

Usporedba metoda za određivanje ekspresije fotosintetskih proteina

Dumančić, Tessa

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:586491>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Tessa Dumančić

**USPOREDBA METODA ZA ODREĐIVANJE
EKSPRESIJE FOTOSINTETSKIH PROTEINA**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Tessa Dumančić

**USPOREDBA METODA ZA ODREĐIVANJE
EKSPRESIJE FOTOSINTETSKIH PROTEINA**

Diplomski rad

Mentorica: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Komentorica: doc. dr. sc. Lidija Begović

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

Usporedba metoda za određivanje ekspresije fotosintetskih proteina

Tessa Dumančić

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju i Odjelu za biologiju, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Mentorica: doc. dr. sc. Martina Šrajter Gajdošik

Komentorica: doc. dr. sc. Lidija Begović

Sažetak

Fotosinteza je biološki važan proces koji se odvija u kloroplastima. Naizgled jednostavan proces u kojem dolazi do stvaranja ugljikohidrata i kisika iz vode i ugljikova dioksida, zapravo je niz oksidacijsko-redukcijskih reakcija potpomognutih svjetlošću za čije su uspješno odvijanje zaslužni brojni proteinski kompleksi. Jedan od najvažnijih proteinskih kompleksa je fotosustav II (PSII), koji je i mjesto inicijacije fotosintetskih reakcija na svjetlu. Njegove najvažnije komponente su antena kompleks i reakcijsko središte (građeno od D1 i D2 proteina) te kompleks za razvijanje kisika (OEC) na čijoj vanjskoj strani se nalaze tri male proteinske podjedinice: PsbO, PsbP i PsbQ. U reakcijama neovisnim o svjetlosti (Calvinov ciklus) nastaju organske molekule iz CO₂, a prvi korak (fiksaciju CO₂) katalizira enzim Rubisco. Cilj našeg istraživanja bio je usporediti metode za određivanje ekspresije fotosintetskih proteina: D1, PsbO podjedinice OEC-a i velike podjedinice Rubisca.

Proteini su izdvojeni iz biljnog materijala pomoću dvije različite metode: metodom izolacije ukupnih proteina i metodom izolacije proteina iz kloroplasta. Odvojeni su prema molekularnoj masi (SDS-PAGE) i detektirani imunodetekcijom (Western blot). Proteinske vrpce dobivene su na filmu pomoću metode kemiluminiscencije. Usporedbom proteinskih vrpca dviju metoda, određena je pogodnija metoda za određivanje ekspresije pojedinih fotosintetskih proteina.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: elektroforeza / fotosinteza / fotosintetski proteini / imunodetekcija

Diplomski rad obuhvaća: 34 stranice, 14 slika, 2 tablice, 40 literaturna navoda i 2 priloga

Stručno povjerenstvo:

1. doc. dr. sc. Ana Amić, predsjednica
2. doc. dr. sc. Martina Šrajter Gajdošik, mentorica i članica
3. doc. dr. sc. Lidija Begović, komentorica i članica
4. doc. dr. sc. Selma Mlinarić, zamjena člana

Rad prihvaćen: 19.9.2019.

Rad je pohranjen : Knjižnica Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

Comparison of methods for determining the expression of photosynthetic proteins
Tessa Dumančić

Thesis completed at: Department of Chemistry and Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD

Co-mentor: Assist. Prof. Lidija Begović, PhD

Abstract

Photosynthesis is a biologically important process in plants that takes place in chloroplasts. Even though it seems like a simple process which produces carbohydrates and oxygen from water and carbon dioxide, it is actually a series of light-driven oxidation-reduction reactions in which a large number of protein complexes take part. One of the most important protein complexes is photosystem II (PSII), where initiation of light-dependent photosynthetic reactions happens. The most important components of PSII are: antenna complex, the reaction center (made of D1 and D2 proteins) and oxygen evolving complex (OEC) which contains three small extrinsic protein subunits: PsbO, PsbP and PsbQ. In dark reactions (the Calvin cycle), organic molecules are formed from CO₂ and the first step (CO₂ fixation) is catalyzed by enzyme Rubisco. The aim of this work was to compare methods for determining the expression of photosynthetic proteins: D1, PsbO subunit of OEC and the large subunit of Rubisco.

Proteins were isolated from the plant tissue using two methods: isolation of the total soluble proteins and isolation of proteins from chloroplasts. Isolated proteins were separated by molecular mass using electrophoresis (SDS-PAGE) and detected by Western blot method. Protein bands were detected on film using chemiluminescence. Comparison of protein bands obtained by two methods, the more suitable method for detection of photosynthetic proteins expression of was determined.

Original in: Croatian

Key words: electrophoresis / photosynthesis / photosynthetic proteins / immunodetection

Thesis includes: 34 pages, 14 figures, 2 tables, 40 references and 2 appendices

Reviewers:

1. Assoc. Prof. Ana Amić, PhD; chair
2. Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD; supervisor and member
3. Assist. Prof. Lidija Begović, PhD; co-mentor and member
4. Assist. Prof. Selma Mlinarić, PhD; substitute member

Thesis accepted: 19.9.2019.

Thesis deposited in: Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Fotosinteza	2
2.3. Građa fotosustava	4
2.3.1. Fotosustav II	5
2.4. Kompleks za razvijanje kisika (OEC)	8
2.5. Ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza	9
2.6. Izolacija i detekcija biljnih proteina	9
2.7. Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)	10
2.8. Imunodetekcija (Western blot)	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Biljni materijal	12
3.1.2. Kemikalije	12
3.2. Metode	13
3.2.1. Izolacija kloroplasta	13
3.2.2. Izolacija ukupnih proteina	14
3.2.3. Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)	15
3.2.4. Western blot	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Vizualizacija proteinskih vrpca bojom Coomassie briljant plavo	20
4.2. Mjerenje koncentracije klorofila	21
4.2. Detekcija D1 proteina	22
4.3. Tubulin	24
4.4. OEC	24
4.5. Rubisco	26
5. ZAKLJUČAK	27
6. LITERATURA	28
7. DODACI	31
7.1. Popis kratica	31
7.2. Životopis	33

1. UVOD

Fotosinteza je nedvojbeno najznačajniji biološki proces na Zemlji. Potrošnjom ugljikovog dioksida i istovremenim stvaranjem kisika omogućila je život na Zemlji kakav danas poznajemo. Direktno ili indirektno, fotosintezom dobivamo kisik, hranu, energiju i druge tvari neophodne za život. Upravo iz ovih razloga znanstveno istraživanje fotosinteze i spoznavanje novih činjenica o samom procesu je prijeko potrebno [1].

Fotosinteza se u zelenim biljkama odvija u kloroplastima, staničnim organelima u kojima se nalaze četiri glavna proteinska kompleksa. Jedan od četiri kompleksa je fotosustav II na kojemu se odvija proces oksidacije vode, odnosno na kojem nastaje molekularni kisik. Fotosustav II je po svojoj građi dimer čije monomere čini više od 20 različitih proteinskih podjedinica te više od 50 kofaktora [2].

U fokusu ovog diplomskog rada su D1 protein te kompleks za razvijanje kisika (engl. *oxygen-evolving complex*; OEC) koji su dio fotosustava II te ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze (engl. *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*; Rubisco), enzim značajan za fotosintetske reakcije u tami [3].

Cilj našeg istraživanja bio je usporediti metode za određivanje ekspresije fotosintetskih proteina: D1, OEC- a i Rubisca. Pri tome su proteini izdvojeni iz biljnog materijala pomoću dvije različite metode: metodom izolacije ukupnih proteina i metodom izolacije proteina iz kloroplasta.

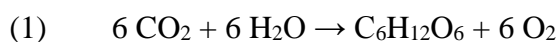
Proteini su odvojeni prema veličini denaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE) i detektirani metodom imunodetekcije (Western blot) te vizualizirati na koristeći kemiluminiscenciju.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Fotosinteza

Fotosinteza je biološki važan proces koji se odvija u kloroplastima biljnih stanica, a prilikom kojeg dolazi do stvaranja ugljikohidrata i molekuskog kisika iz vode i ugljikova dioksida. Proces fotosinteze odvija se u eukariotima (zelene biljke, alge) i prokariotima (cijanobakterije) [4].

Iako se sumarno proces fotosinteze većinom prikazuje reakcijom (1):



njezin mehanizam je vrlo složen i sastoji se od niza oksidacijsko-redukcijskih reakcija potpomognutih svjetlošću u kojem međudjeluju brojni proteini, proteinski kompleksi te druge molekule. Ugljikohidrati, koji nastaju kao produkti fotosinteze, su najčešće škrob i saharoza. Za „hvatanje“ fotona svjetlosti, zaslužni su fotosintetski pigmenti, većinom klorofili, a uloga svjetlosti u procesu fotosinteze je pobuđivanje elektrona na više energijske razine. Visokoenergijski elektroni se transportiraju između dva fotosustava i kao rezultat tog prijenosa nastaje redukcijska snaga potrebna za sintezu adenzin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*; ATP) [5].

Općenito, fotosintetske reakcije možemo podijeliti na dva tipa procesa:

a) Primarni procesi

- Za primarne procese je nužna Sunčeva svjetlost, a odvijaju se na tilakoidnim membranama kloroplasta. Svjetlosna energija se pohranjuje u kemijskim vezama ATP i nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH), fotokemijskom oksidacijom molekula vode razvija se molekulski kisik [6].

b) Sekundarni procesi

- Sekundarni procesi se nazivaju još i reakcije ne ovisne o svjetlosti ili Calvinov ciklus, a odvijaju se u stromi kloroplasta. To su reakcije asimilacije (fiksacije) ugljika u

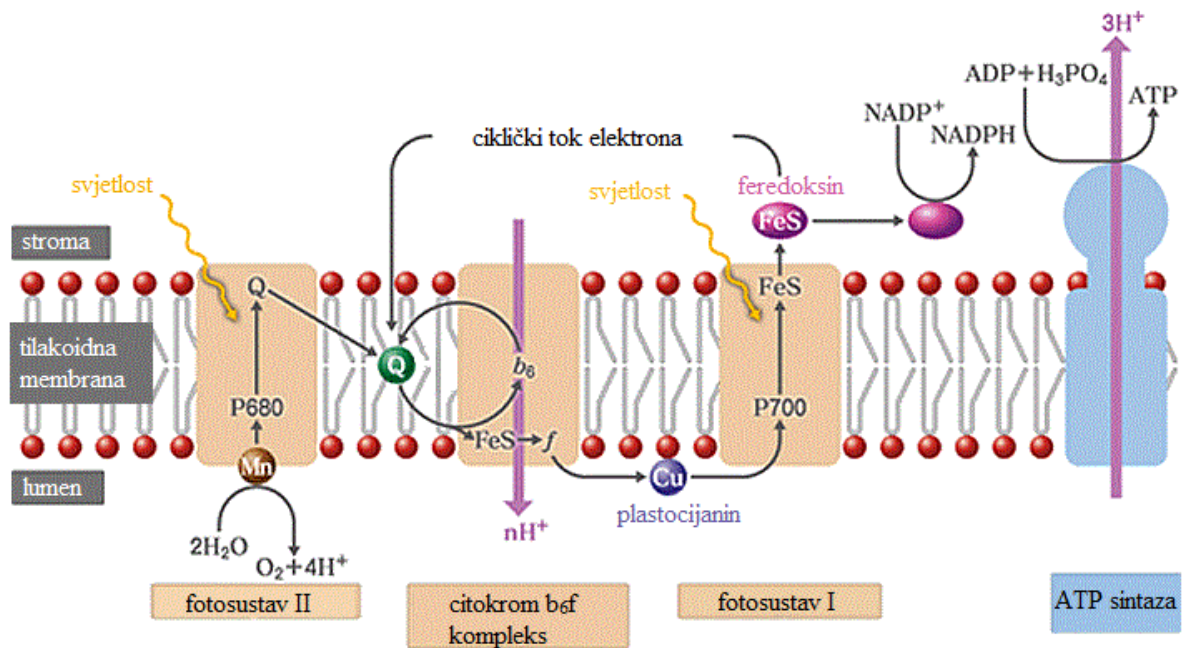
kojima se nastali ATP i NADPH koriste za sintezu organskih molekula iz CO₂. Reakcije asimilacije ugljika nisu ovisne o svjetlosti, ali su ovisne o produktima nastalim u reakcijama ovisnim o svjetlosti [5].

2.2. Fotosintetske reakcije na svjetlu

Fotosintetske reakcije na svjetlu odvijaju se na tilakoidnim membranama gdje se nalaze tri proteinska kompleksa odgovorna za tok elektrona od molekule vode do NADP⁺: fotosustav I (engl. *photosystem I*; PSI), fotosustav II (engl. *photosystem II*; PSII) te citokrom b₆f. Tok elektrona posredovan je mobilnim nosačima (plastokinonom i plastocijaninom), a on omogućava stvaranje transmembranskog protonskog gradijenta preko tilakoidne membrane koji je neophodan za sintezu ATP-a djelovanjem kompleksa ATP-sintaze (*Slika 1.*) [7].

Većinu fotosintetskih proteinskih kompleksa čini više podjedinica koje mogu biti periferne ili integrirane u membranu. Također, sadrže i velik broj različitih kofaktora, molekula pigmenata, hema, Fe-S klastera i metalnih iona koji se vežu na ove komplekse kovalentnim ili nekovalentnim vezama [4].

PSI i PSII sadrže klorofile i druge pigmente koji prikupljaju svjetlosnu energiju i prenose je do reakcijskih središta. Energija zarobljena u reakcijskom središtu inducira pobuđivanje posebnog klorofilnog para koji inicira premještanje elektrona preko membrane kroz niz različitih kofaktora. Voda, koja je elektron donor u ovom procesu, se oksidira do O₂ i 4 H⁺ djelovanjem PSII. Elektroni dobiveni iz vode putuju pomoću molekula kinona i citokrom b₆f kompleksa do plastocijanina, malog, topljivog proteina koji sadrži Cu²⁺. Sunčeva energija koju apsorbira PSI, inducira premještanje elektrona od plastocijanina s unutrašnje strane membrane (lumenska strana) do feredoksina na suprotnoj strani membrane (stromalna strana). Reducirani feredoksin se koristi za sintezu NADPH. Razdvajanje naboja u PSI i PSII, zajedno s prijenosom elektrona preko citokrom b₆f kompleksa, dovodi do stvaranja elektrokemijskog potencijala koji pokreće sintezu ATP-a pomoću četvrtog kompleksa, ATP-sintaze [8].



Slika 1. Shematski prikaz proteinskih kompleksa koji sudjeluju u fotosintezi i tok reakcija, preuzeto i prilagođeno prema [9].

2.3. Građa fotosustava

Fotosustavi su membranski kompleksi građeni od dva dijela: reakcijskog središta i antena kompleksa. Reakcijsko središte se sastoji od integriranih membranskih proteina i molekula klorofila, a njegova uloga je primanje energije od antena kompleksa i pretvorba te energije u kemijsku. Antena kompleks se sastoji od kompleksa za hvatanje svjetlosti (engl. *light harvesting complex*; LHC) i središnjeg kompleksa (engl. *core-complex*). LHC ima ulogu prikupljanja fotona svjetlosti, dok središnji kompleks ima ulogu prijenosa fotona do reakcijskog središta i integrirani je dio reakcijskog središta. Uz PS II vezan je kompleks za hvatanje svjetlosti (LHCII) koji na sebe veže klorofile (*a* i *b*) te ksantofile, dok je uz PS I vezan LHCI koji veže molekule klorofila (*a* i *b*) te karotenoide [10].

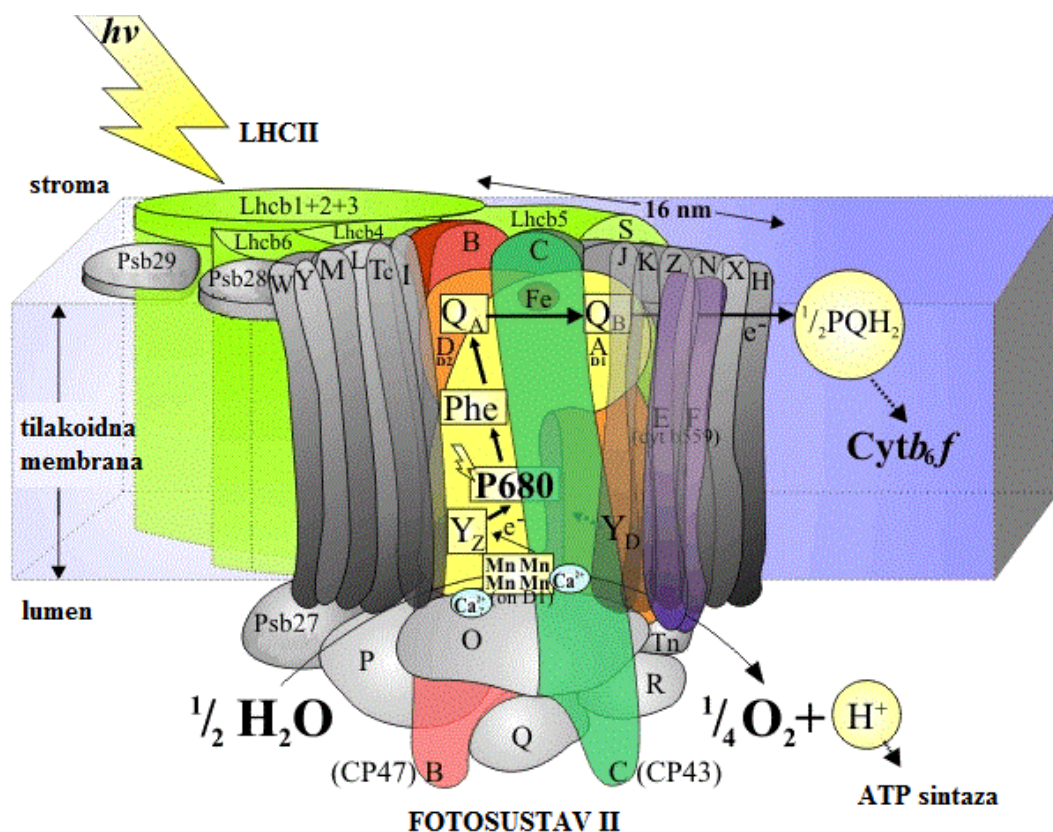
2.3.1. Fotosustav II

Ključne komponentne PSII kompleksa (*Slika 2.*) su: antena kompleks koji sadrži klorofil *a*, klorofil *b* i ksantofile, a koji su zaduženi za apsorpciju svjetlosti; reakcijsko središte P680 u kojem dolazi do inicijacije reakcija prijenosa elektrona; tetranuklearno mangansko središte koje katalizira oksidaciju vode; te vezni džep u kojem se odvija redukcija plastokinona. PSII je glavno mjesto stvaranja kisika kod svih fotosintetskih organizama, uključujući biljke, alge i cijanobakterije [3].

Prema dosadašnjim istraživanjima, poznato je otprilike 30 gena koji kodiraju proteine za PSII i nazvani su *psbA-psbZ* (prema „fotosustav b“, tj. PSII), a kodiraju istoimene proteinske podjedinice koje vidimo na *Slici 2.* označene slovima A-Z. Svaka proteinska podjedinica ima svoju ulogu u PSII i procesu fotosinteze, a za većinu podjedinica je ta uloga poznata [11].

Reakcijsko središte PSII građeno je od polipeptida D1 (PsbA) i D2 (PsbD) koji se vežu na klorofil *a*, β -karoten i željezo. Klorofili sudjeluju u prijenosu energije s proksimalnih antena kompleksa CP43 (PsbC) i CP47 (PsbB) do reakcijskog središta. Citokrom b559 (građen od proteina *psbE* i *psbF*) je najvjerojatnije povezan s mehanizmima koji čuvaju PSII od fotooštećenja [12].

Osim što sadržava reakcijsko središte i antena kompleks, za fotosustav II je karakterističan i kompleks OEC koji katalizira oksidaciju vode kako bi se osigurali protoni potrebni za PSI. OEC je građen od vanjskih polipeptida OEE1 (PsbO), OEE2 (PsbP) i OEE3 (PsbQ), kao i od tetranuklearnog Mn središta te jednog kalcijevog i jednog kloridnog iona. Osim navedenih gradivnih jedinica, PSII sadrži i desetak malih (< 10 kDa) hidrofobnih peptida, od kojih mnogi sadrže transmembranske uzvojnice potrebne za spajanje, stabilizaciju i dimerizaciju PSII kompleksa, kao i za olakšavanje brzih konformacijskih promjena nužnih za normalnu fotosintetsku aktivnost. Neki od malih polipeptida, kao što su *PsbH* i *PsbT*, uključeni su u fotoprotekciju, tj. imaju ulogu zaštite od štetnih učinaka reaktivnih kisikovih vrsta nastalih tijekom procesa fotosinteze [13].



Slika 2. Shematski prikaz fotosustava II, preuzeto i prilagođeno prema [14].

2.3.1.1. D1 protein

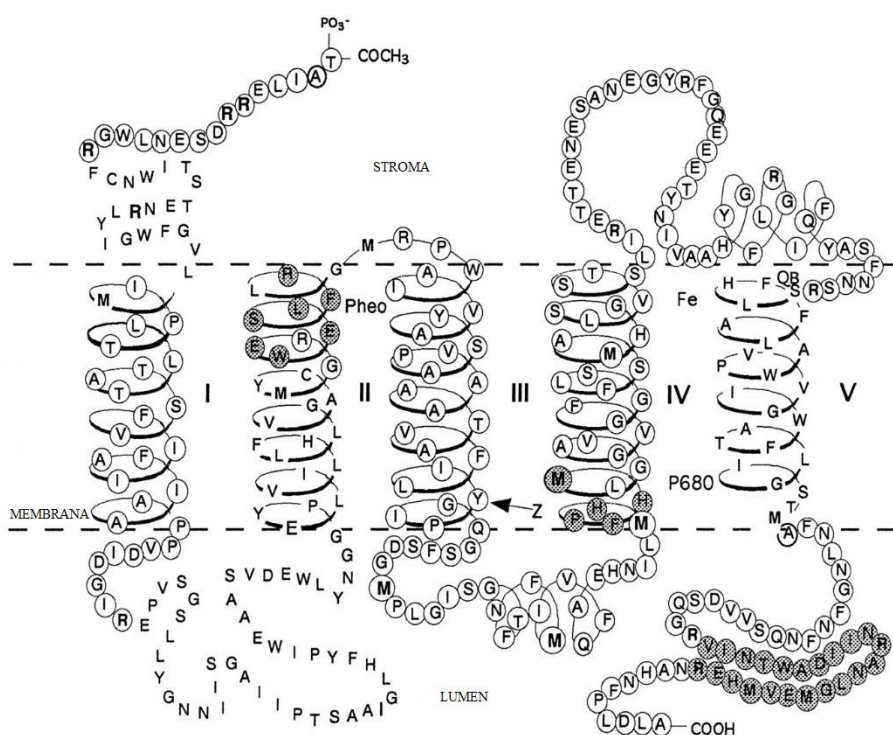
D1 je proteinska podjedinica koja zajedno s D2 podjedinicom gradi reakcijsko središte PSII. Kodira ju gen *PsbA* koji je smješten u genomu kloroplasta. Molekulska masa D1 je približno 32 kDa, ovisno o biljnoj vrsti. Pretpostavlja se da u svojoj strukturi sadrži 5 transmembranskih α -uzvojnica (**Slika 3.**) [11].

Za D1 protein je karakteristično:

- Veže većinu kofaktora uključenih u prijenos elektrona posredovan PSII [15].
- Ima veću sposobnost rotiranja, odnosno savijanja svog polipeptidnog lanca od bilo kojeg drugog proteina na tilakoidnoj membrani. Ova sposobnost je povezana s činjenicom da je PSII podložan fotoinduciranim oštećenjima. Takvo oštećenje može dovesti do fotoinhibicije i smanjenja fotosintetske učinkovitosti [16].

Kod viših biljaka, N-terminalni kraj oba proteina (D1 i D2), koji je okrenut prema stromi, može biti reverzibilno fosforiliran. Na C-terminalnom kraju D1 dolazi do proteolitičkog cijepanja koje je nužno za formiranje tetranuklearnog Mn središta koje uključuje vezanje na C-terminalni alanin D1 podjedinice [17].

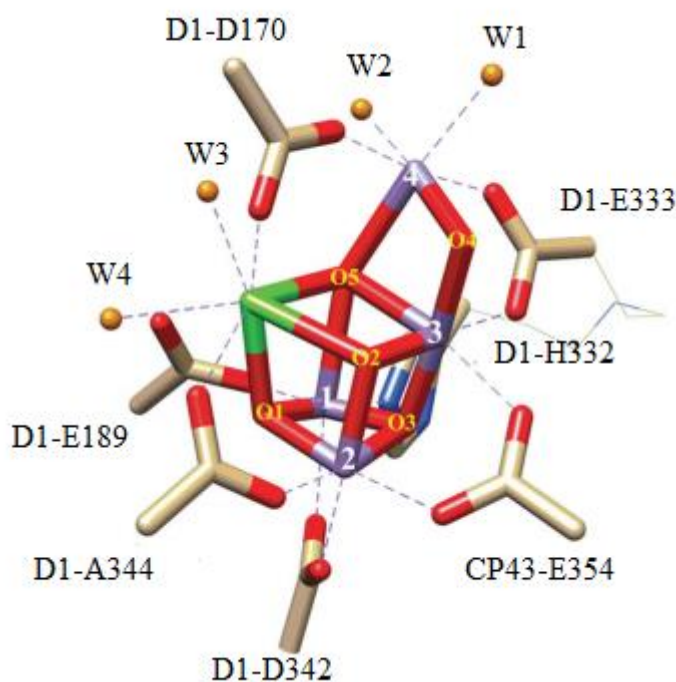
Osim što se veže na Mn klaster, D1/D2 heterodimer se veže i na velik broj kofaktora, uključujući: dvije molekule feofitina, nehemsko željezo i dvije molekule kinona (Q_a (D2) i Q_b (D1)). Nakon pobuđivanja, elektroni se prenose s primarnog donora (klorofil *a*), pomoću intermedijarnog akceptora feofitina, na primarni kinon Q_a, a zatim na sekundarni Q_b. Redoks-aktivan kraj D1 proteina (oksidirani tirozin) reducira P680 odvlačeći elektrone s Mn središta, što dovodi do oduzimanja elektrona s molekule vode i formiranja molekuskog kisika [18].



Slika 3. Primarna struktura D1 proteina dobivena metodom masene spektrometrije, preuzeto i prilagođeno prema [19].

2.4. Kompleks za razvijanje kisika (OEC)

Prilikom fotosintetskih reakcija na svjetlu, oksidacija vode, odnosno formiranje molekuskog kisika, događa se na kompleksu za razvijanje kisika, OEC-u. OEC sadrži Mn_4CaO_5 klaster kao katalitički centar, a cijepanje molekula vode se odvija u ciklusu od pet uzastopnih faza, u kojima OEC prolazi pet redoks stanja nazvanih od S_0 do S_4 . S_0 je najviše reducirano stanje, a S_4 najviše oksidirano stanje. Novija istraživanja su pokazala da Mn_4CaO_5 klaster ima konformaciju „iskrivljenog“ stolca s tri Mn, jednim Ca i četiri atoma kisika koji čine asimetričnu strukturu nalik kubanu, koja čini bazu stolca, dok četvrti Mn, zajedno s petim atomom kisika formira naslon stolca (*Slika 4.*) [20].



Slika 4. Prikaz strukture OEC-a s njegovim ligandima, preuzeto i prilagođeno prema [21]. Mn ioni su označeni ljubičastom bojom, Ca zelenom, a molekule vode narančastom.

S Mn središtem povezuju se i kloridni ioni. Istraživanja su pokazala da u svakom PSII monomeru postoje dva mjesta za vezanje Cl^- koja se nalaze na suprotnim stranama, ali na jednakoj udaljenosti od Mn središta. Prvo mjesto se nalazi u blizini glavnog lanca D1-Glu-333, a drugo mjesto u blizini glavnog lanca CP43-Glu-354. Kao što je prikazano na *Slici*

4., ti su aminokiselinski ostatci direktno koordinirani s Mn središtem. Također, prvo mjesto vezanja nalazi se na ulazu u kanal za izlazak protona. Prema tome, pretpostavlja se da je uloga kloridnih iona održavanje koordinativne strukture Mn_4CaO_5 , što je nužno za normalnu funkciju OEC-a [22].

OEC također grade i manje proteinske podjedinice koje se nalaze na „vanjskoj“ strani kompleksa, a kod viših biljaka to su: PsbO (33 kDa), PsbP (23 kDa) i PsbQ (16 kDa). U ovom radu određivat će se ekspresija PsbO proteinske podjedinice OEC-a [23].

2.5. Ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza

Rubisco je enzim koji sudjeluje u fotosintetskim reakcijama u tami. Rubisco katalizira prvi korak u procesu fiksacije CO_2 , karboksilaciju ribuloza-1,5-bisfosfata s ugljikovim dioksidom pri čemu nastaju dvije molekule 3-fosfoglicerata, međuproducta važnih metaboličkih puteva: glikolize i glukoneogeneze. Kao rezultat ovog procesa nastaju energijom bogate molekule, ugljikohidrati (šećeri). Ponekad Rubisco umjesto s CO_2 reagira s O_2 (reakcija oksigenacije) pri čemu nastaje hidroksiperoksidni međuproduct koji se raspada na 3-fosfoglicerat i fosfoglikolat. Rubisco je najzastupljeniji topljivi protein u kloroplastima i čini više od 50 % ukupnih proteina u listovima biljaka. Njegova molekulska masa je ~560 kDa i sastoji se od osam malih (~14 kDa svaka) i osam velikih (~56 kDa svaka) podjedinica organiziranih u osam heterodimera. U ovom radu određivat će se ekspresija velike podjedinice Rubisca [24].

2.6. Izolacija i detekcija biljnih proteina

Najveća prepreka pri izolaciji biljnih proteina je stanična stijenka koja štiti biljnu stanicu i nju je potrebno mehanički razoriti. Također, prepreka pri izolaciji biljnih proteina su i proteaze. Proteaze su prirodni regulatorni enzimi koji cijepaju peptidne veze između aminokiselina u polipeptidnom lancu te upravo zbog toga mogu otežati karakterizaciju i analizu proteina. Klasificiraju se u šest velikih skupina prema mjestima na kojima cijepaju peptidne veze, a to su: serinske, treoninske, cisteinske i aspartatne proteaze te metaloproteaze

i proteaze glutaminske kiseline. Kako bi se inhibirala aktivnost proteaza koriste se ili inhibitori za specifične proteaze ili smjese proteaznih inhibitora [25].

Velik problem predstavljaju i sekundarni metaboliti (građeni najčešće od fenola) koji mogu imati velik utjecaj na izolaciju i odvajanje proteina iz biljnog tkiva. Ukoliko se sekundarni metaboliti uklanjaju naknadno, najčešće se koristi ekstrakcijski pufer koji u svom sastavu sadrži etilendiamintetraoctenu kiselinu (EDTA), ditiotreitol (DTT) ili β -merkaptotanol, različite inhibitore proteaza te polivinilpolipirolidon (PVPP). Različita biljna tkiva, kao što su lišće, korijenje, sjeme, plodovi, kora ili cvijeće te biljna tkiva različitih biljnih vrsta, predstavljaju jedinstvene izazove za znanstvenike prilikom ekstrakcije njihovih proteina. Budući da je velika razlika u sastavu među različitim dijelovima biljke, tako ne postoji ni univerzalni protokol učinkovit za svako biljno tkivo niti za svaki protein. Neke od ekstrakcijskih metoda već su spomenute, no svakako ih je potrebno modificirati, ovisno o vrsti tkiva i željenih proteina [26].

2.7. Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE) je biokemijska metoda koja omogućava odvajanje proteina na temelju njihove veličine. Ova metoda koristi natrijev-dodecilsulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate*; SDS), deterdžent koji u ovakvom sustavu služi kao agens za denaturaciju sekundarnih i tercijarnih struktura (koje nisu povezane disulfidnim vezama) u proteinima te proteinima daje negativan naboj koji korelira s njihovom duljinom, što u konačnici omogućava procjenu molekulske mase pojedinog proteina. Za izradu ovog diplomskog rada korišten je SDS-PAGE diskontinuiranim sustav s gelovima različitih pH vrijednosti te koncentracijama akrilamida. Sabijajući gel manje je gustoće od razdvajajućeg gela te omogućava proteinima brže kretanje kroz gel i sabijanje proteina u usku liniju prije nego što prijeđu u razdvajajući gel u kojem se odvija razdvajanje proteina na temelju njihove molekulske mase. Nakon odvajanja proteina elektroforetski, proteinske vrpce moguće je vizualizirati bojanjem ili detektirati imunološkim metodama (Western blot) [27].

2.8. Imunodetekcija (Western blot)

Western blot metoda omogućava identifikaciju specifičnih proteina iz kompleksnih smjesa proteina ekstrahiranih iz tkiva i stanica. Sastoji se od nekoliko koraka: odvajanja proteina na temelju mase (SDS-PAGE), prijenosa na čvrstu podlogu (membranu) te detektiranja željenog proteina uz korištenje odgovarajućeg primarnog i sekundarnog antitijela za vizualizaciju proteina [28].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijal

Za istraživanje u ovom radu korišteni su klijanci ječma (*Hordeum vulgare* L.) sorte Panonac, dva hibrida kukuruza (*Zea mays* L.) OS 515 i OS 2938 i dvije sorte Maksimirski krupnozrni zuban i Žuti osmak stari osam dana. Biljni materijal uzgajan je na mješavini zemlje i vermikulita (3:1) u uzgojnoj komori pri temperaturi 22 °C, intenzitetu svjetlosti oko 70 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i fotoperiodi od 16/8 sati (dan/noć).

3.1.2. Kemikalije

Za izradu ovog diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- Sorbitol, $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ (Carl Roth GmbH & Co)
- Tris(hidroksimetil) aminometan, TRIS, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (Sigma)
- Klorovodična kiselina, HCl (Kemika)
- Etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ (Carl Roth GmbH & Co.)
- Natrijev karbonat, Na_2CO_3 (Kemika)
- Goveđi serumski albumin, BSA (VWR Amresco LLC)
- β -merkaptoetanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ (Sigma)
- Aceton, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (BDH Prolabo)
- Natrijev dodecil-sulfat, SDS, $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ (Carl Roth GmbH & Co.)
- Glicerol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ (Kemika)
- Ditiotreitol, DTT, $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ (VWR)
- Tekući dušik (Messer)
- Akrilamid, $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$ (Carl Roth GmbH & Co.)
- *N,N'*-metilenbisakrilamid, $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ (Acros Organics)

- Tetrametiletilendiamin, TEMED, C₆H₁₆N₂ (Acros Organics)
- Amonijev persulfat, APS, (NH₄)₂S₂O₈ (Acros Organics)
- Bromfenol plavo, C₁₉H₁₀Br₄O₅S (Fisher)
- Glicin, C₂H₅NO₂ (VWR)
- Metanol, CH₃OH (Carlo Erba)
- Natrijev klorid, NaCl (Kemika)
- Tween 20 (Kemika)
- Nemasno mlijeko u prahu (Dukat)
- Primarna antitijela (D1, AS05 084; PsbO podjedinica OEC-a, AS05 092; velika podjedinica Rubisca, AS03 037; α -tubulin, AS10 680, Agrisera)
- Sekundarna antitijela (goat anti-rabbit IgG-HRP, AS09 602, Agrisera; donkey anti-rabbit IgG-HRP SC-2313, Santa Cruz)
- Luminol (Roche)
- Peroksidni supstrat (Roche)
- Fiksir (AGFA)
- Razvijač (Tetenal)
- Proteinski marker (Prestained protein ladder, Thermo Scientific).

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija kloroplasta

Za izolaciju kloroplasta korišteno je oko 10 g biljnog materijala. Svi uzorci i potrebne kemikalije prilikom izrade ovog diplomskog rada vagani su na analitičkoj vagi METTLER TOLEDO AB54. Da bi se izolirali kloroplasti iz biljnog materijala, korišten je prethodno pripremljen pufer za izolaciju u sastavu 330 mM sorbitol, 20 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 10 mM Na₂CO₃ i 0,1 % BSA. pH pufera namješten je na 8,4 i pufer je čuvan na +4 °C do uporabe [29].

Biljni materijal je prvo usitnjen u mikseru (Bosch) uz dodatak pufera za izolaciju i β -merkaptetoetanol. Na svaki uzorak dodano je 50 mL ledeno hladnog pufera i 17,5 μ L β -merkaptetoetanol. Nastala suspenzija je profiltrirana kroz dva sloja gaze i dva sloja

Miraclon (oboje prethodno namočeni destiliranom vodom) u plastične graduirane kivete. Potom je sadržaj svake kivete podijeljen na dva jednaka dijela. Dobiveni uzorci su potom centrifugirani na centrifugi Hermle Z 326 K 5 minuta pri 3000 okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*; rpm). Nakon centrifugiranja supernatant je uklonjen, a na talog je dodano 500 µL pufera za izolaciju te je potom sadržaj u kivetama lagano resuspendiran koristeći mikropipetu.

3.2.1.1. Mjerenje koncentracije klorofila

Koncentracija klorofila izmjerena metodom po Arnonu [30, 31]. Za mjerenje koncentracije klorofila uzeto je 20 µL uzorka i pomiješano s 2 mL 80% ledenohladnog acetona. Uzorci su držani na ledu 5 minuta, a potom centrifugirani (Tehtnica Centric 200R) na maksimalnom broju okretaja u minuti u trajanju od 5 minuta. Mjerenje apsorbancije uzoraka (UV-VIS spektrofotometar Shimadzu UV-1900) je rađeno pri valnoj duljini od 652 nm, a koncentracije klorofila dobivene su prema sljedećoj formuli (2):

$$(2) \quad \gamma = \frac{A_{652} \times dil}{34,5} [\text{mg/mL}]$$

gdje je:

γ = masena koncentracija klorofila

A_{652} = izmjerena apsorbancija pri $\lambda=652$ nm

dil = razrjeđenje; 2 µL uzorka na 2 mL acetona = 100

3.2.2. Izolacija ukupnih proteina

Biljni materijal, listovi kljanaca ječma i kukuruza, homogenizirani su pomoću tarionika i tučka u tekućem dušiku. Od svakog uzorka je odvagano otprilike 0,5 g praha u kivetu od 2 mL. Dodan je 1 mL ekstrakcijskog pufera (0,13 M Tris/HCl pH=6,8 4,6 % SDS,

16 % glicerol, 0,01 M DTT), prethodno zagrijanog na 80 °C i kivete s uzorcima su promiješane na tresilici za epruvete (termoblok Eppendorf Thermomixer Compact). Uzorci su ekstrahirani 10 minuta na 80 °C uz miješanje. Nakon inkubacije na ledu u trajanju od 10 minuta, uzorci su centrifugirani na 18000 x g i 4 °C (Tehtnica Centric 200R) [32].

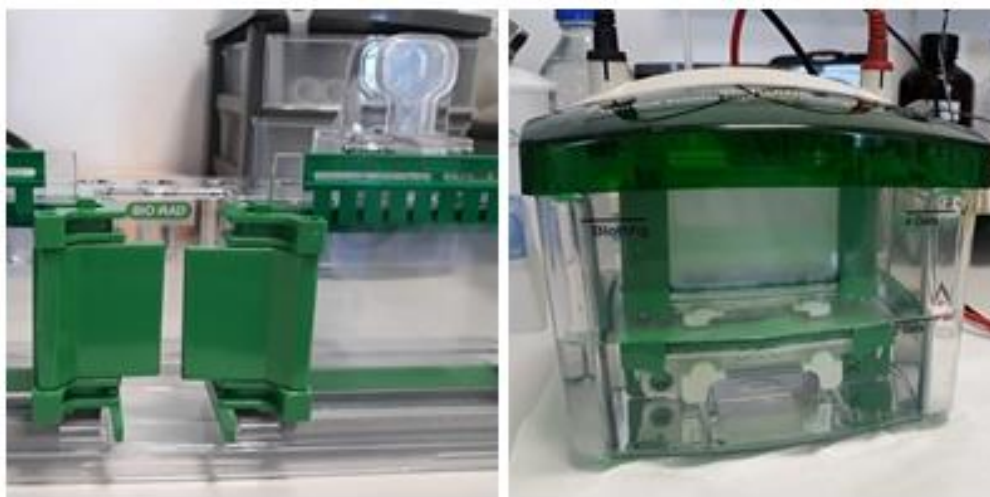
3.2.3. Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Za elektroforetsko razdvajanje proteina korišten je elektrodni pufer sastava: 19,8 mM Tris, 151,9 mM glicin, 0,1 % SDS; pH=8,3 te 12 % za razdvajanje i 4 % poliakrilamidni gel za sabijanje (*Tablica 1.*).

Tablica 1. Sastav poliakrilamidnih gelova za SDS-PAGE.

4 % sabijajući gel	5 mL	12 % razdvajajući gel	10 mL
30 % akrilamid	0,75 mL	30 % akrilamid	4 mL
dH ₂ O	3 mL	dH ₂ O	2,2 mL
1 M Tris pH=6,8	1,3 mL	1 M Tris pH=8,8	3,8 mL
10 % SDS	50 µL	10 % SDS	100 µL
TEMED	8 µL	TEMED	5 µL
10 % APS	50 µL	10 % APS	50 µL

Svakom uzorku dodan je 6x koncentrirani Laemmli pufer [33] (375 mM Tris/HCl pH=6,8, 9 % SDS, 50 % glicerol, 9 % β-merkaptetanol, 0,03 % bromfenol plavo) te su uzorci zagrijani 5 min na 96 °C uz miješanje. Elektroforeza se provodila 120 minuta pri naponu od 150 V i jakosti struje od 45 mA (*Slika 5.*). Za praćenje migracije proteina u gelu korišten je proteinski marker (Prestained protein ladder Thermo Scientific).

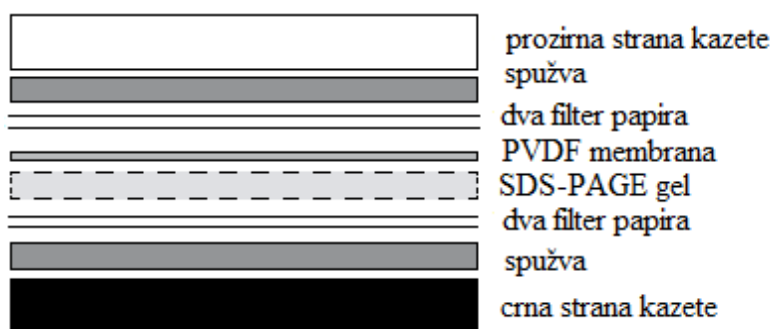


Slika 5. Prikaz sustava za polimerizaciju gelova (lijevo) i elektroforezu (desno) (Bio-Rad Mini-Protean Tetra System).

3.2.4. Western blot

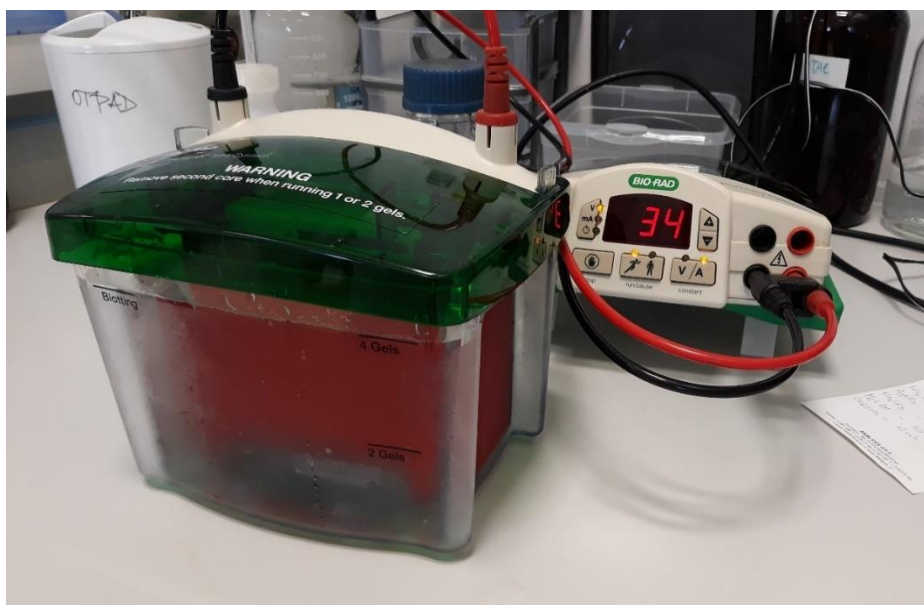
3.2.4.1. Prijenos na membranu

Nakon završene SDS-PAGE, gel je ispran u puferu za prijenos (25 mM Tris, 192 mM glicin, 10 % metanol, pH=8,3). Za prijenos proteina s gela korištena je poliviniliden difluorid (PVDF) membrana. Membrana je prethodno inkubirana pet minuta u metanolu. Spužvice i filter papiri također su kratko namočeni u pufer za prijenos. Kazeta za prijenos proteina iz gela slagana je prema sljedećoj shemi prikazanoj na **Slici 6**.



Slika 6. Shematski prikaz načina slaganja kazete za prijenos proteina s gela na membranu; preuzeta i prilagođena prema [34].

Budući da su proteini negativno nabijeni, gel je orijentiran bliže negativnoj elektrodi, dok se membrana smješta između gela i pozitivne elektrode, omogućavajući negativno nabijenim proteinima da putuju prema pozitivnoj elektrodi. Kadica za prijenos je potom napunjena do vrha hladnim puferom za prijenos i priključena na izvor električne struje (*Slika 7.*). Prijenos proteina provodio se u vremenu od 60 minuta pri naponu od 40 V i jakosti struje od 60 mA.



Slika 7. Prikaz sustava za prijenos proteina s gela na membranu (Bio-Rad Mini-Protein Tetra System).

3.2.4.2. Imunodetekcija proteina na membrani

Nakon prijenosa proteina na membranu, membrana je blokirana na tresilici (PSU-10i Biosan Shaker) (*Slika 8.*) jedan sat na sobnoj temperaturi u TBST puferu (engl. *Tris-Buffered Saline and Tween 20*, 20 mM Tris, 500 mM NaCl i 0,1 % Tween 20) uz dodatak 5 % nemasnog mlijeka kako bi se blokirala sva nevezana mjesta na membrani.



Slika 8. Blokiranje nevezanih mjesta na membrani pomoću otopine 5% nemasnog mlijeka u TBST puferu.

Nakon inkubacije u mlijeku, dodano je primarno antitijelo otopljeno u 5 %-tnoj otopini mlijeka u TBST puferu u omjeru 1:5000 za D1, OEC i Rubisco te 1:2000 za tubulin i ostavljeno je preko noći na +4 °C. Membrana je nakon primarnog antitijela isprana s TBST puferom i to na način da je 10 mL TBST pufera dodano u posudicu s membranom i miješano na tresilici 15 minuta te još tri puta po 5 minuta, svaki put s 10 mL TBST pufera.

Nakon što je membrana isprana, dodano je sekundarno antitijelo (Agrisera) u razrjeđenju 1:25000 u TBST puferu s 5 %-tnim mlijekom te je membrana inkubirana jedan sat na sobnoj temperaturi. Sekundarno antitijelo isprano je po istom protokolu kao i primarno antitijelo.

Ova metoda je ponovljena s izmijenjenim reakcijama imunodetekcije. Nakon prijenosa proteina na membranu, membrana je blokirana preko noći na +4 °C u TBST puferu uz dodatak 5 % nemasnog mlijeka. Primarna antitijela su otopljena u 5 %-tnoj otopini nemasnog mlijeka u TBST puferu u omjeru 1:5000 za D1, OEC i Rubisco te 1:2000 za tubulin. Membrane su u primarnom antitijelu inkubirane u trajanju od jednog sata na sobnoj temperaturi na tresilici. Primarno antitijelo isprano je na isti način kao i u prethodnom protokolu. Sekundarno antitijelo (Santa Cruz) također je otopljeno u 5 %-tnoj otopini nemasnog mlijeka u TBST puferu u omjeru 1:10000. Membrane su inkubirane u

sekundarnom antitijelu u trajanju od jednog sata na sobnoj temperaturi uz miješanje. Sekundarno antitijelo isprano je na isti način kao i prethodno.

3.2.4.3. Kemiluminiscentna detekcija

Temelj kemiluminiscentne detekcije je oksidacija luminola u prisustvu peroksida i peroksidaze iz hrena pri čemu luminol prelazi u produkt u pobuđenom stanju (3-aminoftalat) koji prilikom prelaska u početno stanje emitira svjetlost. Ova reakcija može se zabilježiti na rendgenskom filmu [35].

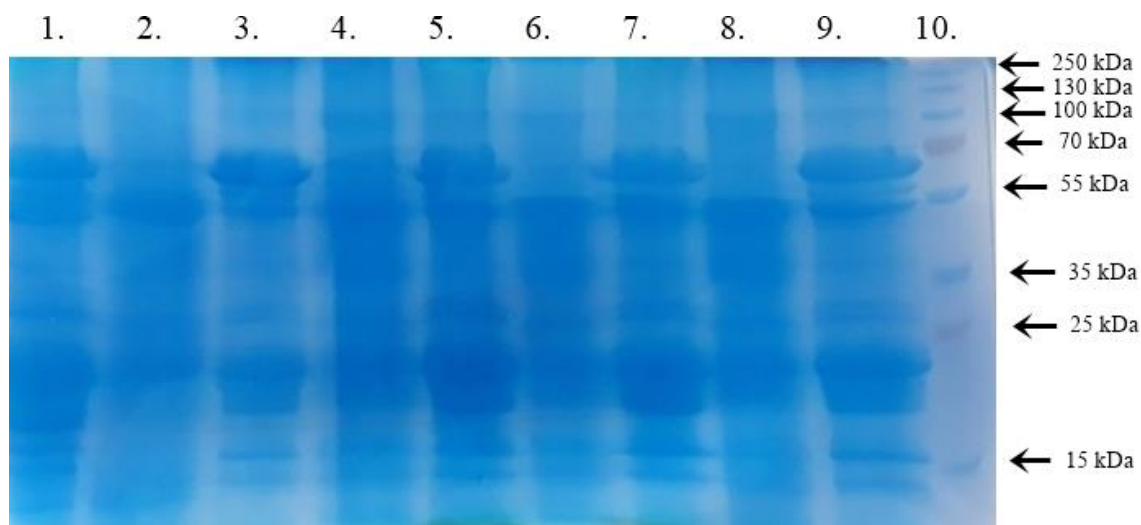
Nakon ispiranja, na membranu su dodani supstrati za kemiluminiscentnu detekciju, luminol i supstrat na bazi peroksida (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche.) Membrana je stavljena u autoradiografsku kazetu (Orthofine Curix Screens, AGFA) i na nju rendgenski film (Ultra Cruz Autoradiography Film, Santa Cruz, Biotechnology, Inc.). Nakon 10 minuta ekspozicije, film je stavljen kratko u razvijlač, ispran s vodom, zatim u fiksir te opet kratko ispran s vodom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Vizualizacija proteinskih vrpca bojom Coomassie briljant plavo

Nakon odvajanja proteina koristeći SDS-PAGE, proteinske vrpce su vizualizirane bojanjem s *Coomassie* briljant plavo (engl. *Coomassie Brilliant Blue*; CBB) za koji je karakteristično da se u kiseljoj sredini elektrostatskim silama veže na amino skupine iz proteina. Za bojanje je korištena 0,1 % (m/v) otopina boje CBB R-250, metanola, dH₂O i octene kiseline (5v:4v:1v) [30]. Kako bi se osigurala učinkovitost elektroforetskog razdvajanja, potrebno je nanijeti u jažice jednaku količinu proteina. Međutim, ekstrakcijski pufer koji je korišten za metodu izolacije ukupnih proteina sadrži visoku koncentraciju SDS koji interferira sa standardnim metodama za određivanje koncentracije proteina. Iz tog razloga umjesto jednake količine proteina, u svaku jažicu nanesen je jednak volumen od 15 µL uzoraka dobivenih metodom izolacije ukupnih proteina. Također, za preliminarne analize nanoseno je i 15 µL uzorka kloroplasta.

Nakon vizualizacije proteinskih vrpca bojom CBB (*Slika 9.*) možemo zaključiti da se u jažicama u kojima se nalaze proteini dobiveni metodom izolacije ukupnih proteina (jažice 2., 4., 6. i 8.) nalazi prevelika količina proteina. Dobivene proteinske vrpce su mutne i razmazane te se gotovo ne mogu razlučiti. Proteini koji su dobiveni izolacijom iz kloroplasta dali su većinom proteinske vrpce bolje razlučivosti i jasnijih granica od proteina dobivenih izolacijom ukupnih proteina, što se vrlo jasno može uočiti na primjeru jažica 8. i 9.



Slika 9. Ukupni proteini biljnog materijala nakon SDS-PAGE i vizualizirani bojom *Coomassie* briljant plavo. U svaku jažicu nanoseno je 15 μ L uzorka (B) sljedećim redoslijedom: 1.) ječam chl, 2.) ječam crude, 3.) OS 515 chl, 4.) OS 515 crude, 5.) OS 2983 chl, 6.) OS 2983 crude, 7.) Osmak chl, 8.) Osmak crude, 9.) Zuban chl, 10.) proteinski marker (oznaka „chl“ označava izolaciju proteina iz kloroplasta, a oznaka „crude“ izolaciju ukupnih proteina).

4.2. Mjerenje koncentracije klorofila

Nakon što je uočena vidljiva razlika u količini proteina između ove dvije metode izolacije, izmjerena je koncentracija klorofila u uzorcima koji su dobiveni metodom izolacije proteina iz kloroplasta. Za mjerenje koncentracije klorofila korištena je metoda po Arnonu koja objedinjuje masene koncentracije klorofila *a* i *b*. Nakon provedenog mjerenja, vidljivo je da se masene koncentracije ukupnog klorofila u biljnom materijalu kreću u rasponu od 0,846 mg/mL do 2,655 mg/mL (**Tablica 2.**). Koncentracije klorofila mjerene su kako bi se mogla izjednačiti količina kloroplastnih proteina u jažicama za elektroforetsko razdvajanje.

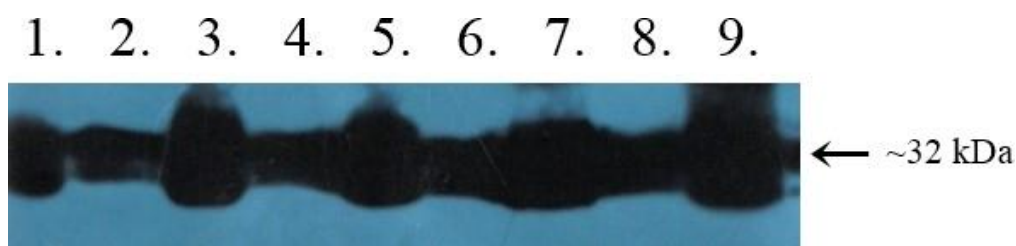
Tablica 2. Masene koncentracije ukupnog klorofila dobivene mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 652 nm korištenjem UV-VIS spektrofotometra Shimadzu UV-1900

Uzorak	γ [mg/mL]
Zuban A	2,655
Zuban B	1,713
Osmak A	1,304
Osmak B	1,438
Ječam A	2,037
Ječam B	2,255
OS 515 A	1,414
OS 515 B	1,043
OS 2938 A	1,536
OS 2938 B	0,843

4.2. Detekcija D1 proteina

Za detekciju D1 proteina, u svaku jažicu nanoseno je 15 μ L uzoraka, dobivenih objema metodama, bez obzira na prethodno mjerenje koncentracije klorofila. Cilj je bio uočiti hoće li se proteinske vrpce D1 proteina razlikovati između dviju. Nakon prijenosa proteina s gela na membranu, imunodetekcija je provedena kao što je opisano u prvom postupku.

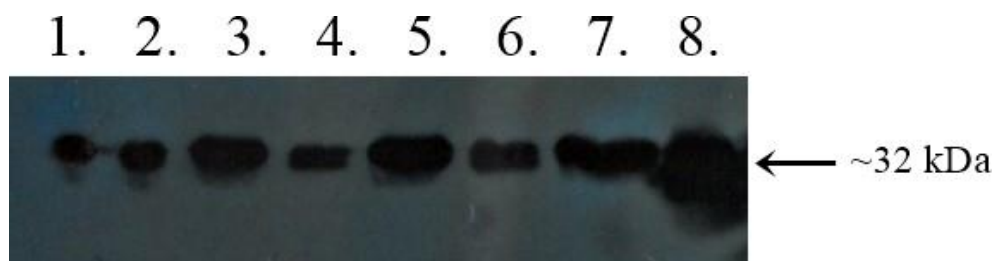
Prema dobivenim rezultatima (*Slika 10.*) možemo zaključiti da se u 15 μ L uzoraka dobivenih objema metodama nalazi prevelika količina željenog proteina, što je dalo proteinske vrpce nejasnih granica. Metoda izolacije proteina iz kloroplasta dala je nešto manje deblje proteinske vrpce što je ukazalo na potrebu za daljom optimizacijom metode detekcije proteina D1.



Slika 10. Prikaz proteinskih vrpca D1 proteina na filmu. U svaku jažicu nanoseno je 15 μ L uzorka sljedećim redoslijedom: 1.) ječam chl, 2.) ječam crude, 3.) OS 515 chl, 4.) OS 515 crude, 5.) OS 2983 chl, 6.) OS 2983 crude, 7.) osmak chl, 8.) osmak crude, 9.) zuban chl (oznaka „chl“ označava izolaciju proteina iz kloroplasta, a oznaka „crude“ izolaciju ukupnih proteina).

Prejak signal na filmu (*Slika 11.*) može biti rezultat preduge inkubacije membrane u primarnom antitijelu, prevelike koncentracije primarnog antitijela, prevelike količine proteina ili preduge ekspozicije. Kako bi se utvrdio razlog, u sljedećem mjerenju su se reakcije imunodetekcije provele prema izmijenjenom protokolu kao što je ranije opisano u metodama te je promijenjena količina proteina u jažicama. Budući da je D1 protein uspješno detektiran u svim uzorcima kukuruza, kao i u ječmu, za daljnju optimizaciju detekcije D1

proteina, kao i za detekciju preostalih proteina odabrani su samo dobiveni izolacijom kloroplasta i ukupnih proteina iz ječma.



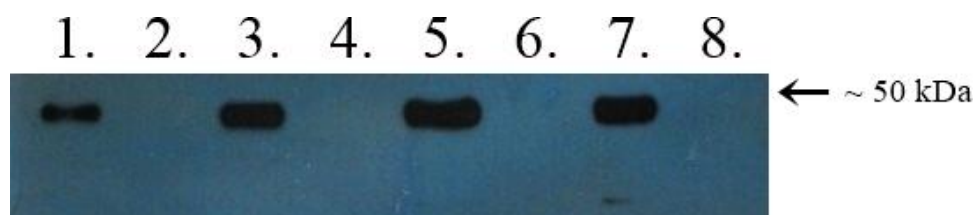
Slika 11. Prikaz proteinskih vrpce D1 proteina na filmu nakon modificiranja reakcija imunodetekcije. Uzorci su nanoseni u jažice sljedećim redoslijedom: 1.) 2 μ L crude, 2.) 2 mg/mL chl, 3.) 5 μ L crude, 4.) 5 mg/mL chl, 5) 10 μ L crude, 6.) 10 mg/mL chl, 7.) 15 μ L crude, 8.) 15 mg/mL chl (oznaka „chl“ označava izolaciju proteina iz kloroplasta, a oznaka „crude“ izolaciju ukupnih proteina).

Vidljivo je da su optimizirane reakcije imunodetekcije dale puno bolji rezultat, odnosno jasnije proteinske vrpce izraženijih granica (**Slika 11.**). Također, možemo zaključiti da se za D1 protein pokazala boljom metoda izolacije ukupnih proteina te da je za vidljivu razliku dviju metoda potrebna količina od 5 μ L ukupnih proteina (3. jažica) ili 5 mg/mL proteina iz kloroplasta (4. jažica). Na 2 μ L ukupnih proteina, tj. 2 mg/mL proteina iz kloroplasta ne vidi se dovoljno jasna razlika između dviju metoda (1. i 2. jažica), dok je kod 15 μ L ukupnih proteina, odnosno 15 mg/mL proteina iz kloroplasta prejak signal zbog previše proteina u uzorku (7. i 8. jažica). Prema [36] dobivena vrijednost za molekulsku masu D1 proteina iz ječma iznosi ~33,5 kDa. Također, prema uputama proizvođača primarnog antitijela (Agrisera), očekivana molekulska masa za D1 protein iznosi 38 kDa, dok je dobivena 23-30 kDa [37]. Eksperimentalno dobivena molekulska masa D1 proteina u ovom radu iznosi ~32 kDa.

Budući da su reakcije imunodetekcije prema drugom protokolu dale bolji rezultat, preostali proteini su detektirani na jednak način.

4.3. Tubulin

Tubulin je protein koji gradi mikrotubule, šuplje cjevčice koje su glavna komponenta eukariotskog citoskeleta. U ovom radu detektiran je α -tubulin čija je molekulska masa ~50 kDa. Prema [38] očekivana je molekulska masa od 49 kDa, a u ovom radu dobivena je molekulska masa od ~50 kDa (*Slika 12.*). Budući da gradi citoskelet, očekivano je da tubulin neće biti prisutan u uzorcima koji su dobiveni metodom izolacije iz kloroplasta.

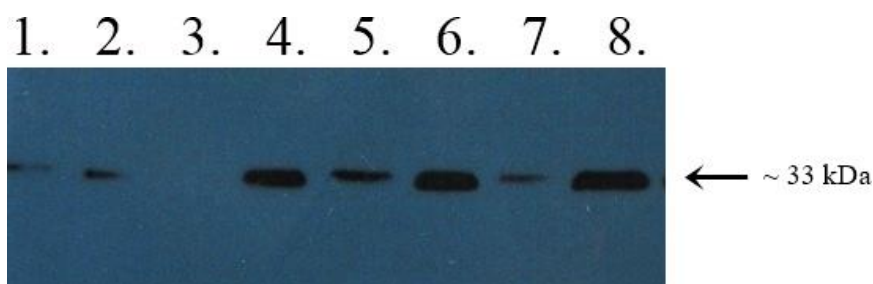


Slika 12. Prikaz proteinskih vrpca tubulina na filmu uz modificirane uvjete imunodetekcije. Uzorci su nanoseni u jažice sljedećim redoslijedom: 1.) 2 μ L crude, 2.) 2 mg/mL chl, 3.) 5 μ L crude, 4.) 5 mg/mL chl, 5.) 10 μ L crude, 6.) 10 mg/mL chl, 7.) 15 μ L crude, 8.) 15 mg/mL chl (oznaka „chl“ označava izolaciju proteina iz kloroplasta, a oznaka „crude“ izolaciju ukupnih proteina).

Kao što je i pretpostavljeno, proteinske vrpce tubulina (*Slika 12.*) prisutne su samo kod uzoraka dobivenih metodom izolacije ukupnih proteina. Budući da je citoskelet prilikom izolacije ukupnih proteina ostao očuvan, u tim uzorcima je tubulin uspješno detektiran.

4.4. OEC

PsbO je vanjska proteinska podjedinica OEC-a molekulske mase ~33 kDa, a pretpostavlja se da je njezina uloga povezana sa stabilizacijom katalitičkog manganskog središta. Prema uputama proizvođača primarnog antitijela (Agrisera) očekivana molekulska masa za PsbO podjedinicu iznosi 33 kDa [39], što je ovim radom i pokazano (*Slika 13.*).

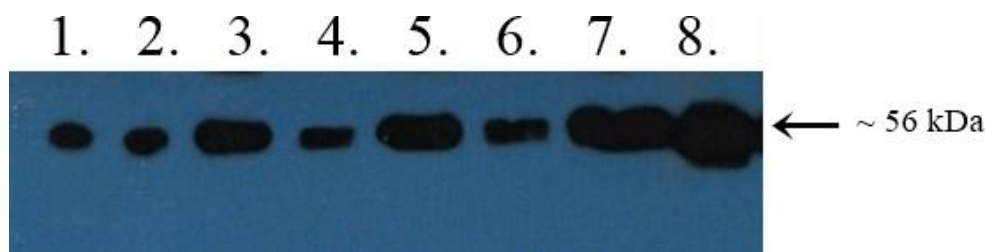


Slika 13. Prikaz proteinskih vrpca OEC-a na filmu uz modificirane uvjete imunodetekcije. Uzorci su nanoseni u jažice sljedećim redoslijedom: 1.) 2 μ L crude, 2.) 2 mg/mL chl, 3.) 5 μ L crude, 4.) 5 mg/mL chl, 5.) 10 μ L crude, 6.) 10 mg/mL chl, 7.) 15 μ L crude, 8.) 15 mg/mL chl (oznaka „chl“ označava izolaciju proteina iz kloroplasta, a oznaka „crude“ izolaciju ukupnih proteina).

Rezultati pokazuju jasnu razliku između intenziteta proteinskih vrpca kod uzoraka dobivenih metodom izolacije proteina iz kloroplasta i u uzorcima dobivenim metodom izolacije ukupnih proteina (**Slika 13.**). Možemo zaključiti da se za detekciju PsbO podjedinice OEC-a pokazala uspješnijom metoda izolacije kloroplasta čiji uzorci pokazuju izraženije, jasnije proteinske vrpce. Iako se razlika vidi pri svim korištenim volumenima, volumen od 2 μ L ukupnih proteina (1. jažica), tj. 2 mg/mL proteina iz kloroplasta (2. jažica) daje slab signal, pa možemo zaključiti da za uspješnu detekciju to nije dovoljan volumen. U 3. jažici PsbO uopće nije detektiran, što nije očekivano s obzirom na to da je njegova proteinska vrpca prisutna i u 1. jažici s manjim volumenom proteina (2 μ L), kao i u 5. jažici s većim volumenom proteina (10 μ L). Također, prema proteinskim vrpca, u 5. jažici je veća količina proteina nego u 7., što se ne podudara s količinama proteina nanosenima u jažice. Također, kod nekih uzoraka dobivenih metodom izolacije kloroplasta (4., 6. i 8. jažica) ne vidi se značajna razlika u intenzitetu proteinskih vrpca. Razlog navedenih pogrešaka je najvjerojatnije ljudski faktor, odnosno pogreške u nanošenju navedenih uzoraka u jažice.

4.5. Rubisco

Kao što je ranije spomenuto, Rubisco je enzim građen od dvije podjedinice – velike i male. U ovom istraživanju određivana je ekspresija Rubiscove velike podjedinice (engl. *Large subunit*, LSU) čija molekulska masa iznosi ~56 kDa.



Slika 14. Prikaz proteinskih vrpce Rubisco na uz modificirane uvjete imunodetekcije. Uzorci su nanoseni u jažice sljedećim redoslijedom: 1) 2 μL crude, 2) 2 mg/mL chl, 3) 5 μL crude, 4) 5 mg/mL chl, 5) 10 μL crude, 6) 10 mg/mL chl, 7) 15 μL crude, 8) 15 mg/mL chl (oznaka „chl“ označava izolaciju proteina iz kloroplasta, a oznaka „crude“ izolaciju ukupnih proteina).

Intenzivnije proteinske vrpce uočene su u uzorcima dobivenih metodom izolacije ukupnih proteina (posebice 3. i 5. jažica) u usporedbi s metodom izolacije proteina iz kloroplasta (4. i 6. jažica). Iz navedenog možemo zaključiti da su obje metode pogodne za imunodetekciju Rubisca, ali signal je jači u uzorcima gdje su izolirani ukupni proteini. Volumen od 2 μL ukupnih proteina, tj. 2 mg/mL proteina iz kloroplasta (1. i 2. jažica) nije se pokazao dovoljnim da bi se uočila jasna razlika, no već 5 μL ukupnih proteina i 5 mg/mL proteina iz kloroplasta daje vrlo jasnu razliku između dviju proteinskih vrpce. Također, jažice 7. i 8. pokazuju razliku između dviju metoda, no količina od 15 μL ukupnih proteina, odnosno 15 mg/mL proteina iz kloroplasta je prema **Slici 14.** prevelika da bi se Rubisco na ovaj način adekvatno detektirao. Također, proteinske vrpce 7. i 8. jažice upućuju na to da je količina proteina. Te jažice također nemaju jasno izražene granice i daju prejak signal. Detektirana molekulska masa za Rubisco iznosi ~56 kDa. Prema [40] očekivana molekulska masa je između 52,3-52,7 kDa, ovisno o biljnoj vrsti.

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti metode za određivanje ekspresije fotosintetskih proteina. Određivana je ekspresija D1 proteina i OEC-a koji sudjeluju u fotosintetskim reakcijama na svjetlu, a nalaze se na tilakoidnim membranama kloroplasta te Rubisco-a, enzima koji se nalazi u stromi kloroplasta i sudjeluje u fotosintetskim reakcijama u tami. Sva tri proteina su od velikog značaja za proces fotosinteze i upravo zato je njihovo daljnje proučavanje od velike važnosti.

Proteini su iz biljnog materijala izolirani dvama metodama:

1. metodom izolacije ukupnih proteina
2. metodom izolacije proteina iz kloroplasta.

Cilj rada bio je utvrditi koja od ovih dviju metoda je pogodnija za izolaciju i detekciju navedenih proteina. Nakon provedenog istraživanja zaključeno je sljedeće:

- Tris-glicin SDS-PAGE s pokazala se kao uspješna metoda za odvajanje proteina na temelju njihove mase; raspon molekulskih masa za ispitivane proteine iznosio je od 32 kDa do 56 kDa.
- Kao optimalno razrjeđenje primarnog antitijela (Agrisera) pokazalo se 1:5000 za svaki ispitivani protein.
- Kao optimalno razrjeđenje sekundarnog antitijela (Santa Cruz) pokazalo se 1:10000 za svaki ispitivani protein.
- Inkubacija membrana u antitijelima u trajanju od jednog sata na sobnoj temperaturi se pokazala dovoljnom za dobivanje jasnih proteinskih vrpca na rendgenskom filmu.
- Obje metode za izolaciju željenih proteina su se pokazale uspješnima.
- Za D1 protein i Rubisco pokazala se uspješnijom metoda izolacije ukupnih proteina, dok se za OEC pokazala uspješnijom metoda izolacije proteina iz kloroplasta.

6. LITERATURA

- [1] <https://sciencing.com/reactants-photosynthesis-5499777.html> (22. 9. 2019.)
- [2] S. Heinz, P. Liauw, J. Nickelsen, M. Nowaczyk, *BBA-Bioenergetics* **1857** (2016), 274-287.
- [3] J.R. Shen, *Annu. Rev. Plant Biol.* **66** (2015), 23-48.
- [4] F.A. Wollman, R. Nechushtai, L. Minai, *BBA-Bioenergetics* **1411** (1999) 21-85.
- [5] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W.H. Freeman, New York, 2002.
- [6] <https://www.britannica.com/science/photosynthesis/Photosystems-I-and-II> (22. 9. 2019.)
- [7] D. Voet, J.G. Voet, *Biochemistry*, Wiley, New Jersey, 2010.
- [8] N. Nelson, A. Ben-Shem, *BioEssays* **27** (2005), 914-922.
- [9] http://csls-text.c.u-tokyo.ac.jp/inactive/08_07.html (22. 9. 2019.)
- [10] M.M. Cox, D.L. Nelson, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 2013.
- [11] <http://macromol.sbcs.qmul.ac.uk/oldsite/psIIimages/PSIIsubunits.html> (22. 9. 2019.)
- [12] B. Hankamer, E. Morris, J. Nield, A. Carne, J. Barber, *FEBS Lett.* **504** (2001), 142-151.
- [13] M. Suorsa, R.E. Regel, V. Paakkarinen, N. Battchikova, R.G. Herrmann, E.-M. Aro, *Eur. J. Biochem.* **271** (2003), 96–107.
- [14] <http://macromol.sbcs.qmul.ac.uk/oldsite/psIIimages/PSII.html> (22. 9. 2019.)
- [15] J. Xiong, G. Jee, S. Subramaniam, *Protein Sci.* **5** (1996), 2054-2073.
- [16] H. Wu, O. Cheregi, K. Gao, L. Abasova, Z. Deák, I. Vass, *J. Photochem. Photobiol., B* **104** (2011), 320-325.
- [17] D.I. Liao, J. Qian, D.A. Chisholm, D.B. Jordan, B.A. Diner, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **7** (2000), 749-753.

- [18] H. Ishikita, E.-W. Knapp, *Biophys. J.* **90** (2006), 3886-3896.
- [19] J. Sharma, M. Panico, C. A. Shipton, F. Nilsson, H.R. i J. Barber, *J. Biol. Chem.* **272** (1997), 33158-33166.
- [20] Y. Umena, K. Kawakami, J.R. Shen, N. Kamiya, *Nature* **473** (2011), 55-60.
- [21] R. Pokhrel, G.W. Brudvig, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16** (2014), 11812-11821.
- [22] K. Kawakami, Y. Umena, N. Kamiya, J.R. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** (2009), 8567-8572.
- [23] L.E. Thornton, H. Ohkawa, J.L. Roose, Y. Kashino, N. Keren, H.B. Pakrasi, *The Plant Cell* **16** (2004), 2164-2175.
- [24] R. Malkin, K. Niyogi, Photosynthesis, Biochemistry and Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists, Rockville MD, 2000.
- [25] A. Laskar, A. Chatterjee, *Online Journal of Biotechnology Research* **1** (2009), 55-61.
- [26] W. Wang, F. Tai, S. Chen, *J. Sep. Sci.* **31** (2008), 2032-2039.
- [27] J.L. Brunelle, R. Green, One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE), Methods in Enzymology: Protein Part C, Volume 541 Academic Press, 2014.
- [28] T. Mahmood, P.-C. Yang, *N. Am. J. Med. Sci* **4** (2012), 429-434.
- [29] S. Jurić, K. Hazler-Pilepić, A. Tomašić, H. Lepeduš, B. Jeličić, S. Puthiyaveetil, T. Bionda, L. Vojta, J.F. Allen, E. Schleiff, H. Fulgosi, *Plant J.* **60** (2009), 783-794.
- [30] D.I. Arnon, *Plant Physiol.* **24** (1949), 1-15.
- [31] G. MacKinney, *J. Biol. Chem.* **140** (1941), 315-322.
- [32] S. Mlinarić, J.A. Dunić, M.S. Babojelić, V. Cesar, H. Lepeduš, *J. Plant Physiol.* **209** (2017), 1-10.
- [33] U.K. Laemmli, *Nature*, **227** (1970), 680-685.
- [34] <https://capricorn.bc.edu/wp/pathways/protein-expression/western-blots/western-blot-exercises/> (22. 9. 2019.)

- [35] <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescent-western-blotting.html> (22. 9. 2019.)
- [36] V.A. Efimov, A.F. Fradkov, A.B. Raskind, M.S. Khristin, V.V. Klimov, O.G. Chakhmakhcheva, *FEBS Lett.* **348** (1994), 153-157.
- [37] <https://www.agrisera.com/en/artiklar/psba-d1-protein-of-psii-c-terminal-100-l.html> (30. 9. 2019.)
- [38] <https://www.agrisera.com/en/artiklar/tubulin-alpha-chain.html> (30. 9. 2019.)
- [39] <https://www.agrisera.com/en/artiklar/psbo-33-kda-oec-oxygen-evolving-complex.html> (30. 9. 2019.)
- [40] <https://www.agrisera.com/en/artiklar/rbcl-rubisco-large-subunit-form-i-and-form-ii-plastid-stroma-global-antibody.html> (30. 9. 2019.)

7. DODACI

7.1. Popis kratica

OEC	kompleks za razvijanje kisika (engl. <i>oxygen evolving complex</i>)
Rubisco	ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza
SDS-PAGE	denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (engl. <i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
CO₂	ugljikov dioksid
C₆H₁₂O₆	glukoza
ATP	adenozin trifosfat
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PSI	fotosustav I
PSII	fotosustav II
LHC	kompleks za hvatanje svjetlosti (engl. <i>light harvesting complex</i>)
LHCI	LHC fotosustava I
LHCII	LHC fotosustava II
Glu	glutaminska kiselina
Asp	asparaginska kiselina
Ala	alanin
His	histidin
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
DTT	ditiotreitrol
PVPP	polivinilpolipirolidon

SDS	natrijev dodecil-sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>)
Tris	tris(hidroksimetil) aminometan
HCl	klorovodična kiselina
Na₂CO₃	natrijev karbonat
BSA	goveđi serumski album (engl. <i>bovine serum albumine</i>)
TEMED	tetrametiletilendiamin
APS	amonijev persulfat
PVDF	poliviniliden difluorid
TBST	pufer koji se koristi kod imunodetekcije, od engl. <i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
CBB	<i>Coomassie</i> briljant plavo (engl. <i>Coomassie Brilliant Blue</i>)

7.2. Životopis

Osobni podaci	
Ime i prezime	Tessa Dumančić
Datum i mjesto rođenja	22. 3. 1995., Našice
Adresa	Naselje Gorica 20, 31540 D. Miholjac
e-mail	tessadumancic1@gmail.com
Obrazovanje	
2017. - 2019.	Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek
2014. - 2017.	Preddiplomski sveučilišni studij kemije Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek Završni rad: Fenoli i kinoni mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji komentor: doc. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač
2010. - 2014.	II. gimnazija, Osijek (Jezična gimnazija)
Radno iskustvo	
srpanj 2019. – kolovoz 2019. lipanj 2018. – rujan 2018. srpanj 2017. – rujan 2017.	Studentski posao servira u Valamar Isabella Island Resort, Poreč Valamar Riviera d.d. Stancija Kaligari 1 52440 Poreč
svibanj 2016. – siječanj 2017.	Studentski posao prodavača u Zara, Portanova, Osijek ZARA Hrvatska d.o.o. Avenija Dubrovnik 16 10000 Zagreb
rujan 2015. - lipanj 2018.	Studentski posao blagajnika u McDonald's, Osijek Globalna hrana d.o.o. Rudeška Cesta 87/a 10000 Zagreb

Osobne vještine

Materinski jezik	hrvatski
Strani jezici	engleski - aktivno u govoru i pismu njemački - pasivno u govoru i pismu talijanski – pasivno u govoru i pismu
Računalne vještine	Odlično snalaženje pri radu na računalu, poznavanje i aktivno korištenje MS Office programskog paketa
Vozačka dozvola	B kategorija