

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij biologije

Antonija Piškori

Ekspresija fotosintetskih proteina

Završni rad

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Završni rad

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

EKSPRESIJA FOTOSINTETSKIH PROTEINA

Antonija Piškori

Rad je izrađen na: Odjelu za biologiju, Zavod za zoologiju

Mentor: dr.sc. Selma Mlinarić, doc.

Kratak sadržaj završnog rada:

Protein D1 jedan je od ključnih proteina fotosustava II i iznimno je osjetljiv na stresne uvjete. Uslijed izlaganja stresu dolazi do pojačane fosforilacije i potpune degradacije D1 proteina. Degradirani D1 protein može se u potpunosti zamijeniti novosintetiziranim u optimalnim uvjetima. Promjene u akumulaciji D1 proteina tijekom suše i nakon 24-satnog oporavka praćeno je na tri kultivara iz porodice kupusnjača (Brassicaceae): kineskom kupusu (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*), bijelom kupusu (*B. oleracea* var. *capitata*) i raštici (*B. oleracea* var. *acephala*). Nakon tretmana sušom kod svih ispitivanih kultivara došlo je do smanjenja akumulacije D1 proteina. Nakon oporavka, kod kineskog i bijelog kupusa došlo je do povećanja akumulacije D1 proteina što ukazuje da ova dva kultivara imaju učinkovit sustav promjene ovog proteina.

Broj stranica: 13

Broj slika: 3

Broj literaturnih navoda: 20

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: SDS elektroforeza, Western analiza, Brassicaceae, D1protein, tubulin,

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Bachelor thesis

Department of Biology

Undergraduate Study of Biology

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

EXPRESSION OF PHOTOSYNTHETIC PROTEINS

Antonija Piškori

Thesis performed at: Department of Biology, Sub Department of Zoology

Supervisor: Selma Mlinarić , PhD, Assistant Professor

Short abstract of bachelor thesis:

Protein D1 is one of the key proteins of the photosystem II and it is extremely sensitive to stress conditions. Stressful conditions provoke enhanced phosphorylation and complete degradation of D1 protein. Degraded D1 protein can be completely replaced by newly synthesized protein in optimal conditions. Changes in the accumulation of D1 protein during drought and after 24-hour recovery were observed on three Brassicaceae cultivars: Chinese cabbage (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*), white cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*) and kale (*B. oleracea* var. *acephala*). After the drought treatment, accumulation of D1 protein decreased in all three cultivars. After the recovery, in Chinese and white cabbage accumulation of D1 protein increased, suggesting that these two cultivars have an efficient turnover of the D1 protein.

Number of pages: 13

Number of figures: 3

Number of references: 20

Original in: Croatian

Keywords: SDS electrophoresis, Western analysis, Brassicaceae, D1 protein, tubulin

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. CILJ RADA.....	2
3. MATERIJALI I METODE	3
3.1. Biljni materijal	3
3.2. Ekstrakcija topljivih i membranskih proteina	3
3.3. SDS elektorforeza u poliakrilamidnom gelu.....	4
3.4. Bojanje Coomassie briljant plavom bojom.....	4
3.5. Bojanje srebrom	4
3.6. Western analiza	5
3.7. Imunodetekcija proteina na membrani kemiluminiscijom.....	5
4. REZULTATI.....	6
4.1. Detekcija proteina bojanjem u gelu	6
4.2. Količina D1 proteina.....	7
5. RASPRAVA.....	8
6. ZAKLJUČAK	11
7. LITERATURA.....	12

Završni rad izrađen je u Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju biljaka Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku pod mentorstvom doc. dr. sc. Selme Mlinarić. Laboratorijska istraživanja financirana su HRZZ projektom „Fitohormoni u abiotskom stresu kupusnjača: mehanizmi tolerancije i primjena“ (IP-2014-09-4359) voditeljice dr. sc. Branke Salopek Sondi.

1. UVOD

Fotosinteza je jedan od najvažnijih metaboličkih procesa u biljkama. Fotosintetski procesi sastoje se od dvije odvojene grupe reakcija: svjetlosnih ili primarnih reakcija i sekundarnih reakcija, neovisnih o svjetlosti. U primarnim reakcijama fotosinteze nastaju NADPH i ATP te molekularni kisik fotokemijskom oksidacijom vode. Transport elektrona od vode do NADP⁺ događa se djelovanjem četiri proteinska kompleksa uklopljena u tilakoidne membrane: fotosustav II (PSII), citokrom_{b₆f} kompleks, fotosustav I (PSI) i ATP-sintaza. (Slika 1). PSI i ATP-sintaza nalaze se na stroma tilakoidima i rubnim dijelovima grana tilakoida, a PSII samo na grana tilakoidima dok je citokrom _{b₆f} kompleks jednoliko je raspoređen između stroma i grana tilakoida (Mlinarić, 2013).

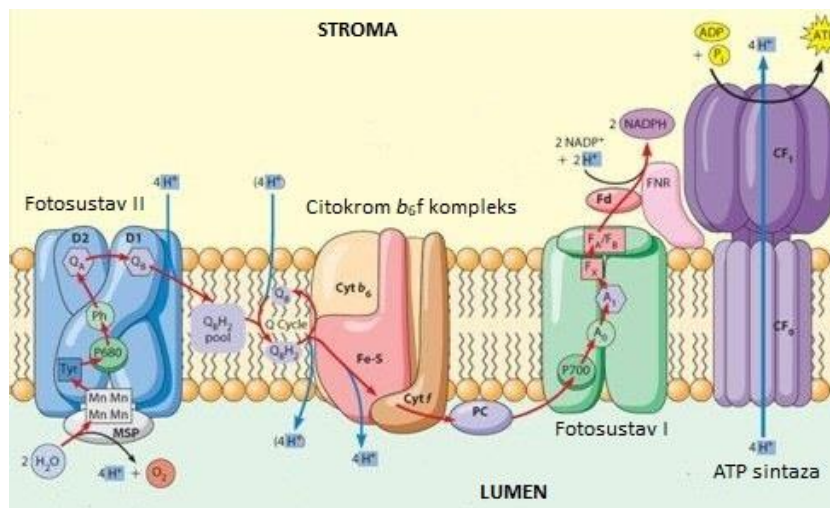
Fotosustavi su građeni od dva dijela: antena kompleksa za prikupljanje svjetla (engl. *light harvesting complex* - LHC) i reakcijskog središta (engl. *reaction center* – RC), dok PSII posjeduje još i kompleks koji katalizira oksidaciju vode (engl. *oxygen-evolving complex* - OEC). Antena kompleks fotosustava II (LHCII) sadrži na stotine molekula pigmenta, uglavnom klorofila *a* i *b* te karotenoida. Antena sustavi građeni su od unutrašnje antene koja je smještena blizu reakcijskog središta te vanjskih, perifernih antena. Unutrašnje antene funkcioniraju kao apsorpcijske jedinice te kao poveznica između vanjskih antena i reakcijskog središta. Vanjske antene LHCII su odgovorne za apsorpciju više od polovice fotona u PSII. U sredini PSII nalazi se reakcijsko središte koje je građeno od 17 transmembranskih proteinskih podjedinica i tri vanjska proteina. Transmembranske podjedinice su D1 (kodirana genom *psbA*) i D2 (kodirana genom *psbD*) čija je molekularna masa 38,2 kDa, odnosno 39,4 kDa. D1 i D2 proteini sadrže različite nosače i ligande koji su nužni za prijenos elektrona kroz reakcijski centar PSII (Toth, 2006). Smatra se da je protein D1 primarno mjesto fotoinhibicije, a kapacitet njegove izmjene (engl. *turnover*) ključni je fiziološki uvjet važan u stvaranju tolerancije te u oporavku od fotoinhibicije (Aro i sur., 1993). Dodatnih 13 podjedinica odnosi se na podjedinice molekularne mase manje od 10 kDa. Tri vanjska proteina vezana su za luminalnu stranu. Ta tri proteina u kombinaciji s vanjskim regijama D1, D2, CP47 i CP43 proteina te manganski klaster (Mn₄Ca) sa Ca²⁺ i Cl⁻ ionima grade kompleks koji katalizira oksidaciju vode.

Fotosustav I djeluje kao plastocijanin - feredoksin oksidoreduktaza. To je integralni membranski proteinski kompleks koji prenosi elektrone sa plastocijanina (PC) na feredoksin (Fd) (He i Malkin, 1998). Antene PSI građene su od četiri različita LHCI

proteina koji se spajaju u dimere te tako stvaraju pojas oko reakcijskog središta. Reakcijsko središte PSI je heterodimer građen od 12 proteina i otprilike 100 molekula klorofila.

Citokrom *b6f* je integralni membranski proteinski kompleks veličine 217 kDa te predstavlja elektronsku vezu između PSII i PSI. Građen je od tri male i četiri velike podjedinice.

ATP sintaza je membranski proteinski kompleks građen od dvije velike podjedinice od kojih jedna ima funkciju protonskog kanala, a druga regulira protok protona. Transmembranski elektrokemijski protonski gradijent pokreće ATP sintazu koja stvara ATP iz ADP i Pi, što je čini ključnim enzimom u energetske metabolizmu stanice (Whitmarsh, 1998; Bottcher i Graber, 2008)



Slika 1: Shematski model fotosintetskog lanca transporta elektrona i strukturalne organizacije proteinskih kompleksa koji su uključeni u prijenos elektrona i protona preko tilakoidnih membrana (Web 1).

2. CILJ RADA

Budući da je brzina fosforilacije te ponovne sinteze, tj. izmjena D1 proteina ključan pokazatelj u odgovoru biljke na stresne uvjete, cilj ovog rada bio je ispitati promjene u akumulaciji D1 proteina kod tri kultivara kupusnjača: kineskog kupusa (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*), bijelog kupusa (*B. oleracea* var. *capitata*) te raštike (*B. oleracea* var. *acephala*) uslijed stresa izazvanog sušom i nakon 24-satnog oporavka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Klijanci tri kultivara iz porodice kupusnjača (Brassicaceae): kineski kupus (*Brassica rapa* subsp. *Pekinensis*L.), bijeli kupus (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* (L.) Duchesne) i raštika (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* (DC.) O. Schwarz) uzgajani su u plastičnim posudicama u uzgojnoj komori (21°C, fotoperioda 16/8h) do pojave prvog pravog lista (četiri tjedna stare biljke). Biljke su bile redovito zalijewane. Nakon toga dio biljaka bilo je podvrgnuto tretmanu sušom u različitom vremenskom trajanju sve dok se relativni sadržaj vode u listu svakog kultivara nije spustio na 45±10%. Nakon toga su biljke zalijane do procjeđivanja te ostavljene na oporavku u trajanju od 24 h. Ekspresija fotosintetskih proteina proučavana je na listovima sva tri kultivara podvrgnutim tretmanu sušom, nakon 24 h oporavka te njihovim kontrolama (redovito zalijewane biljke).

Sjeme divljeg tipa uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) vernalizirano je 5 dana na +4°C, sterilizirano 70% EtOH (1 min), isprano sterilnom vodom (+ 0.05% Tween20) te sterilizirano 1% Izosanom G (10 min). Tako pripremljene sjemenke raspoređene su na pločice s MS krutom hranjivom podlogom te uzgajane 5 dana u uzgojnoj komori (22°C, fotoperioda 16/8 h). Nakon toga su klijanci prebačeni na svježije pločice s MS hranjivom podlogom bez soli (kontrola) ili uz dodatak NaCl (100 mM). Klijanci su uzgajani 10 dana nakon čega su čitave biljke sakupljene za analize proteina.

Sjeme ječma (*Hordeum vulgare* L.) dva odabrana genotipa posijano je u plastične posudice u komercijalni supstrat pomiješan sa pijeskom u omjeru 3:1, te uzgajano 10 dana u klima komori (23±1°C, fotoperioda 16/8 h). Nakon toga su listovi sakupljeni za analize proteina.

Biljke japanskog dvornika (*Reynoutria japonica* Houtt.) uzgajane su na dva različita režima osvjetljenja. Jedna skupina biljaka je uzgajana na konstantno niskom intenzitetu svjetlosti (60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pri temperaturi od 23±1 °C, a druga na promjenjivom intenzitetu svjetlosti koji se kretao između 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i 1250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i pri temperaturi od 24±2 °C. Prvi potpuno razvijeni listovi od vrha sakupljeni su za analize proteina.

3.2. Ekstrakcija topljivih i membranskih proteina

Biljni materijal je usitnjen u tekućem dušiku do praha te je oko 0,5 g tkiva prebačeno u tubice. Na tkivo je dodano 1 mL ekstrakcijskog pufera (0,13 M Tris/HCl, pH=6,8, 4,6% SDS, 16% glicerol, 0,59% DTT) zagrijanog na 80°C. Ekstrakcija se odvijala na

termobloku (Termomixercompact, Eppendorf) tijekom 10 min. Nakon hlađenja i centrifugiranja (10 min pri 18000 g), supernatanti su odvojeni u nove tubice. Postupak je ponovljen još jednom, a supernatanti sakupljeni zajedno. Tako pripremljeni ekstrakti korišteni su za daljnje analize ekspresije proteina.

3.3. SDS elektorforeza u poliakrilamidnom gelu

Razdvajanje proteina provedeno je pomoću denaturirajuće diskontinuirane elektroforeze u poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Korišten je 4%-tni gel za sabijanje i 12%-tni gel za razdvajanje (Laemmli, 1970).

Prije nanošenja na gel, uzorci su kratko centrifugirani i pomiješani s Laemmli puferom (1,5M Tris/HCl, pH=6,8, SDS, glicerol, boja bromfenol plavo i β -merkaptotanol) za nanošenje uzoraka u omjeru 6:1 (uzorci:pufer). Smjesa uzoraka i pufera zagrijavana je 5 min pri 95°C na termobloku. Elektroforeza je provedena u kadici za vertikalnu elektroforezu (BIO-Rad) pomoću pufera za razdvajanje (pH 8.3) pri konstantnoj jakosti struje (20mA) i promjenjivom naponu (100-150 V) tijekom 2h.

3.4. Bojanje Coomassie briljant plavom bojom

Nakon razdvajanja proteini su u gelu obojani Coomassie Brilliant Blue bojom (CBB R250) (Deutscher, 1990). CBB boja se u kiseloj sredini elektrostatskim silama veže za amino skupine proteina. Boja se otopi u smjesi destilirane vode, metanola i octene kiseline (4:5:1). Nakon bojanja gel je odbojavan pomoću otopine deH₂O, metanola (20%) i octene kiseline (10%) kako bi se vizualizirale proteinske vrpce. Postupak je završen kada pozadina gela postane potpuno prozirna, a proteinske pruge ostanu obojene plavom bojom.

3.5. Bojanje srebrom

Gelovi su nakon elektroforeze fiksirani u mješavini metanola (50%), octene kiseline (12%) i deH₂O. Prije bojanja srebrom gelovi su isprani 30% etanolom. Nakon ispiranja slijedila je prethodna obrada pomoću Na₂S₂O₃ x 5H₂O. Gel je ispran destiliranom vodom nakon čega je uslijedila impregnacija srebrovim nitratom (AgNO₃). Nakon 20 minuta impregniranja gel je ponovno ispran deH₂O. Razvijanje je provedeno pomoću otopine Na₂CO₃, Na₂S₂O₃ x 5H₂O, HCHO i deH₂O. Reakcija je zaustavljena nakon pojave smeđih proteinskih pruga naglim zakiseljavanjem. Za zaustavljanje reakcije koristila se ista otopina kao i za fiksiranje (Krsnik-Rasol i sur., 2004).

3.6. Western analiza

Nakon razdvajanja proteina SDS–elektroforezom, proteini su preneseni na sintetske (PVDF- engl. *polyvinylidenedifluoride*) membrane pomoću Western blot metode (Towbin i sur., 1979) i to „mokrim“ prijenosom (engl. *wetblotting/tank blotting*). Prijenos se vrši pomoću pufera za prijenos (25mM TrisHCl, 192mM glicin, 20% (v/v) metanol; pH 8,1-8,4) u kadici za elektroforezu (BIO-Rad). U kadicu za elektroforezu stavlja se kazeta za prijenos u kojoj se nalazi gel i PVDF membrana između filter papira i spužvica namočenih u pufer za prijenos i to na način da je gel okrenut prema negativnoj, a PVDF membrana prema pozitivnoj elektrodi. Prijenos se vrši jedan sat pod naponom od 30V i jakosti struje od 60 mA.

3.7. Imunodetekcija proteina na membrani kemiluminiscijom

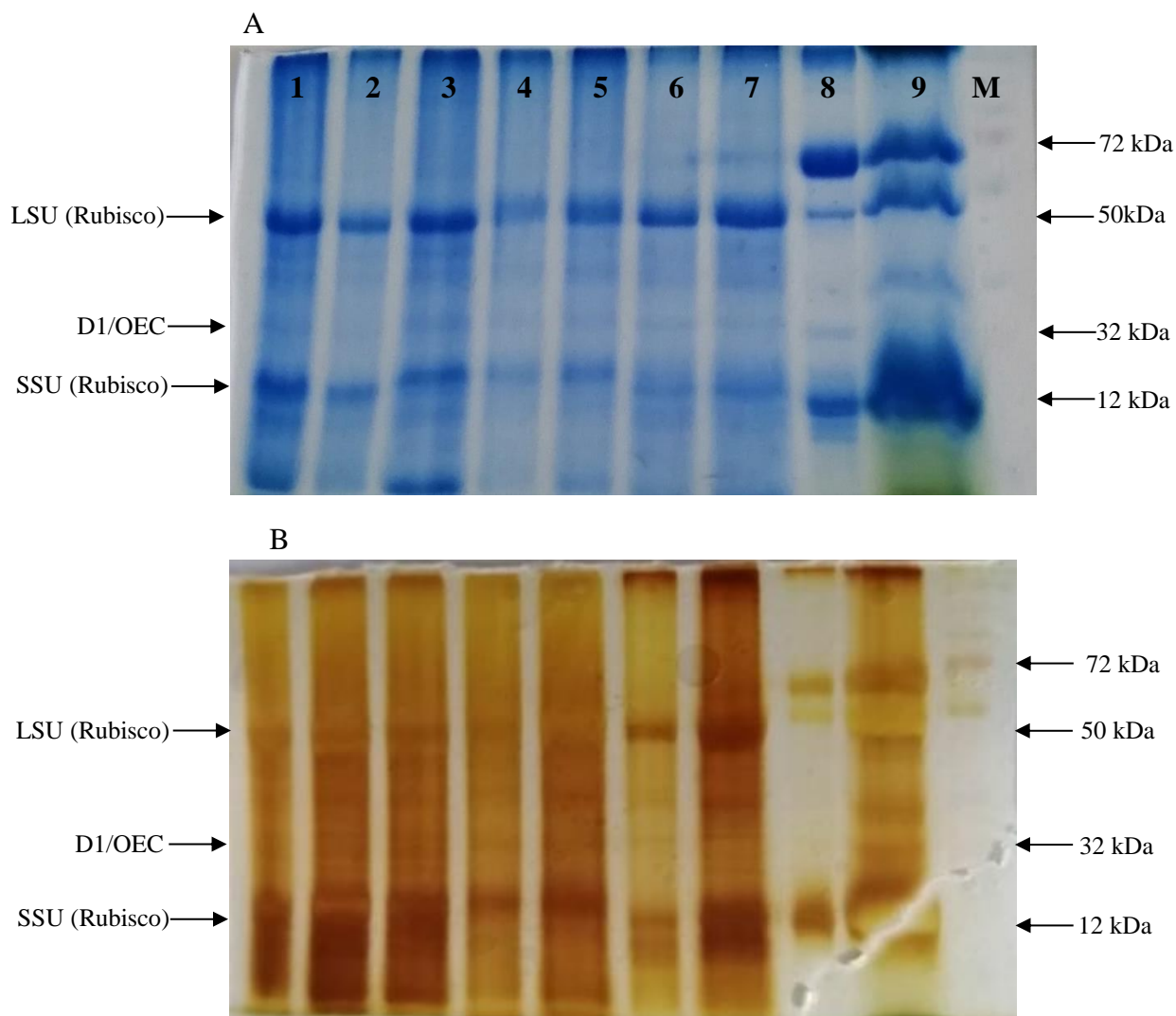
Nakon prijenosa, membrana s proteinima stavlja se na blokiranje (5% bezmasno mlijeko u TBS puferu + 1% Tween 20) preko noći na 4°C. Za detekciju su korištena komercijalna protutijela. Za detekciju tubulina korišteno je primarno anti-tubulin antitijelo u razrjeđenju 1:2000 (Agrisera), a za detekciju D1 proteina, primarno anti-PsbA antitijelo (Agrisera) u razrjeđenju 1:5000. Nakon 1h inkubacije u primarnom protutijelu, membrana je ispirana u TBST puferu 1x15 min te 3x5 min. Zatim je membrana inkubirana 1h u HRP Goat anti-rabbitIgG sekundarnom protutijelu (Agrisera) u razrjeđenju 1:25000. I primarna i sekundarna antitijela razrijeđena su supstratom za blokiranje (5% obrano mlijeko u TBST puferu). Tubulin se koristio kao endogena kontrola. Nakon inkubacije slijedilo je ponovno ispiranje membrane (Bollag, 1996).

Za detekciju proteinskih vrpca kemiluminiscijom korišten je komercijalni supstrat za detekciju (Roche) koji se sastoji od luminola i vodikovog peroksida u omjeru 1:1. Na stranu membrane na kojoj se nalaze proteini nanosi se 1mL supstrata za detekciju. Supstrat je ostavljen da djeluje pet minuta, nakon čega je istisnut višak tekućine. Tako pripremljena membrana uložena je u kazetu (Santa Cruz Biotechnology). Za razvijanje filmova, a na membranu je položen ECL film (Ultra Cruz). Nakon 5-10 min ekspozicije, filmovi su razvijeni i fiksirani standardnim postupkom prema uputama proizvođača (Dentalia). Filmovi su zatim skenirani te su proteinske vrpce kvantificirane pomoću programa Kodak 1D Image analysis.

4. REZULTATI

4.1. Detekcija proteina bojanjem u gelu

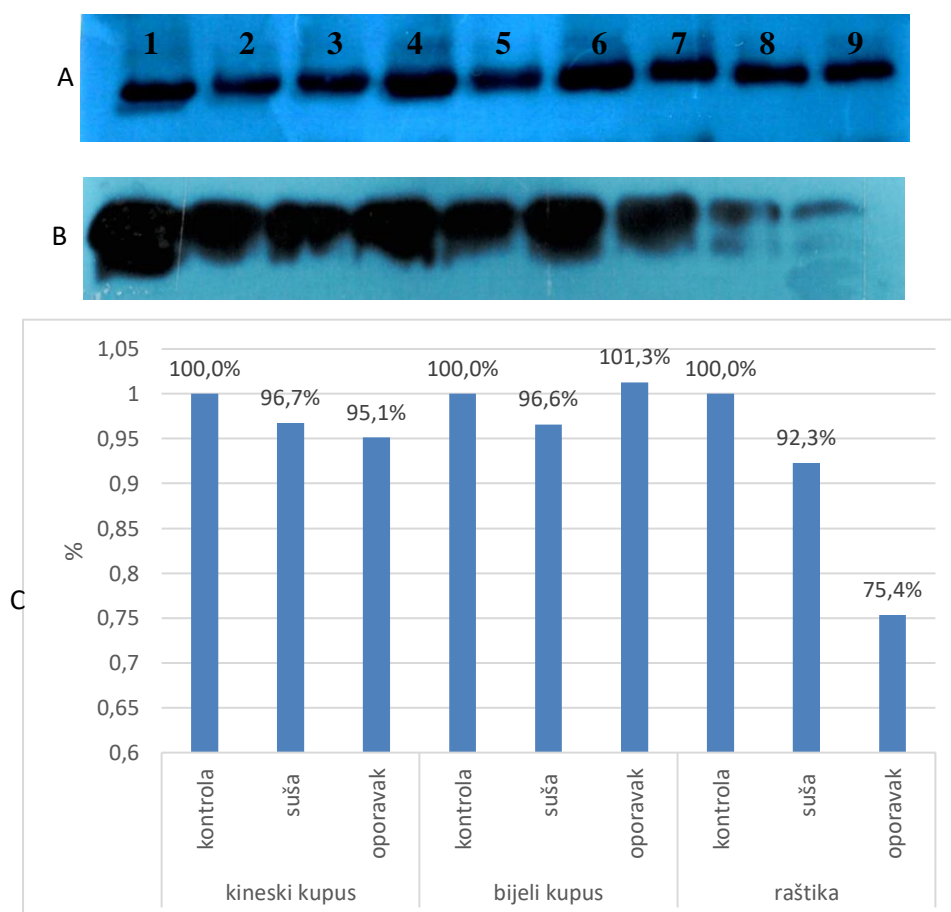
Slika 2 prikazuje proteinske vrpce vizualizirane bojanjem Coomassie Brilliant blue (CBB) bojom (A) i srebrom (B). Na temelju molekularne mase u svim uzorcima detektirani su: LSU (Rubisco) veličine ~50 kDa, D1 i OEC veličine približno 32 kDa te SSU (Rubisco) veličine 12 kDa.



Slika 2: Proteinske vrpce u gelu obojane Coomassie Brilliant Blue bojom(A) i srebrom (B) iz listova bijelog kupusa (*Brassica oleracea* var. *capitata*; 1), raštike. (*B. oleracea* var. *acephala*; 2), kineskog kupusa (*B. rapa* subsp. *Pekinensis*; 3), talijinog uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*; 4 i 5), ječma (*Hordeum vulgare*; 6 i 7) i japanskog dvornika (*Reynoutria japonica*; 8 i 9). Proteinski marker (M) je standard koji služi za utvrđivanje molekularne mase proteina.

4.2. Količina D1 proteina

Slika 3 prikazuje promjene u akumulaciji D1 proteina tri kultivara kupusnjača u uvjetima suše i nakon 24 h oporavka u odnosu na kontrolne uzorke. Tubulin je korišten kao endogena kontrola (kontrola količine uzoraka, Slika 3A). Akumulacija D1 proteina (Slika 3B) u listovima kineskog kupusa smanjila se kod biljaka tretiranih sušom (96,7%) u odnosu na kontrolne biljke (100%) (Slika 3C). Najmanje akumuliranog D1 proteina zabilježeno je u biljaka nakon oporavka (95,1%). Akumulacija D1 proteina u listovima bijelog kupusa smanjila se kod biljaka tretiranih sušom (96,6%) u odnosu na kontrolne biljke (100%). Akumulacija se ponovno povećala te je najveća količina zabilježena u biljkama oporavka (101,3%). Akumulacija D1 proteina (Slika 3B) u listovima raštika smanjila se kod biljaka tretiranih stresom (92,3%) u odnosu na kontrolne biljke (100%) (Slika 3C) Najmanja količina D1 proteina zabilježena je u listovima biljaka nakon oporavka (75,4%). Kod ove vrste količina akumuliranog D1 proteina kontinuirano pada.



Slika 3: Tubulin korišten kao kontrola količine uzoraka (A). Razlike u akumulaciji D1 proteina (B) kod kineskog kupusa (1-kontrola, 2-suša, 3-oporavak), bijelog kupusa (4-kontrola, 5-suša, 6-oporavak), raštika (7-kontrola, 8-suša, 9-oporavak). Vrijednosti su prikazane kao postotak promjene u odnosu na količine izmjerene u kontrolama (C) (100%).

5. RASPRAVA

Postoji čitav niz metoda pomoću kojih je moguće detektirati proteine u gelu. Neke od tih metoda su bojanja srebrovim nitratom, Coomassie Brilliant blue (CBB) bojom, fluorescentnim bojama te imunodetekcija. Za detekciju prisutnosti proteina u uzorku odabrano je bojanje Coomassie Brilliant Blue bojom. Ovim metodama nije moguće odrediti količinu proteina već služi samo za njihovu vizualizaciju. Pomoću nje može se provjeriti i čistoća uzoraka te odrediti molekularne mase proteina. Osim bojanja CBB bojom uzorci su vizualizirani i pomoću srebra. Metoda bojanja srebrovim nitratom znatno je osjetljivija od bojanja CBB bojom i omogućuje vizualizaciju onih proteina koji nisu detektirani pomoću CBB boje. Usporedbom sa proteinskim markerom na temelju molekularnih masa u svim proučavanim uzorcima (obični ječam, japanski dvornik, talijan uročnjak, kineski kupus, bijeli kupus i raštika) detektirane su velika (eng. *large subunit* - LSU) i mala (eng. *small subunit* - SSU) podjedinicu Rubisco-a na 50 kDa, odnosno na otprilike 14 kDa. Nadalje, tu su uočene i proteinske vrpce na veličino od otprilike 32 kDa što najvjerojatnije odgovara proteinima kompleksa koji katalizira oksidaciju vode (eng. *oxygen-evolving complex* - OEC) i proteinu D1 koji je sastavni dio fotosustava II (PSII) no kako bi se točno odredilo o kojim se proteinima radi, potrebno je isto dokazati imunodetekcijom. Na taj način mogu se detektirati i promjene u akumulaciji proteina u stresnim uvjetima.

Pojam stres ni danas nije potpuno jasno definiran. U suštini se odnosi na svako stanje biološkog sustava koje odstupa od optimalnog (Taiz i Zeiger, 2002). Uzrokuju ga svi čimbenici koji negativno utječu na rast i razvoj biljaka. Najveći utjecaj na biljke ima abiotički odnosno fizikalno-kemijski stres. Abiotički stres obuhvaća ekstremne varijacije u temperaturi, zračenju te neoptimalne razine minerala i vode. Suša je jedan od najčešćih abiotičkih čimbenika koji izaziva stres na razini cijele biljke, u gotovo svim biljnim organima i staničnim dijelovima. Abiotički faktori uglavnom ne djeluju izolirano na biljku već su oni povezani i tada govorimo o stresnom sindromu. Tako je nedostatak vode često povezan s visokim temperaturama, dok je dugotrajna suša povezana s povećanim salinitetom (Kolarić, 2016). Suša utječe na različite metaboličke procese (fiziološke, biokemijske i molekularne). Ovisno o njihovoj toleranciji, biljke su razvile različite mehanizme na morfološkoj, fiziološkoj, staničnoj i molekularnoj razini. Korijen je prvi organ izložen nedostatku vode u tlu. Kemijski signali iz korijena transportiraju se prema ostalim dijelovima biljke i iniciraju molekularne i biokemijske procese koji konačno

ublažavaju morfološke odgovore i omogućuju biljkama da se nose s uvjetima suše (Pavlović I. i sur., 2018). Zatvaranje puči i inhibicija rasta su procesi koji se tijekom suše najranije aktiviraju kako bi zaštitili biljku od daljnjeg gubitka vode. Zatvaranjem puči zaustavlja se izmjena plinova, što direktno utječe na fotosintetske procese u kloroplastima (Antunović, 2013). Kao i drugi abiotički stresovi, tako i suša dovodi do oksidativnih oštećenja u biljnim stanicama. Glavni izvor reaktivnih kisikovih jedinki (engl. *reactive oxygen species* - ROS) u biljnim tkivima su reakcijska središta fotosustava I i II (PSI i PSII), točnije prijenos elektrona na molekulu kisika, odnosno redukcija kisika tijekom procesa fotosinteze. Iako je kisik nužan za respiraciju i aerobno stvaranje energije (ATP) te služi kao krajnji akceptor elektrona, ujedno je i toksičan za organizme ukoliko dođe do pomaka ravnoteže u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama. Pomicanje ravnoteže prema oksidaciji dovodi do prekomjernog stvaranja ROS-a (Hancock i sur., 2002; Mittler, 2002).

Provedenim eksperimentom ispitivala se otpornost tri različito osjetljiva kultivara iz porodice kupusnjača (Brassicaceae) na sušu. Biljne vrste iz porodice Brassicaceae (kupusnjače) predstavljaju važne povrtne kulture čija je proizvodnja široko rasprostranjena u cijelom svijetu. Porodica obuhvaća veliki broj vrsta koje imaju značajnu ulogu u stočnoj i ljudskoj prehrani. Jedan od najznačajnijih rodova porodice kupusnjača je rod *Brassica* koji obuhvaća poljoprivredno važne kultivare poput repice, gorušice, kupusa i brokule. Kineski kupus potječe iz Kine, a danas se uzgaja gotovo u cijelom svijetu. Kineski kupus obiluje šećerima, bjelančevinama i vitaminima te je prva komercijalno važna kupusnjača čiji je genom sekvenciran. Bijeli kupus najzastupljeniji je kultivar u Republici Hrvatskoj. Ova vrsta obiluje nutrijentima i fitokemikalijama koje imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Bogata je glukozinolatima koji su specifični metaboliti za porodicu kupusnjača, mineralima, vitaminima, polifenolima i karotenoidima. U Hrvatskoj je zastupljena i raštika. Raštika nije komercijalna vrsta već se uzgaja u domaćinstvima i reproducira sjemenom vlastitog uzgoja, a to uzrokuje velike biološke varijabilnosti. Bogata je slobodnim šećerima, organskim kiselinama, lipidima i mineralima (Pavlović, 2017). Ova tri kultivara uzgajana su u kontroliranim uvjetima te nakon toga podvrgnuta suši tako da biljke nisu zalijevane sve dok nisu postigle relativni sadržaj vode u listu od otprilike 45%. Kod kineskog kupusa do tog smanjenja je došlo nakon otprilike 7 dana, kod bijelog kupusa nakon otprilike 10 dana, a kod raštike nakon 15 dana. Dok je osjetljiv kineski kupus pokazao jasne znakove dehidracije, bijeli kupus i raštika su izgledali zdravije. Zapaženi su samo blagi znakovi dehidracije kod bijelog kupusa (Pavlović i sur., 2018). Nakon toga,

biljke su bile obilno zalijane i nakon 24 sata ponovo je izmjeren relativni sadržaj vode koji je pokazao porast na 86% kod kineskog kupusa, 80% kod bijelog kupusa te 86% kod raštike.

Protein D1 jedan je od ključnih proteina fotosintetskog aparata. Nalazi se u reakcijskom središtu fotosustava II te je iznimno osjetljiv na sve vrste stresa. Formirane reaktivne kisikove jedinke, a naročito singletni kisik $^1\text{O}_2$, nastao uslijed izlaganja suši posebno utječe na degradaciju proteina, odnosno dovodi do povećane fosforilacije što izaziva razgradnje proteina. Degradirani D1 protein zamjenjuje se novosintetiziranim proteinom. Brza ponovna izgradnja D1 proteina održava fotosustav II funkcionalnim. Kad se uslijed izlaganja stresu ekspresija i degradacija proteina više ne mogu kompenzirati dolazi do oštećenja fotosustava II i smanjenja stope fotosinteze (Aro, 1993). Prema tome, na temelju promjene akumulacije D1 proteina u listovima kupusnjača tretiranih sušom i nakon oporavka možemo dobiti uvid u funkcioniranje ovih kultivara u stresnim uvjetima. Raštika je pokazala smanjenje akumulacije ovog proteina u suši, dok je nakon oporavka ta količina bila još i manja. Neka od dosadašnjih istraživanja dokazala su da raštika pokazuje najmanju osjetljivost na sušu, dok je najosjetljivija vrsta kineski kupus (Pavlović i sur., 2018). obzirom na to, bilo je za očekivati da će se i količina D1 proteina nakon zalijevanja povećati kod raštike budući da je došlo do povećanja relativnog sadržaja vode kod ovog kultivara. Prema tome, možemo pretpostaviti da je tijekom provođenja eksperimenta došlo do raspadanja proteina te rezultati za raštiku nisu reprezentativni. S druge strane, promjene u akumulaciji D1 proteina kod kineskog kupusa ukazale da je suša izazvala degradaciju D1 proteina i to u tolikoj mjeri da se nije uspio u potpunosti nadomjestiti ponovnom sintezom nakon oporavka. Količina akumuliranog D1 proteina u uzorcima bijelog kupusa ukazala je da je sušni stres kod ove vrste izazvao degradaciju D1 proteina, ali se protein uspješno nadomjestio ponovnom sintezom nakon zalijevanja. Optimalna količina ispitivanog D1 proteina koja je upotrebljavana u istraživanju određena je pomoću ekspresije tubulina. Tubulin je jedan od *housekeeping* proteina čija se ekspresija ne mijenja pod utjecajem stresa (Glumac, 2018). Optimiziranjem količine *housekeeping* proteina omogućilo nam je da u uzorcima za elektroforezu imamo jednake količine proteina. Na temelju akumulacije D1 proteina kod kineskog i bijelog kupusa može se pretpostaviti da je bijeli kupus pokazuje bržu sposobnost oporavka nakon zalijevanja u odnosu na kineski kupus.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da je nakon tretmana sušom kod svih ispitivanih kultivara, kineskog kupusa (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*), bijelog kupusa (*B. oleracea* var. *capitata*) te raštike (*B. oleracea* var. *acephala*) došlo do smanjenja akumulacije D1 proteina. Nakon zalijevanja i 24-satnog oporavka, raštika je pokazala dodatno smanjenje akumulacije ovog proteina. Kod kineskog kupusa degradirani D1 protein se nakon oporavka gotovo u potpunosti nadomjestio novosintetiziranim proteinom dok je kod bijelog kupusa količina akumuliranog D1 proteina bila jednaka onoj u kontroli. Ovi rezultati ukazuju da kineski i bijeli kupus imaju učinkovitiji sustav promjene (eng. *turnover*) D1 proteina u odnosu na raštiku.

7. LITERATURA

- Antunović J. (2013) Utjecaj ekstremnog zasušivanja na biokemijske i fiziološke značajke klijanaca ječma (*Hordeum vulgare* L.) uzgojenih pri slabom i jakom osvjetljenju. Doktorski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti, Osijek.
- Aro, E. M., Virgin, I., Andersson, B. (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta -Bioenergetics*, 1143: 113-134.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J. (1996) *Protein Methods*, 2nd ed., Wiley-Liss, Inc., New York.
- Böttcher B, Graber P.(2008) The Structure of the H⁺-ATP synthase from Chloroplasts.: Fromme P. (ur) *Photosynthetic protein complexes*. Weinheim, Germany: Wiley - Blackwell Verlag GmbH&Co, str.201-216.
- Deutscher, M. P. (1990) *Guide to protein purification* (Vol. 182). Gulf Professional Publishing, Cambridge, Velika Britanija.
- Glumac, I. (2018) Određivanje utjecaja farnezola i nerolidola na p38 mapk stanični signalni put. Diplomski rad. Sveučilište u Splitu kemijsko-tehnološki fakultet, Split.
- Hancock J.T., Desikan R., Clarke A., Hurst RD, Neill SJ.(2002) Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Plant Physiol Bioch* 40: 611-617.
- He WZ, Malkin R. (1998) *Photosystems I and II.*: Raghavendra AS. (ur) *Photosynthesis*: Cambridge University Press, Cambridge, Velika Britanija, str.29-43.
- Kolarić, D., (2016) Utjecaj nepovoljnih vremenskih prilika na prinos poljoprivrednih kultura. Završni rad. Sveučilište J. Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
- Krsnik-Rasol, M., Balen, B., Maček, B., Pavoković, D. (2004) Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Prirodoslovno - matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227: 680-685.

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

Mlinarić, S. (2013) Fotosintetska učinkovitost i antioksidativni odgovor mladih i razvijenih listova smokve (*Ficus carica* L.) u uvjetima svjetlosnog stresa. Doktorski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij molekularne bioznanosti, Osijek.

Pavlović I. (2017) Uloga auksina i hormona stresa u odgovoru kupusnjača (Brassicaceae) na povišeni salinitet. Doktorska disertacija. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij molekularne bioznanosti, Osijek.

Pavlović, I., Petřík, I., Tarkowská, D., Lepeduš, H., Vujčić Bok, V., Radić Brkanac, S., Salopek-Sondi, B. (2018) Correlations between phytohormones and drought tolerance in selected Brassica crops: Chinese cabbage, white cabbage and kale. International journal of molecular sciences, Zagreb.

Taiz, L., Zeiger, E. (2002) Plant Physiology. 3rd ed., Sinauer Associates, Sunderland,

Toth SZ. (2006) Analysis and application of the fast Chl a fluorescence (OJIP) transient complemented with simultaneous 820 nm transmission measurements. Doktorski rad, Université de Genève, Genève.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, str.4350-4354.

Whitmarsh J. (1998) Electron transport and energy transduction. u: Raghavendra AS. (ur) Photosynthesis: A comprehensive treatise. Cambridge University Press, Cambridge, str. 87-110.

WEB 1: <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-11/CB11.html>