

Ekspresija proteina djelomično neuređene tercijarne strukture u normalnim i stresnim uvjetima

Rončević, Tomislav

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:055537>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Tomislav Rončević

**EKSPRESIJA PROTEINA DJELOMIČNO NEUREGULIRANE TERCIJARNE
STRUKTURE U NORMALNIM I STRESNIM UVJETIMA**

Diplomski rad

Zagreb, 2014.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Tomislav Rončević

**EKSPRESIJA PROTEINA DJELOMIČNO NEUREĐENE TERCIJARNE
STRUKTURE U NORMALNIM I STRESNIM UVJETIMA**

Diplomski rad

Zagreb, 2014.

Ovaj diplomski rad, izrađen u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno – matematičkog fakulteta, pod vodstvom doc.dr.sc. Dubravka Pavokovića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno- matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja prof. biologije i kemije.

Doc.dr.sc. Dubravku Pavokovi u zahvaljujem na razumijevanju, pomoći, strpljenju i ugodnoj zajednici u suradnji u laboratoriju i izvan njega, te korisnim savjetima tijekom eksperimentalnog i pisanog dijela rada.

Svim profesorima, docentima, asistentima i ostalim zaposlenicima Zavoda za molekularnu biologiju zahvaljujem na susretljivosti i korisnim savjetima.

Hvala svim prijateljima na lijepim trenucima studentskih dana.

Hvala mojim roditeljima na ljubavi, strpljenju i podršci tijekom studiranja.

Veliko hvala zaručnici Marini, bratu Anti i prijatelju Daliboru na potpori, savjetima i nezaboravnim druženjima kroz sve studentske dane.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveu ilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matemati ki fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

EKSPRESIJA PROTEINA DJELOMI NO NEURE ENE TERCIJARNE STRUKTURE U NORMALNIM I STRESNIM UVJETIMA

Tomislav Ron evi
Prirodoslovno-matemati ki fakultet, Zavod za molekularnu biologiju,
Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Proteini djelomi no neure ene tercijarne strukture (IDP, *intrinsically disordered proteins*) su uklju eni u regulaciju, signalizaciju i kontrolne putove, te odgovore na razne vrste abioti kog i bioti kog stresa. Ovo istraživanje je provedeno na N, HO i HNO linijama še erne repe (*Beta vulgaris* L.). IDP su uspješno odvojeni od globularnih proteina, te su razdvojeni korištenjem modificirane poliakrilamidne gel elektroforeze. Ekspresija IDP se razlikovala izme u stani nih linija što ukazuje da su neki IDP regulirani razvojnim stadijem stanice. IDP iz sve tri stani ne linije še erne repe podvrgnuti su provjeri N-glikana. Rezultati upu uju da IDP nisu glikozilirani, iako to valja dodatno potvrditi. Odabrana je linija HO še erne repe, tretirana sa 300 mM manitolom i kadmijem u tri razli ite koncentracije (10 μ M, 40 μ M i 100 μ M CdCl₂) kako bi izazvali vodni stres, odnosno stres teškim metalima. Tretiranje manitolom izazvalo je promjene na fenotipskoj razini, manji prirast biljnog tkiva, pove anje aktivnosti peroksidaze, te razli itu ekspresiju IDP u usporedbi sa kontrolom. Tretiranje linije HO sa 100 μ M kadmijem tako er je dovelo do odgovora na fenotipskoj razini, pove anu aktivnost peroksidaze i razli itu ekspresiju IDP u usporedbi s kontrolom. Niže koncentracije kadmija nisu bile dovoljne da bi izazvale zna ajniji odgovor na stres izazvan teškim metalima.

(52 stranice, 18 slika, 7 tablica, 58 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Klju ne rije i: IDP, *Beta vulgaris* L., abiotski stres, kadmij, manitol, vodni stres

Voditelj: dr.sc. Dubravko Pavokovi , doc.

Ocjenitelji: dr.sc. Dubravko Pavokovi , doc.
dr.sc. Draginja Mrvoš-Sermek, izv.prof
dr.sc. Ines Radanovi , izv.prof

Rad prihva en: 10.09.2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

EXPRESSION OF INTRINSICALLY DISORDERED PROTEINS IN NORMAL AND STRESSFUL CONDITIONS

Tomislav Rončević
Faculty of science, Department of molecular biology,
Horvatovac 102 a, 10 000 Zagreb, Croatia

Intrinsically disordered proteins (IDPs) are involved in metabolic regulation, signalization, controlling pathways and in various types of biotic and abiotic stress. This study was conducted using N, HO and HNO sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines. We have successfully separated IDPs from globular proteins, and IDPs have been further analyzed using modified polyacrylamide gel electrophoresis. IDPs expression differed between cell lines indicating some IDPs are regulated by cell developmental stage. Isolated IDPs from the cell lines were tested whether they are N-glycosylated. Results are indicating that IDPs are not glycosylated, although this remains to be verified. HO line was chosen and treated with 300 mM mannitol and cadmium in three different concentrations (10 μ M, 40 μ M and 100 μ M CdCl₂) to cause water deficit and heavy metal stress. Mannitol treatment caused phenotype changes, slower cell growth, increase of peroxidase activity, as well as a change in IDP expression compared with control. Highest cadmium treatment also led to responses on a phenotype level, increase of peroxidase activity and different protein expression compared with control. Lower cadmium concentrations were not sufficient to produce significant response to heavy metal phytotoxicity.

(52 pages, 18 figures, 7 tables, 58 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: IDP, *Beta vulgaris* L., abiotic stress, cadmium, mannitol, water stress

Supervisor: dr.sc. Dubravko Pavoković, assoc. prof

Reviewers: dr.sc. Dubravko Pavoković, assoc. prof
dr.sc. Draginja Mrvoš-Sermek, assoc. prof
dr.sc. Ines Radanović, assoc. prof

Thesis accepted: 10.09.2014.

POPIS KRATICA I SIMBOLA

PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza

2,4-D – 2,4-diklorofenoksiocetena kiselina

2-D PAGE – dvodimenzionalna poliakrilamidna gel elektroforeza

3,3'-DAB - 3,3'- diaminobenzidin

AA – akrilamid

APS – amonijev persulfat

BAP – benzilaminopurin

Bis – N,N'-metilen-bis-akrilamid

BSA – gove i serumski albumin

CBB – Comassie Brilliant Blue boja

Cd 10 – PG0 hranidbena podloga sa 10 μM CdCl_2

Cd 100 – PG0 hranidbena podloga sa 100 μM CdCl_2

Cd 40 – PG0 hranidbena podloga sa 40 μM CdCl_2

ConA – konkanavalin A

Ctrl – PG0 kontrolna hranidbena podloga

deH₂O – destilirana voda

DHN – dehidrini

DTT – ditiotreitrol

HNO - prilagođena neorganogena linija šećerne repe (*Beta vulgaris* L.)

HO – prilagođena organogena linija šećerne repe (*Beta vulgaris* L.)

IDP – proteini djelomično neurone tercijarne strukture

IUP – djelomično nestrukturirani proteini

LDR – duga neurona regija

LEA proteini – proteini kojima je koncentracija obilna u stadiju kasne embriogeneze

Man – PG0 hranidbena podloga sa 300 mM manitolom

N – normalna linija šećerne repe (*Beta vulgaris* L.)

PVP – polivinilpirolidon

reH₂O – redestilirana voda

ROS – reaktivni oblici kisika

SDS – natrijev dodecil sulfat

SDS-PAGE – natrijev dodecil sulfat – poliakrilamidna gel elektroforeza

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiamin

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

TTBS – pufer TBS koji sadrži 0,1% (v/v) *Tween 20*®

D - aspartat

E - glutamat

G - glicin

I - izoleucin

K - lizin

L - leucin

M - metionin

N - aspargin

P - prolin

T - treonin

V - valin

Y – tirozin

SADRŽAJ

1	UVOD	- 1 -
1.1	Struktura globularnih proteina.....	- 1 -
1.2	Otkriće i priznavanje proteina djelomično neuređene tercijarne strukture (IDP).....	- 2 -
1.3	Bioinformatički pristup u identifikaciji i karakterizaciji IDP.....	- 4 -
1.4	Klasifikacija IDP.....	- 5 -
1.5	Uloga IDP u stanici.....	- 6 -
1.5.1	Uloga IDP u abiotičkom stresu.....	- 7 -
1.5.2	Mehanizam djelovanja i regulacija IDP.....	- 8 -
1.5.3	Post-translacijske modifikacije IDP.....	- 9 -
1.6	Stanice šećerne repe (<i>Beta vulgaris</i> L.) u uvjetima <i>in vitro</i>	- 9 -
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	- 11 -
3	MATERIJALI I METODE	- 12 -
3.1	Analiza genoma šećerne repe (<i>Beta vulgaris</i> L.) koristeći DisEMBL.....	- 12 -
3.2	Biljni materijal i tretmani.....	- 12 -
3.3	Tretiranje biljnog materijala manitolom i kadmijem (CdCl ₂).....	- 15 -
3.4	Izolacija IDP.....	- 15 -
3.5	Ukocentriravanje proteina membranskom ultrafiltracijom.....	- 15 -
3.6	Mjerenje koncentracije proteina.....	- 16 -
3.7	Natrijev dodecil sulfat - poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE).....	- 16 -
3.8	Nativna poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE).....	- 17 -
3.9	Denaturirajuća dvodimenzionalna poliakrilamidna gel elektroforeza (2D-PAGE) s urejom ...	- 18 -
3.10	Bojenje gela srebrovim nitratom.....	- 18 -
3.11	Bojenje gelova bojom CBB.....	- 19 -
3.12	Elektroprijenos proteina.....	- 19 -
3.13	Otkrivanje glikoziliranih proteina na membrani lektinom ConA.....	- 20 -
3.14	Spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti peroksidaze.....	- 20 -
4	REZULTATI	- 22 -
4.1	Bioinformatička analiza genoma šećerne repe (<i>Beta vulgaris</i> L.).....	- 22 -
4.2	Odvajanje IDP pomoću native poliakrilamidne gel elektroforeze (PAGE).....	- 23 -
4.3	Odvajanje IDP i globularnih proteina.....	- 24 -
4.4	Diferencijalna ekspresija IDP.....	- 24 -
4.5	Preparativni 2-D PAGE.....	- 26 -
4.6	Detekcija glikoziliranih proteina.....	- 27 -
4.7	Tretiranje linije HO šećerne repe (<i>Beta vulgaris</i> L.) manitolom i kadmijem (CdCl ₂).....	- 28 -
4.7.1	Aktivnost gvajakol peroksidazi.....	- 32 -
4.7.2	Ekspresija IDP u liniji HO nakon osam dana.....	- 33 -
4.7.3	Ekspresija IDP u liniji HO nakon četrnaest dana.....	- 36 -
5	RASPRAVA	- 40 -
6	ZAKLJUČAK	- 44 -
7	LITERATURA	- 45 -

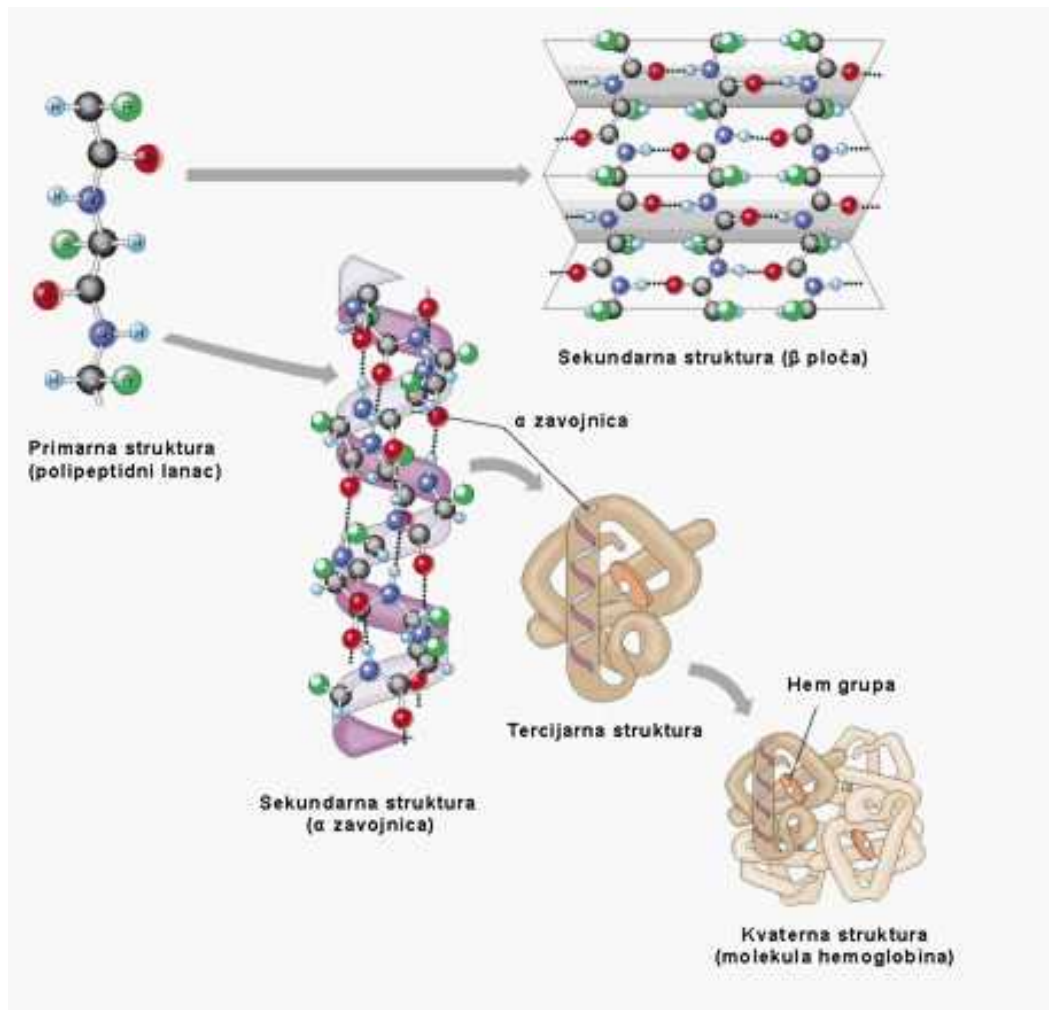
8	PRILOZI	- 50 -
9	ŽIVOTOPIS.....	- 51 -

1 UVOD

1.1 Struktura globularnih proteina

Proteini su linearni polimeri sastavljeni od osnovnih podjedinica – aminokiselina, koje su vezane peptidnom vezom (amidnom vezom). Većina prirodnih polipeptidnih lanaca sadrži od 50 do 2000 aminokiselina. Proteini su građeni od L – aminokiselina, iako nije jasno koja je evolucijska prednost L – aminokiselina u odnosu na D – aminokiseline. Svi proteini svih živih bića sadrže istih dvadeset aminokiselina, sa samo par iznimaka. Aminokiseline se sastoje od središnjeg C atoma, amino grupe, karboksilne grupe, H atoma i bojnog ogranka (R) po kojem se razlikuju. Bojni ogranci se međusobno razlikuju u veličini, naboju, kemijskoj reaktivnosti, hidrofobnom karakteru i mogućnosti stvaranja vodikovih veza (Berg i sur., 2006).

Razlikujemo četiri strukture proteina: primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternu. Linearni slijed aminokiselina predstavlja primarnu strukturu, a sekundarnoj strukturi odgovara prostorni raspored susjednih aminokiselina koji može biti pravilan tako da daje periodičku strukturu. U elemente sekundarne strukture spadaju α -zavojnica, β -ploha, α -okret i β -omotač. Tercijarna struktura predstavlja prostorni raspored udaljenih aminokiselina, te raspored disulfidnih veza (ukoliko postoje). Proteini koji imaju više polipeptidnih lanaca prikazuju četvrti nivo strukturalne organizacije u kojoj se svaki polipeptidni lanac naziva podjedinica. Kvaternu strukturu predstavlja prostorni raspored podjedinica i prirodu njihove interakcije (Berg i sur., 2006) (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz primarne, sekundarne, tercijarne i kvaterne strukture globularnih proteina.

(Izvor: <http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat/notes/API%20Notes%20D%20organic%20chem.htm>)

1.2 Otkriće i priznavanje proteina djelomično neuravnotežene tercijarne strukture (IDP)

Druga polovica dvadesetog stoljeća bila je vrijeme velikog napretka u strukturalnoj biologiji koja je velično mišljenje da je struktura glavni preduvjet za funkciju (Tompa, 2011). Iako su od samih početaka višestruki izuzeci tog mišljenja oni su sustavno zanemarevani i ignorirani. Tek koncem dvadesetog stoljeća pojavili su se konceptualni radovi u kojima se govori da su mnogi proteini u fiziološkim uvjetima neuravnoteženi (Tompa, 2012). Prvotno su nazvani *intrinsically unstructured proteins* (IUP, djelomično nestrukturirani proteini), a potom *intrinsically disordered proteins* (IDP, proteini djelomično neuravnotežene strukture). Potonji naziv pokazao se primjereniji jer naziv nestrukturiran (*unstructured*) implicira da IDP

potpuno nedostaje struktura, a to nije slučaj. Više od prije deset godina postalo je jasno da takvi proteini imaju kratke i duge segmente neurene strukturalne organizacije koja je dovela do promjene u terminologiji (Tompa, 2012). IDP je najbolje opisati kao fluktuirajuće nakupine neurene konformacije koja li i na nesmotana stanja globularnih proteina pri nefiziološkim, iznimno denaturirajućim, uvjetima (Csizmok i sur., 2007).

Od vremena kad su bili smatrani smeće proteinima, bez važne funkcije, IDP su konačno prepoznati kao široko raširen fenomen i kao proteini sa izrazito važnim funkcijama unutar stanice (Pietrosemoli i sur., 2013). O udjelu IDP u ukupnom proteomu nema pouzdanih podataka, ali Tompa (2012) sugerira da po konzervativnim procjenama 10-35% prokariotskih i 15-45% eukariotskih proteina sadrži LDR (*long disordered regions* - duge neurene regije) koji su dugi najmanje trideset uzastopnih aminokiselina. Pietrosemoli i sur. (2013) tvrde da se LDR susreću kod 2% arhejskih, 4,2% eubakterijskih i 33% eukariotskih proteina. Međutim, ono oko čega vlada konsenzus je da IDP u većoj količini susrećemo kod organizama sa većom kompleksnošću. Zadnja istraživanja su pokazala da su eukariotski proteomi izrazito obogaćeni sa IDP u odnosu na bakterijske i arhejske, što možda odražava veću potrebu za signalizacijom i transkripcijskom regulacijom u stanica sa jezgrom (Westerheide i sur., 2012).

Specifična priroda IDP predstavlja problem pri eksperimentalnoj identifikaciji i karakterizaciji. IDP su najčešće otporni na toplinu što je poslužilo kao prikladan način za proširenje toplinskom denaturacijom globularnih proteina (Csizmok i sur., 2007). Csizmok i sur. (2006) su razvili metodu dvodimenzionalne elektroforeze za njihovo prepoznavanje i karakterizaciju. Ova tehnika kombinira nativnu gel elektroforezu proteina podvrgnutih tretmanu toplinske denaturacije, i drugu, denaturirajuću gel elektroforezu s 8 M urejom. Toplinska denaturacija predstavlja potpuno odvajanje IDP od globularnih proteina, većina kojih agregira i precipitira. U prvoj dimenziji IDP i globularni proteini se razdvajaju prema omjeru naboja/masa. U drugoj dimenziji (koja sadrži 8 M ureju) dolazi do denaturiranja globularnih proteina koji usporavaju svoje kretanje, dok IDP prealjuju jednaku udaljenost kao u prvoj dimenziji i pozicioniraju se duž dijagonale, s obzirom da su jednako denaturirani u 8 M ureji kao i u nativnim uvjetima.

Nedostatak definirane tercijarne strukture isključuje upotrebu mnogih eksperimentalnih tehnika pri istraživanju proteinske neurenosti. S obzirom da IDP ne kristaliziraju, nuklearna magnetska rezonanca je jedina metoda kojom se mogu dobiti podaci

o strukturi na atomskom nivou (Yi i sur., 2007). Unato razvoju eksperimentalnih tehnika, bioinformatičke predikcije i dalje igraju odličnu ulogu u istraživanjima strukturalne neureneosti. Baza podataka DisProt sadrži 1539 neureneih regija u 694 proteina (<http://www.disprot.org/>) što predstavlja veliki jaz između eksperimentalne i ekvivalentne strukturalne neureneosti, te ostavlja puno prostora za bioinformatičke studije (Tompa, 2011).

1.3 Bioinformatički pristup u identifikaciji i karakterizaciji IDP

Postoje i eksperimentalne procedure napravljene su za određene proteine, i većina tehnika pruža samo indirektnu informaciju o neureneosti. Međutim, dostupna je njihova aminokiselinska sekvenca koja se može iskoristiti za identifikaciju i karakterizaciju bioinformatičkim alatima. Prva analiza sekvenci IDP otkrila je znatne razlike u sastavu određene i neureneih proteina. Neureni proteini su siromašni hidrofobnim i aromatskim aminokiselinama, dok su bogati polarnim i nabijenim aminokiselinama (Dosztanyi i sur., 2009).

Uobičajna upotreba faktora procjene neureneih struktura (prediktora) većinom uključuje velika istraživanja koja se često rade na cijelom proteomu. U tom slučaju jedino se LDR uzimaju u obzir. U takve svrhe koriste se prediktori kao IUPred (<http://iupred.enzim.hu/>), DisPSSMP (<http://www.biominer.bime.ntu.edu.tw/ipda>) ili PONDR VL3 (<http://www.pondr.com/index>). Međutim, upotrebom prediktora kao što su DISpro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) i DISOPRED2 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) mogu se detektirati mali neureni segmenti unutar globularnih domena (Dosztanyi i sur., 2009). Svaki od spomenutih prediktora koristi različite parametre pri određivanju neureneosti. Kako ne postoji jasna definicija neureneosti, Linding i sur. (2003) su razvili vlastite parametre pri razvijanju prediktora sa umjetnom neuralnom mrežom - DisEMBL-a (<http://dis.embl.de/>).

DisEMBL koristi tri različita kriterija pri procjeni neureneosti: *loops/coils* (petlje/zavojnice), *hotloops* (vrhove petlje), *remark 465* (primjedba 465). *Loops/coils* (petlje/zavojnice) nisu nužno neurene, ali neurenost proteina se nalazi samo unutar petlji/zavojnica. Iz toga slijedi da je procjena petlji/zavojnica bitan, iako ne dovoljan preduvjet za procjenu neureneosti. Ovaj kriterij je najbolje promatrati kao filter da se uklone

lažni pozitivni rezultati. *Hotloops* (vrue petlje) predstavlja rafinirani podskup gore navedenog, petlje/zavojnice sa visokim stupnjem mobilnosti. Iz toga slijedi da visoko dinamične petlje/zavojnice treba smatrati proteinskom neureenosti. *Remark 465* (primjedba 465) se oslanja na podatke dobivene rendgenskom kristalografijom. Nedostatak elektronske gustoće odražava neureenost proteina i od početka je korišten u procjeni neureenosti. Osnovni problem sa podacima dobivenim rendgenskom kristalografijom je da su ti podaci ovisni o onome što se nalazi u PDB (Protein Data Bank) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (Linding i sur., 2003).

1.4 Klasifikacija IDP

Studije vezane uz pojavu proteinske neureenosti su rađene na malom broju proteina, što ograničava njihovu klasifikaciju. Dunker je podijelio IDP u 28 različitih grupa oslanjajući se na samo 90 primjera (Dunker i sur., 2002). Tompa je podijelio IDP na 5 (Tompa, 2002), a kasnije na 6 kategorija (Tompa, 2005) oslanjajući se na 20, a kasnije 45 neureenih proteina. Bez sumnje, proširenje baza podataka DisProt za jedan ili dva reda veličine proširit će naše shvaćanje kako IDP funkcioniraju i olakšati njihovu klasifikaciju (Czismok i sur., 2007).

U biljaka najčešće pronalazimo pet velikih skupina IDP – proteini LEA, transkripcijski faktori NAC, transkripcijski faktori bZIP, proteini GRAS i CRY (Xu i sur., 2008).

LEA (*late embryogenesis abundant*) su najveća grupa neureenih proteina koji pomažu biljci u prilagodbi na abiotički stres kao što je suša, niske temperature i sl. U normalnim uvjetima, proteine LEA susrećemo u većim količinama u kasnim fazama razvoja sjemenke, kad embrio postaje otporan na sušu. U većim količinama susrećemo ih i u tkivima sa velikom metaboličkom aktivnošću kao što su vrhovi korijena i listova. Većina proteina LEA je podijeljena u tri veće grupe (grupa 1, 2 i 3) od kojih je grupa 2 najveća, a još se naziva i DHN (dehidrini) (Sun i sur., 2013). Dehidrini sadrže dijelove bogate lizinom, K segmente aminokiselina (EKKGIMDKIKEKLPG), te S segmente bogate serinom i Y segmente aminokiselina (T/VDEYGNP) koji su obično locirani blizu N-kraja. S obzirom na te segmente dijele se na pet podgrupa: Y_nSK_n , Y_nK_n , SK_n , K_n i K_nS (Xu i sur., 2008).

Transkripcijski faktori NAC i bZIP su dvije velike grupe transkripcijskih faktora koji sadrže domenu za vezanje DNA, domenu za regulaciju transkripcije, a katkad i tre u domenu za dimerizaciju. Transkripcijski faktori NAC su ključni regulatori razvojnih procesa, odgovora na abiotički stres, obrane biljke, procese starenja i formacije ksilema (Sun i sur., 2013). Kao druga najveća grupa transkripcijskih faktora, bZIP regulira eukariotske gene uključene u razvoj, metabolizam, cirkadijski ritam i odgovore na stres. Transkripcijski faktori su često uključeni u komplicirane i fleksibilne proteinske interakcije sa ostalim članovima grupe transkripcijskih faktora i/ili sa signalizacijskim proteinima (Sun i sur., 2013). Srivastava i sur. (2013) su pokazali da se BiP (*binding protein*), koji je šaperon u endoplazmatskom retikulumu, veže za bZIP28, zadržavajući ga u endoplazmatskom retikulumu u nestresnim uvjetima. U odgovoru na stres BiP se odvajava omogućavajući da bZIP uđe u Golgijev aparat gdje se proteolitički procesira nakon čega ulazi u jezgru.

Proteini GRAS su specifični samo za biljke i igraju ključnu ulogu u razvoju biljke, signalizaciji, transkripcijskoj koaktivaciji, te djeluju kao sakupljači i okolišnih signala i signala biljnog rasta. Dijele se u deset podgrupa, a svaka podgrupa djeluje na različite aspekte biljnog rasta i razvoja (Sun i sur., 2013).

Proteine CRY nalazimo u biljkama, životinjama i bakterijama. Igraju ključnu ulogu u biljnoj signalizaciji. Proteini CRY su flavoproteini koji kataliziraju popravak DNA oštećene UV svjetlom. I kod biljaka i kod životinja C-kraj proteina CRY je varijabilan, što omogućava plastičnost koja je nužna za učinkovito prepoznavanje više partnera (Sun i sur., 2013). Potreba za fenotipskom plastičnošću je posebno izražena u biljaka (kao sesilnih organizama) za prilagodbu i preživljavanje u promjenjivom okolišu (Pietrosemoli i sur., 2013).

1.5 Uloga IDP u stanici

IDP su obično uključeni u regulaciju, signalizaciju i kontrolne putove, te se nadopunjuju sa drugim proteinima koji su evoluirali u smjeru što efikasnijih katalizatora. S obzirom da IDP igraju ključne uloge u brojnim biološkim procesima nije iznenađujuće da su uključeni u ljudske bolesti, npr. povezani su s Alzheimerovom bolesti, Downovim

sindromom, Parkinsonovom bolesti itd. Prisutnost neure enosti je primije ena i kod brojnih proteina koji su povezani sa rakom, kao što su p53, p57 i TC-1(Westerheide i sur., 2012).

Odre ene funkcionalne klase proteina (transkripcijski faktori, transkripcijski regulatori, *hub* proteini, *scaffold* proteini, signalizacijski proteini, šaperoni...) su iznimno bogate sa neure enim regijama. Visoki postotak neure enosti u transkripcijskim faktorima sugerira da unutrašnja neure enost strukture igra primarnu ulogu u funkcioniranju transkripcijskih faktora koji vrše molekularno prepoznavanje, vezanje DNA i transkripcijsku regulaciju. IDP vrše i funkciju šaperona. Šaperoni su važan dio stani ne kontrole, a održavaju ravnotežu između proteinske sinteze i degradacije, te štite stanice od posljedica nekontrolirane proteinske agregacije. Kao primjer možemo istaknuti HSCS (*heat shock cognate proteins*) koji pomažu pri proteinskoj translaciji, smatanju novosintetiziranih proteina, te pri translokaciji proteina u stani ne odjeljke kao što su mitohondriji i kloroplasti (Westerheide i sur., 2012).

1.5.1 Uloga IDP u abioti kom stresu

Stres je u fizi kim terminima definiran kao mehani ka sila na neki predmet po jedinici površine. Najprakti nija definicija biološkog stresa je odre ena sila ili stanje koje inhibira normalno funkcioniranje i dobrobit bioloških organizama poput biljaka. Stres može biti bioti ki i abioti ki. U bioti ki stres spadaju patogeni, insekti, herbivori i sl., dok u abioti ki spadaju visoka i niska temperatura, slanost, radijacija, suša, kemikalije (teški metali, pesticidi) i sl. (Mahajan i Tuteja., 2005). Za vrijeme stresnih uvjeta, dolazi do promjene ekspresije tisu a proteina. U stanici raste aktivnost peroksidaza (Gao i sur., 2012). Peroksidaze su enzimi s brojnim biokemijskim i fiziološkim ulogama u višim biljkama. Sudjeluju u rastu biljke, diferencijaciji i razvojnim procesima, odgovoru na patogene itd. Danas je od posebnog interesa prou avanje uloge peroksidazi u H₂O₂-posredovanim signalnim procesima kao odgovor na abioti ki i bioti ki stres u biljaka (Has-Schon i sur., 2005).

IDP imaju izrazito važnu ulogu u odgovoru na abioti ki stres. U tom kontekstu najintenzivnije su promatrani proteini LEA koji su asocirani sa stani nom tolerancijom na sušu induciranu smrzavanjem, visokom slanoš u i isušivanjem. U tim uvjetima enzimi mogu agregirati i izgubiti svoju kataliti ku aktivnost, poput enzima citrat sintaze i laktat dehidrogenaze nakon isušivanja ili smrzavanja. Odre eni proteini LEA mogu sprije iti

njihovu agregaciju i inaktivaciju (Hincha i Thalhammer, 2012). Najintenzivnije istraživani proteini LEA su dehidrini (2. grupa). Otkriveni su osamdesetih godina i od tada su provedena istraživanja koja su pružila uvid u njihovu multifunkcionalnost (Hara, 2010). Dehidrine nalazimo u citoplazmi, vakuoli i jezgri, a lokacija je u nekim slu ajevima tkivno specifi na (Mouillon i sur., 2006). Karakterizirani su s K segmentom, a mogu sadržavati Y segment, te S segment (Dube i sur., 2013). lanovi dehidrinske grupe LEA su proteini ERD (*early response to dehydration*) 10 i ERD 14, izrazito potentni molekularni šaperoni (Kovacs i sur., 2008). Osim što sprje avaju agregaciju uzrokovanu dehidracijom, dehidrini imaju istu ulogu i tijekom visokih temperatura (Yang i sur., 2012). Kovacs i sur. (2008) su pokazali da ERD 10 i ERD 14 uspješno sprje avaju termalnu agregaciju enzima alkohol dehidrogenaze, citrat sintaze, luciferaze i lizozima.

Proteini LEA igraju i važnu ulogu u odgovoru biljaka na teške metale. Ban i sur. (2011) su pokazali da transkripcijski faktori *DRE-binding* (DREB) igraju ulogu u odgovoru biljke na stres izazvan bakrom, i to na na in da poja avaju aktivnost proteina LEA u biljci. Funkcija gena LEA iz vrste *Tamarix androssowii* je tako er karakterizirana u odgovoru na stres induciran teškim metalima. Pokazalo se da NaCl, ZnCl₂, CuSO₄ i CdCl₂ poja avaju ekspresiju gena *TaLEA1*, sugeriraju i da ovaj gen igra ulogu u odgovore na stres izazvan ovim metalima (Gao i sur., 2012).

1.5.2 Mehanizam djelovanja i regulacija IDP

Nedostatak rigidne globularne strukture u fiziološkim uvjetima predstavlja zna ajnu funkcionalnu prednost koja dozvoljava proteinski promiskuitet – vezanje više partnera. Do nedavno se mislilo da prilikom vezanja neure eni proteini postaju ure eni (*disorder-to-order transition*). Pomnije promatranje je pokazalo da IDP kompleksi mogu zadržati funkcionalno zna ajnu neure enost u kompleksu sa vezanim partnerom(-ima), a taj fenomen je nazvan *fuzziness* (Gontero i Maberly., 2012). Ve je navedeno da IDP u stanici, me u ostalim, djeluju kao šaperoni. Iako je ta injenica neupitna, sam mehanizam djelovanja je još uvijek nejasan. Jedan od predloženih na ina funkcioniranja je tzv. *entropy transfer model* (Haaning i sur., 2008). Prema ovom modelu vezanje neure enog šaperona za krivo smotani supstrat je pra eno sa ure enjem šaperona i posljedi nim odmatanjem supstrata (Westerheide i sur., 2012). Tompa (2011) konstatira kako IDP mogu biti regulirani specijaliziranim pomo nim

proteinima nazvanim *nannies*. Pokazalo se da su proteini sa velikim stupnjem nereda ja e regulirani nego proteini sa manjim stupnjem nereda. Isto tako, odre eni inhibitori male molekulske veli ine mogu se vezati na neure ene regije. S obzirom na estu uklju enost IDP u razne bolesti, mogu nost da se naruši njihova aktivnost predstavlja potencijal za razvoj lijekova (Tompa 2011).

1.5.3 Post-translacijske modifikacije IDP

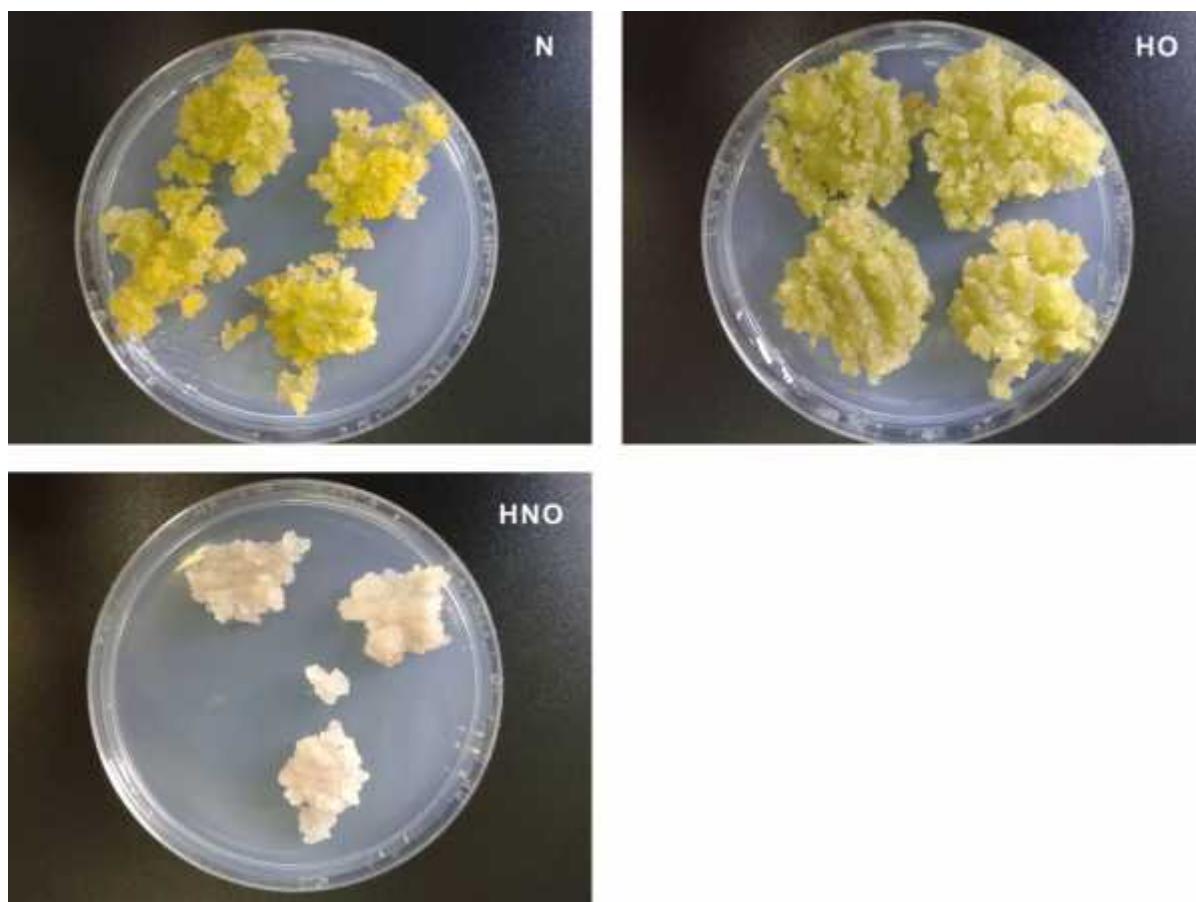
Proteinska fosforilacija i defosforilacija su klju ni u signalizaciji. Oko tre ine eukariotskih proteina je fosforilirano, a mnoga mjesta proteinske fosforilacije su okarakterizirana kao neure ena (Westerheide i sur., 2012). Osim fosforilacije, acetilacija i O-glikozilacija pokazuju preferenciju za pojavljivanjem u neure enim regijama. Metilacija ima tendenciju pojavljivati se u ure enim proteinskim regijama, dok N-glikozilacija ne pokazuje preferenciju izme u ure nih i neure nih proteinskih regija (Kurotani i sur., 2014).

Neure ene proteinske regije su esto uklju ene u post-translacijske modifikacije. O igledno, za to postoje odre ene prednosti. Post-translacijske modifikacije obi no uzrokuju male promjene na površini strukturiranih proteina, dok se velike strukturalne promjene, poput prijelaza neure eno-u-ure eno (*disorder-to-order transition*) mogu o ekivati u neure enim regijama. Ve e strukturalne promjene imaju ja i u inak na proteinsku funkciju osiguravaju i ja i regulatorni u inak post-translacijskih modifikacija (Kurotani i sur., 2014). Post-translacijske modifikacije se ne doga aju nužno unutar neure nih regija. Nespoulous i sur. (2012) su pokazali da se fosforilacija membranskih proteina u *Arabidopsisu* eš e doga a unutar ure nih regija. Takvo otkri e je neo ekivano, a razlog tome možda može biti da ta fosfomjesta imaju više gra evnu, a ne regulatornu ulogu (Nespoulous i sur., 2012).

1.6 Stanice še erne repe (*Beta vulgaris* L.) u uvjetima in vitro

Tri linije še erne repe (*Beta vulgaris* L.) potje u od iste maj inske linije zapo ete od strane de Greef i Jacobsa (1979). Jedna linija je okarakterizirana kao normalna, a dvije kao prilago ene. Prilagodbe su u biljkama obi no definirane stabilnim i nasljednim gubitkom potreba za regulatorima rasta, bez transformacije putem patogena. Normalni kalus (N) je

zelen i kompaktan, sastavljen uglavnom od izduženih stanica i diferenciranih trahealnih elemenata. Ove stanice su izgubile signale da se organiziraju u prava tkiva i organe. Prilago ena organogena linija (HO) je manje zelena u odnosu na N liniju, ali sadrži klorofil. Neovisna je o regulatorima rasta – auksinu i citokininu, te je jedina koja formira izbojke. Prilago ena neorganogena linija (HNO) je sastavljena od nešto stanica nalik parenhimu i malih stanica koje se aktivno dijele. HNO stanice su neovisne o regulatorima rasta (auksinu i citokininu), a u potpunosti su izgubile totipotentnost (Slika 2). Za razliku od N i HO linije, HNO pokazuje nedostatak klorofila (Poder i sur., 1998). Prilago ene linije še erne repe pokazuju, u odnosu na normalnu kulturu, kra u linearnu fazu rasta. Reducirana lignifikacija i hiperhidriranost navodi nas da prilago ene linije klasificiramo kao vitrificirana tkiva (Hagege i sur., 1991).



Slika 2. Linije še erne repe (*Beta vulgaris* L.) uzgojene u uvjetima *in vitro*. N – normalna linija, HO – prilago ena organogena linija, HNO – prilago ena neorganogena linija.

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Podru je istraživanja IDP zaživjelo je tek krajem dvadesetog stolje a. Iako mlado podru je, pokazalo je da su IDP uklju eni u brojne regulatorne i signalne procese u stanici, a evidentna je i njihova povezanost sa razvojnim procesima, stresnim stanjima organizma i brojnim bolestima. Zbog nedostatka definirane tercijarne strukture nailazimo na manjak eksperimentalnih metoda koje se mogu koristiti u njihovom istraživanju kao i rezultata takvih istraživanja, napose u istraživanjima biljaka.

Stoga su ciljevi ovog istraživanja:

- Uspješno odvojiti IDP od globularnih proteina iz biljne stanice, te ih razdvojiti na poliakrilamidnome gelu koriste i izmijenjenu metodu po Czismok i sur. (2006).
- Utvrditi postoje li razlike u ekspresiji IDP izme u stani nih linija N, HO i HNO še erne repe.
- Pri funkcioniranju velikog dijela proteina važnu ulogu igraju post-translacijske modifikacije, kao npr. glikozilacija. Cilj nam je bio utvrditi da li su IDP glikozilirani.
- Liniju HO še erne repe odlu ili smo podvrgnuti tretmanu s 300 mM manitolom koji uzrokuje vodni stres, te sa tri koncentracije kadmija (10 μM CdCl₂, 40 μM CdCl₂ i 100 μM CdCl₂) koji uzrokuje stres teškog metala. Cilj tog dijela istraživanja je:
 - Ispitati utjecaj stresa na prirast biljnog tkiva koje je raslo na kontrolnoj podlozi i na podlogama s manitolom i CdCl₂.
 - Utvrditi aktivnost gvajakol peroksidazi kao indikatora stresa.
 - Ustanoviti razlike u ekspresiji IDP u liniji HO, koja je rasla na kontrolnoj podlozi i na podlogama s manitolom i kadmijem (CdCl₂).

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Analiza genoma šeerne repe (*Beta vulgaris* L.) koriste i DisEMBL

Genom šeerne repe (*Beta vulgaris* L.) preuzet je sa <http://bvseq.molgen.mpg.de/Genome/Download/KDHBv/?C=D;O=A> (datoteka: KDHBv.genes.1302.pep.fa). Preuzeti genom je analiziran na operativnom sustavu Mac OS X 10.7.5. koriste i DisEMBL 1.4 – prediktor sa umjetnom neuralnom mrežom koji je dostupan na <http://dis.embl.de>. Za pokretanje DisEMBL-a 1.4 bilo je potrebno instalirati Python 2.7 (<https://www.python.org/download/releases/2.7>), Biopython 1.63 (<http://biopython.org/wiki/Download>) i Tisean 2.1 (http://www.mpipks-dresden.mpg.de/~tisean/TISEAN_2.1/index.html). DisEMBL koristi tri različita kriterija prilikom predikcije proteina tercijarne neurene strukture – *loops/coils*, *hot loops*, i *remark 465*.

Unose i naredbu `grep -c ">" KDHBv.genes.1302.pep.fa` izra unali smo ukupan broj proteina u šeernoj repi (*Beta vulgaris* L.), a naredbom `grep "HOTLOOPS" results | perl -Ine '@array = split(",",$); foreach $val(@array){ $val=~/(d+)-(d+)/; if($2-$1 > 30){ $count++ } if ($count >= 1){ $countNew++; $count = 0 } } {print $countNew}'` izra unali smo broj proteina koji imaju barem jedan LDR prema *hotloops* kriteriju DisEMBL-a. LDR je definiran kao podruje koje se sastoji od najmanje 30 uzastopnih neurenih aminokiselina.

3.2 Biljni materijal i tretmani

U pokusima su korištene linije šeerne repe N, HO i HNO koje potječu od iste majinske biljke, kultivirane u uvjetima *in vitro* na krutom hranjivom mediju PG0 (Tablica 1). Medij je steriliziran autoklaviranjem 10 minuta pri 120 °C. Stanične linije su rasle u komori rasta održavanoj na 22 °C, sa fotoperiodom od 16 h (80 μmol fotona m⁻² s⁻¹). Stanične linije

su održavane na na in da su svakih 14 dana presa ivane na svježu hranjivu podlogu. Presa ivanje se vršilo u sterilnim uvjetima u laminaru s horizontalnim protokom zraka. Svi instrumenti su sterilizirani u 96%-tnom etanolu i spaljeni na plamenu prije po etka presa ivanja. Linija N je presa ivana na podlogu sa regulatorima rasta, dok su linije HO i HNO presa ivane na podlogu bez regulatora rasta. Za potrebe pokusa tkiva su uzorkovana nakon 6 i 13 dana, izvagana, smrznuta u teku em dušiku i pohranjena na - 80 °C.

Tablica 1. Sastav PG0 hranjivog medija.

<u>Makroelementi:</u>	c/mM	mg/L
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1.81	250
KCl	8.05	600
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.03	400
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2.03	500
KNO ₃	19.80	2000
CaCl ₂ x 2H ₂ O	2.04	300
<u>Mikroelementi:</u>	c/μM	mg/L
H ₃ BO ₃	10	0.620
MnSO ₄ x 2H ₂ O	10	1.680
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	3.7	1.060
KI	9.5	1.583
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.1	0.025
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.01	0.0025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.01	0.0025
Na ₂ EDTA	100	37.3
FeSO ₄ x 7H ₂ O	100	27.6
<u>Organske komponente:</u>	c/μM	mg/L
Inozitol	5.5	1
Vitamin B1	0.03	0.1
Vitamin B6	0.06	0.01
Nikotinska kiselina	0.08	0.01
<u>Regulatori rasta:</u>	c/μM	mg/L
2,4 - D	0.45	0.1
BAP	0.44	0.1
<u>Mješavina:</u>		
Agar-agar	7.5 g/L	
Saharoza	30 g/L	

3.3 Tretiranje biljnog materijala manitolom i kadmijem (CdCl₂)

Za potrebe pokusa abiotičkog stresa korištena je linija HO koja je podvrgnuta tretmanu s manitolom (300 mM), odnosno kadmijem (10 μM, 40 μM i 100 μM). Manitol je otopljen u hranjivu podlogu, dok je kadmij dodan iz matične otopine 0,1 M CdCl₂ u hranjivu podlogu koja je autoklavirana 10 minuta pri 120°C i izlivena u Petrijevu zdjelicu (25 mL). Na hranjive podloge je presaeno 2 g kalusnog tkiva u sterilnim uvjetima, u laminarnu sa horizontalnim protokom zraka. Svi instrumenti su sterilizirani u 96%-tnom etanolu i spaljeni na plamenu prije početka presaivanja. Tkiva su uzorkovana nakon 8 i 14 dana, izvagana, smrznuta u tekućem dušiku i pohranjena na - 80 °C.

3.4 Izolacija IDP

Za izoliranje IDP korištena je izmijenjena metoda po Czismok i sur. (2006). Uzorak tkiva (1,2 g) je usitnjen koristeći prethodno ohlađeni tarionik i tu ak. Tkivo je homogenizirano u 0,8 mL ekstrakcijskog pufera koji sadrži 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2 mM DTT; pH 7,5 i polivinilpirolidonu (PVP) (na vrh spatule). Stanični ostaci su uklonjeni centrifugiranjem 2 h pri 25 000 g i 4 °C. Supernatant je prebačen u nove tube, zagrijan na 100 °C 10 minuta i ponovno centrifugiran 2 h pri 25 000 g i 4 °C. Supernatant je pohranjen na - 20 °C.

3.5 Ukocentriranje proteina membranskom ultrafiltracijom

Nakon ekstrakcije proteina izvršeno je ukocentriranje membranskom ultrafiltracijom (Amicon 30 kDa, Millipore, Germany). Na centrikone se spoje posudice za filtrat i u njih prebace proteinski ekstrakti. Centrikoni se centrifugiraju 2 h i 30 minuta pri 5500 g i 5 °C na način da se nakon prvog i drugog sata centrifuga zaustavi i resuspendira

proteinski ekstrakt. Po završetku centrifugiranja, na centrikone se stave Eppendorf tubice (1.5 mL) kojima se odreže zatvarač, sve okrene za 180 ° i centrifugira dodatne 2 minute pri 500 g i 5 °C kako bi se koncentrirani uzorak proteina prebacio u tubice. Proteinski ekstrakt je pohranjen na - 20 °C.

3.6 Mjerenje koncentracije proteina

Ova metoda se temelji na vezanju boje CBB G-250 na proteine metodom po Bradfordu (1976). Koncentracija proteina određuje se prema unaprijed pripremljenom baždarnom pravcu otopine BSA. Za 10 mL te otopine izvaže se 20 mg BSA i doda 10 mL ekstrakcijskog pufera. Koncentracija se mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 595 nm koristeći spektrofotometar (UV/VIS Unicam Spectrometer UV 4, UK). Najprije se napravi slijepa proba (10 µL ekstrakcijskog pufera + 990 µL Bradford radne otopine koja sadrži 2,85% (v/v) C₂H₅OH, 5,28% (v/v) H₃PO₄ i 6% (v/v) Bradford mati ne otopine), a potom izmjeri apsorbancija koristeći i po dvije replike svakog uzorka (10 µL + 990 µL Bradford radne otopine).

3.7 Natrijev dodecil sulfat - poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Elektroforeza je provedena u mini vertikalnom poliakrilamidnom gelu (0,75 mm) po Laemmliju (1970) sa 1 x elektrodni puferom (100 mL 10 x elektrodni pufer, 900 mL de H₂O). 10 x elektrodni pufer sadrži 0,25 M Tris, 1,25 M glicin i 10 % (w/v) SDS. Uzorci su razdvajani 15 minuta pri 120 V u gelu za koncentriranje (4 %), i pri 190 V u gelu za razdvajanje (12 %) dok boja bromfenol plavo ne dođe do kraja gela (Tablica 2).

Tablica 2. Sastav gela za elektroforezu u denaturiraju im uvjetima

	gel za razdvajanje (12%)	gel za koncentriranje (4%)
reH₂O	3,35 mL	3,050 mL
Tris/HCl	1,5 M, pH 8,8; 2,50 mL	0,5 M, pH 6,8; 1,250 mL
AA/Bis	4,0 mL	0,665 mL
SDS	100 µL	50 µL SDS
APS	50 µL	35 µL APS
TEMED	5 µL	8 µL

3.8 Nativna poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)

Prva dimenzija je provedena u velikom i mini vertikalnom poliakrilamidnom gelu (0,75 mm) po Laemmliju (1970) sa 1 x elektrodni puferom (100 mL 10 x elektrodni pufer, 900 mL de H₂O). 10 x elektrodni pufer sadrži 0,25 M Tris i 1,25 M glicin. U mini vertikalnom poliakrilamidnom gelu uzorci su razdvajani 15 minuta pri 120 V u gelu za koncentriranje (4%), i pri 190 V u gelu za razdvajanje (12%) dok boja bromfenol plavo ne do e do kraja. Sastav gela je identi an onome iz Tablice 2, ali bez SDS-a.

U velikom vertikalnom poliakrilamidnom gelu uzorci su razdvajani 70 minuta pri 150 V u gelu za koncentriranje (4%), i pri 210 V u gelu za razdvajanje (10%) dok bromfenol plavo ne do e do kraja(Tablica 3).

Tablica 3. Sastav gela za elektroforezu u nativnim uvjetima – veliki sustav.

	gel za razdvajanje (10%)	gel za koncentriranje (4%)
reH₂O	16,8 mL	6,1 mL
Tris/HCl	1,5 M, pH 8,8, 10 mL	0,5 M, pH 6,8; 2,5 mL
AA/Bis	13,2 mL	1,3 mL
APS	200 µL	50 µL

TEMED20 μ L10 μ L

3.9 Denaturiraju a dvodimenzionalna poliakrilamidna gel elektroforeza (2D-PAGE) s urejom

Po završetku native PAGE gel je namakan 45 minuta u puferu s 8 M urejom, nakon čega je narezan na trakice s pojedinim proteinskim ekstraktima koje se horizontalno polože na vrh mini vertikalnog (12 % (w/v)) poliakrilamidnog gela (1 mm) s 8 M urejom i 1 x elektrodnim puferom (Tablica 4). Uzorci su razdvajani u trajanju 2,5 x trajanja prve dimenzije. Prvih 15 minuta elektroforeza je provedena pri 100 V, a do kraja (cca 3 h) pri 180 V. Koriste i veliki vertikalni gel prvih 20 minuta elektroforeza je provedena pri 100 V, a do kraja (cca 13 h) pri 190 V.

Tablica 4. Sastav gela za elektroforezu s urejom.

	gel za razdvajanje (12% (w/v))
urea	9,61 g
Tris/HCl	1,5 M, pH 8,8; 5,00 mL
AA/Bis	8,00 mL
APS	100 μ L
TEMED	7 μ L

3.10 Bojenje gela srebrovim nitratom

Nakon završetka denaturiraju e 2D-PAGE s urejom, u kojoj smo koristili mini vertikalni gel, proteini su vizualizirani bojanjem srebrom po Blum i sur. (1987). Gel s proteinima se preko no i pohrani u fiksativ, a nakon toga slijedi ispiranje s 30% etanolom (3 x 10 minuta). Koriste i otopinu A (20 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ u 100 mL re H_2O) vrši se prethodna

obrada (1 minuta), nakon koje slijedi ispiranje s reH₂O (3 x 20 sekundi). Otopinom B (200 mg AgNO₃, 75 µL HCHO u 100 mL reH₂O) vrši se impregniranje (20 minuta), nakon kojeg opet slijedi ispiranje pomoću reH₂O (2 x 20 s). Pomoću otopine C (6 g Na₂CO₃, 50 µL HCHO, 2 mL Na₂S₂O₃ x 5 H₂O u 98 mL reH₂O) izvodi se razvijanje u trajanju od 1 minute i 45 sekundi. Razvijanje se zaustavlja tako da se gelovi nakratko isperu s reH₂O, nakon čega slijedi naglo zakiseljavanje pomoću stop otopine (50% etanol, 12% octena kiselina i deH₂O do 1 L). Nakon vizualizacije proteina, gelovi su skenirani skenerom (Epson Perfection, V 700 Photo, USA) pri rezoluciji od 400 *dpi* i obrađeni računalskim softverima Photoshop CS 6 i IrfanView 4.38.

Otopine A, B i C se pripremaju neposredno prije upotrebe.

3.11 Bojenje gelova bojom CBB

Nakon završetka denaturiranja u 2D-PAGE s urejnom, u kojoj smo koristili veliki vertikalni gel, proteini su vizualizirani bojom CBB R – 250 po Fazekas De St. Groth (1963). Gel se uroni u otopinu za bojenje koja sadrži 0,1 % (w/v) CBB R – 250, 45% (v/v) metanola i 10% (v/v) ledene octene kiseline, te inkubira preko noći na tresilici, pri sobnoj temperaturi. Odbojivanje se izvodi inkubacijom u otopini za odbojivanje koja sadrži 10% (v/v) octene kiseline i 20% (v/v) metanola, na tresilici pri sobnoj temperaturi, dok se pozadina ne obezboji do zadovoljavajuće razine. Otopinu za odbojivanje potrebno je promijeniti nekoliko puta. Nakon vizualizacije proteina gelovi su skenirani skenerom (Epson Perfection, V 700 Photo, USA) pri rezoluciji od 400 *dpi* i obrađeni računalskim softverima Photoshop CS 6 i IrfanView 4.38.

3.12 Elektroprijenos proteina

Nakon razdvajanja proteina pomoću SDS-PAGE i native PAGE izvršen je elektroprijenos proteina na nitroceluloznu membranu koristeći vertikalni sustav za elektroprijenos (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, USA) i pufer za prijenos (28 mM Tris/HCl, 192 mM glicin, 10% (v/v) metanol; pH 8,3). U posudi sa puferom

za prijenos namo i se plasti ni okvir ure aja, dvije spužvice i dva filter papira *Whatmann*. Na donji filter papir položi se membrana i na nju gel. Gel se poklopi sa filter papirom i sa spužvicom paze i da ne ostane mjehuri a zraka. Ovako pripremljeni sendvi postavi se u ure aj za elektroprijenos tako da membrana bude okrenuta prema + elektrodi. Prijenos traje 1 h pri 60 V. Kvaliteta prijenosa provjeri se koriste i boju *Rouge Ponceau S* što omogu uje ucrtavanje biljega molekulskih masa grafitnom olovkom. Membrana se ispiri sa reH₂O, i sa 1 x TBS-om (100 mL 10 x TBS, 900 mL de H₂O) do potpunog obezbojenja, a zatim se blokira sa TTBS-om (preko no i) koji sadrži 0,1% (v/v) *Tween 20*[®] u 1 x TBS. 10 x TBS sadrži 0,2 M Tris/HCl i 0,73 M NaCl; pH 7,5.

3.13 Otkrivanje glikoziliranih proteina na membrani lektinom ConA

Nakon blokiranja u TTBS-u slijedi inkubacija u TTBS-u sa solima (1 mM CaCl₂ i 1 mM MgCl₂) i ConA (25 µg/mL) u trajanju od 90 minuta. Zatim slijedi ispiranje s TTBS-om sa solima (6 x 5 minuta), i inkubacija s TTBS-om sa solima i peroksidazom (25 µg/mL) u trajanju od 60 minuta. Po završetku inkubacije slijedi ispiranje s TTBS-om sa solima (6 x 5 minuta), i završno ispiranje pomo u TBS-a (15 minuta). Razvijanje se izvodi pomo u otopina A (50 mL 1 x TBS, 180 µL 5% H₂O₂) i B (30 mg 3,3'- DAB, 10 mL metanol) koje se pripreme i pomiješaju neposredno prije upotrebe. Ispiranjem pomo u ve ih koli ina reH₂O razvijanje se zaustavlja nakon ega se membrana skenira skenerom (Epson Perfection, V 700 Photo, USA) pri rezoluciji od 400 *dpi* i obradi ra unalnim softverima Photoshop CS 6 i Irfanview 4.38.

3.14 Spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti peroksidaze

Uzorak tkiva (1,2 g) je ustinjen koriste i prethodno ohla eni tarionik i tu ak. Tkivo je homogenizirano u PVP-u (na vrh spatule) i 1,0 mL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera koji sadrži 1,925 mL 1 M KH₂PO₄, 3,075 mL 1 M K₂HPO₄ i re H₂O do 50 mL; pH 7,0. Stani ni ostaci su uklonjeni centrifugiranjem 15 minuta pri 20 000 g i 4 °C. Supernatant se prelije u istu Eppendorf tubicu, a koncentracija se izmjeri metodom po Bradford-u. Aktivnost peroksidaze

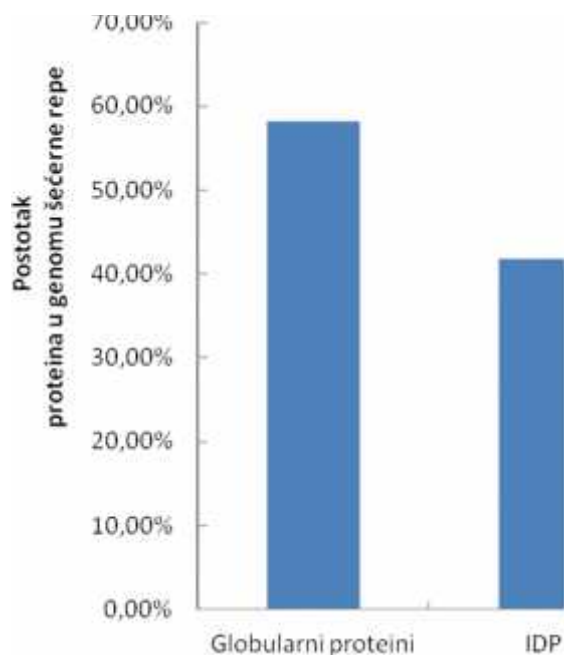
se mjeri pri 470 nm koriste i spektrofotometar (UV/VIS Unicam UV 4 Spectrometer, UK), a kao donor elektrona koristi se gvajakol koji u reakciji prelazi u tetragvajakol. Najprije se napravi slijepa proba (20 μL ekstrakcijskog pufera + 980 μL reakcijske smjese koja sadrži 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, 100, 65 μL gvajakola i 25,5 μL H_2O_2 (30%)), a potom izmjeri apsorbancija tetragvajakola koriste i po dvije replike svakog uzorka (20 μL + 980 μL reakcijske smjese). Mjerenje traje 1 minutu unutar koje se svakih 10 s mjeri apsorbancija. Aktivnost peroksidaze odredi se tako da se promjena koncentracije tetragvajakola u sekundi podijeli sa masom proteina u 20 μL . Pri tome se koristi Beer-Lambertov zakon i molarni ekstincijski koeficijent tetragvajakola od $2,66 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Jedinica za aktivnost peroksidaze je $\text{nM s}^{-1} \mu\text{g proteina}^{-1}$ (u = unit).

4 REZULTATI

4.1 Bioinformatička analiza genoma šećerne repe (*Beta vulgaris* L.)

Unose i naredbu `grep -c ">" KDHBv.genes.1302.pep.fa` izra unali smo da ukupan broj proteina u šećernoj repi (*Beta vulgaris* L.) iznosi 25 368.

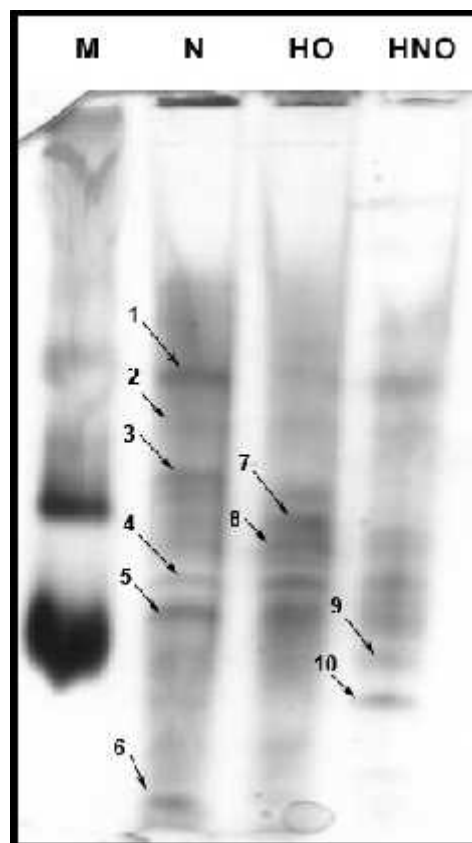
Naredbom `grep "HOTLOOPS" results | perl -lne '@array = split(",",$_); foreach $val(@array){$val=~/(\\d+)-(\\d+)/; if($2-$1 > 30){$count++}} if ($count >= 1){$countNew++; $count = 0}}{print $countNew'` izra unali smo da broj proteina koji imaju barem jedan LDR prema *hotloops* kriteriju DisEMBL-a iznosi 10 592 (41,75%) (Slika 3). Ukupan broj aminokiselina u proteomu iznosi 9 087 294, od kojih je 6 783 081 ure eno, a 2 304 213 (25,35%) neure eno. U Prilogu I se nalazi *output* tj. datoteka sa rezultatima DisEMBL predikcija iz koje izra unavamo broj proteina koji imaju LDR (*long disordered region*). LDR je definiran kao područje koje se sastoji od najmanje 30 uzastopnih neure enih aminokiselina.



Slika 3. Postotak globularnih proteina i IDP u genomu šeerne repe (*Beta vulgaris* L.) dobiven koristeći DisEMBL prema *hotloops* kriteriju. LDR je definiran kao područje koje se sastoji od najmanje 30 uzastopnih neuroničnih aminokiselina.

4.2 Odvajanje IDP pomoću nativne poliakrilamidne gel elektroforeze (PAGE)

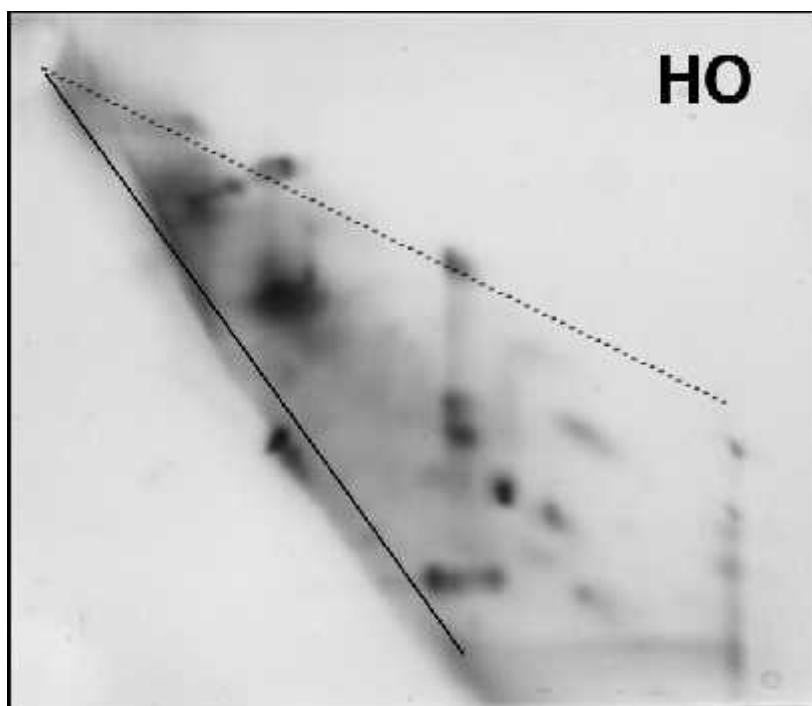
U izolaciji proteina koristilo se zagrijavanje izolata do 100 °C kako bi se odvojili IDP od globularnih proteina. Nakon ekstrakcije pristupilo se provjeravanju razlika u ekspresiji IDP između stanica linija N, HO i HNO šeerne repe. Protein 1 je ekspresiran u sve tri stanice linije, ali u HO najslabije. Protein 3 je ekspresiran u linijama N i HO dok kod HNO nije, a proteine 7 i 8 nalazimo u sve tri stanice linije iako su najjače ekspresirani u liniji HO. Protein 6 nalazimo samo u liniji N, a proteine 9 i 10 samo u liniji HNO (Slika 4).



Slika 4. Nativna PAGE analiza IDP. Prva i druga linija sadrže 10 µg proteina, treća sadrži 9,25 µg. Proteini su obojani srebrom. M – biljeg molekularnih masa; N – normalna, HO – prilagođena organogena, HNO – prilagođena neorganogena linija šeerne repe (*Beta vulgaris* L.)

4.3 Odvajanje IDP i globularnih proteina

Razdvajanje proteina u dvije dimenzije omogućuje kvalitetniju analizu ekspresije proteina. Za IDP kombinira se elektroforeza proteina u poliakrilamidnom nativnom gelu i denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu s 8 M urejom. U sve tri stani ne linije (N, HO i HNO) šeerne repe koje su korištene, dolazi do uspješnog odjeljivanja i to na način da se IDP zadržavaju na dijagonali (puna crta) i oko nje, dok se globularni proteini denaturiraju u ureji, usporava se njihova migracija u denaturirajućem gelu, te se nakupljaju iznad dijagonale (iscrtana crta) (Slika 5).

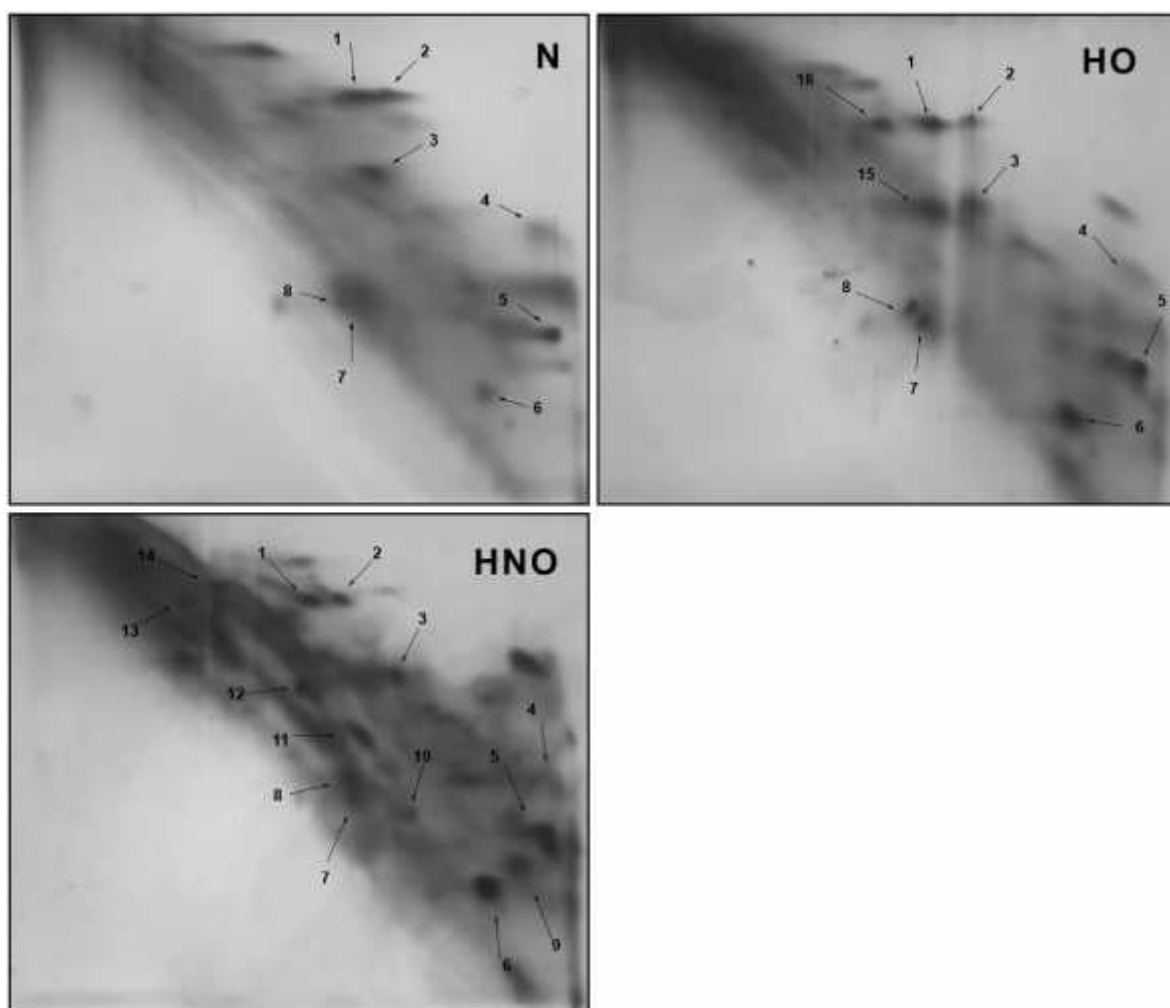


Slika 5. Princip razdvajanja IDP i globularnih proteina kombiniranom nativnom i denaturirajućom 2-D elektroforezom s 8 M urejom u liniji HO šeerne repe (*Beta vulgaris* L.). U prvoj dimenziji proteini se razdvajaju u 12% poliakrilamidnom nativnom gelu, a u drugoj u denaturirajućem 12% poliakrilamidnom gelu s 8 M urejom. Proteini su obojani srebrom. Puna linija označava dijagonalu duž koje se raspoređuju IDP, a isprekidana linija označava pozicioniranje globularnih proteina.

4.4 Diferencijalna ekspresija IDP

Po završetku denaturiraju e 2D-PAGE s urejom prou avane su razlike u ekspresiji IDP u liniji N u odnosu na liniju HO, te liniji N u odnosu na liniju HNO (Slika 6). Vidljiva je ekspresija dodatna dva proteina u liniji HO u odnosu na liniju N (ozna eni brojevima 15 i 16), te ekspresija dodatnih šest proteina u liniji HNO u odnosu na liniju N (ozna eni brojevima 9, 10, 11, 12, 13 i 14).

Osim razlike u ekspresiji novih proteina vidljive su razlike u ja ini ekspresije zajedni kih proteina (1-8) što je analizirano ra unalnim softverom ImageTool (Tablica 5). U liniji HO šest zajedni kih proteina je ja e eksprimirano u usporedbi s linijom N, dok su dva slabije eksprimirana. U liniji HNO sedam zajedni kih proteina je ja e eksprimirano u usporedbi s linijom N, dok je samo jedan slabije eksprimiran.



Slika 6. Usporedba ekspresije IDP u stani nim linijama še erne repe (*Beta vulgaris* L.). Linije N i HO sadrže 10 µg proteina, HNO sadrži 9,25 µg. U prvoj dimenziji proteini se razdvajani u 12% poliakrilamidnom nativnom gelu, a u drugoj u denaturiraju em 12% poliakrilamidnom

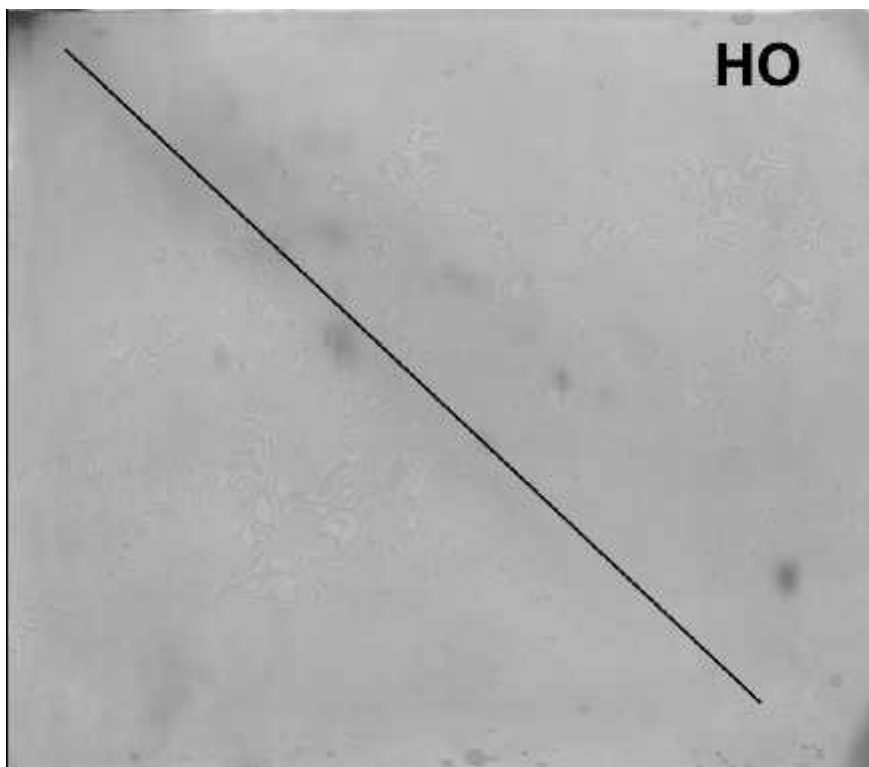
gelu s 8 M urejom. Proteini su obojani srebrom. N – normalna, HO – prilagođena organogena, HNO – prilagođena neorganogena linija šećerne repe (*Beta vulgaris* L.).

Tablica 5. Usporedba ekspresije IDP u staničnim linijama šećerne repe (*Beta vulgaris* L.) primjenom računalnog softvera ImageTool. N/A – nije primjenjivo (*not applicable*), - ekspresija proteina, - pojačana proteinska ekspresija, - smanjena proteinska ekspresija. N – normalna, HO – prilagođena organogena, HNO – prilagođena neorganogena linija šećerne repe (*Beta vulgaris* L.).

Proteinska mrlja	N	HO	HNO
1	N/A	↓	↑
2	N/A	↓	↓
3	N/A	↑	↑
4	N/A	↑	↑
5	N/A	↑	↑
6	N/A	↑	↑
7	N/A	↑	↑
8	N/A	↑	↑
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			

4.5 Preparativni 2-D PAGE

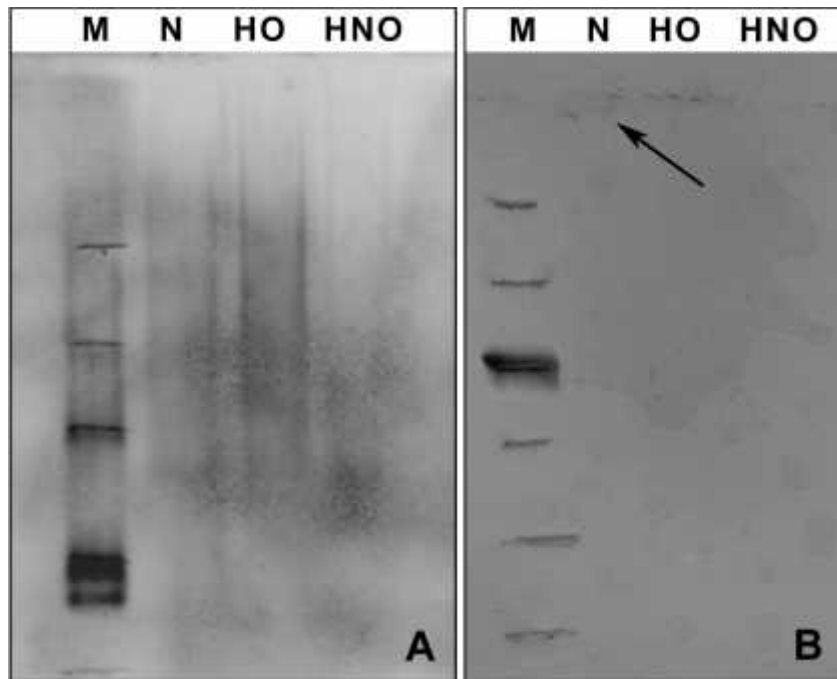
Nakon uspješnog odjeljivanja globularnih proteina od IDP koriste se male gelove (8 x 10 cm), isti postupak je primijenjen koristeći i velike gelove veličine 20 x 16 cm. Ovaj postupak je odabran kako bi dobili dovoljnu količinu proteina za daljnju analizu masenom spektrometrijom. I u ovom slučaju dolazi do uspješnog razdvajanja proteina (Slika 7). Za razliku od malih gelova koji su obojani srebrom veliki su obojani bojom CBB. Ova metoda je manje osjetljiva u odnosu na bojanje srebrom, ali kompatibilna sa masenom spektrometrijom, pa su proteini vizualizirani u manjoj mjeri.



Slika 7. Princip razdvajanja IDP i globularnih proteina kombiniranom nativnom i denaturirajućom 2-D elektroforezom s 8 M urejom u liniji HO šećerne repe (*Beta vulgaris* L.). U prvoj dimenziji proteini se razdvajaju u 12% poliakrilamidnom nativnom gelu, a u drugoj u denaturirajućem 12% poliakrilamidnom gelu s 8 M urejom. Proteini su vizualizirani bojom CBB. Puna linija označava dijagonalu duž koje migriraju IDP.

4.6 Detekcija glikoziliranih proteina

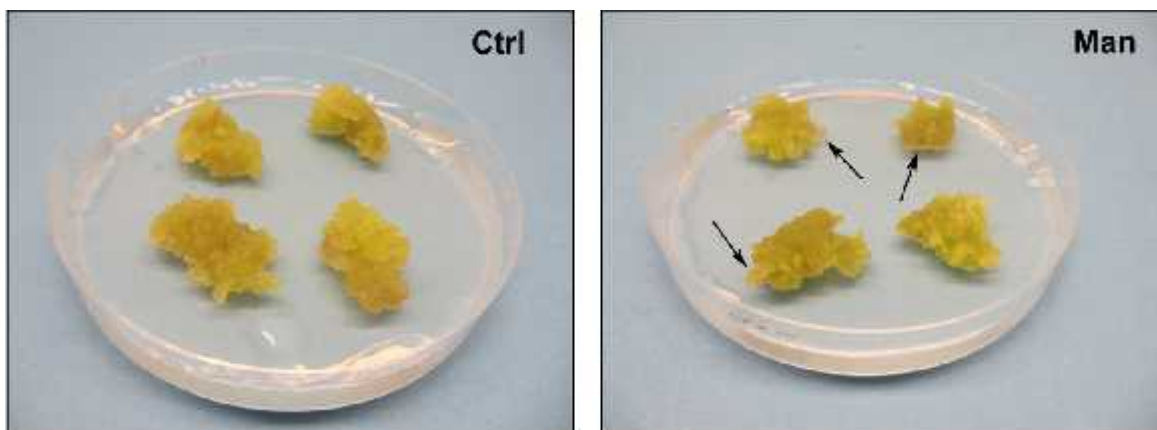
S ciljem da odredimo da li su IDP glikozilirani, vizualizirani su nakon nativne PAGE i SDS-PAGE primjenom ConA i peroksidaze (Slika 8A, Slika 8B). Na slici 8A vidi se razmazani trag u sve tri stanice u linijama N i HO, dok je u liniji HNO manje vidljiv. Na slici 8B u linijama HO i HNO nema nikakvih vidljivih rezultata, a u liniji N dolazi do pojave signala na jednom mjestu (označeno strelicom).



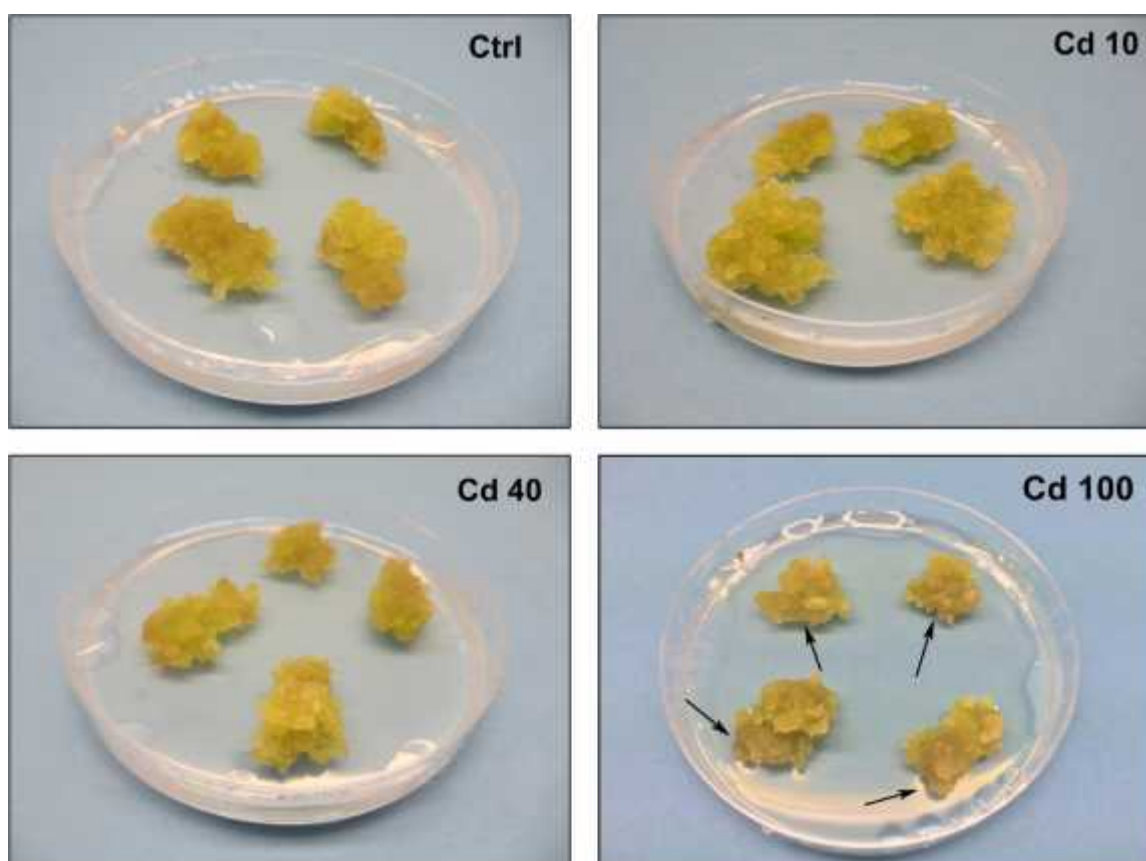
Slika 8. Nitrocelulozne membrane s glikoproteinima koji su detektirani lektinom ConA. (A) Prijenos proteina izvršen na nitroceluloznu membranu nakon nativne PAGE. (B) Prijenos proteina izvršen na nitroceluloznu membranu nakon SDS-PAGE. M – biljeg molekulskih masa; N – normalna, HO – prilagođena organogena, HNO – prilagođena neorganogena linija šećerne repe (*Beta vulgaris* L.).

4.7 Tretiranje linije HO šećerne repe (*Beta vulgaris* L.) manitolom i kadmijem (CdCl_2)

Kako bi izazvali vodni stres i stres teškim metalima, stani na linija HO šećerne repe presađena je na podloge PG0 s dodatkom manitola (300 mM), odnosno kadmija (10 μM , 40 μM i 100 μM) nakon čega je promatran izgled i izmjeren prirast biljnog tkiva nakon 8 i 14 dana. Šećerna repa tretirana 300 mM manitolom raste sporije u odnosu na kontrolno tkivo i vidljiva je djelomična nekroza tkiva (Slika 9, označeno strelicama). Nakon 8 dana šećerna repa tretirana 10 μM i 40 μM kadmijem fenotipski ne pokazuje razliku u rastu u odnosu na kontrolu (Slika 10), dok u šećernoj repi zasađenoj na podlogu sa 100 μM kadmijem rast nije usporen, ali je vidljiva nekroza tkiva (Slika 10, označeno strelicama). Isto tako, tkivo uzgajano na podlozi s 300 mM manitolom, 40 i 100 μM kadmijem je hiperhidrirano u odnosu na tkivo uzgajano na kontrolnoj podlozi. Kod tkiva uzgajanog na podlozi s 10 μM kadmijem ne dolazi do hiperhidriranosti.



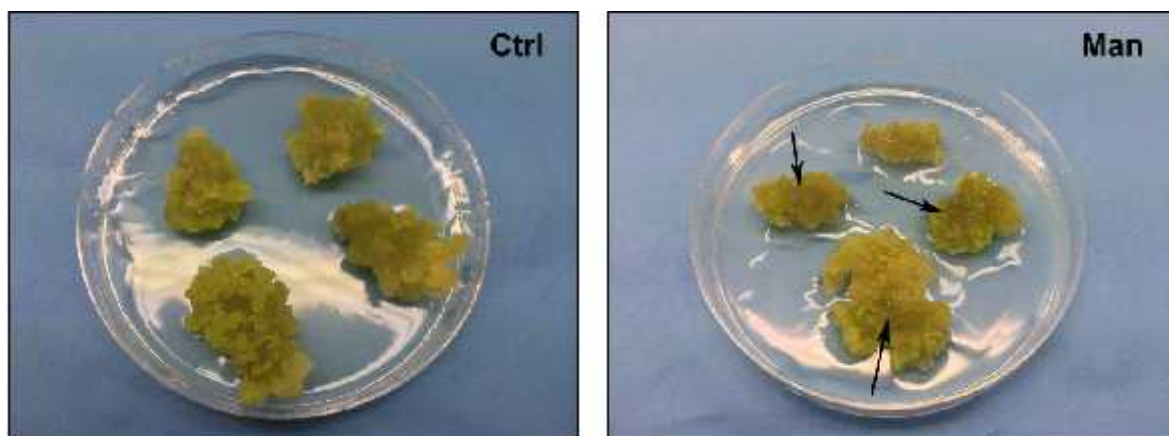
Slika 9. Fotografije linije HO šeerne repe (*Beta vulgaris* L.) osam dana nakon tretiranja s manitolom. Ctrl – kontrolna podloga PG0, Man – PG0 podloga s 300 mM manitolom.



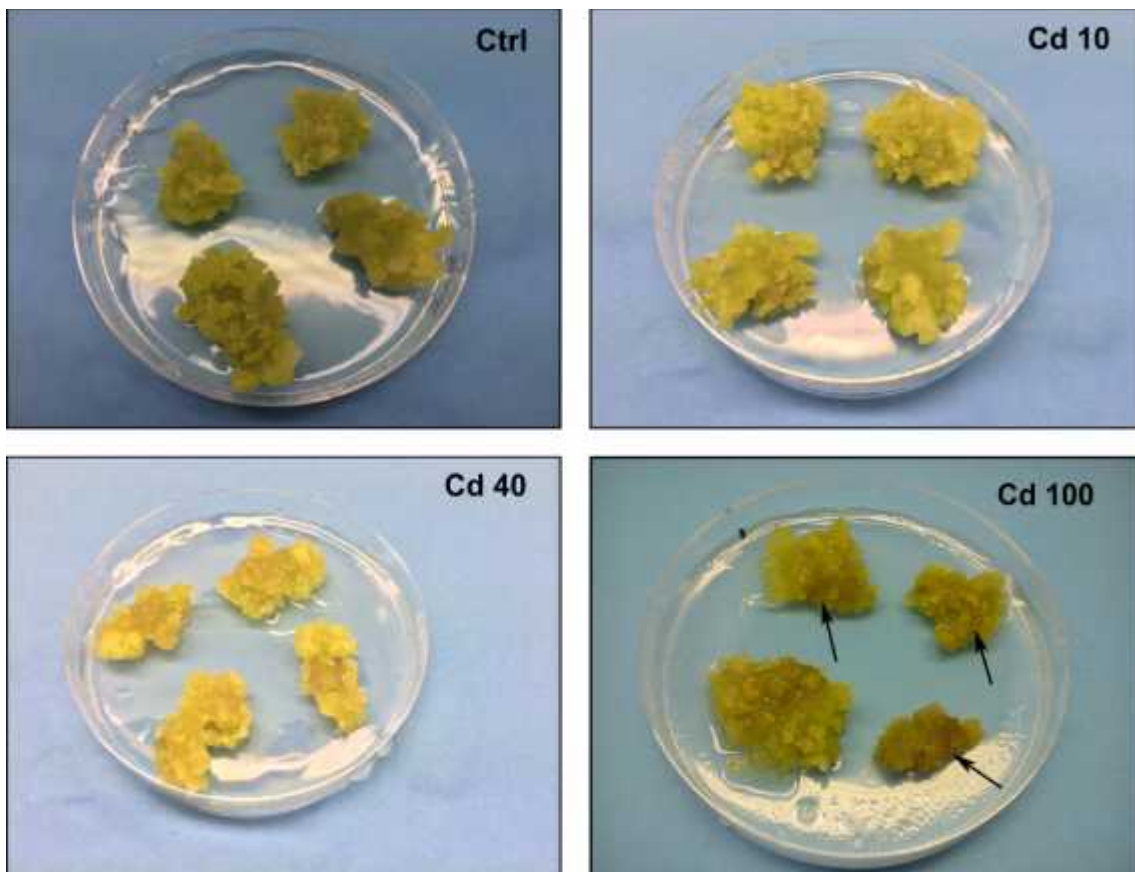
Slika 10. Fotografije linije HO šeerne repe (*Beta vulgaris* L.) osam dana nakon tretiranja s kadmijem. Ctrl – kontrolna podloga PG0, Cd 10 – PG0 podloga s 10 μM CdCl_2 , Cd 40 – PG0 podloga s 40 μM CdCl_2 , Cd 100 – PG0 podloga sa 100 μM CdCl_2 .

Nakon etnaest dana tretmana vidljivo je da šeerna repa tretirana s 300 mM manitolom raste sporije u odnosu na kontrolno tkivo, a vidljiva je i nekroza tkiva (Slika 11, označeno strelicama). Tkivo tretirano s 10 μM kadmijem raste bolje u odnosu na kontrolno

tkivo, dok tkivo tretirano s 40 μM kadmijem raste malo sporije u odnosu na kontrolu. Tkivo uzgajano na podlozi sa 100 μM kadmijem raste lošije u odnosu na kontrolu, a vidljiva je i nekroza tkiva (Slika 12, označeno strelicama). Linija HO šeerne repe, uzgajana na podlozi s 300 mM manitolom, 40 μM i 100 μM kadmijem, je hiperhidrirana u odnosu na tkivo uzgajano na kontrolnoj podlozi. U tkivu uzgajanom na podlozi sa 10 μM kadmijem ne dolazi do hiperhidriranosti.

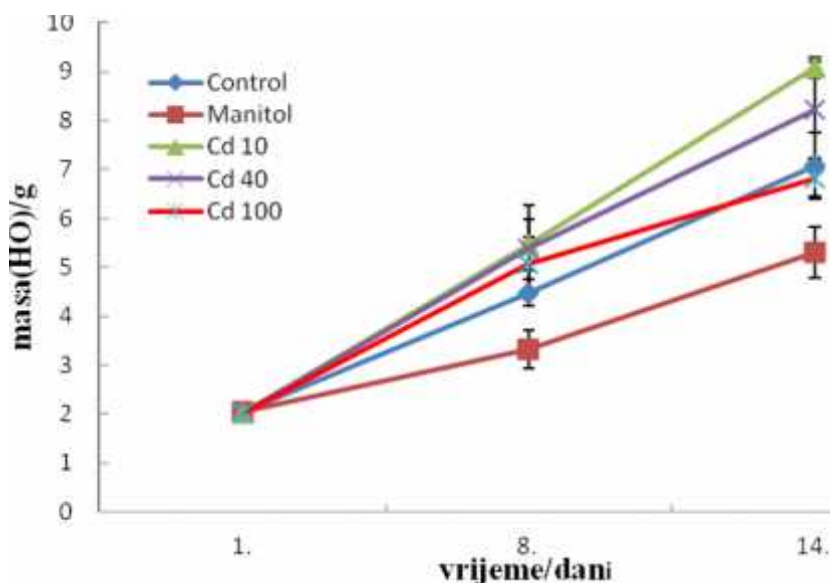


Slika 11. Fotografije linije HO šeerne repe (*Beta vulgaris* L.) etnaest dana nakon tretiranja s manitolom. Ctrl – kontrolna podloga PG0, Man – PG0 podloga s 300 mM manitolom.



Slika 12. Fotografije linije HO še erne repe (*Beta vulgaris* L.) etnaest dana nakon tretiranja s kadmijem. Ctrl – kontrolna podloga PG0, Cd 10 – PG0 podloga s 10 μM CdCl_2 , Cd 40 – PG0 podloga s 40 μM CdCl_2 , Cd 100 – PG0 podloga sa 100 μM CdCl_2 .

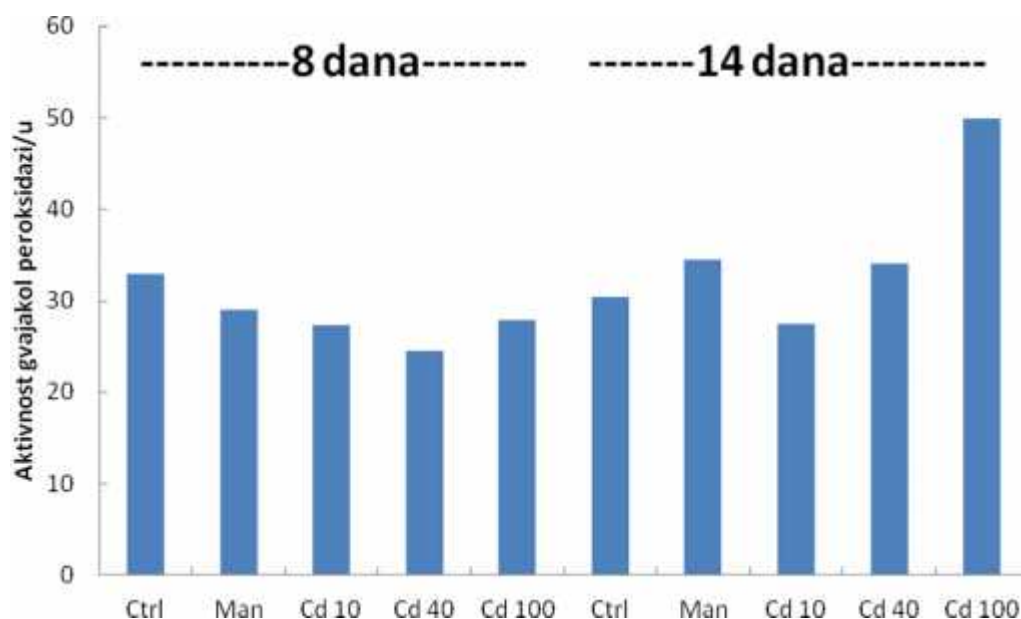
Nakon osam i etnaest dana uzorkovana su tkiva sa svih podloga i izmjerena im je masa. Linija HO koja je rasla na podlozi s 300 mM manitolom pokazuje manju masu nakon osam i etnaest dana u odnosu na kontrolu. Linija HO koja je rasla na podlogama s 10 i 40 μM kadmijem pokazuje ve i prirast nakon osam i etnaest dana u odnosu na kontrolu. Linija HO koja je rasla na podlozi sa 100 μM kadmijem pokazuje ve i prirast nakon osam dana i manji nakon etnaest dana (Slika 13).



Slika 13. Krivulja rasta stani ne linije HO tijekom 14 dana u uvjetima *in vitro*. Ctrl – kontrolna podloga PG0, Man – PG0 podloga s 300 mM manitolom, Cd 10 – PG0 podloga s 10 μM CdCl_2 , Cd 40 – PG0 podloga s 40 μM CdCl_2 , Cd 100 – PG0 podloga sa 100 μM CdCl_2 . Prikazana masa je srednja vrijednost tri uzorka \pm standardna devijacija.

4.7.1 Aktivnost gvajakol peroksidazi

Tretiranje stani ne linije HO manitolom i kadmijem rezultiralo je razliitim aktivnostima gvajakol peroksidazi. Nakon osam dana aktivnost peroksidazi se smanjila u tkivima na svim hranidbenim podlogama u usporedbi s kontrolnom podlogom. Nakon etnaest dana aktivnost peroksidazi se neznatno smanjila u liniji HO na podlozi s 10 μM kadmijem, a u liniji HO na podlozi s manitolom i 40 μM kadmijem dolazi do poveanja aktivnosti. Najvea aktivnost peroksidaze izmjerena je u liniji HO koja je rasla na podlozi sa 100 μM kadmijem (Slika 14).

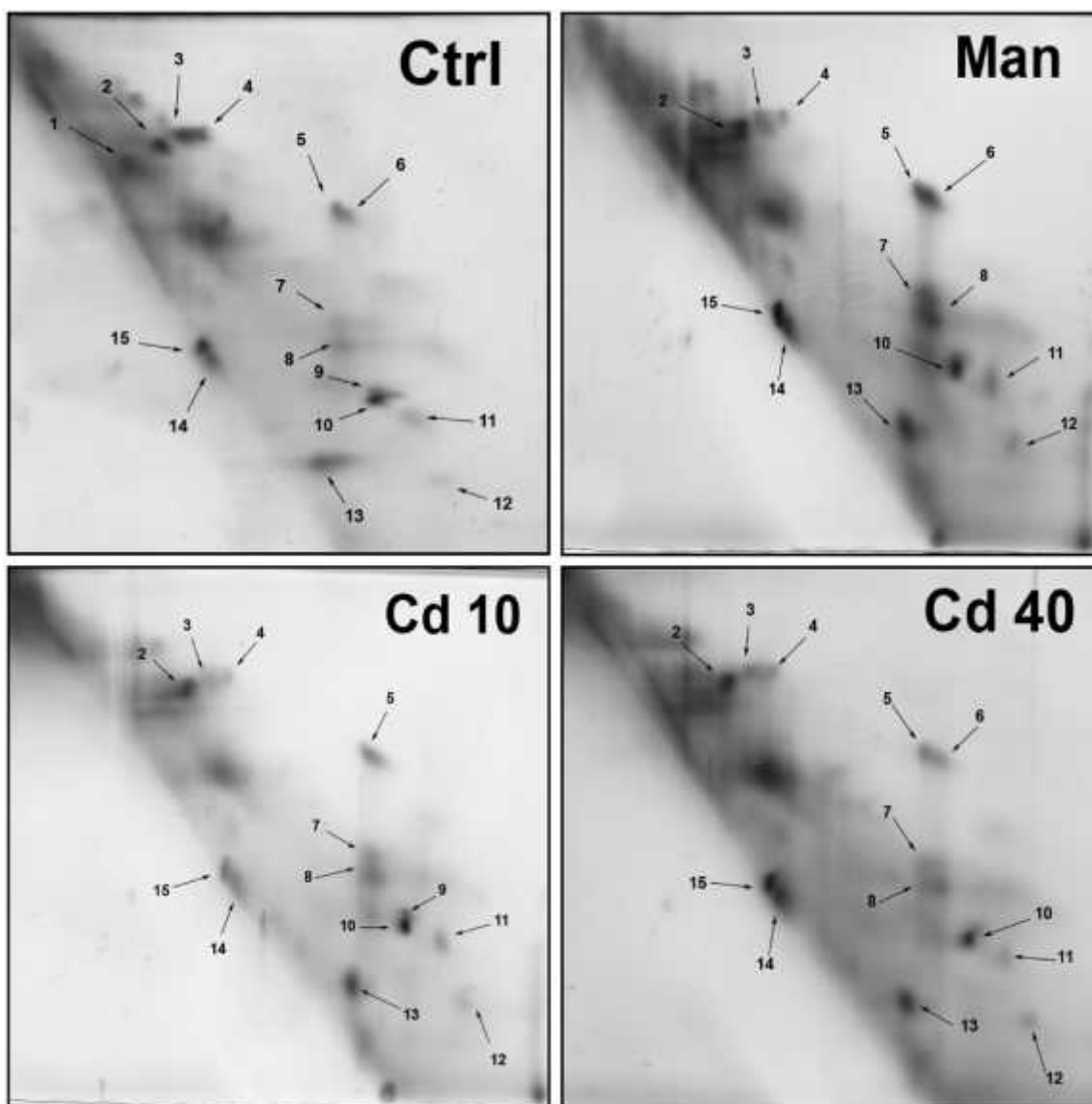


Slika 14. Aktivnost gvajakol peroksidazi u stani noj liniji HO nakon osam i etrnaest dana. Ctrl – kontrolna podloga PG0, Man – PG0 podloga s 300 mM manitolom, Cd 10 – PG0 podloga s 10 μM CdCl₂, Cd 40 – PG0 podloga s 40 μM CdCl₂, Cd 100 – PG0 podloga sa 100 μM CdCl₂. U = unit ($\text{nM s}^{-1} \mu\text{g proteina}^{-1}$).

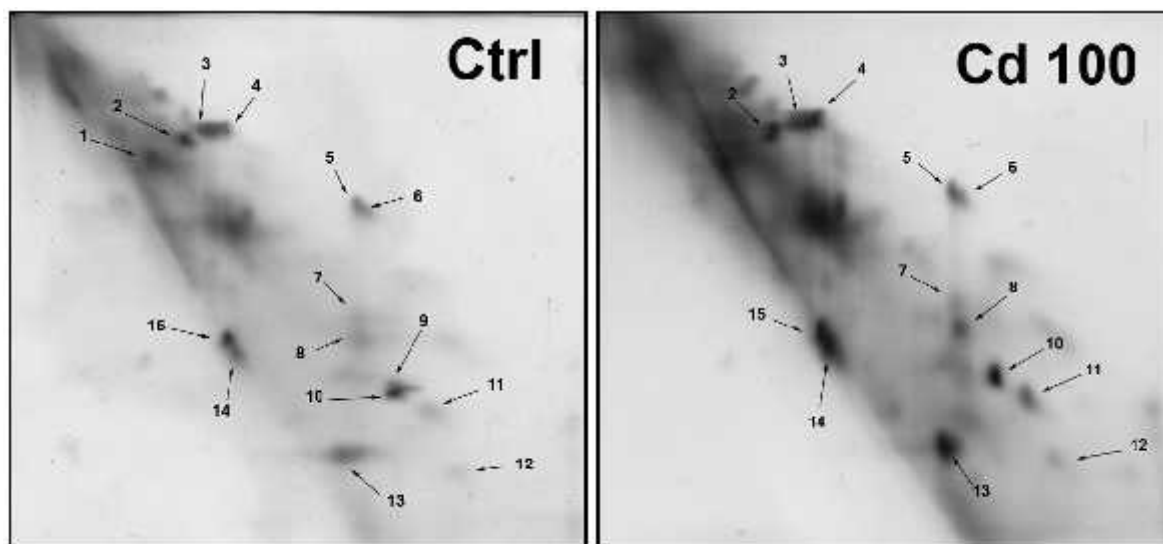
4.7.2 Ekspresija IDP u liniji HO nakon osam dana

Razlika u ekspresiji prou avala se uspore uju i kontrolu s 300 mM manitolom, te s 10 i 40 μM kadmijem. Masa proteina koji su nanešeni na gel u sva etiri uzorka iznosi 12,5 μg . Vidljivo je da u liniji HO koja je rasla na podlozi s 300 mM manitolom i s 40 μM kadmijem nedostaju proteinske mrlje ozna ene brojevima 1 i 9 u odnosu na kontrolu, a u liniji HO uzorkovanoj s podloge s 10 μM kadmijem nedostaju proteinske mrlje ozna ene brojevima 1 i 6 (Slika 15).

Ekspresija proteina u liniji HO koja je rasla na podlozi sa 100 μM kadmijem je uspore ivana s drugom kontrolom. Masa proteina koji su nanešeni na gel u oba uzorka iznosi 9 μg . Vidljivo je da u liniji HO, koja je rasla na podlozi sa 100 μM kadmijem, nedostaju proteinske mrlje ozna ene brojevima 1 i 9 u odnosu na kontrolu (Slika 16).



Slika 15. Ekspresija IDP stani ne linije HO šeerne repe (*Beta vulgaris* L.) osam dana nakon tretmana. Svaka linija sadrži 12,5 µg proteina. U prvoj dimenziji proteini se razdvajaju u 12% poliakrilamidnom nativnom gelu, a u drugoj u denaturiraju u 12% poliakrilamidnom gelu s 8 M urejom. Proteini su obojani srebrom. Ctrl – kontrolna podloga PG0, Man – PG0 podloga s 300 mM manitolom, Cd 10 – PG0 podloga s 10 µM CdCl₂, Cd 40 – PG0 podloga s 40 µM CdCl₂.



Slika 16. Ekspresija IDP stani ne linije HO še erne repe (*Beta vulgaris* L.) osam dana nakon tretmana. Svaka linija sadrži 9 μ g proteina. U prvoj dimenziji proteini se razdvajani u 12% poliakrilamidnom nativnom gelu, a u drugoj u denaturiraju em 12% poliakrilamidnom gelu s 8 M urejom. Proteini su obojani srebrom. Ctrl – kontrolna podloga PG0, Cd 100 – PG0 podloga sa 100 μ M CdCl₂.

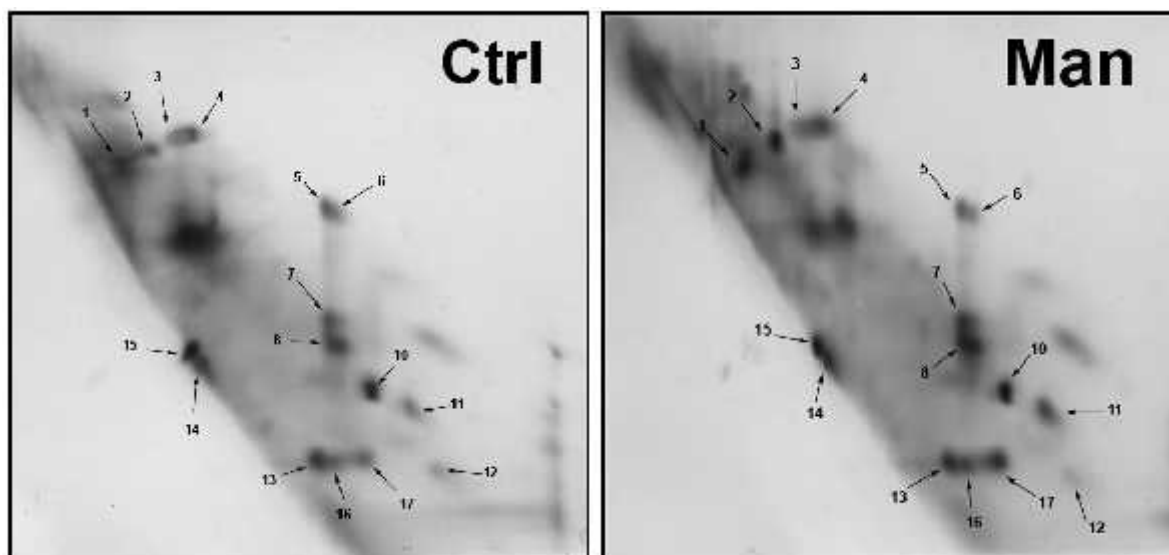
Razlike u ekspresiji proteina analizirane su računalnim softverom ImageTool (Tablica 6). Jedanaest proteina je jače ekspimirano u liniji HO koja je rasla na podlozi s manitolom u odnosu na kontrolu, dok su samo dva slabije ekspimirana. U liniji HO koja je rasla na podlozi s 10 μ M CdCl₂, četiri proteina su slabije ekspimirana, a devet pokazuje podjednaku razinu ekspresije u usporedbi s kontrolom. U liniji HO koja je rasla na podlozi s 40 μ M CdCl₂, tri proteina su slabije ekspimirana, a deset pokazuje podjednaku razinu ekspresije u usporedbi s kontrolom. U liniji HO koja je rasla na podlozi sa 100 μ M CdCl₂, niti jedan protein nije slabije ekspimiran, a trinaest pokazuje jaču razinu ekspresije u usporedbi s kontrolom.

Tablica 6. Ekspresija IDP stani ne linije HO šeerne repe (*Beta vulgaris* L.) osam dana nakon tretmana, analizirana računalnim softverom ImageTool. Ctrl – kontrolna podloga PG0, Man – PG0 podloga s 300 mM manitolom, Cd 10 – PG0 podloga s 10 μ M CdCl₂, Cd 40 – PG0 podloga s 40 μ M CdCl₂, Cd 100 – PG0 podloga sa 100 μ M CdCl₂. - ekspresija proteina, - pojačana proteinska ekspresija, - smanjena proteinska ekspresija, - podjednaka proteinska ekspresija.

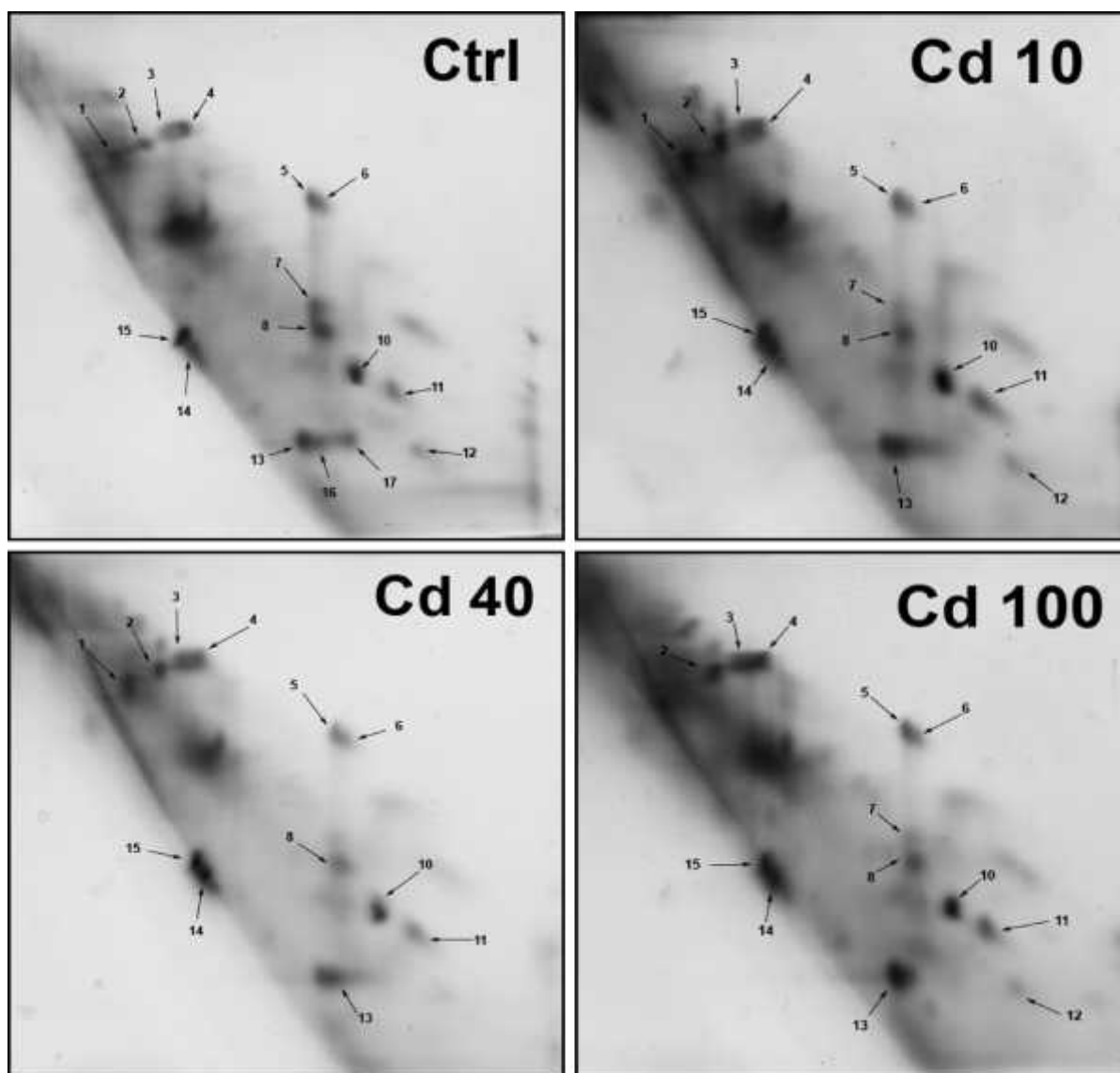
Proteinska mrlja	Ctrl	Man	Cd 10	Cd 40	Cd 100
1					
2		↑	↓	↓	↑
3		↓	↓	↓	↑
4		↓	↓	↓	↑
5		↑	↓	≈	↑
6		↑		≈	↑
7		↑	≈	≈	↑
8		↑	≈	≈	↑
9			≈		
10		↑	≈	≈	↑
11		↑	≈	≈	↑
12		↑	≈	≈	↑
13		↑	≈	≈	↑
14		↑	≈	≈	↑
15		↑	≈	≈	↑

4.7.3 Ekspresija IDP u liniji HO nakon etrnaest dana

U liniji HO tretiranoj s 300 mM manitolom nema razlike u broju proteinskih mrlja u odnosu na kontrolu (Slika 17). Liniji HO koja je rasla na podlozi s 10 μ M kadmijem nedostaju proteinske mrlje označene brojevima 16 i 17 u odnosu na kontrolu, dok u liniji koja je rasla na podlozi s 40 μ M kadmijem nedostaju proteinske mrlje označene brojevima 7, 12, 16 i 17 (Slika 18). Liniji HO koja je rasla na podlozi sa 100 μ M kadmijem nedostaju tri proteinske mrlje (1, 16 i 17) u odnosu na kontrolu.



Slika 17. Ekspresija IDP stani ne linije HO še erne repe (*Beta vulgaris* L.) etnaest dana nakon tretmana. Svaka linija sadrži 9 μg proteina. U prvoj dimenziji proteini se razdvajani u 12% poliakrilamidnom nativnom gelu, a u drugoj u denaturiraju em 12% poliakrilamidnom gelu s 8 M urejom. Proteini su obojani srebrom. Ctrl – kontrolna podloga PG0, Man – PG0 podloga s 300 mM manitolom.



Slika 18. Ekspresija IDP stani ne linije HO šeerne repe (*Beta vulgaris* L.) etnaest dana nakon tretmana. Linija Cd 10 sadrži 8,6 μg proteina, Cd 100 sadrži 9,048 μg proteina, ostale sadrže 9 μg proteina. U prvoj dimenziji proteini se razdvajaju u 12% poliakrilamidnom nativnom gelu, a u drugoj u denaturiraju em 12% poliakrilamidnom gelu s 8 M urejom. Proteini su obojani srebrom. Ctrl – kontrolna podloga PG0, Cd 10 – PG0 podloga s 10 μM CdCl₂, Cd 40 – PG0 podloga s 40 μM CdCl₂, Cd 100 - PG0 podloga sa 100 μM CdCl₂.

Razlike u ekspresiji proteina analizirane su ra unalnim softverom ImageTool (Tablica 7). etnaest proteina je ja e ekspimirano u liniji HO koja je rasla na podlozi s manitolom u odnosu na kontrolu, dok su dva podjednako ekspimirana. U liniji HO, koja je rasla na podlozi s 10 μM CdCl₂, dva proteina su slabije ekspimirana, pet pokazuje podjednaku razinu ekspresije, a sedam je ja e ekspimirano u odnosu na kontrolu. U liniji HO, koja je rasla na podlozi s 40 μM CdCl₂, etiri proteina su slabije ekspimirana, dva ja e, a šest pokazuje podjednaku razinu ekspresije kao i kontrola. U liniji HO, koja je rasla na podlozi sa 100 μM

CdCl₂, niti jedan protein nije slabije eksprimiran, dva su eksprimirana podjednako kao kontrola, a jedanaest pokazuje ja u razinu ekspresije u usporedbi sa kontrolom.

Tablica 7. Ekspresija IDP stani ne linije HO še erne repe (*Beta vulgaris* L.) etrnaest dana nakon tretmana, analizirana ra unalnim softverom ImageTool. Ctrl – kontrolna podloga PG0, Man – PG0 podloga s 300 mM manitolom, Cd 10 – PG0 podloga s 10 µM CdCl₂, Cd 40 – PG0 podloga s 40 µM CdCl₂, Cd 100 – PG0 podloga sa 100 µM CdCl₂. - ekspresija proteina, - poja ana proteinska ekspresija, - smanjena proteinska ekspresija, - podjednaka proteinska ekspresija.

Proteinska mrlja	Ctrl	Man	Cd 10	Cd 40	Cd 100
1		↑	↑	≈	
2		↑	↑	≈	↑
3		↑	↑	≈	↑
4		↑	↑	≈	↑
5		≈	≈	≈	↑
6		≈	≈	≈	↑
7		↑	↓		≈
8		↑	↓	↓	≈
10		↑	≈	↓	↑
11		↑	≈	↓	↑
12		↑	≈		↑
13		↑	↑	↓	↑
14		↑	↑	↑	↑
15		↑	↑	↑	↑
16		↑			
17		↑			

5 RASPRAVA

Kako je već naglašeno, područje istraživanja IDP zaživjelo je tek koncem dvadesetog stoljeća. Zbog te činjenice, kao i zbog specifične strukture IDP, u istraživanju istih nailazimo na manjak eksperimentalnih tehnika. Iz tog razloga prvi korak u našem radu bio je napraviti istraživanje *in silico* korištenjem prediktora *hotloops* prema kojem je ukupni udio IDP u proteomu šećerne repe 41,75%. Taj rezultat je u skladu sa Tompinim sugestijama (Tompa, 2012) koji tvrdi da ukupni udio IDP u eukariotskom proteomu iznosi 15 – 45%, kao i s istraživanjem koje su napravili Feng i sur. (2006), po kojem je ukupni udio IDP u proteomu vrste *Plasmodium falciparum* 48,7%. S druge strane Pietrosemoli i sur. (2013) tvrde da eukariotski proteom sadrži oko 33% IDP.

Primjenom izmijenjene metode izolacije proteina po Czismok i sur. (2006) dolazi do uspješnog odvajanja IDP od globularnih proteina u sve tri stanične linije šećerne repe. Linija HO pokazuje ekspresiju dodatna dva proteina u odnosu na liniju N, dok linija HNO pokazuje ekspresiju dodatnih šest proteina u odnosu na liniju N. Ekspresija proteina ovisi o razvojnom stadiju linije šećerne repe. Različiti tipovi stanica moraju osigurati pravilnu produkciju i transport proteina bitan za normalno funkcioniranje stanice. To dovodi do diferencijalne ekspresije proteina u različitim tipovima stanica (Pavoković i sur., 2007). Iako se ova metoda izolacije IDP pokazala uspješnom, treba naglasiti da ima određena ograničenja. Upotrebom nativnog gela u prvoj dimenziji, razdvajanje se ne može mjeriti sa onom koju ima konvencionalna 2-D elektroforeza. Taj nedostatak se može djelomično ublažiti i to upotrebom blagih, nenabijenih detergenata. U tom smjeru bi zasigurno trebala i buduća istraživanja kako bi se dodatno poboljšala tehnika. Isto tako, neki IDP se pojavljuju u jako malim količinama i nisu podložni detekciji konvencionalnim bojanjem (Czismok i sur., 2006). Detekcija proteina bojanjem srebrom pokazala se znatno osjetljivijom u odnosu na bojanje bojom CBB R – 250. Unaprijednje detekcije je također jedan od budućih smjerova u istraživanju IDP (Czismok i sur., 2006). U tom kontekstu značajna je upotreba masene spektrometrije što su već pokazali Czismok i sur. (2007).

Upotrebom lektina ConA pokušali smo provjeriti prisutnost N-glikoziliranih proteina (Slika 8A i 8B). Rezultati provjere glikozilacije su nedoređeni. ConA se veže za α -D-glukozu, ali i α -D-manozu, koja je sastavni dio središnje strukture svih N-glikana. Obradom membrane

ovim lektinom, nakon elektroprijenosa proteina, mogu se otkriti svi N-glikozilirani proteini u analiziranom proteinskom ekstraktu (Balen i sur., 2011). O-glikozilacija IDP se već odvija u neurenim regijama, dok se N-glikozilacija pojavljuje u istim omjerima u urenim i neurenim proteinskim regijama (Kurotani i sur., 2014). Iako da se N-glikani i pojavljuju samo u urenim regijama to ne objašnjava pojavu razmazanog traga na nitroceluloznoj membrani u sve tri stanične linije šećerne repe. Uzrok tome vjerojatno treba tražiti u fizikalno-kemijskim parametrima elektroforeze i samih proteina. Pokušaj denaturiranja proteina korištenjem SDS-a tijekom elektroforeze u svrhu dobivanja boljih rezultata s ConA nije uspio i detekcija glikoziliranih proteina kojoj je prethodila denaturirajuća elektroforeza nije razriješila situaciju. U linijama HO i HNO nije dobiven pozitivan signal, dok se u liniji N nazire lagani trag. Objašnjenje treba potražiti u daljnjim istraživanjima iako se rezultati slažu sa teorijom da se N-glikoziliraju oni proteini koje je određuje membrana i izvanstanični matriks.

Jedan od ciljeva istraživanja je bio ispitati razinu ekspresije IDP nakon izazvanog abiotičkog stresa. Vodni stres je izazvan manitolom dok je abiotički stres teških metala izazvan kadmijem. Oba stresora su često upotrebljavana za tu svrhu i njihova funkcionalnost je dokazana (Gao i sur., 2012; Xu i sur., 2008; Pavoković i sur., 2011).

Podvrgavanjem stanične linije HO šećerne repe tretmanu s 300 mM manitolom (Slika 9 i 11) primjećuje se da je prirast šećerne repe lošiji nakon osam i četrnaest dana u usporedbi s kontrolom. Isto tako, na tkivu je vidljiva nekroza, naročito nakon četrnaest dana. Takav rezultat je otkriven s obzirom da manitol uzrokuje vodni stres. Nakon osam dana ne dolazi do povećanja aktivnosti gvajakol peroksidaze. Nakon četrnaest dana dolazi do povećanja aktivnosti gvajakol peroksidaze kao odgovora na stresne uvjete izazvane manitolom. Štetni uvjeti, poput vodnog stresa, često uzrokuju oksidacijski stres i proizvodnju reaktivnih oblika kisika (ROS, *reactive oxygen species*) (Gao i sur., 2012). Peroksidaze igraju aktivnu ulogu u staničnoj detoksikaciji ROS, pa je ekspresija gena *POD* u biljkama odgovor na različite okolišne čimbenike poput hladnoće, deficita vode, NaCl i teških metala (Azevedo Neto i sur., 2006). Iz rezultata razdvajanja IDP elektroforezom, vidljivo je da je ekspresija nekih proteina u liniji HO, koja je rasla na podlozi s 300 mM manitolom, znatno jača nego kod linije HO koja je rasla na kontrolnoj podlozi. Neki IDP iz grupe proteina LEA mogu djelovati kao hidratacijski puferi i smanjiti gubitak vode tijekom stresnih uvjeta (Gao i sur., 2012). Soulages i sur. (2002) su pokazali da proteini LEA mogu zamijeniti vodu na dodirnim površinama i tako zaštititi stanice ili tkiva od štete izazvane sušom.

Podvrgavanjem stani ne linije HO tretmanu s kadmijem (Slika 10 i 12) dolazimo do različitih rezultata, ovisno o upotrijebljenoj koncentraciji CdCl₂ (10 μM, 40 μM i 100 μM). Koncentracije od 10 i 40 μM CdCl₂ nisu se pokazale dovoljnim da bi izazvale jači odgovor. 100 μM CdCl₂ uzrokuje promjene na fenotipskoj razini, ali i pojačanu proteinsku ekspresiju nakon osam i etnaest dana.

Izlaganje biljaka stresnim uvjetima uzrokuje oksidacijski stres i produkciju ROS. Stoga je mehanizam uklanjanja ROS bitan za biljke. Gao i sur. (2012) sugeriraju da ekspresija *TaLEA1* može pojačati djelovanje peroksidaza koje pomažu u uklanjanju ROS. Iz rezultata je vidljiva pojačana ekspresija određenih proteina nakon osam i nakon etnaest dana u odnosu na kontrolu. Stoga, jedna metoda kojom biljka može pojačati toleranciju na stres je aktiviranjem *TaLEA1* i povećanjem aktivnosti peroksidaza pod stresom izazvanim pomoću CdCl₂ (Gao i sur., 2012).

Linija HO koja je rasla na podlozi s 10 μM CdCl₂, dala je neekvivalentne rezultate. Kako je rečeno, u prisutnosti kadmija rasla je bolje nego linija HO uzgajana na kontrolnoj podlozi, a izostali su i ostali pokazatelji stresa. Ovaj uinak objašnjava hormoneza koja se definira kao proces u kojem izlaganje niskim dozama kemijske tvari ili okolišnih čimbenika koji su štetni u većim dozama, inducira korisne efekte na stanicu ili organizam (Matson, 2008).

Iz rezultata je vidljiva hiperhidriranost tkiva koje je raslo na podlogama s 40 i 100 μM kadmijem, te 300 mM manitolom. Oksidacijski stres se događa u tkivima koja su hiperhidrirana, što posljedično uzrokuje stani na oštećenja u tkivima uzgajanim u uvjetima *in vitro*. Oksidacijska oštećenja membrane vode ka gubitku funkcije, i na kraju, raspadu strukturalnog integriteta, što dovodi do promjena u morfologiji tkiva (Balen i sur., 2011).

Proučavanjem razlika u ekspresiji IDP u liniji HO koja je rasla na podlozi s manitolom i kadmijem, vidimo da se najjača proteinska ekspresija događa u linijama HO koje su rasle na podlozi s 300 mM manitolom i 100 μM kadmijem. Nakon osam i etnaest dana ti stresori izazivaju značajan odgovor na fenotipskoj i proteomskoj razini. Velika većina proteina je jače eksprimirana u odnosu na kontrolu, a to ide u prilog činjenici koja govori da su IDP uključeni u procese odgovora na vodni stres i stres teškim metalima (Gao i sur., 2012). Niže koncentracije kadmija nisu izazvale takve promjene u ekspresiji proteina, što nam govori da nisu dovoljne da bi potakle odgovor na stres teškim metalima. Slijedeći korak je identifikacija proteina uključeni u odgovor na ove stresore masenom spektrometrijom.

Istraživanje IDP je prvo ove vrste u Republici Hrvatskoj. IDP vrše mnoge uloge u stanici, me u ostalim, igraju ulogu u odgovoru biljke na abioti ki stres. Razumijevanje na ina kako funkcioniraju, otvara prostor ka razvoju novih tehnologija u budu nosti, stoga su daljnja istraživanja neophodna. Jedan od smjerova istraživanja su post-translacijske modifikacije IDP, koje utje u na njihovo funkcioniranje, a samim time i na brojne procese u stanici.

6 ZAKLJUČAK

- Koriste i izmijenjenu metodu po Czismok i sur. (2006) u poliakrilamidnome gelu uspješno su odvojeni IDP i globularni proteini iz biljne stanice.
- Postoje razlike u ekspresiji IDP u staničnim linijama N, HO i HNO šeerne repe, što ukazuje da ekspresija proteina ovisi o razvojnem stadiju linija šeerne repe.
- Detekcija N-glikoziliranih proteina je ostala nedorečena, iako se rezultati slažu s teorijom da se N-glikoziliraju oni proteini čije je odredište membrana i izvanstanični matriks.
- 300 mM manitol i 100 μ M kadmij smanjuju prirast biljnog tkiva, dok tkiva koja su rasla na podlogama s 10 i 40 μ M kadmijem pokazuju veći prirast.
- Aktivnost gvajakol peroksidazi se značajnije povećava nakon četrnaest dana i to na podlogama s 300 mM manitolom i 100 μ M kadmijem, te gvajakol peroksidaze služe kao indikatori stresa.
- Ekspresija IDP je značajno povećana u linijama HO, koje su rasle na podlogama s 300 mM manitolom i 100 μ M kadmijem, što ide u prilog tezi da IDP sudjeluju u odgovoru na abiotički stres, dok 10 i 40 μ M kadmij ne izazivaju takav odgovor.

7 LITERATURA

- Azevedo Neto A.D., Prisco J.T., Eneas-Filho J., de Abreu C.E.B., Gomes-Filho E., (2006): Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt sensitive maize genotypes. *Environmental and experimental botany* **56**: 87-94
- Balen B., Peharec P., Tkalec M., Krsnik-Rasol M., (2011): Oxidative stress in horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) tissues grown *in vitro*. *Food technology and biotechnology* **49**: 32–39
- Balen, B., Pavokovi D., Peharec Štefani P., Krsnik-Rasol M., (2011): Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Hrvatska sveu ilišna naklada, Zagreb.
- Ban Q., Liu G., Wang Y., (2011): A DREB gene from *Limonium bicolor* mediates molecular and physiological responses to copper stress in transgenic tobacco. *Journal of plant physiology* **168**: 449-458
- Berg J., Tymoczko J., Stryer L., (2006): *Biochemistry*, sixth edition. W. H. Freeman and Company, New York, str. 25-65.
- Blum H., Beier H., Gross, H. J., (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93–99.
- Bradford, M. M., (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248–254.
- Csizmok V., Dosztanyi Z., Simon I., Tompa P., (2007): Towards proteomic approaches for the identification of structural disorder. *Current protein and peptide science* **8**: 173-173
- Czismok V., Szollosi E., Friedrich P., Tompa P., (2006): A novel two-dimensional electrophoresis technique for the identification of intrinsically unstructured proteins. *Molecular and cellular proteomics* **5**: 265-273

de Greef W., Jacobs M., (1979): In vitro culture of the sugarbeet: Description of a cell line with high regeneration capacity. *Plant science letters* **17**: 55-61

Dosztanyi Z., Meszaros B., Simon I., (2009): Bioinformatical approaches to characterize intrinsically disordered/unstructured proteins. *Briefings in bioinformatics* **2**: 225-243

Dube M.P., Castonguay Y., Cloutier J., Michaud J., Bertrand A., (2013): Characterization of two novel cold-inducible K₃ dehydrin genes from alfalfa (*Medicago sativa* spp. *Sativa* L.). *Theoretical and applied genetics* **126**: 823-835

Dunker A.K., Brown C.J., Lawson J.D., Iakoucheva L.M., Obradovic Z., (2002): Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* **41**: 6573-6582

Fazekas De St. Groth S., Webster R.G., Datyner, A. (1963): Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoresis strips. *Biochimica and biophysica acta* **71**: 377-391

Feng Z-P., Zhang X., Han P., Arora N., Anders R.F., Norton R.S., (2006): Abundance of intrinsically unstructured proteins in *Plasmodium falciparum* and other apicomplexan parasite proteoms. *Molecular and biochemical parasitology* **150**: 256-267

Gao C., Wang C., Zheng L., Wang L., Wang Y. (2012): A LEA gene regulates cadmium tolerance by mediating physiological responses. *International journal of molecular sciences* **13**: 5468-5481

Gontero B., Maberly S.C., (2012): An intrinsically disordered protein, CP12; jack of all trades and master of the Calvin cycle. *Biochemical society transactions* **40**: 995-999

Haaning S., Radutoiu S., Hoffman S.V., Dittmer J., Giehm L., Otzen D.E., Stougaard J., (2008): An unusual intrinsically disordered protein from the model legume *Lotus japonicus* stabilizes proteins *in vitro*. *The journal of biological chemistry* **283**: 31142-31152

Hagege D., Kevers C., Gaspar T., Thorpe T.A., (1991): Abnormal growth of habituated sugar beet callus and cell suspensions. *In vitro cellular and developmental biology* **27P**: 112-116

Hara M., (2010): The multifunctionality of dehydrins. *Plant signaling and behavior* **5**: 503-508

- Has-Schön E., Lepeduš H., Jerabek Lj., Cesar V., (2005): Influence of storage temperature on total peroxidase activity in crude extracts from *Picea abies* L. karst. needles. *Croatica chemica acta* **78**: 349-353
- Hincha D.K., Thalhammer A., (2012): LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. *Biochemical society transactions* **40**: 1000-1003
- Kovacs D., Agoston B., Tompa P., (2008): Disorderd plant proteins as molecular chaperons. *Plant signaling and behaviour* **3**: 710-713
- Kovacs D., Kalmar E., Torok Z., Tompa P., (2008): Chaperone activity of ERD 10 and ERD 14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant physiology* **147**: 381-390
- Kurotani A., Tokmakov A.A., Kuroda Y., Fukami Y., Shinozaki K., Sakurai T., (2014): Correlations between predicted protein disorder and post-translational modifications in plants. *Bioinformatics* **30**: 1095 - 1103
- Linding R., Juhl Jensen L., Diella F., Bork P., Gibson T.J., Russell R.B., (2003): Protein disorder predictions: Implications for structural proteomics. *Structure* **11**: 1453-1459
- Mahajan S., Tuteja N., (2005): Cold, salinity and droguht stress: An overview. *Archives of biochemistry and biophysics* **444**: 139-158
- Matson M.P., (2008): Hormesis defined. *Ageing research reviews* **7** (1): 1-7
- Mouillon J.M., Gustafsson P., Harryson P., (2006): Structural investigation of disordered stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments. *Plant Physiology* **141**: 638-650
- Nespoulous C., Rofidal V., Sommerer N., Hem S., Rossignol M., (2012): Phosphoproteomic analysis reveals major default phosphorylation sites outside long intrinsically disordered regions of *Arabidopsis* plasma membrane proteins. *Proteome science* **10**: 10.1186/1477-5956-10-62
- Pavokovi D., Omarszad O., Maury S., Joseph C., Delaunay A., Krsnik-Rasol M., Hagege D., (2011): The role of carbohydrate-metabolizing enzymes in sugar sensing and differentiation in sugar beet cell lines. *Food technology and biotechnology* **49**: 435-446

- Pavokovi D., Šola I., Hagege D., Krsnik-Rasol M., (2007): Sugar-induced changes in cellular and extracellular protein and glycoprotein patterns of sugarbeet cell lines. *Acta botanica croatica* **66**: 127-134
- Pietrosemoli N., Garcia-Martin J.A., Solano R., Pazos F., (2013): Genome-wide analysis of protein disorder in *Arabidopsis thaliana*: Implications for plant environmental adaptation. *PLoS ONE* **8**: e55524
- Poder D., Omarzad O., Hagege D., (1991): Comparative study of respiratory metabolism in three types of sugarbeet calli, a normal and two habituated ones (organogenic and non-organogenic). *Life sciences* **321**: 479-483
- Soulages J.L., Kim K., Walters C., Cushman J.C., (2002): Temperature induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean. *Plant physiology* **128**: 822-832
- Srivastava R., Deng Y., Shweta S., Rao A.G., Howell S.H., (2013): Binding protein is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in *Arabidopsis*. *The plant cell* **25**: 1416-1429
- Sun X., Rikketink E.H.A., Jones W.T., Uversky V.N., (2013): Multifarious roles of intrinsic disorder in proteins illustrate its broad impact on plant biology. *The plant cell* **25**: 38-55
- Tompa P., (2002): Intrinsically unstructured proteins. *Trends in biochemical sciences* **27**: 527-533
- Tompa P., (2005): The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS letters* **579**: 3346-3354
- Tompa P., (2011): Unstructural biology coming of age. *Current opinion in structural biology* **21**: 419-425
- Tompa P., (2012): Intrinsically disordered proteins: a 10 year recap. *Trends in biochemical sciences* **37**: 509-516
- Westerheide S.D., Raynes R., Powell C., Xue B., Uversky V.N., (2012): HSF transcription factor family, heat shock response, and protein intrinsic disorder. *Current protein and peptide science* **13**: 86-103

Xu J., Xiu Zhang Y., Wei W., Han L., Qiu Guan Z., Wang Z., (2008): BjDHNs confer heavy-metal tolerance in plants. *Molecular biotechnology* **38**: 91-98

Yang Y., He M., Zhu Z., .Li S., Xu Y., Zhang C., (2012): Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *Plant biology* **12**: 10.1186/1471-2229-12-140

Yi S., Boys B.L., Brickenden A., Konermann L., Choy W.Y., (2007): Effects of zinc binding on the structure and dynamics of the intrinsically disordered protein prothymosin : Evidence for metalation as an entropic switch. *Biochemistry* **46**: 13120-13130

<http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat/notes/API%20Notes%20D%20organic%20chem.htm> (24.08.2014)

http://www.mpipks-dresden.mpg.de/~tisean/TISEAN_2.1/index.html (24.08.2014)

<http://www.disprot.org/> (24.08.2014)

<http://iupred.enzim.hu/> (24.08.2014)

<http://www.biominer.bime.ntu.edu.tw/ipda> (24.08.2014)

<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/> (24.08.2014)

<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> (24.08.2014)

<http://dis.embl.de/> (24.08.2014)

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (24.08.2014)

<http://bvseq.molgen.mpg.de/Genome/Download/KDHBv/?C=D;O=A> (24.08.2014)

<http://biopython.org/wiki/Download> (24.08.2014)

<http://www.pondr.com/index> (24.08.2014)

<https://www.python.org/download/releases/2.7> (24.08.2014)

8 PRILOZI

Prilog I – Popis proteina, u FASTA formatu, iz genoma šeerne repe koji zadovoljavaju *hotloops* kriterije za definiranje LDR.

9 ŽIVOTOPIS

Tomislav Rončević
+385 91 793 14 64
troncevic@gmail.com

Adresa: Boravište - Franje Wolflla 2
10 000 Zagreb

Prebivalište - Rovanijska
Put Rovanijske 21
23 243 Maslenica

Datum i mjesto rođenja: 17.10.1985. u Zadru.

Obrazovanje:

1992. – 1996. Osnovna škola A.G. Matoš, Novalja

1996. – 2000. Osnovna škola Petar Zoranić, Jasenice

2000. - 2004. Srednjoškolsko obrazovanje, Gimnazija Franje Petrića, Zadar

2004. - Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, profesorski smjer biologije i kemije (studij uz rad)

Akademski stupnjevi

Apsolvent smjera prof. biologije i kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Prosječna ocjena - 4.02

Znanstveni interes

Proteomika, strukturalna biologija

Ilanstva, nagrade:

Osvojeno 5. mjesto na državnom natjecanju iz biologije 2004. godine za rad pod nazivom «Ekološke zna ajke uvale Jazine» (mentorica: Terezija Šabi , prof.)

Radno iskustvo:

Demonstrator na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno – matemati kog fakulteta u školskoj godini 2006./2007.

Voditelj Judo i Valbado škole za djecu i odrasle (2009. -)

Razni poslovi fizi kog tipa kroz cijeli studij: selidbe, konobarenje i sl.

Ostalo:

Materinski jezik	Hrvatski
Drugi jezik(ci)	Engleski (aktivno) Njema ki (pasivno)
Društvene vještine i kompetencije	Sklonost timskom radu, upornost, komunikativnost
Druge vještine i kompetencije	Nositelj crnog pojasa u Judo - u (I. Dan) i Valbado – u (II. Dan)
Ra unalne vještine i kompetencije	Vrlo dobro poznavanje rada na ra unalu
Voza ka dozvola	kategorija B