

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti**

Renata Hanzer

**Funkcijska analiza domene PEPE proteina TROL iz biljke
Arabidopsis thaliana (L.)
i njezina uloga u regulaciji fotosinteze**

Doktorska disertacija

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Funkcijska analiza domene PEPE proteina TROL iz biljke *Arabidopsis thaliana* (L.) i njezina uloga u regulaciji fotosinteze

Renata Hanzer

Disertacija je izrađena u: Laboratoriju za elektronsku mikroskopiju Instituta Ruđer Bošković, Zagreb

Mentor: dr.sc. Hrvoje Fulgosi, znanstveni savjetnik

Kratki sažetak doktorske disertacije:

U ovom radu istraživana je uloga prolinom bogate domene PEPE proteina TROL u mehanizmima oksigene fotosinteze. Protein TROL integralni je protein tilakoidnih membrana i zadužen je za vezivanje feredoksin-NADP⁺-oksidoreduktaze (FNR), enzima koji katalizira završni korak prijenosa elektrona na molekulu NADP⁺. U svrhu utvrđivanja uloge ove domene kloniran je konstrukt bez domene PEPE, uspješnost transformacije potvrđena je lančanom reakcijom polimerazom, selekcija transformanata provedena je na pločama sa higromicinom, a potvrda akumulacije proteina pomoću Western blot analize. Za lokalizaciju nativnih i enzimatski aktivnih kompleksa sa proteinom TROL korištena je plava nativna elektroforeza, a pomoću elektronskog mikroskopa utvrđene su promjene ultrastrukture kloroplasta. Promjene fotosintetske učinkovitosti uzrokovane uklanjanjem domene PEPE utvrđene su mjerenjem fluorescencije klorofila *a in vivo*, te utvrđivanjem sadržaja glutaciona imunoglod bojenjem česticama zlata. Kao abiotički stresni čimbenik korištena je svjetlost vrlo viskog intenziteta.

FNR održava dinamiku sustava i dođe li do narušavanja te dinamike redoks stanje je narušeno te se aktiviraju alternativni putevi prijenosa elektrona. Uklanjanje domene PEPE dovodi do promjena u linearnom toku elektrona. Rezultati mjerenja ukazuju na promjene u radu fotosintetskog aparata tijekom izlaganja biljaka svjetlosnom stresu, no biljke su uspjele dijelom spriječiti fotooštećivanje uz uspostavljanje alternativnih puteva za transport elektrona kroz membranu, rasipanjem suviška energije u obliku topline, unutarstaničnom raspodjelom antioksidansa glutaciona i drugo.

Broj stranica: 158

Broj slika: 54

Broj tablica: 41

Broj litaraturnih navoda: 129

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: *Arabidopsis thaliana*, TROL, domena PEPE, FNR, fotosinteza, fluorescencija klorofila *a*, glutation, ultrastruktura kloroplasta

Datum obrane: 18. siječnja 2016.

Stručno povjerenstvo za obranu:

- 1. prof. dr. sc. Hrvoje Lepeduš**, redoviti profesor Filozofskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- 2. dr. sc. Hrvoje Fulgosi**, znanstveni savjetnik Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu
- 3. izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek**, izvanredna profesorica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Disertacija je pohranjena u: Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular Biosciences

PhD thesis

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Biology

Functional analysis of PEPE domain in TROL protein from *Arabidopsis thaliana* (L.) and its role in the regulation of photosynthesis

Renata Hanzer

Thesis performed at: Ruđer Bošković Institute, Laboratory for electronic microscopy, Zagreb

Supervisor: PhD Hrvoje Fulgosi, Scientific advisor

Short abstract:

The proline-rich PEPE domain of TROL protein and its role in the mechanisms of oxygen photosynthesis were investigated in this study. Protein TROL is an integral thylakoid membrane protein and is responsible for binding ferredoxin-NADP⁺-oxidoreductase (FNR), the enzyme that catalyzes the final step of the electron transfer to NADP⁺ molecule. In order to determine the role of this domain, a construct without PEPE domain was cloned, transformation was confirmed by the polymerase chain reaction analysis, selection of transgenic seedlings was performed on selection plates containing hygromycin and protein expression was confirmed by Western blot analysis. For localization of native and enzymatically active TROL containing complexes, blue native electrophoresis was used, and investigation of changes in the chloroplast ultrastructure were done using an electron microscope. Changes in photosynthetic efficiency caused by deletion of PEPE domain were determined by measuring the fluorescence of chlorophyll *a* *in vivo*, and determining the content of glutathione by immunogold labeling. As an abiotic stress factor high light intensities were used.

FNR maintain the system dynamics and if there is a disruption of the dynamics and redox status alternative pathways of electron transfer will be activated. Deletion of the PEPE domain leads to changes in linear electron flow. The measurement results indicate changes in the function of the photosynthetic apparatus during exposure of the plants to light stress, but the plants were able to partially prevent damaging by activating alternative electron transfer pathways through the membrane, discharge excess energy in the form of heat, intracellular distribution of antioxidants glutathione, etc.

Number of pages: 158

Number of figures: 54

Number of tables: 41

Number of references: 129

Original in: Croatian

Key words: *Arabidopsis thaliana*, TROL, PEPE domain, FNR, photosynthesis, chlorophyll *a* fluorescence, glutathione, chloroplast ultrastructure

Date of the thesis defense: January 18th, 2016

Reviewers:

- 1. PhD Hrvoje Lepeduš**, Full Professor, Faculty of Humanities and Social Sciences, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
- 2. PhD Hrvoje Fulgosi**, Scientific Advisor, Ruđer Bošković Institute Zagreb
- 3. PhD Željka Vidaković-Cifrek**, Associate Professor, Faculty of Science, University of Zagreb

Thesis deposited in: City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za elektronsku mikroskopiju, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom mentora dr.sc. Hrvoja Fulgosija.

ZAHVALA

Najiskrenije se zahvaljujem mom mentoru dr. sc. Hrvoju Fulgosiju na prenesenom znanju, stručnoj pomoći i savjetima u mom znanstvenom i profesionalnom radu. Nadam se da naša suradnja ne završava ovdje.

Hvala prof. dr. sc. Hrvoju Lepedušu na nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog rada, te brojnim korisnim sugestijama i podršci.

Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Željki Vidaković – Cifrek na čitanju disertacije i brojnim korisnim savjetima.

Zahvalnost upućujem i prof. dr. sc. Veri Cesar na susretljivosti i pomoći kroz cijeli studij.

Posebno hvala dragim LEM-ovkama: Ani, Snježani, Lei i Luciji; na strpljenju, podršci i ugodnoj radnoj atmosferi.

Hvala Jasenki na prijateljskoj pomoći u svakom trenutku.

Hvala i mojoj ustanovi, Hrvatskom centru za poljoprivredu, hranu i selo na financijskoj i logističkoj podršci.

Veliko hvala mojim roditeljima i sestri na podršci i strpljenju kroz cijelo moje školovanje, znam da sa mnom nije lako.

Hvala ujaku koji me prvi gurnuo u ovu avanturu.

Najveću zahvalnost upućujem mom Damiru, mom najčvršćem osloncu. Hvala ti što si uvijek uz mene, što imaš beskrajno mnogo strpljenja za sve moje mušice i najviše što uvijek vjeruješ u mene.

Hvala mojim princezama, Heleni i Katarini, vama posvećujem ovaj rad.

SADRŽAJ

1	UVOD.....	2
1.1	Pregled dosadašnjih istraživanja.....	4
1.1.1	Fotosinteza vaskularnih biljaka.....	4
1.1.2	Fotosintetski reakcijski centri.....	4
1.1.2.1	Fotosustav II.....	5
1.1.2.2	Citokrom <i>b₆f</i>	8
1.1.2.3	Fotosustav I.....	8
1.1.2.4	F-ATPaza.....	10
1.1.3	Kloroplasti i tilakoidne membrane.....	10
1.1.4	Rodanaze.....	11
1.1.4.1	Proteini nalik rodanazama.....	12
1.1.4.2	TROL.....	13
1.1.4.3	Prolinske regije u transmembranskim uzvojnica.....	15
1.1.5	Vrsta <i>Arabidopsis thaliana</i> – modelna biljka za genetička istraživanja.....	17
1.1.6	Fotosinteza i svjetlosni stres.....	18
1.1.7	Karakteristike transformacije biljaka pomoću bakterije <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
1.1.7.1	T-DNA binarni vektori.....	20
1.1.7.2	Gateway™ tehnologija izravnog kloniranja.....	22
1.1.8	Antioksidans glutation i abiotički stres.....	24
1.2	Ciljevi istraživanja.....	26
2	MATERIJALI I METODE.....	28
2.1	Biljni materijal.....	28
2.2	Transformacija biljaka.....	28
2.2.1	Gateway metoda izravnog kloniranja.....	28
2.2.2	Transformacija bakterija vrste <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
2.2.3	Transformacija biljaka vrste <i>A. thaliana</i> „Foloral dip“ metodom.....	31
2.3	Selekcija transformanata.....	32
2.4	Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	33
2.5	Analiza DNA i proteina.....	35
2.5.1	Elektroforeza u gelu agaroze.....	35
2.5.2	Izolacija ukupnih proteina.....	35

2.5.3	SDS - poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE).....	35
2.5.4	Imunodetekcija proteina Western blot prijenosom.....	36
2.5.5	Plava nativna elektroforeza.....	37
2.6	Mjerenje fotosintetskih parametara.....	38
2.6.1	Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila <i>a</i> (PEA).....	40
2.6.2	Mjerenje fluorescencije klorofila <i>a</i> PAM fluorometrom.....	42
2.7	Mjerenje koncentracije fotosintetskih pigmenata	43
2.8	Mjerenje produkcije kisika pomoću kisikove elektrode	43
2.9	Utvrđivanje relativnog sadržaja glutationa u pojedinim organelama	45
2.10	Elektronska mikroskopija.....	46
2.11	Statističke analize	46
3	REZULTATI	48
3.1	Konstrukcija mutirane linije Δ PEPE i transformacija biljaka <i>A. thaliana</i>	48
3.2	Potvrda ugradnje konstrukta u genom biljke.....	49
3.2.1	Selekcija higromicin rezistentnih biljaka.....	49
3.2.2	Potvrda ugradnje konstrukta PCR metodom.....	51
3.2.3	Imunodetekcija proteina Western blot analizom.....	52
3.2.4	Plava nativna elektroforeza – BN PAGE.....	53
3.3	Promjene u fenotipu mutanti u ovisnosti o svjetlosnom uvjetu.....	54
3.4	Koncentracija fotosintetskih pigmenata	55
3.4.1	Koncentracija klorofila <i>a</i>	56
3.4.2	Koncentracija klorofila <i>b</i>	57
3.4.3	Koncentracija ukupnih klorofila (<i>a</i> + <i>b</i>).....	59
3.4.4	Koncentracija ukupnih karotenoida.....	60
3.4.5	Omjer koncentracije klorofila <i>a</i> i klorofila <i>b</i>	61
3.4.6	Omjer ukupnih klorofila i karotenoida.....	62
3.5	Mjerenje fluorescencije klorofila <i>a</i>	64
3.5.1	Vrijednosti maksimalnog kvantnog prinosa PSII (F_v/F_m)	65
3.5.2	Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}).....	66
3.5.3	Omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila	67
3.5.4	Omjer hvatanja ekscitona i rasipanja energije	69
3.5.5	Transport elektrona nizvodno od primarnog akceptora Q_A	70
3.5.6	Gustoća aktivnih reakcijskih središta	72

3.5.7	Apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu	73
3.5.8	Hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu	74
3.5.9	Elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu	76
3.5.10	Rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu	77
3.5.11	Varijabilna fluorescencija na I koraku	78
3.5.12	Varijabilna fluorescencija na J koraku	79
3.5.13	OJIP porast fluorescencije klorofila a.....	81
3.5.14	Minimalni intenzitet fluorescencije, maksimalni intenzitet fluorescencije i maksimalni kvantni prinos PSII.....	83
3.5.15	Intenzitet fluorescencije kod svjetlosti jačine 100, 250 i 800 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$	84
3.5.16	Maksimalni intenzitet fluorescencije kod svjetlosti jačine 100, 250 i 800 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$	87
3.5.17	Efektivni kvantni prinos PSII ($\Delta F/F'm$).....	89
3.5.18	Relativna stopa prijenosa elektrona (ETR)	91
3.5.19	Indeks fotokemijskog prigušivanja fluorescencije klorofila a (qP)	93
3.5.20	Indeks nefotokemijskog prigušivanja fluorescencije klorofila a (qN) ..	95
3.5.21	Nefotokemijsko prigušivanje (NPQ).....	97
3.5.22	Udio zatvorenih reakcijskih centara PSII (1-qP)	99
3.6	Mjerenje produkcije fotosintetskog O_2	102
3.7	Utvrđivanje relativnog sadržaja glutaciona	104
3.8	Ultrastrukturalna karakterizacija kloroplasta u listovima ΔPEPE biljaka	106
4	RASPRAVA	109
4.1	Osnovna obilježja i moguća uloga domene PEPE	109
4.2	Funkcionalnost fotosintetskog aparata u uvjetima svjetlosnog stresa.....	113
4.3	Specifične promjene u sadržaju glutaciona.....	118
4.4	Fenotipska obilježja i promjene u ultrastrukturi kloroplasta.....	119
5	ZAKLJUČCI.....	122
6	LITERATURA	126
7	SAŽETAK	139
8	SUMMARY.....	142
9	ŽIVOTOPIS.....	145

POPIS KRATICA

ABS	<i>absorption</i> – apsorpcija
ANOVA	<i>analysis of variance</i> – analiza varijance
ATP	adenozin trifosfat
BSA	<i>bovine serum albumine</i> – albumin goveđeg seruma
CaMV 35S	<i>Cauliflower mosaic virus promoter</i> – 35S promotor
<i>Car</i>	karotenoidi
cDNA	komplementarna DNA
Chl <i>a</i>	klorofil <i>a</i>
Chl <i>a/b</i>	omjer klorofila <i>a</i> i <i>b</i>
Chl <i>b</i>	klorofil <i>b</i>
CO ₂	ugljikov dioksid
CS	<i>excited cross section</i> – pobudna površina
cyt <i>b₆f</i>	citokrom <i>b₆f</i>
°C	Celzijev stupanj
DI	<i>dissipation</i> – rasipanje suvišne energije
DNAza	enzim deoksiribonukleaza
DTT	ditiotreitrol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ET	<i>electron transport</i> – transport elektrona
F ₀	minimalni intenzitet fluorescencije
FAD	flavin adenin dinukleotid
Fdx	feredoksin
F _m	maksimalni intenzitet fluorescencije
FNR	feredoksin-NADP ⁺ reduktaza
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i> – Försterov prijenos rezonantne energije
F _v	varijabilna fluorescencija
F _v /F _m	maksimalni prinos fluorescencije
ΔF/F _m '	efektivni prinos fluorescencije
HL	<i>high light</i> – visoki intenzitet svjetlosti
Hyg	higromicin
kb	10 ³ parova baza
kDa	kilodalton
KO	<i>knock-out</i> – nul-mutanta

LSD	<i>least significant difference</i> – najmanja značajna razlika
mRNA	<i>messenger RNA</i> – glasnička RNA
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid (oksidirana forma)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (reducirana forma)
NADP ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (oksidirana forma)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (reducirana forma)
NaOH	natrijev hidroksid
NPQ	nefotokemijsko gašenje fluorescencije klorofila <i>a</i>
OJIP	porast fluorescencije od O do P faze
PAM	<i>pulse amplitude modulation</i> – metoda saturacijskog pulsa
PC	plastocijanin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> – lančana reakcija polimerazom
PEA	<i>Plant Efficiency Analyzer</i> – analizator učinkovitosti fotosinteze
PI _{ABS}	<i>performance indeks</i> – indeks fotosintetske učinkovitosti
Pi	anorganski fosfat
PPFD	<i>photosynthetic photon flux density</i> – gustoća fluksa fotona
PQ	plastokinon
PQH ₂	plastokinol (reducirani plastokinon)
PSI	fotosustav I
PSII	fotosustav II
Q _A	vezani plastokinon
Q _B	slabo vezani (mobilni) plastokinon
qN	koeficijent nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila <i>a</i>
qP	koeficijent fotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila <i>a</i>
RC	<i>reaction center</i> – reakcijsko središte
ROS	<i>reactive oxygen species</i> – reaktivne kisikove jedinke
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> – natrij dodecil sulfat
SP	<i>saturation pulse</i> - saturacijski puls
TAE	tris-acetatni-EDTA pufer
T-DNA	regija tumor inducirajućeg plazmida Ti bakterije <i>A. tumefaciens</i>
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
TROL	<i>thylakoid rhodanase like protein</i>
Trx	tioredoksin
UV	<i>ultraviolet</i> – ultraljubičasto zračenje
WT	<i>wild type</i> – divlji tip

UVOD

1 UVOD

Oksigena fotosinteza je proces kod kojeg se svjetlosna energija pretvara u kemijsku pomoću velikog broja složenih i međusobno povezanih reakcija. Proces podrazumijeva svjetlosne reakcije koje se odvijaju u tilakoidnim membranama i reakcije fiksacije ugljika koje se odvijaju u stromi (Calvin - Bensonov ciklus). Kod vaskularnih biljaka proces fotosinteze odvija se u fotosintetski aktivnim plastidima kloroplastima, kojima je za djelovanje nužna koordinacija ekspresije dva odvojena genetička sustava, plastida i jezgre stanice u kojoj se plastid nalazi (Balsera i sur. 2009). Primarne reakcije fotosinteze odvijaju se na četiri proteinska kompleksa, fotosustav I (PSI), fotosustav II (PSII), citokrom *b₆f* i F-ATPaza (Nelson i Benn-Shem 2005). Kako bi osigurao svoju primarnu zadaću pod različitim okolišnim uvjetima cijeli sustav mora biti izuzetno dobro dinamički usklađen. Iako su uloge većine podjedinica uključenih u proces poznate, postoji veliki broj pomoćnih proteina čija funkcija nije istražena, a nužni su za razumijevanje regulacije fotosintetskih mehanizama.

Vrsta *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) predstavlja važan model za identifikaciju biljnih gena i utvrđivanja njihovih funkcija. Sekvenciranjem genoma ove biljke omogućeno je identificiranje i istraživanje novih gena i njihovih proteinskih produkata. Gen At4g01050 smješten na četvrtom kromosomu vrste *A. thaliana* kodira protein TROL (*thylakoid rhodanase like protein*). TROL sudjeluje u vezanju feredoksin-NADP⁺-oksidoreduktaze (FNR) i održavanju linearnog toka elektrona kod viših biljaka. Vezivanje FNR-a za protein TROL je dinamičko, te ovisno o promjeni pH vrijednosti. Prema Vojta i sur. (2015) dinamika vezivanja i otpuštanja FNR-a na TROL služi održavanju puta linearnog prijenosa elektrona (LET), odnosno nastajanja NADPH.

TROL je svojim većim dijelom smješten na stroma-tilakoidima. Svojim C-terminalnim dijelom okrenut je prema stromi i tu je smještna hidrofobna domena ITEP, a središnji dio proteina čini rodanazama slična domena RHO smještna u lumenu tilakoida. Između te dvije domene smještna je regija bogata prolinom nazvana domena PEPE (Pantoja-Uceda i sur. 2005, Jurić i sur. 2009). Prolin ima stuktturnu ulogu kod transmembranskih uzvojnica, a prolinski ostatak narušava alfa-uzvojnice uslijed gubitka najmanje jednog vodikovog mosta, te dovodi do fleksibilnosti same uzvojnice, odnosno do izvijanja i okretanja. Funkcionalno takvi

molekularni zglobovi imaju ulogu otvaranja i zatvaranja putova za protok iona (Bright i sur, 2002) i pretpostavka je da i PEPE domena predstavlja takav molekularni zglob uključen u regulaciju toka elektrona u procesu vezivanja FNR na TROL.

Za potrebe utvrđivanja moguće uloge domene PEPE proteina TROL modificiran je nukleotidni slijed molekule DNA koja kodira protein TROL i kreiran je delecijски mutant bez domene PEPE (Δ PEPE). Protein TROL integralni je protein tilakoidnih membrana i zadužen je za vezivanje feredoksin-NADP⁺-oksidoreduktaze, enzima koji katalizira završni korak prijenosa elektrona na molekulu NADP⁺. Ova reakcija ujedno je i poveznica između svjetlosnih reakcija i biokemijskog metabolizma kloroplasta. FNR održava dinamiku sustava i dođe li do narušavanja te dinamike redoks stanje je narušeno te se aktiviraju alternativni putevi prijenosa elektrona poput pseudo-cikličkog toka (Mehlerova reakcija). Vojta i sur. (2015) predlažu novi model kod kojega u odsustvu TROL-a dinamičko vezivanje i otpuštanje FNR-a održava linearni tok elektrona i prije nego se pseudo-ciklički tok aktivira. Pretpostavlja se da će i nedostatak domene PEPE dovesti do promjena u linearnom toku elektrona što će se u konačnici odraziti i na samu funkcionalnost kako proteina TROL, tako i cijelog fotosintetskog aparata.

Kao abiotski stresni čimbenik korištena je svjetlost vrlo viskog intenziteta, što dodatno negativno utječe na učinak fotosinteze. Primarna oštećenja se događaju unutar reakcijskih središta PSII, no biljke su evolucijski razvile mehanizme oporavka kojima mogu minimizirati potencijalna oštećenja sustava. Biljke kojima je stabilnost sustava već značajno narušena uklanjanjem funkcionalne domene, u uvjetima svjetlosnog stresa imaju smanjenu sposobnost opiranja štetnim utjecajima svjetlosti (Adir i sur. 2003, Alves i sur. 2002). Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* dobiven je uvid u stanje fotosintetskog aparata utvrđivanjem parametra funkcionalnosti fotosinteze u mutantama bez domene PEPE.

Razvojem molekularnih metoda u novijoj povijesti omogućeno je istraživanje složenih procesa fotosinteze. Nove spoznaje o putovima toka elektrona i općenito o regulaciji fotosintetskih mehanizama nužne su za razumijevanje evolucijskih procesa, no također se mogu koristiti u modernoj poljoprivredi za razvoj novih biljnih kultivara veće produktivnosti, poboljšanih senzorskih i nutritivnih svojstava, povećane tolerancije na stres izazvan sušom i salinitetom, proizvodnji energije, farmaceutskoj industriji i drugo.

1.1 Pregled dosadašnjih istraživanja

1.1.1 Fotosinteza vaskularnih biljaka

Fotosinteza predstavlja glavni izvor kisika i organskih spojeva, a time i temelj života na Zemlji. Biljke, alge i neke bakterije apsorbiraju sunčevu svjetlost i prevode ju u kemijsku energiju organskih spojeva pomoću fizikalno-kemijskog procesa – fotosinteze. Kod biljaka, algi i cijanobakterija proces podrazumijeva fiksaciju ugljikova dioksida iz atmosfere čime se sintetiziraju ugljikohidrati i oslobađa molekularni kisik. Ovaj proces nazivamo još i oksigena fotosinteza. Neke fotosintetske bakterije mogu kao izvor elektrona umjesto vode koristiti sumporne spojeve ili jednostavne organske molekule pri čemu neće doći do oslobađanja kisika, te takvu fotosintezu nazivamo anokisgenom (Feyziyev 2010).

Fotosinteza započinje apsorpcijom fotona pomoću molekula pigmenata (antene) čime se energijom fotona te molekule prevode u elektronski pobuđeno stanje. Takve antene čine stotine različitih pigmenata poput klorofila, karotenoida, bakterioklorofila i sl, koji su vezani na proteine unutar fotosintetske membrane. Kada foton padne na molekulu pigmenta on se ili reflektira ili apsorbira ovisno o valnoj duljini. Pigment klorofil apsorbira svjetlost nižih valnih duljina od 480 nm, te dio spektra između 550 i 700 nm, dok reflektira dio spektra od 480 – 550 nm zbog čega je taj pigment te listovi i ostali biljni dijelovi koji ga sadrže, zelene boje (Heldt 2005). U antenama se prenosi apsorbirana energija i koristi za primarnu reakciju fotosinteze u reakcijskom središtu. Dio energije se izgubi u obliku topline i fluorescencije.

1.1.2 Fotosintetski reakcijski centri

U procesima oksigene fotosinteze svjetlosna se energija koristi za sintezu ATP i NADPH, te produkciju kisika iz vode. Proces se odvija pomoću četiri proteinska kompleksa: fotosustav I (PSI), fotosustav II (PSII), citokrom *b₆f* i F-ATPaza. PSI i PSII sadrže klorofil i druge pigmente koji apsorbiraju svjetlosnu energiju i odvede ju do reakcijskih središta. Dovedena energija inducira eksitaciju posebnog para molekula klorofila, što dovodi do translokacije elektrona uzduž membrane pomoću lanca kofaktora. Donor elektrona u ovoj reakciji je voda koja se oksidira do molekularnog kisika i 4H⁺ pomoću PSII. Tako nastali elektroni putuju preko plastokinona i

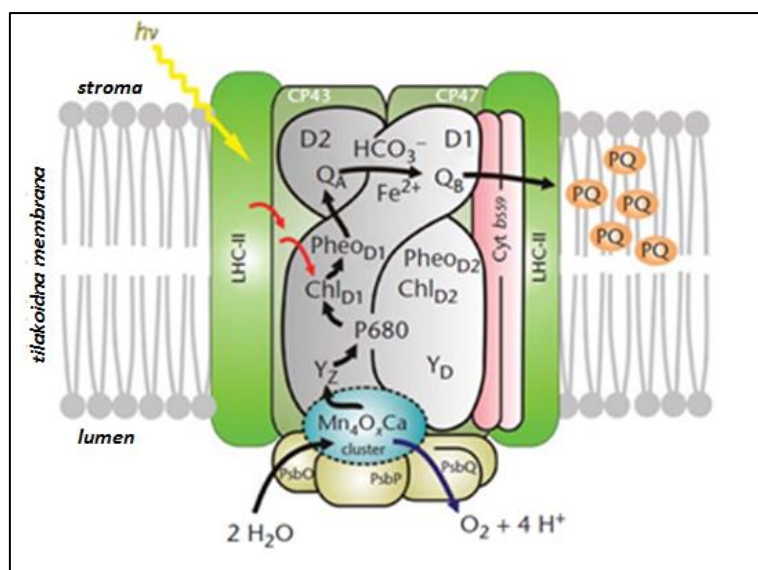
citokrom b_6f kompleksa do plastocijanina, a zatim se elektron prenosi preko PSI do feredoksina koji se nalazi na nasuprotnoj (stromalnoj) strani. Reducirani feredoksin koristi se za veliki broj reakcija i regulatornih ciklusa poput vezivanja dušika, desaturacije masnih kiselina i produkcije NADPH. Razlika u naboju u PSI i PSII, zajedno sa transportom elektrona kroz citokrom b_6f kompleks dovodi do nastanka elektrokemijskog potencijala potrebnog za sintezu ATP pomoću F-ATP sintaze (Nelson i Benn-Shem 2005).

1.1.2.1 Fotosustav II

Fotosustav II prvi je u seriji membranskih proteinskih kompleksa koji iskorištavaju svjetlosnu energiju za prijenos elektrona od H_2O do $NADP^+$ pri čemu se oslobađa molekularni kisik. Elektroni iz vode nizom redoks-reakcija prenose se do $NADP^+$ i nastaje snažan reducens NADPH, te se stvara gradijent protona potreban za sintezu ATP-a. PSII kompleks se sastoji od četiri velike unutar-membranske podjedinice nazvane PsbA-D, te tri izvan-membranske podjedinice nazvane PsbO-Q kod biljaka, odn. PsbO, U i V kod cijanobakterija. Također sadrži i veliki broj malih podjedinica. PsbA (D1) i PsbD (D2) na sebe vežu šest klorofila a i dvije molekule feofitina a , a PsbB (CP47) i PsbC (CP43) vežu 16 odnosno 14 molekula klorofila a (Dekker i Boekema 2005).

Polipeptidi D1 i D2 čine fotokemijsko reakcijsko središte okruženo sustavom antena za hvatanje svjetlosti (Slika 1). Antene čine proteinski kompleksi koji sadrže molekule za apsorpciju svjetlosti poput klorofila. Molekule klorofila hvataju fotone i prevode energiju eksitacije do reakcijskog središta gdje se odvija primarno razdvajanje naboja i započinje transport elektrona (Govindjee i sur. 2010). Polipeptidi D1 i D2 formiraju heterodimerno središte PSII reakcijskog središta u kojemu je smještena većina kofaktora uključenih u transport elektrona. Na D1 i D2 vezan je poseban par molekula klorofila a , P680 koji maksimalno apsorbira crvenu svjetlost valne duljine od 680 nm. Uslijed eksitacije P680 rapidno prenosi elektrone do feofitina a (molekula klorofila a kojoj je magnezij zamijenjen sa dva H^+). S feofitina a elektroni se prenose na plastokinon čvrsto vezan za Q_A mjesto, a potom prelaze na plastokinon smješten na Q_B mjestu na D2 podjedinici. Kada Q_B primi dva elektrona, uz utrošak dva protona iz strome, nastaje plastokinol (PQH_2). Uslijed vrlo brzog prijenosa elektrona sa P680 na feofitin a , stvara se pozitivan oblik $P680^+$ koji

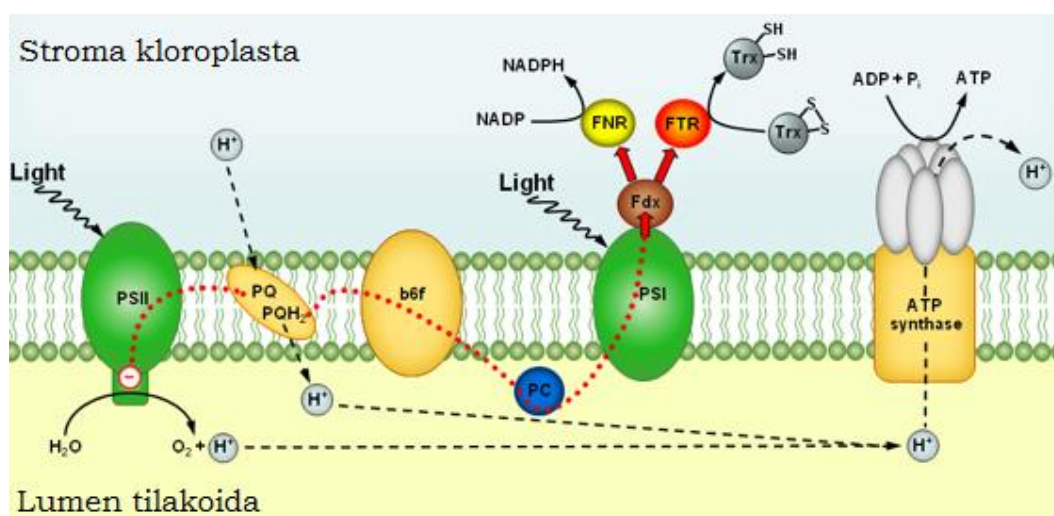
je izuzetno jak oksidans, te izvlači elektrone iz molekule vode vezane na mangansko središte. PSII je jedini poznati proteinski kompleks koji može oksidirati vodu. Voda je izrazito slabi elektron donor i način na koji se elektroni prenose sa vode na P680⁺ još uvijek nije poznat. Mangansko središte čine četiri iona mangana, ion kalcija, kloridni ion, te tirozin radikal. Mangan je redoks središte i dolazi u četiri vrlo stabilna oksidacijska stanja Mn²⁺, Mn³⁺, Mn⁴⁺ i Mn⁵⁺. Svaki puta kada dođe do otpuštanja e⁻ sa P680, pozitivan oblik P680⁺ povuče par elektrona iz manganskog središta. Za oksidaciju molekule vode i nastanak jedne molekule O₂ potrebno je 4 e⁻ sa dvije molekule plastokinona. Redukcija plastokinona se odvija na strani membrane okrenutoj prema stromi, dok je manganski kompleks na strani lumena tilakoida. Za svakih četiri elektrona preuzetih sa molekule vode nastaju dvije molekule PQH₂ povlačeći 4 H⁺ iz strome. Četiri protona nastala oksidacijom vode otpuštaju se u lumen tilakoida. Na taj način nastala distribucija protona kroz tilakoidne membrane stvara pH gradijent sa niskom pH vrijednošću u lumenu, a visokom u stromi (Slika 2).



Slika 1. Shematski prikaz PSII kod viših biljaka i zelenih algi (Govindjee i sur. 2010).

Okolišni uvjeti često limitiraju učinkovitost fotosinteze. Apsorpcija više svjetlosti nego što je moguće upotrijebiti u procesu fotosinteze predstavlja stres. Suvišak svjetlosti može dovesti do neželjenih reakcija u lancu prijenosa elektrona, te

posljedično i do kratkotrajnih čak i dugotrajnih oštećenja sustava. Fotosintetski organizmi su razvili različite strategije borbe protiv oštećenja uslijed svjetlosnog stresa. Jedan od dominantnijih mehanizama obrane je tzv. nefotokemijsko gašenje fluorescencije klorofila *a* (quenching) što predstavlja dinamičko reguliranje puteva prijenosa energije eksitacije unutar sustava antena uslijed čega se energija eksitacije pretvara u toplinu prije nego dođe do reakcijskog središta. U uvjetima suviška svjetlosti čak polovica apsorbirane svjetlosti se može prevesti u toplinu (Meyer i sur. 2009).



Slika 2. Transport elektrona i protona unutar tilakoidne membrane s pripadajućim reakcijama: Elektroni otpušteni uslijed oksidacije vode prenose se kroz PSI, plastokinon (PQ), citokrom *b₆f* kompleks, plastocijanin (PC), te PSII do feredoksina (Fdx). Reducirani feredoksin reducira ili tioredoksin (Trx) pomoću feredoksin:tioredoksin reduktaze (FTR) ili NADP pomoću feredoksin: NADP reduktaze (FNR). Protoni otpušteni u lumen tilakoida uslijed oksidacije H_2O i PQ koriste se za sintezu ATP (Meyer i sur. 2009).

Unatoč ovom obrambenom mehanizmu PSII je podložan oštećenju uslijed nastalih redoks reakcija povezanih sa snažnim oksidansima i reducensima u sustavu. Kako bi se izbjegla oštećenja PSII posjeduje redoks komponente sposobne prihvatiti ili otpustiti elektrone ukoliko je potrebno. Takav primjer je citokrom b599 koji može deaktivirati izrazito štetno redoks stanje PSII. Također neki karotenoidi i klorofili

prisutni na D1/D2 mogu poslužiti kao alternativni elektron donori za P680⁺ u slučajevima kada je kompleks za oksidaciju vode inaktivan (Govindjee i sur. 2010).

1.1.2.2 Citokrom *b₆f*

Transport elektrona između PSII i PSI odvija se preko Citokrom *b₆f* kompleksa (Cyt *b₆f*). Cyt *b₆f* sadrži četiri velike podjedinice: Cyt *f*, Cyt *b₆*, Rieske željezo-bakar protein i podjedinicu IV, te četiri male hidrofobne podjedinice: PetG, PetL, PetM i PetN. Uloga kompleksa je da katalizira prijenos elektrona s lipofilnog PQH₂ nastalog u PSII na hidrofilni plastocijanin (PC), te se još naziva i plastokinon-plastocijanin oksidoreduktaza. PC je nosač elektrona topiv u vodi smješten u lumenu tilakoida. Sadrži jedan atom bakra i izrazito je plave boje. PC prenosi elektrone sa Cyt *b₆f* na PSI. Cyt *b₆f* kompleks ima važnu ulogu u stvaranju elektrokemijskog potencijala nužnog za sintezu molekule ATP-a (Feyziyev 2010, Ke 2001).

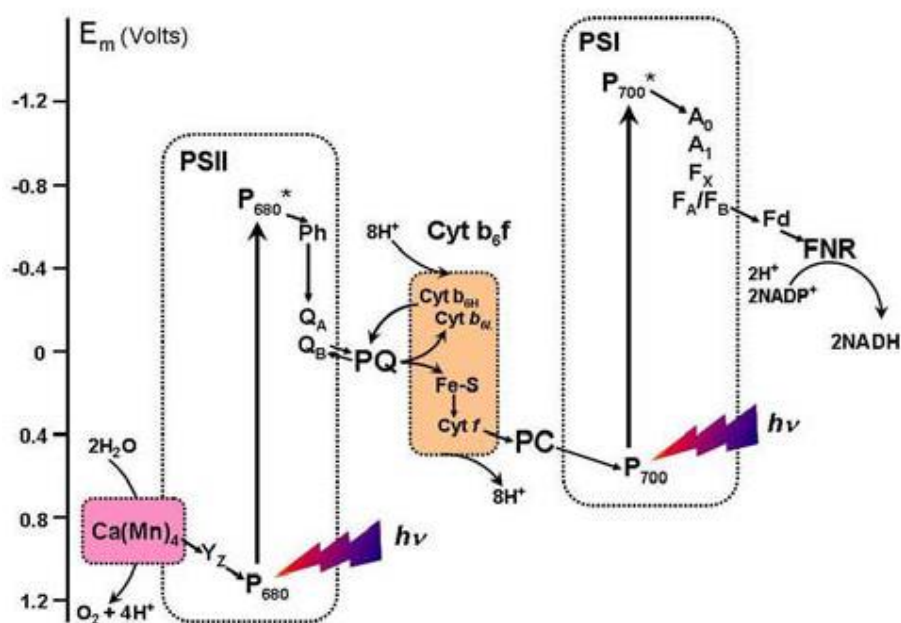
1.1.2.3 Fotosustav I

Fotosustav I katalizira završni korak svjetlosnih reakcija. Reducira feredoksin osiguravajući elektrone za redukciju NADP⁺ u NADPH pomoću feredoksin-NADP⁺ oksidoreduktaze (FNR). NADPH i ATP se koriste za redukciju CO₂ do ugljikohidrata u sekundarnim reakcijama fotosinteze. PSI je veliki proteinski kompleks, smješten na tilakoidnoj membrani, koji katalizira prijenos elektrona s plastocijanina ili citokrom *b₆f* na luminalnoj strani na feredoksin ili flavodoksin na stromalnoj strani membrane. Kompleks čine 13 zasebnih proteina (12 kod cijanobakterija) nazvanih prema njihovim genima (PsaA – PsaX). Veliki broj sastavnica PSI uključen je u procese apsorpcije svjetlosne energije, razdvajanje naboja i prevencije foto-oštećivanja. Antene PSI organizirane su slično kao i kod PSII, dok se sadržaj pigmenta značajno razlikuje, PSI sadrži većinom klorofil *b*. Reakcijsko središte čini poseban par klorofila P700 smještenih u blizini lumenalne strane membrane.

Svjetlost se apsorbira preko velikog sustava antena sačinjenog od 90 molekula Chl *a*, te 22 molekule karotenoida. Energija eksitacije se potom prenosi sa antena na primarni elektron donor P700 pri čemu se oksidira plastocijanin, te se PSI još naziva i plastocijanin-NADP⁺ oksidoreduktaza. Energija ekscitacije se koristi za

stvaranje ekscitiranog oblika P700*, dovodeći do razdvajanja naboja pri čemu preostaje P700⁺ a elektron se prenosi duž tilakoidne membrane pomoću lanca prijenosa elektrona (Fromme i sur. 2013, Ke 2001).

Lanac prijenosa elektrona koji sudjeluje u transmembranskom razdvajanju naboja je najznačajniji dio PSI. Prijenosnici elektrona su: primarni donor P700, A₀ (molekula Chl a), A₁ (filokinon), te tri [4Fe4S] klastera F_x, F_A, F_B (Slika 3).



Slika 3. Relativni redox potencijal kofaktora u linearnom toku elektrona od vode do NADP⁺ (Feyziyev 2010).

Nakon što se P700 ekscitira do najnižeg ekscitiranog stanja P700* elektron se vrlo brzo prenosi do A₀. P700* ima izrazito negativni redoks potencijal, te je vrlo jak reducens. A₀ je anion klorofila s vrlo niskim potencijalom i e⁻ brzo prelazi na slijedeći akceptor A₁, te potom na F_x, F_A i F_B. Konačno elektroni prelaze sa RC na feredoksin (Fd), mali protein (10 kDa) sa 2Fe-2S klasterom kao aktivnim središtem.

Većina proteina u PSI kompleksu su vezani na membrani izuzev željezo-sumpor proteina koji sadrže F_A i F_B, te Fd-vezujućih proteina koji su orijentirani prema stromi. Interakcija između feredoksina i tilakoidne membrane se odvija na dva mjesta: Fd prima elektrone s reducirajuće strane PSI, potom se re-oksidira pomoću

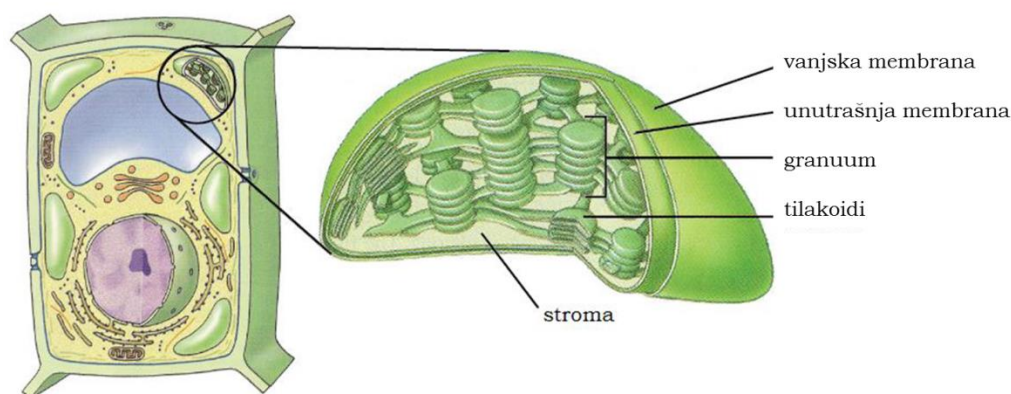
tilakoid-vezujućeg FAD-flavoproteina FNR-a koji formira kompleks s Fd. Reducirani FNR se potom oksidira pomoću NADP⁺ (Nelson i Yocum 2006, Feyziyev 2010).

1.1.2.4 F-ATPaza

PSII proizvodi snažan oksidans P680⁺ koji može izdvojiti elektrone iz vode, dok PSI proizvodi snažan reducens P700* koji može reducirati NADP⁺. Ukupan transport elektrona od cijepanja vode u lumenu sve do NADP⁺ u stromi teče vektorski linearno što rezultira nastajanjem električnog potencijala na membrani s pozitivnim nabojem s unutrašnje, te negativnim s vanjske strane. Protoni nastali oksidacijom vode otpuštaju se s unutrašnje strane membrane uslijed čega dolazi do zakiseljavanja luminalnog prostora. Također protoni se povlače i sa stromalne strane pri čemu nastaje PQH₂, a zatim se otpuštaju na lumenalnoj strani uslijed reoksidacije PQH₂. Sve to dovodi do stvaranja gradijenta protona kroz tilakoidne membrane. F-ATPaza koristi nastalu potencijalnu energiju difuzije H⁺-iona u smjeru pada elektrokemijskog gradijenta za sintezu ATP-a. F-ATPaza još nazvana i ATP sintaza sintetizira ATP iz ADP-a i anorganskog fosfata (P_i), a energiju potrebnu za sintezu osigurava elektrokemijski potencijal gradijenta protona kroz membranu (Yoshida i sur. 2001, Boyer 1997).

1.1.3 Kloroplasti i tilakoidne membrane

Svi kompleksi uključeni u pretvorbu energije koncentrirani su u posebnim staničnim organelima, kloroplastima (Slika 4). Kloroplasti se repliciraju samostalnom diobom, te sadrže vlastiti genetički materijal. Odvojeni su od ostatka biljne stanice dvostrukom, selektivno-permeabilnom membranom koja pomoću intermembranskih proteina regulira transport makromolekula u kloroplastima. Unutrašnji prostor kloroplasta, stroma, bogata je proteinima. Sadrži enzime uključene u stanične procese, DNA kloroplasta, te ribosome i ostale molekule neophodne za sintezu proteina. Škrob nastao procesom fotosinteze skladišti se u stromi u obliku granula.



Slika 4. Struktura kloroplasta.

https://online.science.psu.edu/biol011_active002/node/4190. 14.07.2014.

Uz unutrašnju i vanjsku membranu, kloroplasti sadrže i vrlo složeni sustav tilakoidnih membrana. Kod biljaka su tilakoidne membrane smještene u stromi kloroplasta, dok se kod cijanobakterija nalaze u citosolu. Tilakoidi formiraju zatvorenu trodimenzionalnu mrežu zatvarajući prostor ispunjen vodom i otopljenim tvarima nazvan lumen, a koji čine dvije strukturno različite domene: plosnate sabijene strukture - granuumi i regije koje ih povezuju, stroma-tilakoidi. Lumen je bogat plastocijanima i drugim molekulama nužnim za transport elektrona. Svaki kloroplast sadrži približno 10 – 100 grana-tilakoda. Stroma-tilakoidi povezuju grana-tilakoide i čine zatvoreni kontinuirani membranski sustav, tako da je unutarnji prostor, lumen, u potpunosti odvojen od strome što je od ključnog značaja za sustav prijenosa energije u procesima fotosinteze (Feyziyev 2010, Ke 2001).

1.1.4 Rodanaze

Rodanaze, tiosulfat:cijanid sumportransferaze (TST) enzimi su prisutni u svim živim organizmima od bakterija do ljudi, a glavna im je uloga u detoksikaciji cijanida. Rodanaze kataliziraju biotransformaciju cijanida u tiocijanat, odnosno prijenos sumpora (Slika 5). Slobodne molekule enzima prihvaćaju atome sumpora sa anionskog donora koji sadrži sulfatnu skupinu i prenose ga na izrazito tiofilne anione (Steinmetz i Fischer 1985).

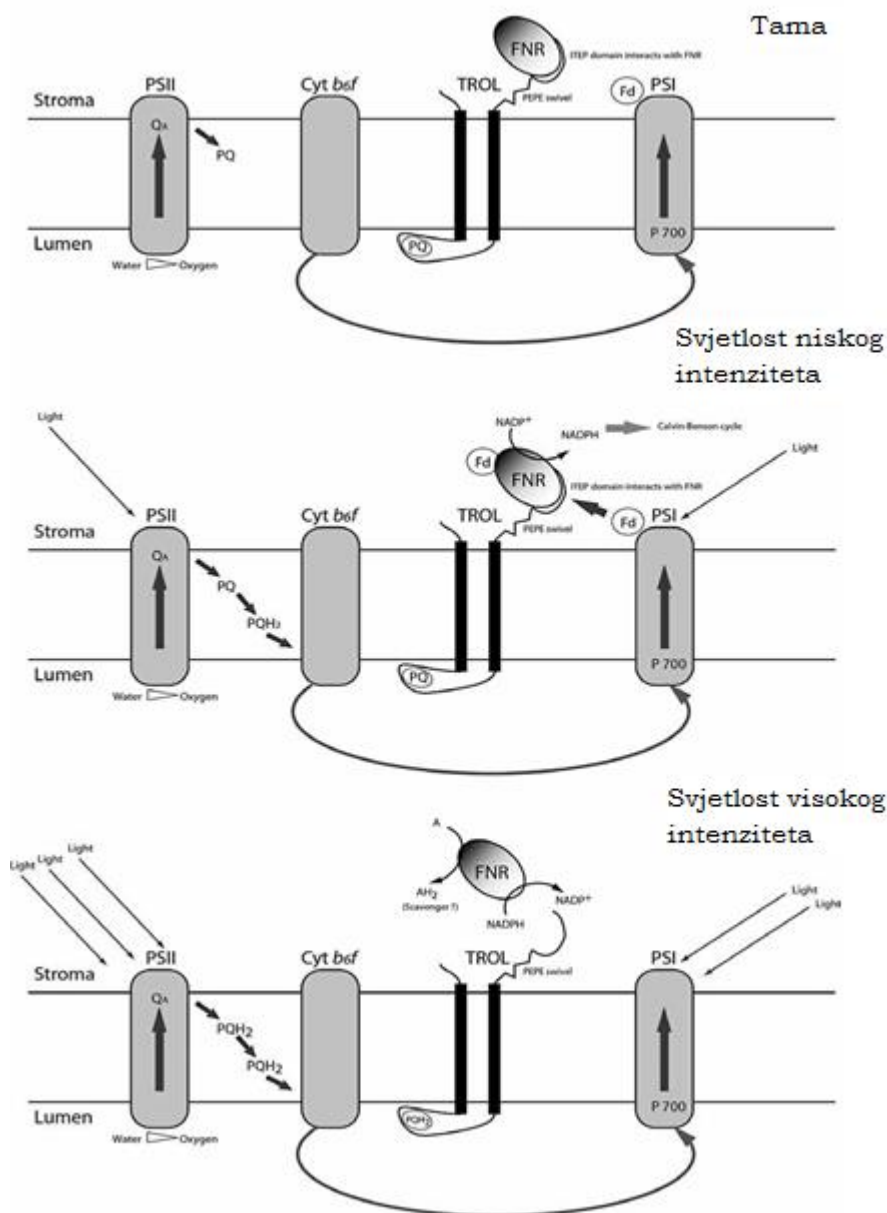
rodanaznom domenom, proteini s tandem domenom, multidomeinski proteini i proteini s produljenom petljom na aktivnom središtu.

Još je velik broj neodgovorenih pitanja vezanih uz fiziološke funkcije i mehanizme djelovanja pojedinih proteina nalik rodanazama. Sve je veći broj novo identificiranih proteina iz ove skupine sa vrlo različitim i specijaliziranim funkcijama što potvrđuje koliko je raznovrsna uloga rodanaza u staničnim procesima (Cipollone i sur. 2007).

1.1.4.2 TROL

Jurić i sur. (2009) opisali su membranski protein nalik rodanazama nazvan TROL (*thylakoid rhodanese-like*) koji je nužan za vezanje FNR-a i održavanje linearnog transporta elektrona. TROL kodira gen At4g01050 smješten na 4. kromosomu vrste *A. thaliana*. Struktura ovog gena, te usporedba sa drugim proteinima s rodanaznom homologijom ukazuje na razlike u duljini i konformaciji petlji, te moguću ulogu nekatalitičkih rodanaznih domena u sumpornim transferazama (Pantoja-Uceda i sur. 2005).

Prema Jurić i sur. TROL čine dvije različite domene, središnja nalik rodanazama (RHO) i C-terminalni hidrofobni dio koji izravno sudjeluje u vezanju FNR-a (ITEP). TROL je integralni membranski protein, čvrsto vezan za tilakoidnu membranu. Veličine je 66 kDa i sadrži dvije transmembranske uzvojnice, te centralno smještenu inaktivnu rodanaznu domenu. Ovaj protein predstavlja jedinstveni spoj dva različita modula, domenu RHO koju susrećemo u svim živim sustavima, te C-terminalnu hidrofobnu regiju za vezivanje FNR-a, ITEP koju nalazimo u vaskularnim biljkama. Pretpostavlja se da su C-terminalni i N-terminalni dio orijentirani prema stromi, dok se RHO domena nalazi u lumenu tilakoida (Vojta i sur. 2012). Uzvodno od ITEP domene uočena je regija bogata prolinom nazvana PEPE za koju se pretpostavlja da je okrenuta prema stromi. Domenu PEPE karakterizira ponavljajući slijed Pro-Val-Pro za koji se pretpostavlja da je zaslužan za fleksibilnost uzvojnice.



Slika 6. Shematski prikaz vezivanja i otpuštanja FNR-a (Vojta i sur. 2012).

Kao transmembranski protein, TROL je čvrsto pričvršćen za tilakoidnu membranu i ne može se ekstrahirati s membrane u suvišku soli, uree ili kod visoke pH vrijednosti. TROL, kao i FNR, uglavnom je smješten na stroma tilakoidima, no može biti ugrađen u unutarnju membranu kloroplastne ovojnice. TROL sa FNR-om formira proteinski kompleks veličine 190 kDa na samoj tilakoidnoj membrani, te predstavlja svojevrsno molekularno sidro za vezivanje FNR-a za tilakoidnu membranu (Mulo 2011). TROL susrećemo i u drugim kompleksima, no samo kompleksi veličine 190 kDa ukazuju na vezivanje s FNR. Istraživanja na biljkama

divljeg tipa vrste *A. thaliana* uzgajanih u različitim svjetlosnim uvjetima ukazuju na ulogu TROL-a kao molekularnog sidra, te da TROL-FNR kompleksi izravno utječu na fotosintetsku učinkovitost biljaka (Slika 6). TROL stabilizira FNR u tami, najvjerojatnije kako bi spriječio otpuštanje elektrona s NADPH što bi narušilo tzv. nizvodne reakcije. U suvišku svjetlosti TROL otpušta FNR, pri čemu FNR katalizira obrnuti protok elektrona s NADPH na potencijalne akceptore (Vojta i sur. 2012, Jurić i sur. 2013).

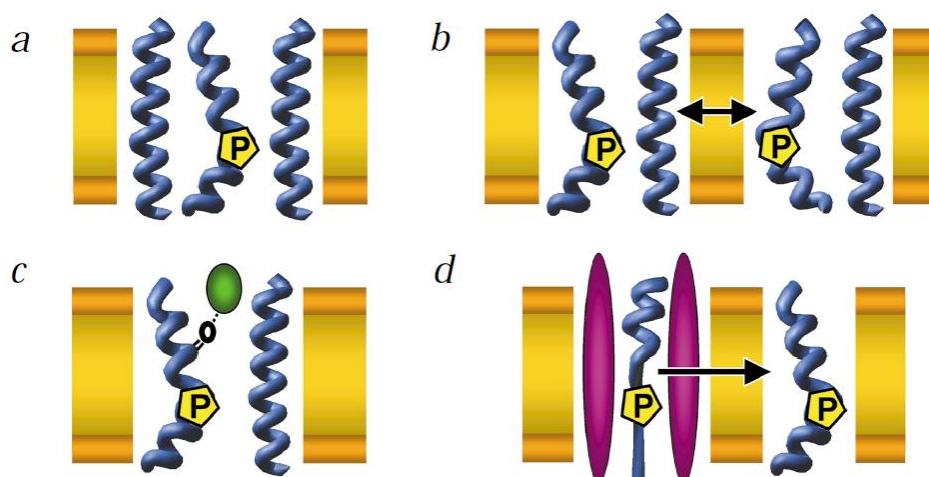
1.1.4.3 Prolinske regije u transmembranskim uzvojnica

Prolin se razlikuje od ostalih aminokiselina po cikličnom bočnom lancu sa dušikom. To čini konformaciju prolina ograničenom na 65° , a i ograničava konformaciju prethodnog ostatka na lancu zbog N-supstituenta i rezultira snažnom preferencijom β -konformacije. Kao posljedica, poliprolinske sekvence imaju tendenciju usvajanja tzv. PP II uzvojnice, proširene strukture s tri ostataka po petlji. To znači da se dva prolina nalaze na istoj strani uzvojnice, što im omogućava interakciju s proteinom. Kod PP II uzvojnice prolini tvore kontinuirani hidrofobni niz duž površine uzvojnice, dok je karbonilna okosnica idealno vezno mjesto za vodik, što ju čini konformacijski ograničenom (a time i slabo hidratiziranom), te bogatom elektronima (Kay i sur. 2000).

Proteini su sačinjeni od relativno krutih sekundarnih strukturnih elemenata međusobno povezanih nešto fleksibilnijim petljama i zavojnicama. α -uzvojnica je jedna od najčešćih sekundarnih struktura proteina i predstavlja ključni strukturni element membranskih proteina. Većinom su to transmembranske (TM) α -uzvojnice, stabilizirane u niskom dielektričnom okruženju lipidna dvosloja gdje se formiraju strogo usmjereni vodikovi mostovi. Još su uvijek nedovoljno istražene veze između sekvenci i struktura, te između struktura i funkcija TM uzvojnica što predstavlja svojevrsan izazov za istraživače, a posebice ostaje nejasno jesu li TM α -uzvojnice čvrste ili neke pokazuju strukturno i funkcionalno značajnu unutarnju fleksibilnost (Bright JN i Sansom MSP, 2002).

Izvijanje inducirano prolinom susrećemo i kod topivih i kod TM α -uzvojnica. Ono utječe na ukupnu arhitekturu pora kroz membranu, te na pravilno pozicioniranje ključnih aminokiselinskih ostatatka unutar transmembranske regije (Slika 7.a). Pretpostavka je da prolin pridonosi dinamici membranskih transportera uslijed

stvaranja C-N veze između prolina i N-terminalne skupine susjedne aminokiseline, te takve konformacijske promjene kod membranskih transportera mogu izazvati rotacije (Slika 7.b).



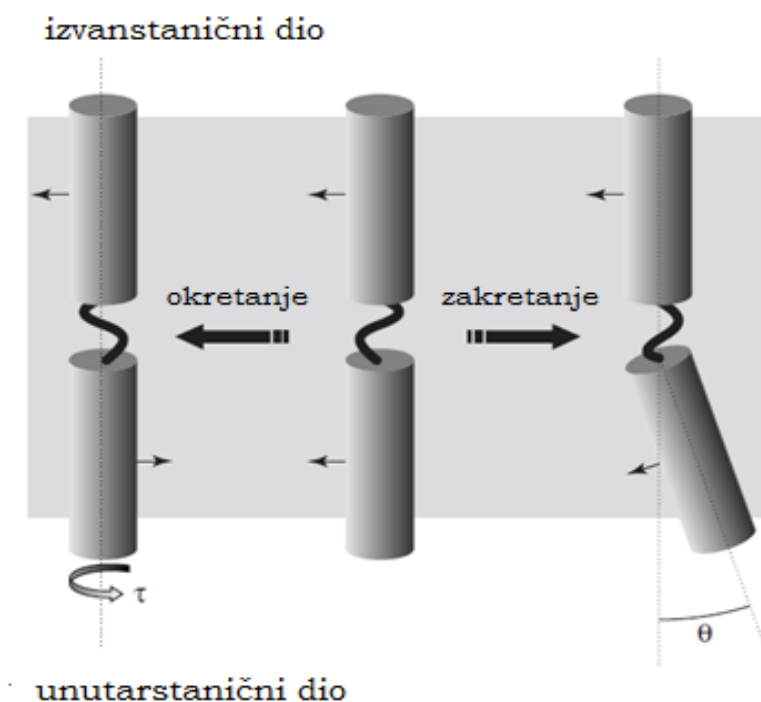
Slika 7. Moguća uloga prolina u TM uzvojnica membranskih proteina (Deber i Therien, 2002).

Treća moguća uloga prolinskog ostatka više je funkcionalna nego koformacijska i proizlazi iz nedostatka protona u peptidnoj vezi prolina s nekim drugim aminokiselinskim ostatkom, što narušava sustav vodikovih veza α -uzvojnice (karbonilni kisik na *Pro* lokusu može izazivati polarne interakcije s različitim supstratima i/ili ionima, Slika 7.c). Slika 7.d prikazuje moguću ulogu prolina u destabilizaciji krivo uvijenog TM segmenta i generiranju pravilne konformacije (Deber i Therien 2002, Wigley i sur. 2002, Senes i sur. 2004).

Prema Sansom i Weinstein (2000) strukturni motivi koji sadrže prolinske ostatke predstavljaju svojevrsne „prekidače“ u prijenosu signala kroz membranu. Prolinski ostatak zaslužan je za izvijanje uzvojnice što dovodi do otvaranja i zatvaranja puteva za protok iona kroz membranu. Razlikujemo dva osnovna tipa izvijanja koja oba mogu sudjelovati u prijenosu signala s jedne na drugu stranu membrane: okret oko osi τ i zakretanje za kut θ (Slika 8).

Prolinski ostaci od velikog su značaja za funkcionalnost, strukturu i termodinamička svojstva integralnih membranskih proteina. Njihovo prisustvo u TM uzvojnica od velikog je značaja kako za prijenos signala kroz membranu,

tako i za ostale transmembranske proteine poput membranskih transportnih proteina, proteina nosača, bakterijskih membranskih proteina, virusnih glikoproteina i dr. (Perálvarez-Marín i sur. 2008).



Slika 8. Shematski prikaz dva tipa izvijanja povezanih sa prolinskim ostatkom unutar TM uzvojnice (Sansom i Weinstein 2000).

1.1.5 Vrsta *Arabidopsis thaliana* – modelna biljka za genetička istraživanja

Vrsta *A. thaliana*, kritosjemenjača iz porodice *Brassicaceae*, jedan je od najzastupljenijih biljnih modela za istraživanje biologije biljaka, te za rješavanje temeljnih pitanja bioloških struktura i funkcija zajedničkih za sve eukariote. Osamdesetih godina prošlog stoljeća biljni biolozi su tražili prikladan biljni organizam za istraživanja. Pojavom prvih staničnih transformacija upotrebom agrobakterija nametnula se mala korovska biljka *Arabidopsis sp.* s malim genomom koji se lako može podvrgnuti detaljnim molekularnim analizama. 1996. godine uspostavlja se tzv. „Arabidopsis genom inicijativa“ s ciljem potpunog sekvenciranja genoma biljke, a koji će se deponirati u javno dostupne baze podataka. Konačnim

sekvenciranjem biljke koncem 2000. godine identificirano je približno 20.000 gena organiziranih unutar pet kromosoma. Vrsta *A. thaliana* rasprostranjena je na tlu cijele Europe, Azije i Sjeverne Amerike. Ekotipovi Columbia i Landsberg prihvaćeni su kao standardi za molekularna istraživanja.

Vrsta *A. thaliana* je rastom mala, samooplodna biljka. Cvjetovi su oko 2 mm dugački, sjemenke 0.5 mm, a rozeta odrasle biljke 2-10 cm u promjeru ovisno o uvjetima rasta. Odrasla biljka dostiže visinu 15-20 cm i proizvede stotinjak mahuna sa preko 5000 sjemenki. Čitav životni ciklus biljke od klijanja sjemenke, preko formiranja rozete listova, cvjetanja, sazrijevanja i konačno do pojave sjemena traje 6 tjedana. Mali rast omogućava jednostavan uzgoj u Petrijevim zdjelicama ili malim lončićima u laboratorijskim komorama. Razvojem „whole-plant“ metoda transformacije insercijom T-DNA pomoću bakterije *A. tumefaciens*, tisuće transgenih linija postaju dostupni putem javnih distributivnih centara. U proteklih 20 godina identificirano je nekoliko tisuća mutanata. Zbog malog rasta, jednostavnog uzgoja, kratkog životnog ciklusa, te velikog broja dostupnih mutiranih linija, ova vrsta predstavlja nezaobilazni alat kako za fundamentalna istraživanja, tako i za rješavanje praktičnih problema u poljoprivredi, energetici, zaštiti okoliša i sl. (Meinke i sur. 1998).

1.1.6 Fotosinteza i svjetlosni stres

Inhibiciju fotosinteze uzrokovanu prevelikim svjetlosnim zračenjem nazivamo fotoinhibicija ili svjetlosni stres („high-light“ stres). Suvišak svjetlosti može dovesti do razaranja fotosintetskih pigmenata (kronična fotoinhibicija), no pojam također opisuje i reverzibilno smanjenje fotosintetske učinkovitosti izazvano prekomjernom količinom svjetlosti (dinamička fotoinhibicija). Fotoinhibiciju može izazvati ultravioletno (UV) zračenje, vidljivi dio spektra (V), te interakcija UV-V. Pri izlaganju slaboj svjetlosti ($<100 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) preko 80% apsorbirane svjetlosti je iskorišteno u procesima fotosinteze, dok pri vrlo visokom zračenju ($\sim 1000 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) iskorišteno je manje od 25% apsorbirane količine svjetlosti (Alves i sur. 2002, Lichtenthaler i Burkart 1999). Primarna oštećenja se događaju unutar reakcijskih središta PSII. Ireverzibilna oštećenja PSII prisutna su gotovo kod svih intenziteta osvjetljenja, no učinkovitost sustava značajno opada samo ukoliko stupanj oštećenja premašuje sposobnost oporavka biljke, što onda zahtijeva sintezu

proteina *de novo*. Kroz evolucijske procese biljke su se prilagodile kako bi maksimalno iskoristile svjetlost, te pritom minimizirale potencijalna oštećenja sustava. U toku dana dolazi do promjena u kvaliteti i kvantiteti osvjetljenja čemu se biljke u određenoj mjeri mogu uspješno prilagoditi. Ukoliko su takve promjene značajnije može doći do fotoinhibicije (Adir i sur. 2003, Alves i sur. 2002).

Stupanj fotoinhibicije jasno se može odrediti mjerenjem kinetike fluorescencije klorofila. Klorofil *a* zeleni je pigment biljaka, algi i cijanobakterija zaslužan za prikupljanje fotona, te za njihovu primarnu pretvorbu u redoks potencijal i gradijent protona. Iako se pretvorba odvija s vrlo visokom učinkovitosti, manji dio apsorbiranih fotona se re-emitira u obliku crvene fluorescencije. Udio te emisije izravno je ovisan o metaboličkom stanju same biljke i predstavlja osnovu za mjerenja učinkovitosti fotosinteze preko fluorescencije (Strasser i sur. 2004). *In vivo* mjerenja fluorescencije Chl *a* koriste se za različita istraživanja biljaka poput stresa, produktivnosti, zagađenja i sl. Fluorescencija Chl *a* dolazi i od PSI i od PSII, no u ukupnoj emisiji PSI je zastupljen u značajno manjem udjelu, te se smatra da na sobnoj temperaturi u području spektra 680-740 nm, fluorescencija Chl *a* dolazi isključivo od PSII (Stirbet i sur. 1998, Strasser i sur. 2004).

Produljeno izlaganje biljaka vrlo visokom svjetlosnom zračenju može rezultirati i destrukcijom fotosintetskih pigmenata uslijed čega biljke poprimaju svjetliju boju. Ovaj fenomen se naziva fotooksidacija i predstavlja sekundarni učinak fotooštećenja jer nastaje nakon što je već došlo do smanjenja fotosintetske učinkovitosti ovisno o intenzitetu zračenja i vremenu izlaganja (Alves i sur. 2002).

1.1.7 Karakteristike transformacije biljaka pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens*

Transformacija biljaka pomoću bakterije *A. tumefaciens* trenutno je najrasprostranjenija metoda unosa stranog gena u biljnu stanicu i stvaranja transgene biljke. Bakterija *A. tumefaciens* je patogena bakterija iz tla koja u okolišu inficira ozlijeđeno mjesto na biljci uzrokujući tumor "Crown gall", bolest koja je poznata već više od devedeset godina. Prva istraživanja tumora bila su orijentirana na utvrđivanje mehanizama bolesti u svrhu razvoja lijekova. Istraživanja su dovela do zaključka da tumorska tvorevina nastaje prijenosom gena sa vrste *A. tumefaciens* na mjesto ozljede biljke. Sama bakterija ima svojstvo prijenosa točno

određenog segmenta DNA, tzv. T-DNA sa Ti plazmida (tumor-inducing) u zaraženu biljnu stanicu (De la Riva i sur. 1998, Clough i Bent 1998). T-DNA se sastoji od dva tipa gena: onkogeni koji kodiraju enzime uključene u sintezu auksina i citokinina i odgovorni su za nastanak tumora, te gena koji kodiraju sintezu opina. Opine sintetiziraju i izlučuju stanice tumora i oni predstavljaju izvor ugljika i dušika za bakteriju *A. tumefaciens*. Virulentni sojevi bakterije *A. tumefaciens* sadrže megaplazmide sa preko 200 kb koji su ključni za nastanak tumora te se stoga zovu Ti plazmidi. Uslijed infekcije mobilni dio Ti, T-DNA, se unosi u jezgru biljne stanice i integrira u biljni kromosom. Cijeli proces prijenosa T-DNA reguliran je djelovanjem proteina koje kodiraju geni iz virulentne regije Ti plazmida. tzv. *vir* geni i geni iz bakterijskih kromosoma (Zupan i Zambryski 1995). Ekspresija gena iz *vir* regije inducirana je fenolnim spojevima koji se luče na mjestu ozljede, dok šećeri i niska vrijednost pH pojačavaju reakciju. T-kompleks sadrži jednolančanu T-DNA i jednu molekulu *vir* proteina, VirD2 vezanog na 5' kraj, a omeđen je po dužini jednolančanim VirE2 proteinom. *Vir* sustav je sposoban prenijeti bilo koju DNA unutar lijeve i desne strane kompleksa (LB i RB). Unutar biljne stanice T-kompleks se unosi u jezgru gdje se jednolančana T-DNA stabilno integrira u biljni kromosom (Zupan i sur. 2000, Lee i Gelvin 2008).

Istraživanja procesa prijenosa T-DNA u biljnu stanicu dovela su do nekoliko zaključaka ključnih za transformaciju biljaka. Nastanak tumora je posljedica izravnog unosa T-DNA u biljnu stanicu, a transkripcija gena s T-DNA se odvija isključivo u biljnoj stanici i nema nikakvu ulogu u procesu prijenosa. Bilo koja strana DNA smještena između LB i RB T-DNA regije može se prenijeti u biljnu stanicu, neovisno o svom porijeklu. Ta saznanja omogućila su nastanak prvog bakterijskog vektora za transformaciju biljaka (De la Riva i sur. 1998).

1.1.7.1 T-DNA binarni vektori

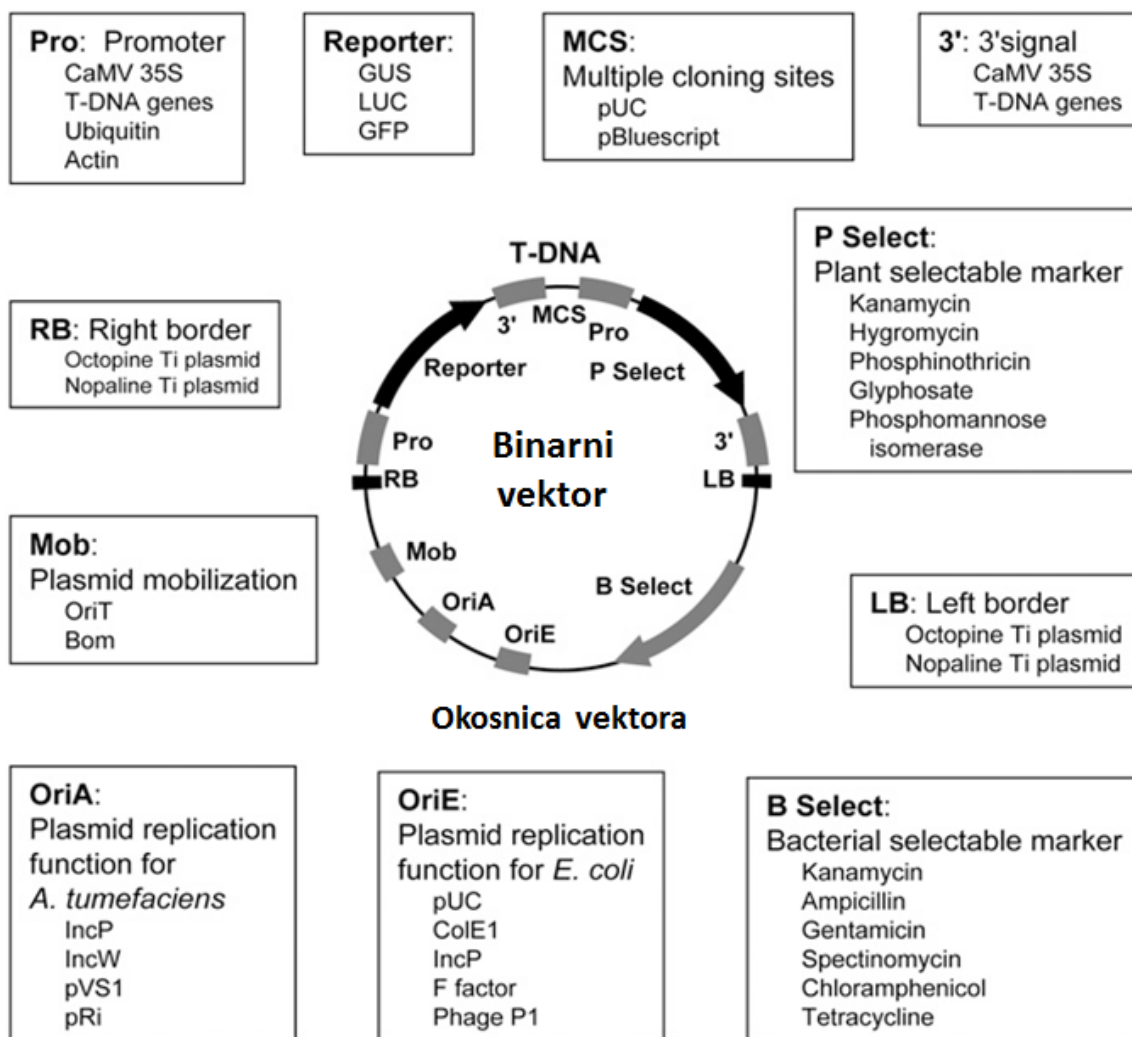
Osnovni mehanizmi komercijalno dostupnih vektora koji se danas upotrebljavaju za transformaciju biljaka nastali su osamdesetih godina prošlog stoljeća. Prvi korak je bio uklanjanje T-DNA divljeg tipa koji je odgovoran za nastanak tumora, a ciljna T-DNA unešena je pomoću bakterije *E. coli*, vektora koji je sposoban integrirati se u Ti plazmid. Takav sustav je učinkovit no kao konačni produkt nastaje plazmid veći od 150 kb unutar bakterije *A. tumefaciens* što čini potvrdu novonastale strukture izuzetno složenom (Komari i sur. 2006). T-DNA regije u divljem tipu su i same velike

i ne sadrže specifična mjesta za restrikcijske endonukleaze prikladna za kloniranje gena od interesa. Također je bilo potrebno ukloniti onkogene iz T-DNA kako bi se regenerirala normalna biljka po završetku transformacije. Geni opin sintaze bili su suvišni u konstruktima za unos gena od interesa u biljku (Lee i Gelvin 2008).

Koristeći svojstvo da je prijenos T-DNA aktivan čak i ako su T-DNA i geni za virulenciju smješteni na odvojenim replikonima unutar stanice bakterije *A. tumefaciens*, nastaje sustav binarnih vektora (Komori i sur. 2007). Unutar plazmida konstruirana je umjetna T-DNA koja se može replicirati i u vrsti *A. tumefaciens* i u vrsti *E. coli*. Plazmidni konstrukt se generira unutar bakterije *E. coli* i jednostavnim prijenosom u bakteriju *A. tumefaciens* nastaje soj spreman za transformaciju biljaka. U tako nastali sustav binarnih vektora s vremenom su uključeni i dodatni virulentni geni *virB*, *virE* i *virG* pri čemu nastaju tzv. super binarni vektori (Komari i sur. 2006).

Osnovnu strukturu binarnih vektora čine T-DNA i okosnica vektora (vector backbone). T-DNA je segment omeđen desnom (RB) i lijevom (LB) graničnom regijom, te može sadržavati višestruko mjesto za kloniranje, selekcijski marker, gen reporter i druge gene od interesa (Slika 9). T-DNA se prenosi i ugrađuje u nuklearni genom domaćina na početku infekcije. Proces prijenosa postiže se pomoću zajedničkog djelovanja približno 20 *vir* gena. Geni i sekvence koji se prenose u biljku smještaju se unutar LB i RB Ti vektora (Hellens i sur. 2000).

Korisnost binarnih sustava za jednostavnu gensku manipulaciju brzo je prepoznata. Geni od interesa jednostavno se kloniraju unutar malih T-DNA regija binarnog vektora. Nakon karakterizacije i potvrde konstrukta unutar bakterije *E. coli*, vektor se jednostavno prenosi u soj agrobakterija sa *vir* regijom. Na tržištu je prisutan veliki broj komercijalno dostupnih binarnih vektora s različitim svojstvima kao i sojeva bakterijskih domaćina dizajniranih za različite namjene što je uvelike unaprijedilo i pojednostavilo dobivanje transgenih biljaka.



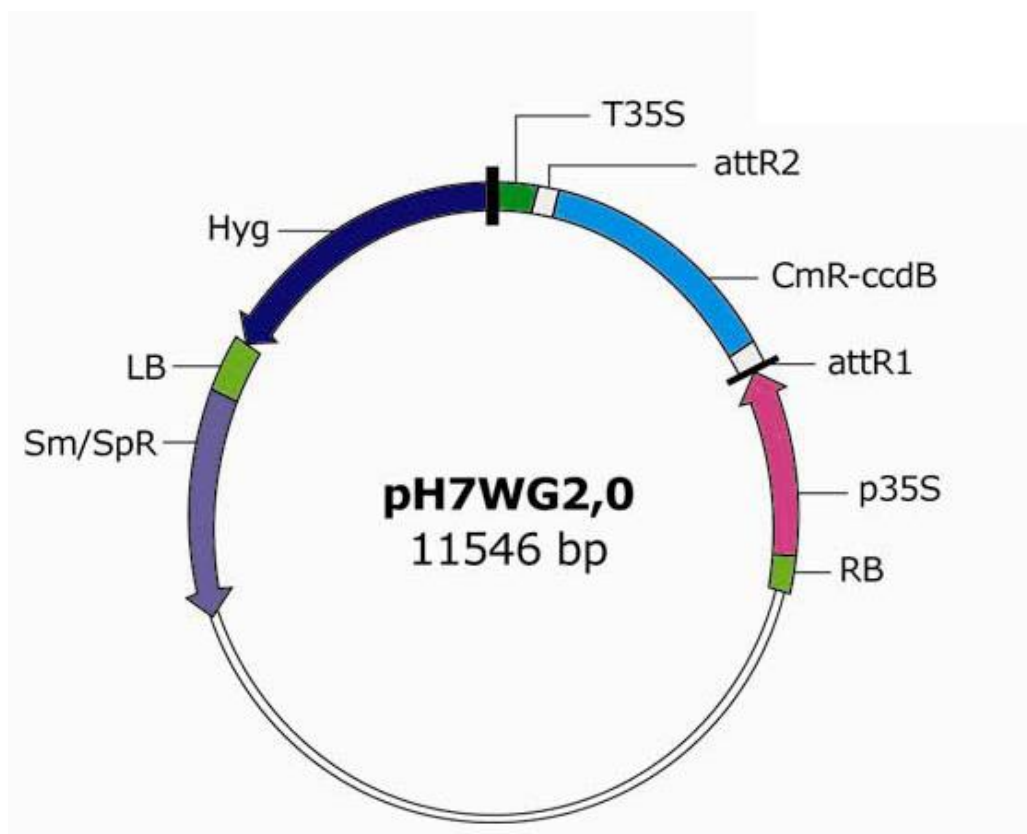
Slika 9. Struktura binarnog vektora i njegovi glavni dijelovi (Komori i sur. 2007).

1.1.7.2 Gateway™ tehnologija izravnog kloniranja

Gateway™ tehnologija kloniranja (Life Technology, SAD) omogućava brzu *in vitro* rekombinaciju koristeći λ bakteriofage (Suzuki i sur. 2005). Sustav se zasniva mjesno-specifičnoj rekombinaciji pomoću faga λ gdje se odsječci DNA, poravnati preko rekombinacijskih sljedova (*att*), mogu prenijeti u vektor sa kompatibilnim rekombinacijskim mjestom (*attB* x *attP* ili *attL* x *attR*). Reakciju katalizira enzim GATEWAY™ BP Colonase™ ili GATEWAY™LR Colonase™. Tzv. „entry“ klonovi, donori plazmida, nastaju rekombinacijom DNA fragmenta od interesa koji sadrži odgovarajuće *attB* rekombinacijsko mjesto sa *attP* mjestom. Posljedično fragment sa

„entry“ klon može se prenijeti u bilo koji destinacijski vektor koji sadrži *attR* mjesto pomoću GATEWAY™LR Colonase™ (Karimi i sur. 2002).

Ovaj sustav koristi mjesno-specifičnu rekombinaciju omogućavajući fagu λ da se integrira i odvoji od bakterijskog kromosoma. Cijeli protokol se zasniva na navedenim BP i LR reakcijama koje kataliziraju BP i LR colonase enzimi. BP colonase prenosi DNA odsječak od interesa (npr. PCR produkt) smješten između dva *attB* mjesta u donor vektor (pDONR) sa dva *attP* mjesta. Nakon rekombinacije odgovarajućih *attB* i *attP* mjesta, DNA odsječak se ugrađuje u okosnicu donora pri čemu nastaje entry klon (pENTR) smješten između dva *attL* mjesta (Karimi i sur. 2007, Curtis i Grossniklaus 2003).



Slika 10. Shematski prikaz binarnog vektora pH7WG2,0 (Islam i sur. 2007).

U radu je korišten Gateway binarni vektor oznake pH7WG2,0 (Slika 10). Okosnicu svih Gateway vektora čini mali plazmid pPZP200 veličine 6,7 kb. Plazmid sadrži izvorište replikacije (origin of replication) u bakteriji *E.coli* (ColE1) i u vrsti *Agrobacterium* (pVs1). Vektor sadrži gen za otpornost na streptomycin i/ili

spektinomycin. Destinacijski vektori sadrže jedan od tri selekcijska markera *nptII* (rezistentnost na kanamicin), *hpt* (rezistentnost na higromicin) ili *bar* (rezistentnost na glufosinat amonijum). Sva tri selekcijska markera su pod regulacijom *nos* promotora i *nos* terminatora. Gateway rekombinacijsko mjesto za uvođenje fragmenta od interesa smješteno je desno od T-DNA, kod vektora pH7WG2,0 taj dio je pod regulacijom 35S promotora i 35S terminatora s obzirom da je taj promotor vrlo aktivan u većini stanica transgenih biljaka (Karimi i sur. 2002).

1.1.8 Antioksidans glutation i abiotički stres

Nepovoljni okolišni uvjeti poput povećanog svjetlosnog zračenja mogu dovesti do promjena u metabolizmu biljke, te su biljke razvile mehanizme kako bi se zaštitile od takvih neželjenih promjena. U stanju stresa dolazi do povećane produkcije reaktivnih kisikovih jedinki. U kloroplastima neravnoteža između utroška reducensa NADPH i potrebe za elektronima u regeneraciji akceptora elektrona NADP u PSI, može dovesti do prijenosa elektrona na alternativne akceptore, prvenstveno molekularni kisik. Kod svjetlosnog stresa suvišak energije ekscitacije dovodi do pre-reduciranosti lanca transporta elektrona, a nastanak ROS-a je iniciran redukcijom O₂ (Tausz i sur, 2004). Tripeptid glutation važan je antioksidans sa višestrukom ulogom u metabolizmu biljaka. Kao antioksidans ima prije svega važnu zaštitnu ulogu jer neutralizira reaktivne kisikove jedinice koje nastaju uslijed oksidativnog stresa u stanicama, a koje mogu dovesti do oštećenja stanice. Glutation također štiti proteine od ireverzibilnih promjena induciranih nastajanjem ROS formiranjem reverzibilnih disulfidnih mostova između tiolne skupine cisteina proteina i glutationa. Glutation je ključni regulator prijenosa signala kontroliranog redoks-procesima i regulira ekspresiju gena te pridonosi preživljavanju stanice (Zechmann i sur. 2008, Zechmann i sur. 2006).

Askorbat-glutationski ciklus najznačajniji je put uklanjanja superoksida i peroksida u kloroplastima. Ciklus koristi reducirani glutation kao elektron donor za regeneraciju askorbata iz oksidiranih oblika, dehidroaskorbata. Reducirani oblik glutationa (GSH) sintetizira se u dva koraka ATP ovisnih reakcija kojima najprije nastaje γ -glutamilcistein iz L-glutamata i L-cisteina, a potom se formira GSH dodavanjem glicina na C-terminalni dio γ -glutamilcisteina. Ove reakcije kataliziraju enzimi γ -glutamilcistein sintetaza i glutation sintetaza (GS).

Poznate su brojne fiziološke uloge GSH u biljkama. Jedna od značajnijih uloga je skladištenje reduciranog oblika sumpora, te njegova raspodjela unutar biljke. Glutation je uključen i u metabolizam sumpora na više razina: transport, skladištenje, vezivanje i sl. Također ima ulogu i kao regulator genske ekspresije, te kao supstrat za GSH *S-transferaze* u katalizi reakcija konjugacije GSH i potencijalno toksičnih ksenobiotika poput herbicida. Zbog svoje tiolne skupine ima značajnu ulogu u obrani biljke od oksidacijskog stresa (Meister, 1988). Reducirani oblik GSH unutar biljne stanice nalazi se naizmjenično sa svojim oksidiranim oblikom glutathion-disulfidom (GSSG). Glutation reduktaza je zadužena za prevođenje GSSG u GSH uz utrošak NADPH, dok za oksidaciju GSH u GSSG zaduženi su brojni slobodni radikali. GSSG se sastoji od dvije molekule GSH povezane disulfidnim mostom. Udio reduciranog oblika ovisan je o redoks statusu stanice, te u ne stresnim uvjetima uvijek iznosi manje od 0,9 (Noctor i sur. 1998).

Glutation reduktaza ima važnu ulogu u obrani od ROS-a održavajući reducirani oblik GSH. Enzim je lokaliziran u kloroplastima, te manjim dijelom u mitohondrijima i citosolu. Istraživanja ukazuju na porast koncentracije glutathion reduktaze u prisustvu Cd, te kod različitih okolišnih uvjeta poput opskrbe sumporom, fumigacije s H₂S, svjetlosnog zračenja, oksidativnog stresa, izlaganja teškim metalima, herbicidima, atmosferskim onečišćenjima i dr. Uslijed izlaganja biljke povećanom svjetlosnom zračenju doći će do pojačane ekspresije enzima uključenih u metabolizam glutathiona što će u konačnici rezultirati i porastom koncentracije glutathiona u listu (Gill i Tuteja, 2010, Noctor i sur. 1998).

1.2 Ciljevi istraživanja

- „Gateway“ metodom klonirati konstrukt bez domene PEPE u vektor pH7WG2.0. Transformirati vrstu *A. thaliana* metodom floral-dip pomoću bakterije *A. tumefaciens*.
- Potvrditi uspješnost transformacije pomoću metode lančane reakcije polimerazom, te na pločama za selekciju higromicin rezistentnih transformanti. Izdvojiti homozigot za transgen.
- Potvrditi sintezu proteina TROL Western blot analizom
- Elektronskom mikroskopijom utvrditi promjene u ultrastrukturi kloroplasta Δ PEPE u odnosu na divlji tip.
- Izračunati parametre dobivene mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* i parametre OJIP testa za linije Δ PEPE, WT i KO, uzgajane pri optimalnim uvjetima i pod svjetlosnim stresom.
- Napraviti analizu proteina u nativnim uvjetima metodom BN-PAGE u svrhu lokalizacije enzimatski aktivnih proteinskih kompleksa s TROL-om.
- Istražiti moguću ulogu domene PEPE u dinamičkom vezivanju FNR-a.

Hipoteza:

Domena PEPE proteina TROL ima ulogu u dinamičkom vezivanju feredoksin:NADP⁺oksidoreduktaze (FNR). Domena je bogata prolinom, a poznato je da prolin narušava alfa-uzvojnice uslijed gubitka najmanje jednog vodikovog mosta, te na taj način inducira zakretanje. Funkcionalno takvi molekularni zglobovi imaju ulogu otvaranja i zatvaranja putova za protok iona i osnovna hipoteza je da i PEPE predstavlja takav molekularni zglob i da omogućuje FNR-u vezanom na domenu ITEP mobilnost i povezivanje sa drugim kompleksima. Metodom obrnute genetike, te primjenom različitih molekularnih i biokemijskih metoda pokušat će se utvrditi uloga ove domene u funkcionalnosti TROL-a, te u linearnom toku elektrona.

MATERIJALI I METODE

2 MATERIJALI I METODE

2.1 Biljni materijal

U radu su korištene eksperimentalne biljke vrste *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., talijin uročnjak, ekotip Columbia (Col-0), jednogodišnja dvosupnica iz porodice *Brassicaceae*. Za potrebe istraživanja biljke su uzgajane u klima komori (Kambič, Slovenija), na supstratu na bazi ilovače i treseta (Stender B400, Njemačka). Zemlja za uzgoj najprije je prosijana u posudice za uzgoj biljaka vrste *A. thaliana* (Arabasket, Arasystem 3600 KIT, Betatech, Belgija). Sjemenke su prije nasijavanja po potrebi stratificirane na +4°C.

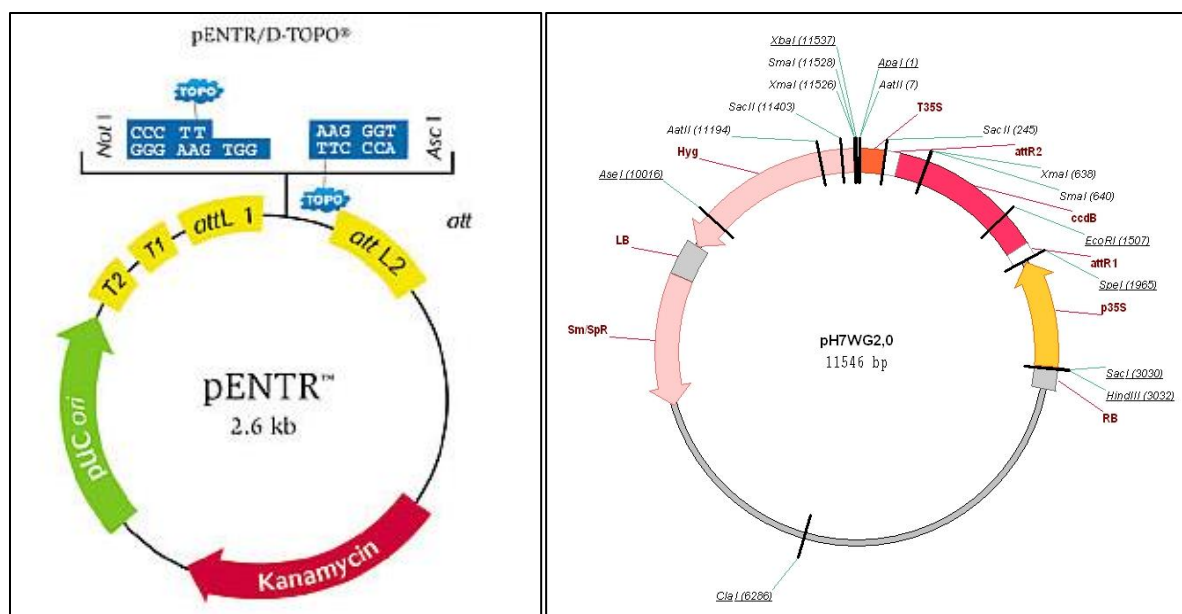
Biljke su uzgajane pri temperaturi od 20°C, u uvjetima relativne vlažnosti zraka od 60%. U uvjetima optimalnog intenziteta svjetlosti (Growth light, GL) fotoperiod je bio 16 sati svjetla ($80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i 8 sati tame (vlažnost 70%, temperatura 18°C). U uvjetima jakog osvjetljenja (High light, HL) biljke su izložene količini svjetlosti od $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, te $700 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.2 Transformacija biljaka

2.2.1 Gateway metoda izravnog kloniranja

U radu je korišten Gateway® pENTR™ Directional TOPO® kit za kloniranje. Sustav omogućuje brzo kloniranje PCR produkata u ishodišni vektor pENTR™/SD/D-TOPO. Ishodišni vektor sadrži regije za mjesno-specifičnu rekombinaciju s destinacijskim vektorom (attL1 i attL2), gen odgovoran za rezistenciju na antibiotik kanamicin, te TOPO® mjesto kloniranja. Kao destinacijski vektor korišten je binarni vektor pH7WG2,0, koji sadrži attR1 i attR2 regije za mjesno specifičnu rekombinaciju s ishodišnim vektorom, gene za otpornost na antibiotike spektinomycin i higromicin te lijevu i desnu graničnu regiju T-DNA (LB i RB).

Prema protokolu početnica za PCR umnažanje konstrukta mora sadržavati CACC slijed nukleotida koji onda naliježe na GTGG slijed samog ishodišnog vektora. Smjesa za kloniranje sadrži: 2 ng svježeg PCR produkta, 1 μL otopine soli, 3 μL vode i 20 ng TOPO vektora (preuzeto iz „Directional TOPO® Cloning Kits Manual“).



Slika 11. Lijevo: ishodišni vektor pENTR™ Directional TOPO®. **Desno:** Destinacijski vektor pH7WG2,0 sa naznačenim regijama od interesa unutar lijeve i desne granične regije (preuzeto iz „Directional TOPO® Cloning Kits Manual“).

Prema protokolu proizvođača priređeni konstrukt je u plazmidni destinacijski vektor ubačen je tzv. LR reakcijom. U LR reakciji dolazi do rekombinacije *attL* regije ishodišnog vektora sa *attR* regijom destinacijskog (Slika 11). Reakciju prijenosa katalizira „Gateway“ LR Clonase™ II“. Nakon inkubacije na 25 °C u trajanju od 1 sata reakcija se zaustavlja dodatkom 1 μL proteinaze K. S tako priređenom smjesom kloniraju se kompetentne stanice bakterije *E. coli*. Selekcija je odrađena na pločama s spektinomycinom. Izrasle bakterijske kolonije su još provjerene PCR umnažanjem, te sekvenciranjem. Bakterija *E. coli* omogućava brzo umnažanje vektora s genom od interesa.

Iz bakterijskih kolonija izolirana je plazmidna DNA prema Birnboim i Doly (1979). Bakterije su inkubirane u 2YT mediju preko noći na sobnoj temperaturi. Zatim se približno 2 mL suspenzije centrifugira 5' na 2000 × g, a precipitat resuspendira u 150 μL otopine I, promućka i ostavi 15' na sobnoj temperaturi. Potom se doda 150 μL otopine II i inkubira 5 minuta na ledu. Doda se 150 μL otopine III, te dobro izmućka i inkubira 15' na ledu. Smjesa se centrifugira 15' na 13000 × g pri 4 °C, te se supernatant se prenese u čistu tubicu. U supernatant se doda 1-2 μL RNAze (koncentracija 10 mg/mL, bez DNAza) i inkubira se 45' na 37 °C. Zatim se doda 360 μL izopropanola i inkubira približno 60' na sobnoj temperaturi. Dobivena

smjesa se centrifugira 10 minuta na $6000 \times g$ pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant se odbaci, a talog osuši dodavanjem $500 \text{ }\mu\text{L}$ 70% etanola. Osušen talog se otopi u $10\text{-}20 \text{ }\mu\text{L}$ H_2O („molecular biology grade“) ili TE pufera i spremi na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tablica 1. Otopine za izolaciju plazmidne DNA

Otopina I (pH 8,0)	Otopina II
50 mM glukoze	0,2 M NaOH
10 mM EDTA	1% SDS
25 mM Tris-HCl	
Otopina III	TE pufer
3 M kalijev acetat	10 mM Tris-HCl
1,8 M mravlja kiselina	1 mM EDTA

2.2.2 Transformacija bakterija vrste *Agrobacterium tumefaciens*

Kemijski kompetentne bakterije uzgajaju se na način da se u 5 mL YEB medija doda $10 \text{ }\mu\text{L}$ MgSO_4 i $10 \text{ }\mu\text{L}$ Rif, te $100 \text{ }\mu\text{L}$ glicerinske kulture bakterija *A. tumefaciens*. Bakterijska suspenzija se inkubira na tresilici u trajanju od 40 sati, pri $28 \text{ }^\circ\text{C}$ i 270 rpm . Po završetku inkubacije 3 mL suspenzije preneseno je u 50 mL YEB medija s Rif i uzgajano na tresilici do postizanja $1,0 \text{ OD}_{600}$ (optička gustoća pri 600 nm). Potom je bakterijska suspenzija centrifugirana 15 minuta pri $3000 \times g$. Talog se odvoji i na ledu resuspendira u 1 mL ledenog 10 mM CaCl_2 , te zamrzne u tekućem dušiku i pohrani na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tako priređene bakterije spremne su za transformaciju unošenjem plazmidne DNA. Na $100 \text{ }\mu\text{L}$ bakterija doda se $5 \text{ }\mu\text{L}$ izolirane plazmidne DNA, inkubira pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 5', te doda 1 mL YEB medija s Rifampicinom. Opet slijedi inkubacija 4 sata na tresilici pri $28 \text{ }^\circ\text{C}$ i 700 rpm u ependorf-epruvetama sa „LID BAC“-om (za sprečavanje kontaminacije). Suspenzija se potom centrifugira 2 minute pri $12.000 \times g$ i precipitat resuspendira u $150 \text{ }\mu\text{L}$ YEB medija s rifampicinom. Bakterijska suspenzija se nanosi na YEB ploče s rifampicinom i spektinomycinom,

te se uspješnost transformacije provjerava se PCR umnažanjem (Clough i Bent, 1998).

2.2.3 Transformacija biljaka vrste *A. thaliana* „Floral dip“ metodom

Transformacija biljaka vrste *A. thaliana* napravljena je jednostavnom metodom uranjanja razvijenih cvatova biljke u bakterijsku suspenziju (Clough i Bent, 1998).

Tablica 2. Otopine za transformaciju bakterije *A. tumefaciens* i „Floral dip“

YEB medij (pH 7,4)	
0,5 % goveđi ekstrakt	Pomiješati goveđi ekstrakt, baktopepton-ekstrakt kvasca i saharoze, podesiti pH na 7,4 s 1 M KOH i autoklavirati. Medij ohladiti na temperaturu od 55 - 60 °C, te dodati MgSO ₄ (steriliziran filtracijom kroz membranski filter). Dodati rifampicin otopljen u dimetilsulfoksidu (100 µg/mL) i spectinomycin otopljen u redestiliranoj vodi, te steriliziran filtracijom kroz membranski filter (50 µg/ml).
0,1% baktopepton	
0,5 % saharoza	
0,1 % ekstrakt kvasca	
2 mM MgSO ₄	
100 µg/mL rifampicin	
100 µg/mL spektinomycin	
Infiltracijski medij	
5% saharoza	Prirediti 500 mL 5% otopine saharoze. Odvojiti 100 mL, a u preostalih 400 mL dodati surfaktant Silwer L-77
0,03% Silwet L-77	
2YT medij (pH 7,0 – 7,5)	
1,6 % baktotripton	Otopiti u vodi i autoklavirati
0,1% ekstrakt kvasca	
0,5% NaCl	

Za potrebe transformacije biljke *A. thaliana* nul-mutatne su uzgajane u klima komori do pojave primarnog cvata. Kako bi se prekinula apikalna dominacija i

stimuliralo biljke na stvaranje većeg broja sekundarnih cvatova, primarni cvatovi se orezuju. Kada sekundarni cvatovi dosegnu 2-10 cm duljine, biljke su spremne za transformaciju.

Za početnu (starter) kulturu približno 200 µl suspenzije kompetentnih bakterija vrste *A. tumefaciens* EHA105 dodano je u 30 ml YEB medija s antibiotikom rifampicinom. Tako priređene bakterije inkubirane su na tresilici u trajanju od 48 sati pri 28 °C. Početna kultura potom je razrijeđena YEB medijem u omjeru 1:20 i ponovno inkubirana dok OD₆₀₀ ne dosegne 1-1,5. Potom je suspenzija centrifugirana 15 minuta na 14600 × g, a dobiveni talog resuspendiran je u 100 mL infiltracijskog medija bez dodanog surfaktanta Silwet L-77 (vidi Tablicu 2). Neposredno prije uporabe bakterijska suspenzija dodana je u preostalih 400 mL infiltracijskog medija sa surfaktantom.

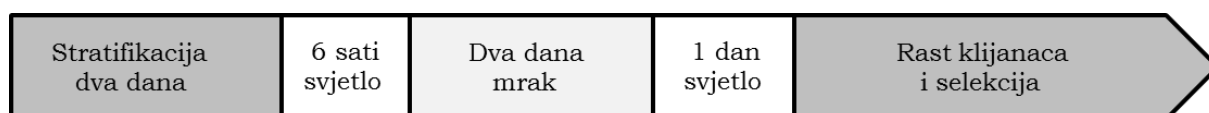
Cvatovi biljaka uronjeni su u infiltracijski medij s bakterijama vrste *A. tumefaciens* u trajanju od 30 sekundi. Biljke su potom umotane u foliju kako bi cvatovi bili u mraku i ostali vlažni. Nakon 24 sata skinuta je folija, biljke ostavljene rasti u klima komori. Kako bi se povećala uspješnost transformacije cijeli postupak ponovljen je za tjedan dana.

2.3 Selekcija transformanata

Selekcija transgeničnih biljaka provedena je na pločama za selekciju prema Harrison i sur. (2006). Ploče su pripremljene uz dodatak 1 % agara, te MS soli (Moorashige i Skoog salt mixture, Sigma), a pH vrijednost otopine je podešena na 5,8. Tako pripremljena otopina se autoklavira, a nakon hlađenja na približno 55 – 60 °C dodaje se antibiotik higromicin koncentracije 15 µg/ml za potrebe selekcije transgena s rezistencijom na higromicin. Prije nanošenja na ploče sjemenke su sterilizirane otopinom Izosan G.

Ploče sa sjemenkama su stratificirane dva dana na temperaturi od 4 °C, nakon čega slijedi inkubacija pri osvjetljenju u trajanju od šest sati na 22 °C, a potom se ploče prekriju aluminijskom folijom i čuvaju u tami 2 dana pri 22 °C u klima komori. Ploče sa sjemenkama se potom prebacuju na uvjete konstantnog osvjetljenja u trajanju od 24 sata kako bi se potaklo klijanje, a zatim se koriste uvjeti 16 sati svjetla i 8 sati tame (Slika 12). Ozelenjeni i narasli klijanci presađuju se na supstrat

i te biljke predstavljaju generaciju T1. Za odabir homozigota za transgen potrebno je sjeme biljaka T1 ponovno nasaditi na ploče za selekciju, napraviti probir transgena (generacija T2), te sjeme svake biljke T2 ponovno nasaditi na podloge za selekciju, nakon čega u generaciji T3 sjeme koje je 100% otporno na antibiotik predstavlja homozigot za transgen.



Slika 12. Shematski prikaz postupka selekcije transformanata.

2.4 Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda umnažanja ciljanog odsječka DNA pomoću enzima polimeraze u uvjetima *in vitro*. Visoka specifičnost metode postiže se primjenom oligonukleotidnih početnica komplementarnih odsječku kojeg umnažamo.

Tablica 3. Popis oligonukleotidnih početnica korištenih u radu (Prema Jurić 2010)

Naziv početnice	Sekvenca 5' → 3'	Produkt
35S-F	CTGACGTAAGGGATGACGCA	190 pb
35S-R	AACTTGTGATATCACTAGTGC	
HYG-F	ATGAAAAGCCTGAACTCACC	1030 pb
HYG-R	ATCTACTCTATTCCTTTGCCCT	
35S-F	CTGACGTAAGGGATGACGCA	860 pb
TROL_ΔRHO_R	TCCCCGGGTGTGGTGTTCAGGATCTTTA	
TROL background provjera		
Sail 740f	AGTCGCTGCACAAGTAATCACAGA	WT – 316 pb
ITEP SalI	ATGCCATCGCAGCCCTGAGTCGA	ΔPEPE – 133 pb
ITEP SalI	ATGCCATCGCAGCCCTGAGTCGA	ΔPEPE – 180 pb
SAIL_LB3	TTCATAACCAATCTCGATACAC	WT – nema produkta

Uz termostabilni enzim polimerazu i odgovarajuće početnice, reakcija zahtijeva i odgovarajuću koncentraciju $MgCl_2$, smjesu dNTP-a, te odgovarajući pufer za PCR. Nakon selekcije transgeničnih biljaka, ugradnja konstrukta u genom biljke potvrđena je PCR reakcijom (prema Innic i sur. 1990).

Tablica 4. Sastav PCR reakcijske smjese (prema Phire® Plant Direct PCR Kit)

Reagens	1 x	Konačna koncentracija
H ₂ O	7,1 µL	
2x Phire®Plant PCR pufer	10 µL	1x
Početnica 1	1 µL	0,5 µM
Početnica 2	1 µL	0,5 µM
2x Phire® Hot Start II DNA polimeraza	0,4 µL	
Uzorak	0,5 µL	
Ukupno	20 µL	

U radu je korišten Phire® Plant Direct PCR Kit (Finnzymes oy F-130, Finska) za kojeg nije potrebna klasična izolacija DNA. Prema protokolu komadić lista promjera 2 mm uranja se u 20 µL pufera za razrjeđivanje (dilution buffer), te se vrškom nastavka za pipetu usitni o stijenku tubice do pojave zelenog obojenja. Tubice sa uzorcima se potom kratko centrifugiraju, a supernatant koristi za PCR reakciju. Sastav reakcijske smjese i PCR protokol dani su u tablicama 4 i 5 (preuzeto iz uputa za Phire® Plant Direct PCR Kit, Finnzymes oy F-130).

Tablica 5. PCR protokol (prema Phire® Plant Direct PCR Kit)

PCR korak	Temp.	Vrijeme	Br. ciklusa
Inicijalna denaturacija	98 °C	5 min	1
Denaturacija	98 °C	5 s	40
Sparivanje	62 °C	5 s	
Produljivanje	72 °C	20 s	
Završno produljivanje	72 °C	1 min	1
	4 °C	∞	-

2.5 Analiza DNA i proteina

2.5.1 Elektroforeza u gelu agaroze

Produkti reakcije PCR vizualiziraju se elektroforezom u gelu agaroze. Metoda podrazumijeva kretanje molekula DNA kroz gel agaroze pod utjecajem električnog polja i razdvajanje na temelju istosmjerne struje, pri čemu negativno nabijena molekula DNA putuje prema pozitivnoj elektrodi (anodi). Dodatkom interkalirajućeg reagensa poput etidijevog bromida u gel, DNA fluorescira pod UV svjetlom (Maniatis i sur. 1989). Za pripremu gela određene koncentracije otapa se agaroz (Sigma) u $1\times$ TAE acetatnom puferu (pH 8,0) uz dodatak etidijevog bromida (konačne koncentracije $1\ \mu\text{g/ml}$) zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici. Pripremljeni gel se potom izlijeva u kalup kako bi se hlađenjem polimerizirao. Uzorci se nanose po prethodno utvrđenom redoslijedu, a uz uzorke se na gel nanosi i DNA marker za utvrđivanje veličine PCR produkta. Reakcija se odvija pri 100 V približno 1 sat. Po završetku reakcije gelovi se fotografiraju pomoću digitalnog uređaja za dokumetiranje (SynGene).

2.5.2 Izolacija ukupnih proteina

Listovi biljaka usitnjeni su mehanički uz pomoć tekućeg dušika u eppendorf tubici. Tako pripremljenim uzorcima dodano je 80 – 100 μl pufera prethodno zagrijanog na 80 °C (0,13 M Tris/HCl pH 6,8; 16 % glicerol; 4,6 % SDS, 0,59 % DTT). Uzorci su potom inkubirani tijekom 5 minuta na 80 °C. Po završetku inkubacije uzorci se centrifugiraju na $13600\times g$ u trajanju od 10 min. Koncentracija proteina u supernatantu određena je metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). Metoda podrazumijeva vezivanje proteina na boju Coomassie blue G pomoću ionskih i hidrofobnih veza. Vrijednosti su izmjerene spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 595 nm. Dobiveni izolati čuvaju se do uporabe na – 80 °C.

2.5.3 SDS - poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Proteini se razdvajaju na osnovu molekularne mase elektroforezom u gelu poliakrilamida. Metoda podrazumijeva korištenje dva gela, gela za sabijanje i gela za

razdvajanje (Tablica 6). Na gel je nanešeno približno po 15 μ L uzoraka prethodno normaliziranih na 20 μ g proteina. Elektroforeza je tekla pri 130 V približno 1,5 h (Laemmli, 1970).

Tablica 6. Sastav gelova za SDS-PAGE

Gel za razdvajanje (12%, pH 8,8)		Gel za sabijanje (4%, pH 6,8)	
diH ₂ O	1,98 mL	diH ₂ O	1,68 mL
1,5M Tris-HCl pH 8,8	1,5 mL	0,5M Tris-HCl pH 6,8	0,75 mL
AA/Bis (30 % otopina akrilamida)	2,4 mL	AA/Bis (30% otopina akrilamida)	0,5 mL
10% SDS (w/v)	0,1 mL	10% SDS (w/v)	30 μ L
10% APS (w/v)	0,1 mL	10% APS (w/v)	30 μ L
TEMED	15 μ L	TEMED	20 μ L
Ukupni volumen	~ 6 mL	Ukupni volumen	~ 3 mL

2.5.4 Imunodetekcija proteina Western blot prijenosom

Nakon razdvajanja proteina pomoću SDS-PAGE, proteini se sa gela prenose na nitroceluloznu membranu (Schleicher & Schuell, PROTRAN BA 83) pomoću Western blot analize, takozvanim mokrim prijenosom (Vujaklija, 2007). Gel se najprije ispere u puferu za prijenos kako bi se uklonile soli i detergent, zajedno sa priređenim membranama i papirom za bugaćenje (WHATMAN). Kasete za prijenos slaže se po slijedećem redoslijedu (počevši od katode): dvije puferom namočene spužvice, tri sloja navlaženog papira, gel (označiti poredak uzoraka zarezivanjem), membrana, tri sloja papira, namočena spužvica. Prilikom slaganja paziti da između slojeva ne zaostaje zrak koji će remetiti prijenos. Složena kazeta se uroni u kadicu u koju je prethodno stavljen magnetič, potom se kadica dopuni puferom do vrha, stavi na magnetsku mješalicu i priključi na izvor struje (400 mA, 1,5 h). Po završetku prijenosa membranu kratko uroniti u otopinu Ponceau S boje (0,2 % Ponceau S, 3 % trikloroctena kiselina u deH₂O), kako bi se potvrdio prijenos, te odredio položaj proteinskog markera. Membrana se ispire destiliranom vodom dok proteinske vrpce ne postanu jasno vidljive. Membrana se potom uranja u 500 ml otopine A (Tablica 7) u trajanju od 60 minuta kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Membrana se potom uroni u otopinu A s primarnim protutitijelom (anti-TROL 1:1000) preko noći uz zibanje. Nakon inkubacije s primarnim protutitijelom, slijedi

inkubacija u otopini A sa sekundarnim protutitijelom (anti-rabbit IgG 1:30 000) 1 sat na zibalici. Po završetku inkubacije sa sekundarnim protutitijelom, membrana se ispiru u otopini B (Tablica 7) 10 minuta uz zibanje. Ispiranje se ponavlja dva puta. Membrana se potom uranja u 30 % H₂O₂ uz dodatak luminola i para-kumarinske kiseline pri čemu dolazi do emisije svjetla, te u kazeti za razvijanje filmova prislanjanja na film za autoradiografiju i tako se prenosi slika gela na film. Film se potom uranja najprije u otopinu za razvijanje, a potom u fiksir (Kodak). Postupak se provodi u tamnoj komori.

Tablica 7. Sastav otopina za Western prijenos

Otopina A		Otopina B	
1 × PBS pufer	50 mL	1 × PBS pufer	5 mL
1 % TWEEN 20	5 mL	1 % TWEEN 20	500 µL
5 % mlijeko u prahu (W/V)	25 g		
voda	do 500 mL	voda	do 50 mL

2.5.5 Plava nativna elektroforeza

Za razdvajanje nativnih i enzimatski aktivnih proteinskih kompleksa korištena je plava nativna poliakrilamid gel elektroforeza (Blue-native polyacrylamide gel electrophoresis, BN – PAGE), metoda prema Schägger i von Jagow (1991). Za izlijevanje gradijentnog gela korištena je peristaltička pumpa, a sastav gela prikazan je u Tablici 8.

Tablica 8. Sastav gela za BN – PAGE prema Schägger i sur. (1994)

	Gel za sabijanje	Gradijentni gel za razdvajanje (6 – 12 %)	
	(4 %)	6 %	12 %
Akrlamid (30/0,8%)	0,532 mL	1,2 mL	3,2 mL
6x Gel – pufer	0,666 mL	1,0 mL	1,0 mL
Glicerol	-	-	1,2 g
10 % APS	40,0 µL	11,3 µL	11,3 µL
TEMED	4,0 µL	3 µL	3 µL
Destilirana voda	3,756 mL	3,8 mL	0,9 mL

Gel s uzorcima smješten je vertikalno u kadicu za elektroforezu, a postupak je vođen na temperaturi od 4 °C, najprije pri 150 V u trajanju od 45 minuta, a zatim kontinuirano pri 600 V, 2 do 2,5 sata. Gornji spremnik kadice napunjen je 1x katodnim puferom (plavo obojeni), a donji 1x anodnim puferom. Nakon što je plava fronta prešla približno pola gela za razdvajanje uklonjen je plavo obojeni katodni pufer i zamijenjen neobojenim. Jakost električnog polja potom je smanjena na 100 – 150 V, a razdvajanje je trajalo preko noći. Po završetku razdvajanja gel je uronjen u blotto pufer (sastav pufera prikazan je u Tablici 9) u trajanju od pola sata, te su potom proteini sa gela prenešeni Western prijenosom prema protokolu iz poglavlja 4.5.4.

Tablica 9. Otopine za BN – PAGE prema Schägger i sur. (1994)

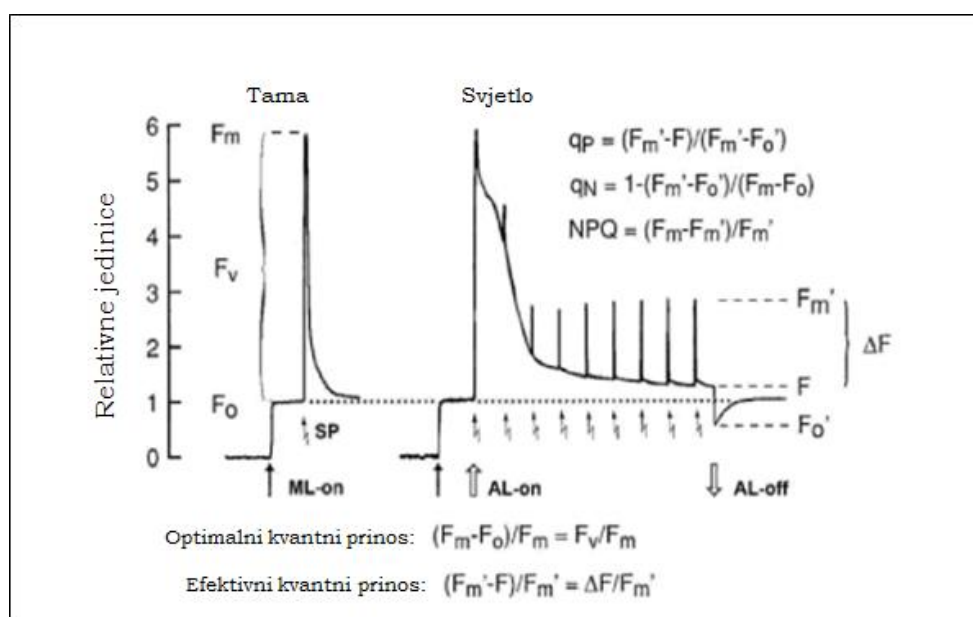
Anodni pufer 1x	50 mM Bis-Tris pH 7,0
Katodni pufer 1x	50 mM Tricin
(pH 7,0)	15 mM Bis-Tris pH 7,0
Katodni pufer 1x	50 mM Tricin
(pH 7,0) plavo obojeni	15 mM Bis-Tris pH 7,0
	0,02 % Coomassie Brilliant Blue G-250
10 x blotto pufer	1,5 M Glicin
	0,2 M Tris

2.6 Mjerenje fotosintetskih parametara

Mjerenja fluorescencije klorofila *a* napravljena su pomoću dva tipa fluorometra: PAM fluorometra (Pulse Amplitude Modulated) koji omogućava mjerenje fluorescencije inducirane modularnom svjetlošću, te Handy PEA fluorometar (Pulse Efficiency Analyser) koji koristi kontinuiranu svjetlost. Mjerenja su napravljena na četiri tjedna starim biljkama uzgajanih pri optimalnim uvjetima osvjetljenja. Polovica uzgojenih biljaka izložena je količini svjetlosti od 300 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ približno 24 sata prije mjerenja. Usporedno su napravljena mjerenja ΔPEPE biljaka, divljeg tipa, te TROL nul mutanti za oba svjetlosna uvjeta.

U normalnim fiziološkim uvjetima, nakon adaptacije na mrak, fotosintetski aparat doseže stabilno stanje uslijed čega je PSII akceptor Q_A potpuno oksidiran, a

fotokemijsko gašenje maksimalno. PAM fluorometar izlaže list izrazito slabom impulsu svjetlosti i u tom trenutku bilježi minimalni intenzitet fluorescencije F_0 . Kratak impuls saturacijske svjetlosti dovesti će do potpune redukcije Q_A , te se u tom trenutku mjeri maksimalan intenzitet fluorescencije F_m . Vrijednosti F_0 i F_m predstavljaju referentne vrijednosti za vrednovanje fotokemijskog i nefotokemijskog gašenja metodom saturacijskog pulsa. Metoda nam također omogućava i procjenu kvantnog prinosa energije u PSII. Optimalni kvantni prinos nakon adaptacije na tamu opisan je izrazom $(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$ pri čemu je $F_v = F_m - F_0$ i predstavlja maksimalnu varijabilnu fluorescenciju. Prilikom osvjetljenja kvantni se prinos smanjuje uslijed zatvaranja reakcijskog središta, odnosno smanjenja fotokemijskog gašenja. Mjerenja u tom trenutku daju nam podatke za efektivni kvantni prinos PSII $(F_m' - F_0)/F_m' = \Delta F/F_m'$ (Slika 13).

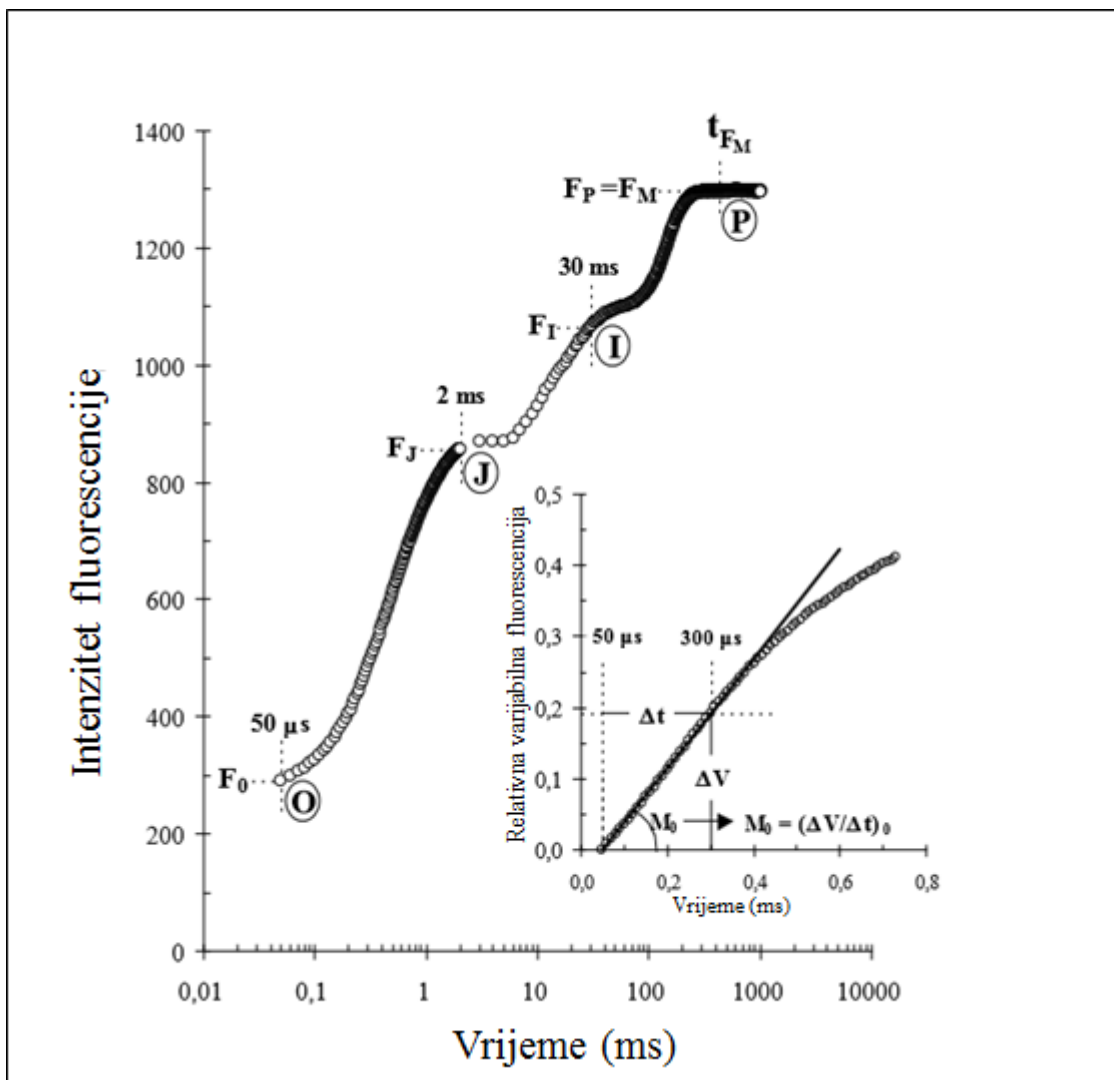


Slika 13. Mjerenje fluorescencije klorofila *a* PAM fluorometrom.

Izračun parametara učinkovitosti PSII (Schreiber 2007).

PEA fluorometar daje puls crvene saturacijske svjetlosti ($3000 \mu\text{mol}_{\text{fotona}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) čime potiče polifazni rast fluorescencije klorofila, te mjeri promjene u intenzitetu fluorescencije najprije svakih $10 \mu\text{s}$ (u prve dvije ms) i nadalje svakih 1ms , što se bilježi na logaritamsku krivulju. Uslijed velikog intenziteta kontinuirane svjetlosti (preko 200Wm^{-2}) porast fluorescencije bilježi se u koraku J (na 2ms) i I (a $20\text{-}30$

ms) između inicijalnih O (F_0) i P (maksimum, F_P), te dobijamo tzv. O-J-I-P krivulju (Slika 14). Iz dobivenih podataka moguće je izračunavanje različitih parametara učinkovitosti PSII (Strasser i Stirber 1998).



Slika 14. Prikaz polifaznog rasta fluorescencije Chl a (O-J-I-P) na logaritamskoj vremenskoj skali (Strasser i sur. 2004).

2.6.1 Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila a (PEA)

Fluorescencija klorofila a mjerena je u 10 ponavljanja po svakoj liniji biljaka i za svaki svjetlosni uvjet. Mjerenja su odrađena *in vivo* pomoću uređaja Plant Efficiency Analyser (Hansatech). Neposredno prije mjerenja biljke su prilagođene uvjetima tame u trajanju od 30 minuta ukalupljivanjem u kopče uređaja. Listovi biljaka

prilagođavaju se na uvjete tame kako bi došlo do potpune redukcije plastokinona i do otvaranja svih reakcijskih središta.

Tablica 10. Podaci dobiveni mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* i parametri OJIP krivulje (prema Strasser i Strasser 1995)

F_0	intenzitet fluorescencije nakon 50 μ s (O stupanj)
F_{300}	intenzitet fluorescencije nakon 300 μ s
F_J	intenzitet fluorescencije nakon 2 ms (J stupanj)
F_I	intenzitet fluorescencije nakon 30 ms (I stupanj)
F_m	F_m maksimalni intenzitet fluorescencije (P stupanj)
F_v	F_v maksimalna varijabilna fluorescencija ($F_v = F_m - F_0$)
t_{max}	vrijeme potrebno da se postigne F_m
V_J	varijabilna fluorescencija na J stupnju ($V_J = (F_J - F_0) / (F_m - F_0)$)
V_I	varijabilna fluorescencija na I stupnju; ($V_I = (F_I - F_0) / (F_m - F_0)$)
S_m	normalizirana komplementarna površina iznad OJIP krivulje ($S_m = AREA / (F_m - F_0)$)
M_0	ukupna brzina zatvaranja ($M_0 = (TR_0/RC) - (ET_0/RC) = 4(F_{300\mu s} - F_0) / (F_m - F_0)$)
N	prometni broj ($N = S_m \times [(dV/dt)_0] / V_J$)
RC/CS_0	gustoća aktivnih reakcijskih središta $RC/CS_0 = F_v / F_m \times (V_J / M_0) \times ABS / CS_0$
F_v / F_m	maksimalni prinos kvanta fotosustava II $F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m = [1 - (F_0 / F_m)] = TR_0 / ABS$
ET_0/TR_0	efikasnost kojom "uhvaćeni" eksciton omogućava prijenos elektrona u elektron-transportnom lancu dalje od Q_A^- ; $ET_0/TR_0 = (1 - V_J)$
ABS/RC	apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu $ABS/RC = M_0 \times (1/V_J) \times [1/(F_v/F_m)]$
TR_0/RC	"trapping" po aktivnom reakcijskom središtu; $TR_0/RC = M_0 \times (1/V_J)$
ET_0/RC	transport elektrona po aktivnom reakcijskom središtu; $ET_0/RC = M_0 \times (1/V_J) \times (1 - V_J)$
DI_0/RC	rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu $DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$
PI_{ABS}	indeks fotosintetske učinkovitosti (RC/ABS) \times (TR_0/DI_0) \times [$ET_0 / (TR_0 - ET_0)$]

PEA fluorimetar mjeri polifazni rast fluorescencije klorofila *a* induciran pulsom crvene saturacijske svjetlosti (apsorpcijski maksimum 650 nm,

3000 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Promjene u intenzitetu fluorescencije bilježe se tijekom 1 s počevši od 50 μs nakon osvjetljavanja. Prve dvije ms promjene se bilježe svakih 10 μs , a potom svake ms. Upotrebljena svjetlost dovodi do zatvaranja svih reakcijskih središta, što inducira porast fluorescencije do maksimalne vrijednosti F_m . Iz izmjerenih vrijednosti izračunavaju se parametri koji opisuju učinkovitost fotosustava II (Tablica 10).

2.6.2 Mjerenje fluorescencije klorofila *a* PAM fluorometrom

Neposredno prije mjerenja biljke su adaptirane na tamu u trajanju od 30 minuta kako bi se svi PSII reakcijski centri otvorili, a Q_A maksimalno oksidirao. Nakon prilagodbe uvjetima tame biljke su pomoću PAM fluorometra (Walz) izložene izrazito slabom impulsu svjetlosti jačine 0,1 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}^{-2}\text{s}^{-1}$ i u tom trenutku zabilježen je minimalni intenzitet fluorescencije F_0 . Potom slijedi impuls saturacijske svjetlosti jačine 3000 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}^{-2}\text{s}^{-1}$ uslijed čega dolazi do potpune redukcije Q_A , te se u tom trenutku mjeri maksimalan intenzitet fluorescencije F_m . Isti parametri mjereni su i pri primijenjenoj svjetlosti od 100, 250 i 800 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ u trajanju od 30 minuta, a vrijednosti mjerenih parametara bilježene su svakih 5 minuta. Vrijednosti F_0 i F_m su referentne vrijednosti za izračun fotokemijskog i nefotokemijskog gašenja metodom saturacijskog pulsa (Tablica 11).

Tablica 11. Podaci dobiveni mjerenjem PAM fluorometrom

F_0	Minimalni intenzitet fluorescencije
F_m	Maksimalni intenzitet fluorescencije
F_v/F_m	Maksimalni kvantni prinos PSII
$F_v = (F_m - F_0)$	Varijabilna fluorescencija
$(F_m' - F) / F_m' = \Delta F / F_m'$	Efektivni prinos fluorescencije
$qP = (F_m' - F) / (F_m' - F_0')$	Koeficijent fotokemijskog prigušivanja
$qN = 1 - (F_m' - F_0') / (F_m - F_0)$	Koeficijent nefotokemijskog prigušivanja
$ETR = \Delta F / F_m' \times \text{PPFD} \times 0,5$	Relativna stopa transporta elektrona (PPFD, Photosynthetically active Photon Flux Density)
NPQ	Nefotokemijsko prigušivanje ili mjera nefotokemijskog rasipanja topline
1-qP	Udio zatvorenih reakcijskih centara PSII

2.7 Mjerenje koncentracije fotosintetskih pigmenata

Koncentracija fotosintetskih pigmenata mjerena je na listovima rozete četiri tjedna starih biljaka mutantnih linija Δ PEPE, te kontrola TROL nul mutanti i divljeg tipa. Dio biljaka izložen je svjetlosnom stresu 24 sata prije mjerenja u uvjetima visoke količine svjetlosti jačine $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Listovi biljaka smrznuti su pomoću tekućeg dušika i usitnjeni u porculanskom tarioniku uz dodatak magnezijevog hidrogenkarbonata (na vrh špatule). Približno 0,1 g usitnjenog lista prenešeno je u eppendorf tubice od 2 mL. U tubice je potom dodano 1 mL ledeno hladnog acetona, te sve zajedno stavljeno na led 15 minuta. Po završetku ekstrakcije uzorci su centrifugirani pri 4°C , 10 minuta na $18000 \times g$. Supernatant dekantiran je u falkon tubicu s čepom, a talog ponovno ispran ledeno hladnim acetonom. Postupak je ponovljen do potpunog obezbojenja taloga. Ukupni volumen sakupljenih supernatanata izmjeren je menzuruom.

Koncentracije fotosintetskih pigmenata određene su spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 661,6, 644,8 i 470 nm. Iz dobivenih vrijednosti izračunate su koncentracije pigmenata prema Lichtenthaleru (1987).

$$\text{Chl } a = (11.24 A_{661.6} - 2.04 A_{644.8}) V / m \times 10^3$$

$$\text{Chl } b = (20.13 A_{644.8} - 4.19 A_{661.6}) V / m \times 10^3$$

$$\text{Chl } a+b = (7.05 A_{661.6} + 18.09 A_{644.8}) V / m \times 10^3$$

$$\text{Car} = (1000 A_{470} - 1,90(11,24 A_{661,6} - 2,04 A_{644,8}) -$$

$$- 63,14(20,13 A_{644,8} - 4,19 A_{661,6})) V / 214 \cdot m 10^3$$

Izraz V odnosi se na ukupni volumen ekstrakta [mL], m predstavlja masu uzorka [g], a vrijednosti koncentracije pigmenata izražene su u mgg^{-1} svježe tvari. Za svaku biljku i svjetlosni uvjet napravljene su tri ekstrakcije, svaka ekstrakcija mjerena je u dva ponavljanja.

2.8 Mjerenje produkcije kisika pomoću kisikove elektrode

Produkcija kisika izmjerena je na četiri tjedna starim biljkama pomoću uređaja za mjerenje kisika u tekućoj fazi, u kojem se koristi Clarkova elektroda („liquid –

phase“, Hansatech). Polovica od ukupnog broja biljaka je izložena kratkotrajnom svjetlosnom stresu pri $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ približno 24 sata prije mjerenja. Usporedno su napravljena mjerenja ΔPEPE biljaka, biljaka divljeg tipa, te TROL nul mutanti. Za svaku biljku i svjetlosni uvjet napravljena su tri mjerenja.

Kisikovu elektrodu čine dvije elektrode - srebrna (Ag) anoda smještena u kružnom utoru i platinasta (Pt) katoda koja se nalazi u uzdignutom svodu diska od epoksi-smole. Elektrolit je otopina KCl (koncentracije koja iznosi 50% od zasićene otopine). Polarizacijski napon od 0,7 V potiče elektrokemijske reakcije na katodi i anodi (Tablica 12). Kisik se reducira na katodi slabodnim elektronima koji potiču s anode pa je rezultirajuća jakost struje ovisna o koncentraciji kisika u uzorku. Ag^+ koji nastaje na anodi reagira s Cl^- iz elektrolita i nastaje AgCl.

Tablica 12. Reakcije na elektrodama

Anoda	Katoda
$\text{Ag} \rightarrow \text{Ag}^+ + e^-$	$\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 2e^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{OH}^-$
$\text{Ag}^+ + \text{Cl}^- \rightarrow \text{AgCl}$	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2e^- \rightarrow 2\text{OH}^-$

Prije mjerenja elektrodu je potrebno pripremiti na sljedeći način: u utor elektrode u kojem se nalazi anoda dodati elektrolit (KCl), te na katodu kapljicu elektrolita. Odmah zatim na elektrodu se položi papirnata razmaknica i membrana propusna za kisik koje se za elektrodu pričvrste gumenim prstenom. Elektroda se nalazi na dnu reakcijske komorice koja je smještena u kućištu tamne boje, nepropusnom za svjetlost. Kućište je spojeno s vodenom kupelji pa se željena temperatura reakcijske smjese održava strujanjem vode kroz kućište. Na kućištu se nalaze držači za izvor svjetlosti. Elektroda je spojena na napajanje i računalo.

Tablica 13. Vrijednosti otopljenog kisika u destiliranoj vodi

Temperatura °C	Kisik (PPM)	Kisik (nmol/mL)
15	9,76	305
20	8,84	276,3
25	8,11	253,4

Prije rada uređaj je potrebno umjeriti pomoću uzorka destilirane vode koji sadrži maksimalnu koncentraciju otopljenog kisika te uzorka vode u kojem je sav postojeći

kisik reduciran. Destilirana voda zasiti se kisikom snažnim mućkanjem. Nakon tog postupka uzorak vode ima poznatu koncentraciju otopljenog kisika koja ovisi o atmosferskom tlaku i okolišnoj temperaturi, a prikazana je u Tablici 13 preuzetoj iz priručnika proizvođača. Osim točke koja odgovara maksimalnoj koncentraciji otopljenog kisika, potrebno je odrediti nultu vrijednost instrumenta. To se postiže dodavanjem natrijevog ditionita u uzorak destilirane vode čime se reducira sav kisik.

Komadići listova približne mase 0,005 g smješteni su u reakcijski prostor elektrode i mjerena je produkcija kisika pri primijenjenoj svjetlosti od 250 i 800 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Temperatura reakcijskog prostora bila je konstantno 20°C.

2.9 Utvrđivanje relativnog sadržaja glutaciona u pojedinim organelama

Za potrebe analize sjemenke vrste *A. thaliana* divljeg tipa, ΔPEPE i TROL nul mutanti nakon stratifikacije naklijavane su u klima komori. Fotoperiod je bio 16 sati svjetla i 8 sati tame. Dnevna temperatura iznosila je prosječno 22 °C, a noćna 18 °C. Biljke su uzgajane pri osvjetljenju od 100 – 140 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ četiri tjedna. Mjerenja su napravljena na potpuno razvijenim mladim listićima rozete biljaka nakon 2 h kontinuirane svjetlosti jačine 150 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, te nakon 4 h izlaganja svjetlosti intenziteta 700 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Sadržaj glutaciona određen je imunogold bojenjem česticama zlata (Zechmann i sur. 2008). Bojenje je napravljeno na ultratankim prerezima pomoću niklane rešetke. Uzorci su tretirani s 2 % otopinom goveđeg albumina (BSA) u fosfatnoj otopini (PBS, pH 7,2) u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Višak otopine sa rešetke uklonjen je filter papirom, a uzorci su tretirani primarnim protutitijelom (anti – glutation IgG) razrijeđenim u omjeru 1:50 sa PBS kojemu je dodan 1 % kozji serum, u trajanju od 2 sata na sobnoj temperaturi. Uzorci su potom isprani otopinom PBS tri puta u trajanju 5 minuta i inkubirani sa sekundarnim protutitijelom na kojemu su konjugirane čestice zlata. Sekundarno antitijelo razrijeđeno je u omjeru 1:50 sa PBS, a inkubacija je trajala 90 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su ponovno isprani otopinom PBS tri puta, po pet minuta, te destiliranom vodom (dva puta po pet minuta). Tako označeni uzorci na niklanoj rešetci priređeni su za elektronsku mikroskopiju. Dodatnim bojanjem sa uranil acetatom omogućena je distinkcija pojedinih staničnih struktura .

2.10 Elektronska mikroskopija

Za potrebe utvrđivanja ultrastrukture elektronskom mikroskopijom biljke su uzgajane pri intenzitetu svjetlosti od $150 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, te pri $700 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Uz ΔPEPE mutante kao kontrola uzgajane su i TROL nul-mutante (KO), te divlji tip vrste *A. thaliana*. Dijelovi lista tako uzgojenih biljaka fiksirani su sa 2% otopinom glutaraldehida u kakodilatnom puferu (pH 7.2). Nakon ispiranja tkivo je fiksirano u 1% OsO_4 u istom puferu, te potom dehidrirano u etanolu i uklopljeno u kapsule polimerizirane smole. Tako priređeni materijal vizualiziran je u obliku ultratankih prereza (100 nm) nakon bojenja sa smjesom 2% toludin plavo i 2% boraksa u omjeru 1:1, pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa (TEM) pri povećanju od 8000 puta kako bi se utvrdile promjene u ultrastrukтури kloroplasta biljaka bez domene PEPE u odnosu na divlji tip, te u odnosu na TROL nul-mutante (Prebeg, 2007).

2.11 Statističke analize

Za potrebu statističke obrade podataka korišten je program StatSoft Inc. STATISTICA, verzija 10.0 (2011). Podaci dobiveni ponavljanjem jednog testa (u zavisnosti od testa bilo je 3-10 ponavljanja) okupljeni su u jedan skup podataka, te je na njima napravljena statistička analiza.

Rezultati dobiveni mjerenjem fluorescencije klorofila, određivanjem koncentracije pigmenta, te produkcije kisika statistički su obrađeni na način da je za svaki skup podataka izračunata srednja vrijednost, te standardno odstupanje. Potom je napravljena analiza varijance (ANOVA) za svaki eksperiment, kroz usporedbu vrijednosti za ΔPEPE mutante, te kontrolne biljke TROL nul-mutante i divlji tip *A. thaliana*, za dva svjetlosna tretmana. U drugom dijelu korišten je LSD test (Least Significant Difference) utvrđivanja najmanje značajnih razlika na razini značajnosti $p < 0,05$. Rezultati analize ANOVA i LSD testa prikazani su malim slovima, pri čemu različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku.

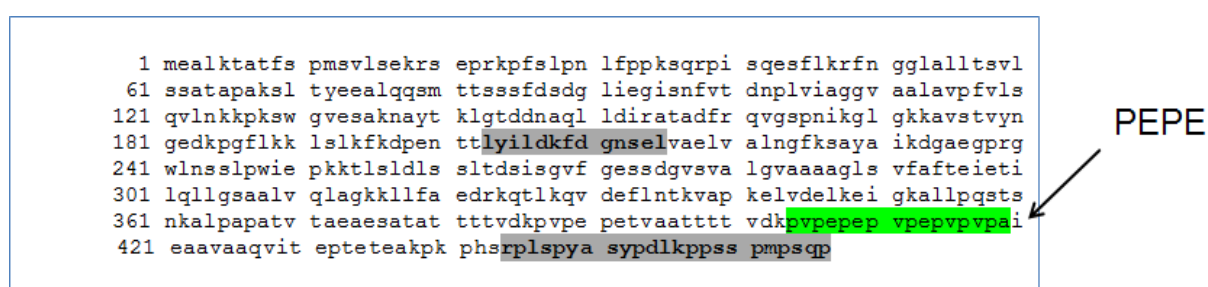
Za prikaz rezultata sadržaja glutaciona korišten je Mann Whitney U-test. Rezultati su prikazani oznakom *, pri čemu rezultat prikazan jednom zvjezdicom (*) se odnosi na razinu značajnosti od $p(t) < 0,05$, dvije (**) za $p(t) < 0,01$, tri (***) za $p(t) < 0,001$ te slovima NS za mjerenja kod kojih nije utvrđena statistički značajna razlika.

REZULTATI

3 REZULTATI

3.1 Konstrukcija mutirane linije Δ PEPE i transformacija biljaka *A. thaliana*

Analizom sekvence proteina TROL utvrđena je zanimljiva prolinom bogata regija između domene ITEP i domene RHO (Jurić 2010). Regiju karakterizira ponavljajući slijed Prolin – Valin - Prolin te je stoga nazvana domena PEPE (Slika 15).



Slika 15. Aminokiselinska sekvenca gena At4g01050 koji kodira protein TROL s naznačenima domenama PEPE, ITEP i RHO (prema Jurić 2010).

Za potrebu funkcijske analize domene PEPE „Gateway“ metodom kloniran je konstrukt bez domene PEPE u vektor pH7WG2.0. Uklonjen je 1210. - 1257. nukleotid koji odgovara aminokiselinskom slijedu PVPEPEPVPEPVPVPA (Slika 16).

Vektor pH7WG2.0 posjeduje gen za otpornost na antibiotike streptomycin i spektinomycin, te unutar T-DNA regije gen za otpornost na antibiotik higromicin. Nakon transformacije plazmidi su uneseni u kompetentne bakterije vrste *E. coli* (soj DH5a) i pohranjeni u obliku bakterijskih glicerinskih kultura na -80 °C. Za izravan unos konstrukta i transformaciju biljaka vrste *A. thaliana* korišteni su sojevi bakterije *A. tumefaciens* oznake EHA105 s rezistencijom na antibiotik rifampicin. Transformirane bakterije uzgajane su na YEB mediju uz dodatak antibiotika. Bakterije s uspješnom ugradnjom plazmida korištene su za transformaciju biljaka „floral dip“ metodom. TROL nul-mutante su uzgajane prema protokolu opisanom u poglavlju 4. uz orezivanje primarnog cvata kako bi se potaklo formiranje većeg broja sekundarnih cvatova i time povećala uspješnost transformacije. Cvjetovi tako

priređenih biljaka uranjani su u baterijsku suspenziju, a sakupljene sjemenke transformiranih biljaka predstavljaju prvu generaciju transformanata T₀.

```

1 atggaagctc tgaaaaccgc aacttttagc cctatgtcgg tgttatccga gaaaagatca
61 gaaccacgaa agcctttctc gctccctaac ctctttccac caaaatcaca gagaccaatc
121 tccaagaaa gcttcttgaa gagattcaat ggtggattgg ctcttctaac ttctgttcta
181 agcagtgcaa cagctcctgc taaatccctg acgtacgagg aagctctgca acaatctatg
241 accacttctt catcttttga ttcggatggt ctgattgaag ggatatccaa ttttgcaca
301 gacaatcctt tggttattgc cgggtgagtt gctgcattgg ctggtccatt tgttctgtct
361 caggttctga acaagaagcc caaatcatgg ggagttgagt ctgctaagaa tgcttatacc
421 aagttgggta ctgatgataa tgctcagttg cttgacataa gagctactgc tgatttcaga
481 caagtgggca gtccctaata taagggtttg ggtaaaaaag cggtttctac tgtttataac
541 ggtgaagaca agcctggttt cctgaagaag ctttctttga agtttaaga tcctgagaac
601 accacattat acattctgga caagtttgat ggaaactctg agcttggtgc tgaattggtg
661 gctcttaatg gattcaaatc tgcttatgcg attaaagatg gtgcagaggg acctagaggg
721 tggttgaata gcagcttgc ttggatagag ccaaagaaga ctctcagcct tgatttaagc
781 agtttgacgg atagcatcag cgggtgattt ggtgagagtt ctgatggtgt atctgtcgtc
841 cttggagtag ctgctgctgc tggattaagt gtttttgcac ttacagagat tgaaaccata
901 ctccaactac taggttcagc tgcacttggt caacttgca gcaagaaact tctatttgc
961 gaagaccgaa agcaaaactc aaaacaggtg gatgagttct tgaacacaaa ggttcccct
1021 aaagaacttg ttgatgagtt aaaggaataa ggaaaggctc ttcttctca atcaacaagc
1081 aacaaagctc tcccagcacc agcaacagta acagcagaag cagaatcagc tacagctaca
1141 accaccacag tcgataaacc agtacctgag ccagaaacag ttgcagctac aacaaccact
1201 gtagataaa cagtacctga gccagagcca gtgccagagc cagtgccagt gccagcgaatt
1261 gaagctgcag tcgctgcaca agtaatcaca gaaccaaccg aaacagaagc caaaccaaaa
1321 cctcattcaa gacctctctc tccatagca tcgtaccctg acttgaagcc tccatcttct
1381 cggatgccaat cgcagccctg a

```

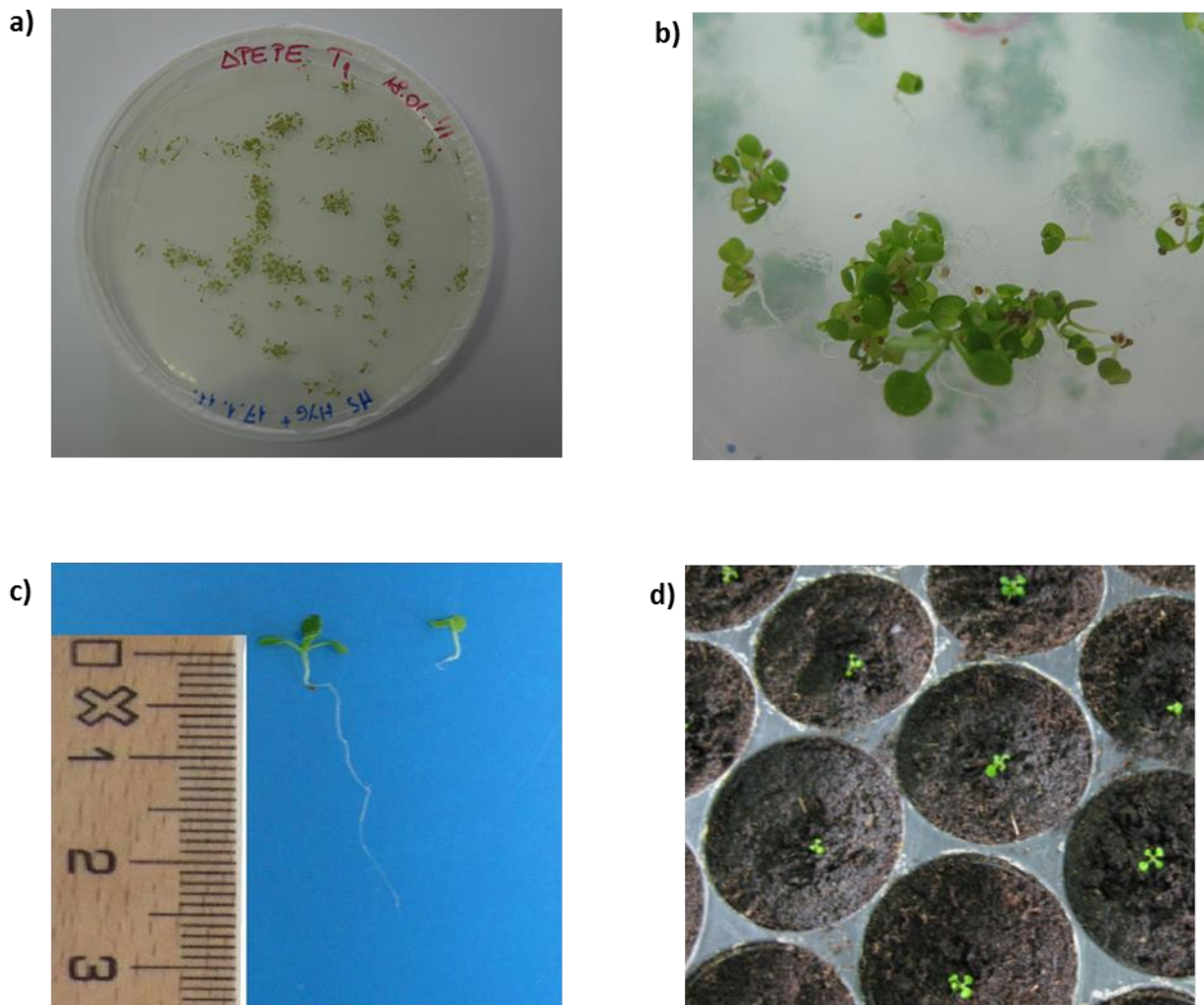
Slika 16. Nukleotidni slijed At4g01050 s naznačenom PEPE domenom.

3.2 Potvrda ugradnje konstrukta u genom biljke

3.2.1 Selekcija higromicin rezistentnih biljaka

Za potvrdu uspješnosti transformacije nakon „floral dip“ metode sjemenke roditeljskih biljaka T₀ podvrgnute su postupku selekcije prema Harison i sur. (2006). Sterilizirane sjemenke su inokulirane na 1% agaru uz dodatak MS medija i antibiotik higromicin. Klijanci s otpornošću na antibiotik lako su identificirani po značajno dužim hipokotilima (duljine preko 1 cm), te bolje razvijenim primarnim listićima rozete. Klijanci netransformiranih biljaka slabo rastu u prisustvu antibiotika, te je kod njih hipokotil skraćen (0,2 - 0,4 cm). Većina inokuliranih sjemenki razvila je klijance kratkog hipokotila i tek nekoliko biljaka sa svake ploče za selekciju je izdvojeno za nastavak istraživanja (Slika 17). Izdvojeni klijanci pažljivo su presađeni na priređeni supstrat od ilovače i treseta. Sjeme tih biljaka predstavlja generaciju T₁.

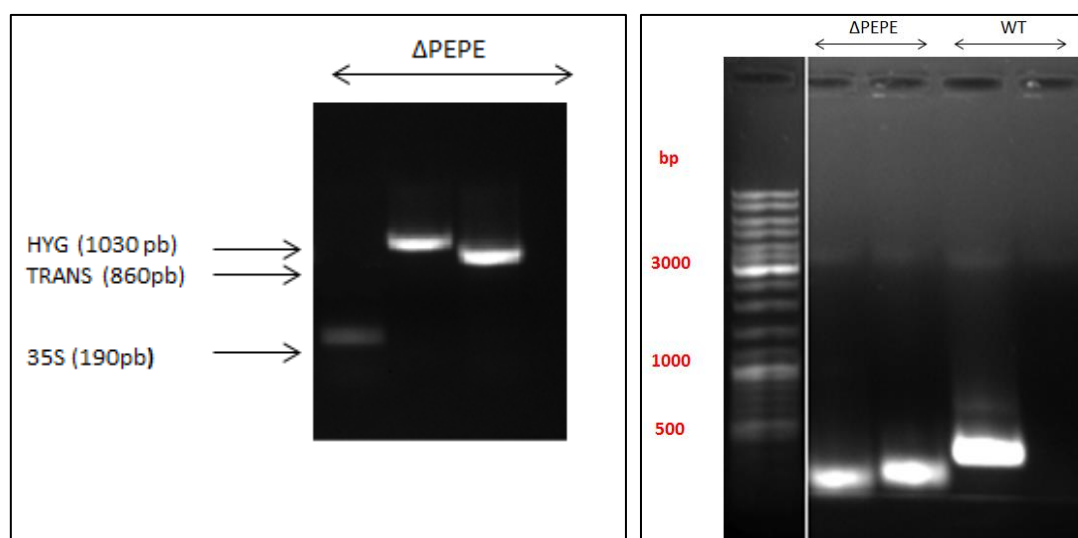
Kako bi izdvojila homozigot za transgen postupak je ponovljen do T₃ generacije. U T₂ generaciji značajno je porastao broj transformiranih klijanaca i samo potomstvo onih biljaka koje su u ovoj generaciji imale omjer rezistentnih biljaka u odnosu na nerezistentne približno 3:1 je korišten za daljnju selekciju. Sjeme T₂ biljaka je ponovno inokulirano na selekcijski medij i izdvojene su one biljke koje su dale potomstvo sa 100 %-tnom otpornošću na higromicin. Ti klijanci su ponovno presađeni na supstrat i uzgojene su biljke kako bi se sakupilo sjeme. Tako dobiveno sjeme predstavlja generaciju transformanata T₃ i homozigot za transgen.



Slika 17. Selekcija higromicin rezistentnih klijanjaca na selekcijskim pločama. a) prikaz inokuliranih sjemenki na selekcijskim pločama nakon tjedan dana uzgoja. b) karakterističan izgled klijanca otpornog na antibiotik. c) usporedba klijanaca transformiranih i netransformiranih biljaka nakon uzgoja na selekcijskom mediju. d) transformirane biljke presađene na supstrat.

3.2.2 Potvrda ugradnje konstrukta PCR metodom

Genotip transformanata potvrđen je lančanom reakcijom polimeraze na T₂ generaciji biljaka. Genomska DNA izolirana je iz rozete biljaka koristeći Phire® Plant Direct PCR Kit. Za amplifikaciju karakterističnih regija genomske DNA korišteno je tri para početnica: 35S-F i 35S-R (190 pb), HYG-F i HIG-R (1030pb) i 35S-F i TROL_ΔRHO_R (860pb).



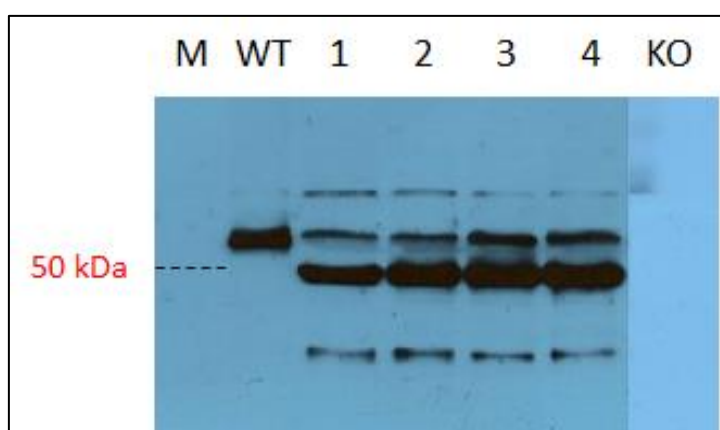
Slika 18. Lijevo: PCR provjera genoma biljaka T₂ generacije. Prva kolona prikazuje produkt umnažanja promotorske regije plazmidnog vektora P-35S, druga prikazuje produkt umnažanja higromicinske regije plazmida, a u trećoj koloni vidimo produkt mjesta vezanja inserta u biljni genom pri čemu jedna početnica naliježe na promotorsku regiju vektora, a druga na RHO regiju TROL-a (TRANS). Desno: Provjera TROL „Background“. U prvoj koloni je produkt umnažanja pomoću Sail740f i ITEPSall početnica (133 pb) za ΔPEPE klon, druga kolona produkt početnica ITEP Sall i LB3 (180 pb). Treća i četvrta kolona prikazuju iste reakcije za divlji tip, pri čemu je produkt Sail740f i ITEPSall početnica veličine 316 pb, dok je reakcija sa početnicom koja se veže za lijevu graničnu regiju vektora izostala.

Umnažani su dijelovi T-DNA regije u svrhu potvrde ugradnje vektora u genom biljke. Za potvrdu mjesta ugradnje i pravilne orijentacije inserta umnožen je dio lanca DNA koji odgovara mjestu vezivanja konstrukta u biljni genom. Produkti umnažanja vizualizirani su elektroforezom u gelu agaroze bojenjem etidij bromidom (Slika 18).

TROL pozadina (TROL Background) potvrđena je umnažanjem početnicama Sail740f i ITEPSall, te ITEP Sall i LB3. Kao kontrola korištena je DNA divljeg tipa kod koje je očekivano izostao produkt reakcije sa početnicom LB3 koja umnaža dio vektora.

3.2.3 Imunodetekcija proteina Western blot analizom

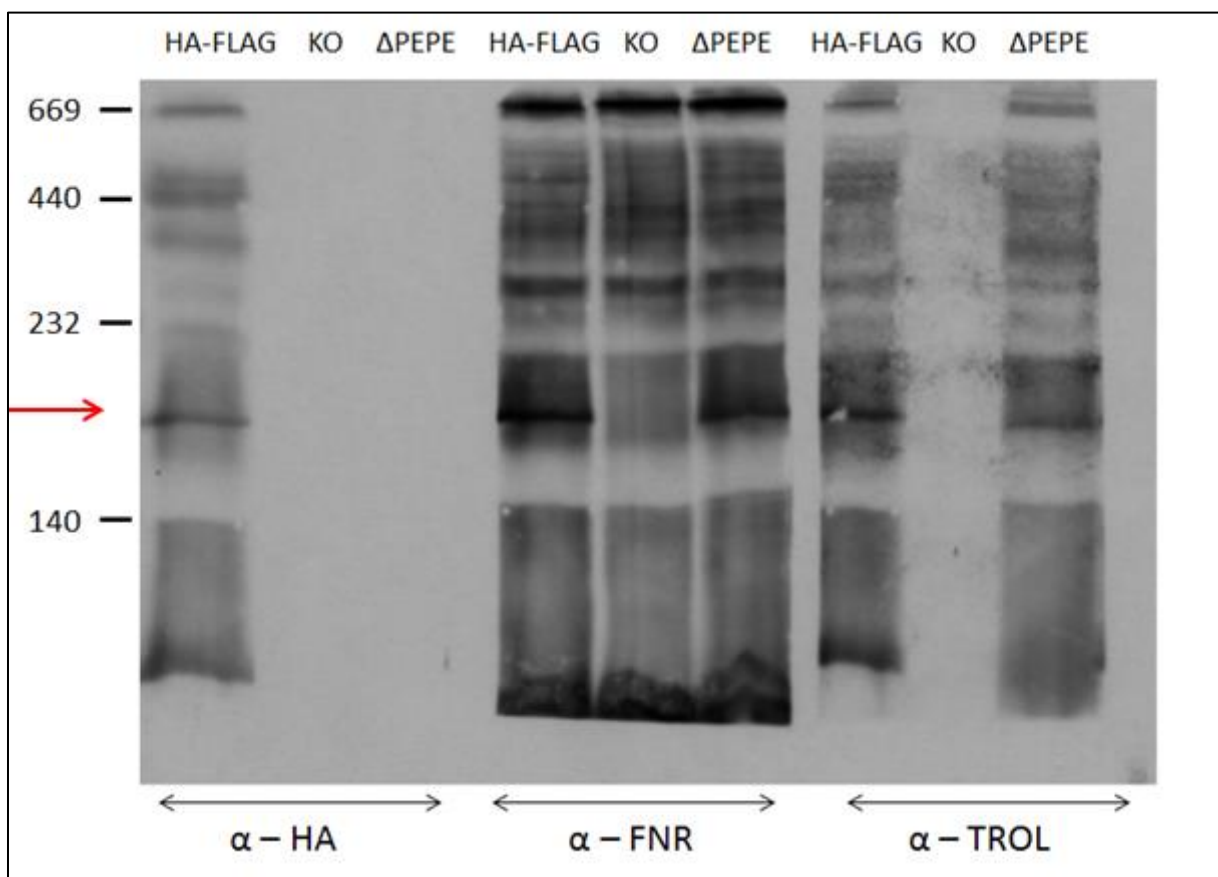
Western blot analiza napravljena je na proteinskom ekstraktu dobivenom iz T₃ generacije ΔPEPE mutanti. Primjenom primarnog protutijela anti-TROL (α-TROL 1:1000), te sekundarnog anti-rabbit IgG (1:30.000) potvrđena je prisutnost proteina TROL u uzorcima ΔPEPE biljaka. Za pozitivnu kontrolu korišten je proteinski ekstrakt divljeg tipa, dok je za negativnu kontrolu korištena TROL nul-mutanta. U uzorcima iz listova ΔPEPE biljaka i listova divljeg tipa vidljiv je proteinski produkt veličine približno 50 – 70 kDa. Kod divljeg tipa proteinski produkt odgovara veličini proteina TROL od približno 66 kDa, dok je produkt reakcije kod ΔPEPE biljaka očekivano nešto kraći zbog uklanjanja domene PEPE. Kod nul-mutanti izostao je produkt uslijed nedostatka proteina TROL u uzorku. Samo ΔPEPE biljke kod kojih je potvrđeno da proizvode protein TROL korištene su za daljnje analize (Slika 19).



Slika 19. Western blot analiza proteina TROL. S lijeva na desno: proteinski marker (M), divlji tip kao pozitivna kontrola (WT), uzorci ΔPEPE (1-4), trol nul-mutanta kao negativna kontrola (KO).

3.2.4 Plava nativna elektroforeza – BN PAGE

Za razdvajanje i lokalizaciju nativnih i enzimatski aktivnih proteinskih kompleksa s TROL-om korištena je plava nativna poliakrilamid gel elektroforeza. Za potrebu razdvajanja kompleksa pomoću peristaltičke pumpe formiran je gradijentni gel poliakrilamida u rasponu od 6 – 12 %. Nativni tilakoidni kompleksi izolirani su iz biljaka Δ PEPE, divljeg tipa, te TROL-HA-FLAG biljaka označenih proteinskim biljezima HA i FLAG (HA-FLAG linije nisu dio ovog doktorata).



Slika 20. BN-PAGE proteinskih kompleksa sa TROL-om i FNR-om. Tilakoidini proteini identificirani su pomoću karakterističnih protutijela (α -HA, α -FNR i α -TROL). Strelica označava položaj TROL-FNR kompleksa (približno 190 kDa).

Za utvrđivanje moguće interakcije TROL-a u Δ PEPE biljkama sa drugim fotosintetskim proteinima, te prije svega dolazi li do čvrstog vezanja FNR-a na TROL

u odsustvu domene PEPE korištena su specifična protutijela: α -FNR i α -TROL, a kao dodatna kontrola i α -HA. Na Slici 20 strelica označava položaj TROL-FNR kompleksa veličine približno 190 kDa. Kompleks je jasno vidljiv kod Δ PEPE biljaka i kod HA-FLAG biljaka označenih vezivanjem sa α -FNR i α -TROL protutijelima, te nije prisutan u TROL nul mutantama. U reakciji sa anti-FNR-om vidljivo je da Δ PEPE biljke sadrže sve proteinske komplekse kao i HA-FLAG biljke koje imaju cjelovit TROL, dok je kod nul mutanti očekivano u potpunosti je izostao kompleks na 190 kDa. Isto vidimo i kod reakcije s anti-TROL-om. TROL-KO biljke nisu u stanju stvoriti kompleks s TROL-om, dok Δ PEPE biljke uspješno sudjeluju u interakciji s FNR-om. Prema Jurić (2010.) FNR protein uz kompleks od 190 kDa, stvara i komplekse približne veličine 300 kDa, 420 kDa i >440 kDa što je potvrđeno i ovim reakcijama, te su vidljivi karakteristični produkti reakcija kod Δ PEPE i HA-FLAG biljaka, dok su kod TROL-KO mutanti izostali svi spomenuti produkti.

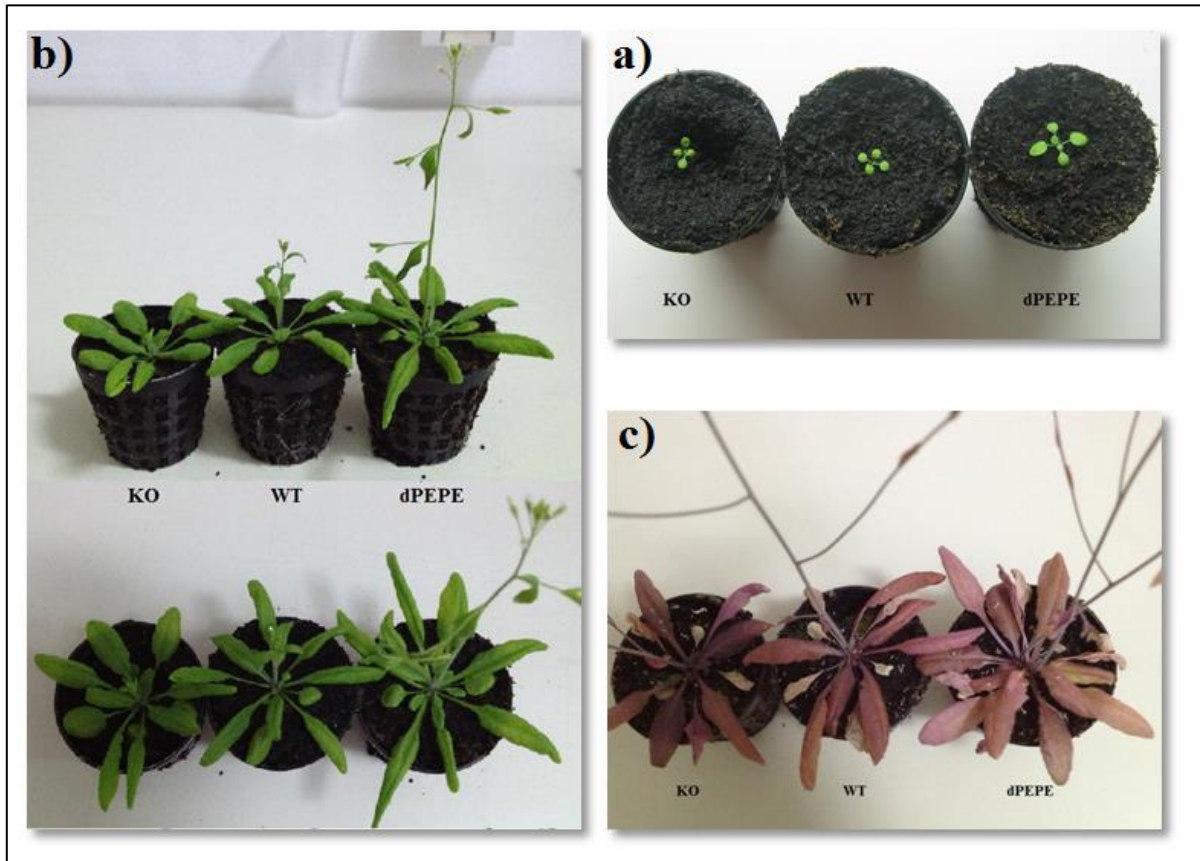
Kao dodatna kontrola biljke su podvrgnute reakciji sa α -HA protutijelom pri čemu su očekivano vidljivi kompleksi samo kod HA-FLAG biljaka označenim HA biljgom (Slika 20).

3.3 Promjene u fenotipu mutanti u ovisnosti o svjetlosnom uvjetu

Za potrebe istraživanja Δ PEPE biljke su uzgajane na supstratu ilovače i treseta uz izmjenični uvjet osvjetljenja od 16 sati svjetla pri temperaturi od 20°C i količini svjetlosti od 80 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, te 8 sati mraka na 18°C. Uz uvjete optimalnog osvjetljenja biljke su također uzgajane i pri količini svjetlosti od 300 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Uz Δ PEPE mutante kao kontrola uzgajane su i biljke divljeg tipa, te TROL nul mutante (Slika 21).

Biljke *A. thaliana* kojima je uklonjena PEPE domena kroz cijelo istraživanje pokazuju znatno brži rast i razvoj u odnosu na biljke divljeg tipa, te TROL-KO mutante. Na biljkama starim četiri tjedna najznačajnija je razlika u razvoju. Biljke bez domene PEPE već su u potpunosti razvile cvijet, dok su biljke divljeg tipa imale cvijet tek u začetku. Rozeta kod svih biljaka bila je ravnomjerno zelene boje, no ukupna biomasa listova Δ PEPE biljaka je bila vidljivo veća. Kod biljaka uzgajanih pri 300 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ intenzitet crvene boje lista bio je izraženiji kod Δ PEPE biljaka

i TROL-KO biljaka u odnosu na biljke divljeg tipa gdje je produkcija antocijana bila manja.



Slika 21. Fenotip Δ PEPE biljaka u odnosu na TROL-KO biljke i divlji tip.

- a) Fenotip tjedan dana starih biljaka uzgojenih pri $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ redom: TROL nul mutanta, divlji tip, Δ PEPE biljka. b) Fenotip četiri tjedna starih biljaka uzgojenih pri istim uvjetima i istim redoslijedom. c) Fenotip biljaka uzgojenih pri $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

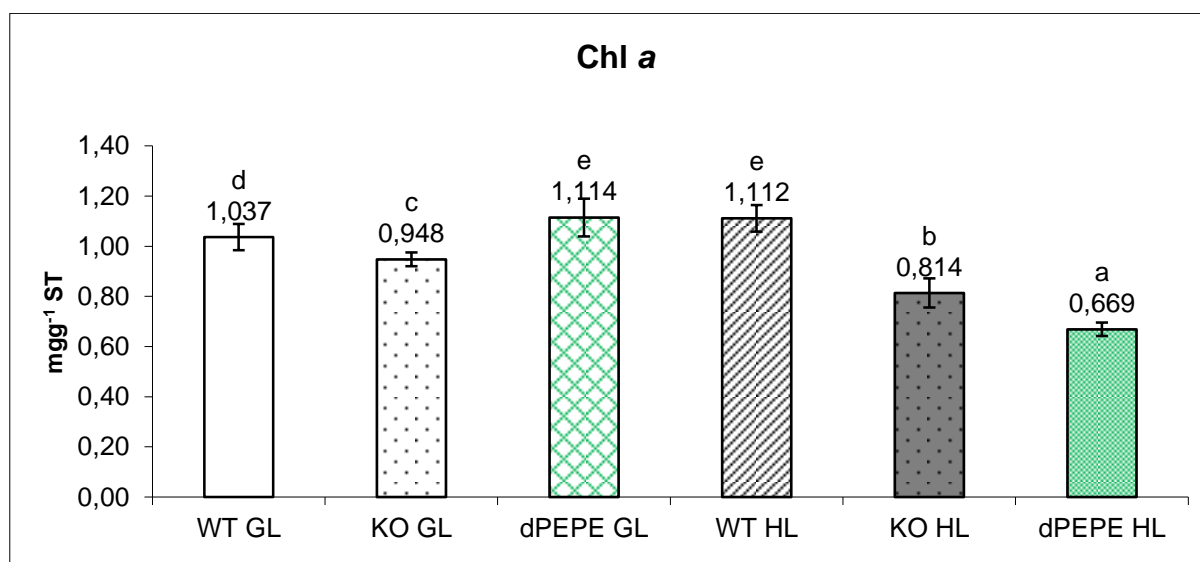
3.4 Koncentracija fotosintetskih pigmenata

Koncentracija pigmenata mjerena je na četiri tjedna starim biljkama. Dio biljaka je izložen velikoj količini svjetlosti od $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ približno 24 sata prije ekstrakcije pigmenata iz listova rozete. Usporedno su napravljena mjerenja Δ PEPE biljaka, divljeg tipa, te TROL nul mutanti.

3.4.1 Koncentracija klorofila *a*

Dobivene srednje vrijednosti i standardna odstupanja usporedno za Δ PEPE biljke, divlji tip, te TROL nul-mutante u dva uvjeta osvjetljenja prikazane su na Slici 22. Analiza varijance za koncentracije klorofila *a* pokazala je statistički značajne razlike i među pojedinim linijama *A. thaliana*, te između dva svjetlosna uvjeta na razini značajnosti $p < 0.05$.

Prosječna srednja vrijednost koncentracije klorofila *a* Δ PEPE mutanti uzgojenih pri $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ iznosila je $1,114 \text{ mgg}^{-1}$ svježe tvari što je ujedno i najviša izmjerena vrijedost za sve linije biljaka uzgajanih pri tom svjetlosnom uvjetu. Najniža vrijednost je izmjerena je u TROL nul mutantama.



Slika 22. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja kod mjerenja koncentracije klorofila *a* (mg g^{-1} svježe tvari) u listovima rozete četiri tjedna starih biljaka *A. thaliana* uzgajanih pri $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL). Statistički značajne razlike označene su malim slovima (Slike 22 – 27).

Kod biljaka izloženih količini svjetlosti od $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ najniža vrijednost klorofila *a* izmjerena je kod Δ PEPE mutanti u iznosu od $0,669 \text{ mgg}^{-1}$, dok je vrijednost za biljke divljeg tipa iznosila najviših $1,112 \text{ mgg}^{-1}$ svježe tvari.

Tablica 14. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja kod mjerenja koncentracije klorofila *a* na Δ PEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

	WT	KO	ΔPEPE
GL	1,037 ± 0,052	0,948 ± 0,027	1,114 ± 0,076
HL	1,112 ± 0,053	0,814 ± 0,058	0,669 ± 0,027

U listovima biljaka uzgajanih pri $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ prosječna srednja vrijednost za Δ PEPE mutante bila je statistički značajno viša i u odnosu na vrijednosti koje su izmjerene u biljaka divljeg tipa ($1,037 \text{ mgg}^{-1}$) kao i u odnosu na TROL nul mutante ($0,948 \text{ mgg}^{-1}$).

U listovima biljaka tretiranih visokim intenzitetom osvjetljenja prosječna srednja vrijednost koncentracije klorofila *a* Δ PEPE biljaka bila je značajno niža u odnosu na divlji tip ($1,112 \text{ mgg}^{-1}$), te u odnosu na trol nul mutante ($0,814 \text{ mgg}^{-1}$).

3.4.2 Koncentracija klorofila *b*

Analiza varijance srednjih vrijednosti za koncentracije klorofila *b* u listovima biljaka uzgajanih pri $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ potvrdila je postojanje statistički značajnih razlika između Δ PEPE biljaka i kontrolnih biljaka (Slika 23).

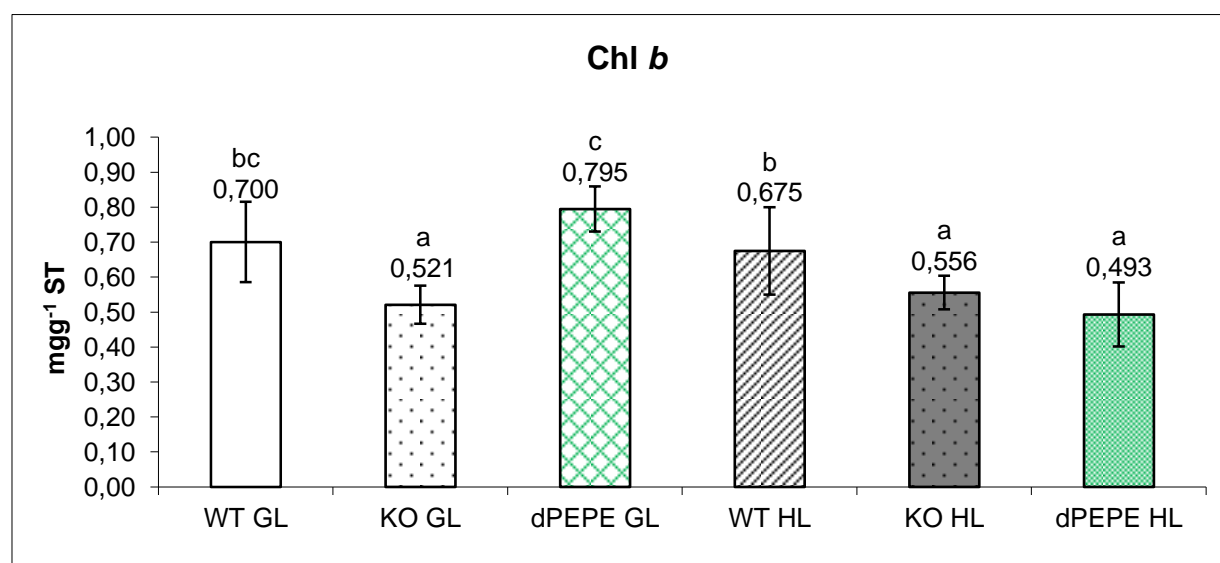
Prosječna srednja vrijednost koncentracije klorofila *b* kod Δ PEPE biljaka uzgajanih pri GL iznosila je $0,795 \text{ mgg}^{-1}$ svježe tvari što je ujedno i najviša izmjerena vrijednost za sve linije biljaka pri oba svjetlosna uvjeta. U HL uvjetima uzgoja najnižu vrijednost koncentracije klorofila *b* imale su linije TROL-KO ($0,521 \text{ mgg}^{-1}$ svježe tvari).

Kod biljaka izloženih djelovanju svjetlosti jačine $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Δ PEPE biljake imale su kao i kod klorofila *a* najnižu izmjerenu vrijednost koja je iznosila $0,496 \text{ mgg}^{-1}$ svježe tvari, dok su u biljaka divljeg tipa izmjerene najviše vrijednosti ($0,675 \text{ mgg}^{-1}$ svježe tvari).

Tablica 15. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja kod mjerenja koncentracije klorofila *b* na Δ PEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

	WT	KO	Δ PEPE
GL	$0,700 \pm 0,115$	$0,521 \pm 0,054$	$0,795 \pm 0,064$
HL	$0,675 \pm 0,125$	$0,556 \pm 0,048$	$0,493 \pm 0,091$

U listovima biljaka uzgajanih u GL uvjetima osvjetljenja prosječna srednja vrijednost koncentracije klorofila *b* Δ PEPE mutante bila je statistički značajno viša od vrijednosti za TROL-KO mutante, no ne i od vrijednosti za biljke divljeg tipa.



Slika 23. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja kod mjerenja koncentracije klorofila *b* (mg g⁻¹ svježe tvari) u listovima rozete četiri tjedna starih biljaka *A. thaliana* uzgajanih pri $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

Kod biljaka izloženih djelovanju visokog intenziteta osvjetljenja prosječna srednja vrijednost koncentracije klorofila *b* Δ PEPE biljaka statistički je značajno niža od biljaka divljeg tipa, dok u odnosu na TROL-KO mutante nema statistički značajne razlike.

3.4.3 Koncentracija ukupnih klorofila (*a + b*)

Srednje vrijednosti i standardna odstupanja koncentracije ukupnih klorofila (Chl *a+b*) kod biljaka uzgajanih u dva svjetlosna uvjeta prikazane su na Slici 24. Najviše vrijednosti koncentracije ukupnih klorofila imale su biljke Δ PEPE uzgajane u GL uvjetima (1,909 mgg⁻¹ svježe tvari), dok su vrijednosti za biljke divljeg tipa iznosile 1,737 mg/g, a za TROL nul mutante 1,468 mgg⁻¹ svježe tvari.

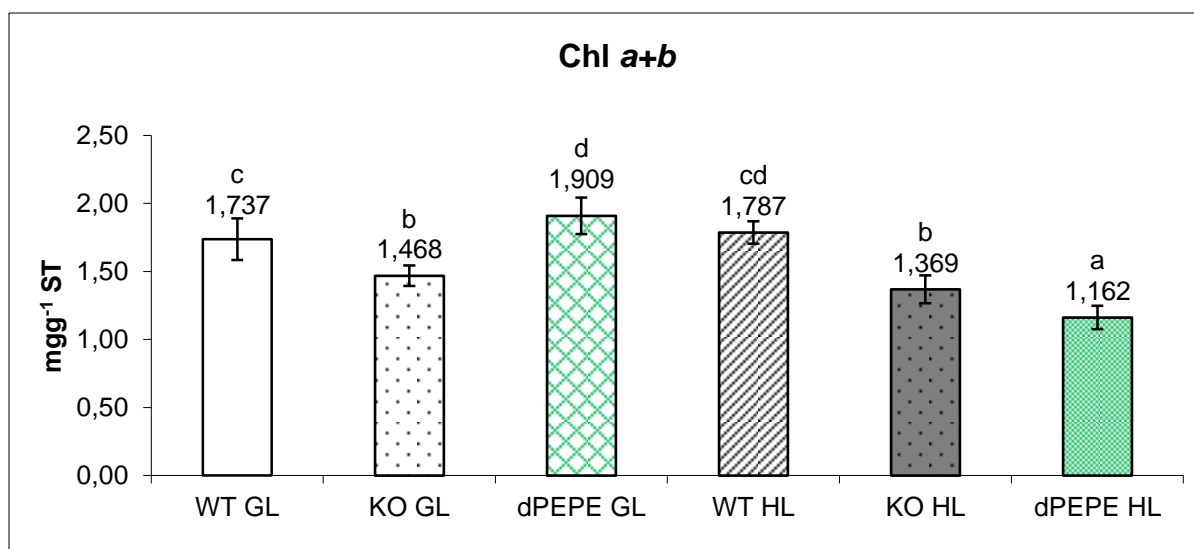
Kod biljaka izloženih HL uvjetima biljke divljeg tipa imale su najviše vrijednosti koncentracije ukupnih klorofila (1,787 mgg⁻¹ svježe tvari), dok su Δ PEPE mutante imale najniže vrijednosti od 1,162 mgg⁻¹ svježe tvari.

Kod biljaka uzgajanih pri 80 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ prosječna srednja vrijednosti Δ PEPE biljaka bila je statistički značajno viša i u odnosu na divlji tip i u odnosu na TROL nul mutante. U listovima biljaka izloženih 300 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ prosječna srednja vrijednost koncentracije ukupnih klorofila Δ PEPE biljaka bila je statistički značajno niža od biljaka divljeg tipa i od TROL-KO mutanti.

Tablica 16. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja kod mjerenja koncentracije ukupnih klorofila na Δ PEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: 80 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i 300 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

	WT	KO	Δ PEPE
GL	1,737 ± 0,152	1,468 ± 0,075	1,909 ± 0,134
HL	1,787 ± 0,083	1,369 ± 0,102	1,162 ± 0,085

Ukupno gledajući sve linije u oba svjetlosna uvjeta statistički značajno najviše vrijednosti koncentracije ukupnih klorofila imale su biljke Δ PEPE uzgajane pri GL uvjetima, dok su statistički značajno najniže vrijednosti imale iste te mutante izložene djelovanju količini svjetlosti od 300 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.



Slika 24. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja kod mjerenja koncentracije ukupnih klorofila (mgg⁻¹ svježe tvari) u listovima rozete četiri tjedna starih biljaka *A. thaliana* uzgajanih pri 80 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹ (GL) i 300 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹ (HL).

3.4.4 Koncentracija ukupnih karotenoida

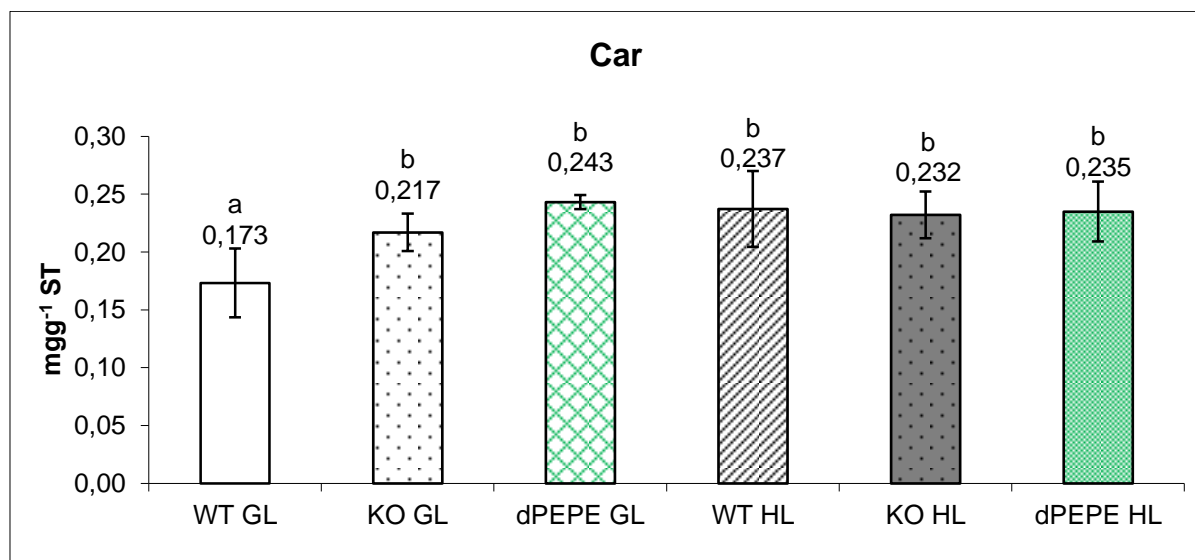
Analiza varijance srednjih vrijednosti koncentracije karotenoidnih pigmenta pokazala je da kod većine mjerenih biljnih izolata za oba svjetlosna uvjeta nema statistički značajne razlike.

Tablica 17. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja kod mjerenja koncentracije ukupnih karotenoida na ΔPEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: 80 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹ (GL) i 300 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹ (HL).

	WT	KO	ΔPEPE
GL	0,173 ± 0,030	0,217 ± 0,016	0,243 ± 0,006
HL	0,237 ± 0,033	0,232 ± 0,020	0,235 ± 0,026

Kod linija biljaka uzgajanih pri GL svjetlosnom uvjetu jedino biljke divljeg tipa imale su statistički značajno niže vrijednosti karotenoida (0,173 mgg⁻¹ svježe tvari), dok kod biljaka izloženih visokom intenzitetu osvjetljenja sve tri linije biljaka imale su

približno jednake vrijednosti koncentracije karotenoida (0,232 - 0,235 mgg⁻¹ svježe tvari) te među njima nije bilo statistički značajnog odstupanja.



Slika 25. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja kod mjerenja koncentracije ukupnih karotenoida (mgg⁻¹ svježe tvari) u listovima rozete četiri tjedna starih biljaka *A. thaliana* uzgajanih pri 80 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹ (GL) i 300 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹ (HL).

3.4.5 Omjer koncentracije klorofila *a* i klorofila *b*

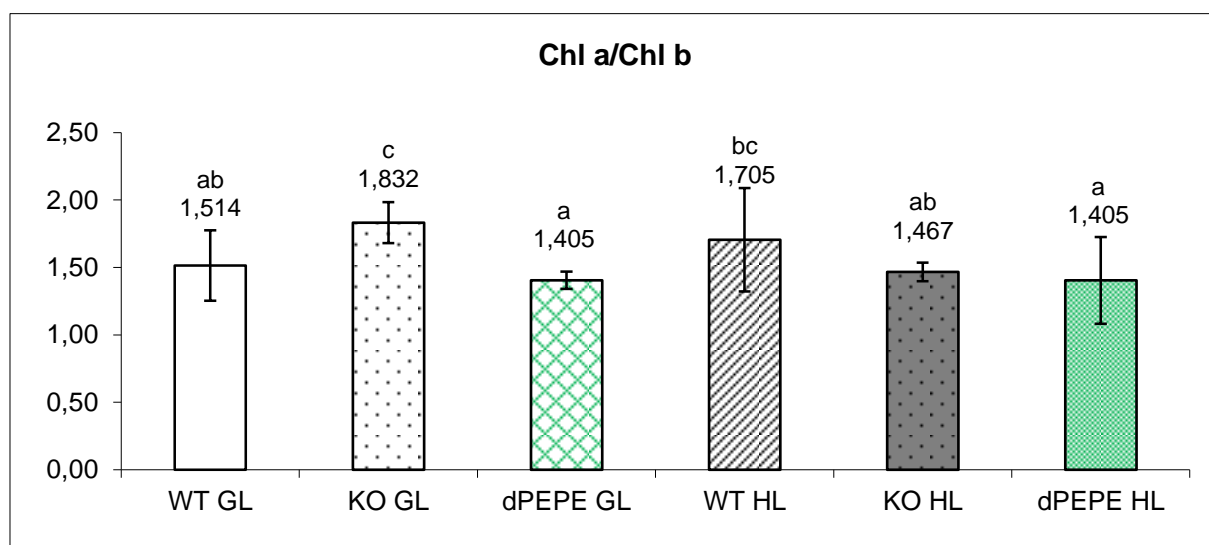
Na razini značajnosti $p < 0,05$ analiza varijance za omjer klorofila *a* i klorofila *b* pokazala je da postoje statistički značajne razlike između ΔPEPE mutanti i kontrolnih biljaka u oba svjetlosna uvjeta.

Tablica 18. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja kod mjerenja omjera koncentracije klorofila *a* i klorofila *b* na ΔPEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: 80 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹ (GL) i 300 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹ (HL).

	WT	KO	ΔPEPE
GL	1,514 ± 0,262	1,832 ± 0,152	1,405 ± 0,064
HL	1,705 ± 0,383	1,467 ± 0,070	1,405 ± 0,321

Omjer Chl *a* / Chl *b* ΔPEPE mutanti iznosio je 1,405 i kod biljaka uzgajanih pri GL uvjetima i kod HL uvjeta što je ujedno i najniža izmjerena vrijednost za omjer Chl *a* / Chl *b*. Najvišu srednju vrijednost omjera imale su TROL nul mutante uzgajane pri GL od 1,832.

Statistički značajno odstupanje omjera Chl *a* / Chl *b* utvrđeno je između ΔPEPE biljaka i TROL nul mutanti uzgajanih pri 80 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹, dok između ΔPEPE biljaka i divljeg tipa nije bilo statistički značajne razlike.



Slika 26. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja kod mjerenja omjera koncentracije klorofila *a* i klorofila *b* u listovima rozete četiri tjedna starih biljaka *A. thaliana* uzgajanih pri 80 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹ (GL) i 300 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹ (HL).

Kod biljaka izloženih djelovanju 300 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹ svjetlosti za ΔPEPE mutante izmjerene su značajno niže vrijednosti u odnosu na biljke divljeg tipa uzgajanih pri istim uvjetima. Između biljaka TROL KO i ΔPEPE linija nije bilo statistički značajne razlike (Slika 26, Tablica 18).

3.4.6 Omjer ukupnih klorofila i karotenoida

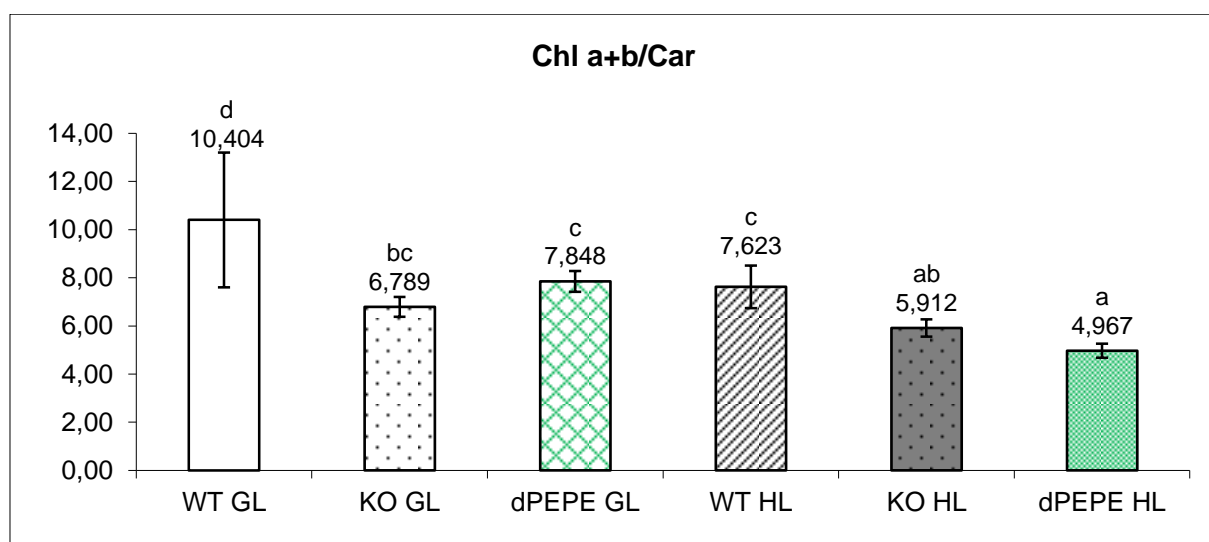
Izračunate srednje vrijednosti i standardna odstupanja omjera ukupnih klorofila i karotenoidnih pigmenata za biljke *A. thaliana* divlji tip, ΔPEPE mutante, te TROL

nul mutante izložene djelovanju dva različita intenziteta svjetlosti prikazane su na Slici 27. Analizom varijance za izračunate vrijednosti omjera koncentracije pigmentata utvrđeno je postojanje statistički značajnih razlika.

Tablica 19. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja kod mjerenja omjera ukupnih klorofila i karotenoida na Δ PEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

	WT	KO	Δ PEPE
GL	10,404 \pm 2,798	6,789 \pm 0,416	7,848 \pm 0,435
HL	7,623 \pm 0,881	5,912 \pm 0,362	4,967 \pm 0,289

Prosječna srednja vrijednost omjera ukupnih klorofila i karotenoida uzgajanih pri GL uvjetima bila je najniža kod TROL nul mutanti i iznosila je 6,789, dok je najviša vrijednost mjerena kod divljeg tipa i iznosila je 10,404. Kod biljaka izloženih visokom intenzitetu svjetlosti najniže vrijednosti omjera imale su Δ PEPE linije (1,967), a najviše biljke divljeg tipa (7,623).



Slika 27. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja omjera ukupnih klorofila i karotenoida u listovima rozete četiri tjedna starih biljaka *A. thaliana* uzgajanih pri $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

Kod Δ PEPE biljaka uzgajanih pri $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dobivene vrijednosti statistički su značajno niže u odnosu na divlji tip, dok u odnosu na TROL nul-mutante nije utvrđena statistički značajna razlika.

Također i kod Δ PEPE biljaka uzgajanih pri $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dobivene vrijednosti su značajno niže u odnosu na divlji tip, a u odnosu na TROL nul mutante nema statistički značajnog odstupanja (Tablica 19).

3.5 Mjerenje fluorescencije klorofila *a*

Mjerenja fluorescencije klorofila *a* napravljena su na četiri tjedna starim biljkama uzgajanim pri optimalnim uvjetima i osvjetljenju od $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Dio biljaka je izložen količini svjetlosti od $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ približno 24 sata prije mjerenja. Usporedno su napravljena mjerenja Δ PEPE biljaka, divljeg tipa, te TROL nul mutanti tretiranih s dva različita svjetlosna uvjeta.

Mjerenja su napravljena pomoću dva tipa fluorometra: PAM fluorometra (Pulse Amplitude Modulated) koji omogućava mjerenje fluorescencije inducirano modularnom svjetlošću, te PEA fluorometer (Pulse Efficiency Analyser) tzv. Handy fluorometar koji koristi kontinuiranu svjetlost.

PEA fluorometrom mjerena je fluorescencija klorofila *a* u 10 ponavljanja po svakoj liniji biljaka i za svaki svjetlosni uvjet. Neposredno prije mjerenja biljke su adaptirane na mrak u trajanju od 30 minuta kako bi se svi PSII reakcijski centri otvorili, a Q_A maksimalno oksidirao.

Nakon mraka biljke su pomoću PAM fluorometra izložene izrazito slabom impulsu svjetlosti ($0,1 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i u tom trenutku zabilježen je minimalni intenzitet fluorescencije F_0 . Potom slijedi kratak impuls saturacijske svjetlosti jačine $3000 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ uslijed čega dolazi do potpune redukcije Q_A , te se u tom trenutku mjeri maksimalni intenzitet fluorescencije F_m . Vrijednosti F_0 i F_m su referentne vrijednosti za vrednovanje fotokemijskog i nefotokemijskog gašenja metodom saturacijskog pulsa. Isti parametri mjereni su i pri primijenjenoj svjetlosti od 100, 250 i $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Dobivene vrijednosti statistički su obrađene najprije analizom varijance, potom LSD testom radi utvrđivanja najmanje značajnih razlika na razini značajnosti $p < 0,05$. Statistički značajne razlike označene su malim slovima.

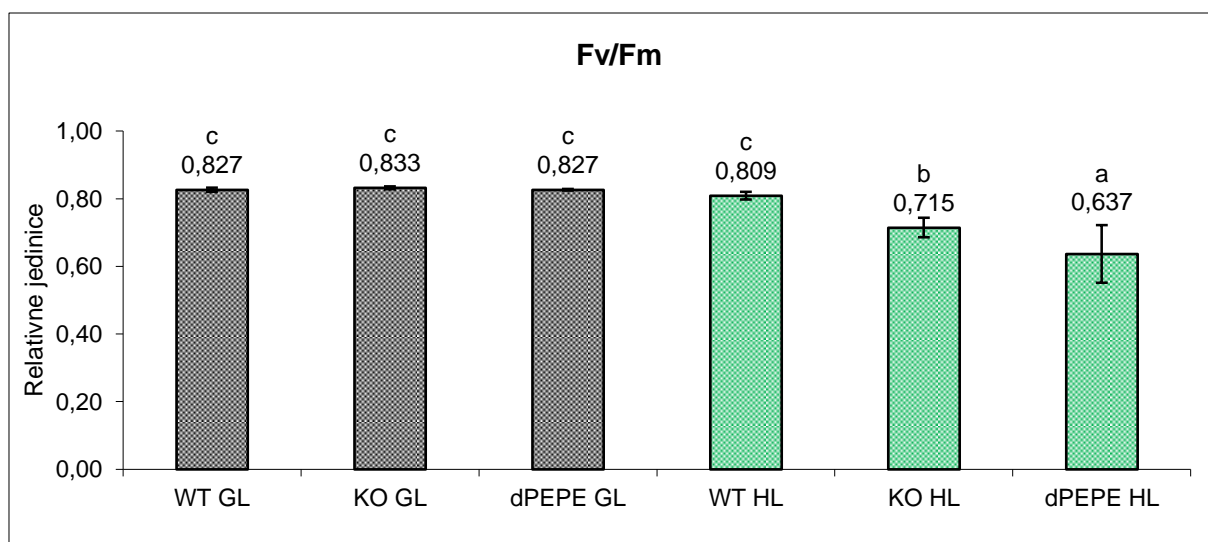
3.5.1 Vrijednosti maksimalnog kvantnog prinosa PSII (Fv/Fm)

Maksimalni kvantni prinos PSII mjeren u listovima biljaka starim četiri tjedna i uzgajanih pri GL uvjetima iznosio je u prosjeku od 0,827 do 0,833, dok je vrijednost maksimalnog kvantnog prinosa PSII u listovima biljaka izloženih povišenom intenzitetu svjetlosti iznosila od 0,637 do 0,809 relativnih jedinica (Tablica 20, Slika 28).

Tablica 20. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja maksimalnog prinosa fluorescencije (Fv/Fm) na Δ PEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

	WT	KO	Δ PEPE
GL	0,827 ± 0,01	0,833 ± 0,00	0,827 ± 0,00
HL	0,809 ± 0,01	0,715 ± 0,03	0,637 ± 0,08

Iz dobivenih vrijednosti vidljivo je da kod svih linija biljaka izloženih GL svjetlosnim uvjetima nema statistički značajne razlike u vrijednostima Fv/Fm. Statistički značajne promjene vidljive su kod biljaka nakon tretmana svjetlom jačine $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. U odnosu na kontrolne biljke Δ PEPE mutante imale su znatno niže vrijednosti Fv/Fm i iznosile su $0,637 \pm 0,08$ što je ujedno i najniža dobivena vrijednost za oba svjetlosna uvjeta. Rezultati analize varijance između dobivenih srednjih vrijednosti, te LSD testa pokazali su kod biljaka izloženih viskom intenzitetu osvjetljenja statistički značajne razlike između sve tri linije biljaka. Δ PEPE biljke imale su statistički značajno niže vrijednosti, dok su vrijednosti maksimalnog prinosa kvanta PSII kod biljaka divljeg tipa bile statistički značajno najviše ($0,809 \pm 0,01$), te se nisu značajno razlikovale od vrijednosti biljaka uzgojenih u GL uvjetima.



Slika 28. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja maksimalnog prinosa fluorescencije (Fv/Fm) za biljke divljeg tipa, TROL nul mutante, te Δ PEPE mutante uzgajane u dva svjetlosna uvjeta (GL i HL).

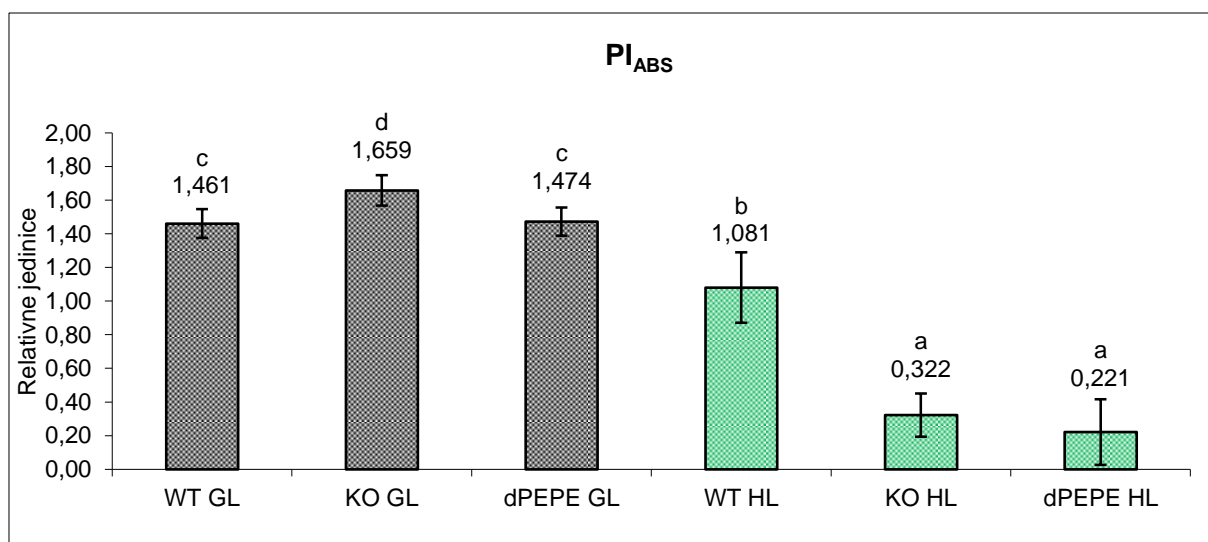
3.5.2 Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS})

Srednje vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti u listovima biljaka koje su kontinuirano uzgajane u GL uvjetima, te u listovima biljaka izloženih tretmanu svjetlosti povišenog intenziteta HL prikazane su na Slici 29.

Kod biljaka uzgajanih pri GL uvjetima dobivene su visoke vrijednosti PI_{ABS} , pri čemu je najviša dobivena vrijednost izmjerena kod TROL nul mutanti ($1,659 \pm 0,1$), dok je kod biljaka divljeg tipa iznosila najnižih $1,461 \pm 0,1$. Indeks fotosintetske učinkovitosti Δ PEPE mutanti iznosio je $1,474 \pm 0,1$.

Kod biljaka izloženih djelovanju svjetlosti jačine $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ vidljiv je pad vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti. Najniže izmjerene vrijednosti imale su Δ PEPE biljke i iznosile su $0,221 \pm 0,2$. Nešto više vrijednosti dobivene su kod TROL nul-mutanti ($0,322 \pm 0,1$), a najviše kod biljaka divljeg tipa $1,081 \pm 0,2$.

Kod GL uvjeta statistički značajne razlike PI_{ABS} vrijednosti određene su između TROL nul-mutanti i Δ PEPE, dok između Δ PEPE i divljeg tipa nije bilo statistički značajne razlike. Kod HL uvjeta LSD testom utvrđeno je da su vrijednosti PI_{ABS} za Δ PEPE mutante statistički značajno niže u odnosu na divlji tip, dok u odnosu na TROL nul mutante nije utvrđena statistički značajna razlika.



Slika 29. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) za biljke divljeg tipa, TROL nul mutante, te Δ PEPE mutante uzgajane u dva svjetlosna uvjeta (GL i HL).

Tablica 21. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) na Δ PEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

	WT	KO	Δ PEPE
GL	1,461 ± 0,10	1,659 ± 0,10	1,474 ± 0,10
HL	1,081 ± 0,20	0,322 ± 0,10	0,221 ± 0,20

3.5.3 Omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila

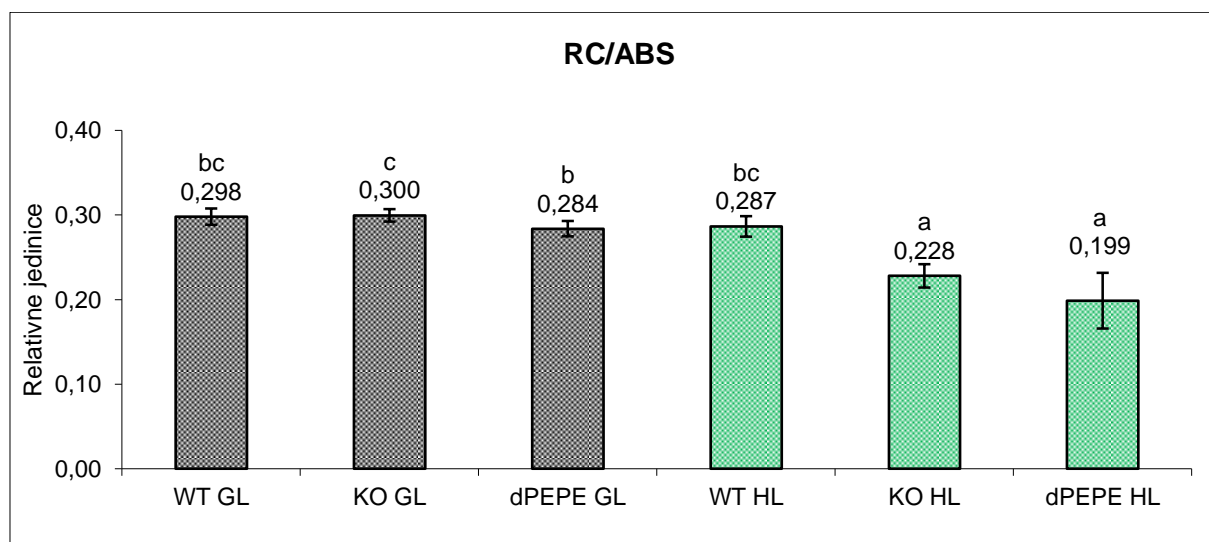
U listovima rozete biljaka starih četiri tjedna uzgajanih pri $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila (RC/ABS) nije se značajno mijenjao i iznosio je prosječno 0,284 – 0,300. U listovima Δ PEPE biljaka i TROL KO biljaka izloženih djelovanju svjetla jačine $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$

prosječne vrijednosti parametra RC/ABS manje su u odnosu na vrijednosti dobivene nakon GL uvjeta (Tablica 22, Slika 30).

Tablica 22. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja omjera koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila na Δ PEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

	WT	KO	Δ PEPE
GL	0,298 ± 0,00	0,300 ± 0,00	0,284 ± 0,00
HL	0,287 ± 0,00	0,228 ± 0,00	0,199 ± 0,00

Dobiveni rezultati LSD testa pokazuju da između linije biljaka divljeg tipa u odnosu na linije TROL KO i Δ PEPE uzgajanih pri optimalnom osvjetljenju od $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nije bilo statistički značajne razlike. S druge strane dobivene vrijednosti za Δ PEPE biljke su statistički značajno manje u odnosu na TROL nul mutante.



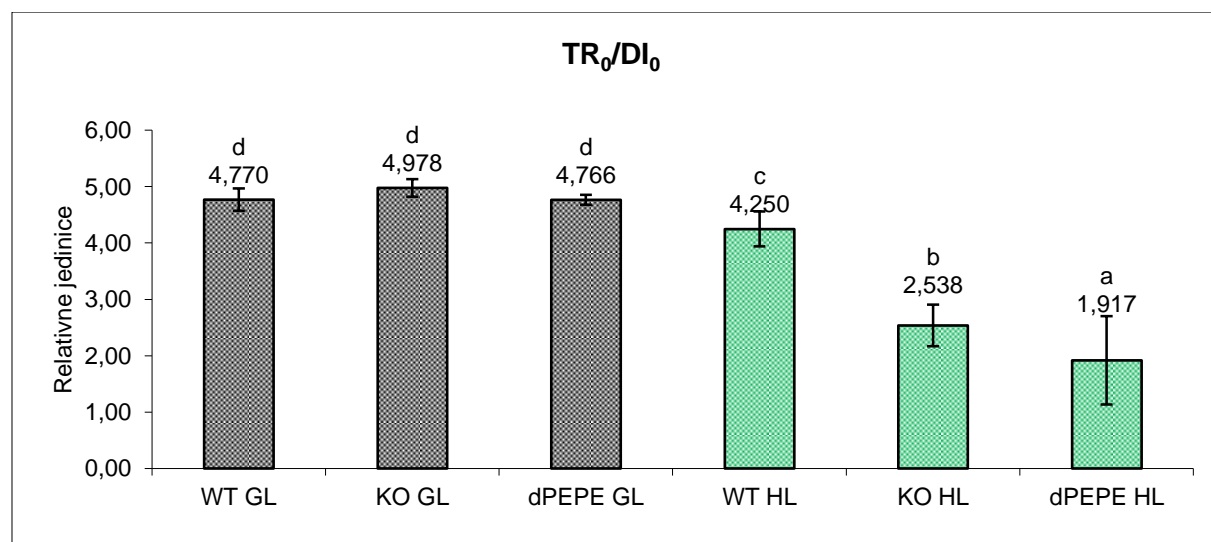
Slika 30. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja omjera koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila (RC/ABS) za biljke divljeg tipa, TROL nul mutante, te Δ PEPE mutante uzgajane u dva svjetlosna uvjeta (GL i HL).

Vrijednosti za biljke divljeg tipa koje su izložene tretmanu visokim intenzitetom svjetlosti nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na vrijednosti sve tri linije biljaka uzgojenih pri GL osvjetljenju. Dobivene vrijednosti za Δ PEPE mutante (HL) statistički su značajno niže u odnosu na biljke divljeg tipa. Između Δ PEPE biljaka i TROL KO nije zabilježena statistički značajna razlika.

3.5.4 Omjer hvatanja ekscitona i rasipanja energije

Srednje vrijednosti omjera hvatanja ekscitona i rasipanja energije (TR_0/DI_0) određene su za Δ PEPE mutante, te kontrolne biljke TROL nul mitanta i divlji tip. Usporedno su napravljena mjerenja za dva svjetlosna uvjeta GL i HL, te je iz dobivenih srednjih vrijednosti LSD testom utvrđeno postojanje statistički značajnih razlika između pojedinih biljaka i svjetlosnog tretmana (Slika 31).

Kod biljaka uzgajanih pri optimalnom svjetlosnom uvjetu (GL) vrijednosti omjera hvatanja ekscitona i rasipanja energije za sva tri sustava bile su ujednačene i kretale su se između $4,766 \pm 0,1$ i $4,978 \pm 0,2$.



Slika 31. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja omjera hvatanja ekscitona i rasipanja energije (TR_0/DI_0) za biljke divljeg tipa, TROL nul mutante, te Δ PEPE mutante uzgajane u dva svjetlosna uvjeta (GL i HL).

Kod biljaka izloženih djelovanju svjetlosti jačine $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ΔPEPE biljke imale su značajno smanjene vrijednosti u odnosu na kontrolne biljke i u odnosu na GL svjetlosni uvjet ($1,917 \pm 0,8$). Srednje vrijednosti TR_0/DI_0 pri HL uvjetu za divlji tip iznosile su $4,250 \pm 0,3$, a za TROL KO mutante $2,538 \pm 0,4$.

Rezultati analize varijance i LSD testa srednjih vrijednosti za sve tri linije biljaka pri GL osvjetljenju pokazale su ujednačenost rezultata i među njima nije utvrđeno statistički značajno odstupanje. Rezultati LSD testa za HL svjetlosni uvjet pokazali su da su ΔPEPE biljke imale statistički najniže vrijednosti u odnosu na kontrolne biljke. Dobivene vrijednosti za TROL nul mutante statistički su značajno niže od vrijednosti divljeg tipa. Sva tri biljna sustava izložena HL tretmanu imala su statistički značajno niže vrijednosti u odnosu na vrijednosti GL uvjeta.

Tablica 23. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja hvatanja ekscitona i rasipanja energije (TR_0/DI_0) na ΔPEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta (GL i HL).

	WT	KO	ΔPEPE
GL	$4,770 \pm 0,20$	$4,978 \pm 0,20$	$4,766 \pm 0,10$
HL	$4,250 \pm 0,30$	$2,538 \pm 0,40$	$1,917 \pm 0,80$

3.5.5 Transport elektrona nizvodno od primarnog akceptora Q_A

U listovima rozete biljaka starih četiri tjedna uzgajanih pri $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ vrijednost parametra $\text{ET}_0/(\text{TR}_0/\text{ET}_0)$ nije se značajno mijenjala i iznosila je prosječno $1,031 - 1,112$. U listovima biljaka izloženih djelovanju svjetla jačine $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ prosječne vrijednosti parametra $\text{ET}_0/(\text{TR}_0/\text{ET}_0)$ manje su u odnosu na vrijednosti dobivene nakon GL uvjeta (Slika 32).

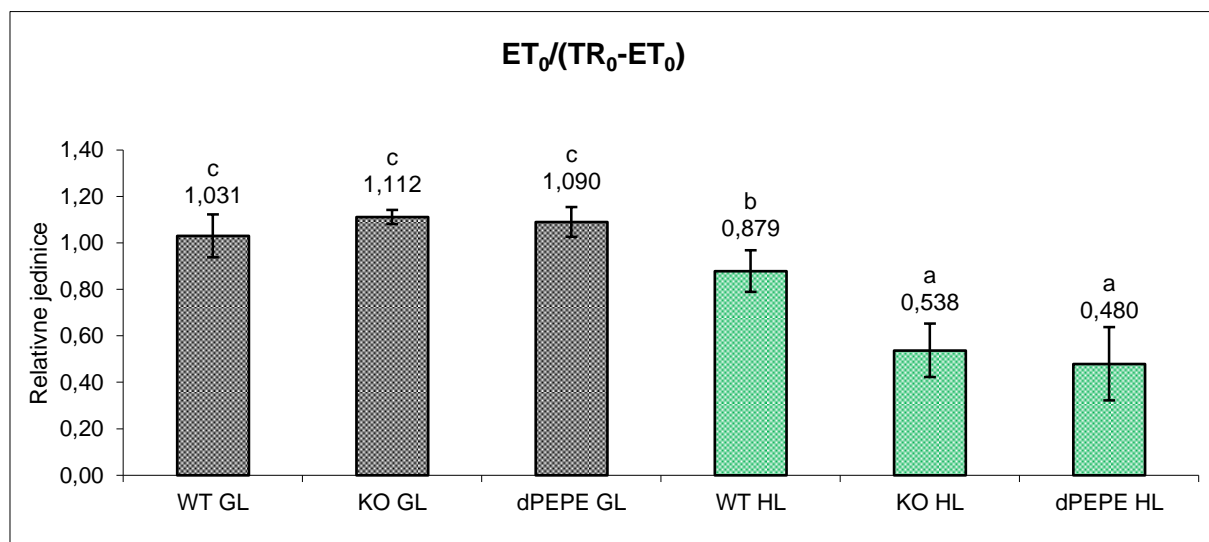
Dobiveni rezultati LSD testa pokazuju da između linija biljaka uzgajanih pri optimalnom osvjetljenju od $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nije bilo statistički značajne razlike. Vrijednosti za biljke izložene tretmanu visokim intenzitetom svjetlosti statistički su

se značajno razlikovale u odnosu na vrijednosti svih linija biljaka uzgojenih pri GL osvjetljenju.

Tablica 24. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja parametra $ET_0/(TR_0/ET_0)$ na Δ PEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

	WT	KO	Δ PEPE
GL	1,031 ± 0,10	1,112 ± 0,00	1,090 ± 0,10
HL	0,879 ± 0,10	0,538 ± 0,10	0,480 ± 0,20

Dobivene vrijednosti za Δ PEPE mutante i TROL KO mutante (HL) statistički su značajno manje u odnosu na biljke divljeg tipa, te je kod svih tri linija biljaka nakon predtretmana HL osvjetljenjem došlo do statistički značajnog smanjenja vrijednosti $ET_0/(TR_0/ET_0)$ u odnosu na biljke bez predtretmana.

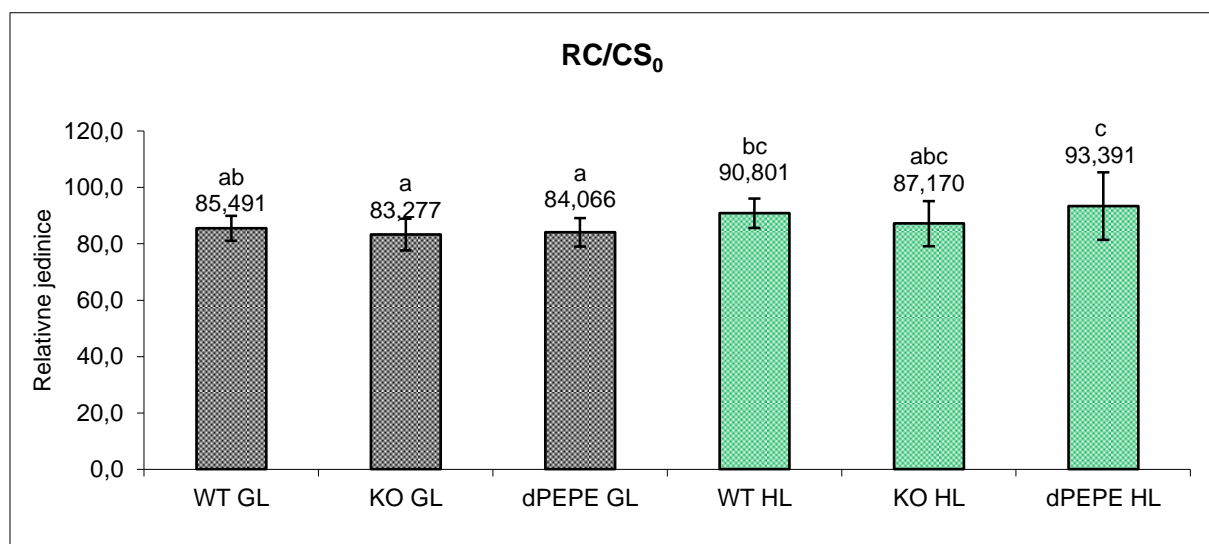


Slika 32. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja parametra $ET_0/(TR_0/ET_0)$ za biljke divljeg tipa, TROL nul mutante, te Δ PEPE mutante uzgajane u dva svjetlosna uvjeta (GL i HL).

3.5.6 Gustoća aktivnih reakcijskih središta

Gustoća aktivnih reakcijskih središta u listovima biljaka nakon četiri tjedna uzgoja pri optimalnom osvjetljenju iznosila je prosječno od $83,277 \pm 5,6$ do $85,491 \pm 4,4$. Vrijednosti gustoće aktivnih reakcijskih središta u listovima biljaka izloženih djelovanju povišenog intenziteta svjetlosti iznosile su prosječno od $87,170 \pm 8,0$ do $93,391 \pm 12,0$. Vrijednosti dobivene nakon tretmana visokim intenzitetom svjetlosti bile su u prosjeku više u odnosu na vrijednosti dobivene pri optimalnom osvjetljenju (Tablica 25).

Najviše dobivene vrijednosti imale su Δ PEPE mutante na $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su da nije bilo statistički značajne razlike između Δ PEPE biljaka i kontrolnih biljaka. U odnosu na biljke koje nisu bile izložene djelovanju HL tretmana Δ PEPE HL biljke imale su statistički značajno više vrijednosti gustoće aktivnih reakcijskih središta. Između biljaka divljeg tipa, te TROL KO biljaka s HL tretmanom i biljaka uzgajanih pri GL uvjetu nije bilo statistički značajne razlike (Slika 33).



Slika 33. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja gustoće aktivnih reakcijskih središta (RC/CS_0) za biljke divljeg tipa, TROL nul mutante, te Δ PEPE mutante uzgajane u dva svjetlosna uvjeta (GL i HL).

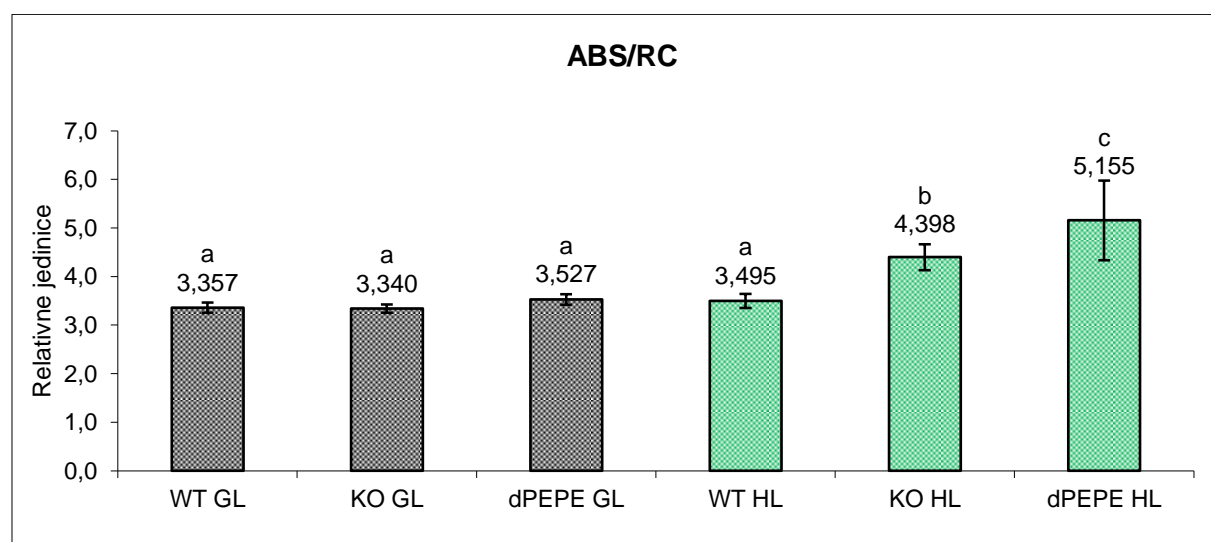
Tablica 25. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja gustoće aktivnih reakcijskih središta (RC/CS₀) na ΔPEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: 80 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹ (GL) i 300 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹ (HL).

	WT	KO	ΔPEPE
GL	85,491 ± 4,4	83,277 ± 5,6	84,066 ± 5,0
HL	90,801 ± 5,2	87,170 ± 8,0	93,391 ± 12,0

3.5.7 Apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu

Srednje vrijednosti apsorpcije po aktivnom središtu (ABS/RC) u listovima biljaka koje su kontinuirano rasle pri GL uvjetima, te vrijednosti za biljke izložene djelovanju svjetlosti visokog intenziteta prikazane su na Slici 34.

Kod biljaka uzgajanih pri 80 μmol_{fotona}m⁻²s⁻¹ dobivene su ujednačene vrijednosti ABS/RC za sve tri linije biljaka. Dobivene vrijednosti kretale su se od 3,357 ± 0,1 za divlji tip, do 3,527 ± 0,1 za ΔPEPE mutante.



Slika 34. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja parametra ABS/RC za biljke divljeg tipa, TROL nul mutante, te ΔPEPE mutante uzgajane u dva svjetlosna uvjeta (GL i HL).

Kod biljaka izloženih djelovanju svjetlosti jačine $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ΔPEPE biljke imale su najviše vrijednosti parametra ABS/RC od $5,155 \pm 0,8$. Srednja vrijednost ABS/RC za TROL nul mutante iznosila je $4,398 \pm 0,3$, a za divlji tip $3,495 \pm 0,1$.

Tablica 26. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja parametra ABS/RC na ΔPEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

	WT	KO	ΔPEPE
GL	$3,357 \pm 0,10$	$3,340 \pm 0,10$	$3,527 \pm 0,10$
HL	$3,495 \pm 0,10$	$4,398 \pm 0,30$	$5,155 \pm 0,80$

Dobiveni rezultati LSD testa pokazuju da između ΔPEPE biljaka i kontrolnih biljaka pri GL uvjetu nije bilo statistički značajnih razlika. Vrijednosti za ΔPEPE biljke nakon tretmana visokim intenzitetom svjetlosti bile su statistički značajno najviše i u odnosu na kontrole uzgajane pri istim uvjetima i u odnosu na GL uvjet. Vrijednost za biljke divljeg tipa pod HL tretmanom statistički su značajno niže u odnosu na ΔPEPE mutante i TROL KO mutante pod istim svjetlosnim tretmanom. Između biljaka divljeg tipa tretiranih HL osvjetljenjem i svih triju biljnih linija pod GL uvjetom nije bilo statistički značajne razlike.

3.5.8 Hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu

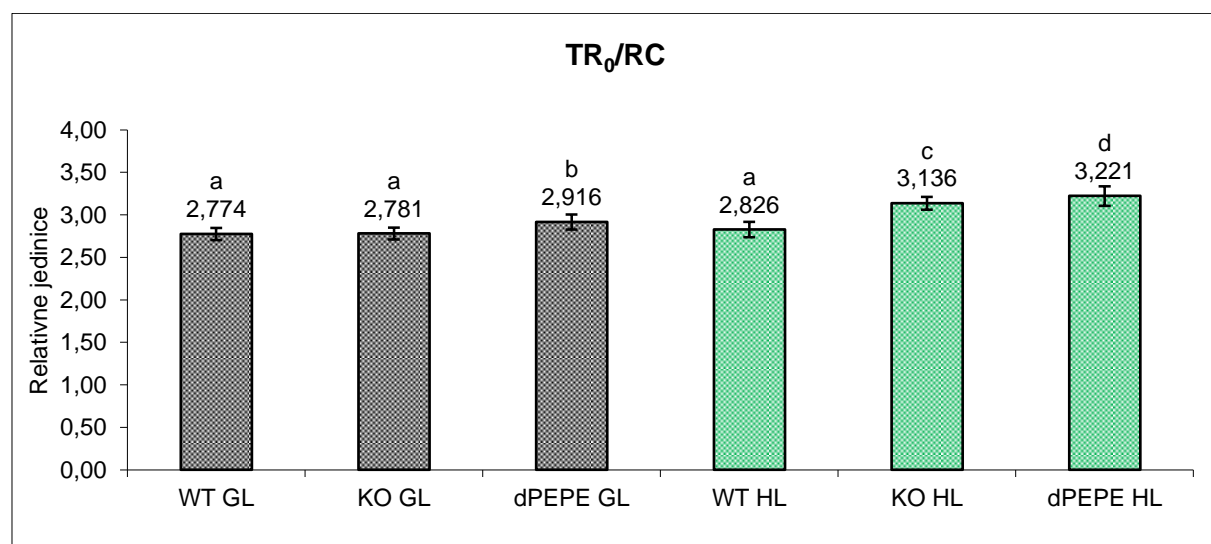
U listovima biljaka uzgajanih pri $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ vrijednosti parametra TR_0/RC kretale su se od $2,774 \pm 0,1$ za biljke divljeg tipa do $2,916 \pm 0,1$ za ΔPEPE mutante. U listovima biljaka izloženih djelovanju svjetla jačine $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dobivene vrijednosti hvatanja ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu kretale su se od $2,826 \pm 0,1$ za divlji tip do $3,221 \pm 0,1$ za ΔPEPE mutante što je ujedno i najviša dobivena vrijednost za ovaj parametar (Slika 35).

Tablica 27. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja vrijednosti hvatanja ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC) na $\Delta PEPE$ biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta (GL i HL).

	WT	KO	$\Delta PEPE$
GL	2,774 ± 0,10	2,781 ± 0,10	2,916 ± 0,10
HL	2,826 ± 0,10	3,136 ± 0,10	3,221 ± 0,10

Kod GL uvjeta analizom varijance i LSD testom utvrđeno je da između biljaka divljeg tipa i TROL nul mutanti nije bilo statistički značajne razlike, dok su $\Delta PEPE$ mutante imale statistički značajno više vrijednosti u odnosu na kontrolne biljke.

Kod HL uvjeta LSD testom utvrđeno je da između sve tri linije biljaka ima statistički značajne razlike. Vrijednosti parametra TR_0/RC za $\Delta PEPE$ biljke statistički su značajno više i od divljeg tipa i od TROL nul mutanti, dok su vrijednosti za divlji tip biljke *A.thaliana* statistički niže i u odnosu na TROL KO mutante i u odnosu na $\Delta PEPE$ biljke.



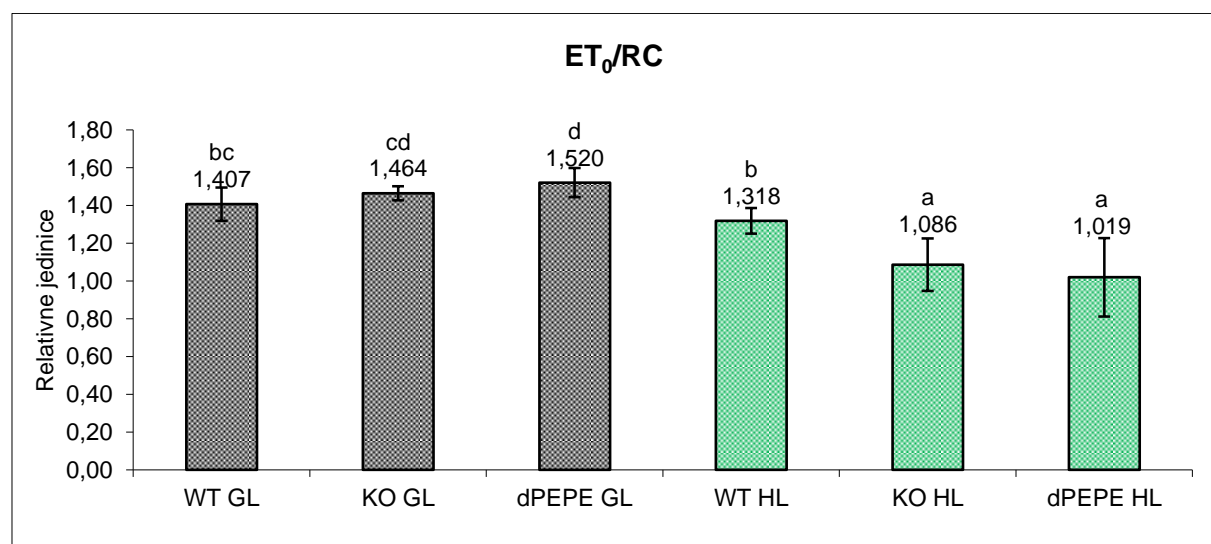
Slika 35. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja vrijednosti hvatanja ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC) za biljke divljeg tipa, TROL nul mutante, te $\Delta PEPE$ mutante uzgajane u dva svjetlosna uvjeta (GL i HL).

3.5.9 Elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu

Srednje vrijednosti parametra ET_0/RC u listovima četiri tjedna starih biljaka uzgajanih na GL svjetlosnom uvjetu kretale su se od $1,407 \pm 0,1$ za divlji tip, do $1,520 \pm 0,1$ za $\Delta PEPE$ biljke. Kod HL uvjeta najviše vrijednosti parametra ET_0/RC imale su biljke divljeg tipa ($1,318 \pm 0,1$), a najniže $\Delta PEPE$ biljke ($1,019 \pm 0,2$). Dobivene vrijednosti prikazane su na Slici 36.

Tablica 28. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja parametra ET_0/RC na $\Delta PEPE$ biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

	WT	KO	$\Delta PEPE$
GL	$1,407 \pm 0,10$	$1,464 \pm 0,00$	$1,520 \pm 0,10$
HL	$1,318 \pm 0,10$	$1,086 \pm 0,10$	$1,019 \pm 0,20$



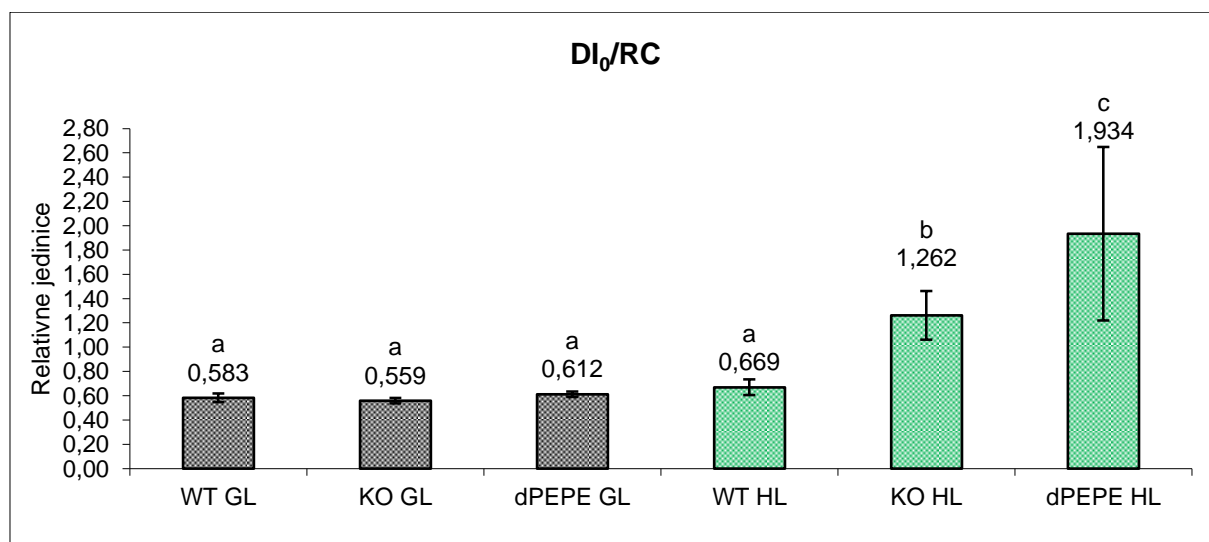
Slika 36. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja parametra ET_0/RC za biljke divljeg tipa, TROL nul mutante, te $\Delta PEPE$ mutante uzgajane u dva svjetlosna uvjeta (GL i HL).

Rezultati LSD testa pokazali su da su dobivene vrijednosti za elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu kod Δ PEPE biljaka pri GL uvjetu statistički značajno više u odnosu na biljke divljeg tipa uzgajane pri istom uvjetu, dok između TROK KO mutanti i Δ PEPE mutanti nije bilo statistički značajne razlike.

Rezultati LSD testa za HL svjetlosni uvjet pokazali su da Δ PEPE biljke imaju statistički niže vrijednosti parametra ET_0/RC u odnosu na divlji tip, dok u odnosu na TROL nul mutante nije bilo statistički značajne razlike.

3.5.10 Rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu

U listovima biljaka kontinuirano uzgajanih pri GL svjetlosnom uvjetu vrijednosti rasipanja po aktivnom reakcijskom središtu između sve tri linije biljaka nisu se značajno razlikovale. Dobivene vrijednosti kretale su se od $0,583 \pm 0,0$ za divlji tip, do $0,612 \pm 0,0$ za Δ PEPE biljke. Kod biljaka tretiranih HL osvjetljenjem vrijednosti rasipanja po aktivnom reakcijskom središtu kretale su se od $0,669 \pm 0,1$ za divlji tip do najviših $1,934 \pm 0,7$ za Δ PEPE biljke (Slika 37).



Slika 37. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja rasipanja po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC) za biljke divljeg tipa, TROL nul mutante, te Δ PEPE mutante uzgajane u dva svjetlosna uvjeta (GL i HL).

Rezultati analize varijance i LSD testa biljaka uzgajanih na GL pokazuju da nema statistički značajne razlike u dobivenim vrijednostima za parametar DI_0/RC . Rezultati LSD testa za biljke izložene HL pokazali su da između sve tri linije biljaka postoje statistički značajne razlike. Dobivene vrijednosti za $\Delta PEPE$ mutante značajno su više u odnosu na divlji tip i TROL KO. Vrijednosti TROL KO mutante značajno su više od dobivenih vrijednosti za divlji tip, dok između dobivenih vrijednosti za divlji tip i biljaka uzgajanih pri GL nije bilo statistički značajne razlike.

Tablica 29. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja rasipanja po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC) na $\Delta PEPE$ biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

	WT	KO	$\Delta PEPE$
GL	$0,583 \pm 0,00$	$0,559 \pm 0,00$	$0,612 \pm 0,00$
HL	$0,669 \pm 0,10$	$1,262 \pm 0,20$	$1,934 \pm 0,70$

3.5.11 Varijabilna fluorescencija na I koraku

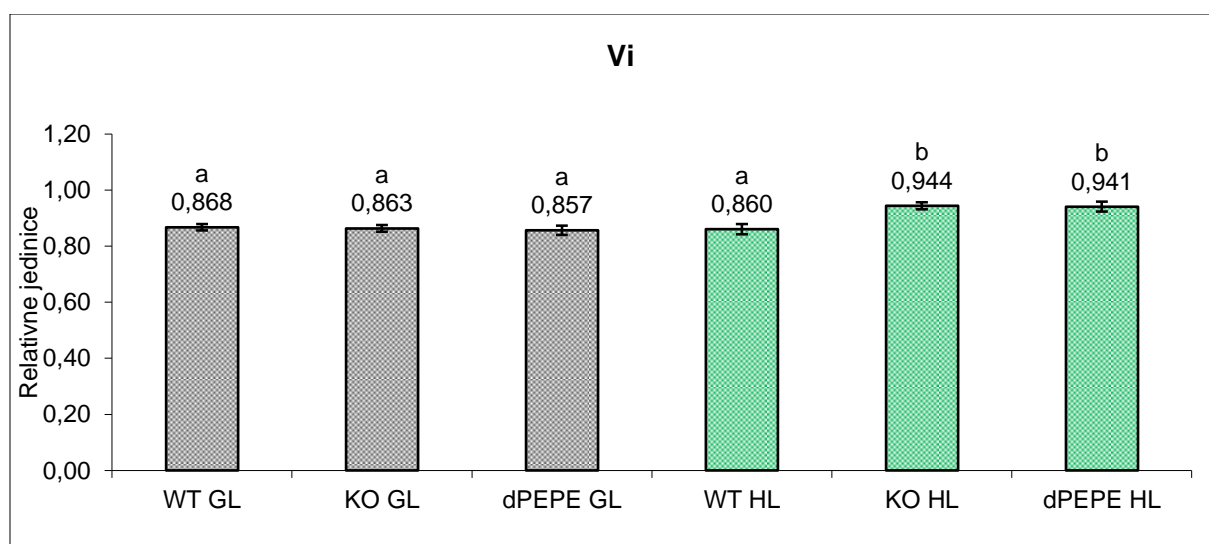
Srednje vrijednosti parametra varijabilne fluorescencije u I koraku (V_I) u listovima biljaka koje su kontinuirano rasle pri GL uvjetima, te vrijednosti za biljke izložene djelovanju svjetlosti visokog intenziteta prikazane su na Slici 38.

Tablica 30. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja parametra V_I za $\Delta PEPE$ biljke, divlji tip i TROL nul mutante izložene djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

	WT	KO	$\Delta PEPE$
GL	$0,868 \pm 0,00$	$0,863 \pm 0,00$	$0,857 \pm 0,00$
HL	$0,860 \pm 0,00$	$0,944 \pm 0,00$	$0,941 \pm 0,00$

Kod biljaka uzgajanih pri $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dobivene su ujednačene vrijednosti ovog parametra za sve tri linije biljaka. Dobivene vrijednosti kretale su se od $0,857 \pm 0,0$ za ΔPEPE biljke do $0,868 \pm 0,0$ za divlji tip. Kod HL uvjeta najniže vrijednosti parametra V_i imale su biljke divljeg tipa ($0,860 \pm 0,0$), a najviše trol nul-mutante ($0,944 \pm 0,0$) (Tablica 30).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazuju da nema statistički značajne razlike u dobivenim vrijednostima ovog parametra kod biljaka uzgajanih pri GL uvjetima, dok kod biljaka izloženih HL rezultati pokazuju značajno više vrijednosti za ΔPEPE mutante i TROL nul-mutante u odnosu na divlji tip, te u odnosu na biljke uzgajane pri GL uvjetima.



Slika 38. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja parametra (V_i) za biljke divljeg tipa, TROL nul mutante, te ΔPEPE mutante uzgajane u dva svjetlosna uvjeta (GL i HL).

3.5.12 Varijabilna fluorescencija na J koraku

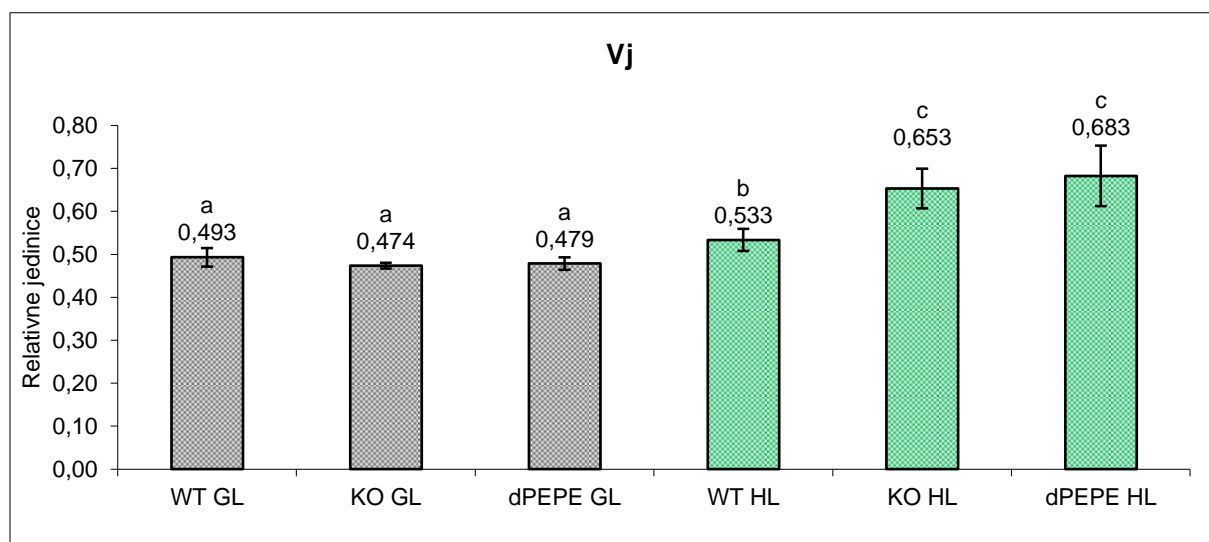
Vrijednosti parametra varijabilne fluorescencije u J koraku (V_J) u listovima biljaka nakon četiri tjedna uzgoja pri optimalnom osvjetljenju iznosila je prosječno od $0,474 \pm 0,00$ do $0,493 \pm 0,0$. Vrijednosti ovog parametra u listovima biljaka izloženih djelovanju povišenog intenziteta svjetlosti iznosile su prosječno od $0,533 \pm 0,0$ do $0,683 \pm 0,0$. Vrijednosti dobivene nakon tretmana visokim intenzitetom svjetlosti

bile su u prosjeku više u odnosu na vrijednosti dobivene pri optimalnom osvjetljenju (Tablica 31).

Tablica 31. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja parametra V_J za Δ PEPE biljke, divlji tip i TROL nul mutante izložene djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

	WT	KO	Δ PEPE
GL	0,493 ± 0,00	0,474 ± 0,00	0,479 ± 0,00
HL	0,533 ± 0,00	0,653 ± 0,00	0,683 ± 0,01

Najviše dobivene vrijednosti imale su Δ PEPE mutante na $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su da nije bilo statistički značajne razlike između Δ PEPE biljaka i TROL nul-mutanti, dok su vrijednosti za divlji tip bile značajno niže. U odnosu na biljke koje nisu bile izložene djelovanju HL tretmana Δ PEPE biljke i TROL nul-mutante nakon HL imale su značajno više vrijednosti V_J parametra (Slika 39).



Slika 39. Srednje vrijednosti i standardna odstupanja parametra (V_J) za biljke divljeg tipa, TROL nul mutante, te Δ PEPE mutante uzgajane u dva svjetlosna uvjeta (GL i HL).

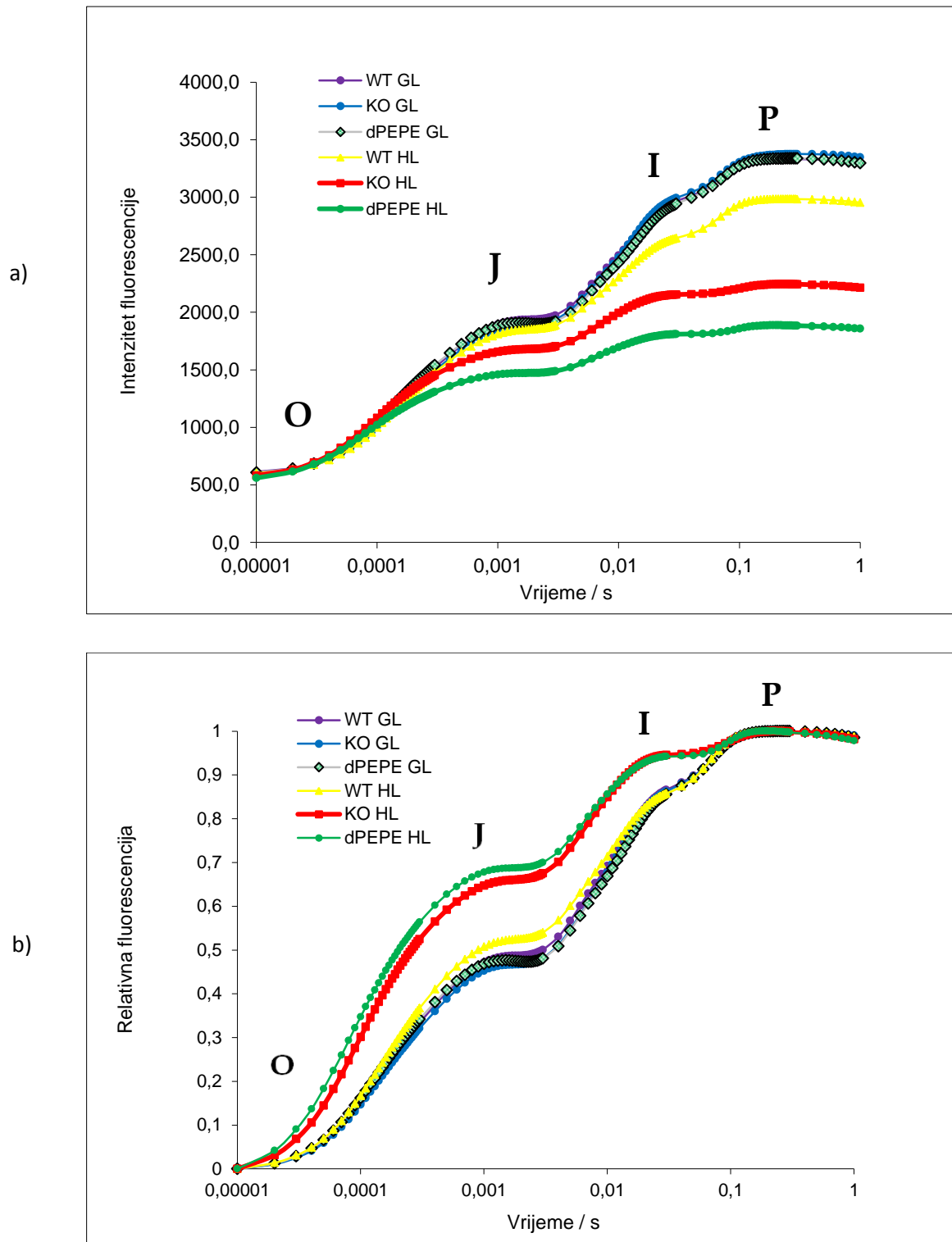
3.5.13 OJIP porast fluorescencije klorofila *a*

OJIP krivulje intenziteta fluorescencije na logaritamskoj vremenskoj skali prema podacima dobivenim mjerenjem fluorescencije klorofila *a* u Δ PEPE mutantama, te kontrolnim biljkama *A. thaliana* divlji tip i TROL nul mutantama izloženim djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL) prikazane su na Slici 40.

Na Slici 40 b) prikazan je normalizirani porast fluorescencije klorofila *a* izmjeren u listovima Δ PEPE biljaka i kontrolama za oba svjetlosna uvjeta. Kod biljaka uzgajanih pri optimalnom osvjetljenju krivulja ima karakterističan OJIP oblik, dok uosporedno kod biljaka izloženih 24 satnom djelovanju visokog intenziteta svjetlosti vidljiv je pad intenziteta fluorescencije u koraku J (intenzitet fluorescencije nakon 2 ms) i u koraku I (intenzitet fluorescencije nakon 30 ms) za sve tri linije biljaka.

Na Slici 40 a) prikazan je porast fluorescencije klorofila *a* bez normalizacije. Kao i kod normalizirane OJIP krivulje i ovdje je vidljivo odstupanje od karakterističnog oblika krivulje za mjerenja na biljkama nakon HL predtretmana. Pad intenziteta fluorescencije započinje u koraku J (intenzitet fluorescencije nakon 2 ms) i nastavlja padati i u koracima I (intenzitet fluorescencije nakon 30 ms) i P (maksimalni intenzitet fluorescencije). Pad intenziteta fluorescencije najizraženiji je za Δ PEPE biljke izložene djelovanju svjetlosti jačine $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Nešto manji pad vidljiv je kod TROL nul mutanti, dok je najmanje izražen kod biljaka divljeg tipa izloženih djelovanju svjetlosti iste jačine.

Kao i u ostalim analiziranim parametrima fluorescencije klorofila *a* i kod OJIP krivulja vidljivo je da izlaganje biljaka svjetlosti jačine $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ daleko najnepovoljnije utječe na Δ PEPE mutante.



Slika 40. a) Porast fluorescencije klorofila *a* bez normalizacije za iste linije biljaka i pod istim uvjetima uzgoja. b) Normalizirani OJIP porast fluorescencije klorofila *a* izmjeren u listovima biljaka uzgojenih pri GL i HL svjetlosnom uvjetu.

3.5.14 Minimalni intenzitet fluorescencije, maksimalni intenzitet fluorescencije i maksimalni kvantni prinos PSII

Prosječne vrijednosti minimalnog intenziteta fluorescencije mjenog nakon adaptacije na mrak kod Δ PEPE biljaka i kontrolama dane su u Tablici 32. Kod biljaka uzgajanih na GL uvjetu dobivene su ujednačene vrijednosti F_0 , dok kod biljaka izloženih predtretmanu svjetlosti jačine $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL) došlo je do laganog porasta vrijednosti F_0 .

Vrijednosti za maksimalni intenzitet fluorescencije biljaka uzgojenih pri GL uvjetima su ujednačene i kreću se od 1097 do 1150, dok je kod biljaka pod HL uvjetom došlo do pada vrijednosti F_m i najniža izmjerena vrijednost iznosi 930 za Δ PEPE mutante.

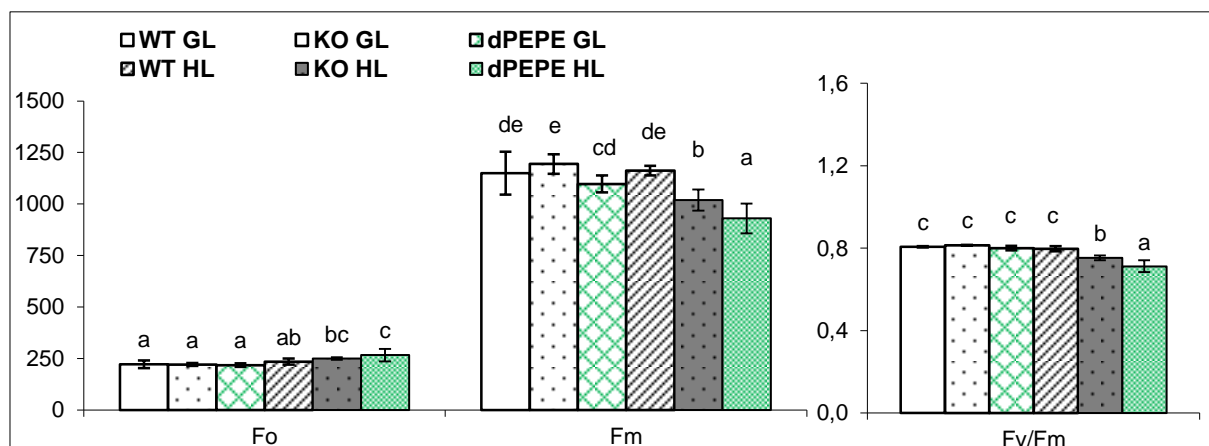
Maksimalni kvantni prinos (Tablica 32) kod sve tri linije biljaka izloženih GL osvjetljenju imao je ujednačene vrijednosti (0,80 – 0,81), dok je kod Δ PEPE biljaka i TROL nul mutanti nakon predtretmana HL osvjetljenjem došlo do pada vrijednosti F_v/F_m . Najniže vrijednosti izmjerene su kod Δ PEPE biljaka ($0,71 \pm 0,028$).

Rezultati analize varijance i LSD testa biljaka uzgajanih na GL pokazuju da nema statistički značajnog odstupanja među rezultatima parametra F_0 za sve tri linije biljaka. Rezultati LSD testa za biljke izložene tretmanu visokim intenzitetom svjetlosti pokazuju da su vrijednosti F_0 kod Δ PEPE biljaka statistički značajno više

Tablica 32. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja za parametre F_0 , F_m i F_v/F_m mjerene na Δ PEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

	F_0	F_m	F_v/F_m
WT _{GL}	222 ± 18,097	1150 ± 104,122	0,81 ± 0,003
KO _{GL}	221 ± 6,782	1194 ± 48,057	0,81 ± 0,002
Δ PEPE _{GL}	218 ± 8,678	1097 ± 41,235	0,80 ± 0,011
WT _{HL}	235 ± 14,822	1162 ± 23,763	0,80 ± 0,013
KO _{HL}	250 ± 6,580	1019 ± 51,350	0,75 ± 0,012
Δ PEPE _{HL}	267 ± 30,211	930 ± 72,130	0,71 ± 0,028

u odnosu na divlji tip, dok u odnosu na TROL nul mutante nije utvrđena statistički značajna razlika. Vrijednosti Δ PEPE i TROL KO mutanti nakon HL predtretmana statistički su značajno veće u odnosu na vrijednosti biljaka koje nisu izložene djelovanju HL svjetlosti.



Slika 41. Grafički prikaz vrijednosti parametara F_0 , F_m i F_v/F_m za Δ PEPE mutante, divlji tip i TROL nul mutante izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta:

$80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

Rezultati LSD testa za parametar F_m pokazuju statistički značajno smanjenje vrijednosti maksimalnog intenziteta fluorescencije nakon izlaganja biljaka HL osvjetljenju. Statistički značajno najniže vrijednosti imaju Δ PEPE biljke i u odnosu na kontrolne biljke kod istog uvjeta osvjetljenja i u odnosu na sve tri linije koje su kontinuirano uzgajane pri GL osvjetljenju (Slika 41).

3.5.15 Intenzitet fluorescencije kod svjetlosti jačine 100, 250 i 800 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Prosječne vrijednosti za intenzitet fluorescencije pri primijenjenoj svjetlosti jačine 100, 250 i 800 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ prikazane su u Tablici 33. Pri osvjetljenju jačine 100 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dobivene su približno jednake vrijednosti intenziteta fluorescencije. Najviše vrijednosti izmjerene su kod TROL nul mutanti s HL predtretmanom ($367 \pm 16,568$) i kod Δ PEPE mutanti s HL predtretmanom ($330 \pm$

26,048), dok su vrijednosti biljaka uzgajanih pri kontinuiranom GL osvjetljenju približno jednake.

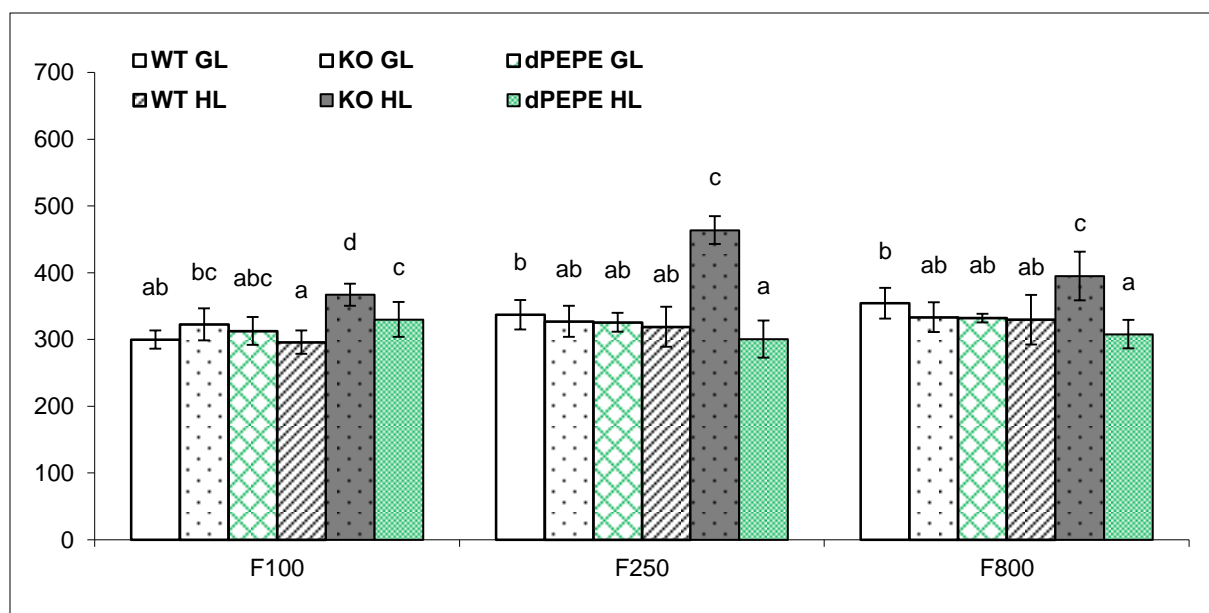
Tablica 33. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja za parametre F_{100} , F_{250} i F_{800} mjerene na Δ PEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženim djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

	F₁₀₀	F₂₅₀	F₈₀₀
WT _{GL}	300 ± 13,609	337 ± 21,863	354 ± 22,917
KO _{GL}	323 ± 23,944	327 ± 23,227	333 ± 22,300
Δ PEPE _{GL}	313 ± 20,705	326 ± 14,117	332 ± 6,457
WT _{HL}	296 ± 17,306	319 ± 30,116	330 ± 37,144
KO _{HL}	367 ± 16,568	464 ± 20,969	395 ± 36,503
Δ PEPE _{HL}	330 ± 26,048	301 ± 27,943	308 ± 21,130

Kod osvjetljenja jačine $250 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dobivene su ujednačene vrijednosti intenziteta fluorescencije za GL biljke ($300 \pm 13,609$ do $323 \pm 23,944$). Kod biljaka uzgajanih pri HL vrijednosti za TROL KO biljke znatno su više od ostalih vrijednosti ($464 \pm 20,969$), dok su Δ PEPE biljke imale najmanju izmjerenu vrijednost intenziteta fluorescencije od $301 \pm 27,943$ (Tablica 33).

Pri primijenjenoj svjetlosti jačine $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dobivene su ujednačene vrijednosti parametra F_{800} za sve tri linije biljaka i za oba svjetlosna uvjeta uzgoja. Kao i kod prethodnih mjerenja i ovdje TROL nul mutante s HL predtretmanom mjere najviše vrijednosti parametra ($395 \pm 36,503$), a Δ PEPE mutante s istim predtretmanom imale su najniže vrijednosti parametra F od $308 \pm 21,130$.

Dobiveni rezultati LSD testa (Slika 42) pokazuju da kod sve tri linije biljaka uzgojenih pri GL uvjetima između dobivenih vrijednosti intenziteta fluorescencije pri primijenjenoj svjetlosti jačine 100, 250 i $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nije bilo statistički značajne razlike.



Slika 42. Grafički prikaz vrijednosti parametara F_{100} , F_{250} i F_{800} za Δ PEPE mutante, divlji tip i TROL nul mutante izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

Vrijednosti parametra F za biljke izložene 24 satnom predtretmanu svjetlosti jačine $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL) pokazale su izvjesne statistički značajne razlike. Kod mjerenja parametra F_{100} vrijednosti TROL KO mutanti statistički su najviše u odnosu na vrijednosti Δ PEPE mutante i divljeg tipa. Vrijednosti parametra F_{100} za divlji tip statistički su značajno manje od vrijednosti Δ PEPE i TROL nul mutanti.

Kod mjerenja parametra F_{250} za GL biljke također nisu utvrđene statistički značajne razlike između biljaka. Kod HL biljaka vrijednosti parametra F_{250} za TROL KO biljke statistički su značajno najviše, a izmjerene vrijednosti za Δ PEPE iako najmanje statistički ne odstupaju od vrijednosti HL divljeg tipa niti od vrijednosti GL Δ PEPE biljaka.

Iz dobivenih vrijednosti LSD testa za F_{800} mjerenja vidljivo je da između GL biljaka nema statistički značajnog odstupanja u rezultatima, dok kod HL biljaka opet TROL KO mutante imaju statistički najviše vrijednosti. Δ PEPE HL biljke imaju najniže vrijednosti ovog parametra no on se ne razlikuje statistički značajno u odnosu na divlji tip s HL predtretmanom.

3.5.16 Maksimalni intenzitet fluorescencije kod svjetlosti jačine 100, 250 i 800 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Srednje vrijednosti i standardna odstupanja parametra F_m dobivene mjerenjem pri primijenjenoj svjetlosti jačine 100, 250 i 800 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dane su u Tablici 34. Kod biljaka kontinuirano uzgajanih pod GL uvjetom nakon primijenjene svjetlosti jačine 100 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ vidljive su razlike u izmjerenim vrijednostima parametra F_m . Najniže vrijednosti izmjerene su kod ΔPEPE biljaka ($839 \pm 99,246$), a najviše kod TROL KO mutanti ($1026 \pm 36,146$). Kod HL biljaka parametar F_{m100} najniži je kod ΔPEPE biljaka ($703 \pm 128,194$), dok je kod divljeg tipa izmjeren najviši F_{m100} ($1036 \pm 38,708$).

Nakon primijenjene svjetlosti jačine 250 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ kod GL divljeg tipa i TROL nul-mutanti izmjerene su približno jednake vrijednosti parametra F_{m250} dok su ΔPEPE GL biljke imale nešto niže vrijednosti ovog parametra ($548 \pm 37,036$). Kod HL biljaka ΔPEPE mutante imale su najniži F_{m250} ($437 \pm 83,061$) što je ujedno i najniža izmjerena vrijednost za oba svjetlosna uvjeta uzgoja. Najviši F_{m250} između HL biljaka izmjeren je kod TROL KO mutanti i iznosi je $798 \pm 58,192$.

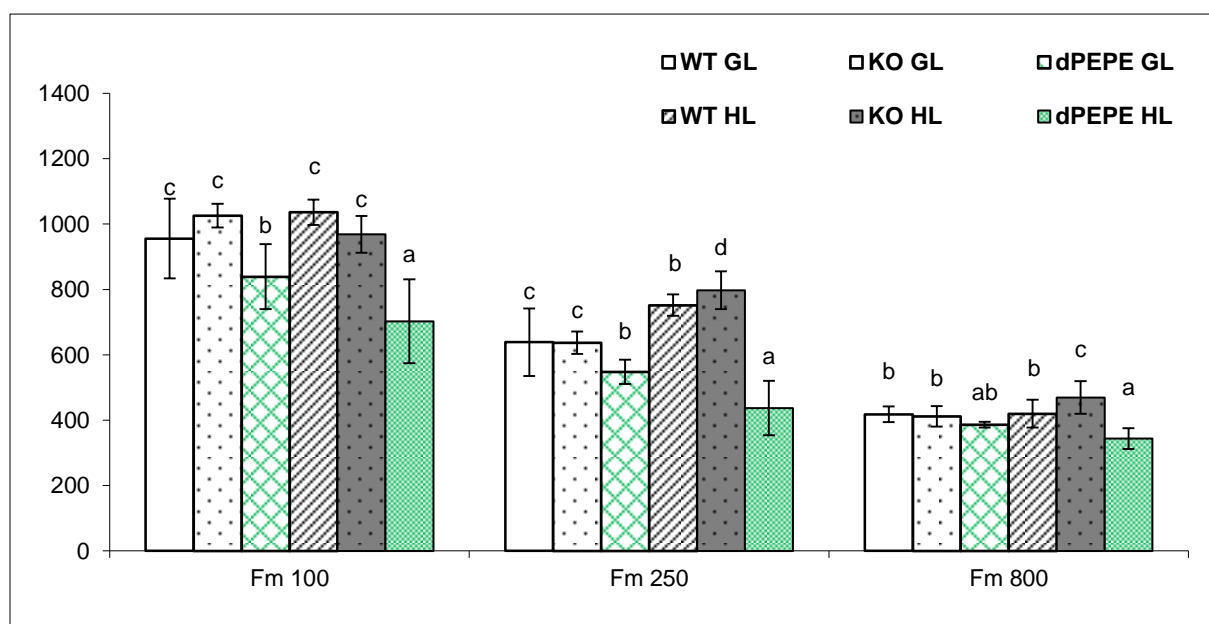
Tablica 34. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja za parametre F_{m100} , F_{m250} i F_{m800} mjerene na ΔPEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: 80 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i 300 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

	F_{m100}	F_{m250}	F_{m800}
WT _{GL}	956 ± 122,147	639 ± 103,517	418 ± 23,858
KO _{GL}	1026 ± 36,146	637 ± 34,392	412 ± 31,252
$\Delta\text{PEPE}_{\text{GL}}$	839 ± 99,246	548 ± 37,036	386 ± 8,643
WT _{HL}	1036 ± 38,708	752 ± 32,465	420 ± 42,614
KO _{HL}	969 ± 56,369	798 ± 58,192	469 ± 50,022
$\Delta\text{PEPE}_{\text{HL}}$	703 ± 128,194	437 ± 83,061	344 ± 31,717

Rezultati mjerenja parametra Fm_{800} pokazuju da nakon primijenjene svjetlosti od $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dolazi do ujednačavanja vrijednosti maksimalnog intenziteta svjetlosti. Nešto niže vrijednosti imale su ΔPEPE mutante posebno nakon HL predtretmana kada su prosječne vrijednosti Fm_{800} za ΔPEPE iznosile $344 \pm 31,717$.

Rezultati analize varijance i LSD testa srednjih vrijednosti za Fm_{100} parametar pokazuju da su kod GL biljaka izmjerene vrijednosti ΔPEPE biljaka statistički značajno niže u odnosu na kontrolne biljke, a također i kod HL biljaka je maksimalni intenzitet fluorescencije značajno najniži kod ΔPEPE mutanti.

Kod mjerenja pri $250 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ također su ΔPEPE mutante imale statistički značajno najniže vrijednosti i kod GL i kod HL uvjeta uzgoja. Izmjerene vrijednosti za ΔPEPE biljke pri HL uvjetu ujedno su i statistički najniže izmjerene vrijednosti ovog parametra za sve tri linije biljaka u oba uvjeta uzgoja. TROL KO mutante kod HL predtretmana imale su najvišu vrijednost parametra Fm_{250} .



Slika 43. Grafički prikaz vrijednosti parametara Fm_{100} , Fm_{250} i Fm_{800} za ΔPEPE mutante, divlji tip i TROL nul mutante izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

Rezultati LSD testa vrijednosti izmjenjenog maksimalnog intenziteta fluorescencije kod primijenjene svjetlosti jačine $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pokazali su da između GL

biljaka nije bilo statistički značajne razlike. Kod HL biljaka za Δ PEPE mutante su izmjerene statistički značajno najmanje vrijednosti F_{m800} u odnosu na sve mjerene biljke u oba svjetlosna uvjeta. TROL nul mutante s HL predtretmanom imale su statistički značajno najviše vrijednosti ovog parametra u odnosu na sve tri linije i oba uvjeta uzgoja biljaka (Slika 43).

3.5.17 Efektivni kvantni prinos PSII ($\Delta F/F'm$)

Izračunate vrijednosti za efektivni kvantni prinos PSII dobivene mjerenjem u listovima četiri tjedna starih biljaka, pri primijenjenoj svjetlosti jačine 100, 250 i 800 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ prikazane su u Tablici 35.

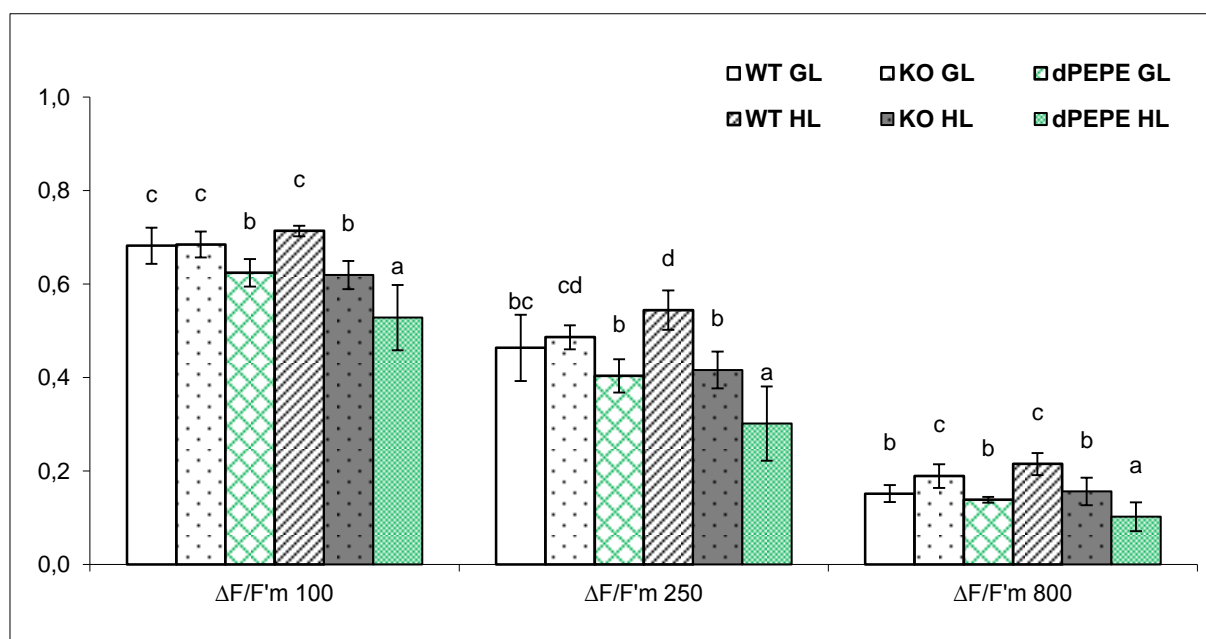
Pri osvjetljenju od 100 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dobivene su ujednačene vrijednosti parametra $\Delta F/F'm$ za divlji tip i TROL nul mutante uzgojene pod GL uvjetom, dok su Δ PEPE biljke imale nešto niže vrijednosti ovog parametra ($0,62 \pm 0,029$). Kod biljaka izloženih HL predtretmanu došlo je do laganog pada vrijednosti $\Delta F/F'm_{100}$. Najniže vrijednosti imale su Δ PEPE biljke ($0,53 \pm 0,070$), a najviše biljke *A. thaliana* divlji tip čije su dobivene vrijednosti jedine bile nešto veće u odnosu na biljke koje nisu bile izložene HL predtretmanu.

Tablica 35. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja za parametre $\Delta F/F'm_{100}$, $\Delta F/F'm_{250}$ i $\Delta F/F'm_{800}$ mjerene na Δ PEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: 80 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i 300 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

	$\Delta F/F'm_{100}$	$\Delta F/F'm_{250}$	$\Delta F/F'm_{800}$
WT _{GL}	$0,68 \pm 0,038$	$0,46 \pm 0,071$	$0,15 \pm 0,018$
KO _{GL}	$0,68 \pm 0,028$	$0,49 \pm 0,026$	$0,19 \pm 0,025$
Δ PEPE _{GL}	$0,62 \pm 0,029$	$0,40 \pm 0,035$	$0,14 \pm 0,006$
WT _{HL}	$0,71 \pm 0,011$	$0,54 \pm 0,042$	$0,22 \pm 0,023$
KO _{HL}	$0,62 \pm 0,030$	$0,42 \pm 0,040$	$0,16 \pm 0,029$
Δ PEPE _{HL}	$0,53 \pm 0,070$	$0,30 \pm 0,079$	$0,10 \pm 0,031$

Nakon primijenjene svjetlosti jačine $250 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ u biljkama GL divljeg tipa i TROL nul-mutantama izmjerene su približno jednake vrijednosti parametra $\Delta F/F'm_{250}$ dok su vrijednosti $\Delta PEPE$ GL biljaka imale nešto niže vrijednosti ovog parametra ($0,40 \pm 0,035$). Kod HL biljaka $\Delta PEPE$ mutante imale su najniži $\Delta F/F'm_{250}$ ($0,30 \pm 0,079$) što je ujedno i najniža izmjerena vrijednost za oba svjetlosna uvjeta uzgoja. Najviši $\Delta F/F'm_{250}$ izmjereno je kod HL divljeg tipa i iznosio je $0,54 \pm 0,042$.

Kod mjerenja pri $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ vidimo osjetni pad vrijednosti efektivnog kvantnog prinosa PSII. Vrijednosti GL biljaka kreću se od $0,14 \pm 0,006$ za $\Delta PEPE$ mutante do $0,19 \pm 0,025$ za TROL KO mutante. Kod biljaka s HL predtretmanom izmjereno je od najviše vrijednosti $0,22 \pm 0,023$ za divlji tip, do najniže vrijednosti $0,10 \pm 0,031$ kod $\Delta PEPE$ biljaka.



Slika 44. Grafički prikaz vrijednosti parametara $\Delta F/F'm_{100}$, $\Delta F/F'm_{250}$ i $\Delta F/F'm_{800}$ za $\Delta PEPE$ mutante, divlji tip i TROL nul mutante izložene djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

Statističkom obradom dobivenih rezultata utvrđeno je da između dobivenih vrijednosti parametra $\Delta F/F'm_{100}$ za divlji tip i TROL KO biljke pri GL uvjetu uzgoja nema statistički značajne razlike, dok je isti parametar za $\Delta PEPE$ mutante

statistički značajno niži. Dobivene vrijednosti parametra $\Delta F/F'm_{100}$ za biljke s HL predtretmanom pokazuje da $\Delta PEPE$ mutante imaju statistički najniže vrijednosti u odnosu na oba uvjeta uzgoja.

Kod mjerenja parametra $\Delta F/F'm_{250}$ između dobivenih vrijednosti za GL biljke vidimo mala odstupanja. $\Delta PEPE$ mutante imaju statistički niže vrijednosti u odnosu na nul mutante, dok u odnosu na divlji tip nema statistički značajnog odstupanja. $\Delta PEPE$ mutante s HL predtretmanom imaju statistički najniže vrijednosti i u odnosu na kontrole s predtretmanom i u odnosu na biljke koje nisu izložene predtretmanu.

Značajno najviši parametar $\Delta F/F'm_{800}$ između GL biljaka imale su TROL KO mutante, dok između divljeg tipa i $\Delta PEPE$ nije utvrđena statistički značajna razlika. Između HL biljaka statistički značajno najniže vrijednosti imaju $\Delta PEPE$ mutante i u odnosu na HL kontrole i u odnosu na biljke bez predtretmana (Slika 44).

3.5.18 Relativna stopa prijenosa elektrona (ETR)

Relativna stopa prijenosa elektrona u četiri tjedna starim biljkama pri osvjetljenju od $100 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ iznosila je kod GL biljaka od $31,2 \pm 1,459$ ($\Delta PEPE_{\text{GL}}$) do $34,2 \pm 1,397$ (KO_{GL}), a kod HL biljaka od $26,4 \pm 3,507$ ($\Delta PEPE_{\text{GL}}$) do $35,7 \pm 0,565$ (WT_{HL}) (Tablica 36).

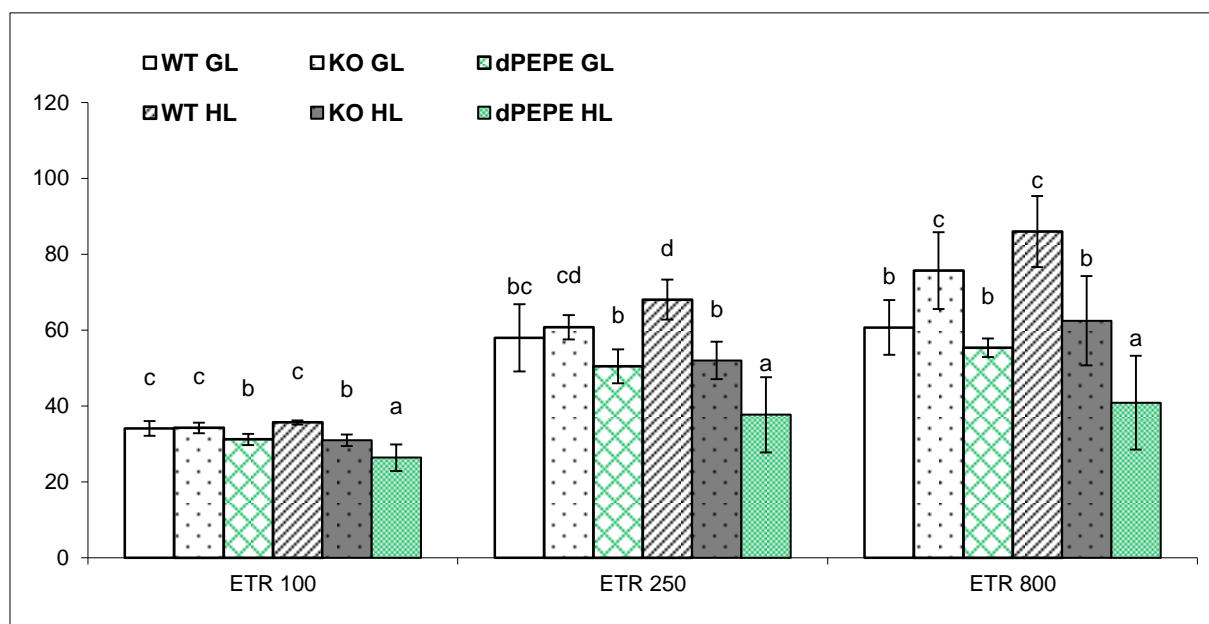
Tablica 36. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja za parametre ETR_{100} , ETR_{250} i ETR_{800} mjerene na $\Delta PEPE$ biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

	ETR₁₀₀	ETR₂₅₀	ETR₈₀₀
WT _{GL}	34,1 ± 1,925	58,0 ± 8,847	60,7 ± 7,224
KO _{GL}	34,2 ± 1,397	60,8 ± 3,205	75,7 ± 10,113
$\Delta PEPE_{\text{GL}}$	31,2 ± 1,459	50,5 ± 4,436	55,4 ± 2,475
WT _{HL}	35,7 ± 0,565	68,0 ± 5,269	86,0 ± 9,342
KO _{HL}	31,0 ± 1,507	52,0 ± 4,940	62,5 ± 11,762
$\Delta PEPE_{\text{HL}}$	26,4 ± 3,507	37,7 ± 9,911	40,9 ± 12,346

Pri povećanju primijenjene svjetlosti dolazi i do porasta vrijednosti parametra ETR. Parametar ETR_{250} na GL biljkama imao je najniže vrijednosti kod Δ PEPE biljaka ($50,5 \pm 4,436$), dok su kontrolne biljke imale ujednačene vrijednosti ovog parametra. Kod biljaka s HL predtretmanom najviše vrijednosti ETR_{250} imale su biljke divljeg tipa što je ujedno i najviša izmjerena vrijednost ($68,0 \pm 5,269$), dok su najniže vrijednosti zabilježene kod Δ PEPE mutanti što su najniže utvrđene vrijednosti ovog parametra za oba uvjeta uzgoja ($37,7 \pm 9,911$).

Nakon primijenjene svjetlosti jačine $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ TROL KO biljke imale su najviše vrijednosti ($75,7 \pm 10,113$), dok su vrijednosti Δ PEPE GL biljaka imale najniže vrijednosti ($55,4 \pm 2,475$) parametra ETR_{800} . Kod HL biljaka Δ PEPE mutante imale su najniži ETR_{800} ($40,9 \pm 12,346$) što je ujedno i najniža izmjerena vrijednost za oba svjetlosna uvjeta uzgoja. Najviši ETR_{800} izmjeren je kod HL divljeg tipa i iznosio je $86,0 \pm 9,342$.

Prema LSD testu ETR za Δ PEPE GL biljke pri osvjetljenju od $100 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bila je značajno niža u odnosu na kontrole. Također i kod HL predtretmana vrijednosti ETR_{100} za Δ PEPE mutante statistički su značajno niže u odnosu na divlji tip i TROL KO mutante (Slika 45).



Slika 45. Grafički prikaz vrijednosti parametara ETR_{100} , ETR_{250} i ETR_{800} za Δ PEPE mutante, divlji tip i TROL nul mutante izložene djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

Kod mjerenja pri $250 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ također su ΔPEPE mutante imale statistički značajno najniže vrijednosti i kod GL i kod HL uvjeta uzgoja. Izmjerene vrijednosti za ΔPEPE biljke pri HL uvjetu ujedno su i najniže izmjerene vrijednosti ovog parametra, te značajno različite od svih linija biljaka za oba uvjeta uzgoja. Biljke *A. thailana* divlji tip nakon HL predtretmana imale su statistički najviši parametar ETR_{250} .

Kod mjerenja pri $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ vidimo povećanje vrijednosti ETR. Kod GL biljaka TROL nul mutante imaju statistički najviše vrijednosti, dok između ΔPEPE mutanti i divljeg tipa nije utvrđena statistički značajna razlika. Kod biljaka s predtretmanom statistički značajno najviše vrijednosti imaju biljke divljeg tipa, dok ΔPEPE biljke imaju statistički značajno najniže vrijednosti parametra ETR_{800} u odnosu na sva mjerenja.

3.5.19 Indeks fotokemijskog prigušivanja fluorescencije klorofila *a* (qP)

Dobiveni rezultati za koeficijent fotokemijskog prigušivanja (qP) navedeni su u Tablici 37. Kod biljaka kontinuirano uzgajanih pod GL uvjetom nakon primijenjene svjetlosti jačine $100 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dobivene su približno jednake vrijednosti parametra qP. Najniže vrijednosti izmjerene su kod ΔPEPE biljaka ($0,85 \pm 0,014$), a najviše kod divljeg tipa ($0,89 \pm 0,039$). Kod HL biljaka parameter qP najniži je kod TROL KO biljaka ($0,84 \pm 0,031$), dok je kod divljeg tipa izmjeren najviši qP_{100} ($0,92 \pm 0,007$).

Nakon primijenjene svjetlosti jačine $250 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ u GL ΔPEPE biljaka izmjerene su najniže vrijednosti qP_{250} ($0,67 \pm 0,033$), dok su vrijednosti TROL KO biljaka imale najviše vrijednosti ovog parametra ($0,75 \pm 0,050$). Kod HL biljaka najniži qP_{250} imale su TROL KO mutante ($0,61 \pm 0,045$) dok su ΔPEPE biljke i divlji tip imale ujednačene vrijednosti qP_{250} od $0,80 \pm 0,070$.

Nakon primijenjene svjetlosti jačine $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ TROL KO biljke imale su najviše vrijednosti ($0,41 \pm 0,055$), dok su vrijednosti ΔPEPE GL biljaka bile najniže ($0,32 \pm 0,012$). Kod HL biljaka ΔPEPE mutante imale su najviši qP_{800} ($0,50 \pm 0,157$) što je ujedno i najviša utvrđena vrijednost za oba svjetlosna uvjeta uzgoja. Najniži qP_{800} izmjeren je kod HL TROL nul mutanti i iznosio je $0,34 \pm 0,047$.

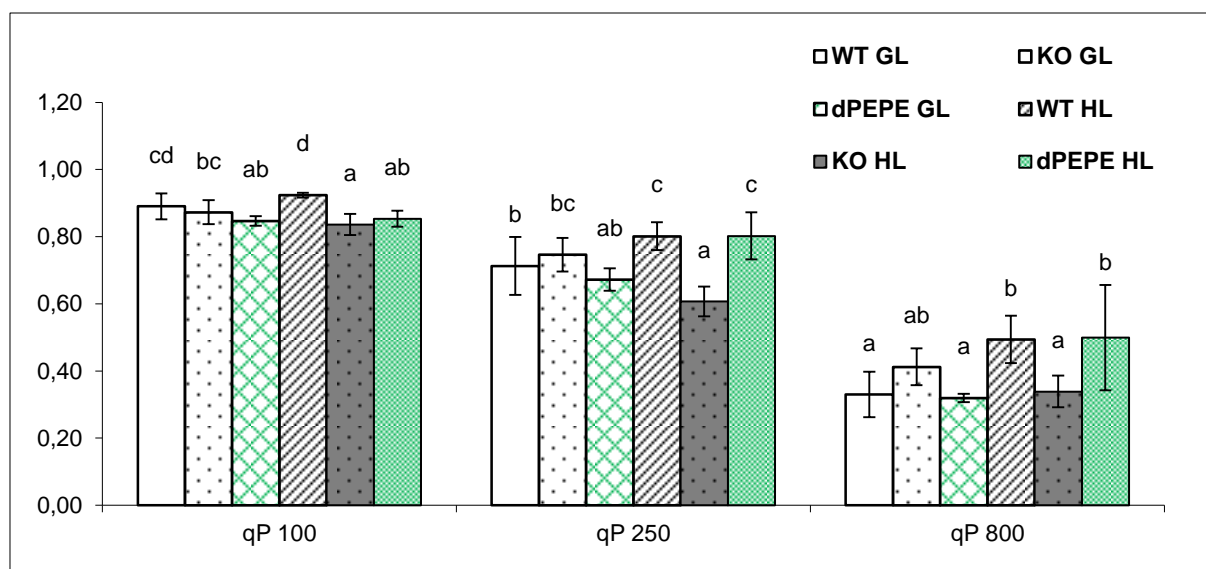
Tablica 37. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja za parametre qP_{100} , qP_{250} i qP_{800} mjerene na Δ PEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženim djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

	qP_{100}	qP_{250}	qP_{800}
WT_{GL}	$0,89 \pm 0,039$	$0,71 \pm 0,086$	$0,33 \pm 0,067$
KO_{GL}	$0,87 \pm 0,036$	$0,75 \pm 0,050$	$0,41 \pm 0,055$
Δ PEPE _{GL}	$0,85 \pm 0,014$	$0,67 \pm 0,033$	$0,32 \pm 0,012$
WT_{HL}	$0,92 \pm 0,007$	$0,80 \pm 0,042$	$0,49 \pm 0,071$
KO_{HL}	$0,84 \pm 0,031$	$0,61 \pm 0,045$	$0,34 \pm 0,047$
Δ PEPE _{HL}	$0,85 \pm 0,024$	$0,80 \pm 0,070$	$0,50 \pm 0,157$

Prema analizi varijance i LSD testu vrijednosti parametra qP_{100} za biljke uzgajane pri kontinuiranom GL uvjetu pokazale su manja odstupanja. Parametar qP_{100} za Δ PEPE biljke statistički je značajno niži u odnosu na divlji tip, dok u odnosu na TROL nul mutante nije bilo statistički značajne razlike. Kod biljaka s HL predtretmanom divlji tip imao je statistički više vrijednosti u odnosu na Δ PEPE i TROL KO biljke između kojih nije bilo statistički značajne razlike.

Kod dobivenih parametra qP_{250} između dobivenih vrijednosti za GL biljke nema statistički značajnih odstupanja. TROL KO mutante s HL predtretmanom imaju statistički najniže vrijednosti u odnosu na divlji tip i Δ PEPE biljke između kojih nema značajne razlike.

Uspoređujući parametar qP_{800} vidljivo je da između GL biljaka nema statistički značajne razlike. Između HL biljaka statistički značajno najniže vrijednosti imaju TROL KO mutante, dok između divljeg tipa i Δ PEPE biljaka nema statistički značajnog odstupanja. Uspoređujući Δ PEPE mutante sa i bez predtretmana vidljivo je da HL Δ PEPE biljke imaju značajno više vrijednosti u odnosu na GL Δ PEPE biljke (Slika 46).



Slika 46. Grafički prikaz vrijednosti parametara qP_{100} , qP_{250} i qP_{800} za Δ PEPE mutante, divlji tip i TROL nul mutante izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

3.5.20 Indeks nefotokemijskog prigušivanja fluorescencije klorofila *a* (qN)

Rezultati mjerenja koeficijenta nefotokemijskog prigušivanja (qN) prikazani su u Tablici 38. Najniže vrijednosti za GL biljke nakon primijenjene svjetlosti od $100 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ izmjerene su kod TROL nul mutanti i iznose $0,17 \pm 0,016$, dok su Δ PEPE biljke imale najviše vrijednosti u iznosu od $0,30 \pm 0,086$. Kod biljaka s HL tretmanom Δ PEPE pokazale su najviše vrijednosti ovog parametra ($0,33 \pm 0,120$), a TROL nul mutante najmanje ($0,06 \pm 0,030$).

Porastom intenziteta primijenjene svjetlosti rastu i vrijednosti parametra qN. Nakon primijenjene svjetlosti od $250 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ vrijednosti GL biljaka ujednačeno rastu od $0,63 \pm 0,023$ za Δ PEPE do $0,55 \pm 0,054$ za divlji tip. Parametar qN_{250} kod HL uvjeta najviši je za Δ PEPE mutante i to je ujedno i najviša izmjerena vrijednost kod oba uvjeta uzgoja ($0,75 \pm 0,087$). TROL nul mutante s predtretmanom imale su najniže vrijednosti ovog parametra u iznosu od $0,29 \pm 0,050$.

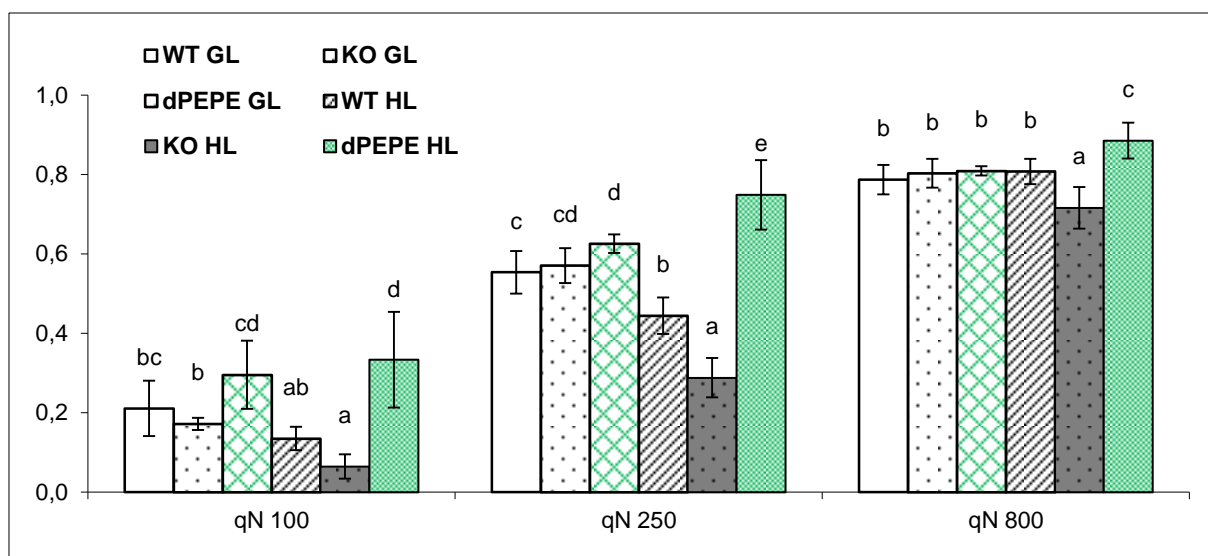
Tablica 38. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja za parametre qN_{100} , qN_{250} i qN_{800} mjerene na Δ PEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

	qN_{100}	qN_{250}	qN_{800}
WT _{GL}	$0,21 \pm 0,070$	$0,55 \pm 0,054$	$0,79 \pm 0,037$
KO _{GL}	$0,17 \pm 0,016$	$0,57 \pm 0,044$	$0,80 \pm 0,036$
Δ PEPE _{GL}	$0,30 \pm 0,086$	$0,63 \pm 0,023$	$0,81 \pm 0,012$
WT _{HL}	$0,14 \pm 0,029$	$0,44 \pm 0,046$	$0,81 \pm 0,032$
KO _{HL}	$0,06 \pm 0,030$	$0,29 \pm 0,050$	$0,72 \pm 0,052$
Δ PEPE _{HL}	$0,33 \pm 0,120$	$0,75 \pm 0,087$	$0,89 \pm 0,045$

Pri osvjetljenju jačine $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ došlo je do ujednačavanja parametra qN_{800} . Sve tri linije biljaka uzgojenih pri kontinuiranom GL uvjetu imale su približno jednake vrijednosti qN_{800} od $0,79 - 0,81$. Kod HL biljaka Δ PEPE mutante imale su najviši qN_{800} ($0,89 \pm 0,045$) što je ujedno i najviša izmjerena vrijednost za oba svjetlosna uvjeta uzgoja, dok je najniži qN_{800} izmjeren je kod HL TROL KO biljaka i iznosio je $0,72 \pm 0,052$.

Prema LSD testu nefotokemijsko prigušivanje za Δ PEPE GL biljke pri osvjetljenju od $100 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bila je značajno niža u odnosu na TROL KO mutante, no u odnosu na divlji tip nije bilo značajne razlike. Kod HL predtretmana vrijednosti qN_{100} za Δ PEPE mutante statistički su značajno najviše u odnosu na kontrole s predtretmanom (Slika 47).

Kod mjerenja parametra qN_{250} za GL biljke Δ PEPE mutante imaju značajno više vrijednosti od divljeg tipa, dok u odnosu na nul mutante nema značajne razlike. Nakon predtretmana HL osvjetljenjem došlo je do značajnog povećanja parametra qN_{250} za Δ PEPE što je ujedno i statistički značajno najviša izmjerena vrijednost ovog parametra. S druge strane vrijednosti za TROL KO mutante s HL predtretmanom imaju statistički najniže vrijednosti i u odnosu na divlji tip i Δ PEPE biljke s HL uvjetom, i u odnosu na biljke bez predtretmana.



Slika 47. Grafički prikaz vrijednosti parametara qN_{100} , qN_{250} i qN_{800} za Δ PEPE mutante, divlji tip i TROL nul mutante izložene djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

Kod utvrđivanja parametra qN_{800} vidljivo je smanjenje razlike između dobivenih vrijednosti. Kod GL biljaka došlo je do izjednačavanja koeficijenta nefotokemijskog prigušivanja i prema LSD testu nema statistički značajnih odstupanja. Kod HL biljaka TROL KO mutante i dalje imaju značajno najniži qN_{800} , dok Δ PEPE biljke s HL predtretmanom imaju statistički najviše vrijednosti ovog parametra u odnosu na sve mjerene biljke.

3.5.21 Nefotokemijsko prigušivanje (NPQ)

Izračunate vrijednosti za parametar NPQ dobivene mjerenjem pri primijenjenoj svjetlosti jačine 100, 250 i $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ prikazane su u Tablici 39.

Pri osvjetljenju od $100 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dobivene su izrazito niske vrijednosti NPQ_{100} . Između biljaka uzgojenih pod GL uvjetom najviše vrijednosti imale su Δ PEPE biljke ($0,32 \pm 0,129$), a najniže TROL nul mutante ($0,16 \pm 0,018$). Kod biljaka s HL predtretmanom odnosi između biljaka približno su jednaki: Δ PEPE biljke mjere najviši NPQ_{100} , a TROL KO najniži ($0,05 \pm 0,026$).

Nakon primijenjene svjetlosti jačine $250 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ došlo je do porasta vrijednosti NPQ. U GL divljeg tipa i TROL KO biljaka izmjerene su približno jednake vrijednosti parametra NPQ₂₅₀, dok su vrijednosti ΔPEPE GL biljaka imale nešto više vrijednosti ovog parametra ($1,01 \pm 0,067$). Kod HL biljaka ΔPEPE mutante imale su najviši NPQ₂₅₀ ($1,16 \pm 0,208$) što je ujedno i najviša izmjerena vrijednost za oba svjetlosna uvjeta uzgoja. Najniži NPQ₂₅₀ izmjeren je kod HL TROL KO mutanti i iznosio je $0,28 \pm 0,064$, što je i najniža izmjerena vrijednost ovog parametra.

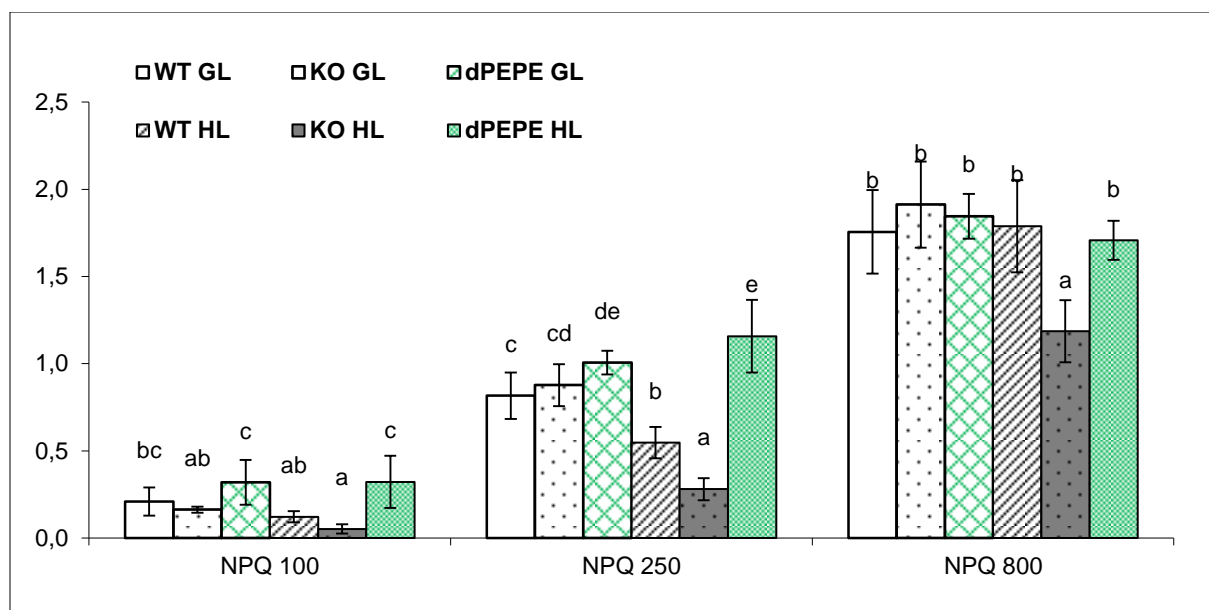
Tablica 39. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja za parametre NPQ₁₀₀, NPQ₂₅₀ i NPQ₈₀₀ izmjerene na ΔPEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

	NPQ₁₀₀	NPQ₂₅₀	NPQ₈₀₀
WT _{GL}	0,21 ± 0,081	0,82 ± 0,133	1,76 ± 0,239
KO _{GL}	0,16 ± 0,018	0,88 ± 0,120	1,91 ± 0,247
$\Delta\text{PEPE}_{\text{GL}}$	0,32 ± 0,129	1,01 ± 0,067	1,85 ± 0,128
WT _{HL}	0,12 ± 0,032	0,55 ± 0,090	1,79 ± 0,264
KO _{HL}	0,05 ± 0,026	0,28 ± 0,064	1,19 ± 0,178
$\Delta\text{PEPE}_{\text{HL}}$	0,32 ± 0,150	1,16 ± 0,208	1,71 ± 0,112

Pri osvjetljenju od $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ došlo je do ujednačavanja parametra NPQ₈₀₀. Biljke uzgojene pri kontinuiranom GL uvjetu imale su približno jednake vrijednosti NPQ₈₀₀ (1,76 – 1,91). Kod HL biljaka TROL nul mutante imale su najniži NPQ₈₀₀ ($1,19 \pm 0,178$) što je ujedno i najniža izmjerena vrijednost za oba svjetlosna uvjeta uzgoja, dok su ostale linije biljaka imale ujednačeni NPQ₈₀₀.

Prema LSD testu vrijednosti parametra NPQ₁₀₀ za biljke uzgajane pri kontinuiranom GL uvjetu pokazale su manja odstupanja. Parametar NPQ₁₀₀ za ΔPEPE biljke statistički je značajno viši u odnosu na TROL KO, dok u odnosu na divlji tip nije bilo statistički značajne razlike. Kod biljaka s HL predtretmanom ΔPEPE biljke imale su statistički više vrijednosti u odnosu na kontrolne biljke, dok u odnosu na GL ΔPEPE nije bilo statistički značajne razlike (Slika 48).

Uspoređujući parametar NPQ_{250} između GL biljaka vidljivo je da su vrijednosti za $\Delta PEPE$ biljke značajno više u odnosu na divlji tip, dok u odnosu na nul mutante nema statistički značajnih odstupanja. $\Delta PEPE$ mutante s HL predtretmanom imaju statistički najviše vrijednosti u odnosu na divlji tip i TROL KO biljke, dok u odnosu na $\Delta PEPE$ mutante bez svjetlosnog predtretmana nisu zabilježene statistički značajne razlike.



Slika 48. Grafički prikaz vrijednosti parametara NPQ_{100} , NPQ_{250} i NPQ_{800} za $\Delta PEPE$ mutante, divlji tip i TROL nul mutante izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

Iz rezultata mjerenja NPQ_{800} vidljivo je smanjenje razlike između dobivenih vrijednosti. Kod GL biljaka prema LSD testu nema statistički značajnih odstupanja, dok kod HL biljaka TROL KO mutante imaju značajno najniži NPQ_{800} , dok između ostalih biljaka sa i bez predtretmana nisu uočene statistički značajne razlike.

3.5.22 Udio zatvorenih reakcijskih centara PSII (1-qP)

Rezultati mjerenja udjela zatvorenih reakcijskih centara PSII prikazani su u Tablici 40. Najniže vrijednosti za GL biljke nakon primijenjene svjetlosti od $100 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$

$2s^{-1}$ izmjerene su kod biljaka *A. thaliana* divljeg tipa i iznose $0,11 \pm 0,039$, dok su Δ PEPE biljke imale najviše vrijednosti u iznosu od $0,15 \pm 0,014$. Kod biljaka s HL tretmanom najviše vrijednosti ovog parametra imale su TROL nul mutante ($0,16 \pm 0,031$), a divlji tip najmanje ($0,08 \pm 0,007$).

Porastom intenziteta primijenjene svjetlosti dolazi do porasta parametra 1-qP. Nakon primijenjene svjetlosti od $250 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ vrijednosti GL biljaka iznosile su od $0,25 \pm 0,050$ za TROL KO do $0,33 \pm 0,033$ za Δ PEPE mutante. Parametar 1-qP₂₅₀ kod HL uvjeta najviši je za TROL nul mutante što je ujedno i najviša vrijednost kod oba uvjeta uzgoja ($0,39 \pm 0,045$). Divlji tip i Δ PEPE mutante s predtretmanom imali su najniže vrijednosti ovog parametra u iznosu od 0,20.

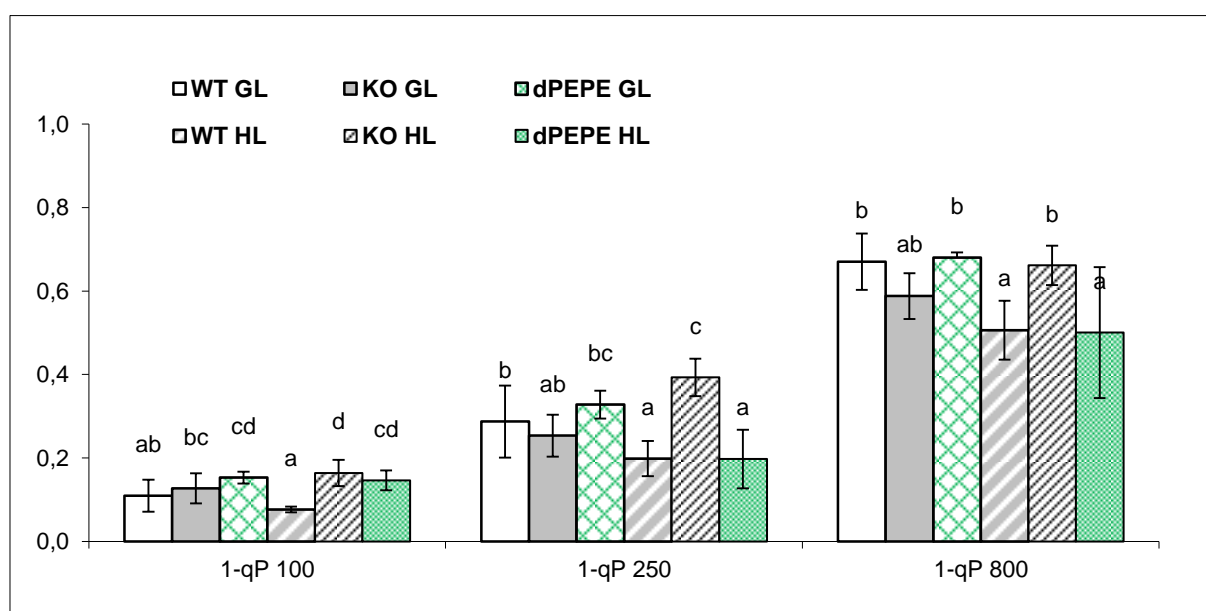
Tablica 40. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja za parametre 1-qP₁₀₀, 1-qP₂₅₀ i 1-qP₈₀₀ izračunate za Δ PEPE biljke, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženih djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

	1-qP₁₀₀	1-qP₂₅₀	1-qP₈₀₀
WT _{GL}	$0,11 \pm 0,039$	$0,29 \pm 0,086$	$0,67 \pm 0,067$
KO _{GL}	$0,13 \pm 0,036$	$0,25 \pm 0,050$	$0,59 \pm 0,055$
Δ PEPE _{GL}	$0,15 \pm 0,014$	$0,33 \pm 0,033$	$0,68 \pm 0,012$
WT _{HL}	$0,08 \pm 0,007$	$0,20 \pm 0,042$	$0,51 \pm 0,071$
KO _{HL}	$0,16 \pm 0,031$	$0,39 \pm 0,045$	$0,66 \pm 0,047$
Δ PEPE _{HL}	$0,15 \pm 0,024$	$0,20 \pm 0,070$	$0,50 \pm 0,157$

Pri osvjetljenju jačine $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ došlo je do značajnog porasta parametra 1-qP. Biljke uzgojene pri kontinuiranom GL uvjetu imale su približno jednake vrijednosti 1-qP₈₀₀ ($0,59 \pm 0,055 - 0,68 \pm 0,012$). Kod HL biljaka Δ PEPE mutante imale su najniži 1-qP₈₀₀ ($0,50 \pm 0,157$) što je ujedno i najniža izmjerena vrijednost za oba svjetlosna uvjeta uzgoja, a najvišu vrijednost ovog parametra između HL biljaka imale su TROL KO biljke i iznosila je $0,66 \pm 0,047$.

Prema LSD testu udio zatvorenih reakcijskih centara PSII (1-qP) za Δ PEPE GL biljke pri osvjetljenju od $100 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bila je značajno viša u odnosu na GL divlji tip, dok u odnosu na TROL KO nije bilo značajne razlike. Također i kod HL predtretmana vrijednosti 1-qP₁₀₀ za Δ PEPE mutante statistički su značajno više u odnosu na divlji tip, dok u odnosu na TROL KO mutante nije bilo statistički značajne razlike (Slika 49).

Statistička analiza parametra 1-qP₂₅₀ između GL biljaka pokazala je da između sve tri linije mjerenih biljaka nema značajnog odstupanja. TROL nul mutante s HL predtretmanom imaju statistički najviše vrijednosti u odnosu na divlji tip i Δ PEPE biljke, između kojih nisu zabilježene statistički značajne razlike.

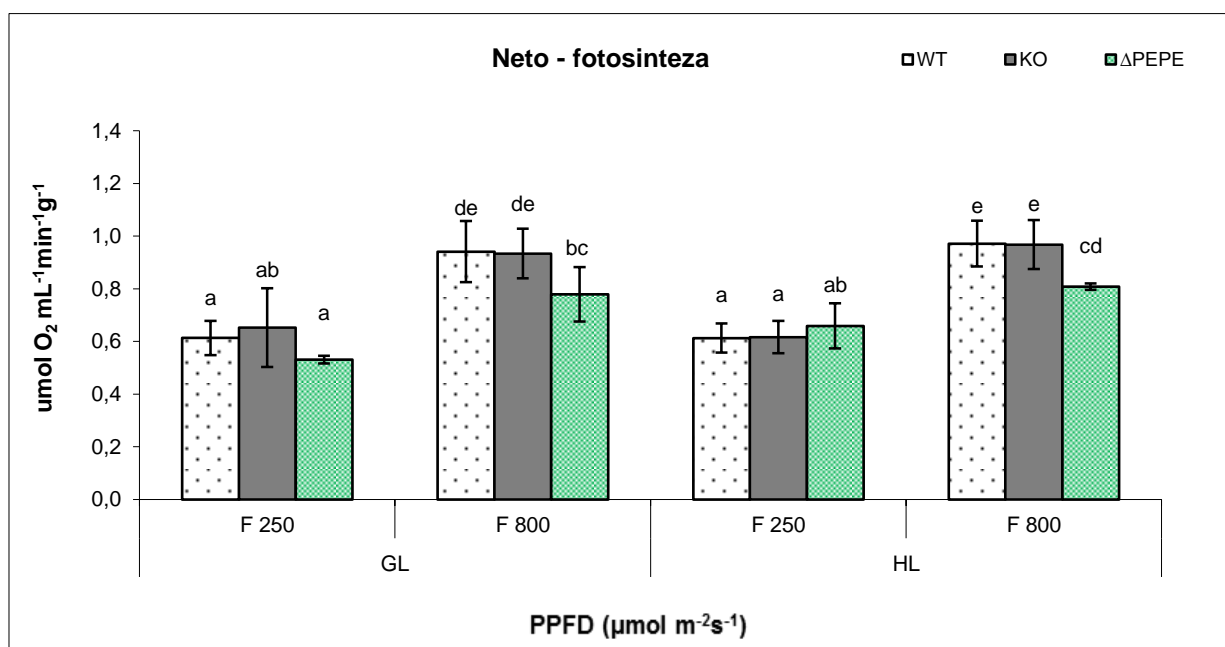


Slika 49. Grafički prikaz vrijednosti parametara 1-qP₁₀₀, 1-qP₂₅₀ i 1-qP₈₀₀ za Δ PEPE mutante, divlji tip i TROL nul mutante izložene djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

Kod mjerenja 1-qP₈₀₀ vidljivo je znatno povećanje udjela zatvorenih reakcijskih centara PSII. Kod GL biljaka prema LSD testu nema statistički značajnih odstupanja, dok kod HL biljaka TROL KO mutante imaju značajno viši 1-qP₈₀₀, dok između divljeg tipa i Δ PEPE biljaka nisu uočene statistički značajne razlike.

3.6 Mjerenje produkcije fotosintetskog O₂

Fotosintetski kisik izmjeren je pomoću tzv. Clark-ove kisikove elektrode pri primijenjenoj svjetlosti od 250 i 800 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Mjerenja su napravljena na četiri tjedna starim biljkama. Polovica biljaka je izložen svjetlosti jačine 300 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ približno 24 sata prije mjerenja. Usporedno su napravljena mjerenja ΔPEPE biljaka, divljeg tipa, te TROL nul mutanti. Za svaku biljku i svjetlosni uvjet napravljena su tri mjerenja. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni pomoću analize varijance (ANOVA), te LSD testa utvrđivanja najmanje značajne razlike. Statistički značajne razlike označene su malim slovima (Slika 50).



Slika 50. Grafički prikaz produkcije kisika za ΔPEPE mutante, divlji tip i TROL nul mutante uzgojene u uvjetima dva svjetlosna uvjeta: 80 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i 300 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL).

Rezultati mjerenja produkcije kisika kisikovom elektrodom dani su u Tablici 41. Kod biljaka koje su kontinuirano rasle pri GL uvjetima nakon primijenjene svjetlosti jačine 250 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dobivene su ujednačene vrijednosti od $0,531 \pm 0,779$ za ΔPEPE biljke do $0,653 \pm 0,150$ za TROL nul mutante. Također i kod biljaka s HL

predtretmanom dobivene su približno jednake vrijednosti od $0,613 \pm 0,055$ za divlji tip do $0,659 \pm 0,086$ za Δ PEPE biljke.

Nakon primijenjene svjetlosti jačine $250 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ došlo je do porasta vrijednosti produkcije kisika. Kod GL biljaka najniže vrijednosti izmjerene su kod Δ PEPE mutanti ($0,779 \pm 0,103$) dok su divlji tip i TROL KO biljke međusobno imale približne vrijednosti. Jednaki odnosi zabilježeni su i kod biljaka s HL predtretmanom. Kod Δ PEPE biljaka izmjerena je najniža vrijednost ovog parametra ($0,809 \pm 0,012$) dok su kontrolne biljke međusobno imale približne vrijednosti.

Tablica 41. Prosječne vrijednosti i standardna odstupanja produkcije kisika mjerene na Δ PEPE biljkama, divljem tipu i TROL nul mutantama izloženim djelovanju dva svjetlosna uvjeta: $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (GL) i $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL). Mjerenja su napravljena pri primijenjenoj svjetlosti od 250 i $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

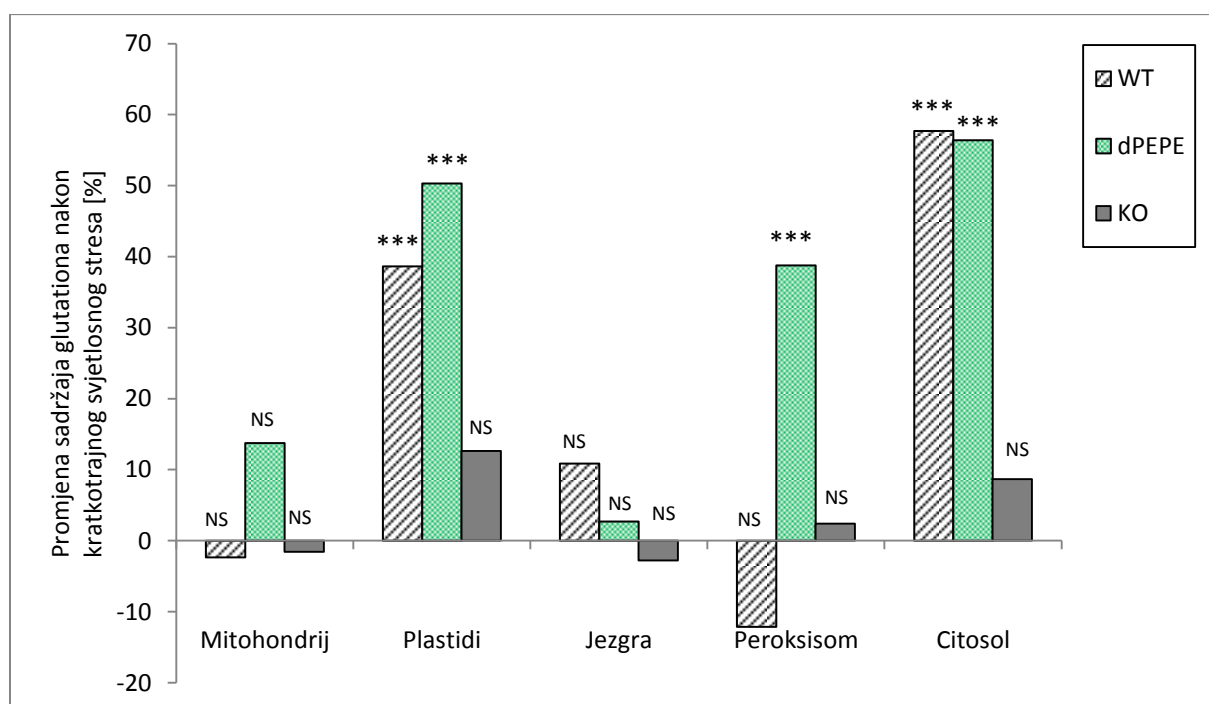
	GL		HL	
	F 250	F 800	F 250	F 800
WT	$0,613 \pm 0,065$	$0,941 \pm 0,116$	$0,613 \pm 0,055$	$0,972 \pm 0,087$
KO	$0,653 \pm 0,150$	$0,934 \pm 0,094$	$0,616 \pm 0,061$	$0,968 \pm 0,093$
Δ PEPE	$0,531 \pm 0,779$	$0,779 \pm 0,103$	$0,659 \pm 0,086$	$0,809 \pm 0,012$

Rezultati LSD testa pokazuju da između dobivenih vrijednosti pri primijenjenoj svjetlosti od $250 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, za oba svjetlosna uvjeta uzgoja nije bilo statistički značajnog odstupanja. Kod mjerenja nakon primijenjene svjetlosti od $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Δ PEPE mutante imale su statistički značajno najniže vrijednosti produkcije kisika kod oba uvjeta uzgoja.

Uspoređujući dobivene vrijednosti pri različitom intenzitetu primijenjene svjetlosti, vidljivo je da kod svih biljaka povećanjem jačine s 250 na $800 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dolazi do značajnog povećanja izmjerene vrijednosti produkcije kisika.

3.7 Utvrđivanje relativnog sadržaja glutaciona

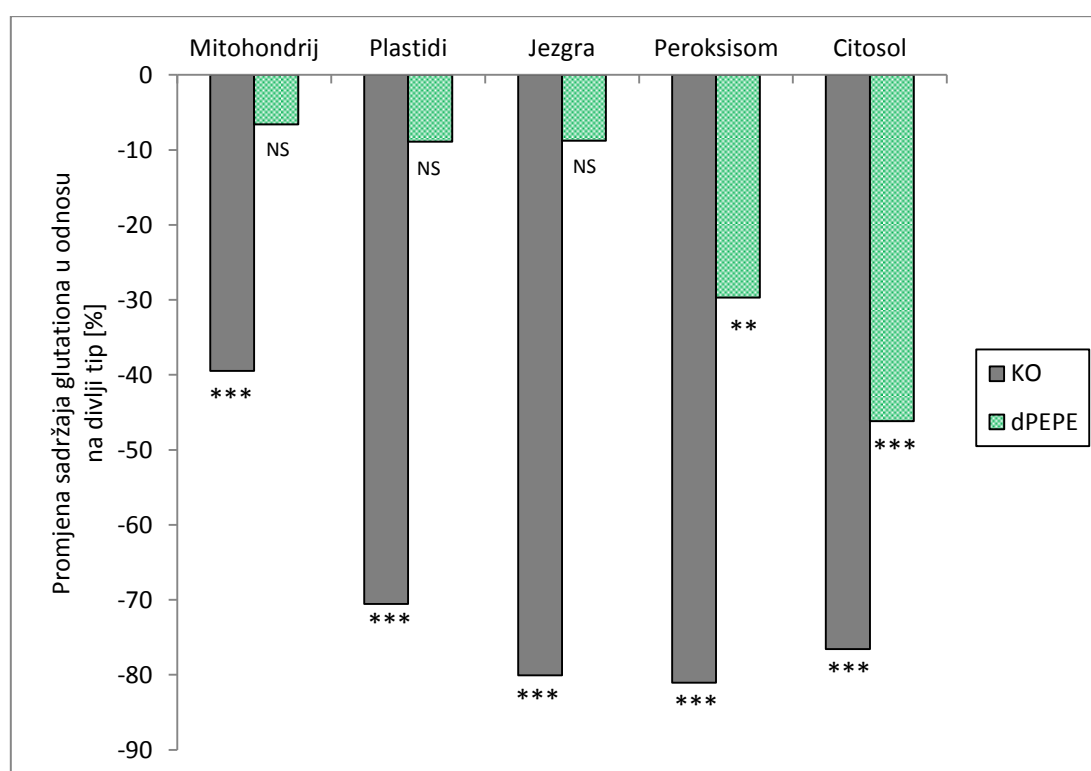
Analuze su napravljene na klijancima biljaka divljeg tipa, Δ PEPE i TROL nul mutantama, starim približno četiri tjedna. Za potrebe analize uzorkovani su mladi, potpuno razvijeni listovi rozeta nakon 2 h kontinuirane svjetlosti jačine $150 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, te nakon 4 h izlaganja svjetlosti jačine $700 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (metoda opisana u poglavlju 4). Rezultati su statistički analizirani pomoću Mann Whitney U-testa. Oznake *, ** i *** redom predstavljaju razine značajnosti od 0,05, 0,01 i 0,001, dok oznaka NS se odnosi na mjerenja kod kojih nije utvrđena statistički značajna razlika.



Slika 51. Usporedba specifičnih promjena u relativnom sadržaju glutaciona nakon kratkotrajnog svjetlosnog stresa (4 sata pri $700 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Slika 51. prikazuje usporedbe specifičnih promjena u gustoći glutaciona nakon četiri sata izlaganja svjetlosti jačine $700 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Graf prikazuje udio vezanih čestica zlata za glutation po μm^2 u mezofilnim stanicama biljaka *A. thaliana* divljeg tipa, te mutanti Δ PEPE i TROL KO nakon kratkotrajnog svjetlosnog stresa u odnosu na dobivene vrijednosti biljaka kontinuirano uzgojenih pri GL uvjetima.

Statistički značajne razlike utvrđene su kod analize sadržaja glutaciona u plastidima gdje je nakon izlaganja svjetlosnom stresu kod Δ PEPE biljaka i divljeg tipa utvrđeno statistički značajno povećanje relativnog sadržaja glutaciona pri razini značajnosti $p(t) < 0,001$. Također i kod utvrđivanja relativnog sadržaja glutaciona u citosolu i peroksisomu utvrđeno je da Δ PEPE mutante imaju statistički značajno povećanje u odnosu na biljke koje nisu izložene svjetlosnom stresu pri razini značajnosti $p(t) < 0,001$.



Slika 52. Usporedba specifičnih promjena u relativnom sadržaju glutaciona mutantnih linija (Δ PEPE i TROL nul mutante) uzgojenih pri $150 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ u odnosu na divlji tip.

Usporedbu specifičnih promjena u relativnom sadržaju glutaciona kod mutanti Δ PEPE i TROL KO uzgojenih pri GL uvjetima prikazuje Slika 52. Vrijednosti su prikazane u odnosu na dobivene vrijednosti za divlji tip. Graf prikazuje udio promjene sadržaja čestica zlata vezanih na glutacion po μm^2 u mezofilnim

stanicama Δ PEPE i TROL KO mutantnih linija u usporedbi sa divljim tipom (Col-0) nakon rasta pri osvjetljenju jačine $150 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Statističkom analizom utvrđeno je da je u odnosu na divlji tip relativni sadržaj glutaciona u mitohondrijima, plastidima i jezgri statistički značajno niži kod nul mutanti ($p(t) < 0,001$), dok kod Δ PEPE biljaka nije utvrđena statistički značajna razlika.

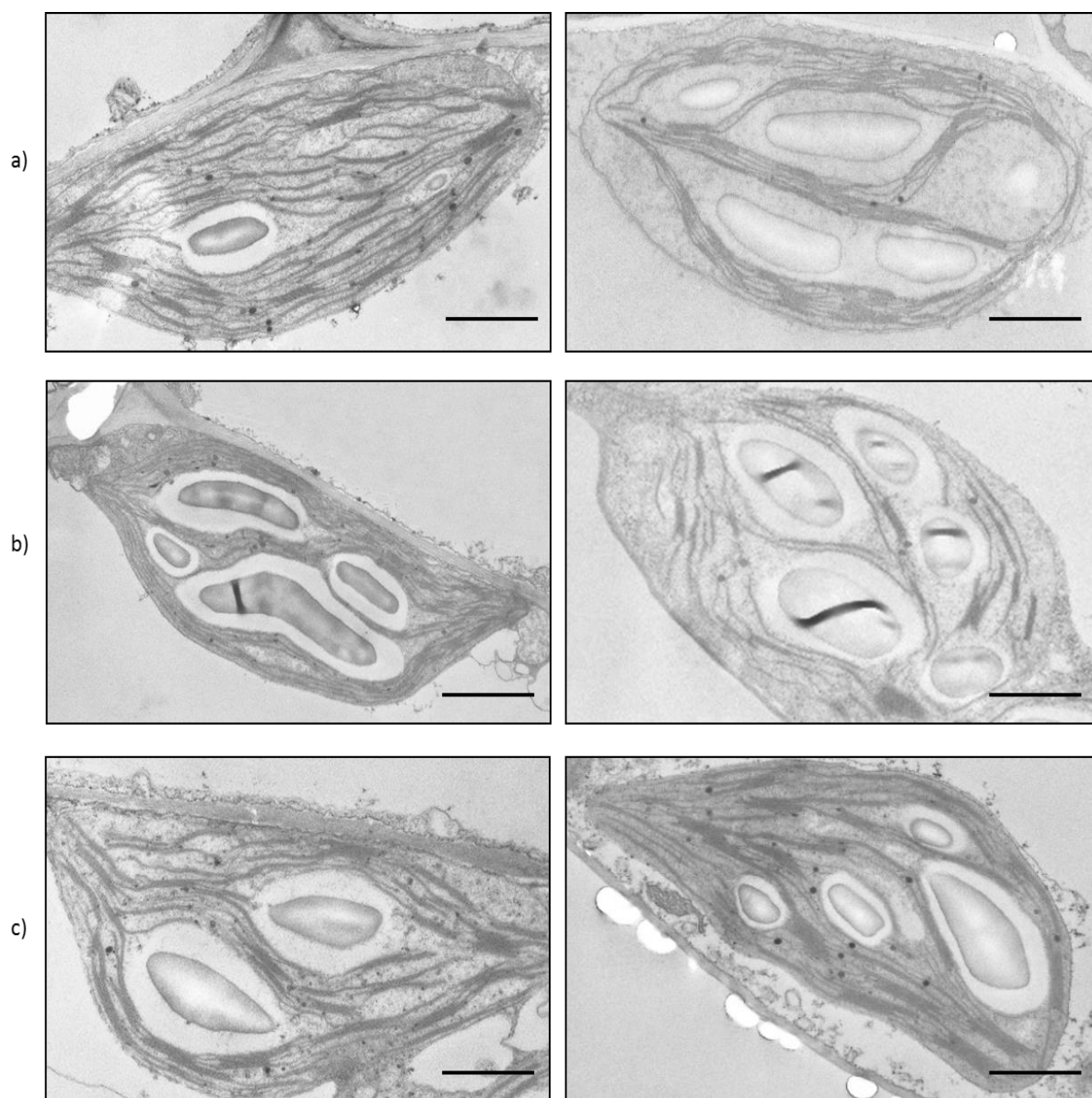
Uspoređujući sadržaj glutaciona u peroksisomu Δ PEPE biljke imaju statistički značajno niže vrijednosti u odnosu na divlji tip pri razini značajnosti od $p(t) < 0,01$, dok TROL KO mutante imaju značajno niže vrijednosti pri razini značajnosti od $p(t) < 0,001$. U citosolu za obje mutantne linije utvrđeno je da im je relativni sadržaj glutaciona statistički značajno niži u odnosu na divlji tip pri razini značajnosti od $p(t) < 0,001$.

3.8 Ultrastrukturalna karakterizacija kloroplasta u listovima Δ PEPE biljaka

Usporedno je promatrana ultrastruktura kloroplasta biljaka uzgajanih pri kontinuiranom GL osvjetljenju, te biljaka izloženih djelovanju svjetla jačine $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Promatrane su biljke divljeg tipa, te Δ PEPE i TROL nul mutante (Slika 53).

Kloroplasti kod sve tri promatrane linije bez predtretmana HL svjetlom regularnog su oblika, uz nešto naglašeniji sadržaj škrobnih granula kod Δ PEPE i TROL nul mutanti. Nakon izlaganja biljaka svjetlosnom stresu vidljivo je značajno povećanje granula škroba, što je posebice naglašeno kod Δ PEPE mutanti kod kojih je duž cijelog presjeka kloroplasta vidljiva površina škrobnih granula.

Kloroplasti Δ PEPE biljaka čine se nešto manji u odnosu na divlji tip, te gušćih tilakoidnih membrana, dok su kod TROL KO biljaka tilakoidne membrane izrazito rijetko posložene unutar kloroplasta. Nakon izlaganja biljaka svjetlosnom stresu uslijed povećanja škrobnih granula došlo je i do porasta veličine kloroplasta, te on poprima zaobljeni oblik.



Slika 53. Usporedni prikaz ultrastrukture kloroplasta ΔPEPE biljaka (Slika 51b) u odnosu na divlji tip (Slika 51a) i TROL nul mutante (Slika 51c). Uzorci su uzeti sa četiri tjedna starih biljaka uzgajanih pri $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (lijevo), te $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (desno). Skala = $1 \mu\text{m}$.

RASPRAVA

4 RASPRAVA

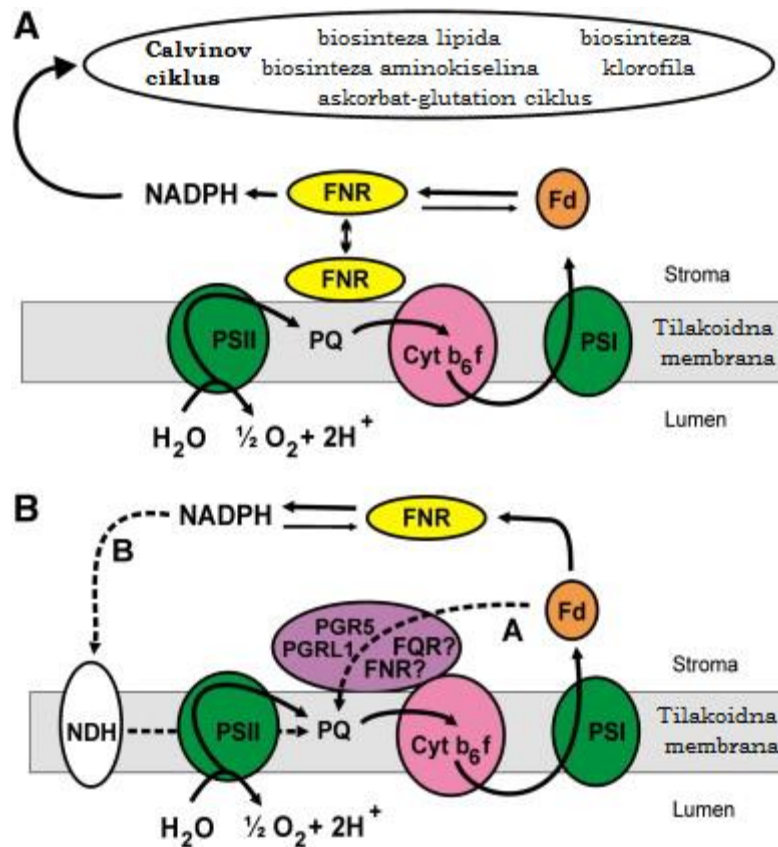
4.1 Osnovna obilježja i moguća uloga domene PEPE

Protein TROL integralni je protein tilakoidnih membrana i sudjeluje u katalizi fundamentalnog procesa prijetvorbe energije. TROL je zadužen za vezivanje flavoenzima feredoksin:NADP⁺ oksidoreduktaze (FNR), enzima koji katalizira prijenos elektrona na molekulu NADP⁺ (Jurić i sur. 2009, Zhang i sur. 2001). Ovaj protein čine dvije specifične komponente: domena ITEP koja je izravno zadužena za vezivanje FNR-a, smještena na karboksiterminalnom dijelu i orijentirana prema stromi; te domena RHO, inaktivna domena nalik rodanazama smještena u lumenu tilakoida. Neposredno ispred domene ITEP smještena je regija bogata prolinom za koju se pretpostavlja da čini fleksibilni dio proteina TROL sa ulogom u dinamici vezivanja FNR-a na domenu ITEP. Domena sadrži ponavljajući slijed Pro-Val-Pro te je nazvana domena PEPE. U sklopu ovog istraživanja primjenom različitih molekularnih i biokemijskih metoda pokušalo se okarakterizirati ovu važnu domenu, te utvrditi njezinu ulogu u funkcionalnosti proteina TROL kao neophodne komponente u završnim procesima reakcija fotosinteze ovisnih o svjetlosti.

Biljke koriste svjetlosnu energiju za redukciju anorganskih spojeva, CO₂, nitrata i sulfata unutar kloroplasta. Elektroni potrebni za taj proces dolaze iz vode kroz niz fotokemijskih reakcija unutar tilakoidnih membrana. Feredoksin (Fd), proteinski nosač smješten u stromi, krajnje je odredište u ovom lancu prijenosa elektrona (Slika 54). Nakon redukcije, Fd donira elektrone Fd-ovisnim enzimima poput FNR-a, Fd-tioreduktaze (FTR), glutamat sintaze i dr. Ovi enzimi, iako međusobno različiti, svi imaju sposobnost formiranja kompleksa sa Fd koji sudjeluje u procesima prijenosa elektrona. Razumijevanje kompleksa između Fd i Fd-ovisnih enzima neophodno je za jasno razumijevanje fotosintetskih procesa prijenosa elektrona (Kurusu i sur. 2001). Fd djeluje i kao usko grlo i kao središte za distribuciju visoko energetske elektrona do raznih enzima u sustavu.

Feredoksin:NADP⁺ oksidoreduktaze nalazimo bilo slobodne u stromi (topljivi FNR) bilo vezane za tilakoidne membrane, no oba oblika su jednako fotosintetski aktivna. Fotosintetski aktivni (autotrofni) FNR pripada obitelji topljivih monomernih enzima sa nekovalentno vezanim flavin-adenin-dinukleotidom (FAD) kao prostetskom skupinom. Za proizvodnju jedne molekule NADPH potrebne su dvije molekule Fd. Heterotrofni FNR enzimi sudjeluju u raznim metaboličkim procesima poput

fiksiranja dušika, biosinteze izoprenoida, metabolizma steroida, detoksikacije ksenobiotika, željezo-sumpor klaster biogenezi, te oksidativnog stresnog odgovora. U tim putevima FNR katalizira suprotnu reakciju, reakciju nastajanja reduciranog Fd-a (Carillo i Ceccarelli 2003).



Slika 54. FNR predstavlja svojevrsno raskrižje različitih puteva za prijenos elektrona. A) linearan prijenos elektrona s molekule vode preko PSII, PQ, Cyt *b₆f*, PSI, Fd i FNR do NADP⁺. B) isprekidane linije prikazuju moguće puteve prijenosa elektrona. Kod Fd-ovisnih puteva elektroni putuju sa Fd do Cyt *b₆f* preko djelomično okarakteriziranih puteva prijenosa elektrona (Mulo 2011).

Za učinkovitost sustava važna je razvnoteža ovog Fd/FNR redoks stanja. Prekomjerna redukcija unutar fotosintetskog lanca prijenosa elektrona može

izazvati oštećenja proteinskih kompleksa i rezultirati povećanom proizvodnjom ROS-a. Poznato je da u uvjetima pretjerane redukcije pseudo-ciklički prijenos elektrona omogućuje elektronima da se kreću od vode do PSI uz molekularni kisik kao alternativni elektron akceptor. Ovaj proces naziva se Mehlerova reakcija i rezultira nastankom H_2O_2 kojeg generira superoksid dismutaza (SOD), te prevodi u vodu i kisik pomoću askorbat peroksidaze. Ovaj alternativni put omogućava funkcionalnost cikličkog prijenosa elektrona, te sintezu ATP-a nužnog za Calvinov ciklus koji potom oksidira NADPH i time je ponovno uspostavljen LET (Allen 2003., Vojta i sur. 2015).

Dosadašnja istraživanja ukazuju na sposobnost FNR-a u stvaranju kompleksa sa različitim proteinima, što ukazuje da je kompleks sa proteinom TROL samo jedan u nizu proteinskih kompleksa sa FNR-om (Mulo 2011). Brojni znanstvenici ukazuju na fotosintetske proteinske komplekse sa FNR-om poput citokroma *b₆f* (Clark i sur. 1984, Yamashita i sur. 2007), PsaE i PSI (Andersen i sur. 1992, Cassan i sur. 2005), no do karakterizacije FNR vezujućih proteina Tic62 i TROL nije bilo jasnih biokemijskih dokaza o izravnoj interakciji sa FNR-om i stvaranja kompleksa velike molekulske mase na samoj tilakoidnoj membrani (Vojta i sur. 2012). Nedavno je predložen novi koncept prema kojemu je većina kloroplastnog FNR-a u razdoblju tame vezana za tilakoide pomoću Tic62 i TROL proteina. U tim uvjetima suvišak FNR-a pohranjuje se na mjestima vezivanja, najvjerojatnije kako bi se stabilizirao FNR za vrijeme fotosintetske neaktivnosti. U periodima promjenjivog intenziteta svjetlosti (npr. jutro) FNR je otpušten u stromi gdje djeluje kao učinkovit NADPH katalizator omogućavajući učinkovit LET. Vojta i sur. (2015) predlažu drugačiji model za dinamičko vezanje FNR-a na TROL kod kojega u normalnim uvjetima osvjetljenja FNR vezan na TROL provodi učinkovitu $NADP^+$ fotoredukciju uslijed specifičnog vezanja FNR-a u blizini PSI što je nužno za kontrolirani prijenos reduciranog Fd. U HL uvjetima FNR je otpušten sa TROL-a vjerojatno uslijed transmembranskog prijenosa signala uključivanjem rodanaznih i prolin bogatih domena. Otpušteni FNR može služiti kao učinkovit sakupljač ROS-a ili Fd može dijeliti elektrone s drugim akceptorima. Autori pretpostavljaju da je FNR vezivanje za membranski regrutni motiv TROL-a i Tic62 posredovan promjenom pH vrijednosti, te da je reguliran promjenom količine svjetla. Također pretpostavljaju da je vezivanje preko TROL-a i drugih proteinskih sidrišta dinamičko. Takvo alternativno vezivanje i otpuštanje FNR-a ili njegovih asocijacija s različitim kompleksima ili donorima/akceptorima elektrona moglo bi biti povezano s

regulacijom i davanjem prednosti drugim putevima prijenosa elektrona, te zaključuju da u odsustvu proteina TROL dinamičko otpuštanje i vezivanje FNR-a predstavlja mehanizam održavanja LET-a prije nego je pseudociklički tok aktiviran. Također pretpostavlja se da FNR-TROL mjesto grananja može biti izvorišni element koji modulira razne nizvodne mreže ROS detoksikacije.

Identificiranjem proteina TROL utvrđeno je da stvara nekoliko proteinskih kompleksa, no jedino kompleks veličine 190 kDa sadrži FNR. Jurić i sur. (2009) potvrdili su interakciju TROL-FNR preko domene ITEP, dok je za domenu RHO utvrđeno da sudjeluje u redoks regulaciji vezivanja i otpuštanja FNR-a čime se postiže stabilnost sustava prijenosa elektrona kroz membranu i optimalno redoks stanje. Djelovanjem svjetlosti visoke jakosti dolazi do otpuštanja FNR-a, te posljedično zbog nastalog suviška NADPH i do prijenosa elektrona na potencijalne elektron akceptore. Pretpostavka je da fleksibilna domena PEPE dovodi do pomicanja ITEP regije dalje od tilakoida, te tako omogućava otpuštanje FNR-a (Vojta i Fulgosi, 2012.).

Dosadašnja istraživanja ukazuju na veliki značaj prolinskih ostataka u odvijanju i zavijanju proteinskih struktura pri prelasku iz jedne konformacije u drugu. Prolinski aminokiselinski ostatak će se u velikoj vjerojatnosti vezivati u *cis* formi, daleko češće nego drugi aminokiselinski ostaci (Sansom MSP i Weinstein H 2000, Levitt 1981). Prolin se također razlikuje od ostalih aminokiselina i po cikličkom bočnom prstenu s dušikom. Takvi struktura ograničava konformaciju na kut od 65°, te također ograničavaju i susjedni aminokiselinski ostatak zbog nakupine N-supstituenata uslijed čega dolazi do snažne tendencije formiranja β -konformacija (Kay i sur. 2000, MacArthur i i Thornton 1991). Sve navedeno omogućuje prolinu vrlo brzo vezivanje i otpuštanje, no posljedično nastaju kompleksi koji nisu strukturno do kraja dobro definirani. Stoga mjesta bogata prolinom susrećemo u situacijama gdje je nužna brza razmjena ili upošljavanje proteina poput inicijacije transkripcije, prijenosa signala kontroliranog redoks-procesima ili preslagivanja, te uloga prolina u takvim procesima nije strukturno definirana već prolin služi kako bi međusobno približio različite proteine na način koji će omogućiti njihovu naknadnu interakciju (Williamson 1994, Kay i sur. 2000, Palatnik i sur. 2003).

Prema Zarrinpar i sur. (2003) domene bogate prolinom obično susrećemo kao dio većeg multidomeinskog proteinskog sustava koji stvaraju komplekse izravno uključene u stanični prijenos signala i druge ključne stanične procese (Ball i sur.

2002). Brojna istraživanja ukazuju na vrlo velik broj prolinskih vezujućih domena, koje sudjeluju u stvaranju različitih kompleksa. Prednost prolina nad preostalim 19 aminokiselina je u navedenim jedinstvenim fizikalno kemijskim svojstvima, te on postaje svojevrsno sidrište za različite proteine. Dodatna selektivnost i specifičnost proizlazi iz dodatnih višestrukih mehanizama koji su uključeni u stvaranje kompleksa poput višestrukih vezujućih mjesta i sl. Još uvijek je velik broj mehanizama nerazjašnjeno no neupitna je uloga ovih molekulskih „prekidača“ u transmembranskim uzvojnica u procesima prenošenja signala duž membrane.

Za funkcijsku analizu ove prolinom bogate domene korištena je metoda obrnute genetike. Metoda obrnute genetike predstavlja izvrstan alat u funkcionalnoj genomici za utvrđivanje uloge pojedinih gena stvaranjem sustava sa izmijenjenim genom od interesa (Sessions i sur. 2002). Kako bi se ispitala uloga domene PEPE *in vivo* dizajnirana je mutanta kojoj je uklonjena domena PEPE. Na dobivenim mutantama Western blot analizom potvrđeno je da mutirane biljke i dalje proizvode protein TROL, dok je nativnom elektroforezom potvrđeno da dolazi do čvrstog vezivanja FNR-a na TROL u odsustvu domene PEPE (kompleks veličine 190 kDa, prema Jurić 2010.).

4.2 Funkcionalnost fotosintetskog aparata u uvjetima svjetlosnog stresa

Fotosintetski organizmi razvili su brojne zaštitne mehanizme kako bi umanjili učinak fotooksidativnog stresa. Brojna istraživanja ukazuju na važnost antioksidativnog odgovora u prilagodbi na uvjete visokog intenziteta svjetlosti. Kombinacija visokoreaktivnih međuprodukata i okoliš bogat kisikom nužan je za fotosintezu, no dođe li do neravnoteže nastaju oštećenja. Gotovo svaka promjena u okolišu može dovesti do ovakvog disbalansa rezultirajući nastajanjem reaktivnih kisikovih jedinki (ROS). Fotooksidativni stres može dovesti do gubitka proteinskih funkcija, narušavanja integriteta membrana, te u konačnici i do stanične smrti (Ledford i Niyogi, 2005). Obrambeni sustavi mogu u određenoj mjeri zaštititi kloroplaste od oksidativnog stresa, te omogućiti biljkama da se aklimatiziraju na suvišak svjetlosti (Golan i sur. 2004). Iako su visoke razine ROS-a smrtonosne, manje razine mogu služiti kao signal stanici da se pripremi na nadolazeći stres. Još

uvijek nije do kraja razjašnjen mehanizam kako fotosintetski organizmi prepoznaju i odgovaraju na oksidativne signale (Mittler, 2002).

Oksidativni stres kod kloroplasta može doći u nekoliko oblika i na nekoliko lokacija. Jedno od potencijalnih mjesta su molekule klorofila unutar tilakoidnih membrana. Okolišni stres koji narušava ravnotežu između količine apsorbirane svjetlosti i upotrebene energije produljuje životni vijek singletne pobudne molekule klorofila ($^1\text{Chl}^*$) povećavajući vjerojatnost prelaska u tripletni oblik ($^3\text{Chl}^*$). $^3\text{Chl}^*$ lakše stupa u reakciju s kisikom pri čemu nastaje singletni kisik $^1\text{O}_2^*$ koji je izrazito reaktivan i vrlo štetno djeluje na lipide, nukleinske kiseline i proteine (Martinez i sur. 2003., Davies, 2004).

Promjene u fluorescenciji klorofila *a* važan su pokazatelj stanja fotosintetskog prijenosa elektrona, te učinkovitosti PSII. Mjerenjem fluorometrom prinos fluorescencije klorofila *a* daje nam kvantitativan podatak o stanju fotosintetskog aparata, kao i o velikom broju zaštitnih mehanizama kod svjetlosnog zračenja (Kalai i sur. 1998).

OJIP krivulje intenziteta fluorescencije klorofila *a* na logaritamskoj vremenskoj skali prikazane su na Slici 40. Na slici b vidimo normalizirani porast fluorescencije klorofila *a*, dok slika a prikazuje porast fluorescencije klorofila *a* bez normalizacije. U oba prikaza za sva tri biljna sustava uzgajanih pri optimalnim uvjetima osvjetljenja vidljiv je karakterističan OJIP oblik krivulje, dok je za mjerenja na biljkama nakon tretmana svjetlosti visokog intenziteta vidljivo odstupanje od karakterističnog oblika krivulje, te pad intenziteta fluorescencije u koraku J i u koraku I. Kod krivulje bez normalizacije intenzitet fluorescencije nastavlja padati i u koraku P. Pad intenziteta fluorescencije najnaglašeniji je kod ΔPEPE mutanti izoženih svjetlosnom stresu. Dobivene vrijednosti pokazuju značajno povećanje vrijednosti parametara V_I i V_J kod ΔPEPE i trol nul-mutanti nakon HL tretmana. Prema Strasser i sur. (1995) O-J korak predstavlja fotokemijsku fazu, pri čemu dolazi do redukcije primarnog akceptora Q_A u Q_A^- . U koraku I nastavlja se redukcija Q_A , a korak P se postiže u trenutku kada je sav plastokinon (QP) reduciran do PQH_2 . Prema literaturnim podacima za utišavanje fluorescencije u J koraku može biti odgovoran mehanizam koji omogućava transport elektrona kroz neaktivni, alternativni ogranak PSII, te da se elektron može prenijeti sa P680 na elektron akceptor feofitin (Pheo) smješten na D2 proteinu PSII. Potom se elektron prenosi sa

reduciranog Pheo2 do Q_B ili Q_B^- . Pretpostavlja se da je takav alternativni elektron transportni lanac odgovoran za utišavanje u J koraku (Lazár, 2006).

Maksimalni kvantni prinos u GL uvjetima ujednačen je za sve tri linije biljaka, dok u uvjetima svjetlosnog stresa dolazi do smanjenja ovog parametra kod mutantnih linija, posebice Δ PEPE biljaka gdje iznosi 0,637. Prema Schreiber i sur. (1994) ovaj parametar se najčešće kreće između 0,8-0,83, dok vrijednosti dobivene za Δ PEPE biljke ukazuju da kod njih fotosintetski aparat pretrpio najveća oštećenja, odnosno Δ PEPE biljke pokazuju najmanju toleranciju na svjetlosni stres. Promjene u maksimalnom prinosu kvanta rezultat su promjene fotokemijske učinkovitosti sustava i rasipanja topline, a niske vrijednosti F_v/F_m ukazuju na oštećenja reakcijskog središta PSII (Sorkel i sur. 2007).

Stanje stresa kod Δ PEPE mutanti nakon izlaganja vrlo visokom intenzitetu svjetlosnog zračenja još je izraženiji preko indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}). Kod Δ PEPE biljaka vrijednosti ovog parametra nakon svjetlosnog stresa drastično su smanjene (sa 1,474 na 0,221 relativnih jedinica). Približno jedanki pad zabilježen je i kod TROL nul mutanti, dok su za biljke divljeg tipa zabilježene znatno manje promjene ovog parametra. Ovakvi rezultati ukazuju na slab učinak fotosinteze kod mutanti u odnosu na biljke divljeg tipa. Prema Strasser i sur. (2000) ovaj parametar uključuje tri neovisna parametra: apsorpciju po aktivnom reakcijskom središtu (RC/ABS), omjer hvatanja ekscitona i rasipanja energije (TR_0/DI_0), te parametar transporta elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A ($ET_0/(TR_0-ET_0)$). Brojna istraživanja ukazuju da je ovaj parametar izuzetno osjetljiv na okolišni stres, daleko više nego maksimalni kvantni prinos (Živčák i sur.2008). Gledamo li pojedinačno dobivene vrijednosti za svaki od ovih parametara (Slike 30., 31. i 32.) vidimo da se drastični pad vrijednosti za Δ PEPE biljke još primjećuje i kod parametara $ET_0/(TR_0-ET_0)$ i TR_0/DI_0 , dok je kod RC/ABS pad vrijednosti nakon stresa dosta manji. I drugi autori opisuju utjecaj svjetlosnog stresa na indeksa fotosintetske učinkovitosti. Prema Lepeduš i sur. (2009) najveći učinak na smanjenje vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitost kod delecijских mutanti M13 (opisane u radu Lepeduš i sur. 2009) izloženih svjetlosnom stresu ima upravo parametar TR_0/DI_0 na kojeg utječe u najvećoj mjeri porast rasipanja energije (DI_0/RC), više nego parametar TR_0/RC koji opisuje hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu. Smanjenje parametra TR_0/DI_0 i kod Δ PEPE delecijских mutanti imalo je značajan utjecaj na PI_{ABS} što navodi na zaključak da je došlo do konformacijskih promjena nastalih kao posljedica stresa.

U ovom istraživanju kao i kod Lepeduš i sur. (2009) nije bilo statistički značajne razlike u gustoći aktivnih reakcijskih središta (RC/CS₀) prije i nakon svjetlosnog stresa, no dobivene vrijednosti za parametar apsorpcije po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC) pokazuju porast. Kod Δ PEPE mutanti parametar ABS/RC kod biljaka nakon tretmana svjetlošću visoke jačine značajno raste. Nešto manji porast vidljiv je i kod nul mutanti, dok kod biljaka divljeg tipa nije bilo značajne promjene ovog parametra. Parametar ABS/RC predstavlja efektivnu veličinu antena prikazanu kao apsorbanacija po reakcijskom središtu. Porast parametra efektivne veličine antena dovodi do smanjenja gustoće aktivnih reakcijskih središta i parametra ET₀/RC koji opisuje transport po aktivnom reakcijskom središtu. Posljedica ovih promjena je i smanjenje primarne fotosintetske učinkovitosti kao i maksimalni prinos PSII (Demetriou i sur. 2007). Prema Nussbaum i sur. (2001) povećanje parametra ABS/RC sugerira da je došlo do inaktivacije dijela reakcijskih središta tako što je dio aktivnih reakcijskih središta Q_A prešlo u neaktivna Q_B. Pri tome se jedan dio energije oslobađa u obliku topline, a parametar DI₀/RC raste. U ovom istraživanju parametar rasipanja po aktivnom reakcijskom središtu (DI₀/RC) kod Δ PEPE biljaka izloženih svjetlosnom stresu u odnosu na biljke koje su rasle u optimalnim uvjetima osvjetljenja narastao je približno 3 puta. Isti parametar kod TROL nul mutanti nakon izlaganja svjetlosnom stresu se udvostručio, dok kod biljaka divljeg tipa nije došlo do značajnije promjene.

Vrijednosti maksimalnog kvantnog prinosa dobivene PAM fluorimetrom približno su jednake vrijednostima dobivenim PEA uređajem. I ovdje su vrijednosti za mutante nakon izlaganja svjetlosnom stresu bile niže od optimalnih 0,8 što ukazuje na smanjenu aktivnost fotosintetskog aparata, te slabu otpornost mutantnih linija na svjetlosni stres. Intenzitet fluorescencije mjeren je i pri primijenjenoj svjetlosti od 100, 250 i 800 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Kod sve tri linije biljaka koje nisu izložene svjetlosnom predtretmanu zabilježene su ujednačene vrijednosti neovisno o primijenjenoj svjetlosti, dok su kod biljaka s predtretmanom svjetlosti visokog intenziteta jedino TROL nul mutante pokazale značajno odstupanje pri povećanju intenziteta primijenjene svjetlosti. Gledajući rezultate dobivene za maksimalni intenzitet fluorescencije, za tri intenziteta primijenjene svjetlosti, najznačajnija dobivena razlika je kod Δ PEPE biljaka izloženih svjetlosnom stresu. Kod ovih biljaka došlo je do značajnog smanjenja parametra maksimalnog intenziteta fluorescencije, što je naizraženije pri primijenjenoj svjetlosti jačine 250 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i to nam ukazuje na smanjenu učinkovitost PSII kod Δ PEPE mutanti već nakon kraćeg

izlaganja svjetlosnom stresu. Prema Schrieber (2004) i Schrieber i sur. (1986) prinos fluorescencije klorofila *a* govori nam o velikom broju zaštitinih mehanizama kod povišenog svjetlosnog zračenja. Osim što služi kao mogući indikator nastanka ROS-a, također promjene u fluorescenciji ukazuju nam i na druge promjene uzrokovane stresom poput gubitka staničnih funkcija ili pokretanja obrambenih mehanizama.

Nefotokemijsko prigušivanje fluorescencije klorofila *a* (NPQ) parametar je koji odražava sposobnost rasipanja suvišne svjetlosti u obliku topline. Pri primijenjenoj svjetlosti od $100 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ najviše izmjerene vrijednosti su za ΔPEPE biljke, pri čemu su dobivene podjednake vrijednosti za obje skupine biljaka, one koje nisu izlagane kratkotrajnom svjetlosnom stresu, kao i kod kontrolnih biljaka. Najniže vrijednosti dobivene su za TROL nul mutante nakon svjetlosnog stresa (Slika 46.). Nakon primijenjene svjetlosti od $250 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ta razlika je još izraženija. Vrijednosti za HL ΔPEPE biljke značajno su najviše, a vrijednosti za HL TROL KO statistički značajno najniže. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da je kod HL ΔPEPE biljaka već pri primijenjenoj svjetlosti slabijeg intenziteta došlo do pokretanja zaštitnih mehanizama u svrhu sprečavanja fotooštećenja i to u vidu rasipanja suviška energije u obliku topline. S druge strane kod TROL nul mutanti je vrlo vjerojatno već pri primijenjenoj svjetlosti slabijeg intenziteta došlo do fotoinhibicije. NPQ (kao i qP) pomažu minimiziranju produkcije singletnog kisika $^1\text{O}_2^*$ odgovornog za fotooštećenje sustava (Müller i sur. 2001, Golan i sur. 2006).

Koncentracije fotosintetsnih pigmenata mjerene su na četiri tjedna starim biljkama sa jednakim predtretmanom kao i za ostatak eksperimenta. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je kod ΔPEPE biljaka nakon izlaganja svjetlosnom stresu došlo do najznačajnijeg pada koncentracije klorofila *a*. Kod TROL nul mutanti također je zabilježen pad, dok je kod biljaka divljeg tipa promjena vrlo mala, te je čak došlo do laganog povećanja koncentracije ovog pigmenta. Izmjerene vrijednosti za klorofil *b* dale su približno jednake odnose, te je i kod ovog pigmenta najznačajnija primjena primijećena kod ΔPEPE biljaka (Slika 22., 23.). Brojna istraživanja ukazuju na pojavu smanjenja koncentracije klorofila u uvjetima svjetlosnog stresa. Ovo smanjenje je karakteristično za sve vaskularne biljke. Gubitak pigmenta svojevrsna je metabolička prilagodba biljke i posljedica je stresa izazvanog suviškom svjetlosnog zračenja, te također predstavlja jedan od obrambenih mehanizama jer posljedično dovodi i do smanjenja stvaranja ROS-a (Jagtap i sur. 1998, Carter i Knapp, 2001).

Koncentracija fotosintetskog kisika u izravnoj je vezi s uvjetima rasta biljke. Fotosintetski kisik mjereno je na četiri tjedna starim biljkama sa i bez svjetlosnog predtretmana, pomoću tzv. Clark-ove kisikove elektrode pri primijenjenoj svjetlosti od 250 i 800 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Kod biljaka koje su kontinuirano rasle pri GL uvjetima kao i kod biljaka s HL predtretmanom nakon primijenjene svjetlosti jačine 250 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dobivene su ujednačene vrijednosti. Nakon primijenjene svjetlosti jačine 800 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ došlo je do porasta vrijednosti produkcije kisika. Kod oba uvjeta uzgoja uočena je slabija sposobnost produkcije kisika kod ΔPEPE biljaka, dok kod kontrolnih sustava nije došlo do značajnih promjena. Uspoređujući sve dobivene vrijednosti, vidljivo je da kod svih biljaka povećanjem jačine osvjetljenja s 250 na 800 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dolazi do značajnog povećanja izmjerene vrijednosti produkcije kisika. Biljke reguliraju produkciju kisika podešavanjem respiratorne aktivnosti na okolišne uvjete, što također predstavlja obrambeni mehanizam kojime se umanjuje i pokušava spriječiti anoksija unutar tkiva kako se smanjuje dostupnost kisika. Smanjenje respiratorne aktivnosti kao posljedice promjene u koncentraciji kisika možemo objasniti kroz nekoliko regulacijskih mehanizama. Različite oksidaze uključene u mitohondrijski lanac transporta elektrona posjeduju različite regulatorne mehanizme preko kojih prilagođavaju svoju aktivnost u odnosu na koncentraciju kisika (Zabalza i sur. 2009, Geigenberger i sur. 2000).

4.3 Specifične promjene u sadržaju glutaciona

Tripeptid glutation važan je antioksidans s raznolikom ulogom u metabolizmu biljke, no prije svega ima zaštitnu funkciju. Reakcije lanca prijenosa elektrona koje se odvijaju u kloroplastima proizvode reaktivne kisikove jedinice (vodikov peroksid, superoksidi i hidroksid radikali). Aksoibat – glutation ciklus ključan je u uklanjanju peroksida, posebice u plastidima. Ta uloga čini glutation esencijalnim u očuvanju membrana, na način da zadržava α -tokoferol i zeaksantin u reduciranoj formi (Foyer i Halliwell, 1976; Noctor i Foyer, 1998). Glutacion je također uključen i u detoksifikaciju organskih spojeva. Mnogi ksenobiotici i razni metaboliti poput antocijanina stupaju u reakcije s glutationim preko raznih glutacion – transferaza, te se u obliku konjugata prevode u vakuole (Marrs, 1996). Glutacion štiti proteine formirajući reverzibilne disulfidne mostove povezujući tiolnu skupinu na cisteinu unutar proteina sa glutationom (Lindermayr i sur. 2005).

U ovom radu sadržaj glutaciona određen je imunogold bojenjem česticama zlata. Mjerenjem nakupljanja glutaciona u plastidima utvrđeno je da nakon kratkotrajnog izlaganja biljaka svjetlosnom stresu kod Δ PEPE biljaka uočeno je značajno povećanje sadržaja glutaciona, te nešto manje kod divljeg tipa, dok kod TROL nul mutanti nije zabilježeno značajnije nakupljanje glutaciona. Također i kod mjerenja relativnog sadržaja glutaciona u citosolu i peroksisomu uočeni su isti trendovi. Uspoređujući vrijednosti za Δ PEPE i TROL nul mutante vidljivo je da u odnosu na divlji tip relativni sadržaj glutaciona je kod nul mutanti u mitohondrijima, plastidima i jezgri značajno niži, što nije slučaj kod Δ PEPE biljaka. S druge strane u peroksisomu i citosolu kod obje mutantne linije uočen je značajan pad vrijednosti glutaciona u odnosu na divlji tip. Ovakva distribucija glutaciona u staničnim organelima navodi na zaključak da postoji značajna razlika između ova tri biljna sustava, te da kod mutantnih linija postoji izvjesno unutarstrukturno oštećenje uslijed kojega dolazi do nakupljanja glutaciona u pojedinim organelama. Uspoređujući s drugim istraživanjima vidljivo je da unutarstanična distribucija glutaciona, te omjer između pojedinih organela varira značajno, posebice u ekstremnim uvjetima. Uzimajući u obzir da je sadržaj glutaciona podložan i razvojnom stadiju biljke, te vrlo ovisan o uvjetima uzgoja, razlike u unutarstaničnoj distribuciji u izravnoj su vezi sa okolišnim uvjetima i stresom.

4.4 Fenotipska obilježja i promjene u ultrastrukтури kloroplasta

Biljke vrste *A. thaliana* kojima je uklonjena domena PEPE pokazuju promjene u anatomiji i fenotipskim obilježjima u odnosu na divlji tip. Δ PEPE biljke kroz cijeli razvojni put pokazuju znatno brži rast i razvoj u odnosu na kontrolne biljke. Najznačajnija razlika vidljiva je kod biljaka u cvatnji gdje su biljke bez domene PEPE već u potpunosti razvile cvijet, dok su ostale biljke imale cvijet tek u začetku. Sve biljke imale su ujednačenu zelenu boju lista, no ukupna biomasa kod Δ PEPE biljaka bila je vidljivo veća (Slika 21). Razni su čimbenici koji reguliraju vrijeme cvatnje same biljke. Prema Simpson i Dean (2002) cvjetanje vrste *A. thaliana* ubrzavaju postupci koji simuliraju prijelaz zime u proljeće poput stratifikacije, te produljenje trajanja dana. Također trenutak cvatnje ubrzavaju i stresni uvjeti poput prenapućenosti, nedostatka nutritijenata, toplina, zračenje, suša i sl. Uzevši u obzir

da su Δ PEPE biljke kroz cijeli postupak od predtretmana do rasta, cvatnje i produkcije sjemena bile izložene istim okolišnim uvjetima kao i kontrolne biljke TROL nul-mutante i *A. thaliana* divlji tip, nameće se zaključak da razlog ubrzane cvatnje nije stres izazvan okolišnim uvjetima već vjerojatnije stres uzrokovan metaboličkim promjenama u samoj mutanti uzrokovanoj uklanjanjem domene PEPE koje čine ove biljke manje tolerantnima na stres.

Kod biljaka izloženih visokom svjetlosnom zračenju intenzitet crvene boje bio je izraženiji kod Δ PEPE biljaka i TROL nul mutanti u odnosu na divlji tip. Razina antocijana i flavona raste pri visokim razinama osvjetljenja, te se smatra da ovi spojevi pomažu smanjenju količine svjetlosti koja dolazi do fotosintetskog aparata. UV zračenje inducira flavonoide kod vrste *A.thaliana* i tako štiti biljku od oštećenja UV zračenjem, te posljedično stanične smrti štiteći molekulu DNA od dimerizacije i kidanja (Dixon i Paiva, 1995; Chalker-Scott L, 1999).

Ultrastruktura kloropasta Δ PEPE i kontrolnih biljaka utvrđena je pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa uz povećanje od 8000 puta. Analizirane su biljke prije i nakon izlaganja svjetlu od $300 \mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Slika 53). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je kloroplast kod svih biljaka urednog oblika s naglašenim sadržajem škrobnih granula kod Δ PEPE biljaka i nul-mutanti, posebno nakon izlaganja biljaka svjetlosnom stresu. Kloroplast Δ PEPE biljaka također je sadržavao gušće složene tilakoidne membrane unutar kloroplasta. Povećane škrobne granule pokazatelj su stresa uzrokovanog svjetlosnim zračenjem, te gušće i sužene tilakoidne membrane uobičajeni su pokazatelj stresa izazvanog suviškom svjetlosti (Lichtenthaler i sur. 1981., Ballantine i Forde i 1970). Literaturni podaci potvrđuju postojanje negativne korelacije između nakupljanja škroba u listu i njegove fotosintetske aktivnosti. Neki autori čak smatraju da nakupljanje škroba u listu može fizički negativno utjecati na fotosintetsku aktivnost lista ometajući lamelarni raspored unutar stanice kloroplasta (Carmi i Shomer, 1979). Iako u ovom radu nije promatrana izravna korelacija između nakupljanja škroba i fotosintetske aktivnosti, dobiveni rezultati mjerenja fluorescencije klorofila *a* upućuju na moguću vezu između smanjene fotosintetske učinkovitosti i povećanih škrobnih granula kod biljaka izloženih svjetlosnom stresu.

ZAKLJUČCI

5 ZAKLJUČCI

- ✓ Delecijske mutante Δ PEPE imaju sposobnost čvrstog vezanja FNR-a na protein TROL i stvaranja kompleksa u odsustvu domene PEPE. U nedostatku prolinom bogate domene onemogućeno je pomicanje ITEP regije, te je tako otežano otpuštanje FNR-a što potvrđuje polaznu pretpostavku da domena PEPE omogućava FNR-u vezanom na domenu ITEP mobilnost.
- ✓ Odstupanja u karakterističnom obliku OJIP krivulje i pad intenziteta fluorescencije u koracima J-I-P kod biljaka bez domene PEPE nakon HL tretmana upućuju na mogućnost nastanka alternativnog $P680 \rightarrow \text{Pheo2} \rightarrow Q_B(Q_B^-)$ elektron transportnog lanca.
- ✓ Maksimalni kvantni prinos kod Δ PEPE mutanti nakon svjetlosnog stresa ukazuje na visoku razinu oštećenja fotosintetskog aparata, te smanjeni učinak PSII u odnosu na divlji tip.
- ✓ Pri svjetlosnom stresu Δ PEPE biljke i TROL nul-mutante imaju slabiju efikasnost iskorištavanja apsorbirane energije u odnosu na divlji tip. Pad vrijednosti PI_{ABS} i slabiji učinak fotosinteze kod mutanti ukazuje na oštećenje fotosintetskog aparata i ove biljke pokazuju najmanju toleranciju na stres.
- ✓ Svjetlosni stres uzrokovao je značajan porast parametra apsorpcije po aktivnom reakcijskom središtu kod Δ PEPE mutanti uslijed porasta veličine antena kod ovih biljaka. Porast efektivne veličine antena sugerira da je došlo do inaktivacije dijela reakcijskih središta (prelaskom Q_A u Q_B), pri čemu se jedan dio energije rasipa u obliku topline, a DI_0/RC raste. Kod Δ PEPE biljaka ovaj parametar se nakon HL utrostručio.
- ✓ Δ PEPE su biljke već pri primijenjenoj svjetlosti slabijeg intenziteta pokreću zaštitne mehanizme rasipanja suviška energije u obliku topline čime se smanjuje produkcija singletnog kisika i tako sprečava moguće fotooštećenje. Kod TROL nul mutanti je najvjerojatnije već pri primijenjenoj svjetlosti slabijeg intenziteta došlo do fotoinhibicije.

- ✓ Δ PEPE biljke kao i TROL nul-mutante nakon svjetlosnog stresa imaju smanjenu koncentraciju klorofila *a*. Smanjenje koncentracije pigmenata u izravnoj je vezi sa stresom i ukupnom fotosintetskom učinkovitosti.
- ✓ Δ PEPE biljke nakon izlaganja svjetlosnom stresu u odnosu na kontrole imaju slabiju sposobnost produkcije fotosintetskog kisika .
- ✓ Nakon kratkotrajnog izlaganja biljaka svjetlosnom stresu kod Δ PEPE biljaka uočeno je značajno povećanje sadržaja glutaciona u plastidima, peroksisomu i citosolu. Kod biljaka *A. thaliana* divljeg tipa nakupljanje glutaciona je zabilježeno u plastidima i citosolu, dok kod TROL KO nije zabilježeno značajnije nakupljanje ovog spoja. Ovakva unutarstanična raspodjela glutaciona upućuje na zaključak da su sva tri biljna sustava međusobno značajno različiti, te da je prisutno izvjesno unutarstrukturno oštećenje nastalo svjetlosnim stresom koje je najizraženije kod TROL KO biljaka.
- ✓ Kreirane mutantne linije bez domene PEPE, pri optimalnim uvjetima uzgoja kao i u uvjetima svjetlosnog stresa pokazuju znakove ubrzanog rasta i sazrijevanja biljaka. Biljke bez domene PEPE ranije cvjetaju, te imaju vidljivo veću ukupnu biomasu u odnosu na kontrole. U uvjetima kratkotrajnog svjetlosnog stresa fenotipske promjene ukazuju na povećanu produkciju antocijana.
- ✓ Elektronskom mikroskopijom utvrđeno je kod Δ PEPE biljaka nakupljanje škorba posebno nakon svjetlosnog predtretmana, te da su tilakoidne membrane unutar kloroplasta uže i gušće u odnosu na divlji tip, dok su kod TROL KO biljaka tilakoidne membrane posložene izrazito rijetko.

Rezultati mjerenja fotosintetskih parametara, OJIP parametara, koncentracije pigmenata, analize fenotipskih promjena, sadržaja glutaciona, te ultrastrukture kloroplasta nedvojbeno ukazuju na promjene u radu fotosintetskog aparata tijekom izlaganja biljaka svjetlosnom stresu. Posljedice stresa najmanje su izražene kod biljaka divljeg tipa. Δ PEPE mutante pokazuju značajno stanje stresa, no iz dobivenih rezultata nameće se zaključak da su biljke uspjele dijelom spriječiti fotooštećivanje kroz rasipanje suviška energije u obliku topline, kroz uspostavljanje alternativnih puteva za prijenos elektrona kroz membrane, kroz unutarstanične

raspodjele antioksidansa poput glutationa i dr. Takvi mehanizmi jednim dijelom smanjuju oksidativni stres kod kloroplasta, te omogućavaju preživljavanje biljci. S druge strane kod TROL nul mutanti zaštitni mehanizmi kod povećanog svjetlosnog zračenja bili su manje učinkoviti.

Djelovanjem svjetlosti visoke jakosti dolazi do otpuštanja FNR-a i do prijenosa elektrona na potencijalne elektron akceptore. Uklanjanjem fleksibilne domene PEPE otežano je pomicanje ITEP regije dalje od tilakoida, te tako onemogućeno nesmetano otpuštanje vezanog FNR-a. Dobiveni rezultati potvrđuju pretpostavku da domena PEPE omogućuje FNR-u vezanom na domenu ITEP mobilnost, te time izravno sudjeluje u dinamičkom vezivanju FNR-a.

LITERATURA

6 LITERATURA

- Adir N, Zer H, Shochat S, Ohad I (2003) Photoinhibition – a historical perspective. *Photosynth Res* 76: 343–370
- Allen JF (2003) Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *Trends Plant Sci* 8: 15–19
- Alves PL da CA, Magalhaes ACN, Barja PR (2002) The phenomenon of photoinhibition of photosynthesis and its importance in reforestation. *Bot Rev* 68(2): 193-208
- Andersen B, Scheller HV, Moller BL (1992) The PSI-E subunit of Photosystem-I binds ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase. *FEBS Lett.* 311: 169–173
- Ball LJ, Jarchau T, Oschkinat H, Walter U (2002) EVH1 domains: Structure, function and interactions. *FEBS Lett* 513: 45-52
- Ballantine JEM, Forde BJ (1970) The effect of light intensity and temperature on plant growth and chloroplast ultrastructure in soybean. *Am J Bot* 57: 1150-1159
- Ballesteros JA i Weinstein H. (1992) The role of Pro/Hyp-kinks in determining the transmembrane helix length and gating mechanism of a Leu-zervamicin channel. *Biophys J* 62: 110–111
- Balsera M, Soll J, Bölter B (2009) Protein import machineries in endosymbiotic organelles. *Cell Mol Life Sci* 66(11-12): 1903-1923
- Bechtold, N, Ellis, J, Pelletier, G (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci Paris Life Sci* 316: 1194-1199
- Ben-Shem A, Frolov F, Nelson N (2003) Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* 426: 630-635
- Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7(6): 1513-1523
- Bordo D, Bork P (2002) The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. *Sequencestructure-function relations. EMBO Rep* 3(8): 741-746

Boyer PD (1997) The ATP synthase – a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66: 717–49

Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Brandl CJ, Deber CM (1986) Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 917–921

Bright JN, Sansom MSP (2002) The Flexing/Twirling Helix: Exploring the Flexibility about Molecular Hinges Formed by Proline and Glycine Motifs in Transmembrane Helices. *J Phys Chem B* 107: 627-636

Bright JN, Shrivastava IH, Cordes FS, Sansom MSP (2002) Conformational dynamics of helix S6 from Shaker potassium channel: simulation studies. *Biopolymers* 64(6): 303-313

Carillo N, Ceccarelli EA (2003) Open questions in ferredoxin-NADP⁺ reductase catalytic mechanism. *Eur J Biochem* 270: 1900–1915

Carmi A, Shomer I (1979) Starch accumulation and photosynthetic activity in primary leaves of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Annal Bot* 44(4): 479-484

Carter GA, Knapp AK (2001) Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. *Am J Bot*, 88(4): 677-684

Cassan N, Lagoutte B, Setif P (2005) Ferredoxin-NADP⁺ reductase. Kinetics of electron transfer, transient intermediates, and catalytic activities studied by flash-absorption spectroscopy with isolated photosystem I and ferredoxin. *J Biol Chem* 280: 25960–25972

Cereda A, Carpen A, Picariello G, Iriti M, Faoro F, Ferranti P, Pagani S (2007) Effects of the deficiency of the rhodanese-like protein RhdA in *Azotobacter vinelandii*. *FEBS Lett* 581(8): 1625-1630

Chalker-Scott L (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem Photobiol* 70(1): 1-9

Cipollone R, Ascenzi P, Visca P (2007) Common Themes and Variations in the Rhodanese Superfamily. *Life* 59(2): 51 – 59

Clark RD, Hawkesford MJ, Coughlan SJ, Bennett J, Hind G (1984) Association of Ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase with the chloroplast Cytochrome B-F Complex. *FEBS Lett* 174(1): 137–142

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16(6): 735-743

Curtis MD,U (2003) A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in *Planta*. *Plant Physiol* 133: 462-469

Davies MJ (2004) Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem Photobiol Sci* 3: 17–25

Deber CM, Therien AG (2002) Putting the β -breaks on membrane protein misfolding. *Nature Struct Biol* 9(5): 318-319

Dekker JP, Boekema EJ (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta* 1706: 12-39

De la Riva GA, Gonzalez-Cabrera J, Vazquez-Padron R, Ayra-Pardo C (1998) *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electron J Biotechnol* 1(3): 18-33

Demetriou G, Neonaki C, Navakoudis E, Kotzabasis K (2007) Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus—the protective role of polyamines. *Biochim Biophys Acta* 1767(4): 272-280

Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7(7): 1085

Fayziyev YM (2010) Oxygenic Photosynthesis: An Introduction. *Proc ANAS (Biol Sc)* 65: 71-82

Foyer CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21–25

Fromme P, Jordan P, Krauß N (2001) Structure of photosystem I. *Biochim Biophys Acta* 1507: 5-31

- Fulgosi H, Vener AV, Altschmied L, Herrmann RG, Andersson B (1998) A novel multi-functional chloroplast protein: Identification of a 40 kDa immunophilin-like protein located in the thylakoid lumen. *EMBO J.* 17: 1577-1587
- Geigenberger P, Fernie AR, Gibon Y, Christ M, Stitt M (2000) Metabolic activity decreases as an adaptative response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biol Chem* 381: 723-740
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch* 48: 909-930
- Golan T, Li X-P, Müller-Moulé P, Niyogi KK (2004) Using mutants to understand light stress acclimation in plants. U: *Chlorophyll a Fluorescence: a Signature of Photosynthesis* 525-554. Vol 19: 525-554. Springer, Dordrecht, Nizozemska
- Golan T, Muller-Moule P, Niyogi KK (2006) Photoprotection mutants of *Arabidopsis thaliana* acclimate to high light by increasing photosynthesis and specific antioxidants. *Plant Cell Environment* 29(5): 879-887.
- Govindjee, Kern JF, Messinger J, Whitmarsh J (2010) Photosystem II. U: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net
- Harrison SJ, Mott EK, Parsley K, Aspinall S, Gray JC, Cottage A (2006) A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* 2: 19
- HartleyJL, Temple GF, Brasch, MA(2000) DNA cloning using in-vitro site-specific recombination. *Genome Res.* 10: 1788-1795
- Heldt HW (2005) The use of energy from sunlight by photosynthesis is the basis of life on earth. U: *Plant Biochemistry*, 3rd edition, Elsevier Inc., Burlington USA, 45-66
- Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S., Mullineaux, P. M. (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42: 819-832
- Hideg E, Schreiber U (2007) Parallel assessment of ROS formation and photosynthesis in leaves by fluorescence imaging. *Photosynth Res* 92: 103-108

Innic M, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (1990) PCR protocols – A Guide to Methods and Applications, San Diego, Academic Press

Islam R, Malo R, Tammi RS, Jahan S, Parvin L, Seraj ZI (2007) Modification of Recombination-based GATEWAY™ Binary Destination Vector with Novel Promoter for Agrobacterium-mediated Transformation of Rice. *Plant Tissue Cult Biotech* 17(1): 47-58

Jagtap V, Bhargava S, Streb P, Feierabend J. (1998) Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J Exp Bot* 49(327): 1715-1721

Jurić S (2010) The role of the gene product At4g01050 in the regulation of photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Jurić S, Hazler-Pilepić K, Tomašić A, Lepeduš H, Jeličić B, Puthyaveetli S, Bionda T, Vojta L, Allen JF, Schleiff E, Fulgosi H (2009) Tethering of ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase to thylakoid membranes is mediated by novel chloroplast protein TROL. *Plant J* 60(5): 783-794

Jurić S, Vojta L, Fulgosi H (2013) Electron transfer routes in oxygenic photosynthesis : regulatory mechanisms and new perspectives. Dubinsky Z (ur.) Rijeka: InTech: 23-46

Kalai T, Hideg E, Vass I, Hideg K (1998) Double (fluorescent and spin) sensors for detection of reactive oxygen species in the thylakoid membrane. *Free Rad Biol Med* 24: 649–652

Karimi M, Depicker A, Hilson P (2007) Recombinational Cloning with Plant Gateway Vectors. *Plant Physiol* 145: 1144–1154

Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002) GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7(5): 193-195

Kay BK, Williamson MP, Sudol M (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 14: 231–241

- Komari T, Takakura Y, Ueki J, Kato N, Ishida Y, Hiei Y (2006) Binary vectors and super-binary vectors. U K Wang, ed, *Methods in Molecular Biology*, Vol 343: *Agrobacterium Protocols*, Ed 2, Vol 1. Humana Press, Totowa, NJ, pp 15–41
- Komori T, Imayama T, Kato N, Ishida Y, Ueki J, Komari T (2007) Current Status of Binary Vectors and Superbinary Vectors. *Plant Physiol* 145: 1155–1160
- Kurusu G, Kusunoki M, Katoh E, Yamazaki T, Teshima K, Onda Y, Kimata-Arigo Y, Hase T (2001) Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase. *Nat Struct Biol* 8: 117-121
- Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lazár D (2006) Review: The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct Plant Biol* 33: 9-30
- Ledford HK, Niyogi KK (2005) Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant Cell Environ* 28: 1037–1045
- Lee L-Y, Gelvin SB (2008) T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiol* 146: 325-332
- Levitt M (1981) Effect of proline residues on protein folding. *J Mol Biol* 145(1): 251-263
- Lepeduš H, Tomašić A, Jurić S, Katanić Z, Cesar V, Fulgosi H (2009) Photochemistry of PSII in CYP38 *Arabidopsis thaliana* Mutant. *Food Technol and Biotechnol* 47(3): 275-280
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148: 350-382
- Lichtenthaler HK, Burkart S (1999) Photosynthesis and high light stress. *Bulg J Plant Physiol* 25(3-4): 3-16
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Döll M, Fietz HJ, Bach T, Kozel U, Rahmsdorf U (1981) Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynth Res* 2(2): 15

- Lichtenthaler HK, Kuhn G, Prenzel U, Buschmann C, Meier D (1982) Adaptation of Chloroplast-Ultrastructure and of Chlorophyll-Protein Levels to High-Light and Low-Light Growth Conditions. *Z Naturforsch* 37 c: 464-475
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated in Arabidopsis. *Plant Physiol* 137: 921-930
- Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002) GATEWAY™vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7(5): 193-195
- Ke B (2001) The primary electron donor of photosystem I - p700. In: Govindjee (Series ed) *Photosynthesis: Photobiochemistry and Photobiophysics. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Kluwer Academic Publishers 463-477
- MacArthur MW i Thornton JM (1991) Influence of proline residues on protein conformation. *J Mol Biol* 218: 397-412
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989). *Molecular Cloning – a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Marrs KA (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 127-158
- Martinez GR, Loureiro AP, Marques SA (2003) Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutat Res* 544: 115-127
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* 282: 662-682
- Meister A (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263 (17): 205-208
- Meyer Y, Buchanan BB, Vignols F, Reichheld JP (2009) Thioredoxins and Glutaredoxins: Unifying Elements in Redox Biology. *Annu Rev Genet* 43: 335-367
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7(9): 405 - 410
- Müller P, Li X-P, Niyogi KK (2001) Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology* 125: 1558-1566

- Mulo P (2011) Chloroplast-targeted ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase (FNR): Structure, function and location. *Biochim. Biophys. Acta* 1807: 927-934
- Nelson N, Ben-Shem A (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 971-982
- Nelson N, Ben-Shem A (2005) The structure of photosystem I and evolution of photosynthesis. *BioEssays* 27: 914-922
- Nelson N, Yocum CF (2006) Structure and Function of Photosystems I and II. *Annu. Rev Plant Biol* 57: 521-65
- Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer CH (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Bot* 49(321): 623-647
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249-279
- Nussbaum S, Geissmann M, Eggenberg P, Strasser RJ, Fuhrer J (2001) Ozone sensitivity in herbaceous species as assessed by direct and modulated chlorophyll fluorescence techniques. *J Plant Physiol* 158(6): 757-766
- Palatnik JF, Tognetti VB, Poli HO, Rodríguez RE, Blanco N, Gattuso M, Hajirezaei M R, Sonnewald U, Valle EM, Carrillo N (2003) Transgenic tobacco plants expressing antisense ferredoxin-NADP(H) reductase transcripts display increased susceptibility to photo-oxidative damage. *Plant J* 35: 332-341
- Pantoja-Uceda D, Lopez-Mendez B, Koshiba S, Inoue M, Kigawa T, Terada T, Shirouzu M, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S, Güntert P (2005) Solution structure of the rodanase homology domain At4g01050(175-295) from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Sci* 14(1): 224-230
- Perálvarez-Marín A, Lórenz-Fonfría VA, Simón-Vázquez R, Gomariz M, Meseguer I, Querol E, Padrós E (2008) Influence of Proline on the Thermostability of the Active Site and Membrane Arrangement of Transmembrane Proteins. *Biophys J* 5: 4384-4395
- Prebeg T (2007) Elektronska mikroskopija. U: Ambrović Ristov A (ur.) Metode u Molekularnoj biologiji, str. 752-756. Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Sansom MS, Weinstein H (2000) Hinges, swivels and switches: the role of prolines in signalling via transmembrane alpha-helices. *Trends Pharmacol Sci* 21: 445-451

Schägger H, Cramer WA, von Jagow G (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* 217(2): 220-230

Schägger H, von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199(2): 223-231

Schreiber U (2004) Pulse-Amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method. U: Papageorgiou G, Govindjee. *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Nizozemska pp 279-319

Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* 10: 51-62

Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1994) Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *In vivo* photosynthesis. *Ecological Studies* 100: 49-70

Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, Clarke JD, Cotton D, Bullis D, Snell J, Miguel T, Hutchison D, Kimmerly B, Mitzel T, Katagiri F, Glazebrook J, Law M, Goffa SA (2002) A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *The Plant Cell*, 14: 2985-2994

Senes A, Engel DE, DeGrado WF (2004) Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol* 14: 465-479

Simpson GG, Dean C (2002) Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time?. *Science* 296(5566): 285-289

Sorkel K, Von Weihe M, Al-Khatib K (2007) Photochemical efficiency and recovery of photosystem II in grapes after exposure to sudden and gradual heat stress. *J Am Soc Hortic Sci* 132(6): 764-769

Steinmetz MA, Fischer U (1985) Thiosulfate sulfur transferases (Rhodanases) of *Chlorobium vibrioforme* f. *thiosulfatophilum*. *Arch Microbiol* 142(3): 253-258

Stirbet A, Govindjee, Strasser BJ, Strasser RJ (1998) Chlorophyll *a* fluorescence induction in higher plants: Modeling and numerical simulation. *J Theor Biol* 193: 131-151

Strasser RJ, Srivastava A, Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem Photobiol* 61: 32-42

Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2000) The fluorescent transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. U: Yunus M, Pathre U, Mohanty P (ur.) *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Taylor and Francis, London 25: 445-483

Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2004) Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. U: G. Papageorgiou and Govindjee, Editors, *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration*, Kluwer Academic Publishers, Nizozemska 19: 321-362

Strasser RJ, Stirbet AD (1988) Heterogeneity of photosystem II probed by the numerically simulated chlorophyll *a* fluorescence rise (O-J-I-P). *Math Comp Simulat* 48: 3-9

Suzuki Y, Kagawa N, Fujino T, Sumiya T, Andoh T, Ishikawa K, Kimura R, Kemmochi K, Ohta T, Tanaka S (2005) A novel high-throughput (HTP) cloning strategy for site-directed designed chimeragenesis and mutation using the Gateway cloning system. *Nucleic Acids Res* 33(12): e109

Tausz M, Šircelj H, Grill D (2004) The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *J Exp Bot* 404(55): 1955-1962

Vermas WFJ (2002) *Evolution of Photosynthesis*. U: *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London.

Vojta L, Carić D, Cesar V, Antunović Dunić J, Lepeduš H, Kveder M, Fulgosi H (2015) TROL-FNR interaction reveals alternative pathways of electron partitioning in photosynthesis. *Sci Rep* 5: 10085

- Vojta L, Fulgosi H (2012) Energy conductance from thylakoid complexes to stromal reducing equivalents. Najafpour, Mahdi M (ur.) *Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects*. Rijeka, In Tech: 175-190
- Vojta L, Horvat L, Fulgosi H (2012) Balancing chloroplast redox status – regulation of FNR binding and release. *Period Biol* 114(1): 25-31
- Vujaklija D (2007) Western analiza. U: Ambriović Ristov A (ur.) *Metode u Molekularnoj biologiji*, str. 583-594. Institut Ruđer Bošković, Zagreb
- Wigley WC, Corboy MJ, Cutler TD, Thibodeau PH, Oldan J, Lee MG, Rozp J, Hunt JF, Thomas PJ (2002) A protein sequence that can encode native structure by disfavoring alternate conformations. *Nature Struct Biol* 9(5): 381-388
- Williamson M P (1994) The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J* 297: 249–260
- Yamashita E, Zhang H, Cramer WA (2007) Structure of the cytochrome *b₆f* complex: quinone analogue inhibitors as ligands of heme *c_n*. *J. Mol. Biol.* 370: 39–52
- Yoshida M, Muneyuki E, Hisabori T (2001) ATP synthase – a marvellous rotary engine of the cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 669-677
- Zabalza A, Van Dongen JT, Froehlich A, Oliver SN, Faix B, Gupta KJ, Schmalzlin E, Igal M, Orcaray L, Royuela M, Geigenberger P (2009) Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. *Plant Physiol* 149(2): 1087-1098
- Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, Lim WA (2003) The structure and function of proline recognition domains. *Sci. STKE* 179: re8
- Zechmann B, Mauch F, Sticher L, Müller M (2008) Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *J Exp Bot* 59(14): 4017-4027
- Zechmann B, Müller M, Zelling G (2006) Intracellular adaptations of glutathione content in *Cucurbita pepo* L. induced by treatment with reduced glutathione and buthionine sulfoximine. *Protop* 227: 197-209
- Zhang H, Whitelegge JP, Cramer WA (2001) Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome *b₆f* complex. *J Biol Chem* 276: 38159–38165

Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* in to plants: a feast of fundamental insights. *Plant J* 23(1): 11-28

Zupan JR, Zambryski P (1995) Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant Cell. *Plant Physiol* 1007: 1041-1047

Živčák M, Brestič M, Olšovská K, Slamka P (2008) Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant Soil Environ* 54(4): 133-139

https://online.science.psu.edu/biol011_active002/node/4190. 14.07.2014.

SAŽETAK

7 SAŽETAK

Protein TROL integralni je protein tilakoidnih membrana i sudjeluje u katalizi fundamentalnog procesa prijetvorbe energije. Zadužen je za vezivanje flavoenzima feredoksin:NADP⁺ oksidoreduktaze (FNR), enzima koji katalizira prijenos elektrona na molekulu NADP⁺. TROL je svojim većim dijelom smješten na stroma tilakoidama. Svojim C-terminalnim dijelom okrenut je prema stromi i tu je smještna hidrofobna domena ITEP koja izravno sudjeluje u vezivanju FNR-a, a središnji dio proteina čini rodanazama slična domena RHO smještena u lumenu tilakoida. Neposredno ispred domene ITEP smještena je regija bogata prolinom za koju se pretpostavlja da čini fleksibilni dio proteina TROL s ulogom u dinamici vezivanja FNR-a na domenu ITEP. Domena sadrži ponavljajući slijed Pro-Val-Pro te je nazvana domena PEPE. Prolin ima stuktturnu ulogu kod transmembranskih uzvojnica, a prolinski ostatak narušava alfa-uzvojnice uslijed gubitka najmanje jednog vodikovog mosta, te dovodi do fleksibilnosti same uzvojnice, odnosno do izvijanja i okretanja. Funkcionalno takvi molekularni zglobovi imaju ulogu otvaranja i zatvaranja putova za protok iona i pretpostavka je da i PEPE domena predstavlja takav molekularni zglob uključen u regulaciju toka elektrona u procesu vezivanja FNR na TROL.

Za funkcijsku analizu ove prolinom bogate domene korištena je metoda obrnute genetike. Kako bi se istražila uloga domene PEPE *in vivo* dizajnirana je mutanta kojoj je uklonjena domena PEPE. Na dobivenim mutantama Western blot analizom potvrđeno je da mutirane biljke i dalje proizvode protein TROL, dok je nativnom elektroforezom potvrđeno da dolazi do čvrstog vezivanja FNR-a na TROL u odsustvu domene PEPE.

Protein TROL zadužen je za vezivanje FNR-a. Ova reakcija poveznica je između svjetlosnih reakcija i biokemijskog metabolizma kloroplasta. FNR održava dinamiku sustava i redoks stanje. Dođe li do narušavanja redoks stanja sustava aktiviraju se alternativni putevi prijenosa elektrona. Literatura kao alternative puteve predlaže tzv. Mehlerovu reakciju, pseudo-ciklički tok elektrona, a novija istraživanja predlažu model kod kojega se u odsustvu TROL-a linearni tok elektrona uspostavlja dinamičkim vezivanjem i otpuštanjem FNR-a i prije nego se pseudo-ciklički tok aktivira. Pretpostavlja se da je FNR vezivanje za membranski regrutni motiv TROL-a i Tic62 posredovano promjenom pH vrijednosti i da je regulirano promjenom količine svjetla, te da je vezivanje preko TROL-a i drugih proteinskih sidrišta

dinamičko. Takvo alternativno vezivanje i otpuštanje FNR-a ili njegovih asocijacija s različitim kompleksima ili donorima/akceptorima elektrona moglo bi biti povezano s regulacijom i prioritizacijom drugih puteva prijenosa elektrona. Uklanjanjem domene PEPE nastojalo se dovesti do promjena u linearnom toku elektrona što će se u konačnici odraziti i na samu funkcionalnost fotosintetskog aparata.

Kao abiotski stresni čimbenik korištena je svjetlost vrlo viskog intenziteta, što dodatno negativno utječe na učinak fotosinteze. Primarna oštećenja se događaju unutar reakcijskih središta PSII, no biljke su evolucijski razvile mehanizme oporavka kojima mogu minimizirati potencijalna oštećenja sustava. Biljke kojima je stabilnost sustava već značajno narušena uklanjanjem funkcionalne domene, u uvjetima svjetlosnog stresa imaju smanjenu sposobnost opiranja štetnim utjecajima svjetlosti. Mjerenjem fluorescencije klorofila dobiven je uvid u stanje fotosintetskog aparata utvrđivanjem parametra funkcionalnosti fotosinteze u mutantama bez domene PEPE.

Dobiveni rezultati mjerenja nedvojbeno ukazuju na promjene u radu fotosintetskog aparata tijekom izlaganja biljaka svjetlosnom stresu. Δ PEPE mutante pokazuju značajno stanje stresa, a rezultati ukazuju da su biljke uspjele dijelom spriječiti fotooštećivanje kroz rasipanje suviška energije u obliku topline, kroz uspostavljanje alternativnih puteva za prijenos elektrona duž membrane, kroz unutarstanične raspodjele antioksidansa poput glutationa i dr.

SUMMARY

8 SUMMARY

Protein TROL is an integral thylakoid membrane protein and participates in catalysis of fundamental processes of energy transformation. It is responsible for binding flavoenzyme ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase (FNR), the enzyme that catalyses the transfer of electrons to the NADP⁺ molecule. TROL is mainly located in the stroma thylakoids. With its C-terminal domain faces the stroma where the hydrophobic domain ITEP is located which is directly involved in the binding of FNR. The central part of the protein contains rhodanese-like domain named RHO located in lumen. Upstream of the domain ITEP a proline rich region is located that is supposed to introduces flexibility in the TROL with the direct role in the dynamics of FNR-binding to the ITEP domain. The domain contains a repeating sequence Pro-Val-Pro and was named domain PEPE. Proline has a structural role in transmembrane helices and its residue disrupts alpha-helix due to the loss of at least one hydrogen bond, which leads to flexibility in the helix allowing the twisting and kinking. Functionally these molecular hinges act as the switches for the ion flow and the assumption is that the PEPE domain represents such a molecular hinge involved in the regulation of the electron flow in the processes of binding the FNR to TROL.

For the functional analysis of these proline-rich domain the reverse genetics where used. To characterize the role of PEPE domain in vivo a deletion mutant was designed. A protein expression was confirmed using a Western blot analysis, while the blue native electrophoresis showed that there is a TROL-containing complex with FNR in the absence of a domain PEPE.

TROL protein is responsible for binding of FNR. This reaction is the link between the light reactions and the biochemical metabolism of chloroplasts. FNR maintain the system dynamic and redox state. If there is a disruption of the redox state the system activates alternative pathways of electron transfer. Literature proposes as an alternative pathway the Mehler reaction, pseudo-cyclic electron transfer, and recent studies suggest a model in which in the absence of TROL a linear electron flow is established by dynamic binding and releasing of the FNR before the pseudo-cyclic flow is activated. It is assumed that the FNR binding to membrane recruitment motif of TROL and Tic62 is mediated by changing the pH and that is regulated by changing the light quantity, and that binding of FNR to TROL and

other protein anchors is dynamic. Such alternative binding and release of FNR or its association with different complexes or donor / acceptor molecules may be associated to the regulation and prioritization of other pathways of electron transfer. By removing the domain PEPE from TROL it was expected to lead to changes in the linear electron flow which will eventually equip the functionality of the photosynthetic apparatus.

As abiotic stress factor high light was used, which further adversely affects the performance of photosynthesis. The primary damage occurring within PSII reaction centres, but the plants are evolutionarily developed mechanisms of recovery that can minimize potential damage to the system. Plants which the stability of the system has been already compromised by removing the functional PEPE domain, in conditions of light stress have a reduced ability of resisting the harmful effects of high light. By measuring the chlorophyll fluorescence it was given an overview of the state of the photosynthetic apparatus determining the parameters of photosynthesis functionality in mutants lacking the PEPE domain.

The results of measurements strongly indicate changes in the performance of the photosynthetic apparatus during exposure of plants to light stress. Δ PEPE mutants show a significant state of stress, and the results indicate that the plants have managed to partly prevent the photodamage by dissipation excess energy in the form of heat, through the activating of alternative pathways for the electron transport along the membrane, through the intracellular distribution of antioxidants such as glutathione and others.

ŽIVOTOPIS

9 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 14. studenog 1976. godine u Osijeku. Završila sam Osnovnu školu Josipovac, te srednju Medicinsku školu u Osijeku, smjer farmaceutski tehničar. Studij prehrambene tehnologije i procesnog inženjerstva upisala sam 1997. godine na Prehrambeno tehnološkom fakultetu u Osijeku koji sam završila 2003. godine i stekla zvanje diplomiranog inženjera prehrambene tehnologije i procesnog inženjerstva, smjer prehrambeno inženjerstvo.

Za vrijeme studija volontirala sam u Ljekarne Osijek, te po završetku volonterskog staža položila stručni ispit. Po završetku studija zaposlila sam se kao prodajni predstavnik u Srijem d.o.o. gdje sam provela tri godine. Od kolovoza 2007. godine zaposlena sam u Laboratoriju za ispitivanje sjemena, Zavoda za sjemenarstvo i rasadničarstvo na poslovima analitičara, a od prosinca 2010. godine voditelj sam Odsjeka za biotehnoške analize.

U periodu od 2009. do 2013. godine bila sam član Odbora za ograničenu uporabu genetski modificiranih organizama. Od 2013. godine član sam Vijeća za genetski modificirane organizme, te sam iste godine imenovana kao član radne skupine za soju pri Europskom uredu za koegzistenciju, te žarišnom točkom za FAO GM Food platformu. Od 2015. godine imenovana sam članom radne skupine za krumpir pri Europskom uredu za koegzistenciju.

Dodatne edukacije i sudjelovanja na kongresima:

- 2015. Ispra, Italija, „1st Workshop on Species Identification“
- 2014. Skopje FNR Macedonia, „International Workshop on Harmonisation of GMO Detection and Analysis „
- 2013. Zagreb, “Workshop on transboundary movement of GMO”
- 2012. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Osijek “Kako interpretirati rezultate umjeravanja i kako ih najbolje iskoristiti”
- 2012. ILVO Merelbeke, Belgija “Study visit on sampling of GMO”
- 2012. Zagreb, “Primjena norme HRN EN ISO/IEC 17025”
- 2012. Rovinj, Split, Vukovar “Workshop on official control of GMO in Food”

- 2012. Zagreb “Workshop on Introduction to National Monitoring and Evaluation System for Contained use of GMO”
- 2012. Shanghai, Kina, Jiao Tong University “Biotechnology Trait Detection Workshop”
- 2010. Nagoya, Japan The Cartagena Protocol “COP/MOP 5”
- 2010. Zagreb „Enlargement/Networking Workshop on Harmonisation of GMO Analysis“
- 2010. Barcelona-Madrid, Španjolska „Study visit on sampling of GMOs“
- 2010. Zagreb „Post-release and post-market monitoring of GMOs“
- 2010. Gebze Kocaeli, Turska „Training Course on GMO Detection Methods“
- 2009. Zagreb „Handling applications for release of GMOs into the environment and placing GMOs on the market“
- 2009. Beč, Austrija AGES „GMO organisation of control system, sampling, detection and placing on the market“
- 2009. Zagreb „Workshop on Novel Food and GMO's“
- 2009. Pariz, Francuska, „International Conference on Co-Existence and Traceability“
- 2009. Osijek „Biotechnology Trait Detection Workshop“
- 2009. Istanbul, Turska „International Workshop on Harmonisation of GMO Detection and Analysis“
- 2009. „Regional Workshop on Risk Assessment of GMO's“
- 2008. Berlin, Njemačka „TRACE project dissemination workshop /Molecular Biology Methods for Traceability Purposes“
- 2008. Zagreb “UNEP-GEF Projekt za izgradnju kapaciteta za učinkovito sudjelovanje u Mehanizmu za razmjenu obavijesti o biološkoj sigurnosti”
- 2008. Osijek „Biosafety Workshop“
- 2008. Ljubljana, Slovenija, Kmetijski inštitut „Advanced Methods and Technologies used for Detection and Quantification of GM in Seed, Food and Feed“
- 2008. Como, Italija „1st Global Conference on GMO Analysis“
- 2007. Chisinau, Moldavija „Central and Eastern Europe Regional Workshop on Capacity building and exchange of experiences on Risk assessment and Risk management of LMO's“

Znanstveni radovi:

1. **Hanzer, Renata**; Zoretić Rubes, Valentina (2012): Program praćenja prisutnosti genetski modificiranih organizama na tržištu Republike Hrvatske (2007.-2011.). 5. Međunarodni znanstveno-stručni skup: Poljoprivreda u zaštiti prirode i okoliša, Vukovar 2012, Zbornik radova skupa, 151-156.
2. **Hanzer, Renata**; Ocvirk, Dijana; Špoljarić Marković, Sanja; Fulgosi, Hrvoje. Monitoring of GM Soybean in High Categories of Seed on the Croatian Seed Market. // *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 77 (2012), 3; 127-130 (članak, znanstveni).
3. Ocvirk, Dijana; **Hanzer, Renata**; Špoljarić Marković, Sanja; Teklić, Tihana. Effects of genotype, seed age and KNO₃ on germination of radicchio (*Cichorium intybus* L.) and endive (*Cichorium endivia* L.) seed. // *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 77 (2012), 4; 185-190 (članak, znanstveni).
4. Ocvirk, Dijana; Špoljarević, Marija; Špoljarić Marković, Sanja; Lisjak, Miroslav; **Hanzer, Renata**; Teklić, Tihana. Seed germinability after imbibition in electrical conductivity test and relations among maize seed vigour parameters. // *Journal of food agriculture & environment*. 12 (2014), 1; 140-145 (članak, znanstveni)

Sažeci u zbornicima skupova:

1. **Hanzer, R.**; Ocvirk, D.; Špoljarić Marković, S.; Fulgosi, H. (2012): Monitoring GM-soje u sjemenu visokih kategorija; Monitoring of GM soybean in high categories of seed. Zbornik sažetaka 47. hrvatskog i 7. međunarodnog simpozija agronoma, Milan Pospisil (ur.). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb, Hrvatska, 55-56 (usmeno izlaganje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
2. Špoljarić Marković, S.; Mijić, Z.; Ocvirk, D.; **Hanzer, R.** (2012): Rezultati naknadne kontrole deklariranog sjemena poljoprivrednog bilja u razdoblju 2005.-2010.; The results of post-control of certified agricultural seed in the period 2005-2010. Zbornik sažetaka 47. hrvatskog i 7. međunarodnog simpozija agronoma, Milan Pospisil (ur.). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb, Hrvatska, 79-80 (usmeno izlaganje, domaća recenzija, sažetak).

3. Špoljarić Marković, S.; **Hanzer, R.** (2011): Seed testing laboratory. Zbornik sažetaka 4. Međunarodne konferencije: Kompetentnost laboratorija, Margeta, Karmen; Grgec Bermanac, Lovorka (ur.). Cavtat - Dubrovnik, 2011. 65-66 (poster, domaća recenzija, sažetak).
4. Špoljarić Marković, S.; Ocvirk, D.; **Hanzer, R.** (2012): Rezultati naknadne kontrole deklariranog sjemena poljoprivrednog bilja i inspekcijskog nadzora kvalitete sjemena u razdoblju 2007.-2011. godine; The results of post-control of certified agricultural seed and inspection control of seed quality from 2007-2011. Zbornik sažetaka 5. Međunarodni znanstveno stručni skup: Hrvatsko oplemenjivanje bilja, sjemenarstvo i rasadničarstvo i europske integracije, Josip Haramija (ur.). Šibenik, Hrvatska, 25-26 (usmeno izlaganje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
5. Hrvoje Fulgosi, Lea Vojta, Snježana Jurić, Ana Tomašić Paić, Lucija Horvat, **Renata Hanzer**, Jasminka Antunović, Vera Cesar, Bernd Zechmann, Hrvoje Lepeduš (2013): New alleys in regulation of photosynthetic energy conversion. 1st International Conference on Plant Biology, 20th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society (usmeno izlaganje, sažetak).