

Usporedba fenotipskih svojstava mutanta TROL KO i divljeg tipa uročnjaka *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Kerečeni, Bernardo

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:900324>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Bernardo Kerečeni

**Usporedba fenotipskih svojstava mutanta TROL KO
i divljeg tipa uročnjaka *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu biljnu biologiju i biotehnologiju Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Hrvoja Fulgosija, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Usporedba fenotipskih svojstava mutanta TROL KO i divljeg tipa uročnjaka *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Bernardo Kerečeni
Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Biljni organizmi fotosintetskim reakcijama pridonose proizvodnji organske tvari u ekosustavu i nastajanju kisika, prijeko potrebnih komponenti energetskeg metabolizma velike većine bioloških organizama. Bitna točka fotosinteze nalazi se na razmeđu reakcija ovisnih o svjetlu i Calvinovog ciklusa: redukcija NADP^+ posredstvom ferredoksin: NADP^+ reduktaze (FNR). U prošlom je desetljeću otkriveno da je za uspješno funkcioniranje enzima FNR prijeko potrebna njezina interakcija s transmembranskim proteinom TROL (*thylakoid rhodanase like protein*). U ovom je radu istražen učinak odsustva proteina TROL (*knock-out* mutacije TROL) na krajnje fenotipske značajke učinkovitosti fotosinteze – suhu biomasu, površinu listova i koncentraciju fotosintetskih pigmenta. Uz kontrolnu grupu biljaka uzgajanu u optimalnim uvjetima, dio biljaka je uzgajan u uvjetima manjka vode radi dodatnog potvrđivanja utjecaja proteina TROL na usmjeravanje elektrona s FNR u biosintezu šećera. Zaključno, *knock-out* mutacija TROL (TROL KO) u slučaju biljaka uzgajanih na zemlji s normalnom količinom vode dovodi do 40%-tnog smanjenja biomase i 20%-tnog smanjenja površine listova u odnosu na divlji tip, dok u uvjetima manjka vode mutirane biljke pokazuju veću otpornost. Mjerenja koncentracije fotosintetskih pigmenta nisu pokazala značajne promjene između mutanata i divljeg tipa uročnjaka. Međutim, koncentracije klorofila *a* i *b* u uročnjacima divljeg tipa izloženih sušnom stresu značajno su porasle, što zahtjeva dodatna istraživanja.

(35 stranica, 13 slika, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: fotosinteza, TROL, suša, biomasa, površina listova

Voditelj: Dr. sc. Hrvoje Fulgosi, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju

Suvoditelj: Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.

Rad prihvaćen: 18.6.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Comparative analysis of phenotypic characteristics of TROL KO mutant and wild-type *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Bernardo Kerečeni
Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Plant organisms with their photosynthetic activity largely contribute to the environment in outputting organic compounds and oxygen involved in the most fundamental biological processes. The essential point of photosynthesis is situated at the intersection of light-dependent reactions and the Calvin cycle, specifically, the reduction of NADP⁺ via ferredoxin:NADP⁺ reductase (FNR). Over the past decade, it has been discovered that the interaction of the transmembrane protein TROL (*thylakoid rhodanase like protein*) is essential for the efficient functioning of FNR. This work investigated the effect of TROL *knock-out* mutation on the final phenotypic characteristics of efficient photosynthesis, like dry biomass, leaf area, and the concentration of photosynthetic pigments. Alongside the control group of plants grown in optimal conditions, a portion of plants was grown in drought conditions, to further prove the effect of TROL protein on channelling the electrons from FNR to sugar biosynthesis. Finally, the TROL *knock-out* mutants (TROL KO) exhibit 40% loss in dry weight and 20% reduction of leaf area in plants cultivated on regularly watered soil, whereas the same plants in drought conditions exhibit increased resilience. Measurements of the photosynthetic pigment concentrations did not show significant changes between mutants and wild-type. However, the concentrations of chlorophyll *a* and *b* in wild-type *Arabidopsis* exposed to drought stress increased significantly, which requires further research.

(35 pages, 13 figures, 56 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: photosynthesis, TROL, drought, biomass, leaf area

Supervisor: Dr. sc. Hrvoje Fulgosi, scientific consultant in permanent placement

Cosupervisor: Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. prof.

Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.

Thesis accepted: 18.6.2020.

Prije svega se zahvaljujem dr. sc. Hrvoju Fulgosiju, znanstvenom savjetniku koji mi je omogućio izradu diplomskog rada u svom laboratoriju i što me pratio od samih početaka našeg upoznavanja na izbornom kolegiju Regulacijski mehanizmi u fotosintezi

Za pomoć iskazanu u morfolometrijskoj analizi površine listova rozeta uzgojenih biljaka A. thaliana u ovom radu zahvala asistentici Luciji Horvat, a za pomoć u westernskoj metodi otiska hvala kolegici dr.sc. Lei Vojta

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek koja mi je na samim počecima bila podrška i svojim predavanjima budila interes za biljnu fiziologiju. Zahvaljujem joj na vrijednim uputstvima u vidu tehničkih detalja oko izrade diplomskog rada i uspješnog provođenja eksperimenata

Također sam zahvalan asistentici dr.sc. Mariji Babić i prof.dr.sc. Mirti Tkalec na mnogim trenucima snažne moralne potpore i zdravog humora prilikom stručne laboratorijske prakse te na divnim uspomnama s Noći biologije na odjelu za biljke mesožderke

Hvala doc.dr.sc. Ivani Šola i dr.sc. Valeriji Vujčić koje su me pratile na drugoj stručnoj praksi na diplomskom studiju u svom laboratoriju za fitokemiju u divnom okružju Botaničkog vrta

Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je bila podrška i potpora tijekom cijelog studiranja

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Proces fotosinteze.....	1
1.2. Fotosinteza u stresnim uvjetima.....	3
1.3. Reaktivne kisikove vrste (ROS, engl. <i>reactive oxygen species</i>)	5
1.4. Biljke i fotosinteza u uvjetima manjka vode.....	7
1.5. Protein TROL i njegova interakcija s FNR	8
1.6. Modelni organizam <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
2. Materijali i metode.....	13
2.1. Porijeklo korištenog sjemenja	13
2.2. Uvjeti uzgoja s naglaskom na suvremeno LED osvjetljenje.....	13
2.3. Westernska metoda otiska	15
2.4. Morfometrijska analiza površine listova.....	17
2.5. Određivanje suhe mase	19
2.6. Metoda ekstrakcije i spektrofotometrijskog mjerenja koncentracije fotosintetskih pigmenata	19
2.7. Statistička obrada podataka	20
3. Rezultati.....	21
3.1. Westernska metoda otiska (<i>western blot</i>): potvrda odsustva proteina TROL u mutantima TROL KO.....	21
3.2. Morfometrijska analiza površine listova rozeta	22
3.3. Određivanje suhe mase biljaka („ <i>carbon capture</i> “).....	23
3.4. Spektrofotometrijsko mjerenje fotosintetskih pigmenata	25
5. Zaključak.....	30
6. Literatura.....	31
7. Životopis.....	35

Popis kratica

ANOVA – analiza varijance

APS – amonijev persulfat

ATP – adenzin trifosfat

Chl a/b – klorofil a/b

ECL – unaprijeđena detekcija

kemilumiscencijom, engl. *enhanced chemiluminescent detection*

ITEP domena – visoko konzervirani modul proteina TROL nužan u specifičnoj interakciji s FNR

Fd - feredoksin

FNR – feredoksin:NADP⁺ reduktaza

GM – genetička modifikacija

KONZ – skupina TROL KO mutiranih biljaka uročnjaka uzgajanih na zemlji normalnog sadržaja vlage

KOSZ – skupina TROL KO mutiranih biljaka uročnjaka uzgajanih na suhoj zemlji

LHC – kompleks za apsorpciju svjetlosti, engl. *light harvesting complex*

NADP⁺ - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, oksidirani

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, reducirani

P680 – klorofil u reakcijskom središtu fotosustava II, koji ima maksimum apsorpcije svjetlosti pri valnoj duljini 680 nm

PBS – fosfatni pufer, engl. *phosphate buffered saline*

PC - plastocijanin

PQ - plastokinon

PSI – fotosustav I

PSII – fotosustav II

RHO domena –domena homologije rodanaza/cdc25 fosfataza

ROS – reaktivni kisikovi oblici, engl. *reactive oxygen species*

RUBISCO – ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza

SDS – natrijev dodecil sulfat, engl. *sodium dodecil sulphate*

TEMED – tetrametiletildiamin

Tic62 – translokon unutrašnje membrane kloroplasta 62, engl. *translocon of the inner chloroplast membrane*

Tris - trishidroksimetilaminometan

TROL – engl. *thylakoid rhodanase-like protein*

TROL OX – TROL *over-expression* mutacija

TROL KO – TROL *knock-out* mutacija

Tukey HSD – Tukeyjev *post-hoc* test statistički značajne razlike (HSD engl. *honest significant difference*)

Tween - polisorbat 20

WTNZ – skupina biljaka uročnjaka divljeg tipa uzgajanih na zemlji normalnog sadržaja vlage

WTSZ – skupina biljaka uročnjaka divljeg tipa uzgajanih na suhoj zemlji

1. Uvod

1.1. Proces fotosinteze

Fotosinteza je osnovni autotrofni biokemijski proces kojim biljke, alge i određene vrste bakterija kao proizvođači organskih tvari unose ugljik u ekosustav putem fiksacije ugljikovog dioksida (CO_2) i njegove susljedne redukcije u šećerne spojeve energijom preuzetom iz fotona sunčeve svjetlosti. Kao nusprodukt početne fotolize molekule vode nastaje molekularni kisik koji je posredstvom fotosintetskih organizama promijenio čitav tok evolucije živućih organizama na Zemlji (Taiz i Zeiger, 2015). Velik dio mase biljnog organizma dolazi od vode, kao što je slučaj s većinom bioloških sustava, no onaj dio mase kojeg biljka aktivno stvara i izgrađuje fotosintezom naziva se njenom „suhom tvari“, „suhom masom“, ili engl. *carbon capture*. Taj naziv upućuje na zanimljivu iako logičnu činjenicu da je zapravo CO_2 iz atmosfere, fotosintezom fiksiran u šećerne molekule, odgovoran za stvaranje celuloze i ostalih potpornih i gradivnih elemenata biljke (Raza, 2019).

Biokemijski gledano, fotosintezu je moguće podijeliti na dva dijela. Prvi obuhvaća niz kompleksnih reakcija ovisnih o sabiranju fotona svjetlosti i njihovom energetski učinkovitom prijenosu kroz lanac membranski vezanih proteina u kloroplastu. Tim procesom u konačnici nastaju visokoenergetski reducenski potrebni za drugi dio reakcija - anaboličku sintezu šećera koja gotovo svim biološkim organizmima predstavlja osnovicu kemijske pretvorbe energije kroz kataboličke reakcije metabolizma. Drugi se niz reakcija tradicionalno nazivao „reakcijama u tami“, što se danas uglavnom izbjegava rabeći naziv „Calvin-Bensonov ciklus“, budući da za odvijanje dotičnih reakcija nije nužno odsustvo svjetlosti, već sama činjenica da ne ovise o dijelu dana kao prvotni niz fotokemijskih reakcija (Johnson, 2016). Štoviše, poznato je iz literature kako se barem četiri enzima Calvinovog ciklusa aktiviraju putem feredoksin:tiodoksin puta čija je aktivnost direktno ovisna o svjetlosti; NADP:gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, koja sudjeluje u reduktivnom dijelu ciklusa te tri enzima, fruktoza-1,6-bisfosfataza, sedoheptuloza-1,7-bisfosfataza i ribuloza-5-fosfat kinaza koji služe u regeneraciji ribuloze-1,5-bisfosfata koji fiksira CO_2 putem enzima RUBISCO. Svim enzimima zajednički je mehanizam aktivacije redukcijom disulfidnih mostova. Nadalje, čak je i sama aktivnost RUBISCO indirektno ovisna o svjetlosti posredstvom RUBISCO aktivaze, iako se točan mehanizam znatno razlikuje od prethodno opisanih enzima povezanih feredoksin:tiodoksin sustavom (Besse i Buchanan, 1997; Lorimer, 1981; Zhang i Portis, 1999).

Dva dosad opisana tipa fotosintetskih reakcija u algama i višim biljkama provode se u posebno specijaliziranim staničnim organelima – kloroplastima. U nastavku rada bit će opisan niz fotosintetskih reakcija i sustava svojstvenih vaskularnim biljkama. Kloroplasti kao takvi spadaju u širu skupinu plastida, veoma dinamičnih i prilagodljivih staničnih organela koji mogu u ovisnosti o okolišnim uvjetima mijenjati morfologiju, ultrastrukturu, biokemijski sastav enzima i pigmenata te svoju konačnu funkciju i svrhu. Ono što im je zajedničko jest to da su, kao i mnogi drugi unutarstanični organeli, odvojeni sustavom membrana od ostatka stanice kako bi se u njima mogle učinkovito odvijati i regulirati specifične metaboličke reakcije (Jensen i Leister, 2014). Kloroplasti se u višim biljkama sastoje od čak tri različita tipa membrana: dvije vanjske koje funkcioniraju kao ovojnica, barijera i fronta komunikacije s jezgrom i ostatkom stanice, te unutarnjeg sustava tzv. tilakoidnih membrana koje se nadalje mogu razlučiti na grana tilakoide i stroma tilakoide. Po pitanju staničnih prostora koje kloroplasti zatvaraju moguće je govoriti o međumembranskom prostoru, stromi i lumenu tilakoida (Mechela i sur., 2019).

Fizikalno-kemijski temelj fotosinteze počiva na stvaranju elektrokemijskog gradijenta između dvaju membranama odvojenih odjeljaka, kao što to biva kod mitohondrija i njihove uloge u oksidacijskim reakcijama pri stvaranju ATP-a. Konkretno, fotoni svjetlosti pokreću prijenos elektrona tijekom kojeg dolazi do nakupljanja protona u lumenu tilakoida. Tako istovremeno pada njihova koncentracija u stromi. Drugim riječima, pH vrijednost strome se povećava u uvjetima osvjjetljenja te kao takva potiče aktivaciju najvažnijeg enzima Calvinovog ciklusa, ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze, poznatijeg kao RUBISCO. Osim svega navedenog, kloroplasti predstavljaju mjesto na kojem biljke reduktivnom energijom nastalom u transportnom lancu elektrona sintetiziraju masti, reduciraju, nitrite, sulfate i mnoge druge spojeve važne u primarnom i sekundarnom metabolizmu stanice i čitavog biljnog organizma kao takvog (Morales i sur., 2017).

Na tilakoidnim membranama nalaze se dva različita fotosustava – fotosustav II (PSII) većinski zastupljen u grana tilakoidima i fotosustav I (PSI), većinski zastupljen u stroma tilakoidima (Caffarri i sur., 2014). Oba fotosustava sastavljena su od velikog broja međusobno povezanih proteina i fotosintetskih pigmenata koji svi zajedno igraju ulogu u apsorpciji fotona svjetlosti i prijenosu svjetlosne energije prema središnjem reakcijskom centru – molekuli klorofila koju pobuđuje kvant apsorbirane svjetlosti valnih duljina 680 nm na PSII, odnosno 700 nm na PSI. Valne duljine maksimuma apsorpcije fotosustava razlikuju se radi osiguravanja jednosmjernog toka energije i time se povećava efikasnost pretvorbe svjetlosne energije fotona u kemijsku energiju reducensa NADPH (reducirani *nikotinamid adenin dinukleotid fosfat*) i ATP-a.

Također je dokazan njihov sinergistički učinak – suradnja dvaju fotosustava dovodi do veće učinkovitosti od samog zbroja učinaka pojedinačnih fotosustava. Između njih nalaze se sastavnice transportnog lanca elektrona koje potpomažu transport protona u lumen tilakoida (citokrom *b₆f*) te sastavnice koje olakšavaju jednosmjernost prijenosa elektrona (hidrofobni platokinon – PQ, hidrofilni, luminalni plastocijanin - PC, hidrofilni, stromalni feredoksin - Fd) od početnog PSII do njihovih konačnih akceptora feredoksin-NADP reduktaze (FNR) i NADP⁺. Budući da ionske vrste same po sebi nemaju sposobnost spontanog prelaženja bioloških membrana, protoni se pod utjecajem nastalog gradijenta počinju kretati iz lumena u stromu kloroplasta kroz ATP-sintazu koja pri tome sintetizira ATP iz ADP i anorganskog fosfata. NADPH služi u reduktivnoj, a ATP u reduktivnoj i regenerativnoj fazi Calvinovog ciklusa u stromi.

1.2. Fotosinteza u stresnim uvjetima

Fotosinteza kakva je dosad opisana odvijala bi se u idealnim okolišnim uvjetima koje karakteriziraju umjereno osvjetljenje i temperatura te optimalna koncentracija CO₂ u atmosferi. U prirodi gotovo nikada ne nastupa takav splet idealnih uvjeta, te su biljke opskrbljene prilagodljivim sustavima koji im pomažu opstati u širokom spektru različitih stresnih uvjeta iz okoliša. Unatoč svojoj nemogućnosti kretanja i mijenjanja prostora radi pronalaska povoljnijih uvjeta, biljke su razvile niz prilagodbi na razini cjelokupnog metabolizma i promjena molekularnih čimbenika odgovarajućih biokemijskih procesa ključnih u njihovom preživljavanju (Gaspar i sur., 2002).

Neke od prilagodbi uključuju proizvodnju zaštitnih pigmenata, kao u slučaju ksantofilskog ciklusa koji se aktivira uslijed pretjerano jakog osvjetljenja. Uz svjetlosni stres se također vežu promjene u sastavu i količini pomoćnih antenskih pigmenata – prvenstveno karotenoida, koji kao takvi pomažu apsorpciju fotona svjetlosti i prijenos prema središnjim reakcijskim centrima u dva dosad navedena fotosustava. Karotenoidi i druge sastavnice nisu samostalno uklopljene u tilakoidnu membranu, već su integrirane s proteinskim sastavnicama u tzv. *light-harvesting* komplekse (LHC). Zanimljiv fenomen nastupa ako se kvaliteta okolišnog osvjetljenja promjeni pri čemu PSII u usporedbi sa PSI postaje prekomjerno aktivan u sabiranju fotona i aktiviranju elektrona klorofila. Posljedično tom neuravnoteženom radu dvaju fotosustava nizvodni elementi transportnog lanca elektrona postaju prekomjerno reducirani i „zakočeni“ pred PSI. U takvom je stanju plastocijanin (PC) reduciran viškom elektrona iz PSII čime dolazi do aktivacije posebne kinaze, stromalnog enzima koji fosforilira LHC proteinske komplekse, oslobađa

njihovu vezanost za PSII i omogućuje njihovu „selidbu“ uz premještanje u stroma tilakoide prema PSI. Povećana količina LHC kompleksa oko PSI pomaže njegovom učinkovitijem sabiranju fotona svjetlosti i uravnoteživanju toka elektrona među fotosustavima. Ovakav intrigantan sustav regulacije toka elektrona i međusobno usklađene suradnje dvaju fotosustava poznat je pod nazivom „prijelazi stanja“ i usko je vezan uz druge mehanizme regulacije toka elektrona u fotosintetskim membranama (Schwarz i sur., 2017).

Kao što je ranije napomenuto, svjetlosnim reakcijama fotosinteze kao krajnji produkti nastaju NADPH, nužan u biosintezi ugljikohidrata, i ATP koji je potreban u znatno široj paleti metaboličnih reakcija. U određenim uvjetima okoliša dolazi do neravnomjernog stvaranja navedenih dvaju produkata, primjerice tijekom povišenog intenziteta osvjetljenja koje prezasićuje transportni lanac elektrona i stvara suvišak NADPH u stromi. Tada biljke odgovaraju tzv. „kružnim tokom“ elektrona (engl. *cyclic electron flow*) u kojem se visokoenergizirani elektroni iz PSI posredovanjem feredoksina (Fd) ponovno vraćaju na citokrom *b₆f* i plastokinon (PQ). Takvim načinom kruženja elektrona nastaje potrebiti elektrokemijski gradijent protona između strome i lumena odgovoran za sintezu ATP-a, dok se sama sinteza NADPH zaustavlja (Sagun i sur., 2019). Istovremeno dolazi do aktivacije nefotokemijskog gašenja fluorescencije (NPQ) i regulacije redoks stanja reakcijskog centra PSI. Oba procesa uključena su u toplinsko raspršenje suviška energije koju su biljke apsorbirale u uvjetima povišenog intenziteta svjetlosti (Huang i sur., 2015).

Nezaobilazni dio rasprave o učinku svjetlosnog stresa na biljke i njihove prilagodljivosti na raznolik niz okolišnih uvjeta uključuje istraživanja fluorescencije klorofila. Dosad spominjani procesi fotosintetskih reakcija na svjetlosti mogli bi se zajedničkim imenom nazvati fotokemijskim procesima, budući da se radi o jednoj od tri moguće sudbine oslobađanja energije ekscitiranih klorofila, Chl*, u reakcijskim centrima PS-a. Preostale dvije sudbine uključuju oslobađanje energije elektrona putem dvaju neučinkovitih procesa, tj. onih koji ne pridonose pretvorbi svjetlosne energije u energiju kemijskih veza. Prvi način povratka molekule pobuđenog klorofila u osnovno stanje uključuje proces fluorescencije, a drugi jednostavno oslobađanje energije u obliku topline, već spomenuto nefotokemijsko gašenje, NPQ (Müller i sur., 2001; Ni i sur., 2019). Fenomen fluorescencije nudi zanimljiv niz alata koji znanstvenicima mogu poslužiti u praktičnim i relativno jednostavnim mjerenjima učinaka svjetlosnog i drugih tipova stresa koji utječu na sastavnice fotosintetskog lanca. Nastaje zbog toga što su nizvodni elementi transportnog lanca elektrona hiperreducirani, tj. zasićeni elektronima i ne mogu ih nastaviti primati iz pobuđenih molekula klorofila.

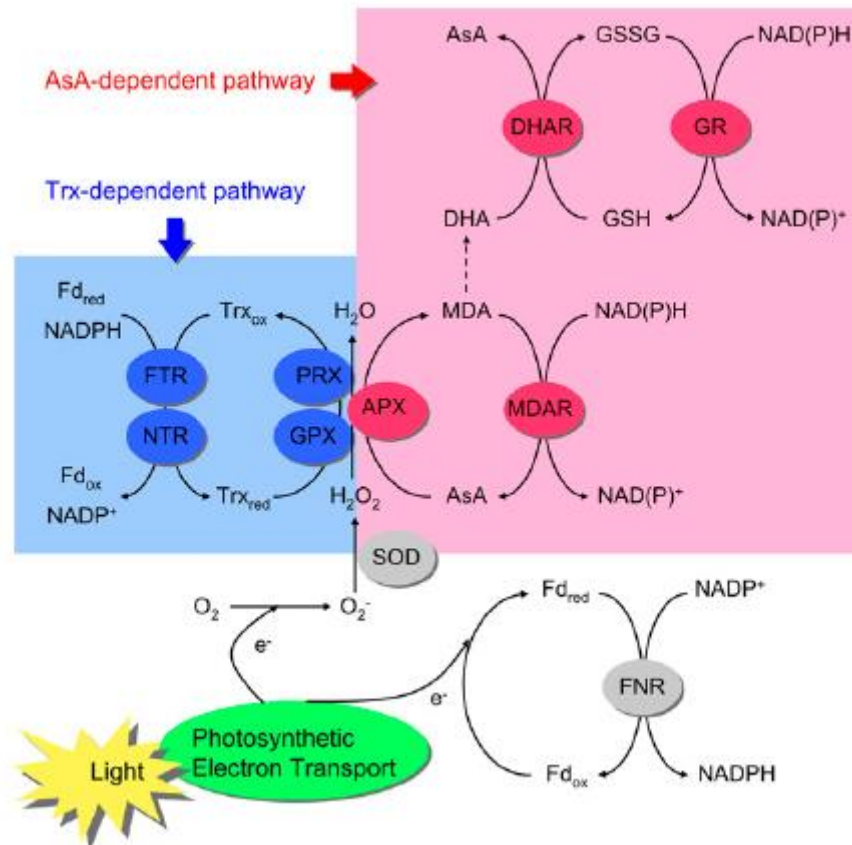
U tom se slučaju smanjuje broj načina na koje je moguće otpustiti suvišak pobudne energije klorofila te dolazi do otpuštanja energije fluorescencijom. Prema prvom znanstveniku koji je opisao takav proces, rabi se naziv „Kautskyjev efekt“ i primarno se odnosi na fluorescenciju klorofila P680 iz PSII (Kautsky i Hirsch, 1931; Govindjee, 1995).

1.3. Reaktivne kisikove vrste (ROS, engl. *reactive oxygen species*)

Aerobni stanični metabolizam kojeg provodi velika većina bioloških organizama, uzrok je nastajanja potencijalno toksičnih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *reactive oxygen species*) i potrebi za održavanjem homeostaze između njihovog nastajanja i eliminacije, budući da u manjoj količini sudjeluju u staničnoj signalizaciji i razvoju organizma (Jones, 2006). Ponekad se nazivaju i „slobodnim kisikovim radikalima“, budući da njihova visoka reaktivnost potiče od nesparenog elektronskog para na kisikovom atomu. Taj se elektron nalazi u veoma nestabilnom stanju i čini kisikove vrste iznimno burnim reagensima – kako bi upotpunili nesparenu elektronsku ljusku, lako otimaju elektrone s raznih molekula na koje naiđu, poput DNA, RNA, proteina i lipida. Svojom reaktivnošću također dovode do nastajanja novih radikalnih vrsta i širenja lančane reakcije. Sam oksidativni stres kao važno područje istraživanja u biologiji definira se preko disbalansa nastajanja i neutralizacije ROS putem velikog broja antioksidacijskih mehanizama koji postoje u stanici.

Među najučestalije ROS spadaju singletni kisik ($^1\text{O}_2$), koji u kontekstu fotosinteze nastaje na PSII, superoksidni radikal, koji nastaje u Mehlerovoj reakciji vezanoj uz PSI te hidroksidni radikal, koji je potencijalni produkt djelomične redukcije superoksidnog radikala posredovanjem enzima superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (Dickinson i Chang, 2011). Izuzev tih enzima, postoje i drugi reducensi i mreže antioksidacijskih enzimatskih sustava koji surađuju u otklanjanju suviška ROS. To su, primjerice, u vodi topivi reducensi glutation (GSH) i askorbat (AsA), lipofilni reducensi poput α -tokoferola i β -karotena kao i kompleksne mreže enzimatskih ciklusa koji povezuju svjetlosne reakcije fotosinteze, Calvinov ciklus i antioksidativni odgovor stanice na ROS (slika 1.1). Iz literature koja proučava utjecaj svjetlosnog stresa na nastajanje ROS u biljnim stanicama, poznato je kako singletni kisik, nastavši otpuštanjem tripletnog klorofila iz reakcijskog centra PSII u njegovo osnovno stanje, uzrokuje nepovratnu oksidaciju i oštećenje središnjeg proteina D1 (Krieger-Liszkay i sur. 2008; Vass i Cser, 2009).

Taj se protein D1 i pri nižim količinama osvjetljenja svakih 30 minuta nanovo sintetizira i ponovno uklapa u PSII, što daje potvrdu visokoj dinamičnosti same regulacije fotosinteze kako ne bi nastupilo nakupljanje prekomjerne količine kisikovih radikala na mjestima važnih staničnih procesa.



Slika 1.1. Prikaz glavnih antioksidacijskih puteva u biljaka za vrijeme oksidativnog stresa i djelovanja superoksid dismutaze (SOD) u prvoj liniji obrane od superoksidnog radikala koji nastaje nepotpunom fotolizom vode u fotosustavu II; označeni apsartat- (AsA) i tioredoksin- (Trx) ovisni putevi antioksidacijskog odgovora na povišenu koncentraciju ROS. FNR – feredoksin:NADP⁺ reduktaza, Fd – feredoksin (*ox* – oksidirani, *red* – reducirani), APX – aspartat peroksidaza, MDAR – monodehidroaskorbat reduktaza, GSH/GSSG – glutation reducirani/oksidirani, GR – glutation reduktaza, DHAR – dehidroaskorbat reduktaza, GPX – glutation peroksidaza, PRX – peroksidaza, Trx – tioredoksin, FTR – feredoksin:tioredoksin reduktaza, NTR – NADPH:tioredoksin reduktaza. Preuzeto iz Foyer i Shigeoka (2011).

Nadalje, u slučaju PSI dolazi do nastajanja superoksidnih i peroksidnih radikala, a cijeli je sustav proteina u transportnom lancu elektrona reguliran mehanizmima poput nefotokemijskog gašenja (NPQ) i cikličnog toka elektrona. Međutim, ono što je važno u vidu ovog istraživanja jest balans između preusmjeravanja elektrona bilo u Calvinov ciklus ili u ostale antioksidacijske cikluse, što se vidi na gornjoj slici.

Feredoksin i s njim povezani enzim FNR nalaze se u oba slučaja na ključnim koracima ciklusa jer je od velike važnosti učinkovito preusmjeriti elektrone dok biljka uslijed okolišnog stresa stvara povećanu količinu ROS. Svi se navedeni metabolički putevi međusobno nadopunjuju – ako se enzimi jednog metaboličkog puta više oštećuju toksičnim djelovanjem kisikovih radikala, tada drugi putevi preuzimaju veću udio u staničnom odgovoru i detoksifikaciji ROS (Foyer i Shigeoka, 2011).

1.4. Biljke i fotosinteza u uvjetima manjka vode

Manjak vode u okolišu jedan je od najučestalijih i najdestruktivnijih stresnih uvjeta unatoč kojem biljke uspijevaju rasti i održati fitnes oslanjajući se na brojne prilagodbe stečene tijekom svoje evolucijske povijesti. Ako se promotri dalekosežan utjecaj suše na godišnji gubitak prinosa usjeva, moguće je primijetiti kako veći dio poticaja istraživanju tog stresnog čimbenika proizlazi upravo iz potrebe za poboljšanjem poljoprivrede, posebice u zemljama čiji klimatski uvjeti ne dopuštaju suvremenim kultiviranim usjevima dovoljno mogućnosti prirodne adaptacije. Nedostatak vode u tlu prvenstveno utječe na biljni rast i učinkovito stvaranje biomase (suhe tvari, *carbon capture*) procesom fotosinteze (Raza i sur., 2019). Jednako tako nastupa smanjenje turgorskog tlaka što je uzrokovano povećanom stopom transpiracije (Farooq i sur., 2009; Scoffoni i sur., 2018).

Kod određenih biljaka primjećuju se promjene u veličini listova i pojačanom grananju korijena, zatvaranju lisnih puči i fotosintetskim prilagodbama najizraženijima u C₄ i CAM biljaka. Posebna skupina sukulentnih biljaka razvila je iglice na mjestu listova i odebljale stabljike koje obilno upijaju ono malo vode koju povremeno donesu oborine.

Na razini regulacije fotosinteze i ostalih biokemijskih procesa, mnogo se istraživanja provodi u vidu antioksidacijskih reakcija koje kao takve otklanjanju štetne ROS te služe popravku oštećenih membranskih sustava i biomakromolekula (Kubota, 2003). Sve u svemu, odgovor biljaka na sušni stres jedan je od najkompleksnijih načina njihove adaptacije, ali jednako tako bogat izvor novih saznanja i istraživačkih pitanja (Salehi-Lisar i Bakhshayeshan-Agdam, 2016; Zivcak i sur., 2013).

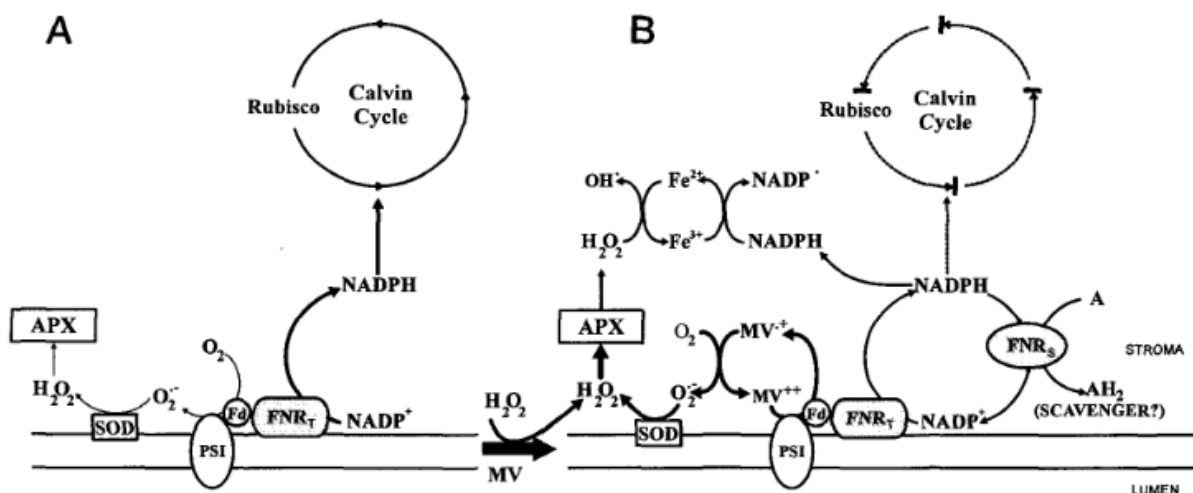
1.5. Protein TROL i njegova interakcija s FNR

Protein TROL koji je u središnjem fokusu ovoga rada, smješten je u sustavu tilakoidnih membrana poput šarke (*hinge*) između proteinskih komponenti konačnih reakcija prijenosnog lanca elektrona i onih koje prethode Calvinovom ciklusu (Vojta i Fulgosi, 2012). Kao takav igra ključnu ulogu u usidranju flavoenzima feredoksin:NADP⁺ oksidoreduktaze (FNR), posljednjeg proteina u lancu prijenosa elektrona koji reducira molekulu NADP⁺ (Jurić i sur., 2009; Vojta i Fulgosi, 2016). Topološki gledano, protein TROL sastoji se od transmembranske domene koja premošćuje tilakoidnu membranu, domene RHO smještene u lumenu tilakoida (Vojta i sur., 2019) te domene koja na stromalnoj strani tilakoidnog sustava membrana veže FNR i pospješuje dovršetak reakcija koje za cilj imaju redukciju NADP⁺. Ta molekula, osim što služi u daljnjoj redukciji CO₂ i pokretanju Calvinova ciklusa, igra ulogu i u nizu reduktivnih reakcija raznih mineralnih tvari, posebice sulfata, te u odgovoru na stresne uvjete, od kojih će u ovom radu biti primarno istražena suša (Selles i sur., 2019).

Na ovom bi mjestu vrijedilo istaknuti nekoliko činjenica vezanih uz kompleksnu mrežu suodnosa proteina Fd, FNR, TROL i ostalih enzima uključenih u hvatanje i redukciju štetnih ROS u stanicama pod stresnim uvjetima, što je sažeto izneseno u radu Vojta i sur. (2015). Prvenstveno, u biljnim kloroplastima Fd igra istovremenu ulogu „uskog grla“ i „središnjeg poštanskog ureda“ koji raspoređuje visoko energizirane elektrone transportnog lanca prema već spomenutim metaboličkim putevima. Poseban put preusmjerenja uključuje ciklični tok elektrona, neophodan u reguliranju ravnotežnog omjera koncentracije NADPH i ATP pod uvjetima fluktuirajućeg osvjetljenja.

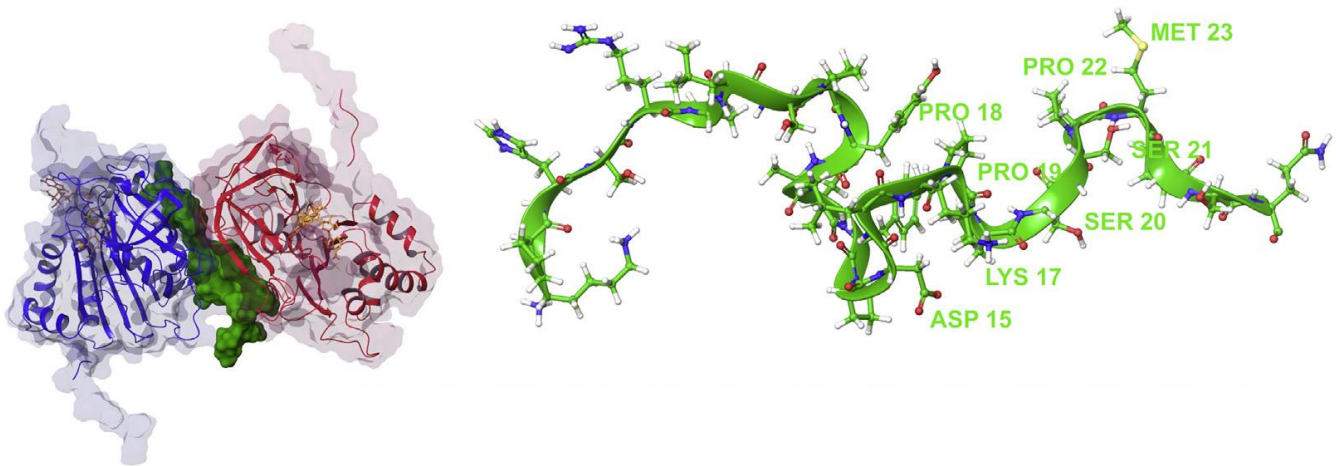
FNR posjeduje zanimljivu funkciju koja dodatno stavlja važnost na otkriće njegove interakcije s proteinom TROL: naime, neki se proteini iz porodice FNR uključeni u stanične procese u kojima FNR katalizira suprotnu reakciju od one kakvu nalazimo u fotosintetskim tilakoidnim reakcijama (Carrillo i Ceccarelli, 2003). Umjesto da primi elektrone od reduciranog Fd, u ovom „heterotrofnom“ obliku on mu ih predaje. Takva mnogostranost jednog proteina uistinu je značajna u odgovoru organizama na različite okolišne uvjete u kojima dolazi do metaboličkih poremećaja nakupljanja neželjenih količina ROS. Jednako tako, Jurić i sur. (2009) dokazali su kako rodna domena (RHO) proteina TROL, okrenuta prema lumenu tilakoida, posjeduje mogućnost otpuštanja FNR ako nastane disbalans u omjeru NADP⁺/NADPH.

Kao i u slučaju cikličnog toka elektrona i održavanja omjera ATP/NADPH, u kloroplastima je omjer $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ također važno održavati konstantnim, budući da njegov poremećaj dovodi do daljnjih oksidativnih oštećenja fotosintetskog sustava (Palatnik i sur., 1997). Pretpostavlja se da u stresnim uvjetima, u kojima učestalo dolazi do prekomjerne redukcije transportnog lanca elektrona, domena RHO proteina TROL interagira s reduciranim plastokinom (PQ) (Jurić i sur., 2013), pri čemu dolazi do konformacijske promjene i otpuštanja FNR u stromu kloroplasta. FNR tada gubi sposobnost učinkovite redukcije NADP^+ te učinkovito provodi suprotnu reakciju oksidacije NADPH, čime se spomenuti omjer vraća u ravnotežu (slika 1.2). Usporedno s oksidacijom NADPH, dolazi do redukcije Fd i ostalih molekulskih hvatača ROS (engl. *ROS scavenger*) koji do danas još nisu dovoljno detaljno istraženi (Vojta i sur., 2015). Sva su dosad spomenuta opažanja i zaključci doneseni u vidu biljaka uzgajanih pod povišenim intenzitetom osvjetljenja. U ovom je, pak, istraživanju naglasak stavljen na odgovor biljaka u uvjetima sušnog stresa i na utjecaj mutacije TROL KO na njihove fenotipske značajke.



Slika 1.2. Prikaz dvostruke funkcije feredoksin: NADP^+ reduktaze (FNR): u slučaju A, FNR je usidren u tilakoidnu membranu posredovanjem proteina TROL koji na slici preuzetoj iz Palatnik i sur. (1997) još nije bio otkriven. FNR tada učinkovito reducira NADP^+ i usmjerava elektrone iz transportnog lanca u biosintezu ugljikohidrata (Calvinov ciklus). U slučaju B, dolazi do otpuštanja FNR u stromu, uzrokovano stresnim faktorom metil viologenom (MV) koji potiče prekomjerno stvaranje ROS i povećava potrebu stanice za preusmjeravanjem visoko energetskih elektrona s NADPH u mrežu antioksidacijskih reakcija. U tom slučaju FNR postaje učinkovit konzument suviška NADPH, vraća omjer $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ u prvotnu ravnotežu i reducira dosad nedovoljno istražene hvatače ROS (engl. *ROS scavenger*). SOD – superoksid dismutaza, APX – aspartat peroksidaza, MV – metil viologen

Od velike je važnosti osvrnuti se na najnovija saznanja o topološkoj strukturi proteina TROL, iako u ovom radu neće biti daljnjeg razlaganja navedene teme. U najnovijem znanstvenom istraživanju Kekić i sur. (2020), koristeći simulacije molekulske dinamike predloženi su različiti načini međusobnih interakcija homodimernog kompleksa FNR s kompleksima TROL i Tic62, pri različitim vrijednostima pH i pri različito uvedenim točkastim mutacijama *in silico*. Rezultati rada doprinijeli su detaljnijem opisu nekovalentnih interakcija navedenih proteina, posebice u vidu dinamične interakcije homodimera FNR s domenom ITEP proteina TROL. Ispostavilo se da sama stabilnost homodimera ovisi o kvaliteti interakcije FNR s konzerviranim prolinima i serinima u domeni ITEP proteina TROL (slika 1.3).



Slika 1.3. Prikaz interakcije FNR homodimera (crveni i plavi vrpčasti prikaz aminokiselinske okosnice, uz prozirno sivi prikaz trodimenzionalne strukture) s ITEP domenom TROL proteina (ispunjena, zelena trodimenzionalna struktura). Detaljni prikaz ITEP domene (desno), uz označene konzervirane proline i serine ključne u interakciji. Slika preuzeta iz Kekić i sur., 2020.

1.6. Modelni organizam *Arabidopsis thaliana*

Svi eksperimenti opisani u ovom radu provođeni su na široko rabljenom biljnom modelnom organizmu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., hrvatskog naziva „uročnjak“ (slika 1.4). Rasprostranjena je diljem Euroazije i Afrike te je zbog svog relativno kratkog životnog ciklusa popularno korišten modelni organizam od strane znanstvenika i laboratorija koji provode istraživačke projekte u području biljne molekularne biologije i biotehnologije. Riječ je o korovnoj biljci, koju je prvi puta taksonomski opisao Johannes Thal 1557. godine (Thal, 1557). Jednostavnog je uzgoja i relativno malog genoma (135 Mb) koji je potpuno sekvenciran 2000. godine (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).



Slika 1.4. Modelni organizam uročnjak, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., u procesu cvatnje (preuzeto s www.eurekaalert.org)

U prirodi raste kao jednogodišnja biljka, čiji listovi ostaju na razini tla, rastući se granaju u oblik rozete te su nerijetko prekriveni brojnim jednostaničnim dlakama, tzv. trihomima. Cvjetna stapka, koja može narasti i do 25 cm, na sebi obično nosi velik broj sitnih, bijelih cvjetića promjera oko 3 mm, tipične morfologije biljaka iz porodice krstašica (Brassicaceae). Samooprašivanje je uobičajen način na koji cvjetići uročnjaka dozrijevaju u komuške koje potom u sebi nose 20 do 30 sjemenki. Pojedinačna generacija uročnjaka od sjemenke do cvjeta u laboratorijskim uvjetima traje cca. 40 dana. Upravo zbog svega navedenog, *Arabidopsis thaliana* se kao modelni organizam počinje koristiti već na koncu 19. stoljeća.

Postoji podatak da je prvi mutant opisao Alexander Braun, 1873., čiji su fenotip okarakterizirali podvostručeni cvjetovi (Meinke, 1998; Mitchell-Olds, 2001; TAIR - About Arabidopsis, 2020). U ovom je radu poseban naglasak stavljen na proučavanje funkcije proteina TROL iz perspektive njegove *knock-out* mutacije u modelnoj biljci uročnjaka. Fenotipska svojstva mutanta uročnjaka TROL KO detaljnije se opisana u radu Jurić i sur. (2009). Mutirani fenotip iskazuje nekoliko mikro- i makroskopskih značajki vrijednih spominjanja - mutanti se općenito sporije razvijaju, stvaraju manje rozete čije listove karakterizira promjena zelene u žućkasto-zelenu pigmentaciju, uz što dolazi i do promjene same površinske teksture lista. U vidu fotosintetskih pigmenata ne dolazi do značajnih povećanja, iako je bilo manjih odstupanja u količini karotenoida. Povećana količina karotenoida u mutantima TROL KO često je povezana s odgovorom na fiziološki stres. Među ostalim promjenama, ističu se one vezane uz povećanje debljine lista kod mutiranih biljaka, unatoč tome što ne dolazi do vidljive morfološke promjene palisadnog i spužvastog parenhima (Jurić i sur., 2009).

1.7. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je kvantitativno opisati učinak odsustva proteina TROL u kloroplastima modelnih organizama *Arabidopsis thaliana* na ukupnu proizvedenu biomasu („*carbon capture*“) i fenotipski izgled biljaka uzgojenih u zemlji normalnog sadržaja vlage te u uvjetima manjka vode u zemlji. U tu svrhu, proveo sam niz eksperimenata s biljkama uročnjaka divljeg tipa i s mutantima TROL KO koji su uzgajani pod programibilnim LED osvjetljenjem, na dvama tlima različitog sadržaja vlage, u trajanju od mjesec dana. Bitan početni korak uključivao je westernsku analizu otiska radi potvrde odsustva proteina TROL u mutantima *A. thaliana*. Kao izabrane fenotipske pokazatelje mutacije TROL KO i otpornosti biljaka na sušni stres mjerio sam svježiu i suhu masu čitavih biljaka; prosječnu površinu listova rozeta i koncentraciju fotosintetskih pigmenata. Međusobno sam uspoređivao četiri različite eksperimentalne skupine: biljke divljeg tipa i mutanti TROL KO na zemlji normalnog sadržaja vlage; biljke divljeg tipa i mutanti TROL KO zemlji u uvjetima manjka vode.

2. Materijali i metode

2.1. Porijeklo korištenog sjemenja

Sjemenke divljeg tipa uročnjaka odabrao sam iz linije *Arabidopsis thaliana* ekotipa Columbia 0, dok su sjemenke mutanata TROL KO poticale iz linije *Arabidopsis thaliana* SAIL_27_B04 koja sadrži jedan element T-DNA umetnut u zadnji intron gena At4g01050 na poziciji 2278.

2.2. Uvjeti uzgoja s naglaskom na suvremeno LED osvjetljenje

Biljke sam uzgajao na dva različita tipa supstrata, navlaženom i prethodno osušenom, u odvojenim pladnjevima za uzgoj (*plant tray*). Svaki sam pladanj nadalje podijelio na dvije polovice kako bih polovičnom raspodjelom posijao sjemenke biljaka divljeg tipa i mutanata TROL KO. Zemlju komercijalnog naziva A400, tvrtke Stender, osušio sam u sušioniku na 55 °C preko noći, u ukupnom trajanju od 12 sati. Vaganjem zemlje prije i nakon sušenja izračunao sam gubitak vlage u osušenoj zemlji koji je iznosio 25%. Sjemenke uročnjaka sam istovremeno sijao na oba tipa zemlje bez prethodne stratifikacije.

Uzgoj biljaka posijanih u dva opisana pladnja odvijao se pod sustavom osvjetljenja *CI-800 Programmable LED Experimentation System* američke tvrtke CID (slika 2.1). Lampe sam povezo s računalom preko bežične *wi-fi* mreže i namjestio njihovu periodu na ravnodnevicu (21. ožujka) u softverskom programu *Light snap!*, čime je u konačnici postavljena na 12 sati dana/12 sati tame. Sam program omogućuje odabir tzv. „svjetlosnih recepata“ – različitih skupova vrijednosti kvaliteta i kvantiteta svjetlosti ovisnih o odabranoj geografskoj širini. Odabrao sam geografsku širinu koja je odgovarala poziciji grada Zagreba, čime je tip svjetlosnog recepta odgovarao onom satelitski izračunatom za kontinentalni i umjereni klimatski pojas. Točno određeni postoci crvene, plave i bijele LED svjetlosti za svaku minutu u danu doprinijele su uzgoju uročnjaka u svojevrsnoj simulaciji prirodnog osvjetljenja, uz izlaske i zalaske sunca.



Slika 2.1. Uzgoj biljaka *Arabidopsis thaliana* pod programibilnim sustavom LED osvjetljenja CI-800, 4. studeni 2019. (mjesec dana nakon sadnje). Prikazan je pladanj sa zemljom normalnog sadržaja vlage (N), podijeljen na dvije domene – TROL *knock-out* mutanti lijevo (KO) i biljke divljeg tipa desno (WT)

Izuzev naprednog sustava osvjetljenja, vlaga je bila konstantna na 55%, jednako tako i temperatura same klima komore na 21°C. Vremensko trajanje uzgoja ograničio sam na mjesec dana. Biljke sam na prethodno osušenoj zemlji zalijevao jednakom mjerom kao biljke neosušene zemlje, budući da je samo sušenje gotovo onemogućilo takvom tipu supstrata učinkovito upijanje vode iz plitice. Replike biljaka korištene u eksperimentalnom dijelu rada odabirao sam nasumice. Četiri eksperimentalne skupine uzgojenih biljaka uročnjaka označio sam na sljedeći način: *KONZ* – TROL KO mutanti na zemlji normalnog sadržaja vlage; *KOSZ* – mutanti na zemlji u uvjetima manjka vode; *WTNZ* – divlji tip biljaka na zemlji normalnog sadržaja vlage; *WTSZ* – divlji tip zemlji u uvjetima manjka vode.

2.3. Westernska metoda otiska

Na samom početku westernske metode otiska, pripremio sam mali, 12%-tni poliakrilamidni gel za razdvajanje sastava 1,98 mL H₂O; 2,4 mL 30%-tnog akrilamida; 1,5 mL 1,5 M Tris-HCl pufera pH vrijednosti 8,8; 0,1 mL 10%-tnog natrijeva dodecil sulfata (SDS) te 15 µL TEMED i 0,1 mL APS, katalizatora polimerizacije akrilamida. Sve sam gore navedene kemikalije pripremao u zasebnoj čaši te sam, dodavši krajnji APS, izlio smjesu u prostor između staklenih ploča odijeljenih teflonskim razmaknicama (engl. spacerima) debljine 0,7 mm i prethodno prebrisanih acetonom. Taj sam postupak proveo radi uklanjanja neželjenog keratina porijeklom iz kose ili kože, koji nerijetko daje lažne pozitivne rezultate na gelu (Westermeier i sur., 2008). Nakon 20-minutne polimerizacije, dodao sam novi sloj gela za sabijanje (engl. *stacking gel*) koji se sastojao od 1,68 mL H₂O; 0,5 mL 30%-tnog akrilamida; 0,75 mL prethodno pripravljenog Tris-HCl pufera; 30 µL 10%-tnog SDS-a; 30 µL APS-a i 20 µL TEMED-a. Nakon izlijevanja gela za sabijanje u istu konstrukciju u kojoj se nalazio već polimerizirani gel za razdvajanje, postavio sam plastični češalj kako bi nastao poliakrilamidni gel s udubljenim jažicama za kasnije nanošenje proteinskih uzoraka.

Zatim sam pripremio proteinske ekstrakte uzoraka biljaka u Laemmli bezbojnom puferu, čiji je sastav uključivao 4% SDS-a, 20% glicerola, 10% 2-merkaptoetanolu, 0.004% bromfenol plavog i 0.125 M Tris HCl, pH 6,8. Iz svake sam eksperimentalne skupine biljaka uzeo po jedan listić i stavio ga u zasebnu eppendorf-epruvetu od 1,5 mL kako bih mu dodao 200 µL Laemmli pufera. Nakon toga sam ih ručno homogenizirao plastičnim mini-tučkom te ih na kraju inkubirao 5 min na 85 °C. Količinu proteina odredio sam fluorimetrijskim uređajem Qubit 3.0 tvrtke Thermo Fisher Scientific uz odgovarajući reagens za kvantifikaciju proteina iz opreme Qubit Protein Assay. Konačna masa proteina koju sam nanosio na svaku jažicu iznosila je 5 µg.

Pripremio sam postolje u kojem se odvijala elektroforeza namjestivši dvije pleksiglas ploče uz rub postolja. Time sam onemogućio struji da za vrijeme elektroforeze teče kroz pufer. Ulio sam 0,5 L 1x SDS elektrodnog pufera (2,4 g Tris, 11,4 g glicin, 1 g SDS, 6.0 M HCl do pH 8,3, deH₂O do 1 L) u količini dovoljnoj za mali gel. Uzorke ekstrahiranih proteina sam prije nanošenja na gel denaturirao inkubacijom na tresilici pri 85 °C, 1-2 minute, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje u trajanju od 5 min na maksimalnoj brzini. Na taj sam način eliminirao suvišne stanične ostatke. Pripremljene proteinske uzorke pažljivo sam nanio Hamiltonkom u označene jažice gela. U krajnju lijevu jažicu dodao sam marker molekulskih masa tvrtke BioRad (punog naziva *Precision plus protein dual colour prestained standard*).

Gel s nanesenim markerom i uzorcima izložio sam električnom polju u rasponu napona od početnih 85 V 1 h te 120 V do završetka elektroforeze, tj. dok obojena fronta uzoraka nije dospjela do dna gela. U međuvremenu sam pripremio otopinu 1x pufera za prijenos (0,15 M glicin, 0,02 M Tris) s 10% MetOH koja je služila u prijenosu elektroforetski razlučenih proteina na nitroceluloznu membranu.

U kadici za transfer pripremio sam „sendvič“ sastavljen od spužvica, Whatmann papira, gela i membrane, uz što sam posebno pazio na orijentaciju gela. Proteini uslijed interakcije s detergentom SDS postaju negativno nabijeni te putuju prema pozitivnoj katodi. U skladu s time sama membrana treba biti postavljena između gela i katode. Uslijedio je postupak prijenosa proteina na membranu u električnoj struji jakosti 300 mA u trajanju od 1,5 h. Po završetku prijenosa, nastavio sam s postupkom westernske metode otiska. Za početak je bilo potrebno blokirati samu membranu u svrhu sprječavanja nespecifičnog vezanja antitijela na nju. Dalje sam je podvrgnuo inkubaciji primarnim i sekundarnim antitijelima s konačnim ciljem detekcije proteina TROL na filmu.

Za navedene postupke blokiranja membrane i njezine inkubacije antitijelima, rabio sam zalihe sljedećih otopina (engl. *stock solutions*): 10x pufer za prijenos (1,5 M glicin, 0,2 M Tris), 10x fosfatnog pufera (PBS, engl. *phosphate buffered saline*, pH 7.2, sastav: 40,00 g NaCl; 1,00 g KCl; 5,75 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O; deH₂O do 500 mL) te dietanolamin (pH 9,6). Koristeći te otopine, zasebno sam pripremio razrijeđene, radne otopine: otopinu A (1x PBS, 1% Tween, 5% otopina mlijeka u prahu), otopinu B (1x PBS, 1% Tween) i otopinu C (0,1 M dietanolamin pH 9,6, 1 mM MgCl₂).

Membranu sam blokirao u otopini A 30 minuta na tresilici s umjerenim njihanjem nakon čega je uslijedila prekonoćna inkubacija membrane s primarnim antitijelom TROL AS194257 (Agrisera, Vännäs, Švedska) dodanim u otopinu A pri razrjeđenju 1:4000. Membranu sam sljedećeg dana ispirao četiri puta otopinom A, svaki put po 10 minuta na tresilici. Zatim sam je 1 h inkubirao sekundarnim antitijelom Goat Anti-Rabbit IgG, konjugiranim s peroksidazom iz hrena (HRP) tvrtke Sigma Aldrich te razrijeđenim u otopini A u omjeru 1:50000. U sljedećem sam koraku uzastopno ispirao membranu po 10 min svakom od otopina B i C. Na samom posljatku metode otiska, proveo sam postupak detekcije prenesenih proteina uz protokol unaprijeđene kemiluminiscencije, tzv. ECL (engl. *enhanced chemiluminescent detection*).

Protokol ECL proveo sam na sljedeći način: izabrao sam komad prozirne plastične folije na koju sam zatim dodao 1 mL otopine luminola, 100 μ l p-kumarinske kiseline i 0,01 (v/v) 35% vodikovog peroksida, H₂O₂. Membranu sam, zatim, njenom proteinskom stranom pažljivo polegnuo u kapljice pripravljene otopine. Potom sam u cijelosti omotao membranu ostatkom folije i položio je u kazetu za razvijanje filma.

Preostale korake protokola ECL provodio sam u potpunom mraku. Membranu sam izložio na X-ray film tvrtke Agfa-Gavaert te sam zaključio postupak razvijanjem i fiksiranjem filma röntgenskim (RTG) razvijanjem i Kodak otopinom za fiksaciju. Vremensko trajanje razvijanja filma nije precizno određeno samim protokolom budući da se u razvijaju reakcija odvija velikom i nepredviđenom brzinom. Potrebno je, dakle, u ovisnosti o situaciji što prije premjestiti film u otopinu za fiksaciju. U suprotnom dolazi do nastajanja prekomjerno izraženog signala što predstavlja problem u jednoznačnoj interpretaciji rezultata westernske metode otiska. Razvijeni film sam na kraju fotografirao i opisao u rezultatima ovog rada (slika 3.1).

2.4. Morfometrijska analiza površine listova

Morfometrijsku analizu površine listova provodio sam u računalnom programu *Fiji* (Image J) kako bih potvrdio rezultate utjecaja odsustva proteina TROL na proizvodnju biljne biomase. Nakon mjesec dana uzgoja, biljke sam fotografirao odvojeno po svakoj skupini. Na svakoj sam fotografiji trebao odabrati fiksnu duljinu nekog predmeta poznate duljine kako bih u samoj morfometrijskoj analizi i mjerenju površine listova mogao preračunati dobivene piksele u cm². Spomenuta fiksna duljina korištena u kalibraciji odgovarala je ili promjeru petrijevke (24 cm, slika 2.2), ili posudice za uzgoj biljke (5 cm, slika 2.3), ovisno o fotografiji, budući da sam jedan dio biljaka već izvadio iz zemlje prije fotografiranja (skupina *KOSZ*, slika 2.2). Za svaku sam biljku nasumično odabrao po četiri lista, što je po skupini iznosilo ukupno 40 listova, te od svih sakupljenih vrijednosti izračunao prosječnu vrijednost površine listova skupine u cm².



Slika 2.2. Promjer petrijevke (24 cm) uzet kao standardna duljina pri kalibraciji *Fiji* sustava i pretvorbe izračunatih površina listova iz piksela u cm^2



Slika 2.3. Promjer posudice za uzgoj (5 cm) uzet kao standardna duljina pri kalibraciji *Fiji* sustava i pretvorbe izračunatih površina listova iz piksela u cm^2

2.5. Određivanje suhe mase

Iz svih biljaka koje sam uzgajao bilo je potrebno prethodno ukloniti svu vodu budući da ona većinski pridonosi biomasi. Na taj je način bilo moguće eksperimentalno usporediti prosječne suhe mase (engl. *carbon capture*) po četirima navedenim skupinama. Stoga sam iz svake skupine odabrao po 10 replika biljaka, izvagao ih i stavio na sušenje u sušioniku pri 105°C preko noći. Nakon sušenja biljke sam ponovno izvagao pritom određivši njihovu prosječnu svježiu i suhu masu, a prosjek masa izračunao sam zasebno za svaku eksperimentalnu skupinu.

2.6. Metoda ekstrakcije i spektrofotometrijskog mjerenja koncentracije fotosintetskih pigmenta

U nastavku slijedi opis protokola za ekstrakciju i određivanje koncentracija fotosintetskih pigmenta po Wellburnu (1994). Iz svake sam skupine uzeo po pet replika biljaka te sam vagnuo 30 mg svježeg tkiva lista. U hladni tarionik dodao sam 1 mL 80% hladnog acetona i vrhom špatule malu količinu CaCO₃ u prahu. Nakon ručne homogenizacije tkiva, ekstrakt sam prelio u eppendorf-tubicu te sam dodao 0,5 mL acetona u tarionik kako bih ga isprao i skupio preostali ekstrakt tkiva. Uzorke ukupnog volumena 1,5 mL centrifugirao sam 10 minuta na 5000 g pri temperaturi od +4 °C. Supernatant sam zatim prebacio u eppendorf-epruvete od 2 ml, dok sam nad preostali talog nanovo dodao 1 mL acetona. Epruvete sam protresao na tresilici imajući na umu ekstrakciju posljednjih ostataka pigmenta u talogu. Uslijedilo je drugo centrifugiranje pri istim uvjetima nakon čega sam supernatant odlio u one iste epruvete od 2 mL u koje sam skupljao supernatant prvotnog ciklusa centrifugiranja.

Apsorbanciju dobivenih ekstrakata mjerio sam pri tri valne duljine vidljive svjetlosti (470 nm, 646 nm i 663 nm) kako bih uz korištenje određenih empirijskih jednadžbi (Wellburn, 1994) i formula odredio koncentracije triju vrsta ključnih fotosintetskih pigmenta – klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida (jednadžbe 2.1. - 2.3., c_a – koncentracija klorofila *a*; c_b – koncentracija klorofila *b*; c_c – koncentracija karotenoida).

$$c_a = 12,21 A_{663} - 2,81 A_{646} [\mu g mL^{-1}] \quad (2.1.)$$

$$c_b = 20,13 A_{646} - 5,03 A_{663} [\mu g mL^{-1}] \quad (2.2.)$$

$$c_c = \frac{1000 A_{470} - 3,27 c_a - 104 c_b}{198} [\mu g mL^{-1}] \quad (2.3.)$$

Masene koncentracije pigmenata u ekstraktima uvrstio sam u sljedeću formulu radi izražavanja konačnih rezultata u μg po mg svježe tvari (jednadžba 2.4., w – maseni udio pigmenta; c_{pigm} – masena koncentracija pigmenta; $V_{e.p.}$ – volumen ekstrakcijskog pufera; m – masa svježeg tkiva uzorka).

$$w = \frac{c_{pigm} V_{e.p.}}{m} [\mu g mg^{-1}] \quad (2.4.)$$

2.7. Statistička obrada podataka

Rezultate sam prikazao kao prosječne vrijednosti masa, površina i masenih koncentracija fotosintetskih pigmenata uz naznačene standardne pogreške (omjere standardnih devijacija i drugog korijena broja uzoraka). Analizu varijance ANOVA proveo sam u programu Statistica 12 uz *post-hoc* Tukeyjev HSD test (engl. *honest significant difference*), uz p-vrijednost od 5% za odredbu statističke značajnosti među različitim kombinacijama eksperimentalnih skupina. Nakon statistike, označio sam stupce različitim slovima (*a*, *ab* ili *b*) radi jasnije predodžbe određenih statistički značajnih razlika.

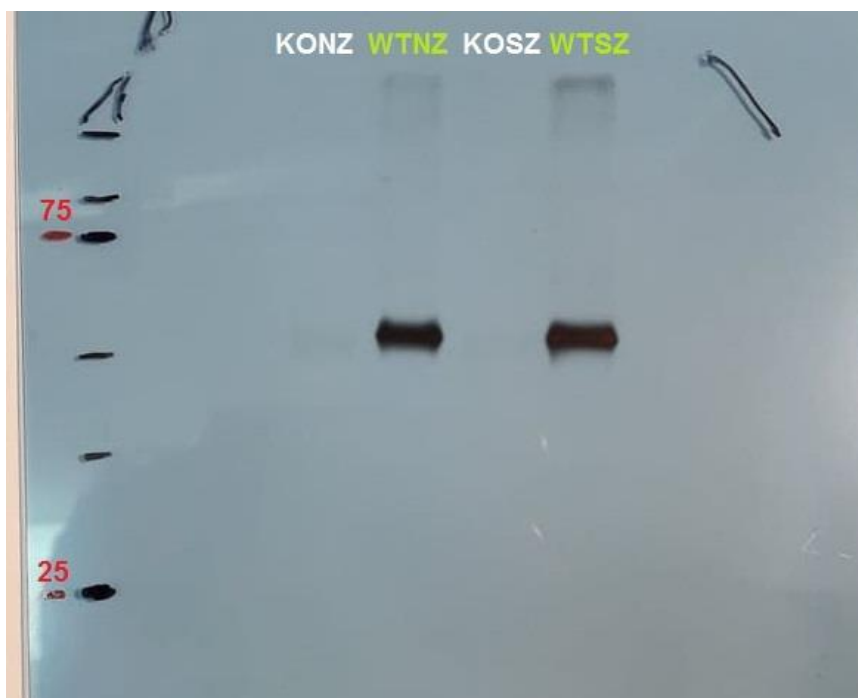
Uloga slova bila je od velikog značenja u razvrstavanju pojedinih eksperimentalnih skupina u statističke grupe. Ako bi analizom varijance dvaju različitih eksperimentalnih skupina bila određena p-vrijednost manja od 5%, tada bi ih bilo potrebno svrstati u dvije različite statističke grupe, uz dodjelu odgovarajućih slova, *a* i *b*.

Ukoliko, u suprotnom, analizom varijance p-vrijednost ne bi bila manja od 5%, te skupine bi trebale biti svrstane u istu statističku grupu, uz dodjelu istog slova. Štoviše, postoji i miješana oznaka, *ab*, koja se dodjeljuje onim eksperimentalnim skupinama koje se nalaze na mjestu preklapanja statističkih grupa. Točnije rečeno, eksperimentalna skupina oznake *ab* ne razlikuje se značajno od onih skupine označenih slovom *a* i *b*.

3. Rezultati

3.1. Westernska metoda otiska (*western blot*): potvrda odsustva proteina TROL u mutantima TROL KO

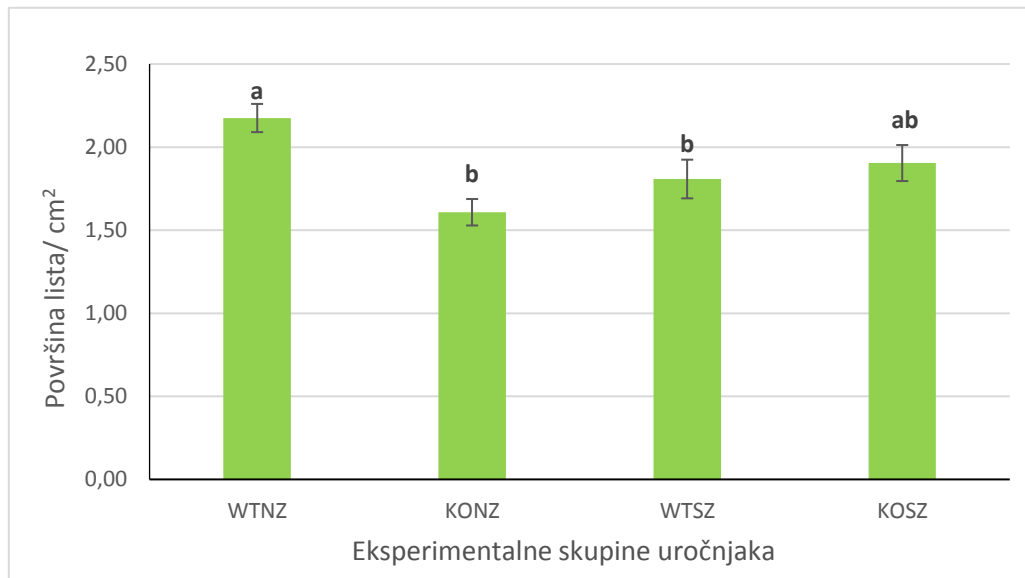
Cilj westernske metode otiska provedene s uzorcima uzgojenih biljaka *Arabidopsis thaliana* bio je dokazati uspješnost *knock-out* mutacije proteina TROL. Eksperimentalne skupine odlučio sam označiti na sljedeći način: *KONZ* – mutanti TROL KO uzgajani na zemlji normalnog sadržaja vlage te *WTNZ* – biljke divljeg tipa uzgajane na zemlji normalnog sadržaja vlage; *KOSZ* – mutanti TROL KO uzgajani na zemlji u uvjetima manjka vode s gubitkom vlage od 25%; *WTSZ* – biljke divljeg tipa uzgajane na zemlji u uvjetima manjka vode. Uz to, trebalo je jasno pokazati kako su svi statistički značajni rezultati opisani u ovom radu prvenstveno uzrokovani mutacijom TROL KO, a tek potom uvjetima manjka vlage u zemlji. Na razvijenom filmu (slika 3.1.), vidljive su dvije pruge podno jažica označenih *WTNZ* i *WTSZ*, koje predstavljaju protein TROL molekulske masa 60 kDa. Uzorci biljaka iz skupina *KOSZ* i *KONZ* ne pokazuju prugu čime je dokazano odsustvo proteina TROL u njima.



Slika 3.1. Razvijeni film nakon provedene metode westernskog otiska na uzorcima biljaka uročnjaka, *Arabidopsis thaliana*. S lijeve strane je prikazan marker molekulskih masa BioRad, a jažice označuju eksperimentalne skupine: *KONZ* – mutanti TROL KO uzgajani na zemlji normalnog sadržaja vlage te *WTNZ* – biljke divljeg tipa uzgajane na zemlji normalnog sadržaja vlage; *KOSZ* – mutanti TROL KO uzgajani na zemlji u uvjetima manjka vode s gubitkom vlage od 25%; *WTSZ* – biljke divljeg tipa uzgajane na zemlji u uvjetima manjka vode. Vidljive su dvije pruge podno jažica označenih *WTNZ* i *WTSZ*, koje predstavljaju protein TROL molekulske masa 60 kDa. Uzorci biljaka iz skupina *KOSZ* i *KONZ* ne pokazuju prugu čime je dokazano odsustvo proteina TROL u njima

3.2. Morfometrijska analiza površine listova rozeta

Prosječnu površinu listova rozeta mjerio sam u programu za obradu digitalnih fotografija *Fiji* na pojedinačno odabranim listovima različitih eksperimentalnih skupina uzgojenih biljaka uročnjaka kao što je opisano u prethodnom poglavlju.



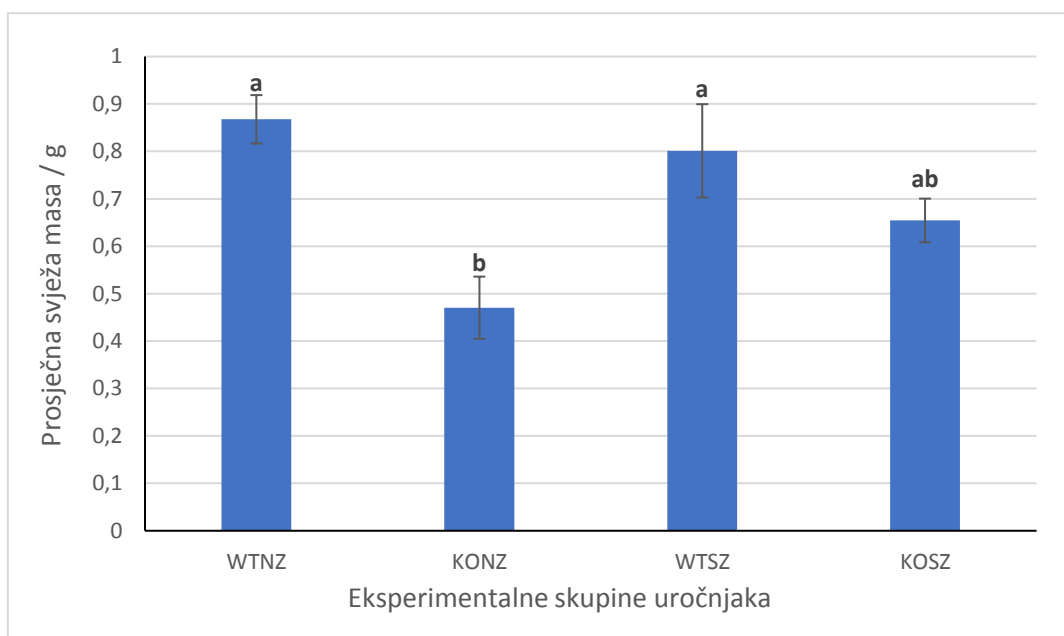
Slika 3.2. Površina listova rozeta biljaka (cm²) prikazuje prosječne vrijednosti sa standardnim pogreškama i statističkim nazivima skupina (*a*, *ab*, *b*). Skupine označene različitim slovima se međusobno razlikuju na razini značajnosti $p < 5\%$. *WTNZ* – divlji tip uročnjaka uzgajan na zemlji normalnog sadržaja vlage; *KONZ* – mutant TROL KO uzgajan na zemlji normalnog sadržaja vlage; *WTSZ* – divlji tip uročnjaka uzgajan na zemlji u uvjetima manjka vode; *KOSZ* – mutant TROL KO uzgajan na zemlji u uvjetima manjka vode

Rezultati morfometrijske analize površine listova pokazali su niz zanimljivih činjenica (slika 3.2). Prosječna površina lista rozete mutanta TROL KO uzgojenog na zemlji u normalnim uvjetima vlage (*WTNZ*) značajno je pala u odnosu na divlji tip uzgajan na istoj zemlji (*KONZ*). Jednako značajan pad prosječne površine za ~20% vidi se u usporedbi skupina *WTNZ* i *WTSZ*. Suprotno tim opažanjima, usporedbom grupe *WTNZ* i *KOSZ* (mutanata TROL KO uzgajanih na zemlji u uvjetima manjka vlage), ne dolazi do statistički značajnog pada u prosječnoj površini lista rozete.

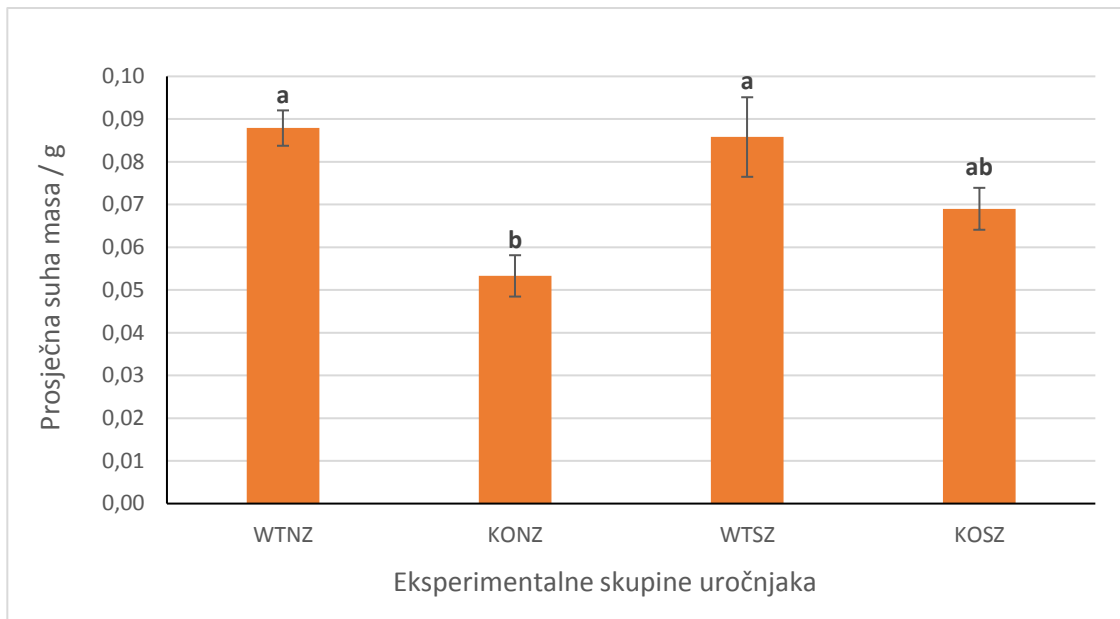
3.3. Određivanje suhe mase biljaka („carbon capture“)

Grafički prikazi prosječne svježe i suhe mase (slika 3.3. i slika 3.4.) za četiri ispitivane eksperimentalne skupine uročnjaka prikazuju slične rezultate kao u slučaju morfometrijske analize listova rozeta. Među skupinama WTNZ i KONZ (divljeg tipa uročnjaka i mutanta TROL KO, uzgajanih na istom tipu zemlje u uvjetima normalne vlage) postoji statistički značajan pad u proizvodnji svježe odnosno suhe mase. Suprotno tome, i divlji tip i mutanti uročnjaka uzgajani na zemlji u uvjetima manjka vlage (WTSZ i KOSZ) ne pokazuju značajni pad u svježoj odnosno suhoj masi ako se usporede sa skupinom WTNZ.

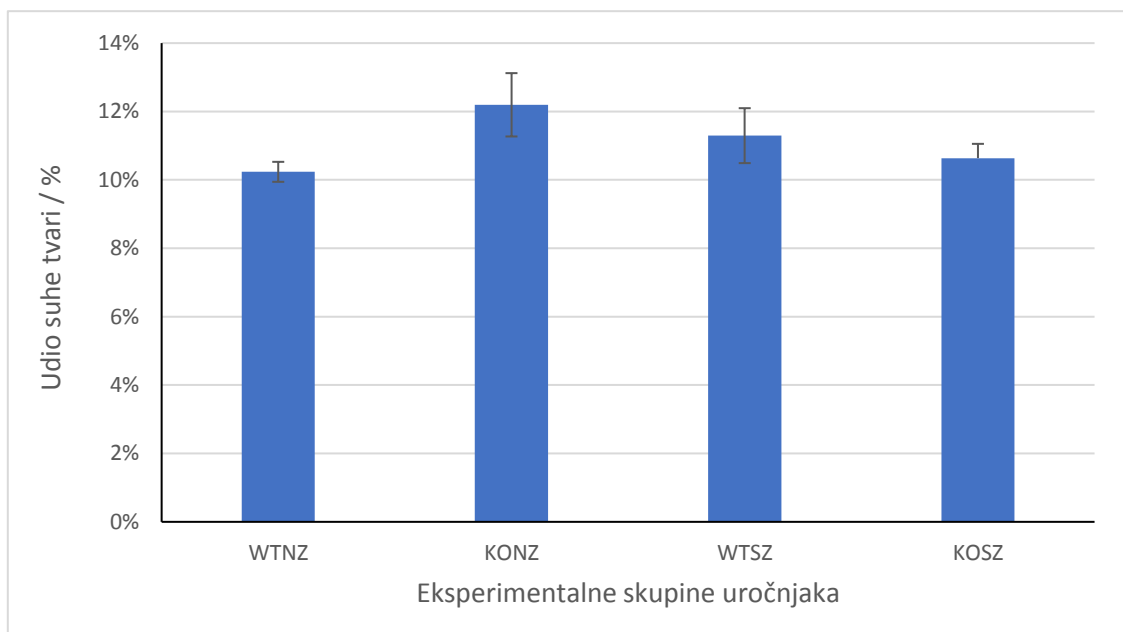
Slika 3.5. prikazuje postotni udio suhe tvari za svaku eksperimentalnu skupinu. Moguće je primijetiti da se udjeli suhe tvari u eksperimentalnim skupinama nakon sušenja nisu statistički značajno razlikovali, budući da analizom varijance nije pronađena razlika koja bi odgovarala p vrijednosti manjoj od 5%.



Slika 3.3. Svježa masa biljaka po skupinama (WTNZ – divlji tip uročnjaka uzgajan na zemlji normalnog sadržaja vlage; KONZ – mutant TROL KO uzgajan na zemlji normalnog sadržaja vlage; WTSZ – divlji tip uročnjaka uzgajan na zemlji u uvjetima manjka vode; KOSZ – mutant TROL KO uzgajan na zemlji u uvjetima manjka vode), s označenim standardnim pogreškama i statistički određenim nazivima skupina (a, ab, b). Skupine označene različitim slovima se međusobno razlikuju na razini značajnosti $p < 5\%$. Statistika provedena u programu Statistica 12, metodom ANOVA i *post-hoc* Tukey HSD testom.



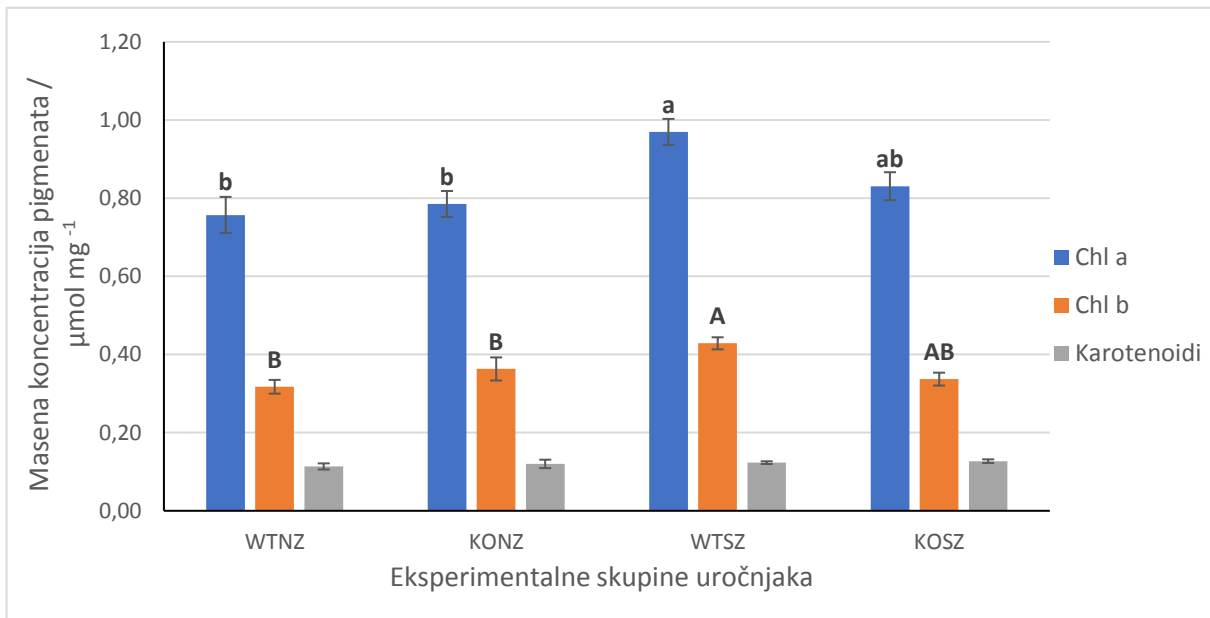
Slika 3.4. Suha prosječna masa biljaka po skupinama (WTNZ – divlji tip uročnjaka uzgajan na zemlji normalnog sadržaja vlage; KONZ – mutant TROL KO uzgajan na zemlji normalnog sadržaja vlage; WTSZ – divlji tip uročnjaka uzgajan na zemlji u uvjetima manjka vode; KOSZ – mutant TROL KO uzgajan na zemlji u uvjetima manjka vode), s označenim standardnim pogreškama i statistički određenim nazivima skupina (*a*, *ab*, *b*). Skupine označene različitim slovima se međusobno razlikuju na razini značajnosti $p < 5\%$. Statistika provedena u programu Statistica 12, metodom ANOVA i *post-hoc* Tukey HSD testom.



Slika 3.5. Udio suhe tvari u tkivu dobiven omjerom *suha/svježa masa* za svaku eksperimentalnu skupinu (WTNZ – divlji tip uročnjaka uzgajan na zemlji normalnog sadržaja vlage; KONZ – mutant TROL KO uzgajan na zemlji normalnog sadržaja vlage; WTSZ – divlji tip uročnjaka uzgajan na zemlji u uvjetima manjka vode; KOSZ – mutant TROL KO uzgajan na zemlji u uvjetima manjka vode). Prikazane standardne pogreške, statistička značajnost nije pronađena analizom varijance ANOVA za p vrijednosti $< 5\%$

3.4. Spektrofotometrijsko mjerenje fotosintetskih pigmenata

Metodom po Wellburnu (1994) odredio sam koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida za svaku pojedinu skupinu biljaka. Rezultati su pokazali statistički značajni porast masenih koncentracija klorofila *a* i *b* u slučaju divljeg tipa. Biljke divljeg tipa uročnjaka zasade na zemlji u uvjetima manjka vlage (WTSZ), u odnosu na uročnjake uzgajane na zemlji u normalnim uvjetima vlage (WTNZ) posjeduju 21,9 % više klorofila *a* i 26,0 % više klorofila *b* (slika 3.6). Usporedbom skupina WTNZ i KONZ nije moguće uočiti statistički značajne promjene u koncentraciji pigmenata potencijalno uzrokovane TROL KO mutacijom. Masena koncentracija karotenoida također se nije značajno promijenila niti u jednoj od proučavanih eksperimentalnih skupina uročnjaka.



Slika 3.6. Masene koncentracije fotosintetskih pigmenata ($\mu\text{g mg}^{-1}$): klorofila *a* („Chl a“), klorofila *b* („Chl b“) i karotenoida u listovima uročnjaka, *A. thaliana*, za svaku od četiri eksperimentalne skupine (WTNZ – divlji tip uročnjaka uzgajan na zemlji normalnog sadržaja vlage; KONZ – mutant TROL KO uzgajan na zemlji normalnog sadržaja vlage; WTSZ – divlji tip uročnjaka uzgajan na zemlji u uvjetima manjka vode; KOSZ – mutant TROL KO uzgajan na zemlji u uvjetima manjka vode). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz naznačene standardne pogreške i statistički određene nazive skupina (*a*, *ab*, *b*). Skupine označene različitim slovima se međusobno razlikuju na razini značajnosti $p < 5\%$. Statistika provedena u programu Statistica 12, metodom ANOVA uz *post-hoc* Tukey HSD test

4. Rasprava

Rezultati mjerenja dobiveni u ovom radu potvrdili su molekularni model funkcije proteina TROL u fotosintetskim reakcijama (Vojta i Fulgosi, 2012). Feredoksin:NADP⁺ reduktaza (FNR) ključni je protein u završnim fazama linearnog transporta elektrona prethodno pobuđenih fotonima vidljive svjetlosti i prenesenih putem visoko organiziranih supermolekulskih kompleksa do konačnog cilja – redukcije NADP⁺. Od velike je važnosti u istraživanju fundamentalnih mehanizama fotosinteze pobliže opisati interakcijske partnere FNR i kako oni potpomažu njegovoj funkciji. U već spomenutim radovima koji se bave problematikom proteina TROL stavljen je veliki naglasak na njegovu molekularnu i biokemijsku ulogu kao transmembranskog proteina koji se nalazi u stroma tilakoidnom sustavu kloroplasta i služi u usidravanju FNR (Jurić i sur., 2009; Vojta i Fulgosi, 2016; Vojta i sur., 2019). Statistički gledano, reakcija koju katalizira FNR zahtijeva podudarnost i uspješnost nekoliko događaja niske vjerojatnosti: potrebno je dovesti dva visoko energizirana elektrona do jedne oksidirane molekule NADP⁺, pritom imajući na umu da elektroni pristižu iz fotosustava I (PSI) posredstvom feredoksina (Fd), topivog stromalnog proteina te da uz sve to postoje i alternativni putevi disipacije njihove energije izuzev one primarne u produktivnoj fotosintezi (npr. *water-water cycle*) (Vojta i sur., 2015). Imajući sve navedeno na umu, očekuje se veoma niska vjerojatnost susreta svih potrebnih sastavnica za uspješnu reakciju završne redukcije NADP⁺ u NADPH. Tome u prilog također govori i fenomen molekularne natrpanosti (engl. *molecular crowdedness*) te je sustavnim istraživanjem proteina TROL dokazano veliko značenje usidravanja FNR kao važnog čimbenika pretvorbe svjetlosne energije fotona u kemijsku energiju veza (Jurić i sur., 2009).

Za razliku od dosadašnjih istraživanja, u ovom je istraživanju jednostavnim pokusima mjerenja suhe mase, površine listova rozeta i koncentracije fotosintetskih pigmenata jasno predočena i dokazana velika važnost međumolekularne interakcije enzima FNR i proteina TROL. Također je postavljen novi niz pitanja za daljnja istraživanja i moguću primjenu saznanja u biotehnologiji genetički modificiranih (GM) biljaka. Zanimalo nas je koliki učinak ima odsustvo proteina TROL na najvidljivije fenotipske značajke biljnih organizama – njihovu suhu biomasu (slika 3.4.) koja je u izravnoj korelaciji s količinom proizvedenih ugljikohidrata u Calvinovim ciklusu. Jednako tako, istraživao se utjecaj mutacije TROL KO na površinu listova uročnjaka (slika 3.6.) koja je također povezana s ukupnom biosintezom šećera tj. celuloze i ostalih polimera ugljikohidrata ključnih u sastavu staničnih stijenki.

Za stresni faktor odabrao sam sušni stres korištenjem osušene zemlje s točno određenim manjkom vlage od 25% kako bih proučio mijenja li se otpornost mutanata uročnjaka TROL KO na taj učestali i kompleksni stresni uvjet. FNR je uključen u posredništvo mnogih enzimatskih ciklusa, bilo onih koji služe antioksidacijskoj detoksifikaciji štetnih ROS, bilo onih koji služe u biosintezi ugljikohidrata (Calvinov ciklus). Upravo stoga sam mogao očekivati izravni učinak odsustva proteina TROL u cjelokupnoj ekonomiji preusmjerenja elektrona prilikom stresnih uvjeta.

Funkcija proteina TROL potvrđena je, za početak, mjerenjem prosječne površine listova uročnjaka koristeći digitalnu analizu fotografija (slika 3.6). Mutanti TROL KO zasađeni na zemlju s normalnom količinom vlage (KONZ) pokazali su predviđeni i statistički značajan pad u prosječnoj površini listova rozeta za ~20% u odnosu na divlji tip uročnjaka uzgajan na istoj zemlji (WTNZ). Sličan učinak na smanjenje površine listova i biomase dokazan je u istraživanju sušnog stresa na *Amaranthus* spp. (Liu i Stützel, 2004). Ako usporedimo skupine divljeg tipa (WTNZ i WTSZ), tada se primjećuje isti, očekivani utjecaj manjka vlage u zemlji – biljke divljeg tipa na zemlji u uvjetima manjka vode proizvode listove prosječno manje površine od istih biljaka na zemlji u normalnim uvjetima vlage. U radu Jaleel i sur. (2009) dokazano je kako biljke izložene sušnom stresu u velikom broju slučajeva smanjuju površinu listova čime usporedno smanjuju i transpiracijski gubitak vode. S druge strane, usporedba skupina KONZ i KOSZ nije iskazala statistički značajnu razliku, iz čega bi se moglo zaključiti da odsustvo proteina TROL pruža biljkama uročnjaka veću toleranciju na sušni stres. Isti obrazac pokazao se i u ostalim mjerenjima te će kasnije biti detaljnije obrađen.

Mjerenja suhe mase (engl. *carbon capture*) biljaka opisanih eksperimentalnih skupina dovela su do zaključka da na zemlji normalnog sadržaja vlage, u idealnim uvjetima osvjetljenja, TROL KO mutacija uzrokuje statistički značajno smanjenje biomase – mutanti biljaka uročnjaka su imali 40% manje biomase od divljeg tipa (slika 3.3). Štoviše, statistički se najviše očituju razlike između skupina KONZ i biljaka divljeg tipa (WTNZ i WTSZ skupine), što bi značilo da bez obzira na sadržaj vlage u zemlji, biljke s uklonjenim proteinom TROL fenotipski najznačajnije pokazuju spomenutu promjenu u procesu *carbon capture*. Suha tvar izvrstan je i jednostavan izvanjski pokazatelj negativnih učinaka mutacija proteina koji su odgovorni za biosintezu osnovnih gradivnih blokova stanica – šećera i susljedno, celuloze (Schulze i sur., 1991). Time je dokazano da protein TROL kao uzvodni čimbenik značajno utječe svojom funkcijom usidranja FNR na nizvodne čimbenike biosintetskih reakcija Calvinovog ciklusa (Vojta i sur., 2015).

U uvjetima stresa, pak, dolazi do drugačijeg učinka što je vidljivo na fenotipu biljaka uzgajanih na zemlji u uvjetima manjka vode – mutanti TROL KO ne pokazuju statistički značajni pad suhe mase u odnosu na mutante uzgajane u normalnim uvjetima. Time je potvrđena hipoteza da u uvjetima stresa i manjku interakcijskih partnera enzima FNR, biljka dio elektrona sabranih iz linearnog transportnog lanca koristi u antioksidacijskim reakcijama (Lintala i sur., 2014). Drugim riječima, biljka manje koristi visokoenergetske elektrone s Fd za redukciju NADP⁺ i daljnje reakcije biosinteze šećernih spojeva. Te iste elektrone potrebno je usmjeriti u antioksidacijske reakcije otklanjanja toksičnih ROS koji nastaju za vrijeme izlaganja sušnom stresu. U prilog tome govori i činjenica da otpuštanje FNR u stromu kloroplasta dovodi do obrtanja njegove prvotne funkcije – FNR usidren u tilakoidnu membranu učinkovito dovodi do nastajanja NADPH, dok u stromi provodi suprotnu reakciju oksidacije NADPH u NADP⁺ (Palatnik, 1997). Tako smanjuje koncentraciju suvišno nastalog NADPH, dovodi do uspostave narušenog omjera NADP⁺/NADPH i preusmjeruje elektrone na dosad nedovoljno istražene hvatače ROS (Vojta i sur., 2012; Jurić i sur., 2013; Vojta i Fulgosi, 2015). Upravo bi zbog toga mogao biti smanjen štetni učinak *knock-out* mutacije TROL kod mutiranih uročnjaka u odnosu na njegov štetni učinak u slučaju uročnjaka divljeg tipa.

Stresni čimbenici često uzrokuju promjene u koncentraciji fotosintetskih pigmenata, kao što u slučaju suše pokazuje rad Parida i sur. (2007). Dokazali su kako biljke pamuka (*Gossypium hirsutum* L.) osjetljive na sušu pokazuju znatno smanjenje koncentracije klorofila i karotenoida. U našem slučaju, mjerenje koncentracija klorofila *a*, *b* i karotenoida pokazalo je statistički značajni porast koncentracije klorofila *a* i *b* za uročnjake divljeg tipa izložene suši u odnosu na divlji tip uzgajan na zemlji normalnog sadržaja vlage. S druge strane, koncentracije se karotenoida ne razlikuju značajno među svim eksperimentalnim skupinama biljaka (slika 3.6). Vrsta *A. thaliana* pokazuje različite odgovore na kratkoročno i dugoročno izlaganje sušnom stresu te se rezultati iskazani u ovom radu razilaze s onim učincima opisanima u istraživanju Chen i sur. (2019). Dok za vrijeme kratkoročnog stresa dolazi do brzog raspadanja LHC sustava, koncentracije klorofila i karotenoida, kao i drugih važnih indikatora stresa, počinju opadati tek nakon dva tjedna izlaganja suši. U spomenutom radu, biljke su prije izlaganja sušnim uvjetima uzgajane četiri tjedna nakon čega im je zaustavljeno navodnjavanje u različitim vremenskim odmacima, najviše 16 dana. Važno je istaknuti kako u slučaju našeg istraživanja, osušena zemlja s izračunatim 25%-tnim manjkom vlage nije pokazivala jednaku stopu upijanja vode iz plitice kao normalna, neosušena zemlja. Takav način uzgoja biljaka jedna je od posebnosti pristupa ovog rada budući da nije kompenzirana učestalost i ritam zalijevanja u ovisnosti o tipu biljke.

Svakodnevno sam dolijevao onoliko vode koliko je bilo potrebno da u plitici bude konstantna razina. Imajući naveden način uzgoja na umu, zanimljivo je da biljke divljeg tipa uročnjaka, mjesec dana uzgajane na osušenoj zemlji, pokazuju značajan porast koncentracije klorofila *a* i *b* u usporedbi s biljkama divljeg tipa na normalno navlaženoj zemlji. Sudeći prema literaturnim podacima, koji na više mjesta govore o smanjenju koncentracija istih pigmenta u sušnim i ostalim stresnim uvjetima, potrebno je dodatno rastumačiti problematiku ovog pronalaska (Jaleel i sur., 2009).

Potencijalni odgovor na pitanje proturječnosti naših rezultata s literaturom nalazi se u činjenici da sam uzgajao biljke pod suvremenim, programabilnim LED osvjetljenjem. U nedavnom radu, Mirzahosseini i sur. (2020) su dokazali kako uzgoj uročnjaka pod LED osvjetljenjem u omjeru 30% crvene : 70% plave LED svjetlosti značajno povećava koncentraciju klorofila *a* i *b*, kao i u slučaju našeg rada. LED lampe tvrtke CID, koje sam koristio u ovom radu, također su sadržavale plave, crvene i bijele LED žaruljice, iako nisu bile namještene na isti omjer crvene i plave, već na svjetlosni recept ravnodnevice (12 h dana i 12 h mraka) uz imitaciju prirodne fluktuacije osvjetljenja kakvo je satelitski izračunato za kontinentalni klimatski pojas. Uzevši sve navedeno u obzir, moguće je zaključiti kako LED osvjetljenje u određenoj mjeri ipak utječe na rast i razvoj uročnjaka ispitivanih u ovom istraživanju, premda kao takvo nije bilo izabrano u vidu tretmana uročnjaka. Kako bi se dodatno utvrdila vjerodostojnost iznesenog zaključka, u budućnosti bi bilo poželjno potkrijepiti rezultate mjerenja fotosintetskih pigmenta ultrastrukturnom analizom kloroplasta putem elektronske mikroskopije. Čestu pojavu kod biljaka u stresnim uvjetima predstavlja reorganizacija tilakoidnih membrana u 3D prostoru koja nadalje ima utjecaj na količinu i razdiobu ključnih komponenti fotosintetskog aparata i pigmenta (Zhang i sur., 2010).

Izuzev toga, zanimljivo bi bilo provesti daljnja istraživanja utjecaja mutacije TROL KO na otpornost biljaka na sušni stres mjerenjem vodnog potencijala zemlje. Tome u prilog govori velik broj različitih načina mjerenja te se kvantifikacija razine suše može preciznije opisati i regulirati, za razliku od one korištene u ovom radu (van der Weele i sur., 2000). Za kraj, neki od mogućih smjerova budućih istraživanja bili bi proučiti utjecaj TROL OX (*overexpression*) mutacije na stvaranje biomase i pitanje primjene u GM tehnologiji biljaka budućnosti (Fulgosi i Vojta, 2020).

5. Zaključak

Istraživanjem fenotipskih značajki mutanata TROL KO i divljeg tipa *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. i njihovom međusobnom usporedbom dokazan je učinak nedostatka proteina TROL na krajnje i najvidljivije rezultate procesa fotosinteze – stvaranje biomase („*carbon capture*“) i veličine listova. Biljke uzgajane na zemlji normalnog sadržaja vlage pokazale su značajni pad suhe biomase (~40%) uslijed izostanka proteina TROL, dok mutirane biljke u uvjetima manjka vode u zemlji nisu pokazale jednako štetne učinke *knock-out* mutacije kao na zemlji normalnog sadržaja vlage. Razlog tome leži u samoj funkciji proteina TROL koji u interakciji s enzimom FNR usmjerava elektrone iz fotokemijskih reakcija fotosinteze u metaboličke reakcije stvaranja biljne biomase. U stresnim uvjetima suše stvaranje biomase se smanjuje te kod mutanata dolazi do smanjenja vidljivog utjecaja odsustva proteina TROL jer se elektroni sa slobodnog, neusidrenog FNR lakše preusmjeruju u antioksidacijske reakcije detoksifikacije štetnih kisikovih radikala. Mjerenja koncentracija fotosintetskih pigmenta nisu pokazala značajne promjene kod mutiranih biljaka u odnosu na divlji tip, međutim došlo je do porasta koncentracije klorofila *a* i *b* u uročnjacima divljeg tipa uzgajanima na zemlji smanjenog udjela vlage što treba dodatno istražiti.

6. Literatura

- Arabidopsis.org. 2020. TAIR - About Arabidopsis. [online] Dostupno na: <<https://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>> [pristupio 29. svibnja 2020].
- Besse, I., Buchanan, B., 1997. Thioredoxin-linked animal and plant processes: the new generation. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 38, str.1–11.
- Caffarri, S., Tibiletti, T., Jennings, R. i Santabarbara, S., 2014. A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning. *Current Protein & Peptide Science*, 15(4), str.296-331.
- Carrillo, N. i Ceccarelli, E., 2003. Open questions in ferredoxin-NADP⁺ reductase catalytic mechanism. *European Journal of Biochemistry*, 270(9), str.1900-1915.
- Chen, Y., Liu, W., Su, Y., Cui, J., Zhang, Z., Yuan, M., Zhang, H. i Yuan, S., 2016. Different response of photosystem II to short and long-term drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 158(2), str.225-235.
- Dickinson, B. i Chang, C., 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chemical Biology*, 7(8), str.504-511.
- EurekaAlert!. 2020. *Arabidopsis thaliana*. [online] Dostupno na: <<https://www.eurekaalert.org/multimedia/pub/159783.php>> [pristupio 12. lipnja 2020].
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. i Basra, S., 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29(1), str.185-212.
- Foyer, C. i Shigeoka, S., 2010. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155(1), str.93-100.
- Fulgosi, H. i Vojta, L., 2020. Tweaking Photosynthesis: FNR-TROL interaction as potential target for crop fortification. *Frontiers in Plant Science*, 11.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B. i sur., 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37, str.263–285.
- Govindjee, 1995. Sixty-Three Years Since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence. *Australian journal of plant physiology*, 22(2), str.131-160.
- Harbinson, J., 2013. Improving the accuracy of chlorophyll fluorescence measurements. *Plant, Cell & Environment*, 36(10), str.1751-1754.
- Huang, W., Yang, Y., Hu, H. i Zhang, S., 2015. Different roles of cyclic electron flow around photosystem I under sub-saturating and saturating light intensities in tobacco leaves. *Frontiers in Plant Science*, 6:923.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Somasundaram, R. i Panneerselvam R., 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International journal of agriculture & biology*, 11(1), str.100–105

- Jensen, P. i Leister, D., 2014. Chloroplast evolution, structure and functions. *F1000Prime Reports*, 6:40.
- Johnson, M., 2016. Photosynthesis. *Essays in Biochemistry*, 60(3), str.255-273.
- Jones, D., 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9-10), str.1865-1879.
- Jurić, S., Hazler-Pilepić, K., Tomašić, A., Lepeduš, H., Jeličić, B., Puthiyaveetil, S., Bionda, T., Vojta, L., Allen, J., Schleiff, E. i Fulgosi, H. 2009. Tethering of ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase to thylakoid membranes is mediated by novel chloroplast protein TROL. *The Plant Journal*, 60(5), str.783-794.
- Kautsky, H. i Hirsch, A., 1931. Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Die Naturwissenschaften*, 19(48), str.964-964.
- Kekić, T., Fulgosi, H., Vojta, L. i Bertoša, B., 2020. Molecular basis of ferredoxin:NADP(+) reductase interactions with FNR binding domains from TROL and Tic62 proteins. *Journal of Molecular Structure*, 1215(128281), str.1-12.
- Krieger-Liszkay, A., Fufezan, C. and Trebst, A., 2008. Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research*, 98(1-3), str.551-564.
- Kubota, F., 2003. The effects of drought stress and leaf ageing on leaf photosynthesis and electron transport in photosystem 2 in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) Cultivars. *Photosynthetica*, 41(2), str.253-258.
- Lintala, M., Schuck, N., Thormählen, I., Jungfer, A., Weber, K., Weber, A., Geigenberger, P., Soll, J., Bölder, B. i Mulo, P., 2014. Arabidopsis tic62 trol mutant lacking thylakoid-bound ferredoxin–NADP⁺ oxidoreductase shows distinct metabolic phenotype. *Molecular Plant*, 7(1), str.45-57.
- Liu, F. i Stützel, H., 2004. Biomass partitioning, specific leaf area, i water use efficiency of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to drought stress. *Scientia Horticulturae*, 102(1), str.15-27.
- Lorimer, G., 1981. The carboxylation and oxygenation of ribulose 1,5-bisphosphate: the primary events in photosynthesis and photorespiration. *Annual Review of Plant Physiology*, 32(1), str.349-382.
- Mechela, A., Schwenkert, S. i Soll, J., 2019. A brief history of thylakoid biogenesis. *Open Biology*, 9(1), str.180237.
- Meinke, D., 1998. Arabidopsis thaliana: A model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), str.662-682.
- Mirzahosseini, Z., Shabani, L. and Sabzalian, M., 2020. LED lights increase an antioxidant capacity of Arabidopsis thaliana under wound-induced stresses. *Functional Plant Biology*, objavljeno *online* prije objave u tiskanom obliku
- Mitchell-Olds, T., 2001. Arabidopsis thaliana and its wild relatives: a model system for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(12), str.693-700.

- Morales, A., Yin, X., Harbinson, J., Driever, S., Molenaar, J., Kramer, D. i Struik, P., 2017. In silico analysis of the regulation of the photosynthetic electron transport chain in C3 plants. *Plant Physiology*, 176(2), str.1247-1261.
- Müller, P., Li, X. i Niyogi, K., 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125, str.1558-1566.
- Ni, Z., Lu, Q., Huo, H. i Zhang, H., 2019. Estimation of chlorophyll fluorescence at different scales: A review. *Sensors*, 19(13), str.3000.
- Palatnik, J., Valle, E. i Carrillo, N., 1997. Oxidative stress causes ferredoxin-NADP⁺ reductase solubilization from the thylakoid membranes in methyl viologen-treated plants. *Plant Physiology*, 115(4), str.1721-1727.
- Parida, A., Dagaonkar, V., Phalak, M., Umalkar, G. i Aurangabadkar, L., 2007. Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. *Plant Biotechnology Reports*, 1(1), str.37-48.
- Raza, A., Gholami, R., Rezaee, R., Rasouli, V. i Rabiei, M., 2019. Significant aspects of carbon capture and storage – A review. *Petroleum*, 5(4), str.335-340.
- Sagun, J., Badger, M., Chow, W. i Ghannoum, O., 2019. Cyclic electron flow and light partitioning between the two photosystems in leaves of plants with different functional types. *Photosynthesis Research*, 142, str.321–334.
- Salehi-Lisar, S. i Bakhshayeshan-Agdam, H., 2016. Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. *Drought Stress Tolerance in Plants*, Vol 1, str.1-16.
- Schulze, W., Stitt, M., Schulze, E., Neuhaus, H. i Fichtner, K., 1991. A quantification of the significance of assimilatory starch for growth of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Plant Physiology*, 95(3), str.890-895.
- Schwarz, E., Tietz, S. i Froehlich, J., 2017. Photosystem I-LHCII megacomplexes respond to high light and aging in plants. *Photosynthesis Research*, 136(1), str.107-124.
- Scoffoni, C., Albuquerque, C., Cochard, H., Buckley, T., Fletcher, L., Caringella, M., Bartlett, M., Brodersen, C., Jansen, S., McElrone, A. i Sack, L., 2018. The causes of leaf hydraulic vulnerability and its influence on gas exchange in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 178(4), str.1584-1601.
- Selles, B., Moseler, A., Rouhier, N. i Couturier, J. 2019. Rhodanese domain-containing sulfurtransferases: multifaceted proteins involved in sulfur trafficking in plants. *Journal of Experimental Botany*, 70(16), str.4139-4154.
- Taiz, L. i Zeiger, E., 2015. *Plant Physiology and Development*. 6. izd. Sinauer Associates. Oxford University Press, Oxford.
- Thal, J., (1557): *Sylva Hercynia sive catalogus Plantarum sponte nascentium in montibus et locis plerisque Hercyniae Sylvae quae respicit Saxoniam*. Moenum.
- The Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408 (6814), str.796–815

- van der Weele, C., Spollen, W., Sharp, R. i Baskin, T., 2000. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient agar media. *Journal of Experimental Botany*, 51(350), str.1555-1562.
- Vass, I. i Cser, K., 2009. Janus-faced charge recombinations in photosystem II photoinhibition. *Trends in Plant Science*, 14(4), str.200-205.
- Vojta, L. i Fulgosi, H. 2012. Energy conductance from thylakoid complexes to stromal reducing equivalents. *Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects*. Najafpour, M.M. (ed.), str.175–190, InTech, Rijeka
- Vojta, L. i Fulgosi, H. 2016. Data supporting the absence of FNR dynamic photosynthetic membrane recruitment in *trol* mutants. *Data in Brief*, 7, str.393-396.
- Vojta, L., Carić, D., Cesar, V., Antunović Dunić, J., Lepeduš, H., Kveder, M. i Fulgosi, H. 2015. TROL-FNR interaction reveals alternative pathways of electron partitioning in photosynthesis. *Scientific Reports*, 5:10085
- Vojta, L., Čuletić, A. i Fulgosi, H. 2019. Topology of TROL protein in thylakoid membranes of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 166, str.300-308.
- Wellburn, A., 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), str.307-313.
- Westermeier, R., Naven, T. i Höpker, H., 2008. *Proteomics In Practice*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Zhang, N. i Portis, A., 1999. Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16), str.9438-9443.
- Zhang, R., Wise, R., Struck, K. i Sharkey, T., 2010. Moderate heat stress of *Arabidopsis thaliana* leaves causes chloroplast swelling and plastoglobule formation. *Photosynthesis Research*, 105(2), str.123-134.
- Zivcak, M., Brestic, M., Balatova, Z., Drevenakova, P., Olsovska, K., Kalaji, H., Yang, X. i Allakhverdiev, S., 2013. Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress. *Photosynthesis Research*, 117(1-3), str.529-546.

7. Životopis

Zovem se Bernardo Kerečeni i rođen sam u Zagrebu, 22. travnja 1995. Pohađao sam OŠ Malešnica i nakon nje Petu gimnaziju. Usporedno s tim dvijema školama, upisao sam i završio osnovnu glazbenu školu Ivan Zajc, smjer gitara te nastavio sa srednjom glazbenom školom Blagoje Bersa, smjer glazbeni teoretičar. Iz srednje glazbene škole maturirao sam godinu dana prije mature u Petoj gimnaziji koju sam završio 2014. Te iste godine upisao sam studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Diplomski rad sam izradio u laboratoriju Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr.sc. Hrvoja Fulgosija, znanstvenog savjetnika u trajnom zvanju.

Za vrijeme samog studija, stekao sam brojna izvannastavna iskustva koja su me obogatila i na razne načine osposobila za budućnost rada u struci. Neka od njih bila su: demonstrature studentima nižih godina, izborne terenske nastave, sudioništvo u udruzi studenata biologije „BIUS“ uz dvogodišnje vodstvo sekcije za kornjaše, vođenje i izradu kreativno-poučnih radionica u sklopu znanstveno-popularnih manifestacija „Noć biologije“ i „Znanstveni piknik“, itd.

Izuzev biologije i glazbe, velik interes mi predstavlja učenje stranih jezika (posebno vješto koristim engleski i njemački te od nedavno i japanski), dok od rekreacijskih sportova volim planinarenje i šetnju prirodom, plivanje i društvene plesove.