O_2$. Prekomjerna akumulacija $^1O_2$ dovodi do stanične i kloroplastne degradacije i stanične smrti (60). Priroda $^1O_2$ kao signalne molekule pokazana je na *flu* mutanti *A. thaliana* koja u tami akumulira fotoosjetljivi intermedijer klorofila protoklorofilid (61). Naime, pojavom svjetlosti protoklorofilid prelazi u tripletno stanje i dovodi do akumulacije $^1O_2$ koji inducira retrogradni signal za zaustavljanje rasta ili staničnu smrt (62). S obzirom da je polu-život $^1O_2$ kratak, potrebni su mu sekundarni signali EXECUTER1 i EXECUTER2, homologni proteini koji se nalaze u tilakoidima (60).

Neki od najvažnijih kloroplastnih antioksidansa su karotenoidi na tilakodnim membranama te tokoferoli koji su također bitni u procesu NPQ i lipidne peroksidacije (63). Ciklus askorbat-glutation je jedan od puteva ograničavanja nakupljanja H_2O_2, pri čemu dolazi do proizvodnje monodehidroakskorbatnih radikala koji se reduciraju pomoću Fd ili reduktaze korištenjem NADPH. Monodehidroaskorbatni radikali također mogu spontano disocirati u askorbat i dehidroaskorbat koji se reciklira pomoću reduciranog glutationa (63).

2.4.2 Identifikacija i kvantifikacija reaktivnih kisikovih radikala elektronskom paramagnetskom rezonancijom (EPR)

Reaktivni kisikovi radikali u biljnoj stanici sudjeluju u mnogim staničnim procesima i odgovorima biljke na abiotički i biotički stres (53). S obzirom da sadrže nesparene elektrone, mogu se detektirati elektronskom paramagnetskom rezonancijom (EPR). EPR je spektroskopska metoda kojom se detektiraju paramagnetski centri i predstavlja iznimno osjetljiv sustav za detekciju slobodnih radikala. S obzirom da radikale karakterizira izrazita reaktivnost i kratak poluživot, kod detekcije i identifikacije EPR-om koriste se takozvane klopke (*spin traps*). Klopke su dijamagnetične i stabilne, a s radikalima stvaraju stabilne produkte (spinske adukte) puno dužeg poluživota koji se mogu detektirati EPR-om (40). Najčešće korištene klopke su nitroni i nitrozo spojevi kao na primjer DMPO (5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksid) i PBN (N-tert-butil-α-fenilnitron) koji s radikalima tvore nitrokside. EPR mjerenjima oslobađanja superoksidnog radikala na *trol* liniji biljke *A. thaliana* pomoću DMPO-a pokazano je stvaranje manje O_2^- u odnosu na divlji tip u trima testiranim uvjetima: biljkama prilagođenim na normalno osvjetljenje, na tamu i na jak intenzitet svjetlosti (5).

2.5. Učinkovitost C4 tipa fotosinteze

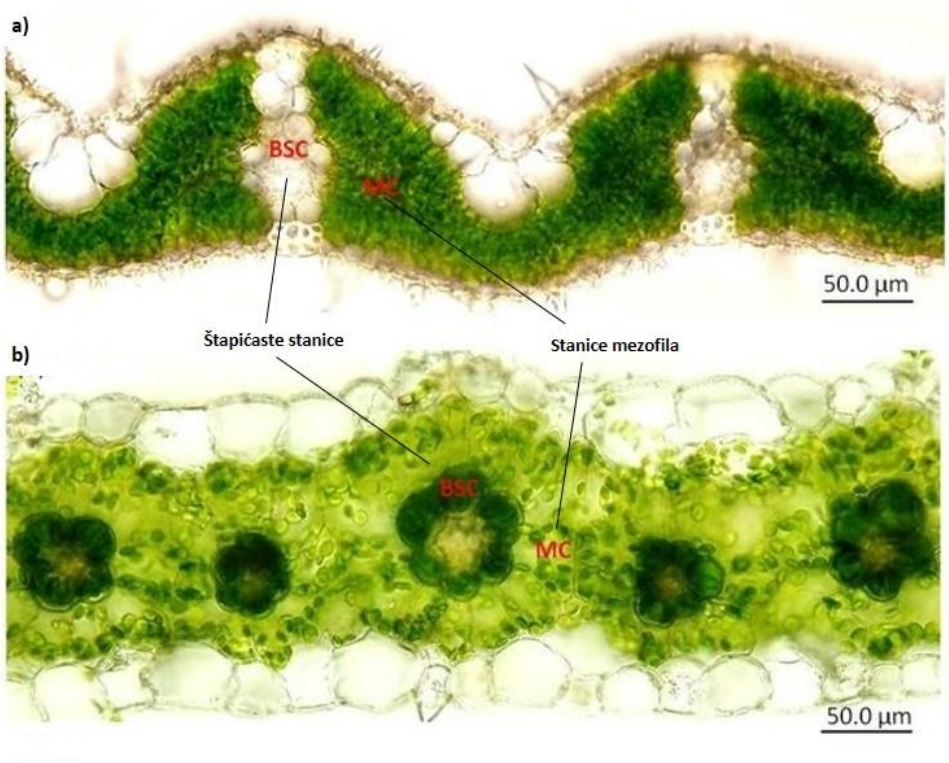
C4 biljke imaju otprilike 50% veću fotosintetsku učinkovitost nego C3 biljke (64), a glavnu razliku čini mehanizam fiksacije ugljika. Kod C3 fotosinteze biljke za fiksaciju CO_2 u stanicama mezofila koriste Calvinov ciklus uz djelovanje enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaze oksigenaze (Rubisco). Kod C4 biljaka je fotosintetska aktivnost podijeljena u dvije vrste stanica, a to su stanice mezofila i štapićaste stanice. Fiksacija ugljika odvija se u štapićastim stanicama pomoću fosfoenolpiruvat karboksilaze (PEPC) te nastaje oksaloacetat (OAA) iz CO_2 i fosfoenol piruvata. OAA se dalje prevodi u malat koji se u štapićastim stanicama dekarboksilira i oko Rubisco-a stvara povećanu koncentraciju CO_2 što smanjuje fotorespiraciju i gubitak energije čime se postiže veća efikasnost fotosinteze u odnosu na C3 biljke (65).

Istraživanja na metaboličkim modelima C3 i C4 biljaka pokazala su da povećanjem intenziteta svjetlosti kod C4 biljaka dolazi do bržeg povećanja biomase i fiksacije CO_2 (66). Također,

povećanje biomase i fiksacije CO_2 uz povećanje koncentracije CO_2 brže je kod C4 nego kod C3 biljaka (58). Dakle, C4 biljke su manje osjetljive na visok intentitet svjetlosti i smanjenu koncentraciju CO_2 što im omogućuje bolje iskorištavanje CO_2 i raspoložive svjelosti (67).

2.5.1. Anatomske i funkcionalne promjene lista ovisno o tipu fotosinteze

Zbog niza biokemijskih promjena pri evoluciji C4 metaboličkog puta, došlo je do promjena anatomije lista u odnosu na C3 pretka koje uključuju radijalno postavljene stanice mezofila u odnosu na povećane štapićaste stanice što zajednički nazivamo Kranzova anatomija (68) (Slika 4). Kod C4 biljaka došlo je do smanjenja broja stanica mezofila u odnosu na C3 biljke i to na način da svaka fotosintetski aktivna stanica mezofila ili dodiruje štapićastu stanicu ili je jednu stanicu udaljena od nje (69). U štapićastim stanicama je došlo do povećanja broja i veličine kloroplasta, a C4 listovi imaju svjetlo zeleno tkivo mezofila jer je u njima manje kloroplasta nego u štapićastim stanicama (70). Smatra se da su mnoge funkcionalne promjene mogle utjecati na smanjen broj kloroplasta u mezofilu. Kloroplasti stanica mezofila C4 biljaka više ne sudjeluju u karboksilaciji, pa mjesto karboksilacije više nije stroma kao kod C3 biljaka nego citosol i smatra se da veliki broj kloroplasta može utjecati na difuziju CO_2 (71).



Slika 4. Razlika u anatomiji između a) C3 biljke *Oryza sativa* L. i b) C4 biljke *Setaria viridis* L. Kod C3 biljke (*Oryza sativa* L.) oko 90% kloroplasta nalazi se u stanicama mezofila, dok kod C4 biljke (*Setaria viridis* L.) kloroplaste nalazimo i u štapićastim stanicama i stanicama mezofila. Slika preuzeta i prilagođena iz (72).

2.6. Rodanaze

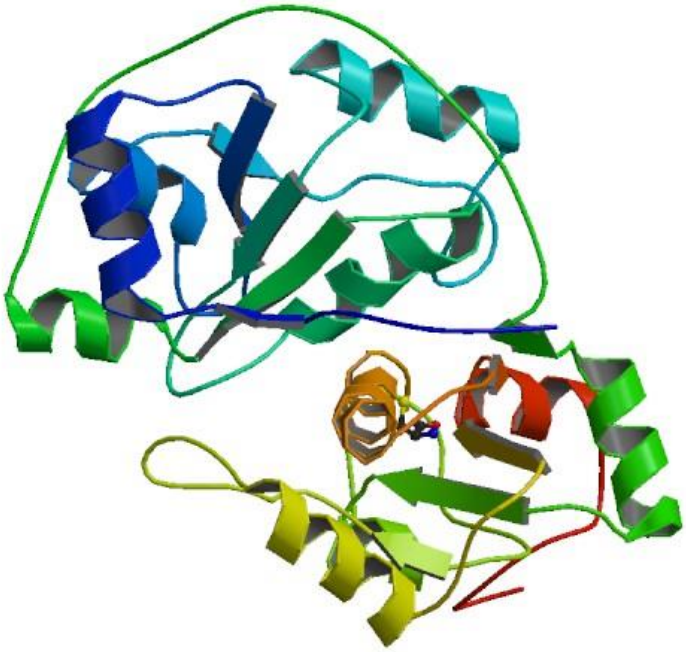
Reduktivna asimilacija sumpora biljkama omogućuje sintezu cisteina, stvaranje sulfitnih i sulfidnih intermedijera te sintezu metionina i glutationa (GSH) (73). Sumpor koji se nalazi u ključnim staničnim elementima, kao što su vitamini, željezo-sumporni klasteri, molibden kofatori (Moco), ima različito podrijetlo.Tako se, na primjer, sumpor koji nastaje degradacijom željezo-sumpornih klastera koristi u procesu biosinteze vitamina (74). Transport sumpora primarno obavljaju enzimi sumporne transferaze (STR) koji posjeduju jednu ili više rodanaznih domena koje obično sadrže katalitički cistein (75, 76). STR su široko rasprostranjeni enzimi koji kataliziraju prijenos sumpora od donora do nukleofilnog primatelja stvaranjem međuprodukta protein persulfida na katalitičkom cisteinu. Njihova učinkovitost i specifičnost ovisi o tipu sumpornih akceptora. Smatra se da su neke od funkcija STR-a detoksifikacija cijanida, izgradnja prostetičkih skupina u željezo-sumpornim proteinima te metabolizam selena (77).

Najbolje je opisana mitohondrijska rodanaza goveđe jetre (*bovine liver rhodanase*). Sastoji se od dvije domene povezane vezujućim slijedom. N-terminalna domena je neaktivna, dok je C-terminalna domena katalitički aktivna. Aktivno mjesto C-terminalne domene karakterizira šest aminokiselina od kojih je najvažniji cistein koji je uključen u katalitičke procese (Slika 5). U neaktivnoj N-terminalnoj domeni mjesto cisteina zauzima aspartat (77).

Enzim može biti fosforiliran i defosforiliran, a prema kaskadnom modelu u dva koraka rodanaze fosforilacijom prelaze u konformacijski oblik u kakvom mogu preuzeti slabo vezane sulfide iz željezo-sumpor centara i formirati međuprodukt.. Tada dolazi do smanjene sinteze ATP-a i smanjenja toka elektrona na unutrašnjoj memmbrani mitohondrija. Nakon što se sumpor prenese na primatelja, dolazi do otpuštanja fosfatne skupine.i rasta mitohondrijske aktivnosti. Humani enzimi Cdc25A i Cdc25B fosfataze koje sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa imaju istu građu i katalitički aktivan cistein. Smatra se da oba enzima imaju istog molekularnog pretka (78).

a)

b)



Slika 5. Struktura rodanaze iz goveđe jetre. Slika prikazuje neaktivnu N-terminalnu domenu a) koja je sa aktivnom domenom b) povezana vezujućom petljom. Narančasto je označena rodanazna domena i pripadajući cistein. Slika preuzeta iz: (Web izvor 4).

STR se međusobno razlikuju prema primarnom aminokiselinskom slijedu, arhitekturi domena, strukturi i dužini petlje aktivnog mjesta (79) te ih možemo podijeliti u tri skupine.

U prvu skupinu spadaju STR s jednom rodanaznom domenom koja uključuje Cdc25 fosfatazu i tiosulfat transferazu. Široko su rasprostranjene, a posebice kod bakterija. Na razini gena, proteini s jednom rodanaznom domenom su povezani s određenim stresnim uvjetima.

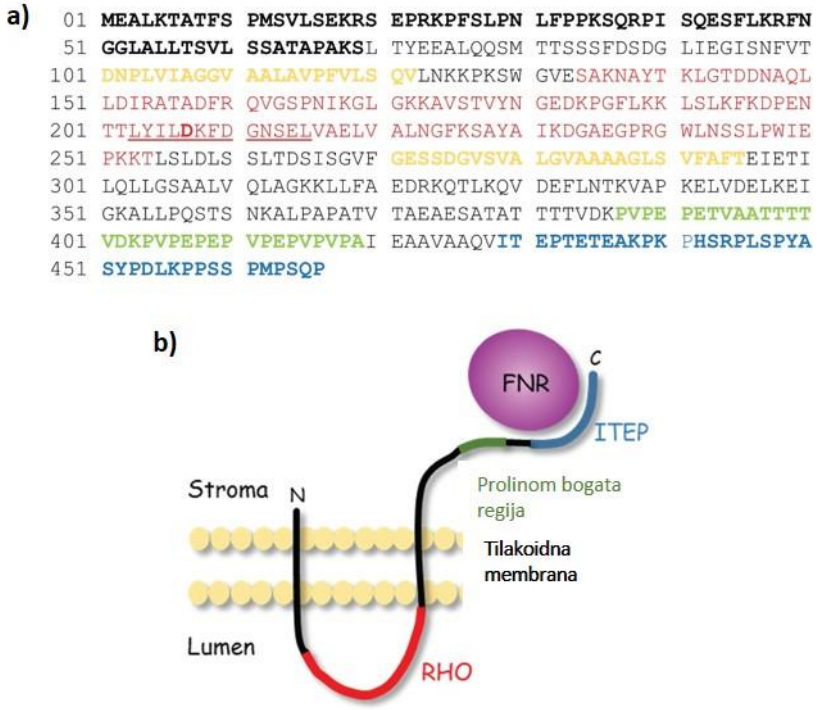
Cdc25 u aktivnom mjestu ima 7 ostataka aminokiselina i širu katalitičku domenu što omogućuje vezanje fosfora koji ima veći van der Waalsov radijus od sumpora. Drugu skupinu čine STR sa dvije rodanazne domene, ali sa samo jednim katalitički aktivnim cisteinom. Supstrat im je 3-merkaptopiruvat iz čega se izvodi i njihov naziv 3-MP-STR. Treću skupinu čine STR koje sadrže RHO domenu čiji je aktivni cistein vezan za domenu koja ima specifičnu ulogu kao što su MAPK fosfataze (79).

Kod biljke *A. thaliana* STR formiraju devet različitih klastera. Najbolje istražene su STR5 i STR17 povezane s mehanizmima tolerancije na arsen, STR13/CNX5 u Moco biogenezi kod enzima koji u aktivnom mjestu sadrže molibden i sudjeluju u tio modifikacijama citosolnih tRNA te STR1 važan za degradaciju cisteina i stvaranje H_2S (80).

Pronađene su i katalitički neaktivne rodanazne domene u čijem je aktivnom mjestu cistein zamijenjen nekom nepolarnom ili kiselom aminokiselinom i to u fosafatazama i nekim enzimima uključenim u ubikvitinaciju (79). Receptor za kalcij kod biljke *A. thaliana* na C-terminalnom završetku sadrži neaktivnu rodanaznu domenu za koju se pretpostavlja da ima signalnu ulogu u kontroli otvaranja i zatvaranja puči-procesu u kojem sudjeluje kalcij. Također, neaktivna rodanazna domena nađena je i kod proteina TROL te se za nju smatra da je dio signalnog puta odgovornog za vezanje i otpuštanje proteina FNR i usmjeravanje fotosintetskih elektrona (6, 81).

2.6.1. Protein TROL

TROL (Thylakoid rhodanase-like protein) je transmembranski protein veličine 66 kDa koji je u biljci *A. thaliana* kodiran genom At4g01050 smještenom na 4. kromosomu. Dvojno je lokaliziran i nalazi se na unutarnjoj membrani ovojnice kloroplasta u obliku pretproteina sa signalnom sekvencom te u stroma tilakoidima i rubnim dijelovima grana tilakoida u zrelom obliku (6). Građen je od dvije transmembranske uzvojnice te od neaktivne domene RHO smještene u lumenu tilakoida (81, 82) (Slika 6). U katalitičkom mjestu neaktivne domene RHO umjesto cisteina nalazi se aspartat. Na C-terminalnom završetku proteina nalazi se ITEP regija karakteristična samo za vaskularne biljke, a funkcija joj je vezanje proteina FNR.



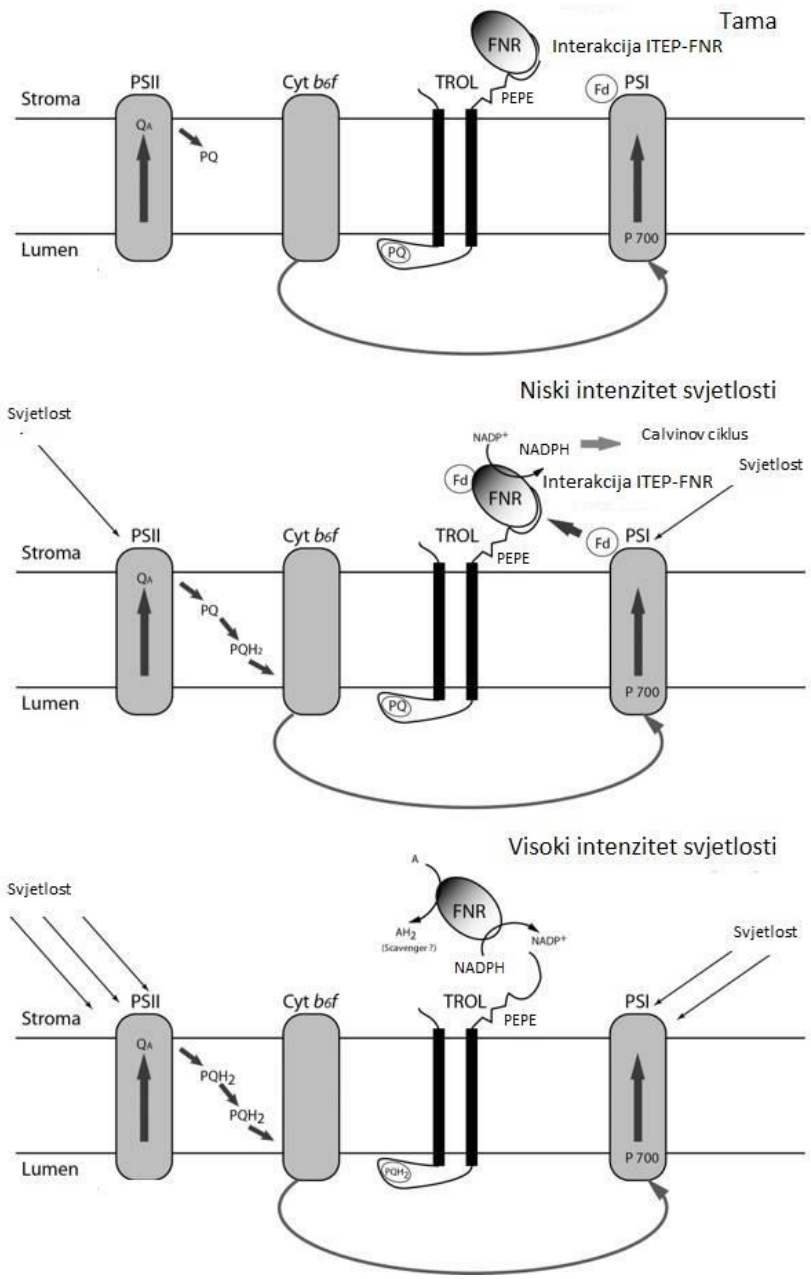
Slika 6. a) Aminokiselinski slijed i domene proteina TROL. Crno-signalni slijed, žuto-transmembranske domene, crveno-RHO domena, zeleno-prolinom bogata regija, plavo-ITEP regija. b) Predloženi model proteina TROL. Slika preuzeta i prilagođena iz: (82).

Uzvodno od regije ITEP smještena je regija PEPE karakteristična po ponavljajućim sljedovima prolin-valin-prolin koji ju čine fleksibilnom. TROL je nađen u nekoliko proteinskih kompleksa od 110-120 kDa koji upućuju na vezanje manjih liganda sa TROL domenama, dok kompleks sa proteinom FNR ima veličinu oko 190 kDa (6). Protein TROL i Tic62 imaju gotovo identičnu domenu kojom vežu FNR.

Predloženo je nekoliko modela vezanja proteina FNR i TROL u komplekse. U prvom je predloženo da je većina kloroplastnog FNR-a vezana za tilakoide pomoću proteina Tic62 i TROL tijekom perioda tame, dok pod utjecajem svjetlosti dolazi do otpuštanja FNR-a u stromu gdje katalizira fotoredukciju $NADP^+$ i omogućava efikasan linearan transport elektrona (26). No, prijašnja istraživanja su pokazala da je fotoredukcija $NADP^+$ neefikasna u uvjetima kada enzim nije vezan za membranu (30).

Model dinamičkog vezanja predlaže da TROL veže i stabilizira FNR tijekom noći i sprječava oduzimanje elektrona iz NADPH. U uvjetima normalnog osvjetljenja vezanje FNR-a na TROL omogućuje prijenos elektrona sa reduciranog Fd na $NADP^+$ pri čemu nastaje NADPH. U uvjetima jakog intenziteta svjetlosti, smatra se da TROL otpušta FNR pod utjecajem signala iz RHO domene, nastalog vezanjem reduciranog liganda te se elektroni predaju alternativnim putevima (81,6) (Slika 7).

Posljednji model uključuje redoks stanje strome (omjer $NADP^+$/NADPH), koje ovisi o uvjetima u okolišu, kao odlučujući čimbenik pri vezanju FNR-a za membrane (83).



Slika 7. Shematski prikaz predloženog dinamičkog modela vezanja i otpuštanja proteina FNR. U uvjetima tame TROL vezanjem stabilizira FNR. U uvjetima niskog osvjetljenja vezani FNR učinkovito reducira $NADP^+$ stvarajući NADPH. U uvjetima visokog intenziteta svjetlosti FNR se otpušta s membrane gdje sudjeluje u alternativnim putevima prijenosa elektrona. Slika preuzeta i prilagođena iz: (81).

Istraživanja interakcija FNR-a i ITEP domena proteina Tic62 i TROL rađena simulacijom molekularne dinamike u uvjetima različitih pH vrijednosti pokazala su da su najvažnije interakcijske regije u FNR dimeru one koje obiluju hidrofobnim van der Waalsovim interakcijama i smještene su u blizini domene ITEP. Identificirano je 5 funkcionalno važnih vodikovih veza od kojih tri (HBN1, HBN2 i CCHH) pokazuju svojstva ovisna o pH te se smatra da omogućavaju veće konformacijske promjene koje su posljedica promjena u okolišu (84).

Mutantne linije *A. thaliana* koje ne sadrže protein TROL (*trol*) formiraju manje rozete i sporije se razvijaju. U odnosu na divlji tip, sadrže dvostruko više manjih kloroplasta, ali sastav pigmenata nije značajno različit (6). Kod dvostrukih mutanti *tic62 trol* primijećen je nizak omjer $NADPH/NADP^+$ bez fenotipskih promjena ili poremećaja u funkcioniranju fotosustava. No, došlo je do promjene u metabolizmu u plastidu gdje je primijećeno veće nakupljanje škroba, povišene razine maltozne te AGP-azne aktivnosti (85).

3. MATERIJALI I METODE

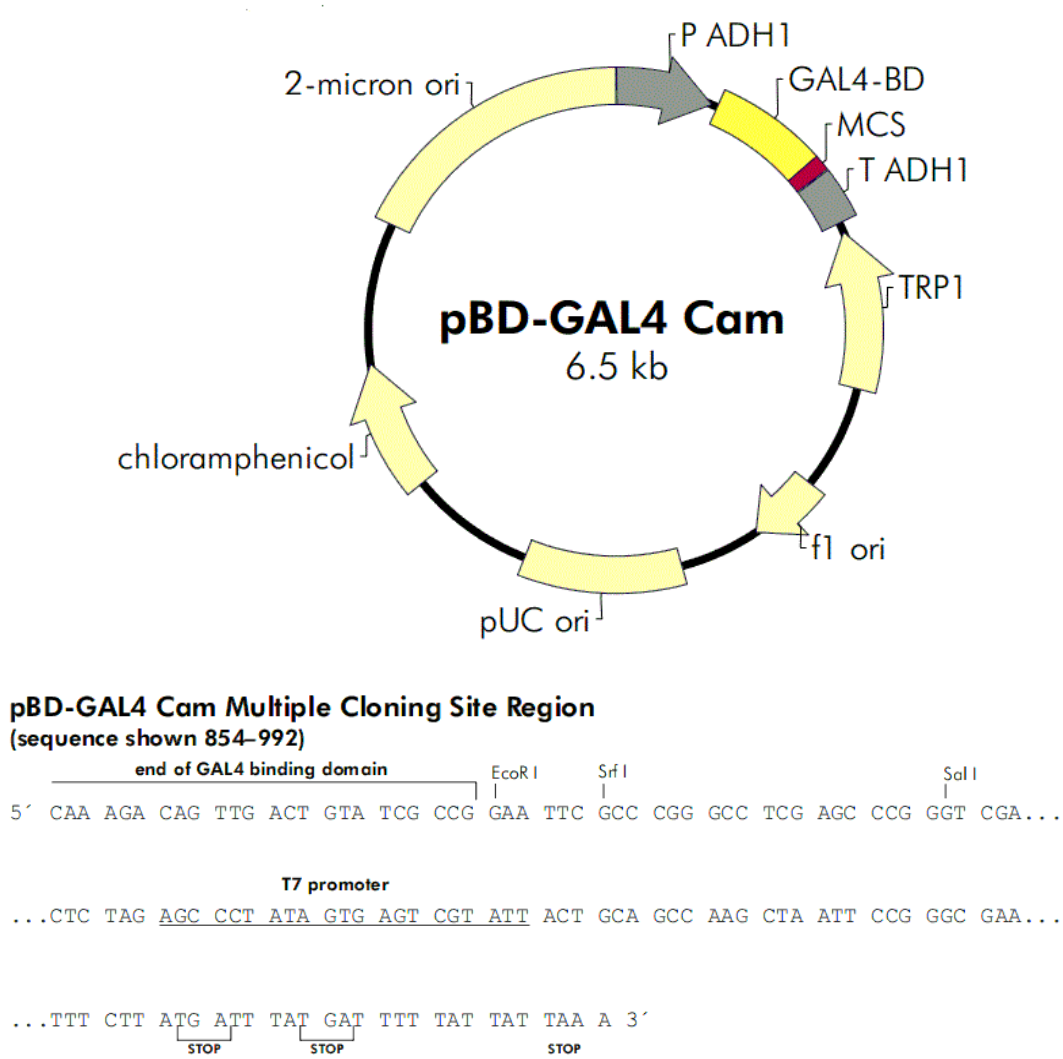
3.1. Vektori, bakterijski sojevi, sojevi kvasca i biljni materijal

3.1.1. Plazmidni vektori

Vektori korišteni u ovom istraživanju su:

- pK7WG2.0 s rezistencijom na kanamicin u koji je ugrađen insert ZmFNR1FLAGHA
- *Prey* vektor pGADT7 s rezistencijom na ampicilin u koji je ugrađen insert ZmFNR1 označen biljezima FLAG i HA
- *Prey* vektor pADGal4 s rezistencijom na ampicilin u koji je ugrađen FNR1 iz graška (PsFNR1) (86)
- *Bait* vektor pBDGAL4 s rezistencijom na kloramfenikol u koji su ugrađeni IA2, PEPE, ITEP i 220 (Slika 8) (86)

U vektore su ugrađeni odgovarajući inserti kako bi se mogle promatrati proteinske interakcije u kvascima.



Slika 8. pBD-GAL4 Cam vektor. Hibrid je faga M13 i plazmida te se naziva i fagemidni vektor. Može biti u formi plazmida ili jednolančane DNA. Za selekciju u *E. coli* ima rezistenciju na kloramfenikol i f1origin jednolančane DNA. Sadrži i znak mikro za replikaciju u kvascima te TRP1 gen za selekciju u kvascima. Slika preuzeta iz: (Web izvor 5).

3.1.2. Bakterijski sojevi

Bakterijski soj *E. coli* DH5α [F– Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK–mK+) phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1] korišten je kao domaćin konstruiranim vektorima u koje su metodama restrikcije i ligacije ugrađeni odgovarajući inserti.

3.1.3. Sojevi kvasca

Kvaščev soj *Saccharomces cerevisiae* (*S. cerevisiae)* AH109 (MATa, trp 1–901, leu2-3, 112, ura 3–52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2:GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3,GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3:MEL1UAS-MEL1TATA-LacZ) (Clontech, SAD) korišten je kao domaćin *prey* i *bait* vektora za ispitivanje proteinskih interakcija između dva proteina sustavom dvaju hibrida kvasca i X-alpha-galaktozidaznim testom (opisano u 3.5, 3.6.1. i 3.6.2.). Kvaščev soj *S. cerevisiae* Y187 (MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met–, gal80Δ, MEL1, URA3: GAL1UAS -GAL1TATA-lacZ) korišten je kao domaćin za ispitivanje proteinskih interakcija praćenjem beta galaktozidazne aktivnosti (opisano u 3.6.3.).

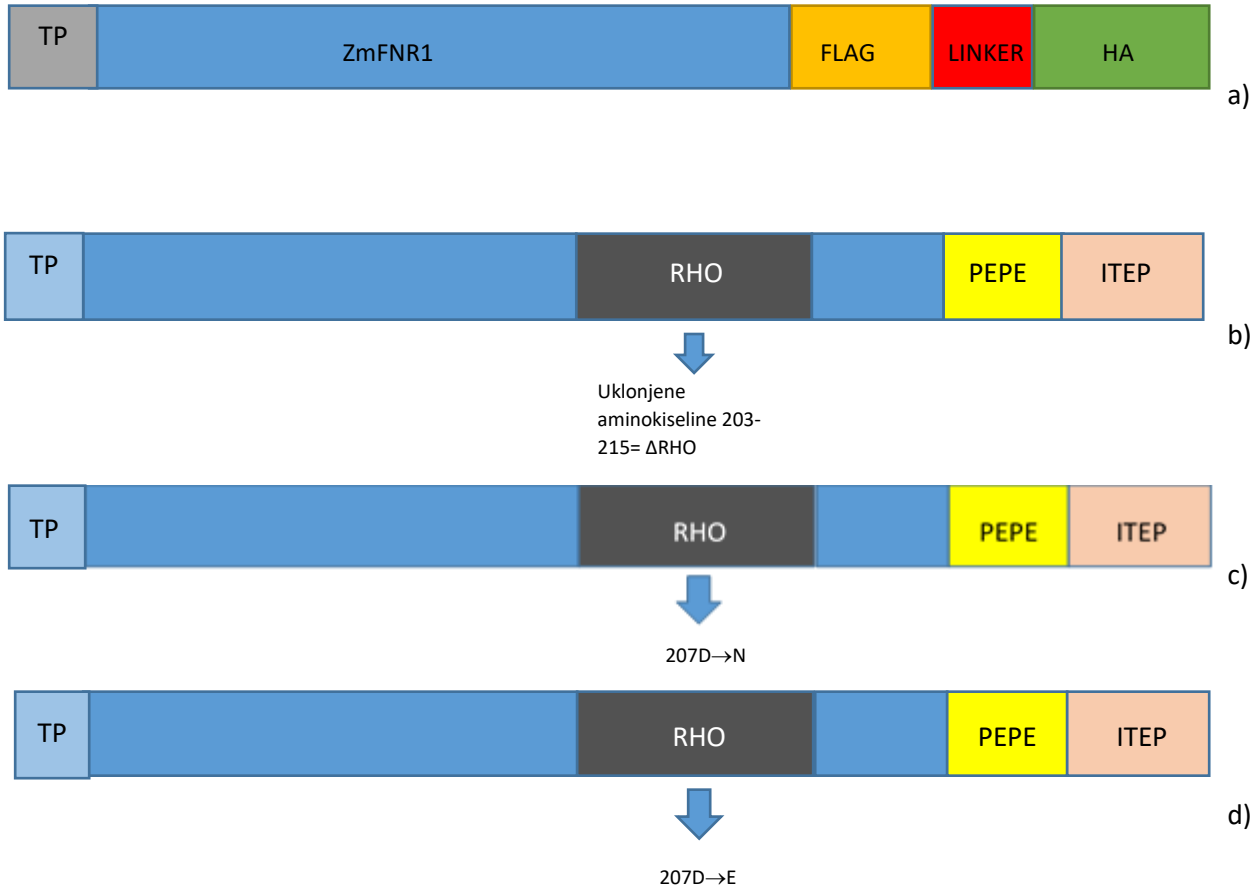
3.1.4. Biljni materijal

Biljni material korišten u ovim istraživanjima su biljke vrste *A. thaliana* (L.) Heynh., ekotip Columbia (Col-0) (WT) te sljedeće mutantne linije:

- ZmFNR1FLAGHA (linija koja ne eksprimira protein TROL i sadrži FNR1 iz kukuruza)
- ΔRHO (linija u kojoj je uklonjeno 13 aminokiselina u domeni RHO proteina TROL)
- D2O7E (linija u kojoj je aspartat 207 u domeni RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom)
- D207N (linija u kojoj je aspartat 207 u domeni RHO zamijenjen asparaginom)
- ZmFNR1WT (linija ZmFNR1FLAGHA križana s WT)
- ZmFNR1D207E (linija ZmFNR1FLAGHA križana s linijom D207E)
- ZmFNR1D207N (linija ZmFNR1FLAGHA križana s linijom D207N)
- ZmFNR1ΔRHO (linija ZmFNR1FLAGHA križana s linijom ΔRHO)
- *trol* (linija koja ne eksprimira protein TROL)

- TROL OX (linija s pojačanom ekspresijom proteina TROL) (86)

Za potrebe istraživanja interakcija proteina FNR i TROL te ispitivanje važnosti domene RHO proteina TROL u transmembranskoj signalizaciji, korištene su mutantne linije biljke *A. thaliana* s obzirom na promjene u proteinu TROL. U *trol* liniju koja ne eksprimira TROL protein je ugrađena TROL cDNA sa izmijenjenom jednom aminokiselinom u RHO domeni, aspartat u glutaminsku kiselinu (D207E) i aspartat u asparagin (D207N) te uklonjenih 13 aminokiselina u rodanaznoj domeni (ΔRHO), a sve pod kontrolom 35S-promotora (86). Te mutantne linije križane su sa biljkama koje ne eksprimiraju protein TROL, a sadrže FNR1 iz kukuruza označen sa FLAG i HA biljezima (linija ZmFNR1FLAGHA) (89) (Slika 9). U eksperimentima praćenja oslobađanja superoksidnog radikala elektronskom paramagnetskom rezonancijom (EPR) je korištena linija koja pojačano eksprimira protein TROL (TROL OX) (86).



Slika 9. Shematski prikaz a) ZmFNR sa dodanim biljezima FLAG i HA i dodanim linkerom; b) ΔRHO mutant proteina TROL s uklonjenih 13 aminokiselina RHO domene; c) TROL mutanta D207N sa zamijenjenom aminokiselinom aspartatom 207 u asparagin 207; d) TROL mutanta D207E sa zamijenjenom aminokiselinom aspartatom 207 u glutaminsku kiselinu 207; sve mutante sadrže označene domene PEPE i ITEP (TP=tranzitni peptid).

3.2. Antibiotici

Antibiotici korišteni u ovim istraživanjima su:

• ampicilin (radna koncentracija 100 µg /ml; Sigma, SAD) koji sprječava sintezu stanične stijenke bakterija. Rezistenciju na ovaj antibiotik imaju bakterije koje sadrže *bla* gen koji kodira β-laktamazu.

• kloramfenikol (radna koncentracija 34 µg/ml; Sigma, SAD) inhibira translaciju na 50S ribosomalnoj podjedinici, a rezistentne bakterije sadrže *cat* gen koji kodira kloramfenikol acetiltrasnferazu koja ga inaktivira.

• kanamicin (radna koncetracija 30 µg/ml; Sigma, SAD) utječe na sintezu proteina vezanjem za 30S ribosomalnu podjedinicu, a inaktivira ga neomicin fosfotransferaza kodirana genom *npt*II.

Navedeni antibiotici korišteni su za uzgoj transformiranih bakterija u odgovarajućim medijima za rast. Ampicilin je korišten za uzgoj transformiranih bakterija vektorima pGADT7 i pADGAL4, kloramfenikol za transformante sa pBDGAL4 vektorom, a kanamicin za uzgoj transformanti sa pK7WG2.0 vektorom.

3.3. Mediji za uzgoj kvasaca i bakterija

Mediji za uzgoj bakterija sterilizirani su autoklaviranjem na 120 °C 20 minuta.

• YEB medij: 0,1% (w/v) kvaščeva ekstrakta, 0,5% (w/v) glukoze, 0,5% (w/v) goveđeg ekstrakta, 0,1% (w/v) bakto-peptona, 1,5% (w/v) agar, 2mM $MgSO_4$ nakon autoklaviranja- pH 7.4.

• LB medij: 1% (w/v) bakto-pepton, 0,5% (w/v) kvaščeva ekstrakta, 1% (w/v)

NaCl, 1,5% (w/v) agar-pH 7.0.

• SOC medij: 2% (w/v) bakto-pepton, 0,5% (w/v) kvaščeva ekstrakta, 10mM NaCl, 3,5 mM KCl, 10mM $MgCl_2$, nakon autoklaviranja dodano 20 mM sterilne glukoze- pH 7.0.

Mediji za uzgoj kvasaca sterilizirani su autoklaviranjem 20 minuta na 120 °C, a u ovim istraživanjima korišteni su:

• YPD medij[kvaščev ekstrakt 4g (w/v), pepton 8g (w/v), glukoza 8g (w/v), voda do 400 ml i 6,67 g (w/v) agara] korišten je za uzgoj kvasaca.

• Synthetic complete drop out (SC-drop out) medij [glukoza 12g (w/v), Yeast nitrogen base without aminoacids 4g (w/v), Synthetic complete drop out mix (-Leu, -Trp-His / -Leu, -His, -Trp, -Ade) 0,5g (w/v), 10 g agara,voda do 600 ml, pH 5,6] korišten je za selekciju tranformiranih kvasaca.

• *Plate mixture*: sterilni PEG 4000 45 ml, 1M LiOAc 5 ml, 1M Tris-Cl (pH 7.5) 0,5 ml, 0,5 M EDTA 0,1 ml.

3.4. Transformacija i priprema bakterija

Priprema kemijski kompetentnih DH5α bakterijskih stanica:

• u 100 µl glicerinske kulture stanica dodano je 3 ml LB medija i inkubirano na 37 °C i 250 rpm preko noći. Nakon toga kultura je razrijeđena u 30 ml LB medija i praćen je rast dok OD_{623} nije dostigao 0,6. Zatim su stanice istaložene na 3000 × g 5 minuta na 4 °C. Pelet je resuspendiran u 15 ml ledeno hladnog 50 mM $CaCl_2$ i držan 30 minuta na ledu. Zatim su stanice ponovno istaložene centrifugiranjem na 3000 × g 5 minuta na 4 °C i resuspendirane u 3 ml ledeno hladne otopine 100 mM $CaCl_2$.

Transformacija kemijski kompetentnih DH5α bakterijskih stanica:

• oko 50 µl kemijski kompetentnih stanica, uzetih sa -80 °C, stavljene su 20 minuta na led, nakon toga je dodana DNA (1-5 µl) i inkubirano je 20 minuta na ledu. Zatim je uzorak inkubiran na 42 °C 30-60 sekundi, opet vraćeno na led 2 minute, dodan je 1 ml SOC medija i ponovna inkubacija na 37 °C 45 minuta. Nakon toga se uzorak u željenim volumenima nanosi na LB ploče za selekciju.

DH5α bakterijske stanice transformirane su pBDGAL4 vektorima koji sadrže regiju ITEP (I429-P466); pBDITEP, regiju IA2 (M263-S444); pBDIA2 proteina Tic62 koja je korištena kao pozitivna kontrola te regije TROL-a koje ne sudjeluju u TROL-FNR interakciji 220 (N180-V220); pBD220 i PEPE (A379-A419); pBDPEPE te sa pADGAL4-2.1 vektorom koji sadrži

FNR1 iz graška; pADPsFNR1. Uzgojene su preko noći na selektivnim pločama sa kloramfenikolom (pBDITEP, pBDIA2, pBD220, pBDPEPE) i ampicilinom (pADPsFNR1) te nakon toga u tekućem LB mediju sa odgovarajućim antibiotikom. Zatim je napravljena izolacija plazmidne DNA prema uputama proizvođača (Promega, SAD). Uzorci su poslani na sekvenciranje kojim su potvrđene pravilne ugradnje inserta u vektore. Nakon toga je slijedila transformacija kvasaca .

3.5. Transformacija kvasaca

Kvasci su uzgojeni preko noći na 30˚C u YPD mediju. Za svaku transformaciju centrifugiran je 1 ml medija sa stanicama, ostavljeno je 50-100 µl medija u mikroepruveti za resuspenziju, a ostatak je dekantiran. U resuspenziju je dodano 2 µl 10 mg/ml DNA lososove sperme. Zatim je dodan 1 µg plazmida i 0.5 ml *Plate mixture* otopine, snažno je protreseno i na to dodano 50 µl 1M DTT-a i ponovno protreseno. Inkubirano je na sobnoj temperaturi 6-8 sati. Nakon toga su stanice inkubirane 10 minuta na 42 °C te nanesene na SC Drop out ploče za selekciju (3.3.).

Kvasci su transformirani vektorima pBDITEP, pBDIA2, pBD220, pBDPEPE, pADPsFNR1 (86) i pGADZmFNR1FLAGHA u svrhu ispitivanja proteinskih interakcija i aktivnosti X-alfa i beta galaktozidaze.

3.6. Ispitivanje proteinskih interakcija

3.6.1. Sustav dvaju hibrida kvasaca (Y2H)

Sustav dvaju hibrida kvasaca (Yeast two hybrid, Y2H) temelji se na rekonstrukciji funkcionalnog transkripcijskog faktora kada dva proteina ili polipeptida ostvare interakciju. Svaki od proteina gradi hibrid sa jednim dijelom transkripcijskog faktora: ili DNA vezujućom domenom (DBD) ili aktivacijskom domenom (AD). Protein vezan za DBD naziva se mamac (*bait*), a onaj vezan za AD naziva se plijen (*prey*). Kada dođe do interakcije između plijena i mamca, domene rekonstruiraju transkripcijski faktor uzvodno od reporter gena. Transkripcija zatim dovodi do rasta stanica kvasaca na mediju za selekciju.

U okviru ovog rada kvaščev soj *S. cerevisiae* AH109 transformiran je sa plijen (*prey*) vektorima pADPsFNR1 i pGADZmFNR1FLAGHA svaki u kombinaciji sa pojedinim mamcem (*bait*) vektorom pBDITEP, pBDPEPE, pBD220 i pBDIA2. Naneseni su na medij niske selektivnosti SC-Drop out –Leu / -Trp i inkubirani na 30 °C. Nakon što su kolonije narasle, prenesene su na medij srednje selektivnosti Sc-Drop out –Leu / -Trp / -His na kojem su ponovno inkubirane. Posljednja selekcija rađena je na mediju visoke selektivnosti Sc-Drop out –Leu / -Trp / -His / -Ade. Vektor pBDIA2 koji sadrži C-terminalnu domenu proteina Tic62 (42) korišten je kao pozitivna kontrola, kao negativna kontrola korišten je prazan pBDGAL4 vektor, a korištene su i domene proteina TROL 220 i PEPE koje ne sudjeluju u interakciji s proteinom FNR. Interakcija je detektirana rastom kvasca.

3.6.2. X-alfa-galaktozidazni test

Transformirani kvaščev soj *S. cerevisiae* AH109 (2.6.1.) sadrži gen MEL1 koji kodira galaktozidazu koja hidrolizira X-alfa-GAL kromogeni supstrat pri čemu nastaje plavo obojenje. Gen MEL1 regulira GAL4 pa prilikom interakcije proteina dolazi do sinteze galaktozidaze koja razlaže supstrat i stvara plavo obojenje. Test je napravljen pomoću komercijalnog seta kemikalija X-alpha-galactosidase Assay Kit (Takara, Japan) prema uputi proizvođača. Na ploče za selekciju

naneseno je 200 µl razrijeđenog X-alfa-Gal supstrata (4 mg/ml) , ploče su ostavljene da se osuše te su nakon toga na njih nasađeni kvasci.

3.6.3. Beta galaktozidazni test

Beta galaktozidazni test je kvalitativna i kvantitativna metoda za uspredbu jačina pojedinih proteinskih interakcija. Korišten je kvaščev soj *S. cerevisiae* Y187 (transformiran istim vektorima kao u 3.6.1.) jer sadrži LacZ promotor koji se aktivira kod proteinskih interakcija i dolazi do sinteze beta galaktozidaze koja hidrolizira o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozu u o-nitrofenol i galaktozu. To dovodi do pojave žutog obojenja koje maksimalno apsorbira na 420 nm i može se kvantificirati spektrofotometrom. Test je rađen pomoću komercijalnog seta kemikalija Yeast β-galactosidase kit prema uputi proizvođača (Thermo Fischer, SAD). U mikroepruvete je dodano 50 µl pufera iz komercijalnog seta kemikalija za svaku testiranu koloniju. Sterilnom čačkalicom dio kolonije je prenesen u mikroepruvetu s puferom. Mikroepruveta je lagano protresena kako bi se stvorila homogena otopina. U otopinu je zatim dodano 250 µl 2x galaktozidaznog pufera i započelo je mjerenje vremena. Uzorci su inkubirani na 37 °C do trenutka pojave žutog obojenja kad je dodana otopina za zaustavljanje rekacije i zaustavljeno mjerenje vremena. Mikroepruvete su centrifugirane na 13 000 × g 30 sekundi te je mjerena apsorbancija supernatanta na 420 nm, a zatim je rađen izračun.

3.7 Lančana reakcija polimeraze (PCR)

3.7.1. Početnice i DNA standard

Lančane reakcije polimerazom rađene su u uređaju T100 Thermal Cycler Biorad (Biorad, Engleska) za umnožavanje ZmFNR1FLAGHA iz pK7WG2.0 početnicama ZmY2HF i ZmY2HR (Tablica 1) dok je na uređaju Thermo Scientific Piko Thermal Cycler (Thermo Fischer Scientific, SAD) rađena lančana reakcija polimerazom kao provjera križnaca te umnažanje gena TROL i ZmFNR1FLAGHA.

Kao DNA standard korišten je *Gene Ruler DNA ladder mix* (Fermentas, SAD) sa rasponom od 100 do 10000 baznih parova.

Tablica 1. Korištene početnice

Početnice za ugradnju inserta i provjeru križanja	
ZmY2HF	5’ AATTGAATTCGCCACCGTCATGGCC 3’
ZmY2HR	5’ CTCCTAGGATCCGTAGACCTCCAC 3’
Početnice za provjeru križanja	
TROL_internalF	5’ AACGGTGAAGACAAGCCTG 3’
TROL_GWAY_R	5’ GGGCTGCGATGGCATCG 3’
TROL_GWAY_F	5'CACCATGGAAGCTCTGAAAACCGCA 3'
Početnice za određivanje primarnog slijeda DNA	
T7 PROMOTOR	5’ TAATACGACTCACTATAGGG 3’
ITEP Eco RI	5’ GGAATTCATCACAGAACCACCGAAAC 3’
ITEP Sal I	5’ ACGCGTCGACTCAGGGCTGCGATGGCAT 3’
220 EcoRIF	5’GGAATTCAACGGTGAAGACAAGCCTGGTT 3’
ZmFNR1_EcoR	5’ ATTCTTAAGTTAAGCAGCAGCGTAATCTG 3’
ZmFNR1_BamF	5’ AATGGATCCATGGCCACCGTCATGGCC 3’
35S_F	5’ CTGACGTAAGGGATGACGCA 3’
35S_R	5’AACTTGTGATATCACTAGTGC 3’

ZmFNR1FLAGHA u vektoru pK7WG2.0 umnožen je metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) pomoću početnica ZmY2HF i ZmY2HR (Tablica 1, 2 i 3). Korištena je Taq DNA polimeraza (Taq DNA Polymerase from *Thermus aquaticus*; Sigma Aldrich, SAD) u 10x PCR puferu koji sadrži $MgCl_2$ (Sigma Aldrich, SAD).

Tablica 2. Lančana reakcija polimerazom; umnožavanje ZmFNR1FLAGHA

	Radna koncentracija
10x PCR pufer	1x
10 mM dNTP	200 µM
ZmY2HF ZmY2HR	0,5 µM 0,5 µM
DNA	1-5 ng
Taq polimeraza	0,2 U/µl
Ukupno	25 µl

Tablica 3. Ciklusi umnažanja ZmFNR1FLAGHA

KORACI	TEMPERATURA	VRIJEME	BROJ CIKLUSA
Početna denaturacija	94˚C	5 minuta	1
Denaturacija Sparivanje početnica Produljivanje DNA lanaca	94˚C 61˚C 72˚C	1 minuta 1 minuta 1 minuta 20 sekundi	30
Završno produljivanje	72˚C	5 minuta	1
	4˚C	beskonačno	

Za provjeru uspješnosti ugradnje inserta ZmFNR1 u vektor pGADT7 rađen je *Colony* PCR s početnicama ZmY2HF i ZmY2HR na transformantama bakterijskog soja DH5α. Individualne transformante bakterijskog soja DH5α dodane su direktno u PCR reakcijsku smjesu (Tablica 4).

Tablica 4. Colony PCR

	Radna koncentracija
10x PCR pufer	1x
10 mM dNTP	200 µM
ZmY2HF	0,5 µl
ZmY2HR	0,5 µl
DNA	2 µl
Taq polimeraza	0,2 U/µl
Ukupno:	25 µl

3.7.2. Lančana reakcija polimeraze *Phire Plant* metodom

Phire Plant lančana reakcija polimeraze je rađena korištenjem komercijalnog seta kemikalija *Phire Plant Direct PCR* Kit (Thermo Fischer Scientific, SAD), prema uputama prozvođača, a temelji se na umnažanju bez prethodne izolacije DNA. Manji komadić lista zgnječen je i inkubiran u puferu koji se onda direktno koristi u reakcijskoj smjesi. U reakciju od konačnih 20 µl volumena dodano je 0,5 µM konačne koncentracije početnica i 2x PCR pufera, 0,4 µl *Phire Hot Start* II polimeraze i 5 µl pufera koji sadrži lisni uzorak. Ciklusi su prikazani u Tablici 5, a protokol u Tablici 6. Ova metoda korištena je u selekciji križanaca.

Početnice korištene za provjeru TROL-a su TROL_GWAY_R, TROL_G_WAY_F i TROL internal F, a za provjeru ZmFNR1 su Y2HR i Y2HF.

Tablica 5. Ciklusi lančane reakcije polimerazom (prema *Phire Plant Direct PCR* Kit)

KORACI	TEMPERATURA	VRIJEME	BROJ CIKLUSA
Početna denaturacija	98˚C	5 minuta	1
Denaturacija Sparivanje početnica Produljivanje DNA lanaca	98˚C 62˚C 72˚C	5 sekundi 5 sekundi 20 sekundi	40
Završno produljivanje	72˚C	1 minuta	1
	4˚C	beskonačno	

Tablica 6. Protokol za Phire Plant PCR

	Radna koncentracija
2x Phire Plant pufer	1x
Početnica 1	0,5 µM
Početnica 2	0,5 µM
Phire Hot Start polimeraza	0,4 µl
DNA	1 µl
ukupno	20 µl

3.8. Restrikcijska razgradnja

Restrikcijska razgradnja vektora pGADT7 i inserta ZmFNR1 za ugradnju i provjeru ugradnje rađena je pomoću visoko učinkovitih enzima (high fidelity, HF) *Eco*RI HF i *Bam*HI HF (New England Biolabs, Engleska) prema preporučenim jedinicama u *Cut Smart* puferu (New England Biolabs, Engleska). Reakcija je postavljena na 36˚C preko noći (Tablica 7 i 8).

Tablica 7. Restrikcijska razgradnja vektora pGADT7.0

vektor	5 µl
*Bam*HI HF	0,75 µl
*Eco*RI HF	0,75 µl
Cut Smart pufer	1,5 µl
H_2O	7 µl
ukupno	15 µl

Tablica 8. Restrikcijska razgradnja ZmFNR1

insert	10 µl
*Bam*HI HF	0,5 µl
*Eco*RI HF	0,5 µl
Cut Smart pufer	1,5 µl
H_2O	2,5 µl
ukupno	15 µl

Nakon razgradnje, uzorci su pročišćeni i razdvojeni na 1%-tnom agaroznom gelu (Slika 16) te stavljeni na ligaciju prema NEB protokolu 10 minuta na sobnoj temperaturi (Tablica 9).

3.9. Ligacija

Povezivanje odgovarajuće pocijepanog vektora i inserta pomoću enzima T4 DNA ligaze rađeno je prema uputama proizvođača (New England Biolabs, Engleska) 10 minuta na sobnoj temperaturi, uz molarni omjer vektora (mase 100 ng) i inserta 1:3 (Tablica 9). Nakon toga uslijedila je transformacija opisana pod 3.4.

Tablica 9. Ligacija PCR produkta ZmFNR1 i vektora pGADT7.0

vektor	5 µl
insert	3 µl
pufer	1,5 µl
T4 DNA ligaza	1 µl
H_2O	4,5 µl
ukupno	15 µl

3.10. Pročišćavanje DNA

Za pročišćavanje i koncentriranje DNA iz agaroznog gela korišten je komercijalni set kemikalija *Monarch DNA Gel Extraction kit* (New England Biolabs, Engleska) prema uputi proizvođača. DNA fragment izrezan je iz agaroznog gela, stavljen u mikroepruvetu te izvagan. Nakon toga je u mikroepruvetu dodano 4 volumena *Gel Dissolving pufera* te je stavljeno na inkubaciju na 50 °C dok se agarozni gel nije otopio. Uzorak je zatim prebačen na kolonu i centrifugiran na 16 000 × g jednu minutu. Nakon toga je na kolonu dodano 200 µl *DNA Wash* pufera te je uzorak ponovno centrifugiran na 16 000 × g jednu minutu. Postupak je ponovljen još jednom nakon čega je kolona prebačena u čistu mikroepruvetu. U sljedećem koraku je na kolonicu dodano 10 µl *Nuclease free water* (Promega, SAD) te je ponovnim centrifugiranjem eluirana DNA.

3.11. Određivanje primarnog slijeda DNA

Određivanje primarnog slijeda DNA uzoraka rađeno je na uređaju ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Thermo Fischer Scientific, SAD). Ukupan volumen reakcijske smjese bio je 15 µl, od čega PCR produkta 50-500 ng, a početnica 1 µl koncentracije 3,2 pmol/µl.

3.12. Križanje biljaka

Križanje biljaka *A. thaliana* rađeno je pod lupom povećanja 20 puta pomoću fine pincete koja se sterilizira 96% etanolom između promjene biljne linije. Važno je odrediti ženskog i muškog roditelja, a proces možemo podijeliti u nekoliko koraka:

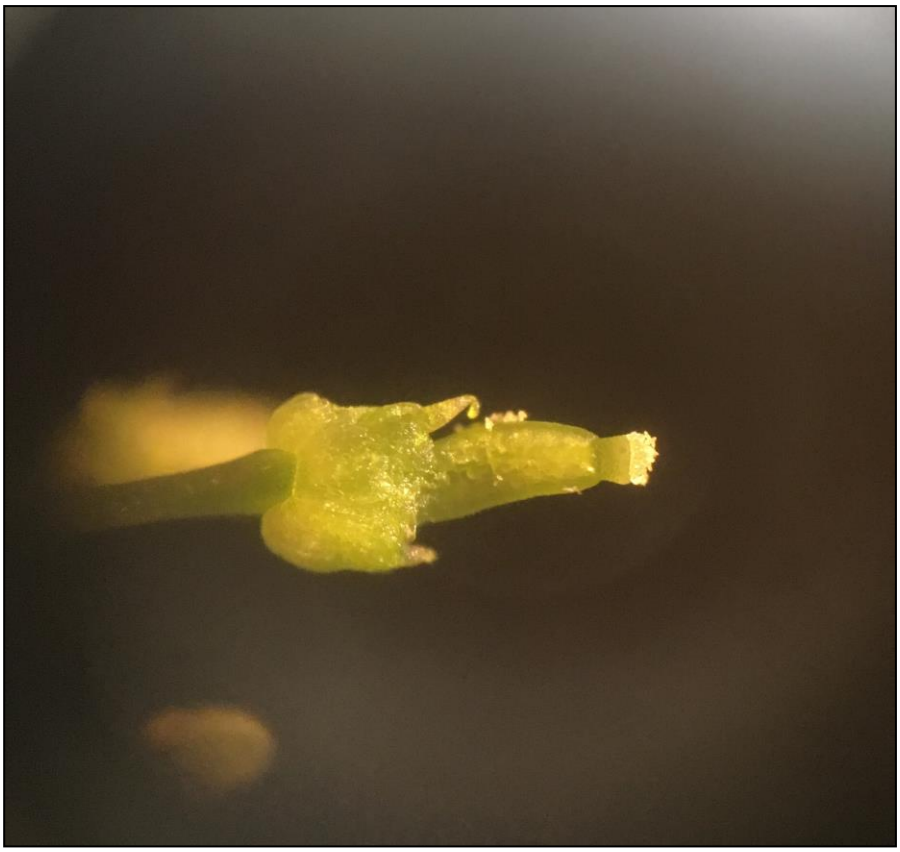
- Idealan ženski roditelj (ZmFNR1FLAGHA) je ona biljka koja je formirala pupove koji su maksimalne veličine, ali bez bijelog vrha, odnosno prije početka otvaranja pupova. S takve biljke su uklonjene su sve postojeće komuščice sa sjemenkama, otvoreni i poluotvoreni cvjetovi, pupovi s bijelim vrhom te jako mali pupovi tako da je na kraju ostalo samo 3-5 pupova odgovarajuće veličine (Slika 10).

Slika 10. Pupovi vrste *A. thaliana* idealne veličine za križanje (otprilike 1 mm dugački) s prethodno uklonjenim neodgovarajućim pupovima.

- Zatim su uklonjene sve latice, lapovi, svi zatvoreni prašnici u pupu i pupovi koji su sadržavali otvorene prašnike. U pravilu pup sadrži šest prašnika, no postoje pupovi kod kojih nalazimo četiri ili pet prašnika. Nakon postupka uklanjanja ostao je samo tučak (Slika 11).

Slika 11. Pupovi vrste *A. thaliana* nakon uklanjanja latica, lapova i prašnika.

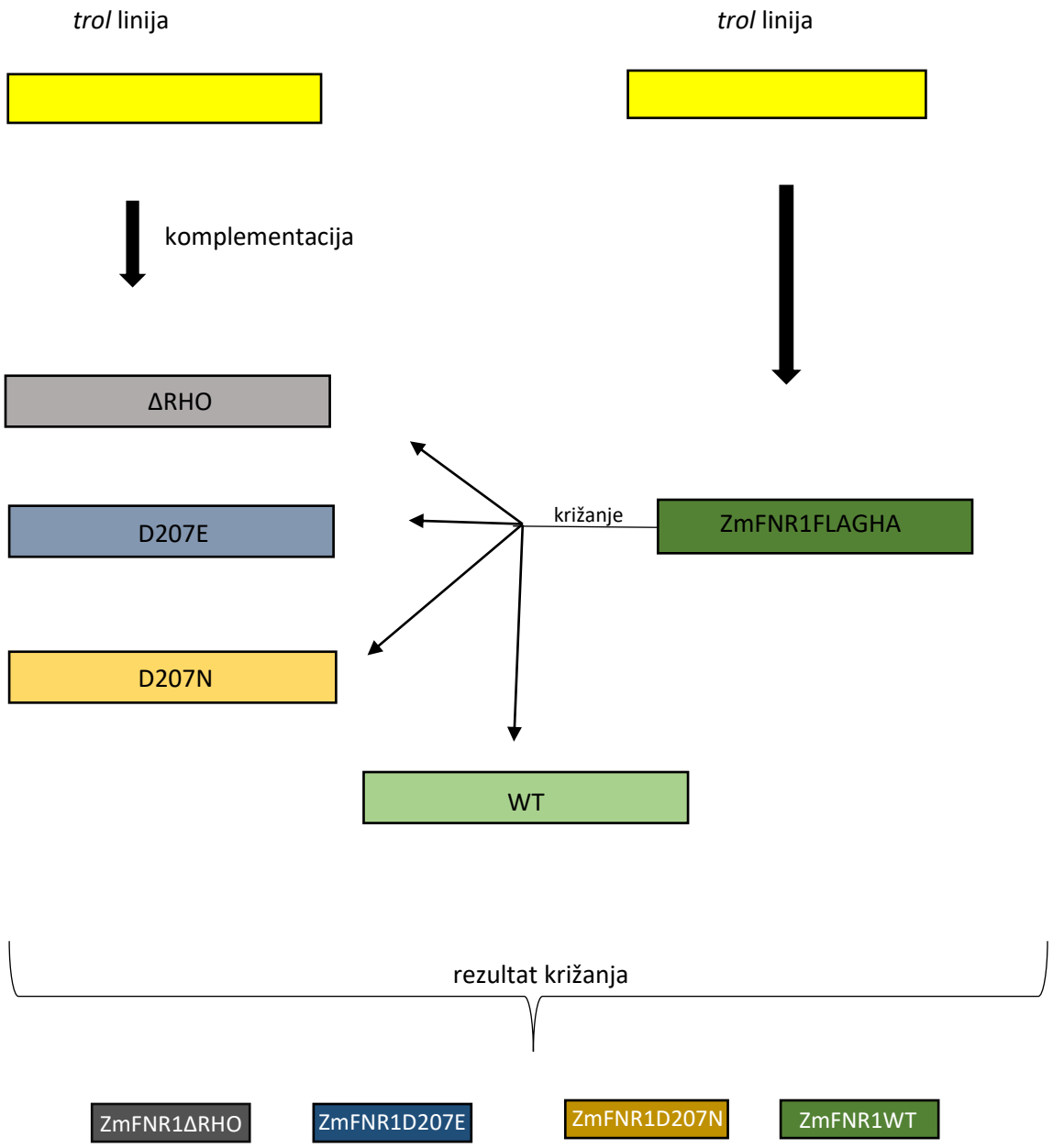
- Prašnici otvorenog cvijeta s muškog roditelja (WT, D207N, D207E, ΔRHO), koji je već počeo formirati komuščice, pod lupom su prislonjeni na tučak ženskog roditelja (Slika 12). Nakon što je na tučak prenesena pelud, pažljivo je omotan prozirnom folijom. Folija je maknuta nakon tri dana, a pup je označen končićem. Očekivati komuščice nakon 15-25 dana.



Slika 12. Tučak biljke *A. thaliana* nakon uklanjanja lapova, latica i prašnika te prenošenja peludi s muškog roditelja.

Komuščice su ostavljene da sazriju i poprime smeđu boju pa su pažljivo skupljene u mikroepruvete. Zatim je pincetom odvojena komuščica od sjemenki koje su se dalje koristile u selekciji.

Shematski prikaz križanja prikazan je na Slici 13.



Slika 13. Shematski prikaz mutantnih linija *A. thaliana*. Iz *trol* linije komplementacijom su dobivene linije koje sadrže: protein TROL sa uklonjenih 13 aminokiselina iz RHO domene (ΔRHO), protein TROL sa izmijenjenom jednom aminokiselinom u domeni RHO (D207E, D207N) te linija koja ne eksprimira TROL, ali sadrži egzogeni kukuruzni protein ZmFNR1 (ZmFNR1FLAGHA). Mutantne linije proteina TROL (ΔRHO, D207E i D207N) te divlji tip

biljke *A. thaliana* križani su sa mutantnom linijom ZmFNR1FLAGHA. Rezultat križanja su biljne linije koje eksprimiraju protein TROL sa izmijenjenom domenom RHO i sadrže, uz endogeni, i egzogeni FNR1 iz kukuruza (ZmFNR1ΔRHO, ZmFNR1D207E, ZmFNR1D207N) te linija koja sadrži neizmijenjen protein TROL i egzogeni ZmFNR1 (ZmFNR1WT).

Selekcija je rađena do četvrte generacije biljaka na kojima su zatim rađeni eksperimenti. Križanje i selekcija mutantnih linija ZmFNR1WT, ZmFNR1D207E, ZmFNR1D207N i ZmFNR1ΔRHO bila je veoma složena i zahtjevna, osobito zbog produženog životnog ciklusa križanaca pa je trebalo čekati i do tri mjeseca kako bi se dobile suhe sjemenke. Rađene su dvostruke kontrole uspješnosti križanja: Phire Plant PCR metoda i Westernska metoda otiska kojima se svaki križanac kontrolirao na dva gena, odnosno dva proteina.

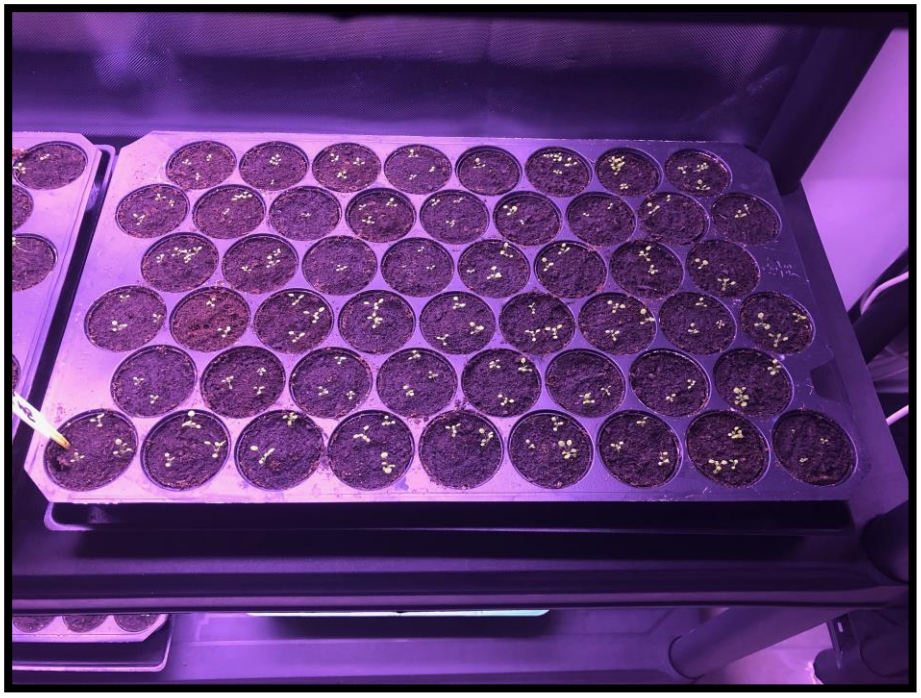
3.13. Uzgoj biljaka

Biljke su uzgajane u klima komori (Kambič, Slovenija) na supstratu na bazi treseta i ilovače (A400, Stender, Njemačka). Prosijani supstrat stavljen je u košarice koje su onda složene u plastični podložak za uzgoj biljaka (Arasystem 3600 KIT, Betatech, Belgija) (Slika 14). Zemlju zatim treba pustiti da se dobro navlaži i nakon toga posijati sjemenke.

Biljke su uzgajane na 20 °C i relativnoj vlažnosti od 60% na 8 sati tame i 16 sati svjetla. Za EPR mjerenja korištena su tri intenziteta svjetlosti kojima su biljke bile izlagane 48 sati prije izolacije kloroplasta:

- Niski intenzitet osvjetljenja (Growth Light, GL): 20 µmol fotona m^{-2} s^{-1}
- Visoki intenzitet osvjetljenja (High Light, HL): 300 µmol fotona m^{-2} s^{-1}
- Tama (Dark, D)

U svrhu mjerenja koncentracije pigmenata, biljke su uzgajane pod *Reptile Sun* lampom (JBL Gmbh & Co, Njemačka) (20 µmol fotona m^{-1} s^{-2}, 36% UV A i 8% UV B), na relativnoj vlažnosti od 60%, 8 sati tame i 16 sati svjetla.



Slika 14. Primjer uzgoja vrste *A. thaliana* koristeći sustav Arasystem.

3.14. Metode analize DNA i proteina

3.14.1. Izolacija plazmidne DNA

Sterilnim plastičnim nastavkom za automatsku pipetu jedna bakterijska kolonija sa selektivne ploče nasađena je u 3 ml LB medija sa odgovarajućim antibiotikom koji je inkubiran na 37 °C preko noći, na 240 rpm. Nakon toga je pomoću komercijalnog seta kemikalija za minipreparaciju prema uputi proizvođača (Pure Yield Plasmid Miniprep System, Promega, SAD) izolirana plazmidna DNA. U mikroepruvetu je dodana prekonoćna bakterijska kultura u koju su zatim dodani 100 µl *Cell Lysis* pufer i 350 µl *Neutralization solution*. Uzorci su centrifugirani na najvećoj brzini 3 minute, a zatim je lizat s plazmidnom DNA prebačen na *Pure Yield* kolonicu i ispran s 200 µl *Endotoxin Removal Wash* otopine. Kolona je u sljedećem koraku isprana otopinom *Column Wash Solution*, a DNA je eluirana dodavanjem 20 µl *Nuclease Free Water* (Promega, SAD) na kolonicu i centrifugiranjem na najvećoj brzini jednu minutu.

3.14.2. Izolacija ukupnih proteina iz biljnog tkiva

Listić vrste *A. thaliana* smrznut je u tekućem dušiku, zdrobljen do praškaste strukture i na to je dodano 30 µl Laemmli pufera (0,13 M Tris/HCl, pH 6,8; 16% (v/v) glicerol; 0,59% (w/v) DTT; 4,6% (w/v) SDS) te stavljeno na inkubaciju 5 minuta na 80 °C. Nakon toga je stavljeno na centrifugiranje 10 min na 10000 × g, a za daljnja istraživanja je korišten supernatant.

3.14.3. Elektroforeza na agaroznom gelu

Agarozni gel je pripremljen otapanjem agaroze (Sigma, SAD) u 1x TAE puferu (0,7% ili 1% w/v), zatim je dodan etidij bromid (Sigma, SAD) koji služi za vizualizaciju DNA (konačna koncentracija 1 µg/ml). Elektroforeza prosječno traje 25-30 minuta pri 120 V, a gel je fotografiran pomoću G:BOX sustava (Syngene, Engleska).

3.14.4. Poliakrilamidna denaturirajuća elektroforeza

Poliakrilamidna denaturirajuća elektroforeza ili elektroforeza na SDS poliakrilamidnom gelu (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) omogućava razdvajanje proteina na temelju njihove molekulske mase djelovanjem električnog polja kroz dva gela: gel za sabijanje i gel za razdvajanje (Tablica 10). SDS denaturira proteine i neutralizira razlike u naboju. Uzorci kroz gel za sabijanje putuju pri 25 mA, a nakon što uđu u gel za razdvajanje pri 35 mA. Uz uzorke, na gel je nanesen i marker molekulskih masa *Precision plus protein dual colour prestained standard* (Biorad, SAD).

Tablica 10. Sastav gela za sabijanje i gela za razdvajanje za SDS elektroforezu

	Gel za sabijanje (5%)	Gel za razdvajanje (12%)
dH_2O	3,36 ml	1,98 ml
Akril amid (30%)	0,996 ml	2,4 ml
Tris-HCl pufer	1,5 ml 0,5 M Tris-HCl pufer pH 6,8	1,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
10% SDS (w/v)	60 µl	0,1 ml
10% APS (w/v)	60 µl	0,1 ml
Temed	25 µl	15 µl

3.14.5. Westernska metoda otiska (*Western blot*) i imunodetekcija

Nakon elektroforeze, slijedi prijenos proteina na nitroceluloznu membranu (GE Healthcare Life Sciences, SAD). Gel je složen u poseban sendvič koji omogućava prijenos proteina u puferu za transfer (10x Transfer pufer: 0,15 M glicin; 20 mM Tris) i to redom: elektropropusni plastični podložak, na njega ide spužvica namočena u pufer, tri namočena Whatmann papira, namočena nitrocelulozna membrana, na nju namočen gel, tri namočena Whatmann papira i dvije spužvice te na kraju plastični podložak. Membrana treba biti okrenuta prema katodi, a gel prema anodi. Na dno kadice za Westernsku metodu otiska je stavljen magnetić koji tijekom čitavog prijenosa lagano miješa pufer. Pufer naliti preko kasete do ruba kadice. Prijenos traje 1 h i 15 min na 200 mA.

Membrana je nakon toga isprana u otopini A (1x PBS-pufer; 1% (v/v) Tween 20; 5% (w/v) mlijeko u prahu) 3 x 10 minuta kako bismo spriječili nespecifična vezanja, a potom je inkubirana s primarnim antitijelom preko noći na klackalici na 4 °C (anti-HA, 1:1000, Roche; anti-TROL, 1:2000, Agrisera). Idući dan membrana je isprana otopinom A 3x10 minuta i inkubirana sa sekundarnim antitijelom (anti-rat-peroksidaza 1:30000 za anti-HA i anti-goat/rabbit-peroksidaza 1:50000 za anti TROL; Sigma, SAD) sat vremena na sobnoj temperaturi. Za kontrolu tilakoida su korištena primarna antitijela na tilakoidne proteine AtpB (β-podjedinica ATP sintaze; 1:2000) i na LHCII (1:2000). Zatim se membrana ispire 2 x 10 minuta otopinom B (1x PBS pufer; 1% (v/v) Tween 20) i rezultat detektira kemiluminiscencijom (ECL).

Dva ml luminola (0,025% (w/v) luminol u 0,1 M Tris puferu-pH 8.6), 0,6 µl H_20_2 i 200 µl p-hidroksikumarinske kiseline (0.11% (w/v) p-hidroksikumarinske kiseline u dimetil sulfoksidu (DMSO) pomiješano je u mikroepruveti od 2 ml. Otopina se izlije na prozirnu foliju i membrana pažljivo uroni u otopinu. Suvišak otopine uklonjen je papirom, membrana je umotana u prozirnu foliju i u tamnoj komori prislonjena na film (Agfa, Ortho CPG plus, Belgija) u kaseti oko tri minute. Nakon toga je film razvijen u razvijaču i fiksirani u fiksiru (Kodak, SAD).

3.14.6. Izolacija kloroplasta i tilakoida

Za izolaciju kloroplasta korištene su biljke stare oko 4 tjedna. Cijeli proces izolacije potrebno je raditi na 4 °C. Listovi su, zajedno sa puferom za izolaciju kloroplasta (5 mM EDTA, 20 mM Tris, 10 mM Na_2CO_3, 0,33 mM sorbitol, 0,1% BSA i 5 mM β-merkaptoetanola koji se dodaje neposredno prije izolacije), samljeveni u mikseru i propušteni kroz dva sloja gaze te dva sloja Miraclotha. Nakon toga su centrifugirani na 2000 × g 5 minuta. Supernatant je dekantiran, a pelet nježno resusprendiran pomoću kista u 1-2 ml izolacijskog pufera. Uzorci su ponovno centrifugirani pa je pelet resuspendiran u 1-2 ml pufera bez β-merkaptoetanola. Uzorak je naslojen na gradijent Percolla (GE Healthcare, SAD) (na dnu mikroepruvete 8 ml 80%-tnog Percolla u izolacijskom puferu, nadslojenog sa 13 ml 40%-tnog Percolla) i centrifugiran 10 minuta na 3000 × g u *swing-out* rotoru bez kočnice za zaustavljanje. Na granici između 40 i 80%-tnog Percolla nalazili su se cjeloviti kloroplasti, a pri vrhu gradijenta oštećeni. Na dno mikroepruvete prilikom centrifugiranja pao je škrob, ostaci zemlje od uzgoja i ostalo smeće. Pipetom s odrezanim vrhom pažljivo su skupljeni cjeloviti kloroplasti te su razrijeđeni sa 3-4 volumena pufera za izolaciju. Uzorci su ponovno centrifugirani 5 minuta na 2000 × g pa je talog resuspendiran u 500 µl pufera za izolaciju. Zatim je izmjerena koncentracija klorofila.

Za izolaciju tilakoida je na kloroplastni talog (oko 50 µg kloroplasta) dodano 300 µl TMK pufera (10 mM Tris; 10 mM $MgCl_2$; 20 mM KCl, pH 6,8) te su kloroplasti lizirani na ledu 5 minuta. Zatim su centrifugirani 10 minuta na 10000 × g, uklonjen je supernatant, a talog resuspendiran i dva puta ispran u 200 µl TMK pufera.

3.14.7. Određivanje koncentracije klorofila

Koncentracija klorofila određena je po Arnonu (87) tako da je u 2 ml ledeno hladnog 80%-tnog acetona dodano 20 µl uzorka izolata kloroplasta i inkubirano je na ledu 5 minuta. Nakon toga je uzorak filtriran te mu je na spektrofotometru izmjeren OD_{652}. Preko formule OD_{652} x razrjeđenje/ 34,5 dobivena je koncentracija klorofila mg/ml.

$$\frac{OD652\ x\ razrjeđenje}{34.5} = mg\ chl/ml$$

3.14.8. Priprema biljnih ekstrakata i određivanje fotosintetskih pigmenata spektrofotometrijom

Za određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata po Wellburnu (88) korišteni su svježi listovi 3-4 tjedna starih biljaka. Listovi su izvagani te, uz dodatak $CaCO_3$, homogenirani u hladnom 80%-tnom acetonu. Homogenat je zatim prebačen u mikroepruvetu i centrifugiran na 5000 × g, 4 °C, 10 minuta. Supernatant je prebačen u epruvetu i stavljen na led, a na preostali talog dodano je oko 1 ml acetona, te je uzorak ponovno centrifugiran. Taj supernatant je također spremljen u epruvetu na ledu. Apsorbancija ekstrakta izmjerena je na 470 nm, 646 nm te 663 nm. Koncentracija fotosintetskih pigmenata izračunata je prema jednadžbama:

$$c_a = 12{,}21\ A_{663} - 2{,}81\ A_{646}\ \ [\mu g\ mL^{-1}]$$
$$c_b = 20{,}13\ A_{646} - 5{,}03\ A_{663}\ [\mu g\ mL^{-1}]$$

$$c_c = \frac{(1000\ A_{470} - 3{,}27\ c_a - 104\ c_b)}{198}$$

Koncentracije pigmenata u ekstraktima treba uvrstiti u sljedeću formulu da bi rezultate izrazili u µg po mg svježe tvari:

$$c = \frac{c_{pig} \times V_{e.p.}}{m} \; [\mu g \; mg^{-1}_{su.t.}]$$

c_a – masena koncentracija klorofila *a* [µg/ml]

c_b – masena koncentracija klorofila *b* [µg/ml]

c_c – masena koncentracija karotenoida [µg/ml]

c_{pig} – količina pojedinog pigmenta [µg/ml]

A_{470} – absorbancija pri 470 nm

A_{646} – absorbancija pri 646 nm

A_{663} – absorbancija pri 663 nm

m – masa svježeg tkiva [mg]

$V_{e.p.}$ – volumen ekstrakcijskog pufera

3.15. Elektronska i svjetlosna mikroskopija

3.15.1. Određivanje ultrastrukture kloroplasta

Otopine za pripremu biljnih uzoraka:

- natrijev kakodilat 0.2 M [4,28 g $Na(CH_3)_2AsO_2$ x $3H_2O$ u 100 ml destilirane vode]
- glutaraldehid 2-4% (otopljen u kakodilatnom ili fosfatnom puferu)
- 2% osmij tetroksid (1g OsO_4 u 50 ml vode)
- Spurrovo sredstvo (komponente smole: 40g ERL 4221-D; 32g DER 736; 104g NSA; 1,6 g S-1)
- uranil-acetat 1-4% (vodena otopina)
- olovni citrat [1,33g $Pb(NO_3)_2$; 1,76g $Na_3(C_6H_5O_7)$ x $2H_2O$ otopiti u 30 ml redestilirane vode]

Koraci:

1. Fiksacija

   Biljno tkivo je u kapljici hladnog glutaraldehida izrezano žiletom na sitne komadiće te je stavljeno u bočicu sa hladnim glutaraldehidom i inkubirano 1 sat na ledu. Zatim su uzorci dva puta isprani kakodilatnim puferom i inkubirani na ledu 10 minuta. Kakodilatni pufer je zatim zamijenjen osmijevim tetroksidom i uzorci su ponovno inkubirani na ledu 1 sat. Nakon toga su dva puta isprani vodom, a zatim je uslijedila inkubacija na sobnoj temperaturi 10 minuta.

2. Dehidracija

   Destilirana voda zamijenjena je 50%-tnim etanolom. Nakon toga je uzorak po 10 minuta inkubiran u 50%-tnom etanolu, zatim u 60%-tnom, 70%-tnom, 80%-tnom i 96%-tnom etanolu. U 100%-tnom etanolu uzorak može stajati nekoliko tjedana.

3. Infiltracija prijelaznim otapalima

   100%-tni etanol zamijenjen je zatim mješavinom etanola i acetona u omjeru 1:1 i uzorci su stavljeni na inkubaciju 30 minuta, a nakon toga su 30 minuta inkubirani u čistom acetonu.

4. Uklapanje

   Apsolutni aceton zamijenjen je mješavinom aceton: Spurrovo sredstvo u omjeru 1:1 (v/v) i uzorci su inkubirani 1 sat. Mješavina je zatim zamijenjena čistim Spurrovim sredstvom i uslijedila je inkubacija 4-5 sati na 40 °C uz miješanje iglicom svakih 30 min. U kalup za uklapanje stavljen je listić s brojem te je tkivo iglicom pažljivo preneseno u kalup koji je zatim nadopunjen Spurrovim sredstvom do vrha. Uzorci su polimerizirani dva dana na 65 ˚C.

5. Kontrastiranje ultratankih prereza

   Kontrastiranje je rađeno pomoću uranil-acetata i olovnog citrata. Mrežice su stavljene na kapljicu sredstva za kontrastiranje i držane 5-10 minuta, isprane laganim mlazom destilirane vode (42 °C) i osušene filter papirom.

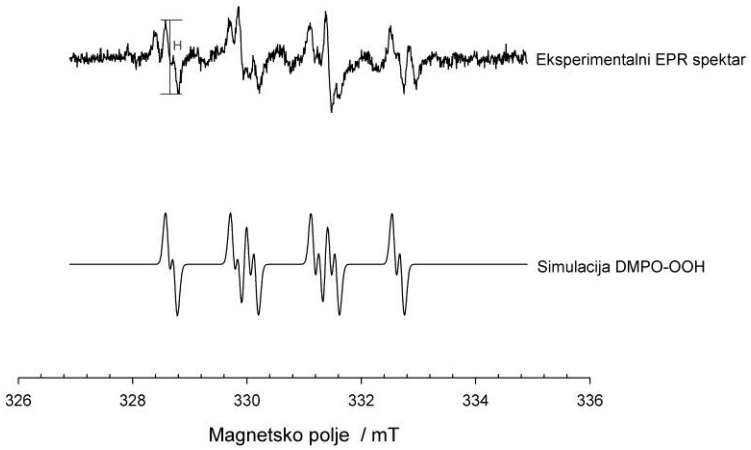
Uzorci su promatrani transmisijskim elektronskim mikroskopom Zeiss EM 10A.

3.15.2. Anatomska analiza lista poludebelim prerezom

Lisno tkivo za poludebele prereze fiksirano je prema postupku opisanom u 3.15.1., a zatim obojano otopinom 2%-tnog (w/v) toluidinskog modrila i 2%-tnog (w/v) boraksa u omjeru 1:1. Prerezi su rezani na debljinu od 500 nm, a promatrani su invertnim mikroskopom Opton Axiovert 35 (Zeiss, Njemačka) pri ukupnom povećanju od 400x.

3.16. Elektronska paramagnetska rezonancija (EPR)

Elektronska paramagnetska rezonancija je spektroskopska metoda kojom se detektiraju nespareni elektroni pomoću radijacije mikrovalova uz prisutnost vanjskog magnetskog polja (Slika 15). Korištena je u svrhu ispitivanja oslobađanja reaktivnih kisikovih radikala u cjelovitim kloroplastima. Mjerenja su rađena na *A. thaliana* divljem tipu (WT) i liniji sa pojačanom ekspresijom proteina TROL (TROL OX) kako bi pokazali utjecaj interakcije FNR-TROL na kloroplastni metabolizam biljaka koje sadrže više proteina TROL i samim time više vezanog proteina FNR. Biljke su uzgajane prema postupku opisanom u 3.13. te su izolirani cjeloviti kloroplasti prema opisanom postupku u 3.14.6. U uzorke je dodana specifična klopka za superoksidni anion (O_2^-) 5,5-dimetil-1-prolin-N-oksid (DMPO), a u pojedine uzorke je dodan i herbicid metil viologen (MV). MV u osvjetljenim kloroplastima preuzima skoro sve elektrone iz PSI, posebno od reduciranog feredoksina, kako bi formirao kationske radikale koji vrlo brzo generiraju O_2^- autooksidacijom. Mjerenja su rađena u staklenim kapilarama na X-band Varian E-109 spektrometru uz mikrovalnu snagu od 20 mV, modulacijsku amplitudu 0,1 mT, frekvenciju od 100 kHz i raspon skeniranja od 8 mT (DMPO).



Slika 15. Analiza EPR spektra nastanka DMPO-OOH spinskog adukta u kloroplastima *A. thaliana* WT linije prethodno izloženih fotosintetskom osvjetljenju od 100 μmol fotona m^{-2} s^{-1} tijekom 30 sekundi.

3.17. Statistička obrada podataka

Analiza fotosintetskih pigmenata biljnih linija rađena je u pet mjerenja pod osvjetljenjem sa UV komponentom i pet mjerenja pod osvjetljenjem bez UV komponente. Rezultati su prikazani u obliku srednjih vrijednosti s naznačenom standardnom devijacijom. Statistički značajna razlika između međusobno ispitivanih linija za svaki od pigmenata određena je korištenjem T-testa na razini značajnosti od 5%.

Oslobađanje superoksidnog radikala mjereno je u 6 replika za svaki uvjet (D, L, D+MV, L+MV) elektronskom paramagnetskom rezonancom na linijama TROL OX i WT. Rezultati su normalizirani u odnosu na WT te prikazani kao srednja vrijednost s označenom standardnom devijacijom. Statistička analiza rezultata rađena je analizom varijance ANOVA te T-testom, a TROL OX uzorci koji su se statistički značajno razlikovali od divljeg tipa označeni su zvjezdicom.

Analiza morfometrije listova rađena je u programu *Fiji* (Image J) koji, pomoću izmjerenog referentnog predmeta poznate duljine, piksele pretvara u mm^2. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 50 replika površine listova pojedine linije križanaca u mm^2 s označenom standardnom devijacijom, a statistička analiza je rađena analizom varijance ANOVA i T-testom.

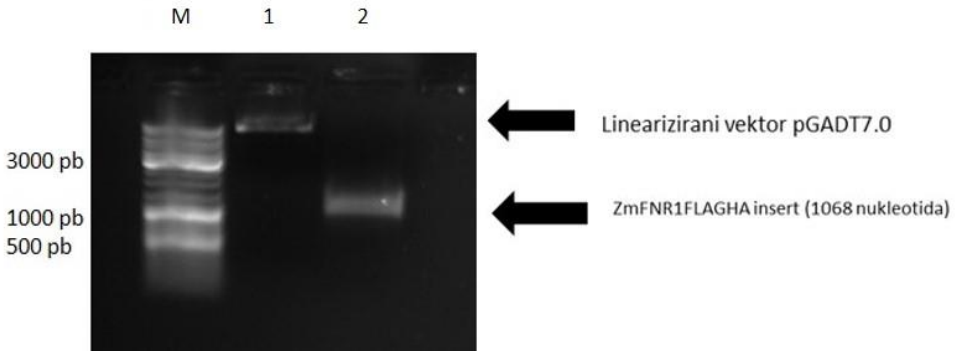
4. REZULTATI

U okviru istraživanja interakcija proteina FNR i TROL, istražene su razlike u jačini interakcija ovih proteina kod C3 i C4 biljaka. Stvaranje mutantnih linija križanjem ZmFNR1FLAGHA biljaka koje ne sadrže TROL sa mutantnim biljkama sa izmjenjenom domenom RHO proteina TROL stvorena je platforma za istraživanje proteinskih kompleksa i učinka izmijenjene domene proteina TROL na sam proces fotosinteze.

4.1. Kvalitativna i kvantitativna provjera interakcija FNR-TROL kod C3 i C4 biljaka

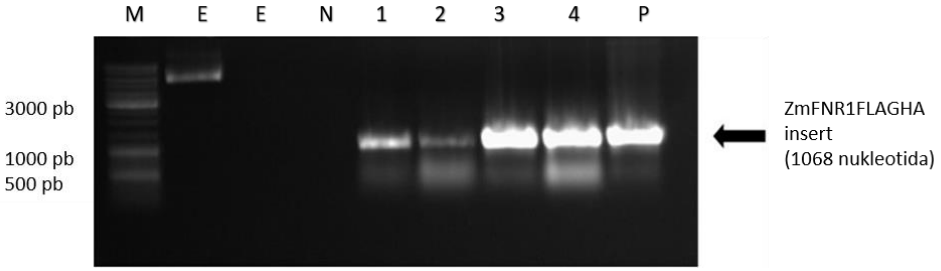
4.1.1. Konstrukcija vektora pGADZmFNR1FLAGHA

Kako bi ispitali interakciju FNR-TROL kod C3 i C4 biljaka sustavom dvaju hibrida kvasaca (4.1.3.), konstuiran je *prey* vektor pGADZmFNR1FLAGHA. ZmFNR1FLAGHA u vektoru pK7WG2.0 umnožen je metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) pomoću početnica ZmY2HF i ZmY2HR (Tablica 2 i Tablica 3). Nakon toga je rađena restrikcijska razgradnja umnoženog ZmFNR1FLAGHA i vektora pGADT7 (Tablica 7 i Tablica 8) koji su, nakon pročišćavanja iz gela (Slika 16), stavljeni na ligaciju (Tablica 9).

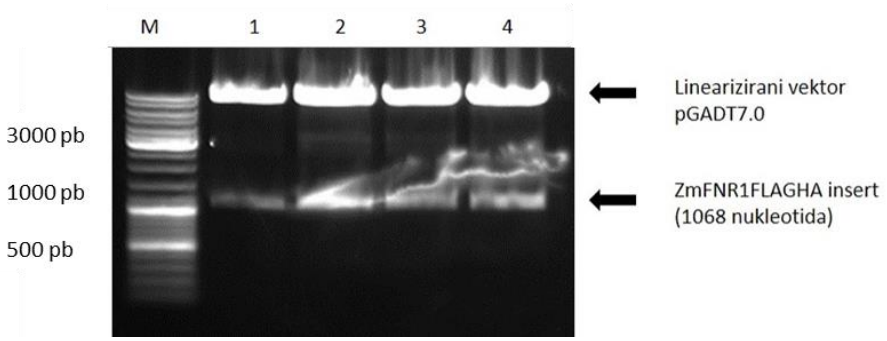


Slika 16. Prikaz DNA uzoraka na 1% agaroznom gelu. Linija 1: linearizirani vektor pGADT7 (7987 pb) nakon razgradnje restrikcijskim endonukleazama *Bam*HI HF i *Eco*RI HF; linija 2: insert ZmFNR1FLAGHA nakon razgradnje restrikcijskim endonukleazama *Bam*HI HF i *Eco*RI HF; M: Marker (*Gene Ruler DNA Ladder Mix*).

Kemijski kompetentne DH5α (2.4.) bakterijske stanice transformirane su produktom ligacije, a zatim nasađene na LB selekcijske ploče s ampicilinom. Na transformantama je zatim rađen *Colony* PCR kako bi potvrdili ugradnju inserta u vektor (Slika 17, Tablica 4). Insert je umnožen početnicama ZmY2HF i ZmY2HR korištenim u početnom umnažanju inserta (4.1.1.). Kao dodatna provjera ugradnje rađena je restrikcijska razgradnja (Slika 18).



Slika 17. Prikaz DNA uzoraka na 1% (w/v) agaroznom gelu. Linije 1-4: insert ZmFNR1FLAGHA umnožen početnicama ZmY2HF i ZmY2HR *Colony* PCR metodom; N: negativna kontrola u koju nije dodan DNA kalup; P: pozitivna kontrola ZmFNR1FLAGHA u vektoru pK7WG2.0; linije E- linije u koje nije nanesen uzorak; M: marker (*Gene Ruler DNA Ladder Mix*).



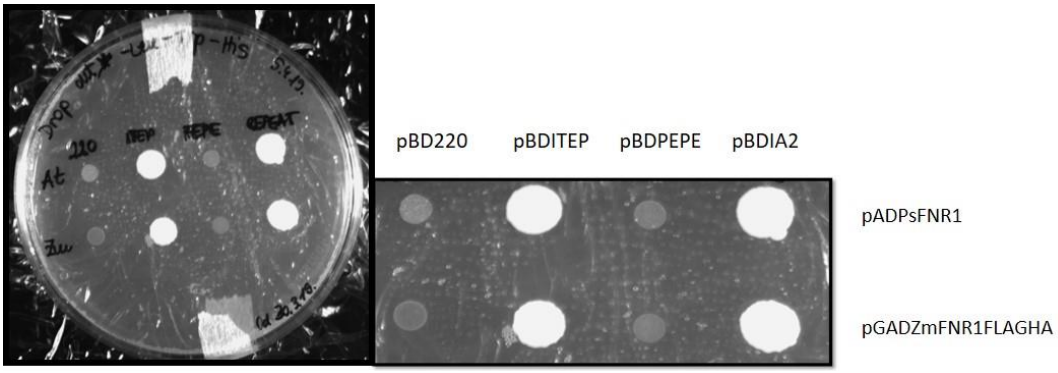
Slika 18. Prikaz DNA uzoraka na 1% (w/v) agaroznom gelu. Linije 1-4: produkti razgradnje restrikcijskim endonukleazama *Bam*HI HF i *Eco*RI HF linearizirani vektor pGADT7.0 i insert ZmFNR1FLAGHA; M: marker (*Gene Ruler DNA Ladder Mix*).

Nakon potvrđene uspješne ugradnje inserta ZmFNR1FLAGHA u vektor pGADT7, bakterijski soj DH5α transformiran je i sa pBDITEP, pBDIA2, pBDPEPE, pBD220 i pADPsFNR1, vektorima korištenim u eksperimentima ispitivanja proteinskih interakcija.

.

4.1.2. Sustav dvaju hibrida kvasaca

Sojevi kvasaca *S. cerevisiae* AH109 i Y187 transformirani su Li-O-Ac metodom (3.5). Nasađeni su na ploče niske selektivnosti SC-Drop out –Leu / -Trp. Ploče su zatim inkubirane 3-5 dana na 30 °C. Kvasci koji su narasli, odnosno kod kojih je interakcijom proteina omogućena ekspresija gena koja im je omogućila rast na selektivnim pločama, nasađeni su na ploče srednje selektivnosti SC-Drop out – Leu / -Trp / -His, a nakon toga i na ploče visoke selektivnosti Sc-Drop out –Leu / -Trp / -His /-Ade. Na svim selektivnim pločama sustav dvaju hibrida kvasca dao je jednak rezultat (Slika 19).

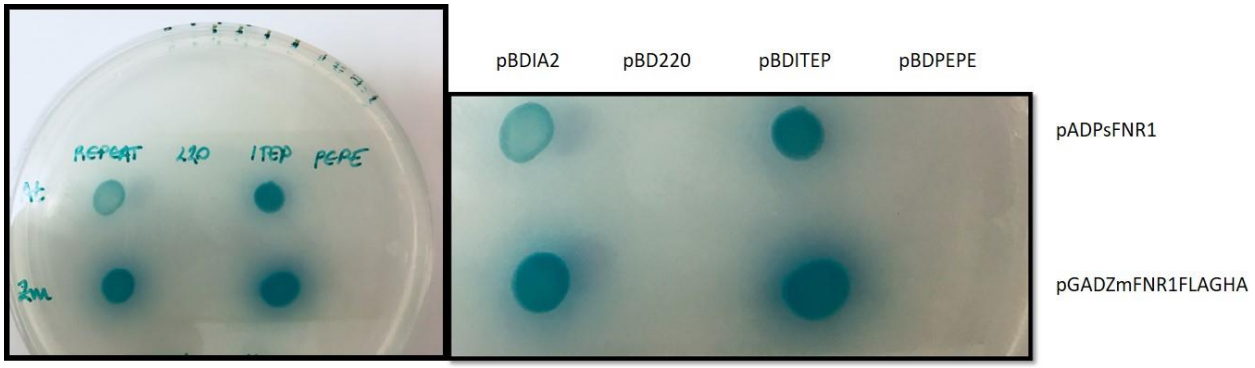


Slika 19. Provjera proteinskih interakcija sustavom dvaju hibrida kvasaca na selektivnim pločama SC-Drop out –Leu / -Trp / -His. Kvaščev soj *S. cerevisiae* AH109 transformiran je s plijen (*prey*) vektorima pADPsFNR1 i pGADZmFNR1FLAGHA, svaki u kombinaciji s pojedinim mamcem (*bait*) vektorom pBD220, pBDITEP, pBDPEPE i pBDIA2. Interakcije *bait* vektora pBDIA2 (domena proteina Tic62) i pBDITEP (domena proteina TROL) s oba *prey* vektora omogućile su rast kvasaca (na slici vidljivo kao bijele točke). Interakcije između pBD220 i pBDPEPE s pADPsFNR1 i pGADZmFNR1FLAGHA nije bilo i nema rasta kvasaca

na selektivnoj ploči (na slici vidljivo kao prozirne točke). Selektivna ploča fotografirana je pomoću G:BOX sustava (Syngene, Engleska).

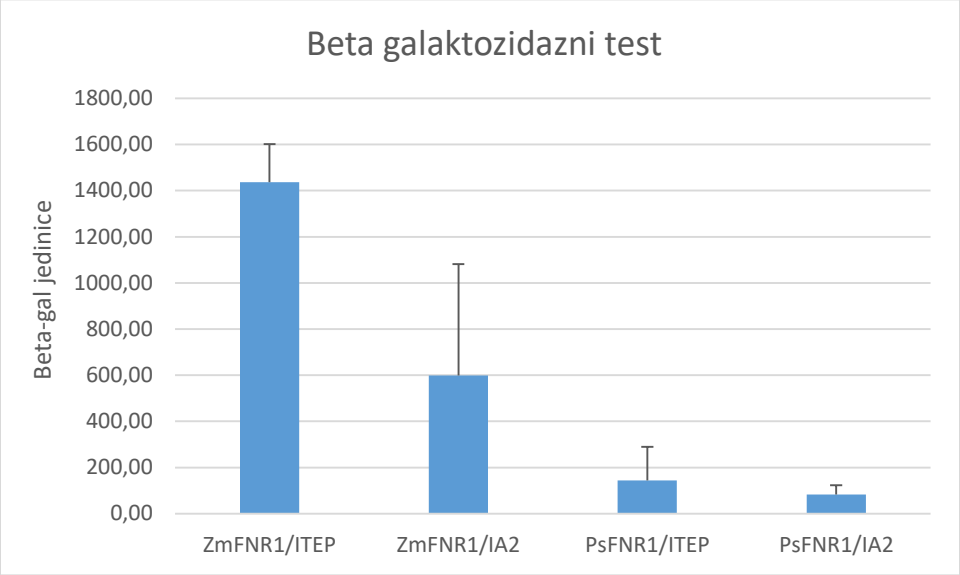
4.1.3. Kvantifikacija interakcija X-alfa-galaktozidaznim i beta galaktozidaznim testom

Dodatna provjera interakcija napravljena je semikvanititativnim X-alfa-galaktozidaznim testom (3.6.2). Test je potvrdio rezultate dobivene sustavom dvaju hibrida na pločama visoke selektivnosti SC-Drop out –Leu / -Trp / -His / -Ade s naznakama da su interakcije između pGADZmFNR1 sa pBDITEP i pBDIA2 jače od onih s pADPsFNR1 (Slika 20).



Slika 20. Provjera proteinskih interakcija X-alfa-galaktozidaznim testom na pločama visoke selektivnosti SC-Drop out –Leu / -Trp / -His / -Ade. Interakcije *prey* i *bait* vektora su omogućile rast kvasaca i razgradnju kromogenog supstrata X-Gal što je dovelo do pojave plavog obojenja kod interakcija pozitivne kontrole pBDIA2 (domena proteina Tic62) i pBDITEP (domena proteina TROL) sa oba *prey* vektora. Interakcije između negativnih kontrola pBD220 i pBDPEPE sa pADPsFNR1 i pGADZmFNR1FLAGHA nije bilo i nema rasta kvasaca niti pojave plavog obojenja na selektivnoj ploči.

Kako bi kvantificirali razlike u jačini interakcija, napravljen je beta galaktozidazni test (3.6.3) (Slika 21).



Slika 21. Određivanje jačine proteinskih interakcija beta galaktozidaznim testom. Prikazana je srednja vrijednost rezultata sa standardnom devijacijom. Između pBDITEP i pGADZmFNR1FLAGHA ostvarena gotovo 10 puta jača interakcija nego između pBDITEP i pADPsFNR1, a oko 6 puta jača između pBDIA2 i pGADZmFNR1 nego između pBDIA2 i pADPsFNR1.

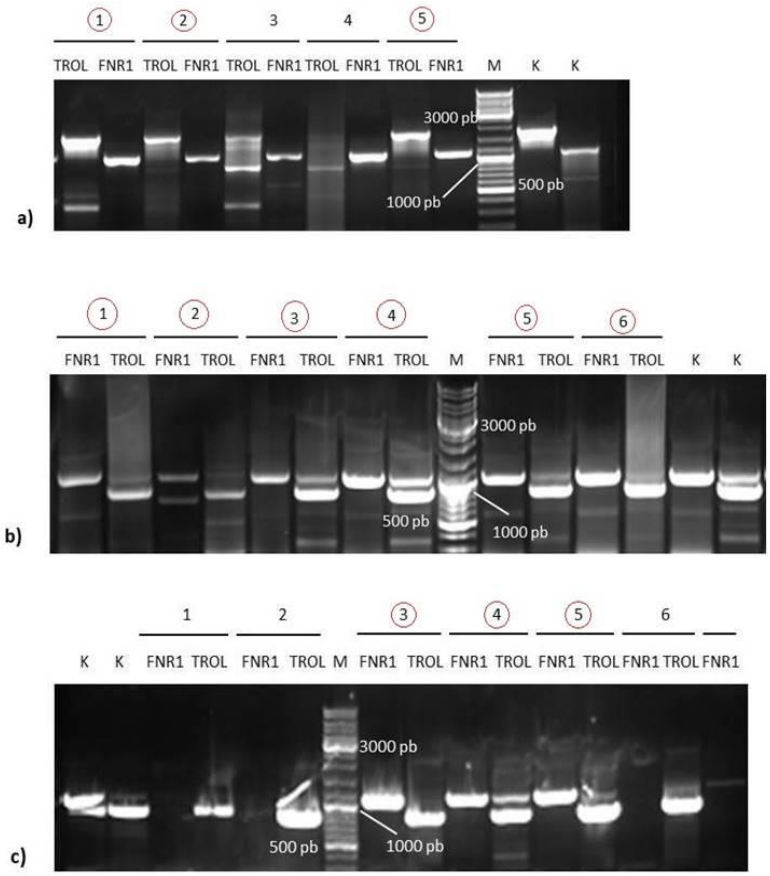
Jače interakcije s domenama proteina TROL i Tic62 ostvario je protein ZmFNR1 iz C4 biljke kukuruza u odnosu na interakcije koje s istim domenama ostvaruje protein PsFNR1 iz C3 biljke graška.

4.2. Konstrukcija biljnih mutantnih linija ZmFNR1FLAGHA koje sadrže izmijenjeni protein TROL i ZmFNR1

4.2.1. Križanje, uzgoj i selekcija mutantnih linija

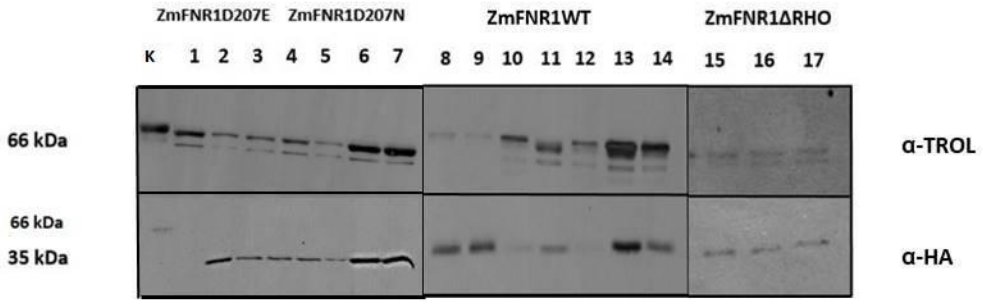
Mutantna linija ZmFNR1FLAGHA (89) koja ne sadrži protein TROL križana je sa mutantnim linijama proteina TROL: D207E, D207N i ΔRHO (86) te s divljim tipom WT. Linije su uzgojene prema postupku opisanom u 3.13. Odabrani su odgovarajući ženski roditelji linije ZmFNR1FLAGHA i muški roditelji iz linija WT, D207E, D207N i ΔRHO. Biljke su križane (3.12.), a križanci su kontrolirani *Phire Plant* lančanom reakcijom polimerazom (3.7.2.) (Slika 22, Tablica 5 i 6) te Westernskom metodom otiska.

Početnice korištene za umnažanje TROL-a su TROL_GWAY_R, TROL internal F i TROL_G_WAY_F, a za umnažanje ZmFNR1 korištene su Y2HR i Y2HF.



Slika 22. Prikaz produkata ZmFNR1 i TROL umnoženih *Phire Plant* lančanom reakcijom polimeraze na 1% (w/v) agaroznom gelu. a) 1-5: pet mutantnih biljaka ZmFNR1WT; b) 1, 2, 5, 6: četiri mutantne biljke ZmFNR1D207E; 3,4: dvije mutantne biljke ZmFNR1D207N; c) 1-6: šest mutantnih biljaka ZmFNR1ΔRHO; svaka biljka je testirana *Phire Plant* lančanom reakcijom polimeraze u kojoj je TROL umnožen početnicama TROL_GWAY_R i TROL internal F, a ZmFNR1 početnicama Y2HR i Y2HF; M: marker (*Gene Ruler DNA Ladder Mix)*; K: pozitivne kontrole. Zaokruženi uzorci su dodatno testirani Westernskom metodom otiska i imunodetekcijom.

Biljke kod kojih su uspješno umnožena oba gena *Phire Plant* lančanom reakcijom polimeraze su zatim dodatno testirane Westernskom metodom otiska i imunodetekcijom (3.14.5.), a one u kojima su detektirani proteini ZmFNR1 i TROL (Slika 23) koristile su se u daljnjoj selekciji.



Slika 23. Westernska metoda otiska i imunodetekcija proteina TROL i ZmFNR1 u izolatu ukupnih proteina mutantnih linija ZmFNR1D207E (1-4), ZmFNR1D207N (5-7), ZmFNR1WT (8-14) i ZmFNR1ΔRHO (15-17); analiza α-HA antitijelima (1:1000, Sigma; sekundarno antitijelo anti-rat-peroksidaza 1:30000, Sigma), α-TROL(1:2000, Agrisera; sekundarno antitijelo anti-goat/rabbit-peroksidaza 1:50000, Sigma). K: pozitivne kontrole: WT linija (α-TROL), TROL OX (α-HA).

4.3. Fenotipska, strukturna i ultrastrukturna analiza mutanti biljaka *A. thaliana*

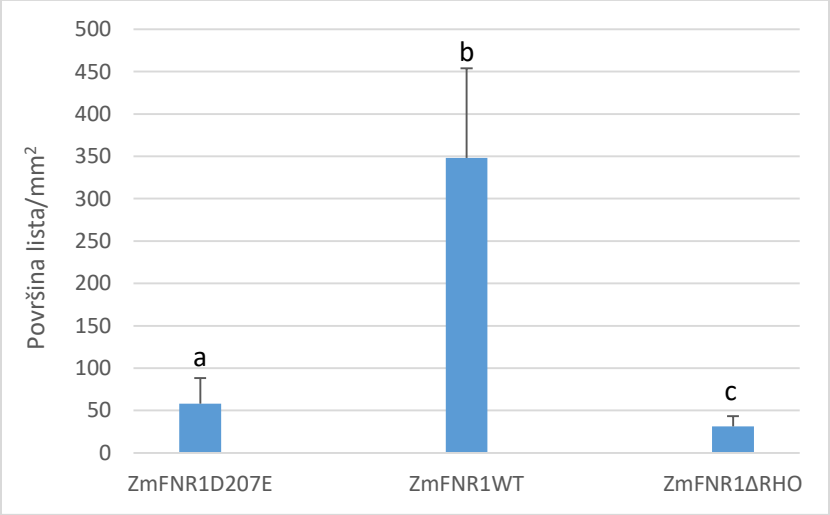
4.3.1. Fenotip mutanti biljaka *A. thaliana*

Primijećena je međusobna razlika u fenotipu mutanti koje su rasle na GL osvjetljenju (Slika 24). Mutanta ZmFNR1WT razvila je velike listove i rozete dok su kod mutanti ZmFNR1D207E i ZmFNR1D207N (nije prikazana na slici) primijećeni slabiji rast i manje rozete. Najmanje rozete formirala je mutanta ZmFNR1ΔRHO. Osim što su svi križanci imali značajno produžen životni ciklus, primijećena je razlika u početku cvjetanja koje je prvo započelo kod linije ZmFNR1WT, dok je kod linije ZmFNR1D207E, ZmFNR1D207N i ZmFNR1ΔRHO započelo kasnije.

Slika 24. Mutantne linije ZmFNR1D207E, ZmFNR1WT i ZmFNR1RHO uzgojene pri GL osvjetljenju pokazuju različit fenotip. a) Križanci stari oko tri i pol tjedna; b) Križanci stari 8 tjedana.

4.3.2. Morfometrija listova mutantnih linija

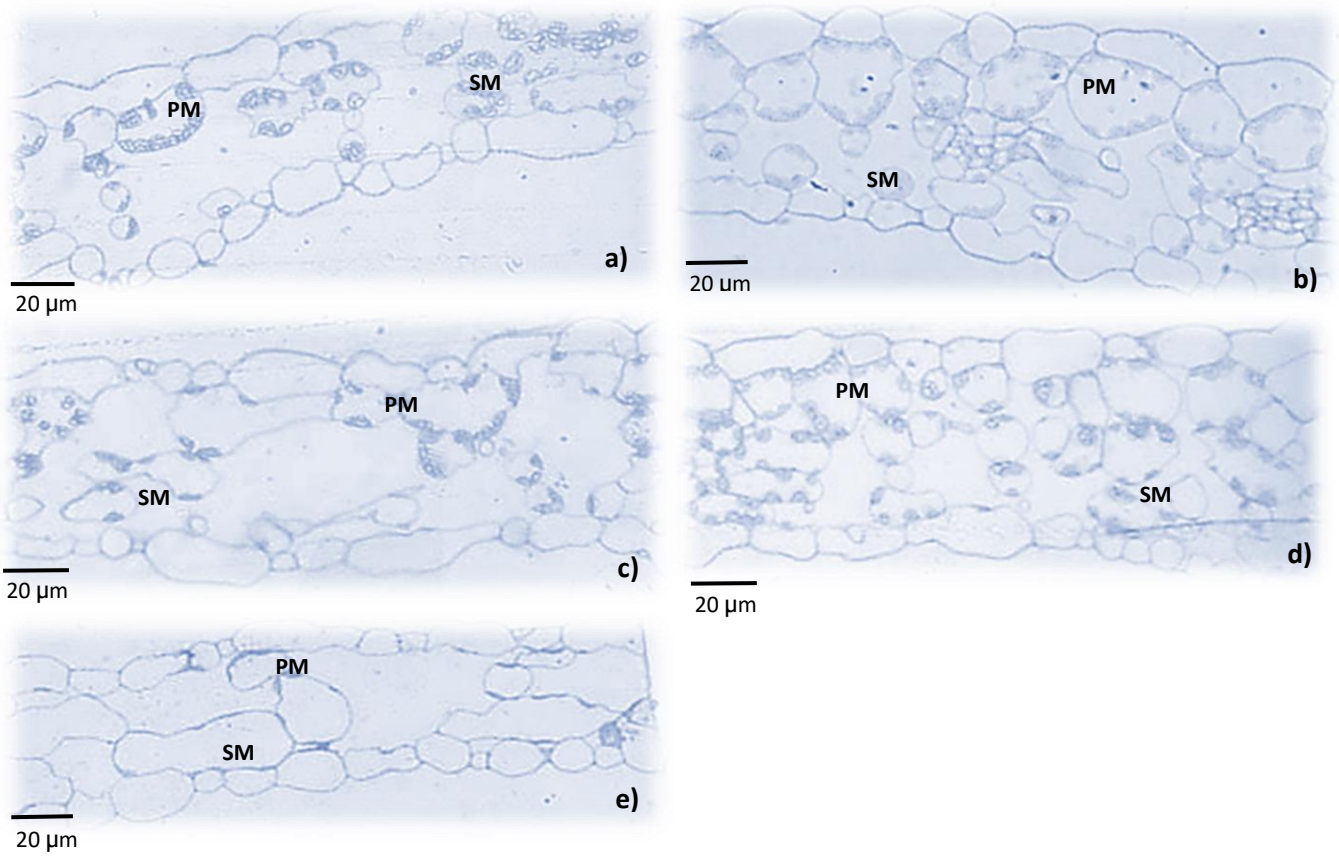
Programom *Fiji* Image J izmjerene su površine listova triju mutantnih linija. Mjesec dana stare biljke fotografirane su pored predmeta poznate duljine kako bi se u računalnom program *Fiji* preračunali pikseli u mm^2. Kao što je prikazano (Slike 24 i 25) najveću prosječnu površinu lista imala je linija ZmFNR1WT, a sve tri linije su se međusobno statistički značajno razlikovale. Pri obradi podataka korišteni su statistički testovi ANOVA i T-test.



Slika 25. Morfometrija listova mutantnih linija ZmFNR1D207E, ZmFNR1WT i ZmFNR1ΔRHO. Prikazana je srednja vrijednost površine listova izražena u mm^2 i standardna devijacija. Skupine se međusobno statistički značajno razlikuju na razini značajnosti od 5%. Najveća površina listova izmjerena je kod ZmFNR1WT mutante, a najmanja kod ZmFNR1ΔRHO.

4.3.3. Anatomska struktura lisnog tkiva mutantnih linija

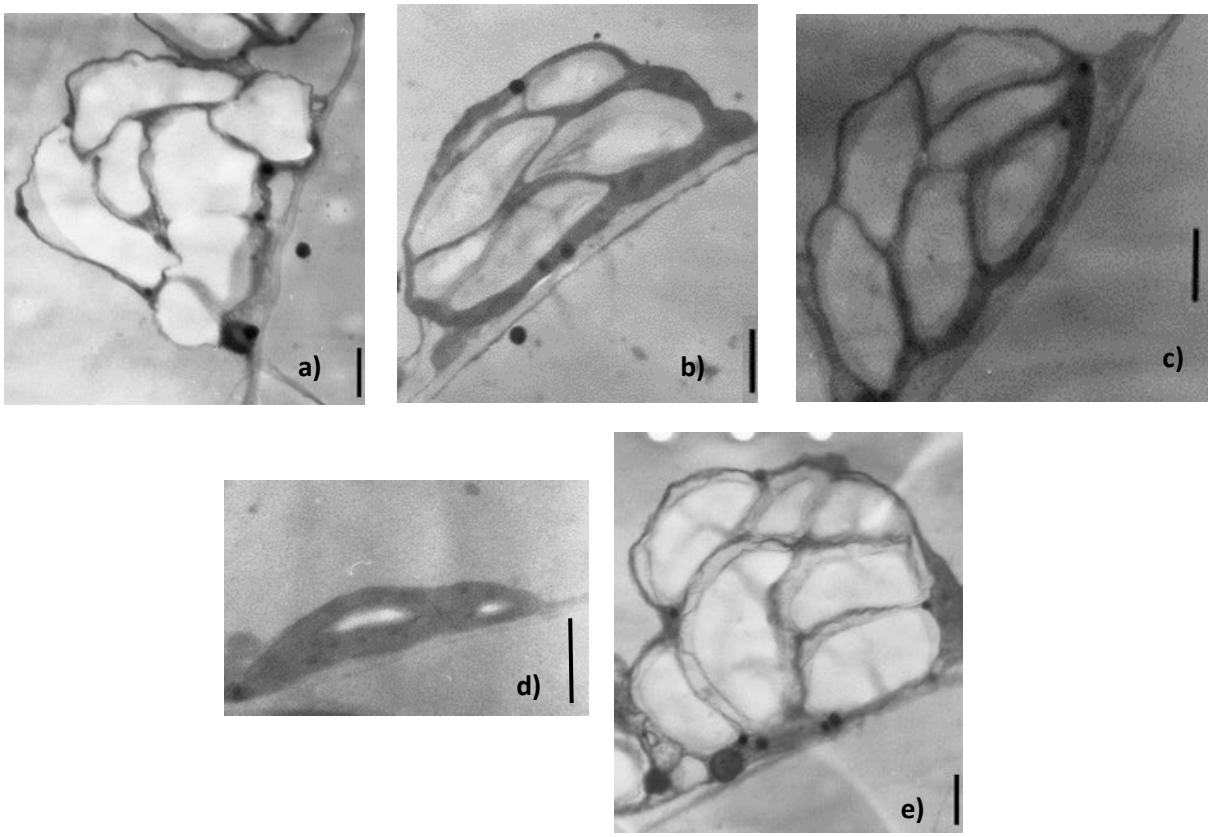
Za izradu poludebelih prereza korišteni su listovi 4 tjedna starih biljaka mutantnih linija i divljeg tipa uzgojenih na osvjetljenju (20 µmol fotona m^{-2} s^{-1}) (3.15.2.). Osim fenotipskih razlika, primijećena je i razlika u anatomskoj strukturi listova mutanti (Slika 26). Palisadni i spužvasti mezenhim sadrže puno međustaničnog prostora, a stanice su uvećane i nepravilnog oblika. Mutante ZmFNR1WT, ZmFNR1D207N i ZmFNR1ΔRHO su razvile deblje listove u odnosu na divlji tip dok je linija ZmFNR1D207E u odnosu na divlji tip razvila tanje listove.



Slika 26. Usporedba lisne anatomije poludebelih prereza linija: a) WT , b) ZmFNR1WT, c) ZmFNR1ΔRHO, d) ZmFNR1D207N i e) ZmFNR1D207E. PM-palisadni mezofil i SM-spužvasti mezofil. Mjerna oznaka: 20 µm.

4.3.4. Ultrastruktura kloroplasta mutantnih linija

Analiza ultrastrukture kloroplasta na 4 tjedna starim biljkama uzgojenih na GL linija ZmFNR1D207N, ZmFNR1WT, ZmFNR1ΔRHO, ZmFNR1D207E i WT (3.15.1.) (Slika 27) pokazala je da su kloroplasti nepravilnog oblika i da sadrže velike količine škroba osim kod linije ZmFNR1ΔRHO u kojima su kloroplasti manji i sadrže manje škroba u odnosu na kloroplaste linija WT, ZmFNR1D207N, ZmFNR1WT i ZmFNR1D207E.

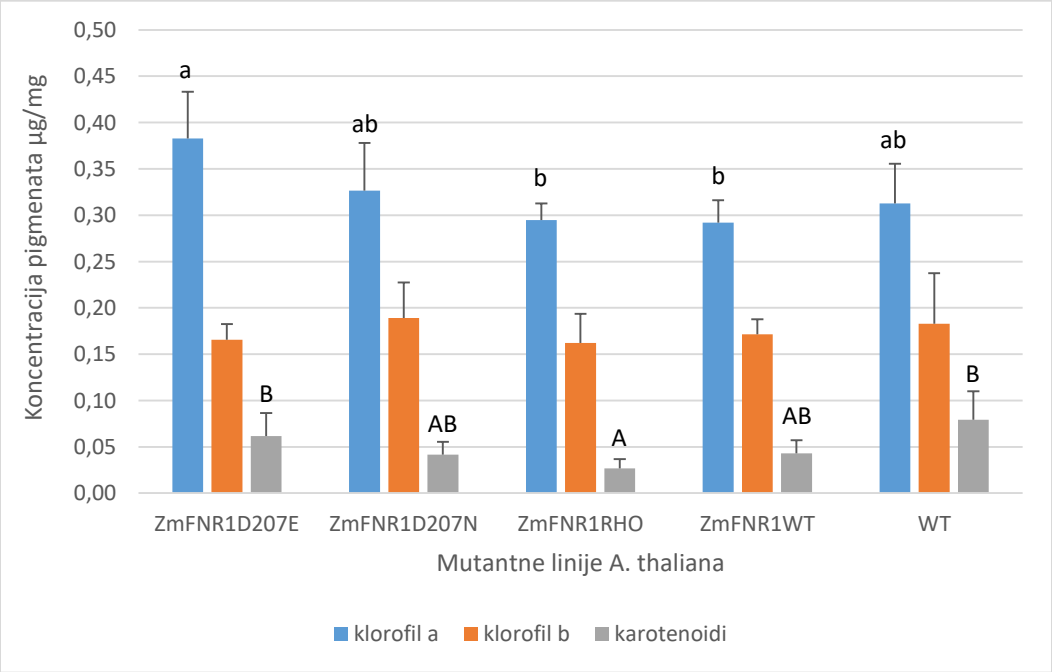


Slika 27. Ultrastruktura kloroplasta biljnih linija a) ZmFNR1D207N; b) ZmFNR1WT; c) ZmFNR1D207E; d) ZmFNR1ΔRHO; e) WT uzgojenih na normalnom osvjetljenju (20 µmol fotona m^{-2} s^{-1}). Mjerna oznaka: 1 µm.

4.4. Analiza pigmenata

4.4.1. Analiza pigmenata mutantnih linija uzgojenih pod UV osvjetljenjem

Koncentracije klorofila *a* i ukupnih karotenoida kod biljaka uzgajanih na osvjetljenju od 20 µmol fotona m^{-2} s^{-1} s UV komponentom (36% UV-A i 8% UV-B) statistički su se značajno razlikovale među mutantnim linijama dok kod koncentracije klorofila *b* nije bilo statistički značajne razlike između linija (Slika 28).



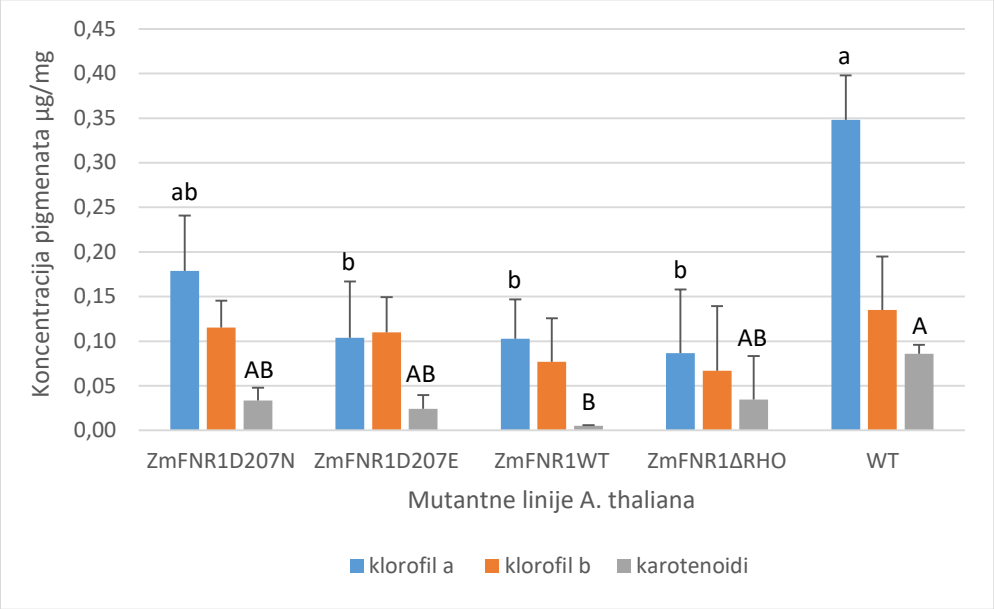
Slika 28. Koncentracija pigmenata (µg/mg svježe tvari) klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u mutantnih linijama biljke *A. thaliana* te u divljem tipu. Rezultati su obrađeni T-testom, a prikazani su u obliku srednjih vrijednosti sa označenom standardnom devijacijom. Skupine označene različitim slovima se međusobno razlikuju na razini značajnosti od 5%.

Tablica 11. Omjeri pigmenata mutantnih linija i divljeg tipa uzgojenih pod osvjetljenjem od 20 µmol fotona m^{-2} s^{-1} s UV komponentom.

	Chl *a* (µg/mg $_{sv.tv}$)	**Chl *b*** (µg/mg $_{sv.tv}$)	**Karotenoidi** (µg/mg $_{sv.tv}$)	**Chl *a* / Chl *b***	**Chl *a*+*b***
ZmFNR1D207E	0,38±0,05	0.17±0.02	0.06±0.02	2.24	0.55±0.05
ZmFNR1D207N	0,33±0,05	0.19±0.04	0.16±0.01	1.74	0.52±0.06
ZmFNR1ΔRHO	0,29±0,02	0.16±0.03	0.03±0.01	1.81	0.45±0.1
ZmFNR1WT	0.29±0.02	0.17±0.02	0.04±0.01	1.70	0.46±0.09
WT	0.31±0.04	0.18±0.05	0.08±0.03	1.72	0.49±0.06

4.4.2. Analiza pigmenata mutantnih linija uzgojenih pod osvjetljenjem bez UV komponente

Koncentracija klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida mutantnih biljaka *A. thaliana* i divljeg tipa uzgojenih na osvjetljenju od 20 µmol fotona m^{-2} s^{-1} bez UV komponente su se statistički značajno razlikovale u koncentraciji klorofila *a* i karotenoida dok kod klorofila *b* nije bilo statistički značajne razlike (Slika 29).



Slika 29. Koncentracija pigmenata (µg/mg svježe tvari) klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u mutantnim linijama biljke *A. thaliana* te u divljem tipu. Rezultati su obrađeni T-testom, a prikazani su u obliku srednjih vrijednosti sa označenom standardnom devijacijom. Skupine označene različitim slovima se međusobno razlikuju na razini značajnosti od 5%.

Tablica 12. Omjeri pigmenata mutantnih linija i divljeg tipa biljaka uzgojenih na osvjetljenju od 20 µmol fotona m^{-2} s^{-1} bez UV komponente

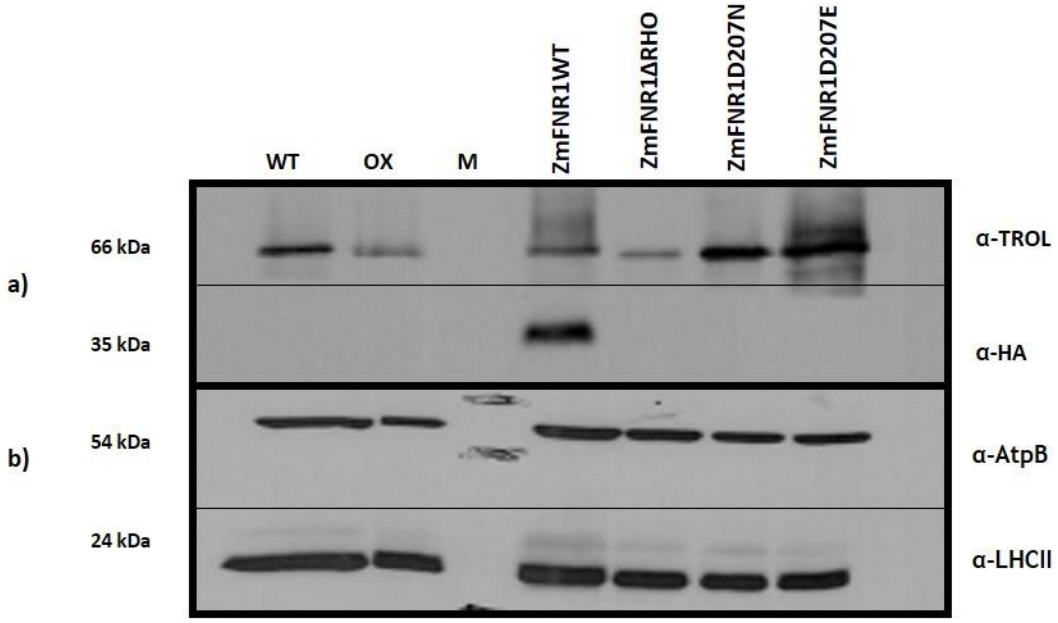
	Chl *a* (µg/mg $_{sv.tv}$)	**Chl *b* (µg/mg $_{sv.tv}$)**	**Karotenoidi (µg/mg $_{sv.tv}$)**	**Chl *a*/ Chl *b***	**Chl *a*+*b***
ZmFNR1D207E	0.10±0.06	0.11±0.04	0.03±0.02	1	0.21±0.07
ZmFNR1D207N	0.18±0.06	0.12±0.03	0.03±0.01	1.5	0.3±0.1
ZmFNR1ΔRHO	0.09±0.07	0.07±0.07	0.03±0.05	1.28	0.16±0.09
ZmFNR1WT	0.10±0.04	0.08±0.05	0.01±0.00	1.25	0.18±0.06
WT	0.35±0.05	0.14±0.06	0.09±0.01	2.5	0.49±0.07

Primjećena je razlika u koncentracijama pigmenata mutantnih linija uzgojenih pod osvjetljenjem bez UV komponente u odnosu na mutantne linije uzgojene pod osvjetljenjem s UV komponentom (Tablice 11 i 12). S obzirom da je intenzitet fotosintetski aktivne radijacije (PAR) kod osvjetljenja koje ne sadrži UV komponente jednak onoj izmjerenoj kod osvjetljenja koje sadrži UV komponente, iz razlika u koncentraciji fotosintetskih pigmenata može se zaključiti da njihovo nakupljanje ovisi isključivo o UV komponenti osvjetljenja.

4.5. Analiza interakcije ZmFNR-a s proteinom TROL i njegovim mutantama

Na mutantnim linijama ZmFNR1WT, ZmFNR1D207E, ZmFNR1D207N i ZmFNR1ΔRHO provjerena je interakcija proteina ZmFNR1 s proteinom TROL na cjelovitim tilakoidima koji su izolirani prema opisanom (3.14.6.) te je svaki uzorak na gel nanesen u količini ekvivalentnoj 10 µg klorofila.

ZmFNR1 na tilakoidima detektiran je samo kod linije ZmFNR1WT dok kod ostalih linija koje imaju izmijenjen protein TROL nije detektiran na tilakoidima (Slika 30). Kao kontrole očuvanosti tilakoida korištena su α-AtpB i α-LHCII antitijela. Antitijelo α-AtpB detektira beta podjedinicu ATP sintaze, a α-LHCII integralni membranski protein LHCII, glavni antenski sustav PSII.

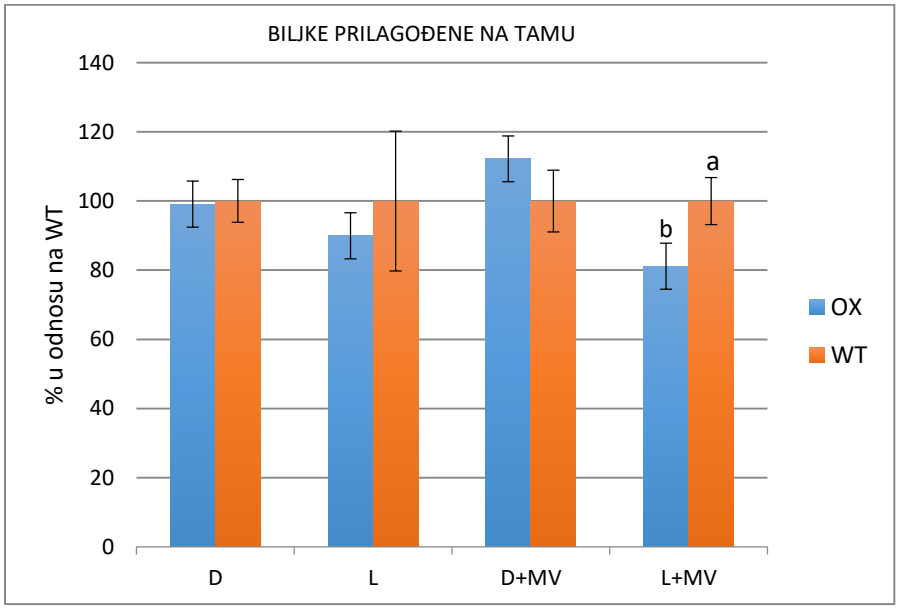


Slika 30. Analiza vezanja proteina ZmFNR1 na tilakoide TROL mutantnih linija Westernskom metodom otiska i kemiluminiscencijom. a) Tilakoidi su izolirani iz mutanti ZmFNR1WT, ZmFNR1ΔRHO, ZmFNR1D207N i ZmFNR1D207E, a imunodetekcija je rađena antitijelima α-HA (1:1000, Sigma; sekundarno antitijelo anti-rat-peroksidaza 1:30000, Sigma) za detekciju proteina ZmFNR1FLAGHA proteina te α-TROL antitijelima (1:2000, Agrisera; sekundarno antitijelo anti-goat/rabbit-peroksidaza 1:50000, Sigma) za detekciju proteina TROL. b) Kao

kontrole cjelovitosti tilakoida i ujednačenog nanošenja uzoraka na gel korištena su antitijela α-AtpB i α-LHCII (1:2000, Agrisera; sekundarno antitijelo anti-goat/rabbit-peroksidaza 1:20000). Rezultati su vizualizirani ECL-om i eksponiranjem na rendgenski film. M-marker standardnih proteinskih masa (BioRad, SAD).

4.6. Elektronska paramagnetska rezonancija (EPR)

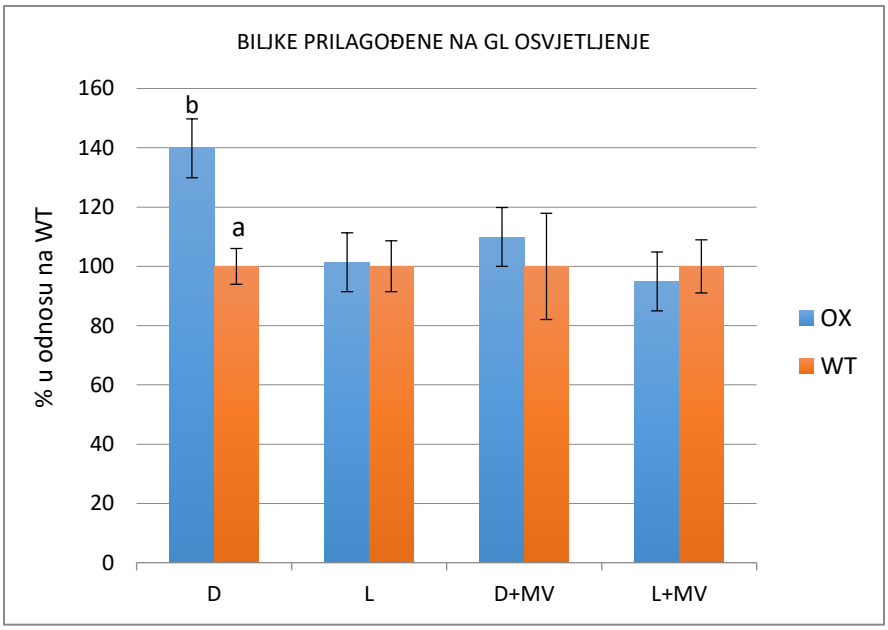
Mjerenja reaktivnih kisikovih radikala rađena su na WT liniji i TROL OX liniji (3.16) (Slike 31, 32 i 33). Kao specifična klopka za superoksidni radikal korišten je DMPO. Nakon dodavanja klopke u izolirane kloroplaste, a prije mjerenja, uzorak je držan 30 sekundi u tami (D) ili je nakon dodavanja klopke i prije mjerenja uzorak osvjetljen sa 100 µM fotona m^{-2} s^{-1} 30 sekundi (L). Reakcijska smjesa sastojala se od izoliranih kloroplasta u koncentraciji 50 µg klorofila + 433 mM DMPO (+ 10 mM MV kod D+MV i L+MV). Rezultati su normalizirani prema WT. Analizirane su linije uzgajane na D, GL ili HL osvjetljenju (opisano u 3.13.).



Slika 31. Oslobađanje superoksidnog radikala kod WT i TROL OX biljaka prilagođenih na tamu (D). Rezultati su normalizirani prema divljem tipu, a prikazani su kao srednja vrijednost sa označenom standardnom devijacijom. Grupe koje se statistički značajno razlikuju na razini značajnosti od 5% označene su različitim slovima. Rezultati su obrađeni statističkim testom ANOVA te T-testom. D: mrak tijekom 30 sekundi inkubacije; L: uzorak osvjetljen sa 100 µM fotona m^{-2} s^{-1} 30 sekundi; D+MV: mrak tijekom 30 sekundi inkubacije uzorka u koji je dodan i

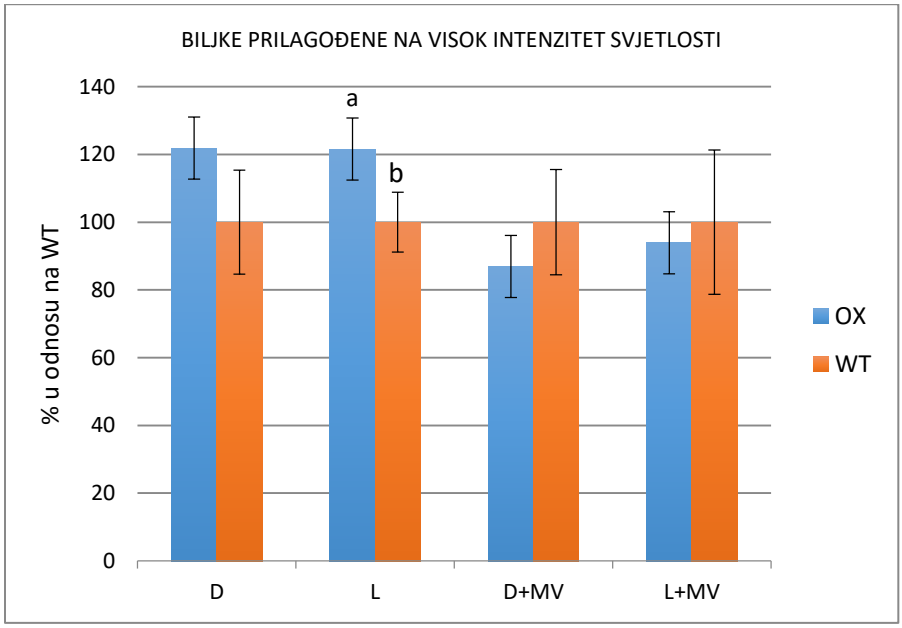
MV; L+MV: uzorak u koji je dodan MV osvjetljen sa 100 µM fotona m^{-2} s^{-1} 30 sekundi ; MV: metil-viologen.

Biljke prilagođene na tamu, a prije mjerenja izložene svjetlosti uz dodatak metil viologena, pokazale su 20% manje oslobođenog superoksidnog radikala u odnosu na divlji tip.



Slika 32. Oslobađanje superoksidnog radikala kod WT i TROL OX biljaka uzgojenih na GL osvjetljenju. Rezultati su normalizirani prema divljem tipu, a prikazani su kao srednja vrijednost sa označenom standardnom devijacijom. Grupe koje se međusobno statistički značajno razlikuju na razini značajnosti od 5% označene su različitim slovima. Rezultati su obrađeni statističkim testom ANOVA te T-testom. D: mrak tijekom 30 sekundi inkubacije; L: uzorak osvjetljen sa 100 µM fotona m^{-2} s^{-1} 30 sekundi; D+MV: mrak tijekom 30 sekundi inkubacije uzorka u koji je dodan MV; L+MV: uzorak u koji je dodan MV osvjetljen sa 100 µM fotona m^{-2} s^{-1} 30 sekundi; MV: metil-viologen.

Biljke prilagođene GL osvjetljenju, a koje su prije mjerenja izložene tami, pokazale su 40% više oslobođenog superoksidnog radikala u odnosu na divlji tip.



Slika 33. Oslobađanje superoksidnog radikala kod WT i TROL OX biljaka prilagođenih visokom intenzitetu svjetlosti (HL). Rezultati su normalizirani prema divljem tipu, a prikazani su u obliku srednjih vrijednosti sa označenom standardnom devijacijom. Grupe koje se međusobno statistički značajno razlikuju na razini značajnosti od 5% označene su različitim slovima. Rezultati su obrađeni statističkim testom ANOVA te T-testom. D: mrak tijekom 30 sekundi inkubacije; L: uzorak osvjetljen sa 100 µM fotona m^{-2} s^{-1} 30 sekundi; D+MV: mrak tijekom 30 sekundi inkubacije uzorka u koji je dodan MV; L+MV: uzorak u koji je dodan MV osvjetljen sa 100 µM fotona m^{-2} s^{-1} 30 sekundi; MV: metil-viologen.

Biljke prilagođene visokom intenzitetu svjetlosti koje su prije mjerenja bile izložene osvjetljenju, pokazale su 20% veće oslobađanje superoksidnog radikala u odnosu na divlji tip.

5. RASPRAVA

U ovom doktorskom radu istražena je uloga domene RHO proteina TROL u transmembranskoj signalizaciji vezanja i otpuštanja proteina FNR. Eksperimenti su uključili kvantifikaciju interakcija, interakcije sa mutantama proteina TROL u domeni RHO te ispitivanje učinka interakcije FNR-TROL na stvaranje i uklanjanje ROS-a.

Protein FNR se u obliku homodimera veže u komplekse na tilakoidnoj membrani s proteinima Tic62 i TROL. Oba proteina dijele visoko konzerviran slijed na svom C-terminalnom završetku kojim vežu FNR. Taj slijed je nazvan *membrane recruiting motif* (MRM), a specifičan je samo za vaskularne biljke (6, 43, 92). Iako i TROL i Tic62 vežu protein FNR putem identične domene, sami kompleksi imaju potpuno drugačije funkcije. Tako je kompleks proteina FNR i Tic62 reguliran uvjetima pH vrijednosti u stromi (93), odnosno u kiselim uvjetima Tic62 veže FNR te ga stabilizira i sprječava njegovu inaktivaciju, no nema utjecaj na fotosintezu (26, 43, 90). Kompleks FNR-TROL je odgovoran za učinkovit linearan prijenos elektrona i učinkovitu fotosintezu (6, 81). Dosadašnja istraživanja su pokazala da je interakcija između proteina FNR i proteina TROL osam puta jača od one između FNR-a i Tic62 (6). Lintala i suradnici (85) su utvrdili da kod *tic62* i *trol* mutanti nije došlo do promjene u asimilaciji ugljika, ali je nedostatak vezanog FNR-a doveo do smanjenja stope redukcije $NADP^+$ u NADPH. Također, ove su mutante pokazale otpornost na jak intenzitet svjetlosti (26, 85). S druge strane, istraživanja Twachtmanna i suradnika (29) rađena na izoformama enzima FNR iz kukuruza, koji je C4 biljka, pokazala su da lisna izoforma ZmFNR1, koju nalazimo i u štapićastim i u stanicama mezofila, ima najveći afinitet za vezanje u membranske komplekse. Proteinske kimere sastavljene od topivog ZmFNR3 i N-terminalnog završetka izoforme ZmFNR1 pokazale su da je vezanje u komplekse na membranu i dimerizacija omogućena samo kod izoformi sa specifičnom strukturom N-terminalnog završetka (29).

S obzirom na gore navedene rezultate, u ovom radu je za provjeru i kvantifikaciju interakcija odabrana izoforma FNR1 iz kukuruza. Označena je biljezima FLAG i HA kako bi ju mogli pratiti i razlikovati od endogenih lisnih izoformi *A. thaliana* (89). Prethodna istraživanja Jurić i suradnika (6) potvrdila su jače interakcija između domene ITEP proteina TROL i FNR, nego domene IA2 proteina Tic62 i FNR. Rezultat ovog istraživanja potvrdio je rezultat Jurić i suradnika (6), ali i ukazao na razliku pri kvantifikaciji koja se odnosila na tipove fotosinteze, odnosno jače interakcije uočene su između ZmFNR1, elementa C4 biljke, i ITEP domene proteina TROL u odnosu na interakciju PsFNR1, elementa C3 biljke, i domene ITEP i to za čak

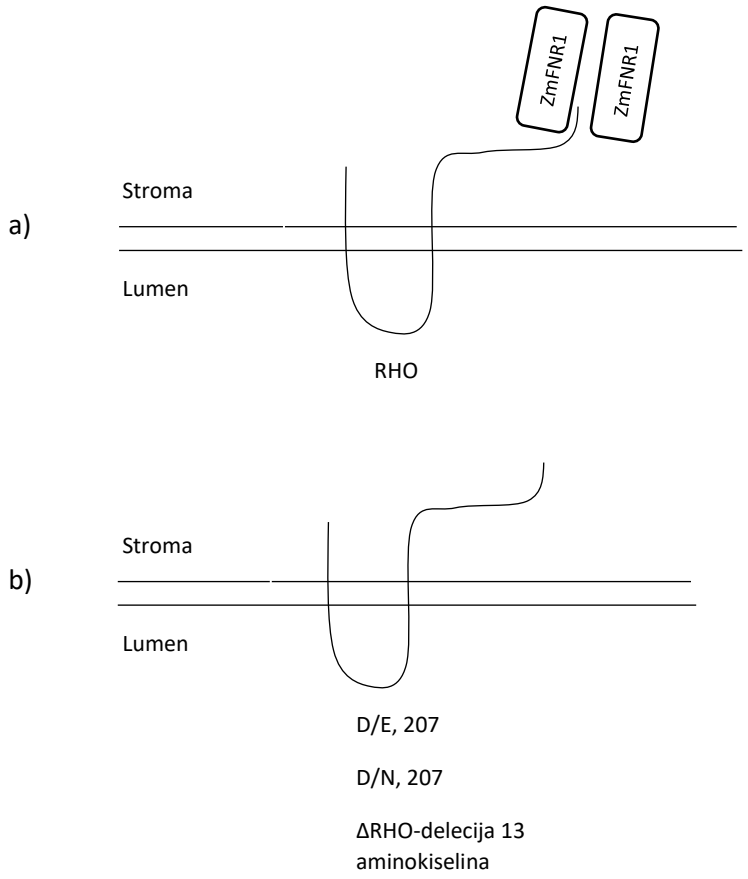
10 puta (91). Dva puta jače interakcije zabilježene su kod ZmFNR1 i IA2 domene Tic62 proteina nego kod PsFNR1 i IA2 domene Tic62 (91).

Nekoliko je predloženih modela vezanja FNR-a u komplekse na membrane. Jednim od modela predlaže se da je vezanje uvjetovano uvjetima pH vrijednosti u stromi, odnosno da zakiseljavanje strome i nedostatak svjetlosti uzrokuju vezanje u komplekse (26). Drugi model predlaže da na vezanje FNR-a na membranu utječe redoks stanje strome ($NADP^+$/NADPH) (83), a treći upućuje na važnost RHO domene kao regulatora dinamičkog vezanja i otpuštanja FNR-a transmembranskom signalizacijom (81,6).

Rodanazne domene proteina prilagodile su se raznovrsnim funkcijama kako bi uspješno osigurale sumpor potreban u različitim metaboličkim i regulatornim putevima. Identifikacija supstrata proteina koji sadrže rodanaznu domenu je otežana, ali uočena je važnost aminokiselinskog slijeda petlje aktivnog mjesta u specifičnosti prepoznavanja supstrata. Kod katalitički neaktivnih domena primijećena je povezanost sa drugim domenama što upućuje da imaju regulatornu funkciju i to najvjerojatnije signaliziranje (79). Pokazano je da je RHO domena proteina TROL smještena u lumenu tilakoida dok su C-terminalni i N-terminalni završetak smješteni u stromi (82). Rodanazna domena proteina TROL identična je aktivnim rodanaznim domenama, no za razliku od njih, u aktivnom mjestu ne sadrži cistein već aspartat. Iako nije aktivna, predložen je već spomenuti model u kojem ima važnu ulogu u transmembranskoj signalizaciji vezanja i otpuštanja FNR-a koja bi mogla biti potaknuta vezanjem signalnog liganda sličnog PQ (81).

Kako bi eksperimentalno dokazali važnost domene RHO u dinamici kompleksa FNR-TROL na membrani, u ovom istraživanju korišteno je nekoliko mutantnih linija *A. thaliana*, a cilj je bio križanjem stvoriti liniju koja će omogućiti praćenje proteina ZmFNR1 i promatrati utjecaj mutacija u domeni RHO u lumenu na stvaranje kompleksa FNR-TROL na stromalnoj strani tilakoida. Provjerom križanja *Phire PCR* metodom i Westernskom metodom otiska u izolatu ukupnih proteina detektirani su protein TROL i njegovi mutantni oblici, ali i protein ZmFNR1. Međutim, rezultat dobiven na izolatu tilakoida križanaca ZmFNR1WT upućivao je na neosporan utjecaj RHO domene u transmembranskoj signalizaciji. Westernskom metodom otiska je ZmFNR1 detektiran vezan na tilakoidima samo kod ZmFNR1WT križanaca. Naime, ovi križanci sadrže TROL koji nema nikakve promjene u RHO domeni i potječe iz divljeg tipa, dok kod svih ostalih križanaca sa izmijenjenom RHO domenom, bilo da je riječ o izmjeni jedne aminokiseline

ili uklanjanju 13 aminokiselina, ZmFNR1 nije detektiran vezan na tilakoidima. Zaključno, uklanjanje 13 aminokiselina u RHO domeni smještenoj u lumenu, ali i izmjena aspartata na poziciji 207, uzrokovala je nemogućnost vezanja ZmFNR1 na stromalnoj strani tilakoida (Slika 34).



Slika 34. Shematski prikaz rezultata vezanja ZmFNR1 na tilakoide. a) Kod linije ZmFNR1WT koja nema promjenu u domeni RHO ZmFNR1 je vezan na tilakoide, b) kod mutanti ZmFNR1D207E i ZmFNR1D207N koje imaju promjenu aspartata u domeni RHO nema vezanja, kod mutante ZmFNR1ΔRHO u kojoj je uklonjeno 13 aminokiselina domene RHO nema vezanja.

Kao što je već spomenuto, u neaktivnoj rodanaznoj domeni proteina TROL cistein, koji je karakterističan za aktivne domene, zamijenjen je aspartatom. Aspartat je supstrat histidin kinaza,

dijela dvokomponentnog sustava prijenosa signala koji je prvotno smatran karakterističnim samo za prokariotske stanice (95). Međutim, nakon otkrića histidin kinaza u *A. thaliana* (97) postalo je jasno da ovakav sustav možemo pronaći i u eukariotskim stanicama. Prve opisane kinaze su ERT1 i CK1 koje sudjeluju u prepoznavanju fitohormona etilena i citokinina te ATHK1 koja sudjeluje kao senzor osmotskih procesa (98, 99). Ekspresija ATHK1 je inducirana sušom, niskim temperaturama i mehaničkim stresom, a smatra se da je njena kinazna aktivnost pod kontrolom osmotskog tlaka (98, 99). Osim otkrića samih kinaza, Urao i suradnici (100) sustavom dvaju hibrida kvasaca predložili su i određene signalne puteve dvokomponentnog sustava u *A. thaliana.* Histidin kinaze kataliziraju prijenos fosfatne grupe s histidina histidin kinaze na aspartat regulatora odgovora, a važne su za prepoznavanje i integraciju brojnih endogenih i egzogenih signala (101). Razlikujemo i dvokomponentni sustav u više koraka u kojem sudjeluje tzv. hibridna histidin kinaza. Naziv hibridna potječe od dodatne domene s konzerviranim aspartatom na C-terminalnom završetku na koju se prvo prebacuje fosfatna grupa, a tek onda na aspartat regulatora odgovora. Fosforilacija regulatora odgovora uzrokuje konformacijske promjene koje dovode do promjene biološke aktivnosti (102, 103). S obzirom na ova dosadašnja istraživanja i rezultat dobiven u ovom istraživanju križanjem mutanti proteina TROL u domeni RHO, konkretno uklanjanjem 13 aminokiselina ili zamjeni aspartata, možemo zaljučiti da postoji mogućnost da je aspartat neaktivne domene RHO odgovoran za prijenos transmembranskog signala iz strome u lumen fosforilacijom dvokomponentnim sustavom. Pri tome dolazi do konformacijskih promjena u domeni ITEP koje dovode do otpuštanja FNR-a sa membrane u uvjetima prevelike redukcije transportnog lanca elektrona. Nadalje, neaktivna rodanazna domena je strukturno vrlo slična katalitičkoj podjedinici Cdc25 fosfataze, enzima ključnog za regulaciju staničnog ciklusa (105). Glavna strukturna razlika je u dužini petlje aktivnog mjesta. Humani homolozi Cdc25 fosfataze Cdc25A i Cdc25B vezani su za onkogenezu različitih tipova tumora. Pojačanom ekspresijom ovih proteina dolazi do destabilizacije staničnog ciklusa, nekontrolirane diobe stanica te genske nestabilnosti (105). Primijećeno je da bi inhibiciju Cdc25 fosfataza mogla uzrokovati redoks promjena kinona u prisutnosti kisika (106,107). U skladu s tim rezultatima, postoji mogućnost da plastokinon, uz to što igra važnu ulogu u prijenosu elektrona i redoks regulaciji cyt b_6f kompleksa, uzrokuje i aktivaciju transmembranskog signala putem domene RHO. Dakle, reducirani plastokinon promjenom svog redoks stanja mogao bi biti okidač signala u lumenu za otpuštanje proteina FNR sa domene ITEP proteina TROL u stromi.

Postavlja se pitanje zašto je uopće važno dinamičko vezanje i otpuštanje FNR-a i kakav utjecaj ima na kloroplastni metabolizam. Kao što je već spomenuto, nakon PSI, Fd prenosi elektrone različitim enzimima, no preferencijalni put je onaj kataliziran FNR-om u kojem nastaje NADPH. S obzirom da FNR može katalizirati i obrnutu reakciju pri čemu nastaje reducirani Fd, potrebna je stalna ravnoteža između potrošnje NADPH i dostupnog $NADP^+$ da bi sustav bio učinkovit (94). U slučaju pretjerane redukcije transportnog lanca može doći do oštećenja proteinskih kompleksa i proizvodnje velike količine ROS-a. Također, dolazi do aktivacije Mehlerove reakcije i proizvodnje H_2O_2 pseudocikličkim putem, aktivacije cikličkog toka elektrona da bi se osigurao ATP za Calvinov ciklus te ponovna uspostava linearnog toka elektrona (94).

FNR vezan na TROL nalazi se u blizini PSI i pridonosi učinkovitom prijenosu elektrona na $NADP^+$. Važno je napomenuti da su za proizvodnju jedne molekule NADPH potrebna dva reducirana Fd. Predloženi model dinamičkog vezanja i otpuštanja FNR-a podrazumijeva učinkovitu proizvodnju NADPH pri normalnom osvjetljenju dok je FNR vezan za TROL. Vojta i suradnici (81) predložili su da u uvjetima pojačanog intenziteta svjetlosti, transmembranskom signalizacijom dolazi do otpuštanja FNR-a s membrane što omogućuje prijenos elektrona alternativnim primateljima i/ili sprječavanje propagacije ROS-a. Istraživanja rađena na pšenici i duhanu pokazala su da pojačana ekspresija FNR-a i njegovo otpuštanje sa membrane povećavaju otpornost biljaka na ROS (108, 109). Kod *trol* linije biljke *A. thaliana* zabilježeno je stvaranje manje O_2^- u trima testiranim uvjetima: biljkama prilagođenim na tamu, na normalno osvjetljenje i na jak intenzitet svjetlosti (5). Čini se da se u odsutstvu TROL-a elektroni sa PSI ne prenose na O_2 nego ih reducirani Fd šalje alternativnim putevima (5,81). No, može se pretpostaviti i uloga Asada-Halliwel-Foyer puta detoksifikacije nefotokemijskih elektrona koji se učinkovito uklanjaju enzimima SOD, APX te glutationom koji regulira omjer $NADPH/NADP^+$ u stresnim uvjetima (112). U tom smislu treba napomenuti da su enzimi SOD i APX pronađeni u izoliranim kompleksima s TROL-om (Vojta, Rac, Fulgosi neobjavljeni rezultati). Vojta i suradnici (5) pokazali su da kloroplasti *trol* mutanti proizvode 20% manje O_2^- u usporedbi s divljim tipom, dok je čak 30-40% manje O_2^- detektirano u tretmanima s MV u odnosu na tretirani divlji tip. Dakle, u odsustvu TROL-a FNR bi mogao biti vezan za neke alternativne komplekse koji omogućuju učinkovito uklanjanje O_2^-, čak i u prisutnosti MV (5), najvjerojatnije one koji uključuju već spomenute SOD i APX. U ovom istraživanju je kod biljne linije TROL OX (86) na sva tri svjetlosna tretmana primijećena povećana proizvodnja O_2^-, osim u slučaju kad su biljke

prilagođene na tamu bile izložene kratkom osvjetljenju uz dodan MV (Slika 31). Kod biljaka uzgojenih na normalnom osvjetljenju primijećena je čak 40% veća proizvodnja O_2^-, a kod biljaka uzgojenih na jakom intenzitetu svjetlosti 20% veća (Slike 32 i 33), što odgovara predloženom modelu u uvjetima visokog intenziteta osvjetljenja. Prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti da prisutnost TROL-a u suvišku sprječava prenošenje elektrona na put detoksifikacije ROS-a što dovodi do stvaranja veće količina O_2^- nego u slučaju kada TROL nije prisutan.

Sztatelman i suradnici (117) pokazali su da je izlaganje biljaka *A. thaliana* većim dozama UV osvjetljenja koje su nakon toga držane u tami spriječilo degradaciju klorofila u tami i senescenciju. Isti tretman rađen na biljkama koje su uzgojene na normalnom osvjetljenju uzrokovao je smanjenje koncentracije svih pigmenata, pad učinkovitosti fotosinteze i žućenje listova. Kod biljaka *A. thaliana* koje su rasle pod UV-B osvjetljenjem primijećena je smanjena površina lista i smanjena stomatalna provodljivost, ali i veća koncentracija klorofila. Također, te su biljke bile otpornije na sušu i visok intenzitet svjetlosti (118). Brown i suradnici (111) pokazali su da su fotomorfogeni odgovori na UV-B svjetlost kod biljaka *A. thaliana* regulirani proteinom UVR8 (113) koji djeluje kao fotoreceptor stvarajući monomere pod utjecajem UV-B koji zatim aktiviraju mrežu morfogenih i fizioloških odgovora interakcijom sa proteinom COP1 (116). Mutante *uvr8-1* pokazale su hipersenzitivnost na UV-B (112) dok su mutante koje su pojačano eksprimirale UVR8 bile tolerantne na UV-B (113). U ovom istraživanju, mjerenjem koncentracije fotosintetskih pigmenata mutantnih biljaka i biljaka divljeg tipa, primijećeno je da mutante uzgojene pod UV osvjetljenjem sadrže veće koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida nego biljke uzgojene pod osvjetljenjem bez UV-a koje sadrže značajno manje klorofila *a* u odnosu na divlji tip. Koncentracija klorofila *b* nije pokazala statistički značajne razlike u tretmanima. Za razliku od istraživanja Brown i suradnika (111), osvjetljenje korišteno za ova istraživanja sadržavalo je i UV-A komponentu osvjetljenja čiji intenzitet nismo mogli mjeriti pa ne možemo sa sigurnošću donositi nikakve zaključke na temelju usporedbe. S ozbirom na dobivene rezultate, postoji mogućnost da je interakcija FNR-TROL povezana s odgovorima biljke na UV tretman te da je TROL mogući ishodišni element u procesima fotomorfogeneze ovisne o UV.

Promjene u domeni RHO utjecale su i na ultrastrukturu kloroplasta, anatomsku strukturu lista i fenotip biljaka. Naime, linija ZmFNR1WT je u odnosu na WT razvila puno veće rozete s većim i debljim listovima, dok je kod linija ZmFNR1D207N, ZmFNR1D207E i ZmFNR1ΔRHO rozeta i

površina listova bila puno manja. Ultrastruktura kloroplasta pokazala je da su sve linije osim ZmFNR1ΔRHO sadržavale nepravilne kloroplaste bogate škrobom.

Istraživanja interakcija FNR-TROL u ovoj doktorskoj disertaciji omogućila su bolji uvid u složenost fotosintetskih procesa te ukazala na važan utjecaj samo jedne aminokiseline u domeni RHO na tok elektrona, a time i na učinkovitost fotosinteze. Rezultati otvaraju nova pitanja poput ključnog lumenalnog mehanizma u transmembranskoj signalizaciji, utjecaja proteina TROL na fotomorfogenezu ovisnu o UV, ali i usmjeravaju na daljnja istraživanja C3/C4 elemenata fotosinteze koja mogu dovesti do nastanka biljaka otpornijih na stres s učinkovitijom fotosintezom.

6. ZAKLJUČAK

U ovom doktorskom radu istražena je uloga proteina TROL i njegove domene RHO u interakciji s proteinom FNR u procesima regulacije prijenosa elektrona u fotosintezi biljke *A. thaliana*.

1. Istraživanje proteinskih interakcija sustavom dvaju hibrida kvasca te X-alpha i beta galaktozidaznim testom proteina TROL sa ZmFNR1 iz C4 biljke kukuruza te PsFNR1 iz C3 biljke graška pokazalo je da ZmFNR1 oko 10 puta snažnije interagira s FNR vezujućom TROL domenom u usporedbi sa PsFNR1.

2. Konstrukcijom mutanti biljke *A. thaliana* koje imaju definirane izmjene u lumenalnoj domeni RHO proteina TROL te sadrže endogeni FNR1 i egzogeni ZmFNR1 istražena je hipoteza uloge transmembranske signalizacije u dinamičkom vezanju FNR-a. Pokazano je da nema vezanja ZmFNR1 na tilakoide u mutantama koje su sadržavale izmjenu u domeni RHO. Vezanje ZmFNR1 na tilakoide pokazano je samo kod mutante s neizmijenjenom RHO domenom proteina TROL po čemu se može zaključiti da domena RHO tj. njezin aminokiselinski ostatak Asp207 ima važnu ulogu u regulaciji vezanja i otpuštanja FNR-a na stromalnoj strani tilakoida.

3. Uloga dinamičkog vezanja i otpuštanja FNR-a u nastajanju ROS-a istražena je korištenjem mutante koja prekomjerno nakuplja protein TROL (TROL OX). Utvrđeno je da mutanta TROL OX nakuplja značajno veće količine O_2^- u odnosu na divlji tip biljke *A. thaliana* što je upravo suprotno od mutanti koje ne nakupljaju TROL (*trol*). Time možemo zaključiti da u prisustvu pojačanog vezanja FNR-a na tilakoide ne dolazi do aktivacije alternativnog puta/alternativnih puteva prijenosa elektrona koji služi za sprječavanje stvaranja ROS-a.

4. Mjerenjem koncentracije fotosintetskih pigmenata mutanti i divljeg tipa biljke *A. thaliana* pokazano je da mutante uzgajane pod osvjetljenjem s UV komponentom sadrže veće koncentracije pigmenata nego one uzgajane pod osvjetljenjem bez UV komponente. Takav rezultat upućuje da postoji mogućnost da je protein TROL dio procesa fotomorfogeneze ovisne o UV.

7. POPIS LITERATURE

1. Tanaka A, Makino A (2009) Photosynthetic Research in Plant Science. Plant Cell Physiol 50:681-683.
2. Soll J, Bölter B (2009) Protein import machineries in endosymbiotic organelles. Cell Mol Life Sci 66:1903-1923.
3. Nelson N, Ben-Shem A (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. Nat Rev Mol Cell Biol 5:971-982.
4. The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408:796-815.
5. Vojta L, Carić D, Cesar V, Antunović Dunić J, Lepeduš H, Kveder M, Fulgosi H (2015) TROL-FNR interaction reveals alternative pathways of electron partitioning in photosynthesis. Sci Rep 5:10085.
6. Jurić S, Hazler-Pilepić K, Tomašić A, Lepeduš H, Jelić B, Puthiyaveetil S, Bionda T, Vojta L, Allen J, Schleiff E, Fulgosi H (2009) Tethering of ferredoxin:$NADP^+$ oxidoreductase to thylakoid membranes is mediated by novel chloroplast protein TROL. Plant J 6:783-794.
7. Schopf JW (1993) Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. Science 260:640-646.
8. Xiong J (2006) Photosynthesis: what color was its origin? Genome Biol 7(12):245.
9. Olson JM, Blankenship RE (2004) Thinking about the evolution of photosynthesis. Photosynth Res 80:373-386.
10. Nelson N, Ben-Shem A (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. Nat Rev Mol Cell Biol 5:971-982.
11. Dekker JP, Boekema EJ (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. Biochim Biophys Acta 1706:12-39.
12. Gruber M.J., Maly P, Kruger P.J., van Grondelle R (2018) From isolated light-harvesting complexes to the thylakoid membrane: a single molecule perspective. Nanophotonics 7:81-92.
13. Nirody A.J., Budin I, Rangamani P (2020) ATP Synthase: Evolution, energetics and membrane interactions. J Gen Phisiol 152:e201912475.
14. Hill R, Bendall F (1960) Function of the two cytochrome components in chloroplast: a working hypothesis. Nature 186:136-137.

15. Arnon, DI (1959) Conversion of light into chemical energy in photosynthesis. Nature 184:10-21.
16. Joliot P, Joliot A (2002) Cyclic electron transfer in plant leaf. Proceedings of the National Academy of Sciences 99:10209-14.
17. Rumeau D, Peltier G, Cournac L (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. Plant Cell Environ 30:1041-1051.
18. Nelson N, Yocum CF (2006) Structure and function of photosystems I and II. Annu Rev Plant Biol 57:521-565.
19. Palatnik JF, Tognetti VB, Poli HO, Rodríguez RE, Blanco N, Gattuso M, Hajirezaei MR, Sonnewald U, Valle EM, Carrillo N (2003) Transgenic tobacco plants expressing antisense ferredoxin-NADP(H) reductase transcripts display increased susceptibility to photo-oxidative damage. Plant J 35:332-34.
20. Gummadova JO, Fletcher GJ, Moolna A, Hanke GT, Hase T, Bowsher C (2007) Expression of multiple forms of ferredoxin $NADP^+$ oxidoreductase in wheat leaves. J Exp Bot 58:3971-3985.
21. Morales R, Charon MH, Kachalova G, Serre L, Medina M, Gomez-Moreno C, Frey M (2000) A redox-dependent interaction between two electron-transfer partners involved in photosynthesis. EMBO Rep 3:271-276.
22. Goss T, Hanke G (2014) The end of the line: can ferredoxin and FxNADP(H) oxidoreductase determine the fate of photosynthetic electrons? Curr Protein Pept Sci 15:285-293.
23. Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. Plant Physiol 155:2-18.
24. Kozuleva M, Goss T, Twachtmann M, Rudi K, Trapka J, Selinski J, Ivanov B, Garapati P, Steinhoff H-J, Hase T, Scheibe R, Klare JP, Hanke GT (2017) Ferredoxin:NADP(H) oxidoreductase abundance and location influences redox poise and stress tolerance. Plant Physiol 173:1933.
25. Benz JP, Soll J, Bolter B (2009) Protein transport in organelles: The composition, function and regulation of Tic62 complex in chloroplast protein import. FEBS J 276:1166-76.

26. Benz JP, Stengel A, Lintala M, Lee YH, Weber A, Philippar K, Gügel IL, Kaieda S, Ikegami T, Mulo P, Soll J, Bölter B (2009) Arabidopsis Tic62 and ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase form light-regulated complexes that are integrated into the chloroplast redox poise. Plant Cell 21:3965-3983.
27. Lintala M, Allahverdiyeva Y, Kangasjärvi S, Lehtimäki N, Keränen M, Rintamäki E, Aro EM, Mulo P (2009) Comparative analysis of leaf-type ferredoxin-NADP oxidoreductase isoforms in Arabidopsis thaliana. Plant J 57:1103-1115.
28. Schuster G, Ohad I, Martineau B, Taylor WC (1985) Differentiation and development of bundle sheath and mesophyll thylakoids in maize. Thylakoid polypeptide composition, phosphorylation, and organization of photosystem II. J Biol Chem 260:11866-11873.
29. Twachtmann M, Altmann B, Muraki N, Voss I, Okutani S, Kurisu G, Hase T, Hanke GT (2012) N-Terminal structure of maize ferredoxin:$NADP^+$ Reductase determines recruitment into different thylakoid membrane complexes. Plant Cell 24:2979-2991.
30. Forti G, Bracale M (1984) Ferredoxin-ferredoxin NADP reductase interaction, catalytic differences between the soluble and thylakoid bound complex. FEBS Lett 166:81–84.
31. Korn A, Ajlani G, Lagoutte B, Gall A, Sétif P (2009) Ferredoxin:$NADP^+$ oxidoreductase association with phycocyanin modulates its properties. J Biol Chem 284:31789–31797.
32. Egea I, Barsan C, Bian W, Purgatto E, Latche A, Chervin C (2010) Chromoplast differentiation: current status and perspectives. Plant Cell Physiol 51:1601–1611.
33. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2015) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. 2nd edn. John Wiley and Sons, New York.
34. Solymosi K, Schoefs B (2010) Etioplast and etio-chloroplast formation under natural conditions: the dark side of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. Photosynth Res 105:143-66.
35. Archibald JM (2009) The puzzle of plastid evolution. Curr Biol 19:R81-R8.
36. Wicke S, Schneeweiss GM, dePamphilis CW, Muller KF, Quandt D (2011) The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. Plant Mol Biol 76:273-297.
37. Demarsy E, Lakshmanan AM, Kessler F (2014) Border control: selectivity of chloroplast protein import and regulation at the TOC-complex. Front Plant Sci 5:483.

38. Stoebe B, Maier UG (2002) One, two, three: nature's box for building plastids. Protoplasma 219:123-130.
39. Allen JF (2003) Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. Comp Funct Genomics 4:31-36.
40. Bačić G, Mojović M (2005) EPR spin trapping of oxygen radicals in plants: A methodological overview. Ann. N. Y. Acad. Sci 1048:230-243.
41. Pyke KA, Leech RM (1994) A Genetic Analysis of Chloroplast Division and Expansion in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol 104:201-207.
42. Küchler M, Decker S, Hörmann F, Soll J, Heins L (2002) Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. EMBO J 21:6136-6145.
43. Stengel A, Benz P, Balsera M, Soll J, Bölter B (2008) TIC62 redox-regulated translocon composition and dynamics. J Biol Chem 283:6656-6667.
44. Kelly AA, Dorman P (2004) Green light for galactolipid trafficking. Curr Opin Plant Biol 7:262-269.
45. Kobayashi K, Kondo M, Fukuda H, Nishimura M, Ohta H (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. PNAS 104:17216-17221.
46. Kleine T, Voigt C, Leister D (2009) Plastid signalling to the nucleus: messengers still lost in the mists? Trends Genet 25:185-192.
47. Richly E, Dietzmann A, Biehl A, Kurth J, Laloi C, Apel K, Salamini F, Leister D (2003) Covariations in the nuclear chloroplast transcriptome reveal a regulatory master-switch. EMBO Rep 4:491-498.
48. Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiol 141:391-396.
49. Buchanan BB, Balmer Y (2005) Redox regulation: A broadening horizon. Ann Rev Plant Biol 56:187-220.
50. Geigenberger P, Fernie AR (2014) Metabolic control of redox and redox control of metabolism in plants. Antioxid. Redox Signal 21:1389-1421.
51. Hisabori T, Sunamura E, Kim Y, Konno H (2013) The chloroplast ATP synthase features the characteristic redox regulation machinery. Antioxid. Redox Signal 19:1846-1854.

52. Thormählen I, Ruber J, Von Roepenack-Lahaye E, Ehrlich S, Massot V, Huemmer C, Issakidis-Bourguet E, Geigenberger P (2013) Inactivation of thioredoxin f1 leads to decreased light activation of ADP glucose pyrophosphorylase and altered diurnal starch turnover in leaves of arabidopsis plants. Plant Cell Environ 36:16-29.
53. Richter AS, Peter E, Rothbart M, Schlicke H, Toivola J, Rintamäki E, Grimm B (2013) Posttranslational influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis. Plant Physiol 162:63-73.
54. Perez-Ruiz JM, Spinola MC, Kirchsteiger K, Moreno J, Sahrawy M, Cejudo FJ (2006) Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. Plant Cell 18:2356-2368.
55. Foyer CH, Ruban AV, Noctor G (2017) Viewing oxidative stress through the lens of oxidative signalling rather than damage. Biochem J 474:877-883.
56. Heber U (2002) Irrungen, Wirrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants. Photosynth Res 73:223-231.
57. Carmody M, Crisp PA, d'Alessandro S, Ganguly D, Gordon M, Havaux M, Albrecht-Borth V, Pogson BJ (2016) Uncoupling high light responses from singlet oxygen retrograde signaling and spatial-temporal systemic acquired acclimation. Plant Physiol 171:1734-1749.
58. Karpinski S, Reynolds H, Krapinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P (1999) Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. Science 284:654-657.
59. Exposito-Rodriguez M, Laissue PP, Yvon-Durocher G, Smirnoff N, Mullineaux P (2017) Photosynthesis-dependent H_2O_2 transfer from chloroplasts to nuclei provides a high-light signalling mechanism. Nat Commun 8:49.
60. Wagner D, Przybyla D, Op den Camp R, Kim C, Landgraf F, Lee KP, Wursch M, Laloi C, Nater M, Hideg E (2004) The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. Science 306:1183-1185.
61. Meskauskiene R, Nater M, Goslings D, Kessler F, op den Camp R, Apel K (2001) FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci 98:12826-12831.

62. op den Camp RG, Przybyla D, Ochsenbein C, Laloi C, Kim C, Danon A, Wagner D, Hideg E, Gobel C, Feussner I (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopsis. Plant Cell 15:2320-2332.
63. Piller EL, Glauser G, Kessler F, Besagni C (2014) Role of plastoglobules in metabolite repair in the tocopherol redox cycle. Front Plant Sci 5:298.
64. Kajala K, Covshoff S, Karki S, Woodfield H, Tolley BJ, Dionora MJ, Mogul RT, Mabilangan AE, Danila FR, Hibberd JM, Quick WP (2011) Strategies for engineering a two-celled C4 photosynthetic pathway into rice. J Exp Bot 62:3001.
65. Majeran W, Friso G, Ponnala L, Connolly B, Huang M, Reidel E, Zhang C, Asakura Y, Bhuiyan NH, Sun Q, Turgeon R, van Wijk KJ (2010) Structural and metabolic transitions of C4 leaf development and differentiation defined by microscopy and quantitative proteomics in maize. Plant Cell 22:3509-42.
66. Oberhuber W, Dai ZY, Edwards GE (1993) Light dependence of quantum yields of Photosystem II and CO_2 fixation in C 3 and C 4 plants. Photosynth Res 35:265-74.
67. Wang C, Guo L, Li Y, Wang Z (2012) Systematic comparison of C3 and C4 plants based on metabolic network analysis. BMC Syst Biol Suppl 2:S9.
68. Dengler NG, Nelson T (1999) Leaf structure and development in C4 plants. U: Sage RF & Monson RK (ed) C4 Plant Biology, Academic Press, San Diego, CA, USA 133-172.
69. Edwards GE, Voznesenskaya EV (2011) C4 photosynthesis: Kranz forms and single-cell C4 in terrestrial plants. U: Raghavendra AS & Sage RF (ed) C4 Photosynthesis and Related CO_2 Concentrating Mechanisms Springer, Dordrecht, Netherlands, 29-61.
70. Maai E, Shimada S, Yamada M, Sugiyama T, Miyake H, Taniguchi M (2011) The avoidance and aggressive movements of mesophyll chloroplasts in C4 monocots in response to blue light and abscisic acid. J Exp Bot 62:3213-3221.
71. Stata M, Sage TL, Rennie TD, Khoshravesh R, Sultmanis S, Khaikin Y (2014) Mesophyll cells of C4 plants have fewer chloroplasts than those of closely related C3 plants. Plant Cell Environ 37:2587-2600.
72. Karki S, Rizal G, Quick WP (2013) Improvement of photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by inserting the C4 pathway. *Rice* 6**,** 28.

73. Takahashi H, Kopriva S, Giordano M, Saito K, Hell R (2011) Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. Annu Rev Plant Biol 62:157-184.
74. Lanz ND, Booker SJ (2015) Auxiliary iron-sulfur cofactors in radical SAM enzymes. Biochim Biophys Acta 1853:1316-1334.
75. Hatzfeld Y, Saito K (2000) Evidence for the existence of rhodanese (thiosulfate:cyanide sulfurtransferase) in plants: preliminary characterization of two rhodanese cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 470:147-150.
76. Guretzki S, Papenbrock J (2011) Characterization of the sulfurtransferase family from *Oryza sativa* L. Plant Physiology and Biochemistry 49:1064-1070.
77. Cipollone R, Ascenzi P, Visca P (2007) Common themes and variations in the rhodanese superfamily. IUBMB Life 59:51-59.
78. Hofmann K., Bucher P. and Kajava, AV (1998) A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain. J Mol Biol 282:195-208.
79. Bordo D, Bork P (2002) The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. EMBO Rep 3:741-746.
80. Selles B, Moseler A, Rouhier N, Couturier J (2019) Rhodanase domain-containing sulfurtransferases: multifaced proteins involved in sulfur trafficking in plants. J Exp Bot 70:4139-4154.
81. Vojta L, Horvat L, Fulgosi H (2012) Balancing chloroplast redox status-regulation of FNR binding and release. Period Biol 114:25-31.
82. Vojta L, Fulgosi H (2019) Topology of TROL protein in thylakoid membranes of *Arabidopsis thaliana*. Physiol Plant 166:300-308.
83. Stengel KF, Holdermann I, Cain P, Robinson C, Wild K, Sinning I (2008) Structural basis for specific substrate recognition by the chloroplast signal recongnition particle protein cpSRP43. Science 321:253-256.
84. Kekić T, Fulgosi H, Vojta L, Bertoša B (2020) Molecular basis of ferredoxin:NADP($^+$) reductase interactions with FNR binding domains from TROL and Tic62 proteins. J Mol Struct 12:128281.

85. Lintala M, Schuck N, Thormählen I, Jungfer A, Weber KL, Weber AP, Geigenberger P, Soll J, Bölter B, Mulo P (2014) *Arabidopsis tic62 trol* mutant lacking thylakoid-bound ferredoxin:NADP oxidoreductase shows distinct metabolic phenotype. Mol Plant 7:45-57.
86. Jurić S (2010) The role of the gene product At4g01050 in the regulation of photosynthesis in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
87. Arnon DL (1949) Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol 24:1-15.
88. Wellburn A (1994) The Spectral Determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. J Plant Physiol 144:307-313.
89. Rac A (2015) Heterologna ekspresija gena FNR1 iz kukuruza u biljci Arabidopsis thaliana (L.), Heynh., diplomski rad, Odjel za biologiju, Osijek.
90. Küchler M, Decker S, Hörmann F, Soll J, Heins L (2002) Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. EMBO J 21:6136-6145.
91. Rac A, Fulgosi H (2019) Qualitative and quantitative dataset of TROL protein interaction with C3 and C4 ferredoxin: $NADP^+$ oxidoreductases. Data Brief 28:105038.
92. Balsera M, Stengel A, Soll J, Bolter B (2007) Tic62: a protein family from metabolism to protein translocation BMC Evol Biol 7:43.
93. Alte F, Stengel A, Benz JP, Petersen E, Soll J, Groll M, Bolter B (2010) Ferredoxin:NADPH oxidoreductase is recruited to thylakoids by binding to a polyproline type II helix in a pH-dependent manner. Proc Natl Acad Sci 107:19260-19265.
94. Allen JF (2003) Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. Trends Plant Sci 8:15-19.
95. Parkinson JS, Kofoid EC (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. Annu Rev Genet 26:71-112.
96. Mizuno T, Kaneko T, Tabata S (1996) Compilation of All Genes Encoding Bacterial Two-component Signal Transducers in the Genome of the Cyanobacterium, *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. DNA Research 6:407-414.
97. Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1993) Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. Science 262:539-44.

98. Kakimoto T (1996) CKI1, a Histidine Kinase Homolog Implicated in Cytokinin Signal Transduction Science 274, 5289:982-985
99. Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K (1999) A Transmembrane Hybrid-Type Histidine Kinase in Arabidopsis Functions as an Osmosensor. The Plant Cell 1743-1754.
100. Urao T, Miyata S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000) Possible His to Asp phosphorelay signaling in an Arabidopsis two-component system. FEBS Lett 478:227-32.
101. Hass C, Lohrmann J, Albrecht V, Sweere U, Hummel F, Yoo SD, Hwang I, Zhu T, Schäfer E, Kudla J, Harte K (2004) The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in Arabidopsis. EMBO J 23:3290-3302.
102. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN (2000) Two-componentsignal transduction. Annu Rev Biochem 69:183-215.
103. West AH, Stock AM (2001) Histidine kinases and response regu-lator proteins in two-component signalling systems. Trends Biochem Sci 26:369-376.
104. Reynolds RA, Yem AW, Wolfe CL, Deibel MR, Chidester CG, Watenpaugh KD (1999) Crystal structure of the catalytic subunit of Cdc25B required for G2/M phase transition of the cell cycle. J Mol Biol 293:559-568.
105. Lyon MA, Ducret AP, Wipf P, Lazo JS (2002) Dual-specificity phosphatases as targets for antineoplastic agents. Nat Rev Drug Discov 1:961-976.
106. Wardman P (1990) Bioreductive activation of quinones: redox properties and thiol reactivity. Free Radic Res Commun 8:219-229.
107. O'Brien PJ (1991) Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. Chem Biol Interact 80:1-41.
108. Rodriguez RE et al (2007) Transgenic tobacco plants overexpressing chloroplastic ferredoxin-NADP(H) reductase display normal rates of photosynthesis and increased tolerance to oxidative stress. Plant Physiol. 143:639-649.
109. Palatnik JF, Valle EM, Carillo N (1997) Oxidative stress causes ferredoxin-$NADP^+$ reductase solubilization from the thylakoid membranes in methyl viologen-treated plants. Plant Physiol 115:1721-1727.
110. Paul MJ, Foyer CH (2001) Sink regulation of photosynthesis. J Exp Bot 52:1383-1400.

111. Brown B, Cloix C, Jiang GH, Kaiserli E, Herzyk P, Kliebenstein DJ, Jenkins GI (2005) A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. Proc Natl Acad Sci USA 102:18225-18230.
112. Pandey S, Fartyal D, Agarwal A, Shukla T, James D, Kaul , Negi Y, Arora S, Reddy M (2017) Abiotic stress tolerance in plants: Myriad roles of ascorbate peroxidase. Front Plant Sci 8:58.
113. Jenkins GI (2009) Signal transduction in responses to UV-B radiation. Annu Rev Plant Biol 60:407-431.
114. Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schäfer E, Nagy F, Jenkins GI, Ulm R (2011) Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. Science 332:103-106.
115. Kliebenstein DJ, Lim JE, Landry LG, Last RL (2002) Arabidopsis UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human *Regulator of chromatin condensation 1*. Plant Physiol 130:234-43.
116. Favory JJ, Stec A, Gruber H, Rizzini L, Oravecz A, Funk M, Albert A, Cloix C, Jenkins GI, Oakeley EJ, Seidlitz HK, Nagy F (2009) Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. EMBO J 28:591-601.
117. Sztatelman O, Grzyb J, Gabryś H (2015) The effect of UV-B on Arabidopsis leaves depends on light conditions after treatment. BMC Plant Biol 15:281.
118. Poulson ME, Boeger MRT, Donahue RA (2006) Response of photosynthesis to high light and drought for Arabidopsis thaliana grown under a UV-B enhanced light regime. Photosynth Res 90:79.

Web izvori:

Web izvor 1: http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/3_metabolism/metabolism_3t_alt.htm.
Web izvor 2: https://biologyboom.com/light-reaction-or-photochemical-phase-or-hills-reaction/
Web izvor 3: https://www.open.edu/openlearn/science-maths-technology/science/tour-the-cell/content-section-4.11.
Web izvor 4: https://www.rcsb.org/structure/1RHD
Web izvor 5: http://www.biofeng.com/zaiti/jiaomu/pBD-GAL4-Cam.html.

Životopis

Anja Rac rođena je 31. ožujka 1990. godine u Đakovu gdje je završila Osnovnu školu Ivana Gorana Kovačića, a zatim i opću gimnaziju. 2009. godine upisala je biologiju na Sveučilištu J. J. Strossmayera u Osijeku na Odjelu za biologiju. Diplomski rad pod nazivom "Heterologna ekspresija gena FNR1 iz kukuruza u biljci *Arabidopsis thaliana* (L.), Heynh." izradila je u Laboratoriju za molekularnu biljnu biologiju i biotehnologiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom Prof. dr. sc. Hrvoja Fulgosija. Poslijediplomski studij biologije upisala je 2016. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.Članica je Hrvatskog društva za biljnu biologiju (HDBB).
Sudjelovala je na 3 ljetne škole: 1st FeSBioNet COST Training School, Caparica, Portugal (2017); FrenchBIC summer school, Marseille, Francuska (2017); COST Training School Calorimetry for Metalloprotein Analysis and Enzymology, Delft, Nizozemska (2019) s posterskim priopćenjima. Na 13. Hrvatskom biološkom kongresu u Poreču 2018. održala je predavanje "Importance of Ferredoxin; NADP+ oxidoreductase in photosynthetic alternative electron transfer pathways", a 2019. je sudjelovala na "The 44th FEBS Congress- From Molecules to living systems" u Krakovu sa posterskim priopćenjem.
Autorica i koautorica je dva znanstvena članka i jednog popularno-znanstvenog članka.

Znanstveni članci:
Rac A, Fulgosi H (2019) Qualitative and quantitative dataset of TROL protein interaction with C3 and C4 ferredoxin: NADP+ oxidoreductases. Data in Brief 28:105038.
Vojta L, Tomašić Paić A, Horvat L, Rac A, Lepeduš H, Fulgosi H (2019) Complex lumenal immunophilin AtCYP38 influences thylakoid remodelling in Arabidopsis thaliana. J Plant Physiol. 243:153048.

Popularno znanstveni članak:
Rac, Anja; Fulgosi, Hrvoje (2017)
Fantastičan svijet fotosinteze (Amazing World of Photosynthesis)
Priroda (mjesečnik za popularizaciju prirodnih znanosti Hrvatskog prirodoslovnog društva), godište: 107, broj 1056, 3-4/17.