Doprinos epigenetičkih promjena adaptibilnosti poljoprivrednih kultura na sušu te pregled metoda kojima se utvrđuju

Kuhar, Bernard

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:977660

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

DOPRINOS EPIGENETIČKIH PROMJENA ADAPTABILNOSTI POLJOPRIVREDNIH KULTURA NA SUŠU TE PREGLED METODA KOJIMA SE UTVRĐUJU

DIPLOMSKI RAD

Bernard Kuhar

Zagreb, rujan, 2020.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Biljne znanosti

DOPRINOS EPIGENETIČKIH PROMJENA ADAPTABILNOSTI POLJOPRIVREDNIH KULTURA NA SUŠU TE PREGLED METODA KOJIMA SE UTVRĐUJU

DIPLOMSKI RAD

Bernard Kuhar

Mentor:

doc. dr. sc. Ivanka Habuš Jerčić

Zagreb, rujan, 2020.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Bernard Kuhar**, JMBAG 0178105795, rođen/a 11.10.1996. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

DOPRINOS EPIGENETIČKIH PROMJENA ADAPTABILNOSTI POLJOPRIVREDNIH KULTURA NA SUŠU TE PREGLED METODA KOJIMA SE UTVRĐUJU

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

_____
Potpis studenta / studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Bernard Kuhar**, JMBAG 0178105795, naslova

DOPRINOS EPIGENETIČKIH PROMJENA ADAPTABILNOSTI POLJOPRIVREDNIH KULTURA NA SUŠU TE PREGLED METODA KOJIMA SE UTVRĐUJU

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	doc. dr. sc. Ivanka Habuš Jerčić	mentor	_____
2.	prof. dr. sc. Snježana Kereša	član	_____
3.	prof. dr. sc. Milan Poljak	član	_____

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Cilj rada 2

2. Epigenetske modifikacije DNA 3

2.1. Metilacija DNA 4

2.1.1. DNA metilacija vođena s RNA 6
2.1.2. Demetilacija 7

2.2. Modifikacije histona 8

2.2.1. Acetilacija/deacetilacija histona 9
2.2.2. Metilacija histona 10
2.2.3. Histonski čaperoni 11
2.2.4. Kromatinsko remodeliranje ovisno o ATP-u 11

2.3. Represijski polikomb-kompleks 12

2.4. MikroRNA 13

2.5. Transpozoni 15

3. Tehnike za otkrivanje epigenetskih promjena kod biljaka 17

3.1. Histonske modifikacije 17

3.2. Profiliranje metilacije DNA kod biljaka 19

3.2.1. Digestija restrikcijskim enzimima 20
3.2.2. Analiza metilacije bazirana na afinitetu 23
3.2.3. Bisulfitne modifikacije 25

3.3. Detekcija miRNA 27

3.3.1. Northern blotting 27
3.3.2. Real-time qPCR 29
3.3.3. Tehnologija mikro zraka 31
3.3.4. Detekcija miRNA bazirana na nano česticama 32

3.3.5. Rolling circle amplification (RCA) 33
3.3.6. Izotermna eksponencijalna amplifikacija 34
3.3.7. Amplifikacija bez enzima 36
3.3.8. Kombinacija amplifikacijskih metoda 37

3.4. Određivenje polimorfizama kod transpondirajućih elemenata 38

4. Epigenetske promjene nastale pod utjecajem stresa suše 41

4.1. Obična pšenica (*Triticum aestivum*) 41

4.2. Citrusi (*Citrus spp.*) 44

4.3. Rajčica (*Solanum lycopersicum*) 46

4.4. Riža (*Oryza sativa*) 47

4.5. Kukuruz (*Zea mays*) 50

5. Zaključak 52

6. Popis literature 53

Životopis 59

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Bernard Kuhar**, naslova

DOPRINOS EPIGENETIČKIH PROMJENA ADAPTABILNOSTI POLJOPRIVREDNIH KULTURA NA SUŠU TE PREGLED METODA KOJIMA SE UTVRĐUJU

Epigenetska regulacija ima ključnu ulogu u mehanizmima biljnog odgovora na okolišne uvjete, bez promjene DNA sekvence. Različiti stresovi djeluju kao poticaj i mijenjaju razinu genske ekspresije pomoću metilacije DNA, modifikacije histona, djelovanja mikro RNA, aktivnosti transpozona i represijskog polikomb-kompleksa. Proučavanjem epigenetskih promjena povećavamo razumijevanje prilagodbe biljaka na stresne uvjete i mehanizam na kojem se ona temelji. Kod različitih poljoprivrednih kultura utvrđene su epigenetičke promjene u genomu koje su omogućile adaptabilnost kultura na stres suše. S obzirom na štetne učinke globalnih klimatskih promjena, osobito suše, korištenje epigenetskih razlika za razvoj adaptabilnijih sorti usjeva od velike je važnosti u oplemenjivanju bilja.

Ključne riječi: epigenetičke promjene, suša, adaptabilnost

Summary

Of the master's thesis – student **Bernard Kuhar,** entitled

THE CONTRIBUTION OF EPIGENETIC CHANGES TO THE ADAPTABILITY OF AGRICULTURAL CROPS TO DROUGHT AND A REVIEW OF METHODS THAT DETERMINE THEM

Epigenetic regulation plays a key role in the mechanisms of plant response to environmental conditions, without altering the DNA sequence. Different stresses stimulate a change in the gene expression through DNA methylation, histone modification, microRNA, transposon and repressive polycomb complex activity. We increase our understanding of plant adaptation to stressful conditions and the mechanism on which it is based by studying epigenetic changes. Epigenetic changes in the genome have been identified in different agricultural crops, which have enabled the adaptability of crops to drought stress. Given the detrimental effects of global climate change, particularly drought, the use of epigenetic differences to develop more adaptable crop varieties is of great importance in plant breeding.

Keywords: epigenetic modifications, drought, adaptability

1. Uvod

Ograničena opskrba vodom može ozbiljno ograničiti rast, razvoj i proizvodnju biljaka. Klimatske promjene vode do globalnog zatopljenja te sve češćih i ekstremnijih suša u mnogim važnim poljoprivrednim regijama svijeta. Pokazalo se da sukcesivni događaji suše pokreću trajne promjene u reakcijama biljaka u smislu da prethodni stresni događaji mogu pripremiti biljku za prevladavanje sljedećih nepovoljnih uvjeta, stvarajući neku vrstu biljne memorije na ove poremećaje. Ovo se „pamćenje“ stresa može razviti u različitim životnim fazama, a povezano je s promjenama u fiziološkim i molekularnim procesima biljaka (Neves i sur., 2017).

Prema brojnim istraživanjima epigenetska regulacija ima ključnu ulogu u mehanizmima biljnog odgovora na okolišne uvjete, bez promjene DNA sekvence (Gonzales i sur., 2013; Jiang i sur., 2019; Neves i sur., 2017; Shi i sur., 2018). Modifikacije DNA usprkos tome što ne mijenjaju slijed nukleotida u molekuli DNA mogu utjecati na aktivnost gena. Kemijski spojevi koji se vežu za pojedine gene mogu regulirati njihovo djelovanje, a modifikacije koje time nastaju poznate su kao epigenetske promjene (Chinnusamy i Zhu, 2009). Epigenom obuhvaća sve kemijske spojeve koji su dodani u cijelost nečije DNA (genoma) kao način regulacije aktivnosti (ekspresije) svih gena unutar genoma. Kemijski spojevi epigenoma nisu dio sekvence DNA, ali su na DNA ili su vezani za nju. Epigenetske promjene ostaju kako se stanice dijele i u nekim se slučajevima mogu nasljeđivati kroz generacije. One nam mogu pomoći pri utvrđivanju jesu li geni uključeni ili isključeni i mogu utjecati na sintezu proteina u određenim stanicama, osiguravajući da se proizvode samo potrebni proteini.

Različiti stresovi djeluju kao poticaj i mijenjaju razinu genske ekspresije pomoću metilacije DNA, modifikacije histona i djelovanja mikro RNA. „Sjećanje“ biljaka na stres može se zadržati samo kratko, budući da „pamćenje“ ovisi o životnom vijeku (*half-life*) proteina, RNA i metabolita izazvanih stresom, dok memorija može trajati dulje ukoliko uključuje reprogramiranje u fenologiji i morfologiji biljaka (Chinnusamy i Zhu, 2009). Epigenetski procesi, odnosno stabilna ili nasljedna metilacija DNA i modifikacije histona, također mogu biti izvor zadržavanja „pamćenja“ stresa dulje vrijeme (Chinnusamy i Zhu, 2009). Proučavanjem epigenetskih promjena povećavamo razumijevanje prilagodbe biljaka na stresne uvjete i mehanizam na kojem se ona temelji. Reprogramiranje diferencijacije stanica kao odgovor na stres iz okoline dovodi do fenološke i razvojne plastičnosti, što su važni mehanizmi otpornosti na stres. Fenotipska plastičnost pomaže pri prilagodbi trajanjem različitih fenoloških faza kod biljaka, a time omogućava biljkama da izbjegnu izloženost kritičnim fazama rasta, a posebno reproduktivnom razvoju, stresnim uvjetima. Nadalje, prilagodba rasta i razvoja presudna je za učinkovito korištenje resursa pod stresom (Zhu, 2008).

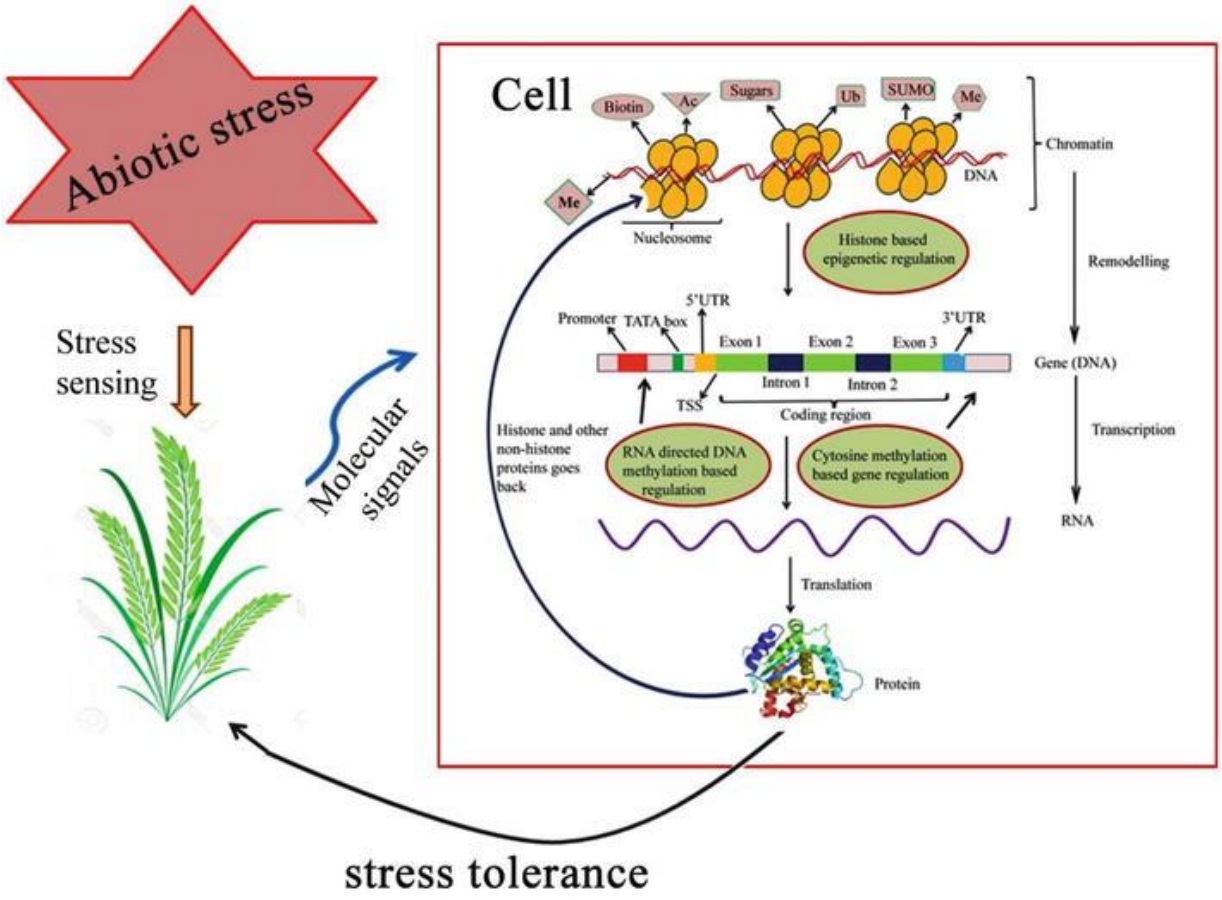
S obzirom na štetne učinke globalnih klimatskih promjena, osobito suše, korištenje epigenetskih razlika za razvoj adaptabilnijih sorti usjeva od velike je važnosti za stabilnost prinosa.

1.1. Cilj rada

Cilj rada je dati pregled dosadašnjih istraživanja epigenetskih promjena, tj. mehanizama koje su biljke razvile kao odgovor na stres suše kod značajnih poljoprivrednih kultura, kao i pregled morfoloških, fizioloških i molekularnih metoda kojima se utvrđuje epigenetska varijabilnost.

2. Epigenetske modifikacije DNA

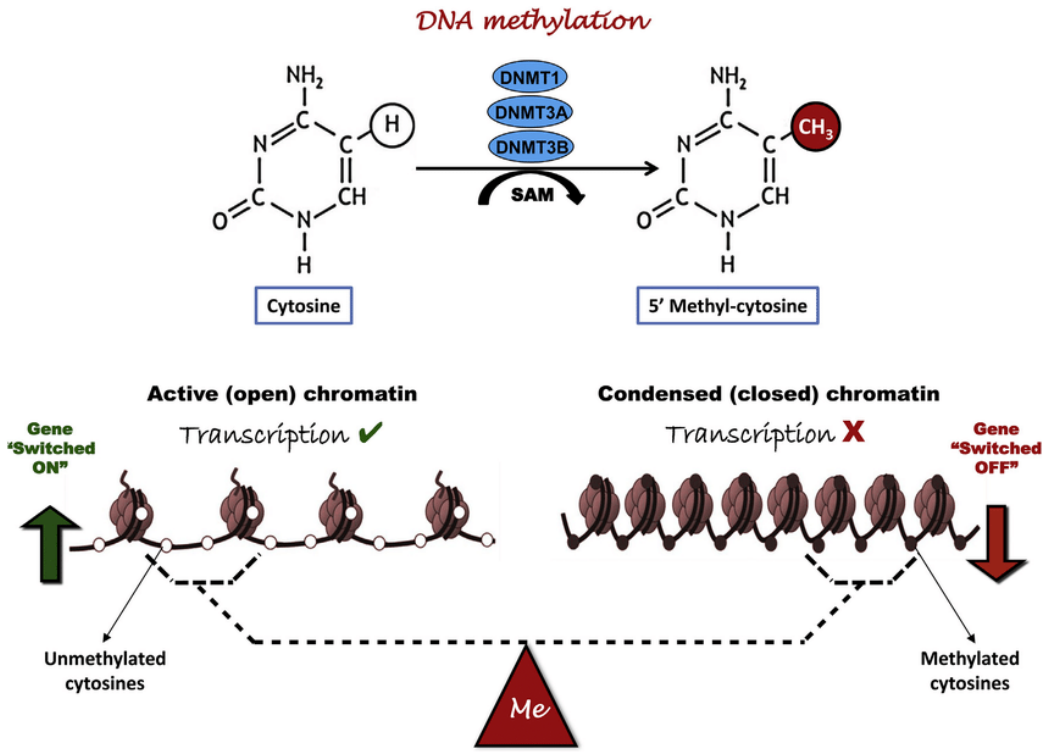
Modifikacije DNA koje ne mijenjaju slijed nukleotida u DNA mogu utjecati na aktivnost gena. Kemijski spojevi koji se vežu za pojedinačne gene mogu regulirati njihovu aktivnost; ove modifikacije su poznate kao epigenetske promjene. Epigenom sadrži sve kemijske spojeve koji su dodani cijeloj DNA (genomu) kao način da se regulira aktivnost (ekspresija) svih gena u genomu. Kemijski spojevi epigenoma nisu dio DNA sekvence, već su na ili su spojeni na DNA ("epi" znači iznad na grčkom). Epigenetske modifikacije ostaju s dijeljenjem stanica te se u nekim slučajevima mogu naslijediti kroz generacije. Agroekološki uvjeti također mogu utjecati na epigenom (Genetics Home Refrence, 2020) (slika 2.1.). Obrasci epigenetske modifikacije razlikuju se među jedinkama, različitih tkiva unutar iste jedinke, pa čak i između različitih stanica (Genetics Home Refrence, 2020).



Slika 2.1. Različiti oblici epigenetičkih modifikacija pod utjecajem stresa
Izvor: Singroha i Sharma (2019)

2.1. Metilacija DNA

Metilacija DNA je najviše proučavana epigenetska modifikacija. Modifikacija kromatina i aktivnost gena može se povezati sa stupnjem metilacije DNA. Osnovni mehanizam ovog procesa je dodavanje metilnih skupina na citozinske (dušične) baze CpG-otoka (*5′—C—phosphate—G—3′*) čime uvelike utječu na aktivnost gena (Sang-Woon i Simonetta, 2010). CpG-otoci (eng. CG Islands, CGIs) su najčešće promotorske i predpromotorske, te u osnovi nemetilirane regije DNA duljine najmanje 200 parova baza, od kojih je barem 50% citozina i gvanina. S obzirom da je to područje početka transkripcije, promjene u statusu metilacije mogu dovesti do promjena transkripcijske aktivnosti koje se mogu očitovati na razne načine. Metiliranje inhibira transkripciju gena. Geni koji su uvijek aktivni nisu metilirani (Sang-Woon i Simonetta, 2010). Metilacija ne sprječava replikaciju molekule DNA. Cijeli mehanizam metilacije temelji se na dodavanju metilne skupine na ^{5}C atom citozina pri čemu nastaje 5-metilcitozin, ovaj proces katalizira skupina enzima DNA-metiltransferaze (DNMT). Donor metilne skupine je S–adenozil–L–metionin (SAM) (slika 2.1.1.).



Slika 2.1.1. DNA metilacija

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Interplay-between-DNA-methylation-gene-transcription-and-chromatin-structure-The_fig1_323190556 - pristup 17.7.2020.

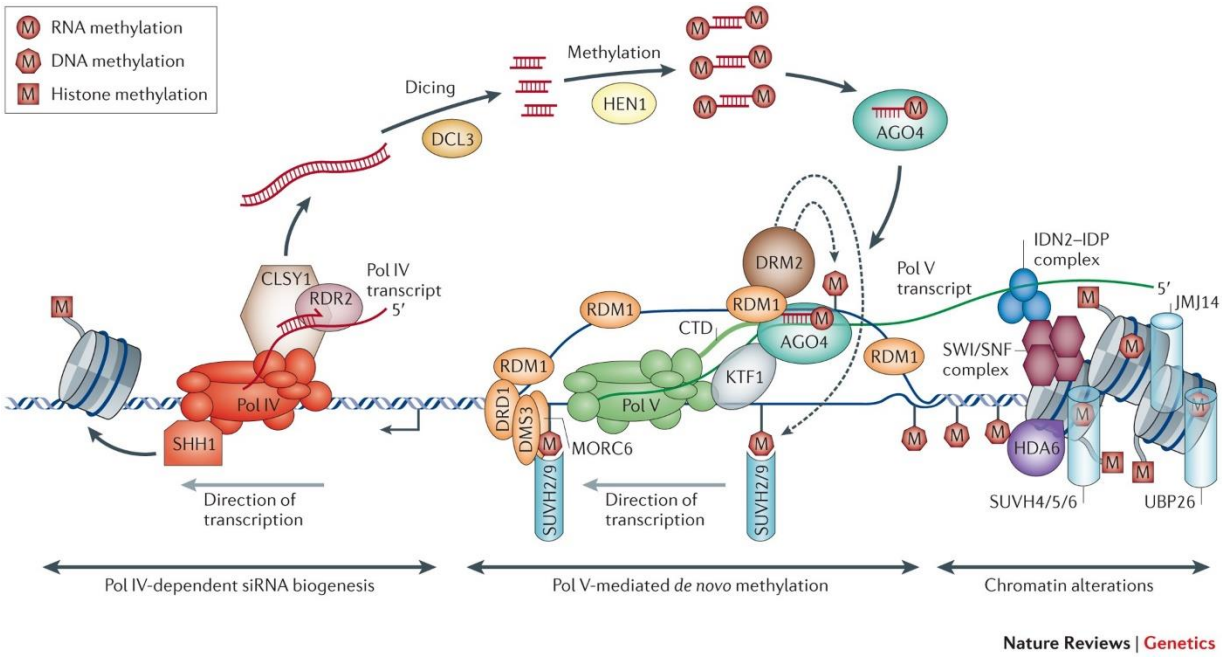
Metilacija DNA je evolucijski sačuvan epigenetski mehanizam kod eukariota koji kontrolira brojne biološke procese, uključujući utišavanje gena, tkivno specifičnu ekspresiju gena, inaktivaciju prijenosnih, transponirajućih elemenata (TE), paramutaciju (paramutacija je epigenetski prijenos informacija s jednog alela gena na drugi kako bi se uspostavilo stanje ekspresije gena koje je nasljedno generacijama (Chandler, 2007.) i reakcije na stres. U biljkama se metilacija DNA događa u CG, CHG i CHH kontekstu (gdje H predstavlja A (adenin), C (citozin) ili T (timin)). Ovisno o mjestu gdje se odvija metilacija, ona može biti simetrična ili asimetrična. Na CG i CHG metilacije su simetrične, dok metilacije na CHH su asimetrične. Uglavnom se metilacija odvija na CpG dinukleotidima (Singroha i Sharma, 2019). Razina metilacije dinamički se kontrolira uspostavljanjem, održavanjem i uklanjanjem metilacije citozina (demetilacijom DNA) (Chandler, 2007). Dodana metilna grupa pruža mjesto za vezanje raznih proteinskih kompleksa koji modificiraju povezanost sa histonima što rezultira promjenom ekspresije gena (Singroha i Sharma, 2019).

Biljke metiliraju samo neke gene, a ta metilacija je uglavnom ograničena na CG dinukleotide u samim genima. Transponirajući elementi, s druge strane, su metilirani na većini CG, CHG i CHH sekvenca. Metilacija u transponirajućim elementima i promotorskim regijama gena vode do utišavanja, dok metilacija u samom genu dovodi to ekspresije gena. DNA metilacija u samom genu igra glavnu ulogu u regulaciji ekspresije gena te metilacija u repetitivnim sekvencama (transponirajućim elementima) sprječava repetitivne sekvence da kompromitiraju normalnu genomsku funkciju. Povećana metilacija genomske DNA smanjuje ekspresiju gena, što omogućuje biljkama čuvanje energije za slučajeve biotskih i abiotskih stresova. Nasuprot tome, smanjenje metilacije gena koji uvjetuju otpornost biljaka na određeni stres potiče kromatinsku aktivnost i ekspresiju drugih gena koji omogućuju dugoročnu ili trajnu otpornost na stres (Singroha i Sharma, 2019).

Različiti proteini su uključeni u metiliranje, održavanje metilacije i njeno uklanjanje sa DNA. DNA metilacija može nastati *de novo* ili biti održavana. *De novo* metilacija kod svih sekvenci je katalizirana enzimom DRM2 (*Domains Rearranged Methyltransferase 2*). Održavanje metilacije se odvija trima različitim putevima. CG metilacija se održava uz pomoć enzima MET1 (*Methyltransferase 1*) i DDM1 (*Decrease in DNA Methylation 1*). CHG metilaciju održava CMT3 (*Chromomethylase 3*), specifična biljna metiltransferaza. Za održavanje metilacije CHG je neophodna dimetilacija histona H3K9 (H3K9me2) koja je posredovana s KYP/SUVH4 histonskom metiltransferazom. I CMT3 i KYP formiraju stabilan mehanizam između DNA metilacije i metilacije histona. Asimetričnu CHH metilaciju održava DRM2 i CMT2 (*Chromomethylase 2*). Uz ove dvije DNA metiltransferaze, faktor kromatinskog remodeliranja (*chromatin remodeling factor*) DDM1 (*Decrease in DNA Methylation 1*) je također potreban kako bi privukao metilaze zadužene za održavanje metilacije do regija vezanja na histonu H1. Te metilaze su: CMT2, CMT3 i MET1 (Deng i sur., 2018).

2.1.1. DNA metilacija vođena s RNA

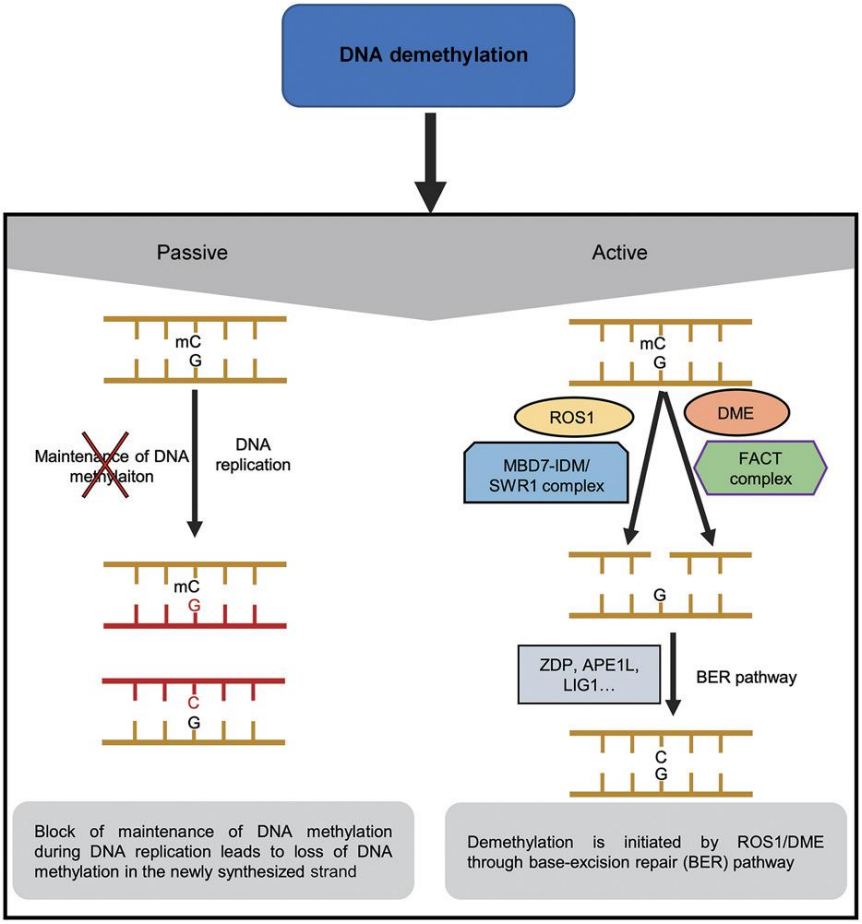
Aktivnost DRM2 je regulirana DNA metilacijom vođenoj s RNA (eng. *RNA-directed DNA methylation*, RdDM) (Singroha i Sharma, 2019). CLSY1 (Classy 1) je faktor kromatinskog remodeliranja koji aktivira RNA polimerazu IV (Pol IV), biljni specifični enzim sa svojom najvećom podjedinicom NRPD1. Pol IV transkribira heterokromatinske regije kako bi sintetizirala jednolančanu RNA (eng. *single-stranded RNA*, ssRNA). RDR2 (*RNA-directed RNA Polymerase 2*) potom sintetizira dvolančane RNA (eng. *double-stranded RNA*, dsRNA) kao međuprodukte, odnosno prekursore koje enzim skupine RNaza III - DCL3 (*Dicer-like 3*) siječe na 24 nukleotida duge male interferirajuće RNA molekule (eng. *small interfering RNA*, siRNA). siRNA se inkorporira u Argonaute 4 (AGO4) (Singroha i Sharma, 2019). siRNA, inkorporirana u AGO4, se dušičnim bazama povezuje sa transkriptima RNA polimeraze V (Pol V) – Pol V sa svojom najvećom podjedinicom NRPE1 transkribira međugenske ne kodirajuće (eng. *intergenic non-coding*, IGN) regije (Deng i sur., 2018). Određeni faktori kromatinskog remodeliranja, DRD1 (*Defective in RNA-directed DNA Methylation 1*), DMS3 (*Defective in Meristem Silencing 3*) i RDM1 (*RNA-directed DNA Methylation 1*) formiraju stabilni proteinski kompleks – DDR – koji se veže sa kromatinom. Ovaj kompleks je neophodan za transkripciju koju katalizira Pol V. IDN2 (*Involved in de novo 2*) je protein sličan SGS3 (*Suppressor of Gene Silencing 3*) koji stabilizira interakcije između siRNA i IGN transkripata inkorporiranih u AGO4 protein. Kod biljaka IGN transkript, AGO4, RDM1 i KTF1 (*Kow domain-containing Transcription Factor 1*) formiraju kompleks koji vodi DNA metiltransferazu DRM2 do ciljanog lokusa (slika 2.1.1.1.) (Matzke i Mosher, 2014).



Slika 2.1.1.1. DNA metilacija vođena s RNA
Izvor: Matzke i Mosher (2014)

2.1.2. Demetilacija

Metilacija DNA je reverzibilna. Demetilacija DNA nastaje bilo pasivnim ili aktivnim postupkom. Pasivna demetilacija odnosi se na gubitak metilacije DNA tijekom replikacije DNA zbog smanjenja ili inaktivacije enzima koji doprinose održavanju metilacije DNA. Aktivna demetilacija DNA uključuje enzimsko uklanjanje metiliranog citozina. U biljkama ovaj proces pokreće skupina DNA glikozilaza. Aktivna demetilacija DNA nije samo ključna za epigenetsko reprogramiranje na čitavom genomu, već posreduje aktivaciju gena specifičnih za lokuse tijekom razvoja biljke (slika 2.1.2.1.) (Li i sur., 2018.).

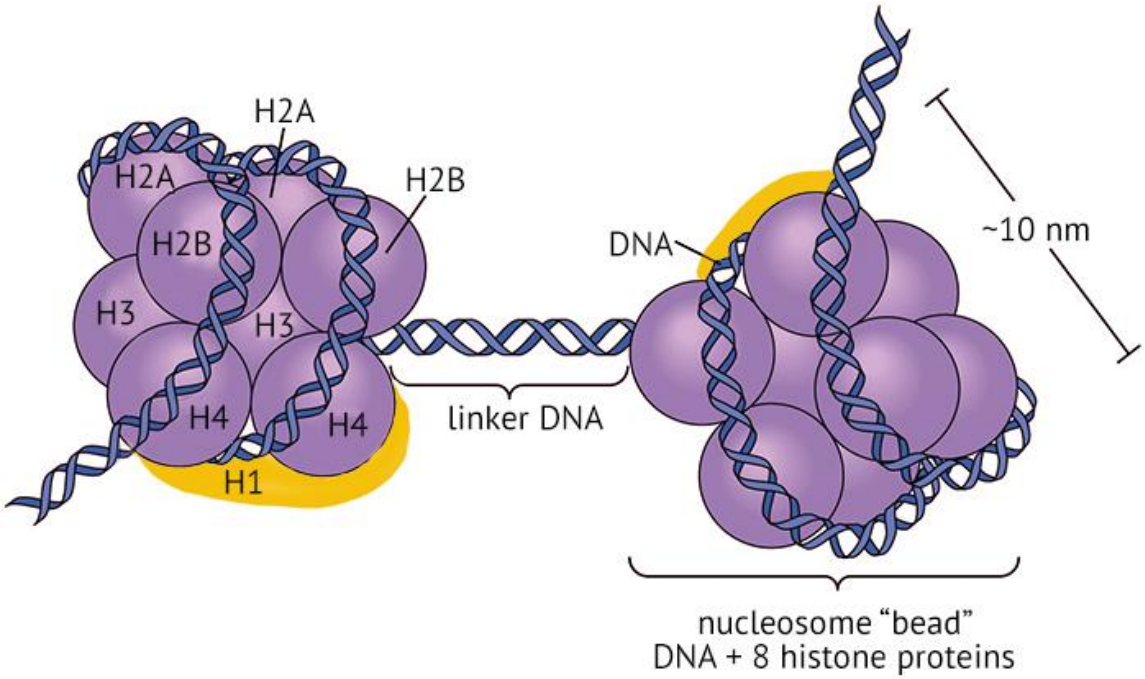


Slika 2.1.2.1. pasivna i aktivna demetilacija
Izvor: Liu i sur. (2018)

Kod biljaka postoje četiri bifunkcionalne 5-metilcitozin glikozilaze: ROS1 (Repressor of Silencing 1), DME (Demeter), DML2 (Demeter-like 2) i DML3 (Demeter-like 3). Navedene 5-metilcitozin glikozilaze su implicirane u aktivno uklanjanje 5-metilcitozina sa DNA tijekom molekularnog mehanizma popravka dušičnih baza u toj DNA. DNA metilacija kod biljaka ima dvije glavne uloge: obranu genoma od „sebičnih“ DNA elemenata i regulaciju genske ekspresije. DNA metilacija potiče transkripcijsko utišavanje transgena, kao i endogenih transpozona i retrotranspozona kako bi se očuvala stabilnost genoma (Liu i sur., 2015).

2.2. Modifikacije histona

Biljke sadrže nekoliko histonskih varijacija i enzima koji posttranslacijski modificiraju histone te utječu na regulaciju gena. Histonski proteini su omotani s DNA te formiraju jako kompaktnu strukturu zvanu nukleosom. Histonski proteini su pozitivno nabijene molekule koje reagiraju s negativno nabijenim fosfatnim skupinama molekule DNA. Nukleosomi se sastoje od histonskog oktamera koji sadrži dvije kopije svakog histonskog proteina: H2A, H2B, H3 i H4. Oktamerna jedinica je dva puta omotana dijelom molekule DNA duljine 147 parova baza, a na mjestu gdje lanac DNA dolazi na nukleosom, te gdje odlazi s nukleosoma, vezan je jedan H1 protein. Duljina spojne regije (eng. *linker DNA*) između dva nukleosoma nije uvijek jednaka, a najčešće je to 10-90 parova baza (Lodish i sur., 2008) (slika 2.2.1.). Histoni se modificiraju na području tzv. histonskih ili N-terminalnih repova koji sadrže 15 – 38 aminokiselinskih ostataka, a najčešće se modificira lizin koji se metilira ili acetilira, te arginin koji se samo metilira (Sang-Woon i Simonetta, 2010). Takve histonske modifikacije se povezuju sa represijom gena ili njihovom aktivacijom. Kod biljaka metilacija i demetilacija H3K9 i H3K27 (aminokiseline u histonu H3) rezultira utišavanjem gena, dok acetilacija i metilacija H3K4 i H3K36 je povezana sa aktivacijom gena čime se potiče genska ekspresija. Ove kovalentne modifikacije, pod utjecajem stresa, reguliraju transkripciju omotane DNA sekvence tako što mijenjaju strukturu „pakiranja“ DNA, što kao rezultat ili aktivira transkripciju DNA ili čini strukturu više zbijenu te tako onemogućuje transkripcijskim faktorima vezanje (Singroha i Sharma, 2019). Histoni se još, osim acetilacijom i metilacijom, mogu modificirati fosforilacijom, biotinilacijom, ubikvitinacijom, ADP-ribolizacijom, glikozilacijom, karbonilacijom i sumoilacijom (Liu i sur., 2015).

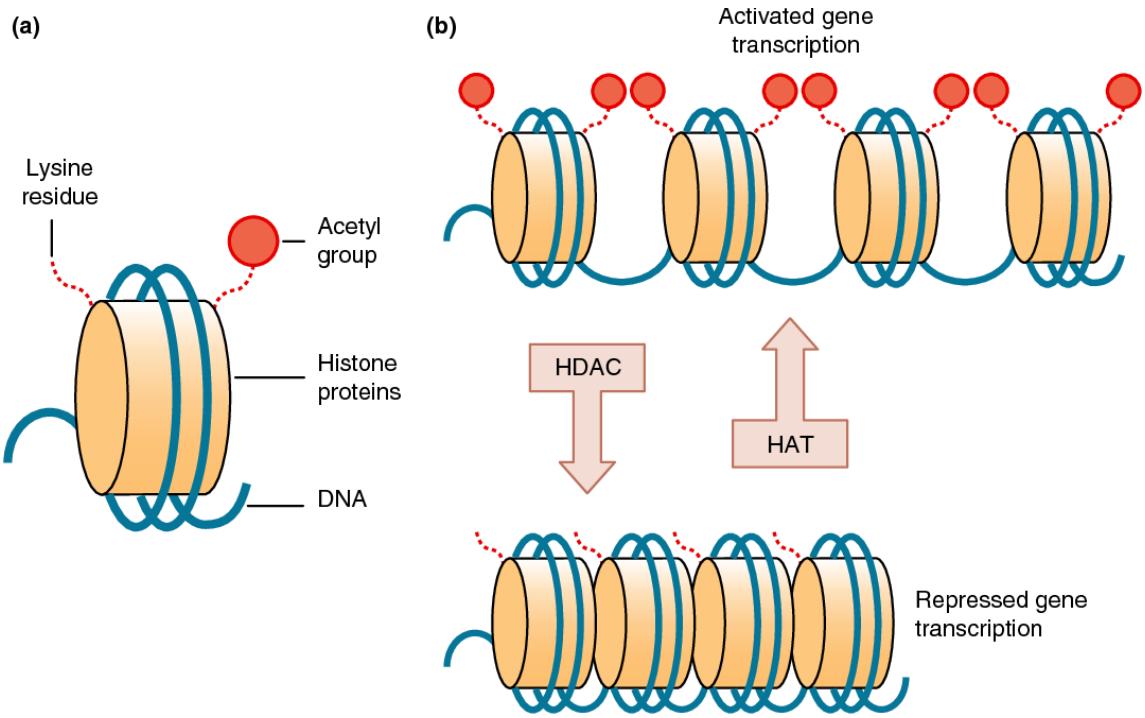


Slika 2.2.1. Struktura nukleosoma

Izvor: DNA Structure and replication. Philpot Education, 2020. https://www.philpoteducation.com/mod/book/view.php?id=802&chapterid=1072#/ - pristup 17.7.2020.

2.2.1. Acetilacija/deacetilacija histona

Acetilacija histona je najbolje proučena histonska modifikacija pri čemu dolazi do reverzibilne acetilacije aminokiselina koje se nalaze na N-terminalnim krajevima histona. Acetilacija je proces koji uključuje prijenos acetilne skupine s acetila-CoA (koenzima A) na ε-amino skupinu lizinskog ostatka histona (Huang i sur., 2016). Procesi acetilacije i deacetilacije regulirani su enzimima histon acetiltransferaza (eng. *histone acetyltransferases*, HATs), odnosno histonske-deacetilaze (HDAC) (slika 2.2.1.1.). Kod biljaka postoje četiri glavne skupine histon acetiltransferaza: GNAT, CBP, TFII250 i MYST (sa svojim podskupinama MOZ, Ybf2, Sas2, i Tip60) (Saraswat i sur., 2017). Acetilacija N-terminalnog lizina uzrokuje redukciju ukupnog pozitivnog naboja histona i rezultira smanjenjem elektrostatske sile privlačenja između negativno nabijene DNA i pozitivno nabijenog histona, što dovodi do popuštanja kromatina i transkripcijske aktivacije DNA (Singroha i Sharma, 2019). Kondenzirani heterokromatin prelazi u ne kondenzirani, aktivni eukromatin, te TATA sekvenca (eng. TATA box, dio promotora na koji se vežu transkripcijski faktori) postaje dostupna transkripcijskim faktorima i transkripcija je omogućena. Lizin na histonu može primiti samo jednu acetilnu skupinu (Sang-Woon i Simonetta, 2010). Samo specifični lizini u histonskom proteinu su acetilirani. U različitim histonskim proteinima različiti lizinski ostaci prolaze kroz modifikacije (Singroha i Sharma, 2019).

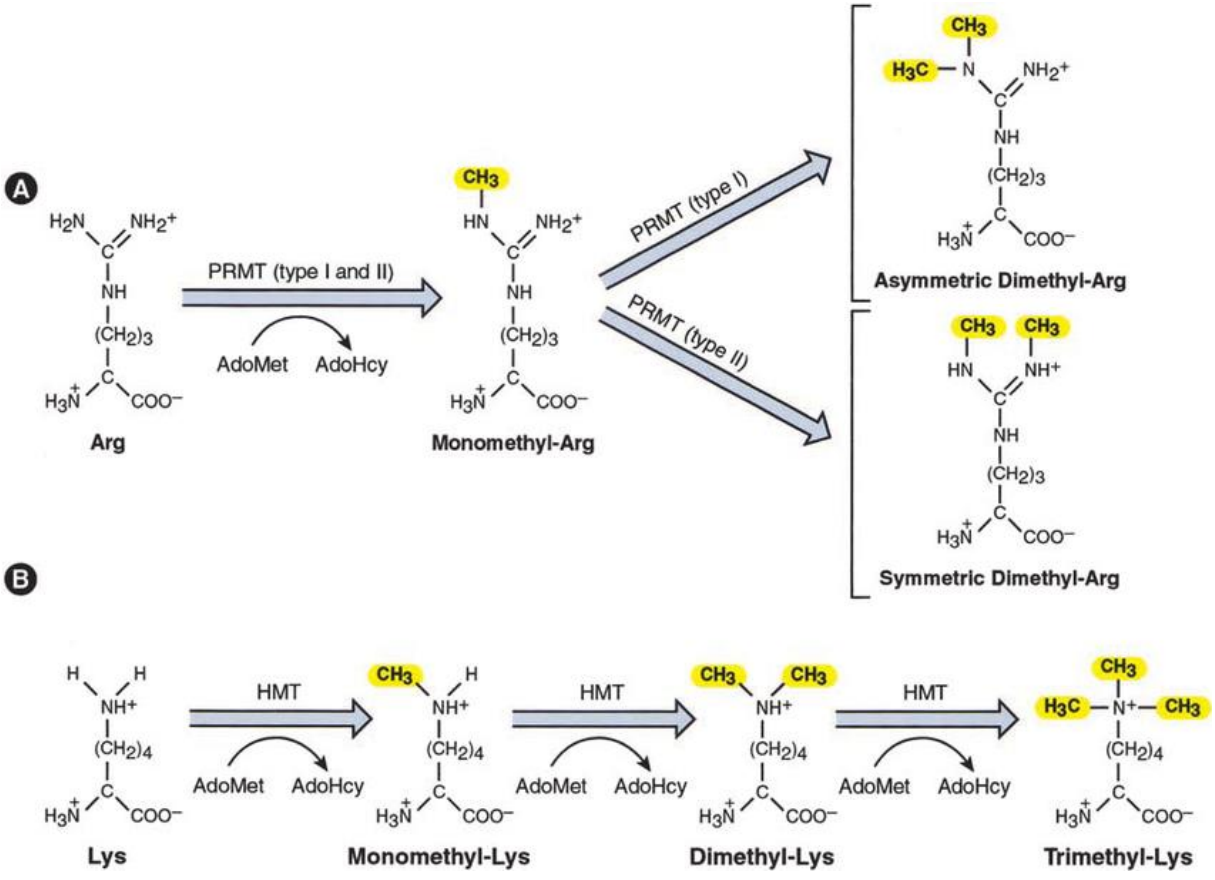


Slika 2.2.1.1. Acetilacija/deacetilacija histona

Izvor: https://www.semanticscholar.org/paper/Review-article%3A-selective-histone-deacetylase-as-in-Felice-Lewis/00235af8826e00832235bda756c28b92d79cbb6a - pristup 17.7.2020.

2.2.2. Metilacija histona

Pri metilaciji histona dolazi do kovalentnog vezanja metilnih skupina na aminokiselinske ostatke lizina i arginina, što može imati i aktivirajuće i inaktivirajuće djelovanje na kromatin. Različiti argininski i lizinski ostaci u različitim histonima prolaze različite tipove metilacije (R3 od H2A; R3 i K20 od H4; K4, K9, K27, K36, R2 i R17 od H3 itd.). Za razliku od acetilacije, u metilaciji lizin može biti metiliran s jednom, dvije ili tri metilne skupine, dok arginin sa jednom ili dvije metilne skupine (*slika 2.7.*). Donor metilne skupine je S-adenozilmetionin, a reakcija je katalizirana histonskim metiltransferazama (Sang-Woon i Simonetta, 2010). Za razliku od acetilacije i fosforilacije, metilacija histona ne mijenja naboj histona već mijenja hidrofobni karakter i cjelokupnu veličinu modificiranih ostataka (Huang i sur., 2016). Utjecaj metilacije na hidrofobnost histona može promijeniti interakciju između histona i DNA ili može stvoriti vezna mjesta za različite proteine koji ograničavaju vezanje transkripcijskih faktora te sprječavaju transkripciju. Drugim riječima, metilacija može aktivirati ili utišati gene ovisno o metiliranom ostatku. Tako na primjer, H3K4 trimetilacija aktivira transkripciju, dok K9 i K27 dimetilacija u H3 sprečava transkripciju. Histon lizin metiltransferaze (eng. *histone lysine methyltransferases*, HKMT ili HMT) katalizira metilaciju lizinskih ostataka, a protein arginin metiltransferaza (eng. *protein arginine methyltransferases*, PRMT) katalizira metilaciju argininskih ostataka (Singroha i Sharma, 2019) (slika 2.2.2.1.).



Slika 2.2.2.1. Metilacija arginina i lizina u histonima

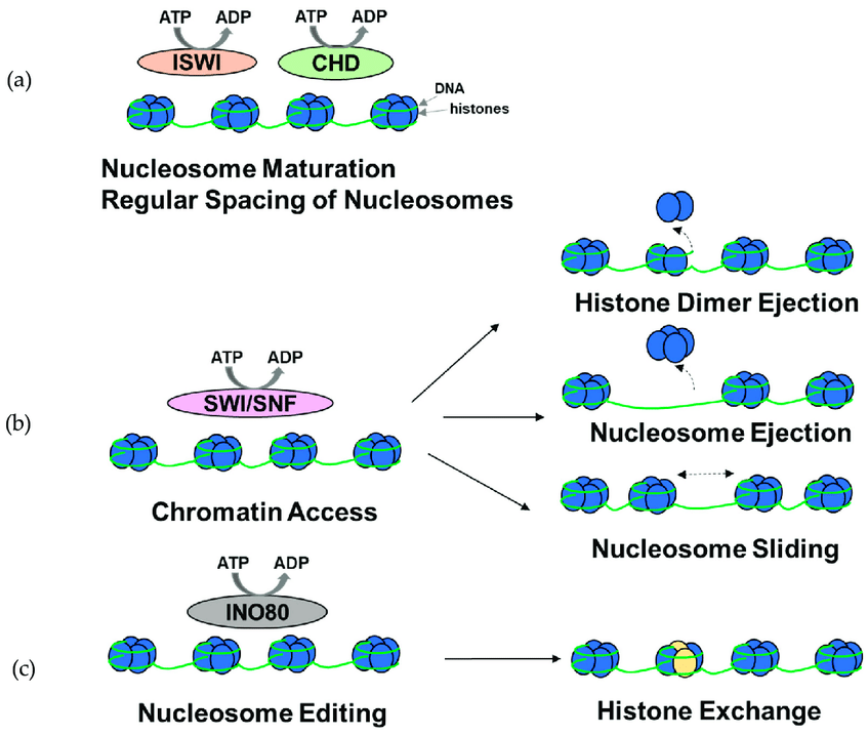
Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Chemistry-of-arginine-and-lysine-methylation-A-Molecular-structure-of-arginine-and_fig1_11786356 - pristup 17.7.2020.

2.2.3. Histonski čaperoni

Histonski čaperoni su grupa proteina koji vežu histone i sprječavaju neproduktivno spajanje između pozitivno nabijenih histona i negativno nabijene DNA bez korištenja energije iz ATP-a. Igraju važnu ulogu u sastavljanju nukleosoma tijekom različitih procesa kao što su DNA replikacija, popravak i transkripcija. Uglavnom se histonski čaperoni mogu podijeliti kao H3–H4 ili H2A–H2B čaperoni prema tome na koje se histone vežu. Kod biljaka najproučavaniji H3–H4 čaperoni su: ASF1 (*Anti-Silencing Function 1*), CAF1 (*Chromatin Assembly Factor-1*) i HIRA (*Histone Regulatory Homolog A*); dok najproučavaniji H2A–H2B čaperoni su: NAP1 (*Nucleosome Assembly Protein 1*), NRP (*Nap1-Related Protein*) i FACT (*Facilitates Chromatin Transcription*) (Valieva i sur., 2016).

2.2.4. Kromatinsko remodeliranje ovisno o ATP-u

Kompleksi za kromatinsko remodeliranje ovisni o ATP-u koriste energiju hidrolize ATP-a za promjenu strukture kromatina tako što destabiliziraju interakciju između histona i DNA, pomicanjem histonskih oktamera ili kataliziranjem ugradnje druge varijante histona. Prema korištenim ATPazama, kompleksi se mogu grupirati u četiri glavne klase: SWI/SNF klasa (*SWItch/Sucrose Non-Fermentable*), ISWI klasa (*Imitation Switch*), INO80 klasa (*Inositol Requiring 80*) i CHD klasa (*Chromodomain and Helicase-like Domain*) (slika 2.2.4.1.). Funkcionalna analiza pokazuje da mnogi od tih proteina igraju važnu ulogu u razvoju biljke i reakciji na stres. Štoviše, neki od tih proteina su uključeni u epigenetsku regulaciju (Liu i sur., 2015).



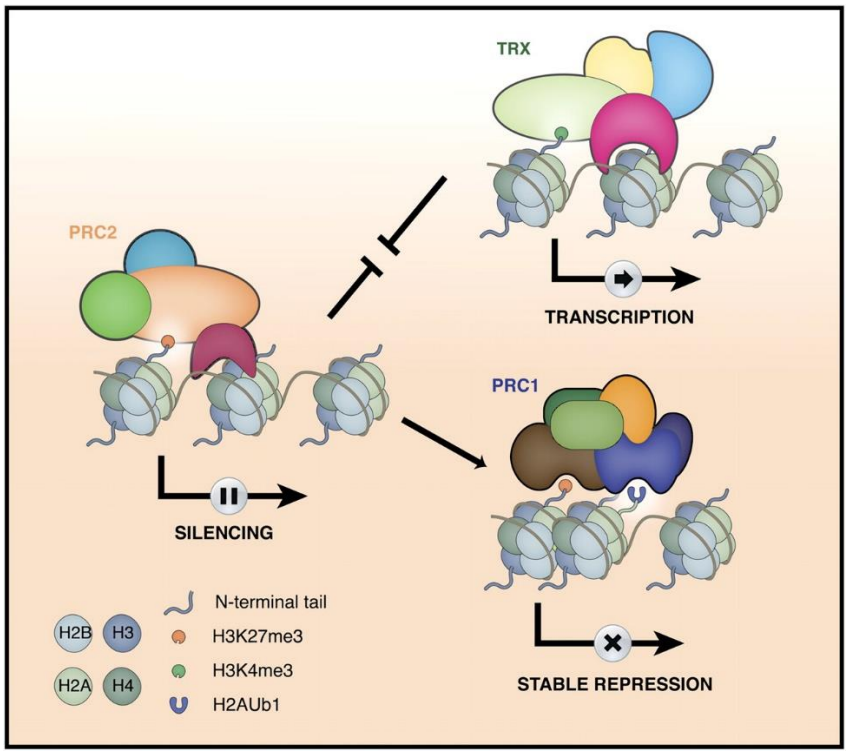
Slika 2.2.4.1. Kromatinska remodeliranja ovisna o ATP-u

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Overview-of-the-functions-of-ATP-dependent-chromatin-remodeling-complexes-a-A-subset_fig1_337520073 - pristup 17.7.2020.

2.3. Represijski polikomb-kompleks

Proteini polikomb skupine (eng. *Polycomb-group*, PcG) igraju bitnu ulogu u epigenetičkoj represiji gena lokaliziranim zbijanjem kromatina (Max Planck Institute for plant breeding research, 2020) ili aktiviranju transkripcije gena kod životinja i biljaka, a uključeni su u stabilno i nasljedno transkripcijsko utišavanje ili aktiviranje ciljanih gena tijekom razvoja organizma. PcG proteini su evolucijski očuvani i uključeni su u različite aspekte razvoja biljaka, kao što su vrijeme cvatnje i razvoja sjemena te odgovora na abiotske i biotske stresove. Za razliku od životinjskih PcG proteina koji sudjeluju u održavanju pluripotencije i sprečavanju diferencijacije stanica, biljni PcG proteini su potrebni za promicanje diferencijacije stanica skraćivanjem embrionalnog razvoja (Huang i sur., 2019).

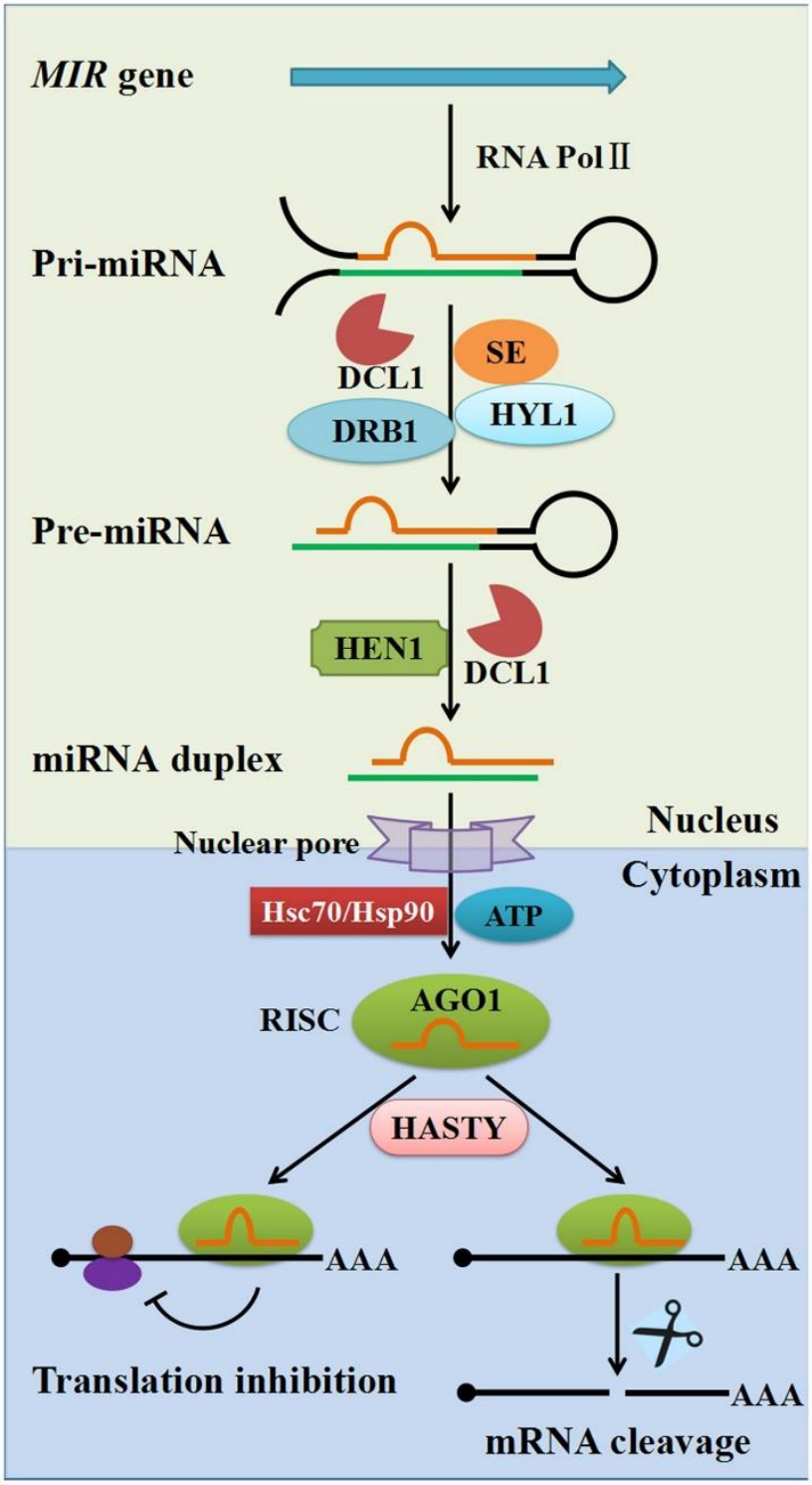
Postoje najmanje tri različita kompleksa: PRC1 (*Polycomb Repressive Complex 1*), PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) i Pcl-PRC2 (*polycomb-like PRC2*). PRC2 je zaslužan za trimetilaciju lizina-27 na histonu H3 (H3K27me3). Pcl-PRC2 je potreban za generiranje visokih razina H3K27me u ciljanim genima kako bi došlo do utišavanja gena. PRC1 održava represiju gena tako što inhibira aktiviranu RNA polimerazu II. PRC1 katalizira H2A monoubikvitaciju (H2Aub) putem RING1a/b podjedinice i uzrokuje represiju transkripcije histona H3K27me, induciranog PRC2 koji osigurava mjesto vezanja za N-terminalni rep PRC1 Pc podjedinice. PRC1 također olakšava transkripciju mnogih gena (Huang i sur., 2019). Aktivnost represije PRC2 suzbija aktivnost Trithorax-a (TRX). Trithorax trimetilira lizin 4 u histonu H3 (H3K4me3) i potiče ekspresiju ciljanih lokusa (slika 2.3.1.). Iako je funkcija Trithorax-a pronađena kod biljaka, sam kompleks još nije identificiran (Holec i Berger, 2012).



Slika 2.3.1. Represijski polikomb kompleksi 1 i 2
Izvor: Holec i Berger (2012)

2.4. MikroRNA

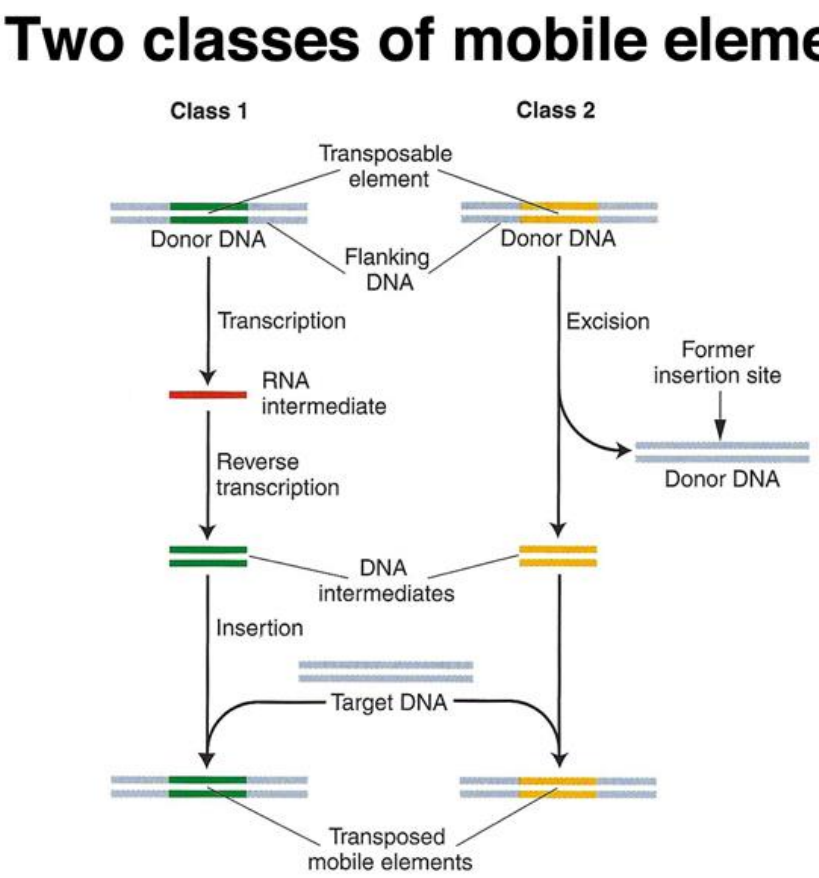
Biljne mikroRNA (miRNA) molekule su skupine malih, endogenih i nekodirajućih molekula RNA duljine 20 – 24 nukleotida koje su nastale iz duljih, jednolančanih prekursora. Prekursori se ponekad transkribiraju iz introna ili egzona (regije koja kodira za protein), ali uglavnom su prekursori transkribirani iz međugenskih regija genoma. MikroRNA gene transkribira polimeraza II (Pol II) kako bi stvorila primarni miRNA transkript zvan pri-miRNA (*primary* miRNA). Pri-miRNA molekule su pretvorene u nesavršene strukture oblika petlje dužine oko 70 nuklotida (Ferdous i sur., 2015), takozvane *miRNA/miRNA* duplex*, pomoću endonukleazne aktivnosti DCL1 (*Dicer-like 1*) proteinskog kompleksa u jezgri stanice zajedno sa HYL1 (protein koji se veže na dsRNA) (Aravind i sur., 2017). „miRNA“ se odnosi na lanac koji će postati zrela miRNA, a „miRNA*“ se odnosi na lanac koji je komplementaran miRNA. Svaki lanac je metiliran pomoću dsRNA metilaze i HEN1 proteina kako bi se izbjegla degradacija prije transporta do citoplazme. miRNA/miRNA* duplex se transportira u citoplazmu uz pomoć HASTY proteina te se siječe na otprilike 22 nukleotida duge zrele miRNA molekule. Zrela miRNA molekula se ukomponira u proteinski kompleks RISC (*RNA-induced silencing complex*). RISC je multiproteinski kompleks u koji se ukomponira zrela miRNA ili siRNA (*small interfering RNA*). Zrela miRNA ukomponirana u RISC navodi do mjesta gdje treba sječi komplementarnu mRNA preko AGO1 proteina, koji posjeduje PAZ domenu i katalitičku PIWI domenu (Ferdous i sur., 2015). Znači, baze zrelih molekula miRNA se sparuju s ciljnim molekulama glasničke RNA (mRNA, eng. messanger RNA) kako bi inhibirale translaciju ili kako bi usmjeravale razgradnju molekule mRNA preko kompleksa RISC (eng. RNA-induced silencing complex) koji ih cijepa i tako inaktivira njihovu aktivnost (Liu i sur., 2015) (slika 2.4.1.). Osim toga, miRNA ima vrlo važnu ulogu u kontroli metilacije DNA i modifikaciji histona, ali metilacija DNA i acetilacija histona mogu istovremeno regulirati i ekspresiju miRNA (Banovac, 2016).



Slika 2.4.1. Sinteza miRNA i njezina regulacija translacije
Izvor: Liu i sur. (2017)

2.5. Transpozoni

Transpozoni (pokretni geni) su isječci DNA koda koji se mogu kopirati na nove položaje unutar genoma. Oni mogu mijenjati, utišati ili pojačano transkribirati određene gene, ili uopće nemaju učinka (Benoit i sur., 2019). Kao rezultat ove karakteristike, oni su odgovorni za dodavanje regulatornih sekvenci i transkripcijskih regulatornih signala, kao i za stvaranje znatne genomske nestabilnosti, posredovanja kromosomskih preuređenja, mijenjajući i ekspresiju i funkciju gena te stvaranje novih gena i egzona. Takva mobilizacija može također rezultirati smanjenjem i povećanjem genoma domaćina (Lopes i sur., 2013). Prema jedinstvenom sustavu klasifikacije koji se predlaže za eukariotske transponirajuće elemente (TE), TE se mogu grupirati u dvije klase (slika 2.5.1.) u skladu s njihovim načinom transpozicije: Elementi klase I (retrotranspozoni) koji koriste enzim reverzna transkriptaza (RTaza) za transponiranje preko RNA posrednika do novog mjesta u genomu; te elemenata klase II, koji se transponiraju izravno preko molekule DNA pomoću enzima transpozaze (Tpaza). Elementi I. klase podijeljeni su u pet redova (LTR, DIRS, PLE, LINE, SINE), od kojih je svaki podijeljen u superporodice (LTR: Copia, Gypsy, Bel-Pao, Retrovirus, ERV; DIRS: DIRS, Ngaro, VIPER; PLE: Penelope; LINE: R2, RTE, Jockey, L1, I; SINE: tRNA, 7SL, 5S). Elementi klase II (DNA transpozoni) podijeljeni su u dva podrazreda: podrazred I sadrži ili superporodice s terminalnim inverznim ponavljanjima (Tc1-Mariner, hAT, Mutator, Merlin, Transib, P, PiggyBac, PIF-Harbinger i Cacta) ili bez terminalnih inverznih ponavljanja (Crypton), dok podrazred II obuhvaća superporodice Helitron i Maverick (Benoit i sur., 2019).



Slika 2.5.1. Dvije klase transponirajućih (mobilnih) elemenata

Izvor: Genome Structure. Biol 202 Genetics, 2020.
http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/lecture24.html - pristup 17.7.2020.

Biljni genomi sadrže velike količine repetitivne DNA, prije svega LTR retrotranspozona. Mnogi od tih retrotranspozona nalaze se u blizini gena domaćina i na taj način mogu utjecati na ekspresiju susjednih gena čija je ekspresija posredovana raznim mehanizmima, kao što su: RNA interferencija (RNAi) , metilacija DNA i transkripcijom. Iako se čini da je transkripcijska aktivnost TE-a strogo pod nadzorom genoma domaćina, istraživanja također pokazuju da se TE mogu aktivirati u određenim stresnim uvjetima, kao što su infekcija patogenima, fizičke ozljede, abiotski stresovi ili u staničnim kulturama (Lopes i sur., 2013).

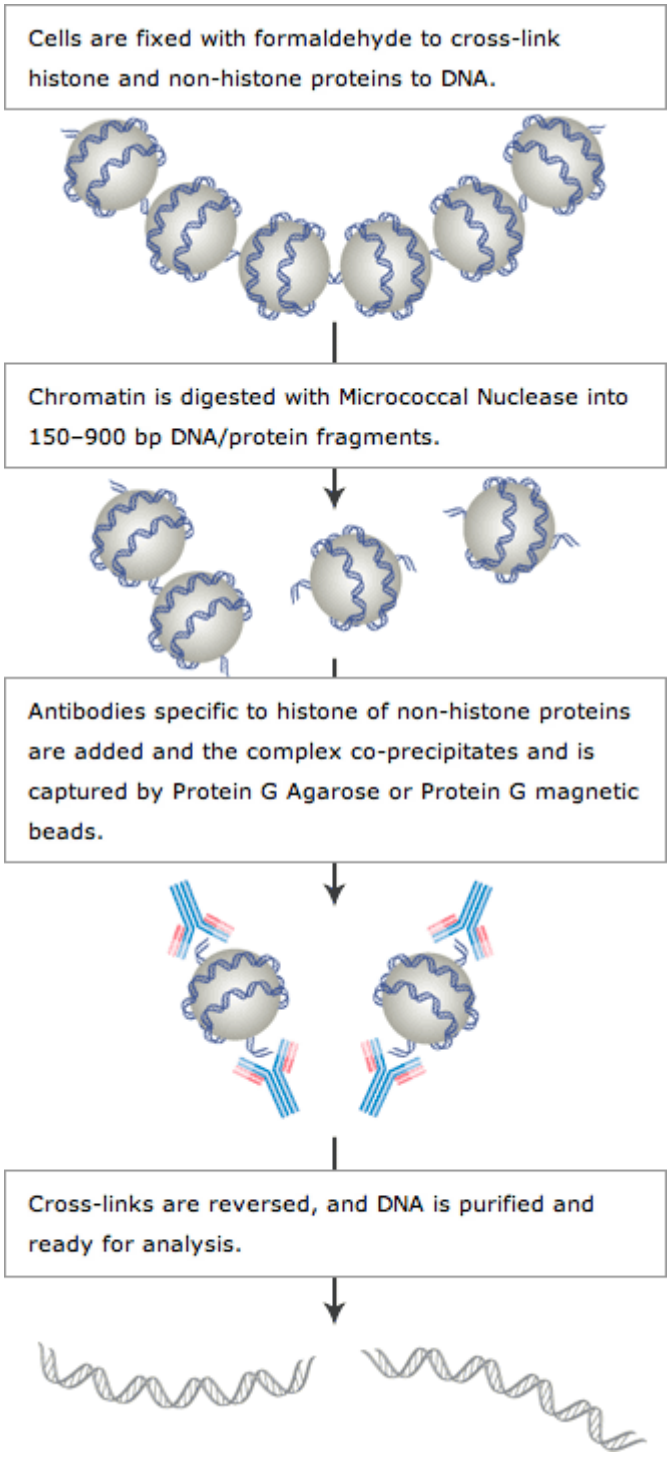
3. Tehnike za otkrivanje epigenetskih promjena kod biljaka

3.1. Histonske modifikacije

Test imunoprecipitacije kromatina (eng. *chromatin immunoprecipitation*, ChIP) moćan je i svestran način koji se koristi za ispitivanje interakcija proteina i DNA unutar prirodnog kromatinskog konteksta stanice, odnosno za detekciju histonskih modifikacija (Cell Signaling Technology, 2020). Ovo ispitivanje može se koristiti za identificiranje više proteina povezanih s određenom regijom genoma ili suprotno, za identificiranje mnogih područja genoma povezanih s određenim proteinom. Pored toga, ispitivanje ChIP-om može se koristiti za definiranje prostornog i vremenskog odnosa određene interakcije protein-DNA. Na primjer, ChIP test može se koristiti za određivanje određenog redoslijeda regrutacije različitih proteinskih faktora na genskom promotoru ili za "mjerenje" relativne količine određene histonske modifikacije kroz čitav genski lokus tijekom aktivacije gena (Cell Signaling Technology, 2020). Pored proteina histona, ispitivanje ChIP-om može se koristiti i za analizu vezanja transkripcijskih faktora, transkripcijskih kofaktora, faktora replikacije DNA i proteina koji popravljaju DNA.

Prilikom provođenja ChIP testa, stanice se najprije fiksiraju formaldehidom, reverzibilnim agensom koji povezuje protein-DNA i koji služi za fiksiranje ili „očuvanje“ interakcija proteina i DNA u stanici. Stanice se zatim liziraju, a kromatin se sakuplja i fragmentira pomoću ultrazvuka ili enzimske aktivnosti. Zatim se kromatin podvrgne imunoprecipitaciji koristeći antitijela specifična za određenu modifikaciju proteina ili histona. Sve DNA sekvence koje su povezane sa proteinskom ili histonskom modifikacijom od interesa će se istovremeno istaložiti kao dio umreženog kromatinskog kompleksa, a relativna količina te DNA sekvence obogaćena je postupkom imunoselekcije. Nakon imunoprecipitacije, proteinske i DNA unakrsne veze se prekinu i DNA se pročisti. Pročišćena sekvenca DNA ili više njih može se tada detektirati sa više različitih metoda (slika 3.1.1.) (Singroha i Sharma, 2019).

Standardne PCR metode često se koriste za identificiranje DNA sekvence ili područja genoma povezanih s određenom modifikacijom proteina ili histona. PCR se koristi za mjerenje relativne količine određene sekvence DNA usporedbom imunoprecipitacije DNA vezanom sa specifičnim proteinom i imunoprecipitacije s nespecifičnim antitijelima kao kontrolnom grupom. PCR produkti se uspoređuju na agaroznom ili akrilamidnom gelu radi olakšavanja kvantifikacije, a razina obogaćene DNA sekvence određuje se u odnosu na ukupnu količinu ulazne DNA (postotak unosa). PCR u stvarnom vremenu (eng. *real-time PCR*, RT-PCR) pruža precizniji sustav bez gela za kvantifikaciju obogaćivanja DNA. Alternativno, ispitivanje ChIP-om može se kombinirati s *genomic tiling micro-array* tehnikom, sekvenciranjem ili kloniranjem što omogućuju analizu interakcija proteina i DNA te histonskih modifikacija na cijelom genomu (Cell Signaling Technology, 2020).

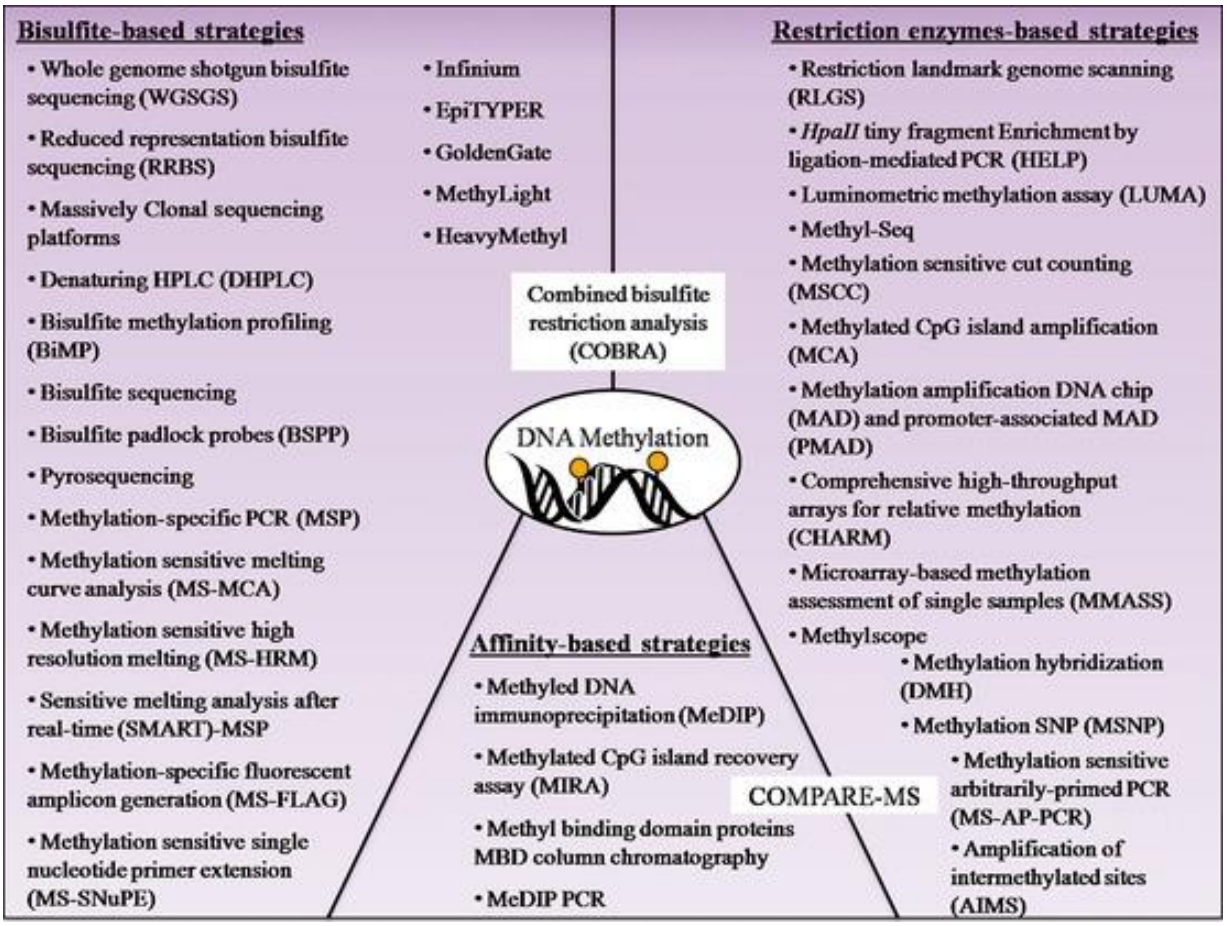


Slika 3.1.1. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) technique

Izvor: Overview of Chromatin IP Assay Methodology. Cell Signaling Technology, 2020. https://www.cellsignal.com/contents/resources-applications-chromatin-immunoprecipitation/overview-of-chromatin-ip-assay-methodology/chip-assay-overview - pristup 17.7.2020.

3.2. Profiliranje metilacije DNA kod biljaka

Tijekom zadnjih nekoliko desetljeća razvijene su mnogobrojne tehnike za profiliranje DNA metilacije i metilacijskih biljega na području cijeloga genoma, svaka sa svojim prednostima, nedostacima i područjem za koje se može upotrijebiti. Kako se metiliranost DNA gubi tijekom PCR amplifikacije, većina pristupa se oslanja na tretiranje DNA prije same amplifikacije. Postupci tretiranja se mogu klasificirati u tri glavne kategorije: digestija restrikcijskim enzimima (RE), analiza temeljena na afinitetu te bisulfitno modificiranje. Kombinacija ova tri pristupa sa sekvenciranjem i *microarray-based plat-forms* daje široki spektar tehnika za analizu DNA metilacije. Glavni pristupi se koriste za profiliranje metilacije na cijelom genomu budući da nude niz prednosti. Uglavnom se radi o visoko propusnim metodama koje pokrivaju što veći broj lokusa (slika 3.2.1.) (Olkhov-Mitsel i Bapat, 2012).



Slika 3.2.1. Podjela metoda za profiliranje DNA metilacije
Izvor: Olkhov-Mitsel i Bapat (2012)

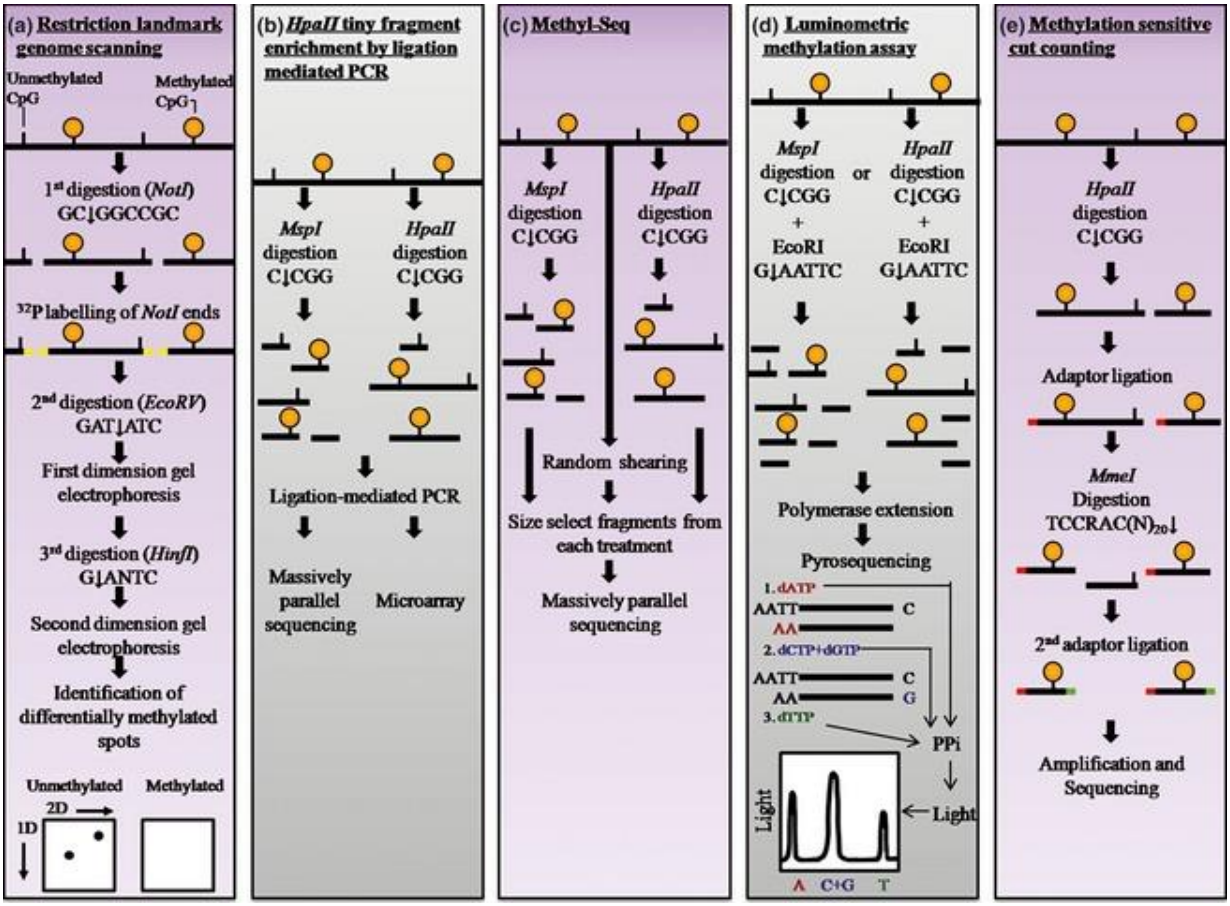
Konkretno, platforme za sekvenciranje daju kvalitativne informacije o statusu metilacije svakoga CpG dinukleotida i omogućuju analizu metilacije uzastopnih sekvenci i rijetkih varijanti metilacije, što je teško učiniti pomoću mikro zraka. Sljedeća prednost ovog pristupa je da se može koristiti za analiziranje metilacije DNA regija bez prethodnog znanja o slijedu nukleotida. Glavne slabosti ove strategije su: pristranost genetskim knjižnicama, troškovi, dostupnost i poteškoće u upravljanju i analiziranju podataka; iako se troškovi tehnologija za masovno naglo sekvenciranje smanjuju. Proces metilacije DNA pomoću mikro zraka visoke gustoće još je jedan uobičajeni postupak za identificiranje većih razlika među skupinama uzoraka. Potrebno je manje vremena, radne snage te je jeftinije od sekvenciranja. Pored toga, mikro zrake omogućuju istodobnu analizu većeg broja uzoraka sa širim CGI obuhvatom. Bez obzira na to, analizama koje koriste mikro zrake nedostaje pouzdano kvantificiranje i ograničeno je dizajnom sonde, učinkovitošću hibridizacije i komponentama hibridizacije (Olkhov-Mitsel i Bapat, 2012).

3.2.1. Digestija restrikcijskim enzimima

Restrikcijske enzimatske metode koriste enzime osjetljive na metilaciju koji izrezuju samo nemetiliranu DNA i enzime ovisne o metilaciji koji samo izrezuju metiliranu DNA. Ovi enzimi koriste se za obogaćivanje metiliranih ili nemetiliranih sekvenci i omogućavaju očitavanje metilacije DNA. *Restriction landmark genome scanning* (RLGS) (slika 3.2.1.1. a) je bila prva pouzdana tehnika bazirana na restrikcijskim enzimima (RE) za profiliranje DNA metilacije. No, upotreba RLGS-a se smanjila jer uključuje korištenje radioaktivnog materijala i elektroferorezu na gelu (Hayashizaki i sur., 1993). Danas mnoge tehnike kombiniraju enzimatske metode sa *array-based* analizom. Jedna takva tehnika je *HpaII tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR* (HELP) (slika 3.2.1.1. b), koje se temelji na digestiji genomske DNA pomoću enzima osjetljivih na metilaciju – *Hpa*II (Khulan i sur., 2006). Paralelno, izrezuje se drugi dio DNA, enzimom neosjetljivim na metilaciju - *Msp*I, koji izrezuje na istom mjestu bez obzira na status metilacije. Stoga, sekvence koje su prisutne u *Msp*I genskoj knjižnici, a nisu prisutne u *Hpa*II genskoj knjižnici izvedene su iz metiliranih regija. *Msp*I genska knjižnica također služi kao unutarnja kontrola koja omogućava identifikaciju lažnih varijabli koje mogu utjecati na aktivnost *Hpa*II. To uključuje nepostojanje CpG otoka na mjestima restrikcije, mutacije, varijacije broja kopija i tehničke greške. Nadalje, upotreba unutarnje kontrole omogućava otkrivanje lažnih diferencijalnih učinaka specifičnih za enzim *Hpa*II. HELP tehnika se kombinira s masivnim paralelnim sekvenciranjem (HELP-Seq) i/ili *array-based* platformama (Khulan i sur., 2006).

Ostali primjeri bazirani na *Hpa*II i *Msp*I digestiji su *methyl-Seq* i *luminometric methylation assay (LUMA)* (Karimi i sur., 2006). Kod *methyl-Seq* (slika 3.2.1.1. c) tehnike nakon digestije pomoću *Msp*I i *Hpa*II slijedi selekcija fragmenata genomske DNA na osnovi njihove dužine kako bi se postigla veća koncentracija regija koje sadrže CpG otoke te se odabrani fragmenti sekvenciraju. Kod LUMA (slika 3.2.1.1. d) tehnike genomska DNA se reže pomoću *Hpa*II ili *Msp*I nakon čega slijedi dodavanje bioluminometrijske polimeraze te pirosekvenciranje kako bi se kvantificirao doseg rezanja RE te stupanj metilacije. Svi do sada navedeni pristupi se oslanjaju na digestiju s *Msp*I kako bi se stvorila kontrolna genska knjižnica. Alternativno, u metodama kao što je *methylation-sensitive cutcounting* (MSCC) (slika 3.2.1.1. e), genomska DNA se samo digestira s *Hpa*II nakon čega slijedi temeljito sekvenciranje (Ball i sur., 2009). Broj koliko je određeno mjesto promatrano tijekom sekvenciranja služi kao

indikator stupnja metilacije. Mjesta koja su zastupljena mnogo puta tijekom sekvenciranja imaju malu metiliranost, dok mjesta koja uopće nisu zabilježena tijekom sekvenciranja imaju izrazito veliki stupanj metilacije.



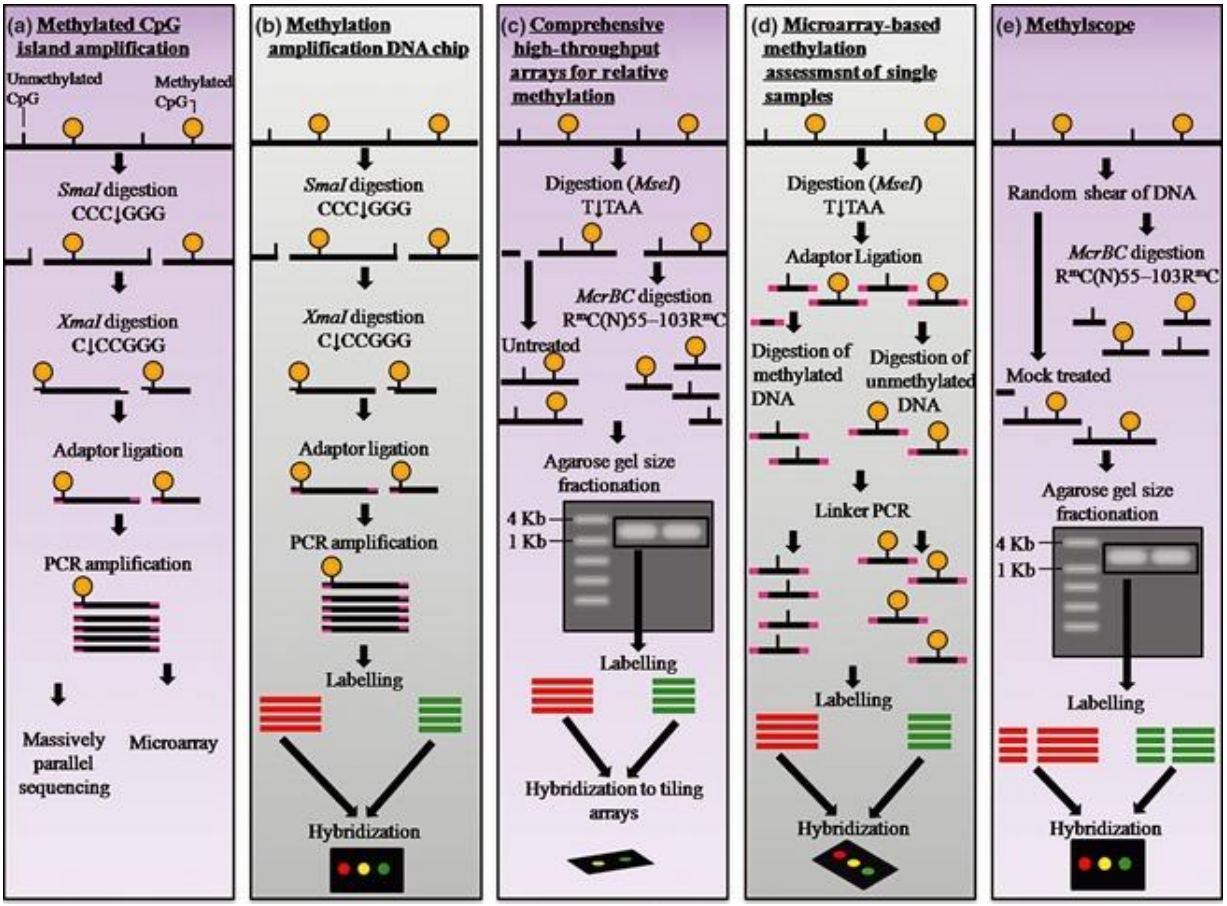
Slika 3.2.1.1. Tehnike analize metilacije DNA bazirane na restrikcijskim enzimima osjetljivim na metilaciju

Izvor: Olkhov-Mitsel i Bapat (2012)

Osim *Hpa*II i *Msp*I, drugi par enzima često korištenih za analizu metilacije su *Sma*I (osjetljiv na metilaciju) i *Xma*I (neosjetljiv na metilaciju). Metoda u kojoj se koriste je *methylated CGI amplifica*tion (MCA) (slika 3.2.1.2. a). U ovoj metodi *Sma*I generira fragmente tupih krajeva (*blunt end*) te eliminira nemetilirana mjesta. DNA se potom digestira s *Xma*I kako bi se stvorili ljepljivi krajevi (*sticky ends*) i kako bi se ostali pričvršćeni na metiliranim stranama. Metilirani fragmenti se ligiraju adaptorima te amplificiraju PCR-om. Dobiveni amplikon je ili sekvenciran (MCA-Seq) ili drugačije označen te hibridiziran na mikro zrakama (MCAM) (Toyota i sur., 1999). Drugi pristup koji koristi *Sma*I i *Xma*I enzime je *methylation amplification DNA chip* (MAD) (slika 3.2.1.2. b).

Alternativa enzimima osjetljivima na metilaciju su enzimi ovisni o metilaciji, kao što je *Mcr*BC. Enzim prepoznaje blisko pozicionirane metilirane citozine te zato ima sposobnost digestije gusto metilirane regije DNA. Tehnika koja koristi ovaj enzim se zove *comprehensive high-throughput arrays for relative methylation* (CHARM) (slika 3.2.1.2. c). Prvi korak je digestija DNA s RE, npr. *Mse*I. Mjesto prepoznavanja enzima je rijetko kada u regijama bogatima GC nukleotidima, stoga većina CGI-a ostaje cijela. Slijedi podjela DNA na dvije

frakcije, prva se tretira s *Mcr*BC, a druga ne. Frakcije se slažu po dužini, diferencijalno označavaju te hibridiziraju na mikro zrakama. Omjer intenziteta hibridizacije između tretirane i ne tretirane DNA pruža mjeru DNA metilacije (Sutherland i sur., 1992). McrBC: a multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease. J. Mol. Biol. 225:327–348.. Druga tehnika koja koristi *Mcr*BC enzim je *microarray-based methylation assessment of single samples* (MMASS) (slika 3.2.1.2. d). S *Methyl-Scope* (slika 3.2.1.2. e) tehnikom DNA se fragmentira i dijeli u dvije frakcije, jedna se digestira s *Mcr*BC. Fragmenti se odjeljuju elektroforezom te se fragmenti veći od 1 kb pročišćuju, označavaju različitim bojama (ovisno da li su tretirani s *Mcr*BC ili ne) te se hibridiziraju na *genomic-tiling microarrays*. Ova tehnika, osim što je osjetljiva na gusto metilirana područja, ne zahtjeva specifičnu sekvencu te češće reže DNA, a osim toga nije potrebno prethodno poznavanje metiliranosti uzorka kroz kontrolni uzorak. Korištenje RE se može kombinirati s enzimima osjetljivim na metilaciju, ta tehnika se zove *differential methylation hybridization* (DMH). Kod DMH DNA se digestira kombinacijom enzima osjetljivih na metilaciju, kao što su: *Bst*UI, *Hha*I i *Hpa*II. Nastali DNA fragmenti se ligiraju, amplificiraju PCR-om te hibridiziraju na mikro zrakama (Sutherland i sur., 1992).



Slika 3.2.1.2. Tehnike analize metilacije DNA bazirane na restrikcijskim enzimima ovisnima o metilaciji i osjetljivim na metilaciju

Izvor: Olkhov-Mitsel i Bapat (2012)

Analiza metilacije cijeloga genoma bazirana na RE lako, jeftino i brzo pruža uvid i identificira često metilirane CpG regije te se može koristiti kako bi se analizirale tisuće CGI u jednom pokusu (Nestor i sur., 2010). Enzymatic approaches and bisulfite sequencing cannot distinguish between 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in DNA. Biotechniques

48:317–319.). RE su ograničeni na elemente prepoznavanja, odnosno ograničeni su na samo dio metiliranih mjesta u genomu. Također ne mogu razlikovati između 5-mC i 5-hmC. Enzimi ovisni o metiliranosti režu i obje modifikacije CpG-a (metilirane i hidroksimetilirane), dok enzimi osjetljivi na metilaciju su potpuno blokirani s obje modifikacije. Zato jedan dio lokusa identificirani kao metilirani mogu zapravo biti hidroksimetilirani. Kako bi se riješio ovaj problem razvijaju se novi enzimatski pristupi za specifično otkrivanje hidroksimetilirane citozine (Nestor i sur., 2010).

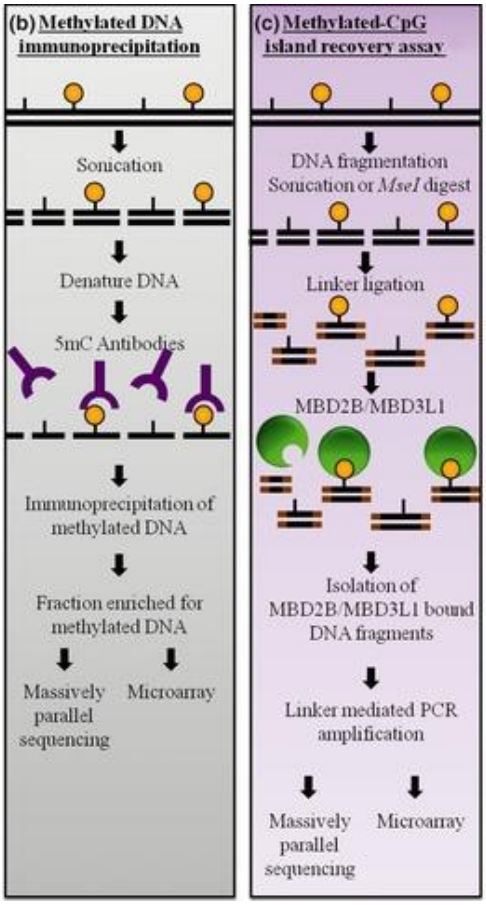
3.2.2. Analiza metilacije bazirana na afinitetu

Kako bi se zaobišle limitacije metoda digestije restrikcijskim enzimima, razvijene su tehnike koje koriste pročišćivanje i dobivanje veće količine metilirane DNA pomoću afiniteta određenih molekula. Tehnika „hvatanja“ metiliranih sekvenci DNA se zove *methyled DNA immunoprecipitation* (MeDIP) (Weber i sur., 2005). Počinje sa fragmentiranjem DNA pomoću ultrazvuka kako bi se dobili fragmenti različite dužine. Fragmenti se denaturiraju u jednolančanu DNA i imunoprecipitiraju sa jednim ili više monoklonskih anti-5-metilcitozin antitijela. Sakupljena DNA je bogata metiliranim sekvencama te se amplificira i analizira sekvenciranjem (MeDIP-Seq) ili platformama mikro zraka (slika 3.2.2.1. b). Glavna limitacija ove metode je to što zahtjeva da DNA bude jednolančana što može biti teško za izvesti u regijama bogatima CpG nukleotidima. Druga limitacija je kvaliteta i specifičnost samih antitijela. Nadalje, efikasnost izdvajanja regija sa niskom koncentracijom CpG nukleotida je izrazito niska. Kako bi se izbjegli navedeni problemi koriste se metode bazirane na *methylbinding domain proteins* (MBDs) (Weber i sur., 2005).

Methylated-CpG Island Recovery Assay (MIRA) se ne oslanja na bisulfitnu pretvorbu DNA ili na antitijelima koja prepoznaju jednolančane DNA (Mitchell i sur., 2011). MIRA može analizirati obrasce metilacije DNA u dvolančanoj DNA i ima veću osjetljivost i specifičnost od gore spomenutih metoda (slika 3.2.2.1. c). MIRA se temelji na prepoznavanju metiliranih CpG dinukleotida pomoću *methyl-CpG-binding domain protein-2b* (MBD2b) (Rauch i Pfeifer, 2005). Methylated-CpG island recovery assay: a new technique for the rapid detection of methylated-CpG islands in cancer. Lab. Invest. 85:1172–1180. . Vezivanje MBD2b na metiliranu DNA ne ovisi o sekvenci. MBD2b ima jedan od najviših afiniteta za vezanje metilirane DNA; međutim, afinitet vezanja se dalje povećava dodatkom *methyl-CpG-binding domain protein 3-like-1* (MBD3L1). MBD3L1 se veže s MBD2b *in vivo* i *in vitro* te potiče stvaranje kompleksa koji se vežu na metiliranu DNA. Nastali kompleks je glavni korak koji omogućuje uspješno funkcioniranje MIRA metode.

Prvi korak u MIRA metodi je fragmentiranje dvolančane DNA do prosječne duljine od 0,35 Kb (kilo baza), bilo ultrazvukom ili restrikcijskim endonukleazama. Metilirani fragmenti DNA tada se vežu pomoću *glutathione-S-transferase (GST)- tagged recombinant* MBD2b protein/His-tagged MBD3L1 kompleksa. DNA-proteinski kompleks se zatim hvata pomoću glutationskih zrnaca. Nakon hvatanja, DNA se eluira (otapanje tvari adsorbiranih na čvrstim sredstvima pomoću otapala (Proleksis Enciklopedija Online, 2020.) iz kompleksa DNA-proteina i amplificira s PCR-om za analizu specifičnih mjesta.

Metoda koja koristi MBD se zove *methylated CGI recovery assay* (MIRA) za koju se koriste MBD2 i MBD3 te *MBD column chromatography* koja koristi MBD2 ili MeCP2. Kod MIRA, DNA se fragmentira s *Mse*I, ligira se te se inkubira zajedno sa MBD2 i MBD3 koji su vezani za sepharose matrix te se vežu za metiliranu DNA sa visokom specifičnosti. Prikupljena DNA se amplificira PCR-om, označava i hibridizira na CGI mikro zrakama (Robertson i sur., 2011). Metode bazirane na afinitetu omogućuju brzu i specifičnu procjenu stupnja metiliranosti velikih DNA regija. Potrebni reagensi su komercijalno dostupni i laki za rukovati. Međutim, metode zahtijevaju veliku količinu DNA te ne pružaju informaciju o udaljenim CpG dinukleotidima. Na interakciju između DNA i MBD ili antitijela utječu okolne sekvence i gustoća metiliranosti. Stoga su ponavljajuće sekvence katkad previše zastupljene u analizi baziranoj na afinitetu. Tehnike, bazirane na afinitetu koje koriste MBD ili anti-5-mC antitijela, su specifične te se ne vežu s 5-hmC. Razvijena su specifična anti-5-hmC antitijela za analizu hidroksimetilacije (Olkhov-Mitsel i Bapat, 2012).

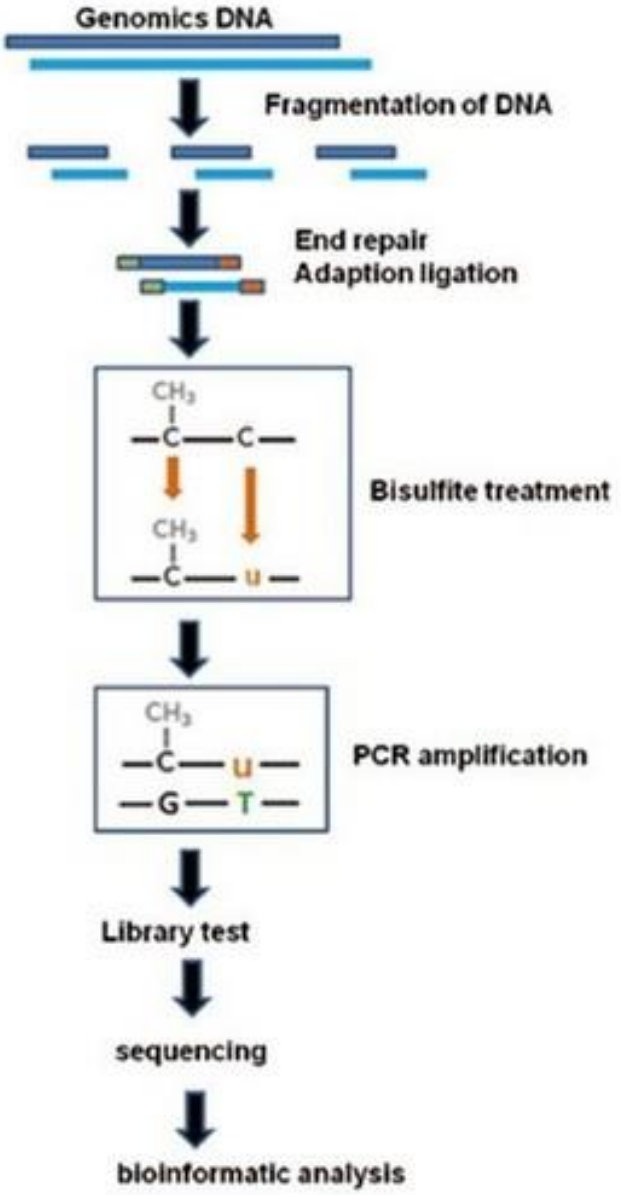


Slika 3.2.2.1. MeDIP i MIRA tehnike
Izvor: Olkhov-Mitsel i Bapat (2012)

3.2.3. Bisulfitne modifikacije

Princip natrij bisulfit modifikacije se bazira na različitim reakcijama metiliranih i nemetiliranih citozina tijekom tretiranja sa bisulfitom, samo će nemetilirani citozini prijeći u uracil. Prijelaz se može detektirati raznim metodama u kombinaciji sa sekvenciranjem i/ili s platformama mikro zraka. Tehnike bazirane na bisulfitnom tretiranju su danas najzastupljenije u analizi metiliranosti, a najpreciznija i najobuhvatnija je *whole genome shotgun bisulfite sequencing* (WGSGS) (slika 3.2.3.1.). Prednosti ove tehnike su kvantitativna analiza DNA metilacije skoro svugdje u genomu, rezolucija do jednog nukleotida te detekcija specifičnih, rijetkih metilacija. Iako, proces prelaska citozina u uracil rezultira značajnom degradacijom DNA te reducira preciznost sekvenciranja, što predstavlja problem za sekvenciranje i platforme mikro zraka (Huang i sur., 2010). Metode koje koriste bisulfitno modificiranje i sekvenciranje također zahtijevaju statističku analizu, poravnavanje sekvenci te informacije o bazama. Kako bisulfitna analiza ovisi o potpunom prelasku nemetiliranih citozina u uracil, nepotpuni ili neprikladni prelasci dati će krive rezultate. Natrijev bisulfit u reakciji s 5-hmC daje drugačiji produkt, citozin-5-metilensulfonat koji ne prelazi u deaminirani citozin. Kao rezultat, bisulfitno tretirani 5-hmC se ne razlikuje od 5-mC, implicirajući da dio genomskih lokusa identificiranih kao metilirani mogu biti u stvari hidroksimetilirani. Utvrđeno je da 5-mC i 5-hmC imaju različiti funkcionalni utjecaj (EC SEQ Bioinformatics, 2020). Zbog ovog problema razvijen je *oxidative bisulfite sequencing* (oxBS-Seq). Tijekom bisulfitnog tretiranja 5-fC prelazi u uracil te omogućuje specifično mapiranje 5-mC mjesta. Danas, uz oxBS-Seq, su razvijene mnoge druge metode kemijskog predtretiranja kako bi se 5-hmC mogli razlikovati od 5-mC (Mitchell i sur., 2011).

Rad na organizmu s velikim genomom može dovesti do visokih troškova sekvenciranja. (EC SEQ Bioinformatics, 2020). Kao alternativa, određivanje metilacije DNA se može usmjeriti na određeni podskup genoma, smanjujući na taj način količinu podataka eksperimenta, kao i troškove. Jedan od pristupa je sekvenciranje reduciranog reprezentativnog uzorka bisulfitom - *reduced representation bisulfite sequencing* (RRBS). Temeljna ideja RRBS je postići „smanjenu zastupljenost“ genoma, s naglaskom na CpG otocima. To uključuje dodavanje restrikcijskih enzima kako bi se DNA fragmentirao. Tipično se koristi enzim MspI koji je neosjetljiv na metilaciju te siječe na 5'-CCGG-3'mjestima. Budući da se CpG dinukleotidi uglavnom nalaze na promotorima i CpG otocima dobiva se "smanjena zastupljenost", odnosno uvelike se prikupljaju samo promotorska područja za daljnju analizu. Ova reakcija enzimatske aktivnosti obogaćuje uzorak sa fragmentima DNA različitih veličina (40 – 220 nukleotida (Singroha i Sharma, 2019)) koji imaju CpG dinukleotid na svakom kraju. Krajevi fragmenta se ligiraju adapterima, fragmenti se slažu po veličini, tretiraju bisulfitom te se na kraju sekvenciraju (EC SEQ Bioinformatics, 2020). RRBS se koristi u istraživanjima biljnih populacija i može se koristiti za vrste za koje nema dostupnih genomskih referenca.



Slika 3.2.3.1. Whole Genome Shotgun Bisulfite Sequencing (WGSGS)
Izvor: https://www.indiamart.com/proddetail/whole-genome-bisulfite-sequencing-service-15911546433.html - pristup 17.7.2020.

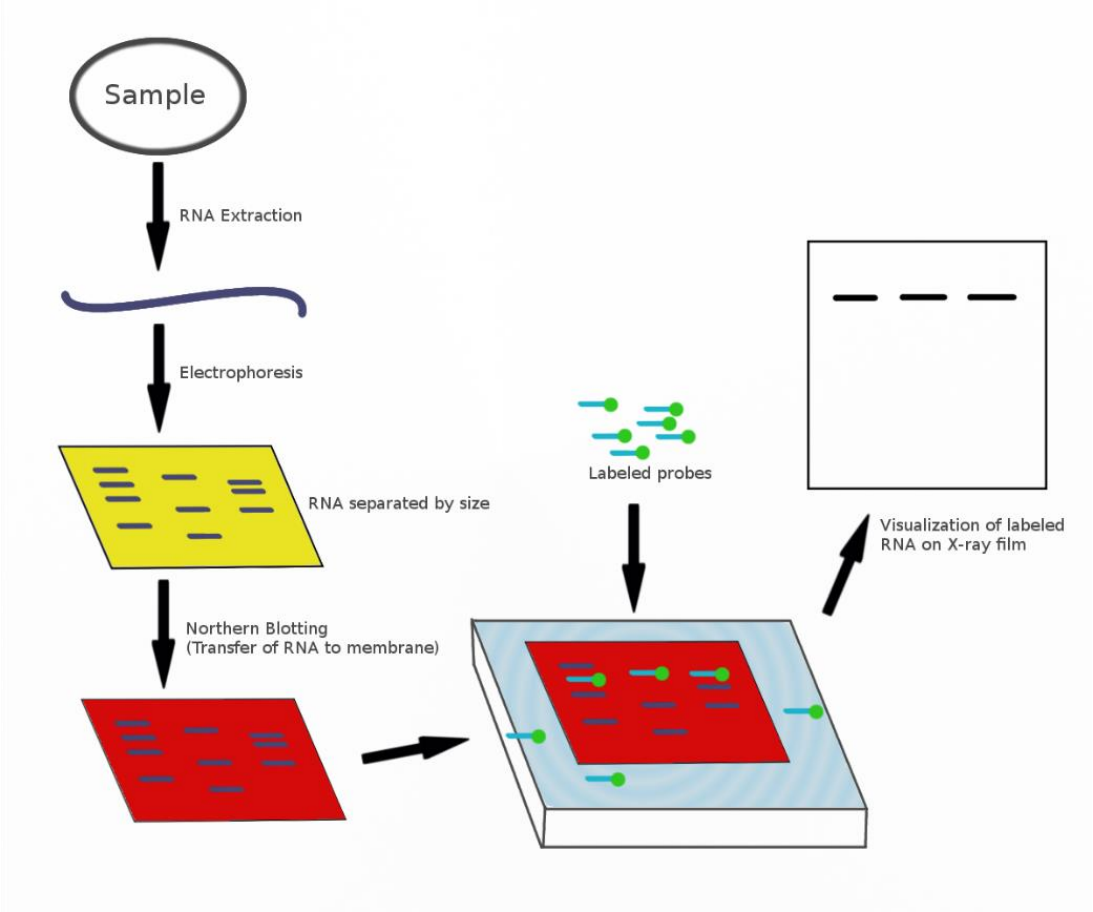
3.3. Detekcija miRNA

S obzirom na važnu ulogu koju miRNA ima u regulaciji gena i biološkoj funkciji, specifična i osjetljiva detekcija miRNA postaje sve važnija. Međutim, kratka duljina sekvence, velika varijabilnost broja kopija po stanici i velika sličnost slijeda nukleotida unutar istih skupina predstavljaju veliki izazov u njihovoj analizi. Proteklih desetljeća uloženi su značajni napori u razvoju novih metoda otkrivanja (Ye i sur., 2019). Postojeće tehnike otkrivanja miRNA mogu se podijeliti u dvije kategorije: tradicionalne metode i nove tehnološke metode. Tradicionalne metode detekcije miRNA uključuju *northern blotting*, analiza mikro zraka i kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze (qPCR). Za nove tehnološke metode, u svrhu poboljšanja osjetljivosti i selektivnosti detekcije miRNA, ove se metode uvijek oslanjaju na strategijama amplifikacije signala, poput amplifikacije na osnovi nano čestica, *rolling circle amplification* (RCA), izotermna eksponencijalna amplifikacija, amplifikacija bez enzima, *hybridization chain reaction* (HCR) i kombinacija ovih strategija amplifikacije (Ye i sur., 2019).

3.3.1. Northern blotting

Northern blotting je standardna i najčešće korištena metoda za otkrivanje miRNA. Može se koristiti ne samo za otkrivanje zrelih miRNA, već i njihovih prekursora. Ne treba specijalizirana oprema. Osnovni princip je sljedeći: uzorak RNA se digestira restrikcijskom endonukleazom, odvoji se elektroforezom na agaroznom gelu, denaturira se i prenese u nitrocelulozni film ili najlonsku membranu prema njegovom položaju u gelu te se fiksira, nakon čega slijedi reakcija s izotopom ili drugom posebno označenom sondom. Nakon ispiranja slobodne sonde, miRNA se može detektirati autoradiografijom ili drugom prikladnom tehnikom (slika 3.3.1.1.) (Pall i sur., 2007).

Relativna molekularna veličina i relativna količina miRNA može se otkriti *northern blotting-om,* ali ova metoda također ima mnoge nedostatke, poput polukvantibilne, male propusnosti, nezgrapnosti, dugotrajnosti i jednostavne degradacije RNA. Kao rezultat, zahtijeva strogo eksperimentalno stanje. *Northern blotting* ima nisku osjetljivost zbog koje se RNA male molekulske mase ne mogu detektirati (Ye i sur., 2019). Specifične sonde označene radioizotopima povećavaju osjetljivost, ali istovremeno povećavaju i rizik od reakcije.



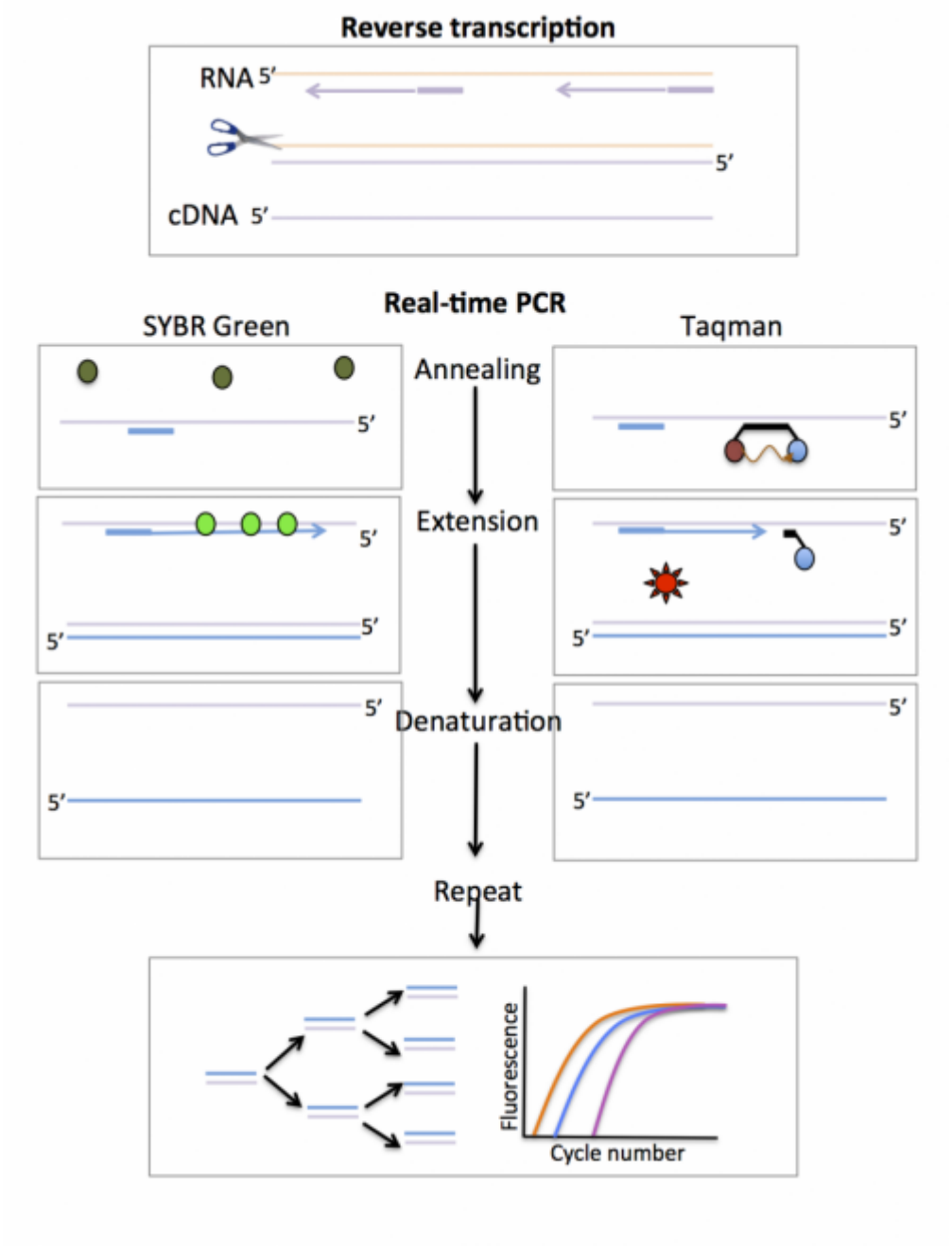
Slika 3.3.1.1. Northern blotting

Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Northern_blot - pristup 18.8.2020.

3.3.2. Real-time qPCR

Real-time qPCR postao je rutinska i pouzdana tehnika za otkrivanje ekspresije miRNA zbog velikog dinamičkog raspona, visoke osjetljivosti i visoke specifičnosti sekvenci. Ciljana miRNA se prebacuje u komplementarnu DNA (eng. *complementary DNA*, cDNA) reverznom transkripcijom (Gan i sur., 2011). Nakon toga se provodi PCR za postizanje detekcije fluorescencije u realnom vremenu. Za sintezu cDNA reverznom transkripcijom obično se koristi *stem-loop* primer, poli (T) adapter ili genski specifični primer (GSP) koji uključuje sekvencu repa (*tail*), dok se dvije fluorescentne metode koriste za praćenje miRNA qPCR: metoda *TaqMan* sonde i metoda *SYBR Green* fluorescentne boje (slika 3.3.2.1.). *SYBR Green* je interkalirajuća (koja se umeće između) fluorescentna boja između dsDNA, veže se za dsDNA i povećava fluorescentni signal za 800-1000 puta. Međutim, *SYBR Green* ne može prepoznati nespecifične proizvode kao što su dimeri primera, što smanjuje točnost qPCR kvantifikacije specifičnih amplificiranih produkata. Analiza krivulje disocijacije koristi se za praćenje homogenosti produkata qPCR-a. Vrijednost Tm dsDNA ovisi o njegovoj duljini i sastavu baze, dok broj točaka sjecišta na krivulji taljenja ukazuje na broj PCR proizvoda, uključujući dimere primera. Stoga bi prihvatljiva krivulja disocijacije trebala imati samo jednu točku sjecišta, dok višestruke točke presjeka označavaju prisustvo nespecifičnih proizvoda. Sonde *TaqMan* su oligonukleotidne sonde označene s željenom skupinom na svom 5' kraju i fluorescentnom skupinom na 3' kraju, čija su mjesta vezanja između dva primera. Dimeri primera ili drugi nespecifični amplikoni u ovoj metodi neće proizvoditi fluorescentni signal. *TaqMan* metoda ima veću specifičnost i obnovljivost od *SYBR Green* metode (Benes i Castoldi, 2010).

Real-time qPCR vrlo je osjetljiva metoda, ali njezino davanje lažnih pozitiva i poteškoće u dizajniranju primera ograničavaju upotrebu ove metode. Točna kvantifikacija qPCR-a u stvarnom vremenu ovisi o međusobnoj povezanosti više koraka, a svaki korak se mora optimizirati. Za dobivanje smislenih i ponovljivih rezultata potrebno je uzeti u obzir nekoliko parametara kao što su ekstrakcija RNA, kontrola integriteta RNA, sinteza cDNA, dizajn primera, detekcija amplikona i normalizacija podataka (Ye i sur., 2019).

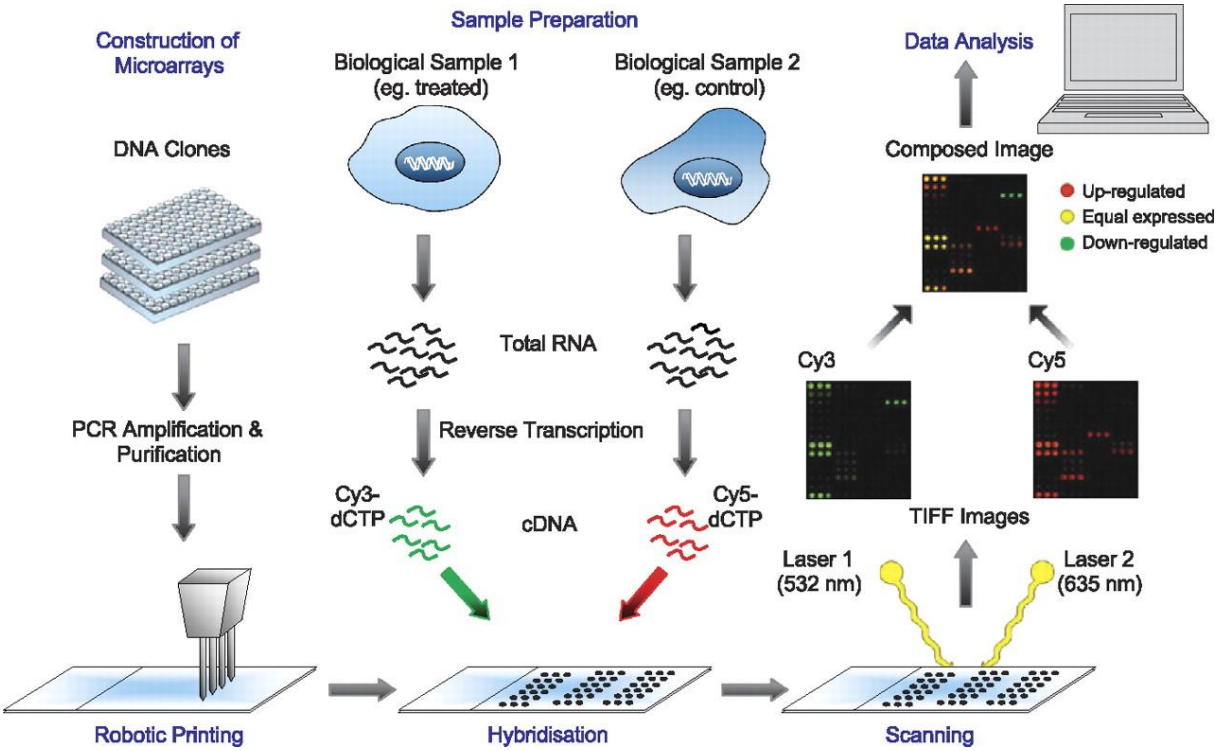


Slika 3.3.2.1. Real-time qPCR

Izvor: https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/functional-genomics-ii-common-technologies-and-data-analysis-methods/real-time-pcr - pristup 18.8.2020.

3.3.3. Tehnologija mikro zraka

Mikro zrake su najčešće korištena metoda za brzo i visoko propusno otkrivanje miRNA. Za ovu metodu, uzorak RNA se dobiva reverznom transkripcijom korištenjem obilježene sonde, a fluorofori ili cDNA označena biotinom se detektiraju korištenjem oligonukleotida u čvrstoj fazi koji imaju isti slijed kao ciljana miRNA (Li i Ruan, 2009). Označeni cDNA uzorak se nanosi u svaku jažicu, nakon čega slijedi niz koraka pranja za uklanjanje slobodne DNA (slika 3.3.3.1.). Ako je hibridizirana cDNA biotinilirana, fluorofor obilježen streptavidinom (protein sa visokim afinitetom za biotin) može se označiti; a ako je cDNA označena fluoroforom, intenzitet fluorescencije svake jažice može se izravno izmjeriti. Intenzitet fluorescencije svake jažice može se koristiti za određivanje razine ekspresije miRNA. Iako mikro zrake mogu analizirati tisuće uzoraka dnevno, trošak je vrlo visok. Kod ove metode prekratka miRNA i miRNA s malim brojem kopija ne može se otkriti, a specifičnost analize miRNA s sličnim sekvencama nije tako dobra (Li i Ruan, 2009).



Slika 3.3.3.1. Mikro zrake

Izvor: https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/130/1/1300001.xml - pristup 18.8.2020.

3.3.4. Detekcija miRNA bazirana na nano česticama

Nanostrukturirano zlato, poput nanočestica zlata (AuNP) i nakupina zlata, najčešće se primjenjuje u razvoju analitičkih metoda. Kolorimetrijski testovi temeljeni na AuNP-u, bez potrebe za naprednim instrumentima, nude ekonomičnu, brzu i prikladnu opciju za otkrivanje miRNA (Li i sur., 2016). AuNP igraju važnu ulogu u izradi senzornog supstrata za vezanje ciljanih sondi putem Au – S veze. Ciljano aktivirana agregacija AuNP rezultira promjenom boje otopine AuNP iz crvene u ljubičastu (Ye i sur., 2019), kao odgovor na apsorpciju plazmonske rezonance dispergiranih i agregiranih nanočestica, što je osnova za optičku detekciju.

Srebrni nanoklasteri (AgNC), posjeduju intrinzična svojstva: visoka biokompatibilnost, fotostabilnost, prilagodljiva luminiscencija te su subnanometarske veličine. Za razliku od AuNP-a, uporaba DNA-AgNC-a izbjegava kovalentnu vezu između AgNC-a i indikatora. Razlog je taj što se ti AgNC-i mogu „osvijetliti“ sa 500-puta jačom fluorescencijom nakon što se postave u neposrednu blizinu s sekvencama bogatih gvaninom (Ye i sur., 2019). Neke izotermne strategije amplifikacije koje uključuju enzime razvijene su za postizanje osjetljive detekcije miRNA. Međutim, AgNC su osjetljivi na okolne proteinske enzime i pridružene uvjete enzimske reakcije, što može rezultirati lošom ponovljivošću. Kako bi se prevladao nedostatak, u otkrivanje povezano s AgNC uvedeni su postupci amplifikacije bez enzima. Na taj način poboljšana je osjetljivost i selektivnost metoda s boljom stabilnošću.

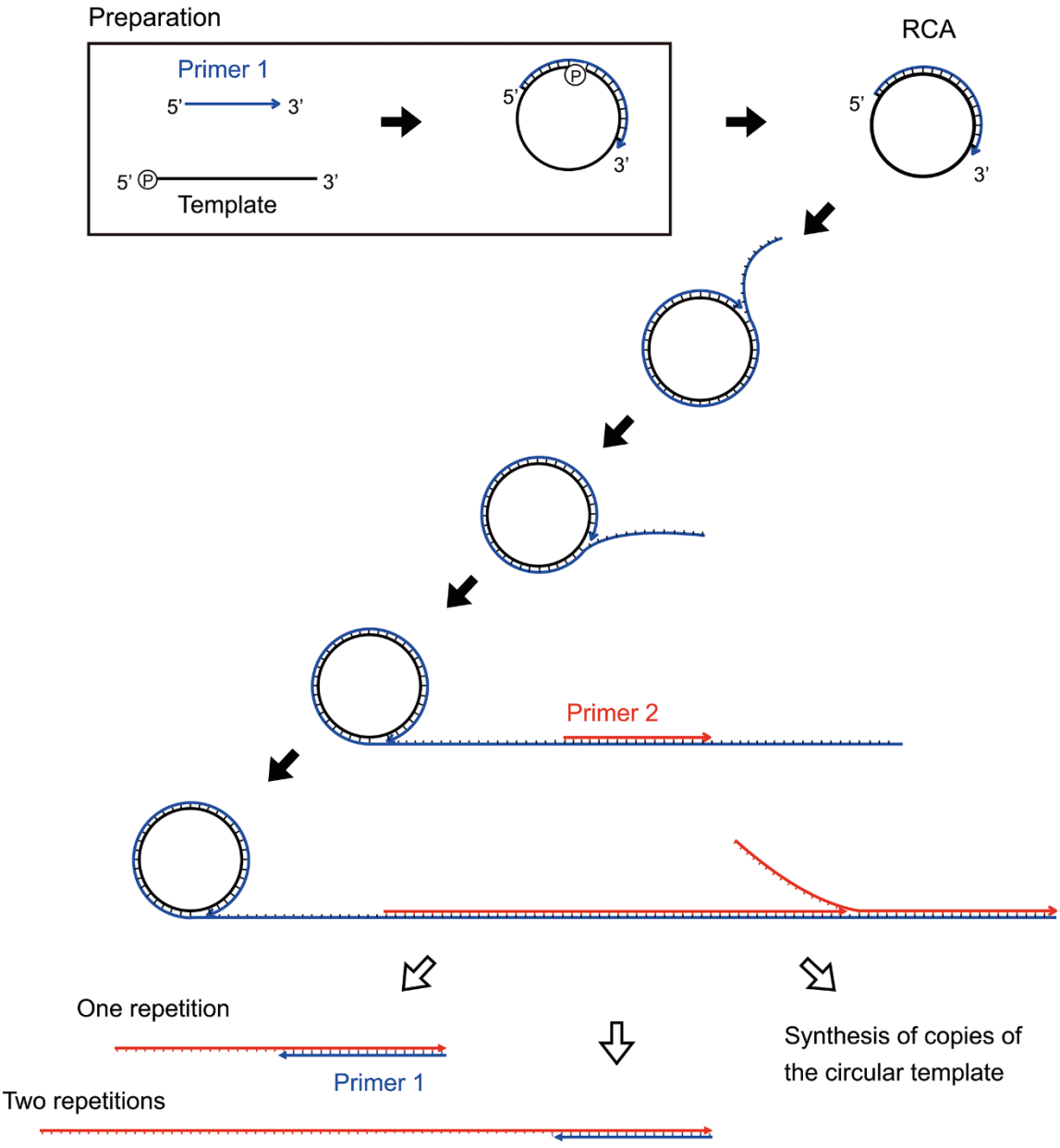
Nanostrukturirani bakar poput bakrenih nanočestica (CuNP), ima prednost u odnosu na AuNP i AgNC zbog svoje brze i jednostavne sinteze. Osim toga, CuNP pokazuje netoksičnost i biokompatibilnost, što omogućuje upotrebu u analizi bioloških uzoraka (Qing i sur., 2013).

U posljednje vrijeme naširoko se primjenjuju ugljikovi nanomaterijali u otkrivanju miRNA, uglavnom uključujući grafen i ugljikove nanocjevčice (eng. *carbon nanotubes*, CNTs). Bolji su od ostalih materijala u svojstvima: tvrdoća, mehanička svojstva, otpornost na toplinu i električna vodljivost. Tijekom ovih godina iskorišteno je mnoštvo miRNA senzora koji se temelje na ugljiku (Jacobs i sur., 2010). Međutim, učinkovitost u biološkom okruženju ovih senzora je zadovoljavajuća zbog slabe topljivosti elementarnog ugljika. Iz tih razloga, grafen oksid (GO) postaje široko korišten materijal elektroda, čija površina posjeduje mnoge karboksilne kiseline i hidroksilne skupine radi poboljšanja njegove topljivosti u vodi. Mnoge strategije su GO uključile u dizajn biosenzora za otkrivanje miRNA. Kako bi se zadovoljila potreba za imobilizacijom bioloških molekula s visokom biološkom aktivnošću, korišteni su CNT-ovi zbog velikog omjera površine i energije privlačenja između cijevi (Jacobs i sur., 2010).

Osim već spomenutog, sve je veći broj modificiranih nanočestica (TiO2-α-Fe2O3 heterojunkcija, NCS / Mo2C nano-kompleks itd.) S različitim značajkama koje nude nove strategije za otkrivanje miRNA i drugih biomolekula u raznim sustavima (Ye i sur., 2019).

3.3.5. Rolling circle amplification (RCA)

RCA postaje sve popularniji u otkrivanju miRNA zbog svoje jednostavnosti, specifičnosti i visoke osjetljivosti. U većini slučajeva, miRNA djeluje kao ligacijski predložak, a sonda će se hibridizirati s ciljanom miRNA. Sonda se ligira s T4 RNA ligazom ili SplintR enzimom, tvoreći kružnu ssDNA, nakon čega slijedi produženje oko kružne ssDNA s vanjskim primerom ili s samom miRNA, ovo istiskuje sjedinjenu miRNA te se nastavlja proizvodnja dugih produkata nukleinske kiseline (slika 3.3.5.1.). Proizvodi nukleinske kiseline mogu se otkriti različitim tehnikama očitavanja signala, kao što su fluorescencija, kolorimetrija, elektrokemija, elektrokemiluminiscencija, SERS i LAMP (Ye i sur., 2019).

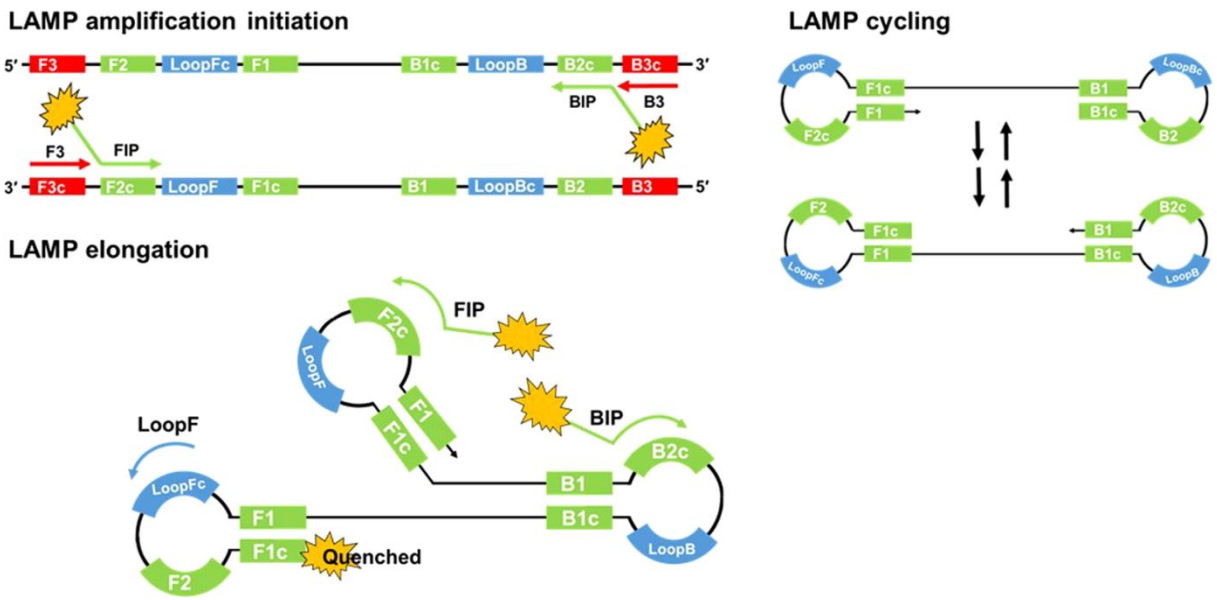


Slika 3.3.5.1. Rolling circle amplification

Izvor: https://journals.plos.org/plosone/article/figure?id=10.1371/journal.pone.0136532.g001 - pristup 18.8.2020.

3.3.6. Izotermna eksponencijalna amplifikacija

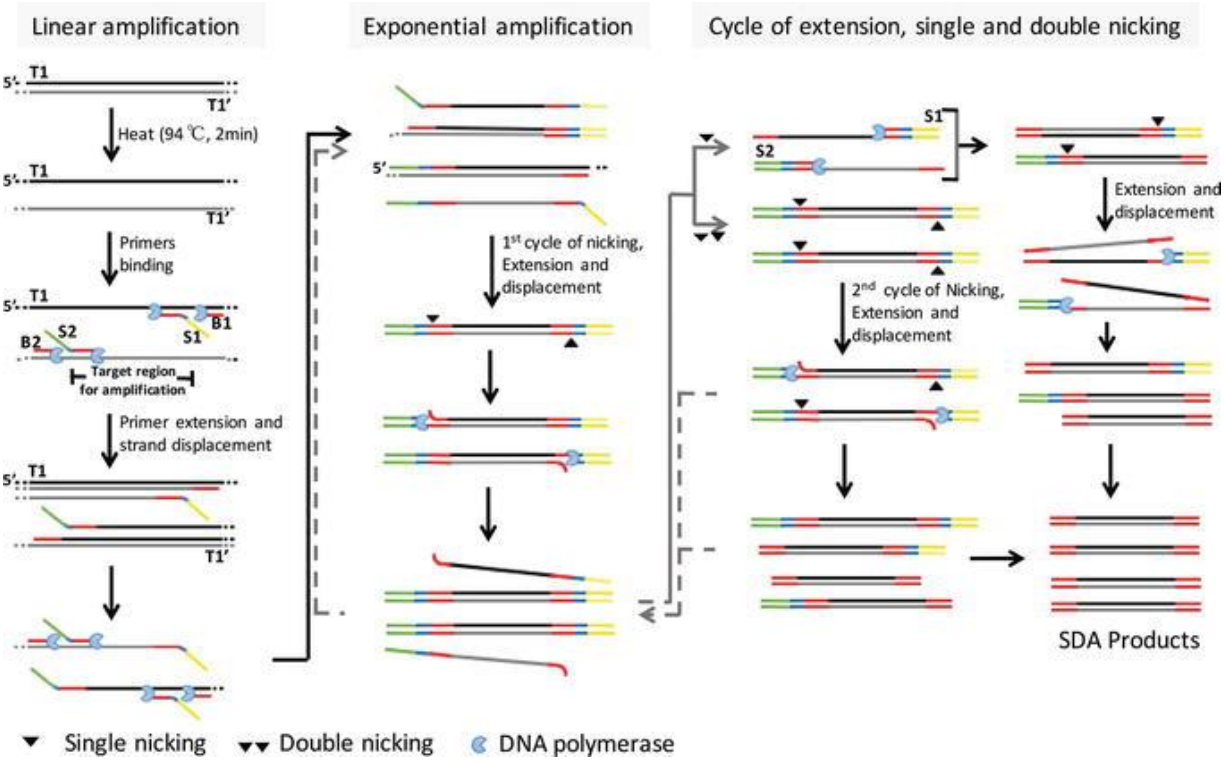
Dvije najkorištenije metode koje se oslanjaju na izotermnu eksponencijalnu amplifikaciju su LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) i SDA (*strand-displacement amplification*) (Ye i sur., 2019). LAMP je izotermalna reakcija koja se obično koristi za amplifikaciju DNA i RNA, a koja pokazuje veliku osjetljivost kao rezultat eksponencijalnog svojstva amplifikacije. Koriste se 4-6 različitih primera kako bi se istovremeno identificiralo 6–8 različitih ciljnih sekvenci, čime se poboljšava selektivnost. U većini slučajeva miRNA djeluje kao okidač za pokretanje reakcije. Samo uz prisutnost ciljane miRNA, primeri mogu provesti produženje i sintezu razdvojenih lanaca uz pomoć DNA polimeraze (slika 3.3.6.1.). U detekciji miRNA zasnovane na LAMP-u, dizajn sonde može biti prilično kompliciran jer LAMP predložak sadrži 4–6 unaprijed definiranih sekvenci za formiranje matičnih petlji (*stem-loop*), koje smanjuju osjetljivost metode zbog učinka sinergističke hibridizacije i produljenja više primera duž dugih lanaca koji služe kao predlošci (Li i sur., 2011). Slično kao u PCR-u, glavni nedostatak LAMP-a je uporaba metoda neizravne procjene, kao što je SYBR Green I boja, taloženje i hidroksinaftol plava boja, koje nisu u stanju razlikovati željene proizvode od nespecifičnih proizvoda, što dovodi do lažnih pozitivnih rezultata. Još uvijek postoji prostor za naknadnu ugradnju primera i detekcijskih sondi koje se mogu prilagoditi potrebama detekcije.



Slika 3.3.6.1. LAMP

Izvor: https://www.nature.com/articles/s41598-019-43817-z?proof=trueInJun – pristup 18.8.2020.

SDA je vrsta izotermalne reakcije. Budući da se miRNA (opća uloga kao predložak) reciklira u reakciji na osnovi produljenja razdvojenih lanaca polimerazom, obično se dobiva linearna amplifikacija (slika 3.3.6.2.). Općenito, konvencionalna uporaba enzima koči SDA od šire primjene budući da reakcije posredovane enzimima ograničavaju mnogi faktori kao što su temperatura i ionski sastav. Stoga je razvoj transformacijskih SDA metoda i drugih metoda amplifikacije bez enzima od presudne važnosti (Shi i sur., 2014).



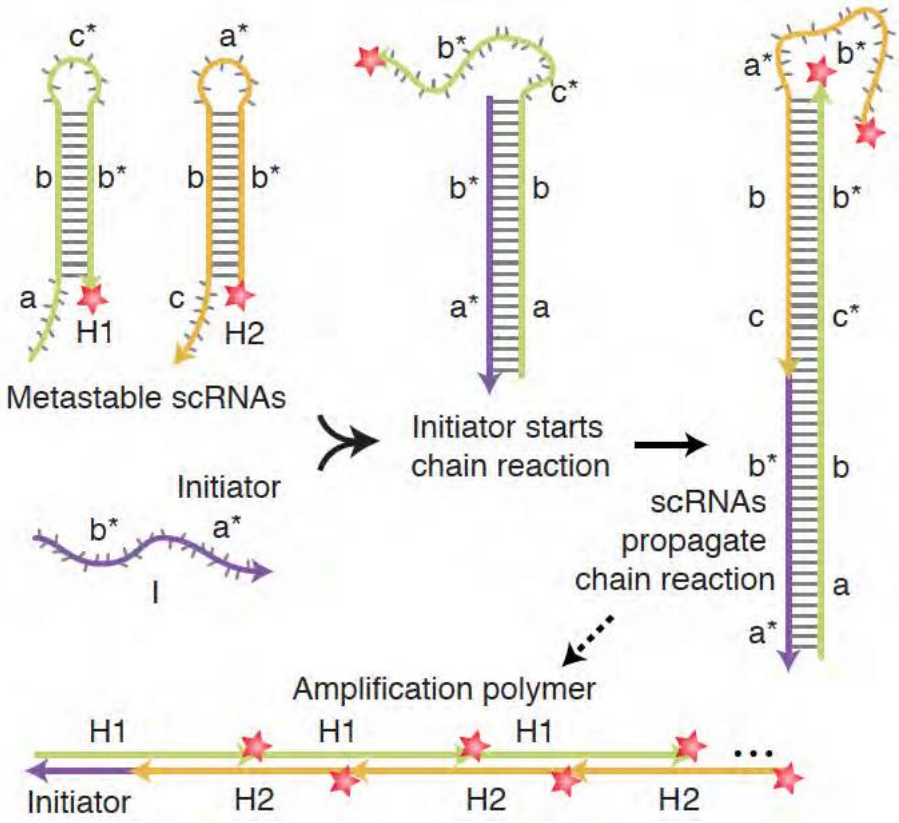
Slika 3.3.6.2. SDA

Izvor: https://www.intechopen.com/books/modulating-gene-expression-abridging-the-rnai-and-crispr-cas9-technologies/strand-displacement-amplification-for-multiplex-detection-of-nucleic-acids – pristup 18.8.2020.

3.3.7. Amplifikacija bez enzima

U reakciji amplifikacije bez enzima, miRNA obično djeluje kao okidač za pokretanje procesa razdvajanja lanaca jedne ili više DNA petlji vođeno negativnom promjenom slobodne energije tijekom formiranja baznih parova. Posljednjih godina razvijene su mnoge metode amplifikacije bez enzima za otkrivanje i snimanje miRNA na temelju hibridizacijske lančane reakcije (eng. *hybridization chain reaction*, HCR), katalitičkog sastavljanja petlje (eng. *catalytic hairpin assembly*, CHA) i katalitičke entropije (Zhou i sur., 2019).

HCR je tehnika bez enzima, djelotvorna pri sobnoj temperaturi i brze linearne amplifikacije te se koristi za kratke sekvence oligonukleotida. Dvije različite molekule DNA petlji s različitom kinetičkom energijom koje imaju djelomično komplementarne segmente se aktiviraju pomoću indikatorske DNA te se pokreće autonomna hibridizacija pri kojoj se obje petlje raspuste te se sastave u dugački dvolančani amplifikacijski polimer (slika 3.3.7.1.). Tipično, HCR koristi dvije molekule DNA petlji kako bi se postiglo značajno smanjenje pozadinskog šuma (Cai i sur., 2014). HCR produkti su jako dobro raspoređeni dvostruki heliksi DNA, što omogućuje da se signalne molekule mogu povezati na dvostruki heliks s točno kontroliranom gustoćom, što je korisno za učinkovitost amplifikacije. Učinkovitost amplifikacije pomoću HCR-a ovisi o naizmjeničnom autonomnom sklapanju dviju petlji koje služe kao sonde, što ovaj postupak čini korisnim lako razgradive ciljeve, poput miRNA (Ye i sur., 2019).



Slika 3.3.7.1. HCR

Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hybridization_Chain_Reaction_(HCR)_mechanism.png – pristup 18.8.2020.

Katalitičko sastavljanje petlje (CHA) ima dobre mogućnosti primjene zbog svoje mogućnosti amplifikacije signala, zanemarive interferencije u pozadini i svestranosti koja omogućuje kombiniranje s različitim signalnim strategijama (Ye i sur., 2019).

Za razliku od CHA i HCR, katalitička reakcija vođena entropijom vodi se termodinamički putem entropijskog dobitka nastalih slobodnih molekula bez promjene ukupnog broja baznih parova, što je brže, bolje razvijeno te stabilnije od dizajna temeljenog na petljama i mogu se izbjeći nepotrebne pozadinske interferencije zbog kompliciranе sekundarne strukture petlji u molekulama DNA (Ye i sur., 2019).

3.3.8. Kombinacija amplifikacijskih metoda

Kako bi se postigla dobra izvedba detektiranja, znanstvenici uvijek kombiniraju nekoliko metoda amplifikacije. Postoje uglavnom tri prednosti kombinacijskih strategija. Prvo, omogućuje obogaćivanje ciljnih molekula u tragovima prije analize kako bi poboljšala osjetljivost metode. Drugo, izbjegava se upotreba tradicionalnih oznaka ili enzima, što pojednostavljuje postupak i smanjuje troškove. Treće, sudjelovanje elektrokemijskih senzora i biosenzora koji se temelje na nanomaterijalima pomaže učinkovito smanjivanje pozadinskih šumova (Ye i sur., 2019).

3.4. Određivenje polimorfizama kod transpondirajućih elemenata

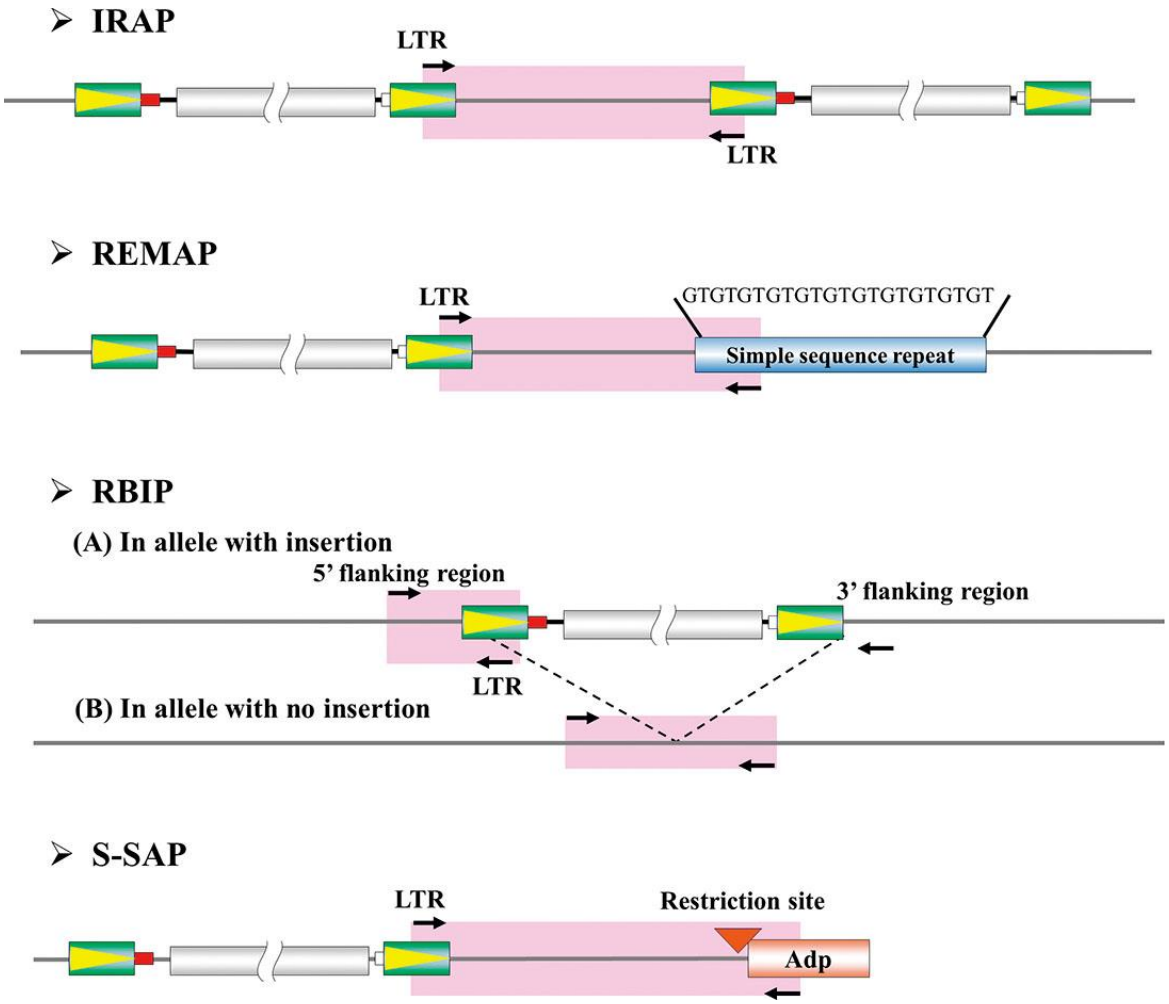
Mnogi retrotranspozoni su insertirani po cijelome genomu te se genetski nasljeđuju, proučavanjem polimorfizmama između sorata kultura razvijeni su molekularni markeri za filogenetsku analizu i studije genetske raznolikosti (Yuki i Makoto, 2015). Najvažniji molekularni markeri bazirani na polimorfizmima insertiranih retrotranspozona su: *inter-retrotransposon amplification polymorphism* (IRAP), *retrotransposon microsatellite amplification polymorphism* (REMAP), *retrotransposon-based insertion polymorphism* (RBIP) i *sequence-specific amplified polymorphism* (S-SAP) (slika 3.4.1.).

IRAP i REMAP tehnike otkrivaju duge ponavljajuće sekvence LTR (*long terminal repeats*) polimorfizme na insercijskim mjestima retrotranspozona. Dok IRAP amplificira intervenirajuću genomsku regiju između dvije LTR sekvence dizajnirajući jedan ili dva PCR primera specifičnih za LTR sekvence (Antonius-Klemola i sur., 2006), REMAP amplificira DNA segment između LTR sekvence i SSR-a (*simple sequence repeat*) koristeći kombinacije LTR specifičnog i SSR (poput (GA)n ili (CT)n sekvence) specifičnog primera. Iako obje tehnike rezultiraju s većim brojem pouzdanih i ponovljivih *bandova*, zahtijevaju karakterizaciju LTR sekvenci prije nego što se nastavi s razvojem markera. Prema tome, dostupnost ovih metoda ovisi o tome jesu li okarakterizirane prikladne LTR sekvence (Yuki i Makoto, 2015).

RBIP markeri ciljaju jednu inserciju retrotranspozona na određenom mjestu primjenom PCR primera za bočna područja pojedinog mjesta umetanja. U slučaju alela s insertiranim retrotranspozonom, genomska regija se amplificira pomoću setova LTR specifičnih primera i primera specifičnih za bočne regije, a amplifikacija se ne detektira na primerima 5' i 3' bočnih regija jer je čitavi LTR retrotranspozon obično dugačak više tisuća baza (Yuki i Makoto, 2015). Suprotno tome, alel koji ne sadrži insertirani retrotranspozon stvara PCR *band* s primerima 5' i 3' bočnih regija. Taj se marker može upotrijebiti kao kodominantni marker koristeći tri seta specifičnih primera (LTR-, 5' i 3' bočne regije) na svakom insercijskom mjestu, a genotipizacija se može provesti na temelju prisutnosti ili nedostatku pojedinih insercija. Međutim, ova metoda zahtijeva ne samo LTR sekvence već i sekvence 5' i 3' bočnih regija za razvoj markera (Flavell i sur., 1998).

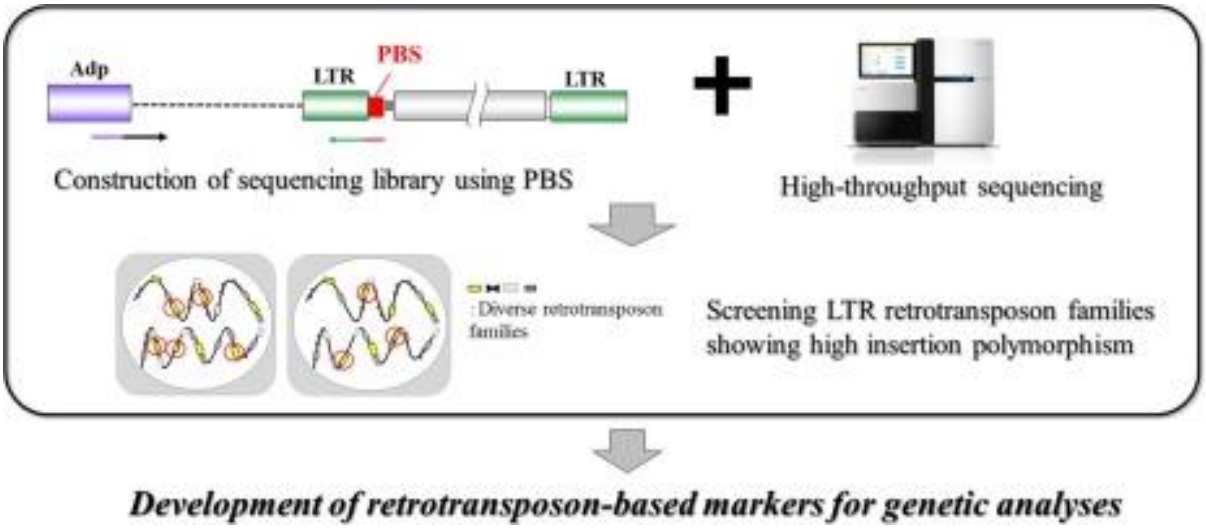
Princip rada S-SAP, nakon digestije genomske DNA restrikcijskim enzimima, adapter se ligira na digestirane fragmente DNA. PCR amplifikacija S-SAP-a se radi s kombinacijom primera specifičnih za LTR sekvencu i za sekvence adaptera. U jednoj reakciji, ova metoda otkriva polimorfizam udaljenosti između mjesta insercije TE i najbližeg mjesta rezanja restrikcijskog enzima, prikazuju brojne polimorfne *bandove*, pri čemu svaki *band* predstavlja pojedinačnu inserciju (Yuki i Makoto, 2015). U tim metodama je moguće detektirati različita mjesta insercije u genomu odabirom restrikcijskih enzima i prilagođavanjem broja generiranih *bandova* pomoću PCR primera koji sadrže selektivne baze. Prije primjene ovih metoda potrebno je odrediti LTR ili DNA transpozonske terminalne sekvence. Dakle, sve gore navedene tehnike uglavnom se oslanjaju na dostupnost LTR sekvenci. LTR sekvence su klonirane PCR amplifikacijom sačuvanih retrotranspozonskih domena koje kodiraju proteine, kao što su reverzna transkriptaza (RT) i integraza (INT), koristeći degenerirane primere sekvenci praćene genomom koji ide prema LTR (Konovalov i sur., 2010). Ovaj postupak može biti zahtjevan i dugotrajan. Još važnije, polimorfizam insercije kloniranog LTR-a među kultivarima također se mora istražiti jer se LTR sekvence koje ne pokazuju visoku razinu

polimorfizama insercija među kultivarima ne mogu koristiti za razvoj markera (Yuki i Makoto, 2015).



Slika 3.4.1. molekularni markeri bazirani na polimorfizmima insertiranih retrotranspozona
Izvor: Yuki i sur. (2015)

Inter - primer binding site (iPBS) amplifikacija je metoda za identificiranje različitih LTR sekvenci i izravno vizualiziranje njihovih polimorfizama među kultivarima (Yuki i sur., 2014). iPBS amplifikacija se bazira na gotovo univerzalnoj prisutnosti komplementarne tRNA kao reverzne transkriptaze na mjesto vezanja početnice kod LTR retrotranspozona (Kalendar i sur., 2010). Ova se metoda usredotočuje na PBS regiju koja je uz 5' LTR te je očuvana u različitim LTR retrotranspozonskim porodicama (slika 3.4.2.). Budući da se tRNA veže na PBS regiju da inicira reverznu transkripciju, PBS sekvenca je komplementarna 3' terminalnoj sekvenci tRNA i sačuvana je u gotovo svim LTR retrotranspozonskim porodicama, uz nekoliko iznimaka (Yuki i sur., 2014). Dakle, dizajniranje PCR primera u ovoj regiji daje DNA fragmente koji sadrže različite LTR sekvence, uključujući neautonomne elemente kao što su TRIMs i LARDs kojima nedostaju regije koje kodiraju proteine. Ranije metode za kloniranje LTR sekvenci oslanjaju su na sačuvanu protein-kodirajuću domenu, poput reverzne transkriptaze i integraze, i zahtijevaju genomsko hodanje do LTR-a, što ograničava pregled autonomnih elemenata. Stoga, metoda iPBS ima nekoliko prednosti za *screening* različitih LTR sekvenci i provođenje *DNA fingerprintinga* (Yuki i sur., 2014).

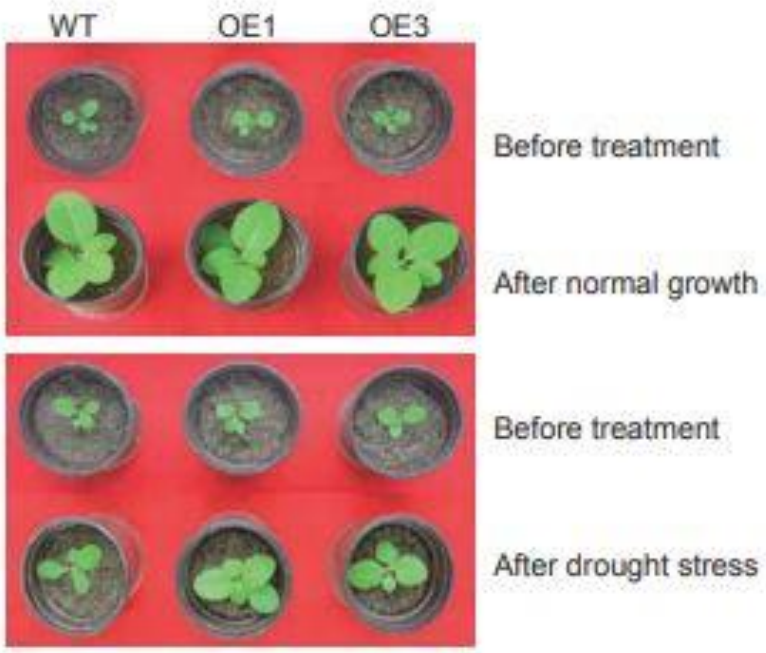


Slika 3.4.2. Razvoj markera pomoću iPBS amplifikacije
Izvor: Yuki i sur. (2014)

4. Epigenetske promjene nastale pod utjecajem stresa suše

4.1. Obična pšenica (*Triticum aestivum*)

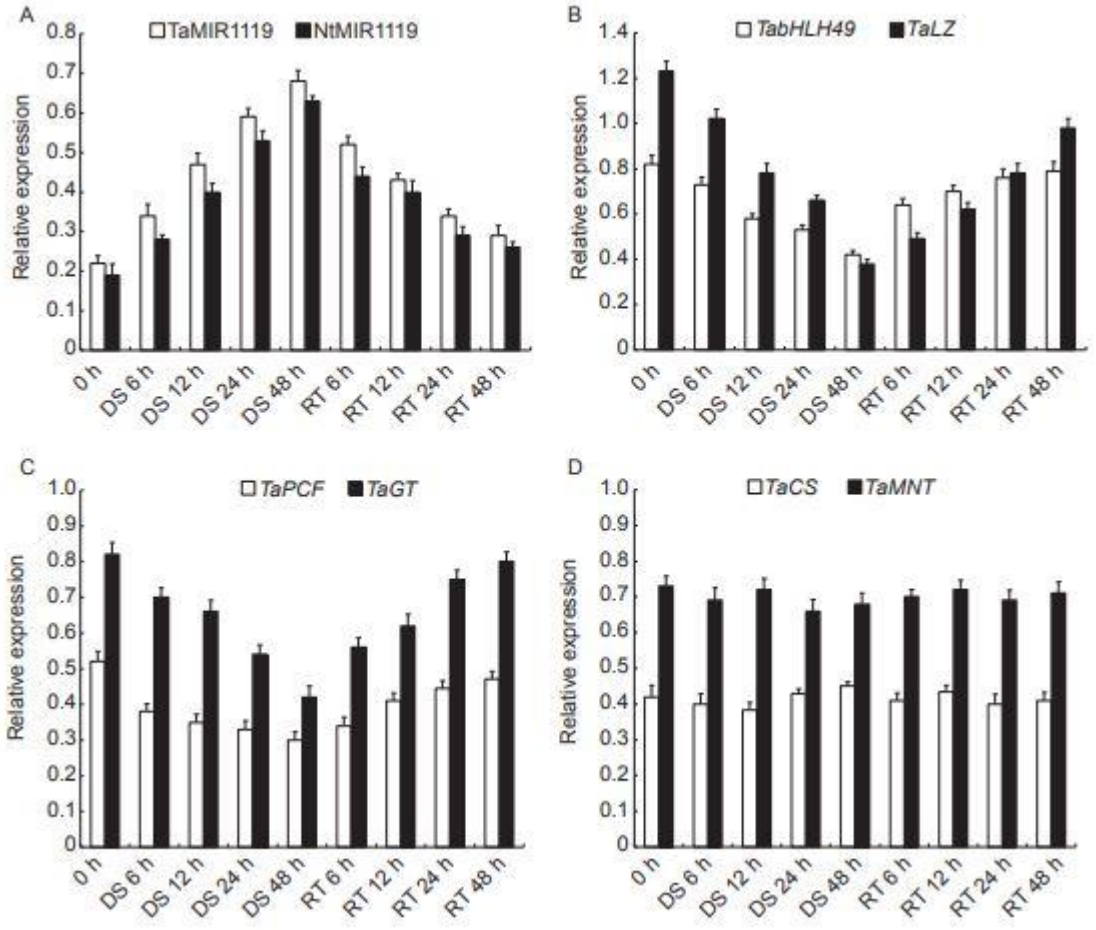
Reguliranjem ciljnih gena pomoću mehanizama posttranskripcijskog cijepanja ili translacijske represije, biljne miRNA molekule su uključene u različite biološke procese povezane s rastom, razvojem i reakcijama na abiotski stres. Shi i sur. (2018) u svom istraživanju su opisali funkciju TaMIR1119, molekula miRNA koju posjeduju članovi porodice pšenice (*Triticum aestivum*), u reguliranju biljnih reakcija na sušu. Pretpostavljaju da TaMIR1119 regulira šest gena razvrstanih u funkcionalne klase transkripcijske regulacije, RNA i biokemijskog metabolizma, transporta i oksidativne zaštite od stresa. Sadnice pšenice (sorta 'Shiyou 20') i duhana (sorta 'Wisconsin 35'), kod kojega je NtMIR1119 homolog TaMIR1119, su hidroponski uzgojene u standardnoj MS otopini do stadija tri izrasla lista, tada su prebačene na modificiranu otopinu MS-a dopunjenu s PEG 6000 (10%, w/w) za tretman simuliranja suše. Nakon 48 h tretmana, dio sadnica je premješten na standardnu MS otopinu na tretman oporavka. Korijenska tkiva sakupljana su u vremenskim intervalima od 0 (prije tretmana), 6, 12, 24 i 48 sati nakon stresa od suše te također 6, 12, 24 i 48 h nakon tretmana za oporavak. Transkripti TaMIR1119 i ciljani geni u uzorcima su procijenjeni na osnovu qRT-PCR-a. Kako bi dokazali svoju hipotezu, Shi i sur. su genetskim inženjeringom dobili linije koje imaju povećanu ekspresiju TaMIR1119. Dvije transgenične linije označene kao OE1 i OE3 su posjedovale mnogo više transkripata TaMIR1119 u T3 generaciji od ostalih transgeničnih linija, te su stoga odabrane za daljnju analizu miRNA u modulaciji biljne reakcije na sušu. Za analizu su uzgajane jednake sadnice stare 10 dana na vermikulitu, transgenične linije i divlji tip, te su redovito opskrbljivane sa standardnom MS otopinom (normalan rast, kontrola) ili sa otopinom MS dopunjene s 10% polietilen glikolom za tretman simuliranja suše. Nakon pet tjedana tretiranja, fenotipovi transgeničnih linija i divljeg tipa su snimljeni pomoću digitalnog fotoaparata (slika 4.1.1.). Suha tvar biljne biomase utvrđena je nakon sušenja u sušioniku. Također je određen sadržaj prolina i topljivih šećera, dva vrlo važna funkcionalna osmolita. Tri parametra koji odražavaju učinkovitost fotosintetske funkcije su bili procijenjeni na listovima transgeničnih linija i divljeg tipa: stupanj fotosinteze (P_n), učinkovitost PSII (ϕPSII) i nefotokemijsko gašenje (eng. *non-photochemical quenching*, NPQ). Kako bi se odredilo da li je TaMIR1119 u suši povezana s drastičnom modifikacijom stanične reakcije na slobodne radikale određena je aktivnost superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i peroksidaze (POD) te sadržaj malondialdehida (MDA), koji djeluje kao biomarker stanične oksidacije pod nepovoljnim uvjetima. Ekspresija gena koji kodiraju za proteine antioksidativnih enzima je određena pomoću qRT-PCR-a.



Slika 4.1.1. Fenotipovi divljeg tipa i transgeničnih linija duhana
Izvor: Shi i sur. (2018)

Prilikom simulacije stresa suše, količina TaMIR1119 transkripata u korijenima se drastično izmijenila, pokazujući da se postupno reguliraju unutar 48-satnog sušnog režima (najveća ekspresija je zabilježena nakon 48 sati) i da se transkripti uzrokovani sušom postupno smanjuju tijekom 48-satnog tretmana oporavka, kada su se vratili u početnu koncentraciju prije samog tretmana (graf 4.1.1. A). Suprotno tome, četiri ciljana gena (*TabHLH49*, *TaLZ*, *TaPCF* i *TaGT*) koji kodiraju za miRNA pokazuju obrnuti obrazac ekspresije u odnosu na TaMIR1119, pokazujući obrazac smanjene ekspresije tijekom suše i čiji su smanjeni transkripti ponovno povišeni tijekom tretmana oporavka (graf 4.1.1. B i C). Ovi rezultati analize ekspresije pokazali su da TaMIR1119 reagira na sušu i regulira ciljane gene uglavnom kroz mehanizam posttranskripcijskog cijepanja. Dva ciljana gena (*TaCS* i *TaMNT*) nisu pokazala promjenu ekspresije tijekom simulirane suše te potom tijekom oporavka, što upućuje da ih TaMIR1119 regulira mehanizmom translacijske represije (graf 4.1.1. D). Pod normalnim uvjetima transgenične linije (OE1 i OE3) pokazale su usporedivi fenotip, biljnu biomasu i fotosintetske parametre: stupanj fotosinteze (P_n), učinkovitost PSII (ϕPSII) i nefotokemijsko gašenje (eng. *non-photochemical quenching*, NPQ) s divljim tipom, što sugerira da TaMIR1119 ne igra ulogu u modulaciji rasta biljaka kod stanja bez stresa. Suprotno tome, pod sušom, OE1 i OE3 pokazale su bolji fenotip, veću biljnu biomasu, jači P_n i ϕPSII, a smanjeni NPQ u usporedbi s divljim tipom.

Graf 4.1.1. Rezultati ekspresije miRNA i ciljanih gena



Izvor: Shi i sur. (2018)

Sadržaj prolina i topljivog šećera, aktivnosti SOD, CAT, POD te sadržaj MDA procijenjeni su u transgeničnim linijama i divljem tipu nakon tretmana sušom. U skladu s fenotipom i biljnom biomasom kao što je gore opisano, transgenične linije su pokazale slični sadržaj prolina i topljivih šećera, sličnu SOD, CAT i POD aktivnost, te sličan sadržaj MDA u usporedbi s divljim tipom u normalnim uvjetima rasta, što sugerira na nepromijenjeni metabolizam osmolita i staničnog oksidativnog stresa u transgeničnim linijama pod normalnim uvjetima. Pod tretmanom suše, međutim, OE1 i OE3 pokazali su više količine osmolita, veće aktivnosti antioksidativnih enzima i manji MDA sadržaj nego biljke divljeg tipa. Ovi rezultati ukazuju na to da je tolerancija na sušu koju posreduje TaMIR1119 povezana s ulogom miRNA u modulaciji metabolizma osmolita i staničnog odgovora na oksidativni stres. Rezultati koje su dobili Shi i sur. (2018) pokazuju da TaMIR1119 igra važnu ulogu u regulaciji tolerantnosti biljaka na sušu kroz transkripcijsko reguliranje ciljanih gena koji moduliraju nakupljanje osmolita, fotosintetsku funkciju i poboljšavaju staničnu obranu od slobodnih radikala.

4.2. Citrusi (*Citrus spp.*)

Neves i sur. (2017) su procijenili fiziološke, molekularne i hormonalne parametre uzajamne interakcije plemke/podloge biljaka citrusa tijekom ponavljajućih razdoblja deficita vode. Promatrano je stanje i razvoj sorte naranče 'Valencia' (VO) kao plemke nacijepljene na dvije sorte mandarine, 'Rangpur Lime' (RL) i 'Sunki Maravilha' (SM), kao podloge s različitim kapacitetima upijanja vode iz tla. Uspoređene su biljke izložene jednom razdoblju deficita vode (WD1) s biljkama koje su izložene po dva (WD2) i tri (WD3) puta razdoblju deficita vode.

Kombinacije VO/RL i VO/SM pokazale su polimorfne promjene na epigenetskoj i hormonalnoj razini. Promjene su bile posebno istaknuti kod VO/SM biljaka koje su bile izložene tretmanu WD3. Nakon uzastopne suše, kombinacija VO/SM razvila je aklimatizacijske karakteristike koje omogućuju veću toleranciju na razdoblja deficita vode povećanjem transpiracije (E), većom stomatalnom provodljivošću (g_s) i većim stupnjem fotosinteze (A).

Značajne razlike u ukupnoj površini lisne površine nisu utvrđene među genotipovima ili tretiranjima. Vodeni potencijal i potencijal vode u listovima ispod -1,5MPa, odnosno -2,0MPa, zabilježen je na kraju svakog tretmana (WD1, WD2 i WD3). Relativni sadržaj vode (RWC) je također bio sličan bez obzira na kombinaciju plemka/podloga. Nakon rehidratacije, obje kombinacije plemke/podloge ponovno su uspostavile svoj RWC i puni lisni potencijal (Ψ_L). Zabilježene su više vrijednosti transpiracije (E), stomatalne provodljivosti (g_s) i stupnja fotosinteze (A) kod VO/RL u odnosu na VO/SM tijekom tretmana WD1. Nije bilo statističkih razlika između biljaka s jednom ili drugom podlogom podvrgnutih tretmanima WD2 i WD3, unutar i između svakog razdoblja deficita vode, što ukazuje na moguću aklimatizaciju biljaka nakon prvog tretmana.

Razina apscizinske kiseline (ABA) u listovima VO/SM cijepova pokazuje značajne razlike između triju tretmana (WD1, WD2 i WD3), s najvišim vrijednostima za WD3 tretman. Biljke izložene više od jednog razdoblja deficita vode (WD2 i WD3) pokazuju veću razinu ABA u usporedbi s biljkama izloženih jednom razdoblju deficita vode (WD1). Sadržaj ABA bio je viši kod VO/SM cijepova za sve tretmane (WD1, WD2 i WD3) u usporedbi s VO/RL cijepovima, s izuzetkom razine ABA u korijenima za WD1. Kod VO/RL cijepova nisu bila značajna odstupanja u razinama ABA promatrane unutar tretmana (WD1, WD2 i WD3), bilo u lišću ili u korijenu (graf 4.2.1. A i D).

U VO/RL cijepovima razine indol-3-octene kiseline (IAA) smanjene su kod biljaka izloženim više puta tretmanu s deficitom vode (WD2 i WD3). Ovo nije zabilježeno u VO/SM cijepovima, kod kojih nisu pronađene značajne razlike između tri tretmana (WD1, WD2 i WD3) (graf 4.2.1. B). U VO/RL cijepovima, razine IAA u korijenu bile su značajno veće kod WD1 i WD3 u odnosu na WD2. Progresivno povećanje razine IAA u korijenu zabilježeno je tijekom WD1, WD2 i WD3 tretmana u VO/SM cijepovima (graf 4.2.1. E).

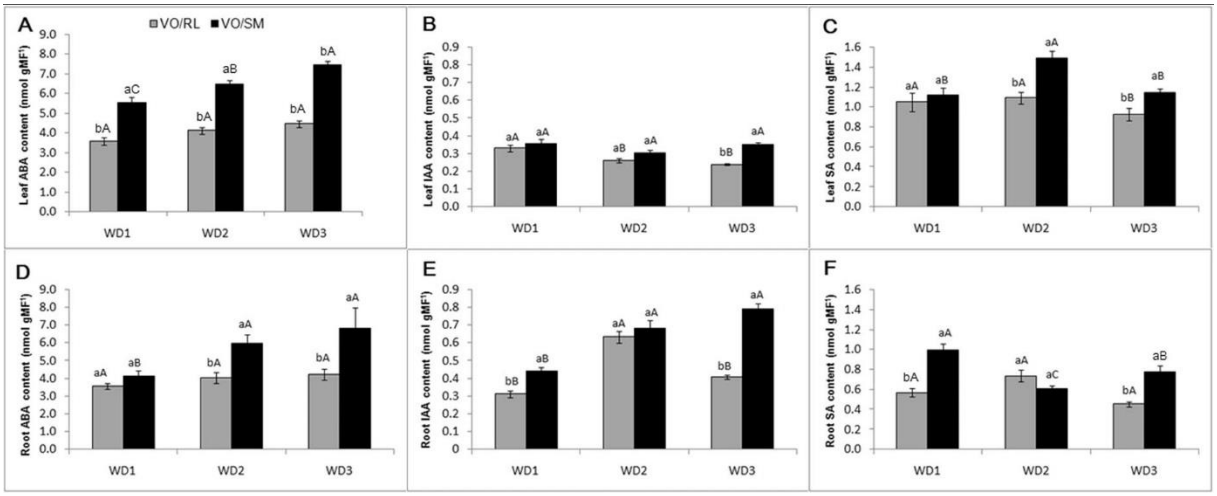
U cijepovima VO/RL, WD1 je rezultirao višom razinom salicilne kiseline (SA) u listovima u usporedbi s WD2 i WD3. Suprotno tome, u VO/RL cijepovima, tretman WD2 rezultirao je višim razinama SA u listovima u odnosu na WD1 i WD3 (graf 4.2.1. C). Nadalje, najviša razina SA u korijenu je zabilježena kod VO/SM cijepova podvrgnutih WD1, dok VO/RL cijepovi nisu pokazali značajnu razliku (graf 4.2.1. F).

Tehnika MSAP (eng. *Methylation Sensitive Amplification Polymorphism*) rezultirala je s ukupno 322 *banda* za VO/RL cijepove i 309 *bandova* za VO/SM cijepove. Kod VO/RL cijepova su dobiveni sljedeći rezultati: 229 metiliranih citozina kod kontrole, 200 metiliranih citozina pod WD1 tretmana, 201 metilirani citozin kod WD2 tretmana i 195 metiliranih citozina kod WD3 tretmana; što ukazuje na smanjenu metilaciju kod biljaka izloženih suši. Suprotno tome, kod VO/SM cijepova su dobiveni rezultati: 153 metiliranih citozina kod kontrolne grupe, 192 metilirana citozina pod WD1 tretmanom, 198 metilirana citozina pod WD2 tretmanom i 192 metilirana citozina pod WD3 tretmanom; što ukazuje na povećanu metilaciju u biljkama izloženih suši.

U cijepovima VO/SM je došlo do povećanja stope polimorfnih *bandova*, posebno u tretmanima WD2 i WD3. Ovo može značiti dodatnu metilaciju citozina tijekom ponavljanih razdoblja deficita vode, sugerirajući hipermetilaciju uzrokovanu sušom. Suprotno tome, u VO/RL cijepovima je došlo do gubitaka metilacije citozina kod kontrolne grupe u usporedbi s grupama u kojima su se ponavljali tretmani sa deficitom vode, sugerirajući hipometilaciju izazvanu sušom kod ovog genotipa.

Ovo istraživanje donosi skup podataka koji sugeriraju da epigenetske promjene u biljkama citrusa potaknute ponavljajućim razdobljima deficita vode dovode do poboljšane tolerancija na sušu.

Graf 4.2.1. Koncetracije hormona u listovima i korijenima VO/RL i VO/SM cijepova

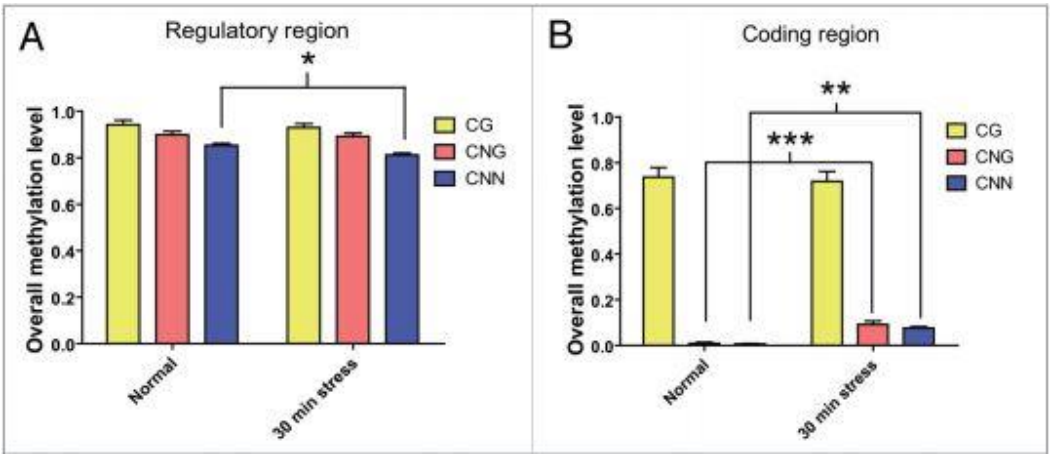


Izvor: Neves i sur. (2017)

4.3. Rajčica (*Solanum lycopersicum*)

González i sur. (2013) su proučavali gen rajčice *Asr2*, gen koji kodira protein, raširen u biljnom carstvu. Istraživali su status metilacije citozina kod gena *Asr2* u korijenu rajčice tijekom stresnih uvjeta deficita vode pomoću qRT-PCR-a. Pronašli su 3 vrste (CG, CNG i CNN) metiliranih citozina u regulatornom području gena *Asr2*. Nakon grupiranja rezultata prema svakom tipu metilacije zaključeno je da postoje znatne razine triju tipa metilacija (CG, CNG i CNN) u toj regiji u uvjetima bez stresa. Nakon stresa je došlo do malog, ali značajnog smanjenja cjelokupne CNN metilacije (na 77 od 142 mjesta) (graf 4.3.1. A). Također je pronađena jedna vrsta (CG) metiliranih citozina u samom genu (kodirajućoj regiji). Metilacija je pronađena na nekoliko postojećih CG mjesta pod oba uvjeta (sa stresom i bez stresa). Nasuprot tome, pronađeno je vrlo malo metiliranih CNG-a i CNN-a (koji su mnogo više zastupljeni u kodirajućem dijelu gena od CG) u normalnim i stresnim uvjetima (graf 4.3.1. B).

Graf 4.3.1. Razina metilacije u regulatornoj i kodirajućoj regiji



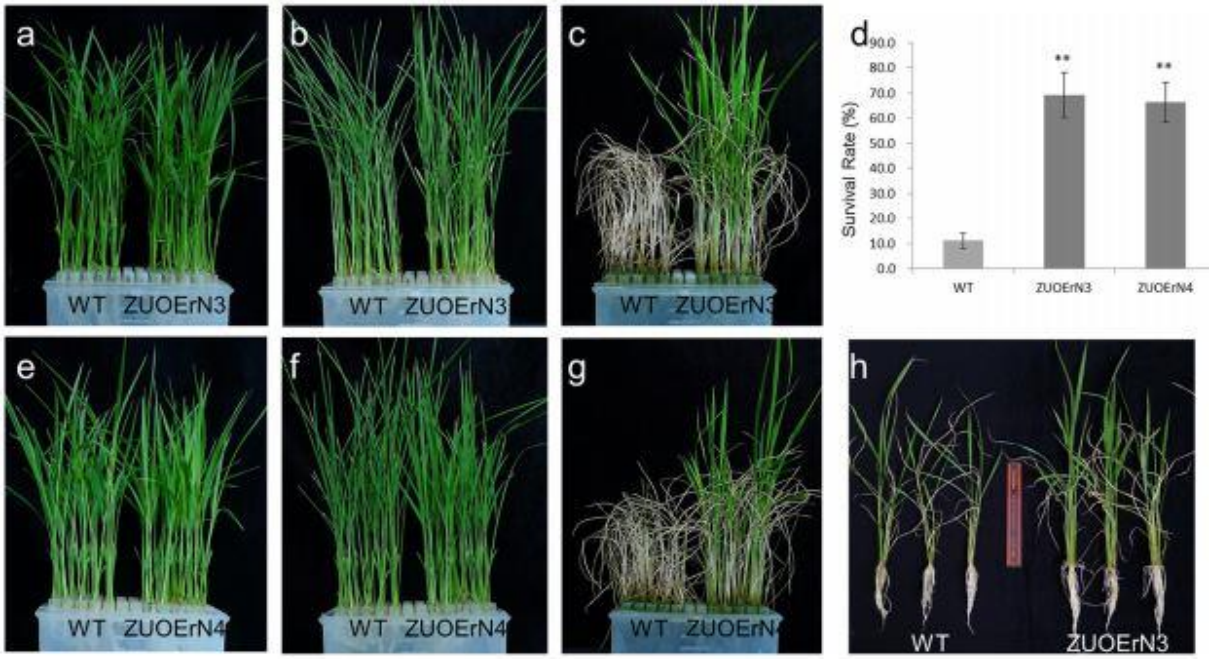
Izvor: González i sur. (2013)

Kako je genska ekspresija također pod utjecajem post-translacijskih histonskih modifikacija González i sur. (2013) su istražili broj histonskih modifikacija H3K27me3 i H3K9me2 koje su odgovorne za represiju gena te H3K4me3 koja je odgovorna za aktivaciju gena. Ovaj dio istraživanja su metodom ChIP (*Chromatin immunoprecipitation*) specifičnom za navedene histonske modifikacije. H3K27me3 i H3K4me3 su jedva detektirane u regiji iza gena (-316/−207 baznih parova). Međutim, u regiji ispred gena (-987/-820 baznih parova), otkrivena je represivna modifikacija H3K27me3, ali se rezultat nije promijenio između biljaka pod simuliranom sušom i onih u normalnim uvjetima bez stresa. Ove histonske metilacije nisu zabilježene u kodirajućoj regiji *Asr2*. Suprotno tome, uglavnom represivna modifikacija H3K9me2 je bila jasno vidljiva u svim analiziranim regijama te se smanjivala tijekom perioda nedostatka vode i koja se izgubila nakon 30 minuta simulirane suše. Rezultati su pokazali malen porast razine *Asr2* mRNA već u ranoj fazi (nakon 10 minuta) stresa i znatno veći porast nakon 30 minuta stresa (vremenska točka u kojoj je izvedena analiza metilacije). Stres duži od 30 minuta rezultirao bi masovnom staničnom smrću, što je onemogućilo epigenetsku procjenu. Kako nisu pronađene značajne promjene prilikom stresa u količini H3K4me3 i H3K27me3 modifikacija autori su zaključili da je metilirani H3K27 neovisan od DNA metilacije. Za represivnu modifikaciju H3K9me2 se ispostavilo da je u korelaciji sa metilacijom CNN-a te povezana sa ekspresijom gena *Asr2*.

4.4. Riža (*Oryza sativa*)

Jiang i sur. (2019) su razvili dvije transgenične linije riže, ZUOErN3 i ZUOErN4, sa prekomjernom ekspresijom transkripcijskog faktora *OsNAC2* koji je otporan na miR164b (miRNA koja dovodi do rezanja mRNA, odnosno vodi posttranskripcijsko utišavanje). Kako je *OsNAC2* modificiran da bude otporan na miR164b autori su ga nazvali *mOsNAC2*. U ovom istraživanju, otkrili su kako je klijanje sjemena ZUOErN3 i ZUOErN4 znatno sporije od sjemena divljeg tipa (eng. *wild type*, WT), iako je konačna klijavost svih linija bila preko 95%. Zakašnjelo klijanje kod sjemena s prekomjernom ekspresiji *mOsNAC2* je povezano s povećanim sadržajem apscizinske kiseline (ABA). Prethodne studije su pokazale da povećani sadržaj ABA u sjemenu usporava klijanje, dok smanjenje sadržaja ABA ubrzava klijanje (Zhu i sur., 2009). Analizirajući razinu ABA u sjemenkama, Jiang i sur. (2019) su dobili sljedeće rezultate: za WT iznosila je 72,1 ± 2,2 ng/g, dok je bila značajno viša kod transgeničnih linija (131,6 ± 4,4 ng/g kod ZUOErN3 i 120,4 ± 13,3 ng/g kod ZUOErN4).

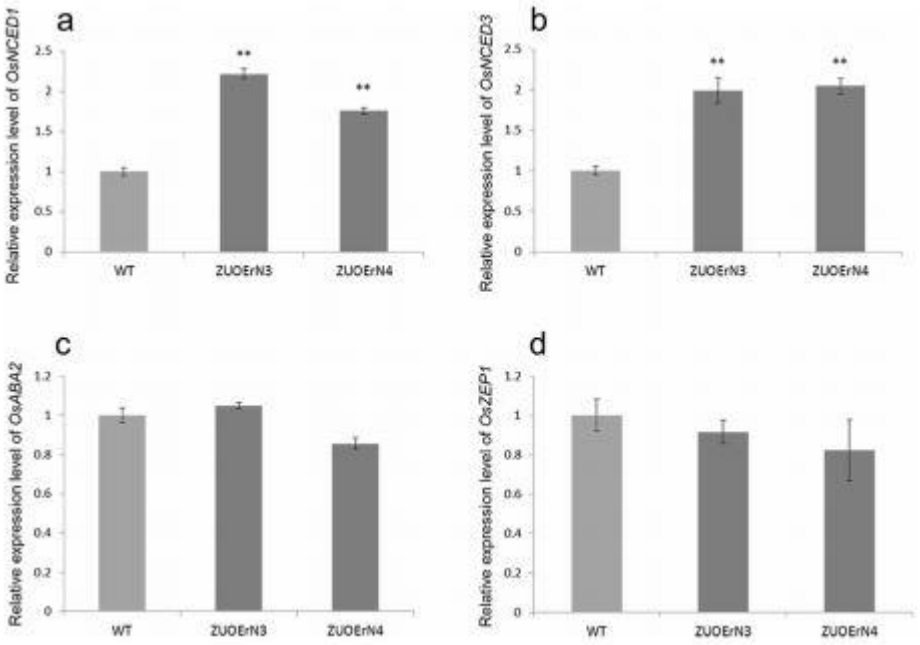
Sadržaj ABA u biljci je povezan s tolerancijom na stres suše (Zhu i sur., 2009). Kako su autori otkrili viši sadržaj ABA u sjemenu biljaka sa prekomjernom ekspresijom *mOsNAC2*, istraživali su jesu li biljke koje prekomjerno ekspresiraju *mOsNAC2* povećale toleranciju na sušu podvrgavanjem dvotjednih sadnica polietilen glikolu (PEG). Za analizu tolerancije transgeničnih biljaka na sušu, WT sjemenke i transgenične sjemenke homozigota (ZUOErN3 i ZUOErN4) su proklijale u vodi te su bile prebačene u Kimura B hranjivu otopinu četiri dana nakon klijanja. Sadnice stare 2 tjedna su potom prebačene u nove hranjive otopine Kimura B sa 10% PEG 6000. Biljke su fotografirane prije tretmana, u 3. i u 8. danu, te zatim nakon razdoblja oporavka od 8 dana, tijekom kojeg su tretirane samo Kimura B hranjivom otopinom. Stopa preživljavanja mjerena je nakon oporavka sadnica. Sadnice tretirane PEG-om, simulirajući sušu, prikupljene su nakon 0 h, 1 dana, 2 dana i 3 dana. Fenotipovi sadnica WT, ZUOErN3 i ZUOErN4 su bili slični prije tretmana PEG-om (slika 4.4.1. a i e). Nakon trodnevnog tretmana, lišće biljaka WT bilo je uvijeno i uvenuto, pokazujući očigledne simptome dehidracije, dok je lišće ZUOErN3 i ZUOErN4 pokazalo ograničene simptome stresa od suše (slika 4.4.1. b i f). Nakon osmodnevne suše i potom osmodnevnog oporavka, većina WT biljaka je bila povenuta i mrtva, dok su transgenične biljke imale zeleno lišće (slika 4.4.1. c i g). Postotak preživljavanja kod ZUOErN3 je iznosio 69,2 ± 8,8%, kod ZUOErN4 je iznosio 66,3 ± 7,9%, dok je kod biljaka WT iznosio samo 11,2 ± 3,1% (slika 4.4.1. d). Ovi rezultati pokazali su da prekomjerna ekspresija *OsNAC2* značajno povećava toleranciju na sušu i postotak preživljavanja u fazi sadnice. Proučavali su također toleranciju na sušu u kasnijim fazama rasta i razvoja. Biljke su tretirane sa 15% PEG-a pet dana te se oporavljale sedam dana, nakon čega su transgenične biljke izgledale zdravije od WT-a. Transgeničnim biljkama su narasli novi listovi, a listovi WT biljaka su samo povratili svoju zelenu boju (slika 4.4.1. h). Ovi rezultati upućuju da je tolerancija na sušu kod transgeničnih biljaka u kasnijim fazama također viša nego kod WT biljaka.



Slika 4.4.1. Fenotipovi transgeničnih linija i divljeg tipa
Izvor: Jiang i sur. (2019)

9-cis-epoksikarotenoid dehidrogenaze (*nine-cis-epoxycarotenoid dehydrogenases*, NCEDs) su ključni enzimi u biosintezi ABA (Zhu i sur., 2009). Gen *OsNCED1* je uglavnom ekspresioniran u lišću riže u normalnim uvjetima (Ye i sur., 2011). Jiang i sur. (2019) su napravili analizu pomoću RT-qPCR-a, koja je pokazala da je gen *OsNCED1* značajno više ekspresioniran u transgeničnim biljkama nego u WT biljkama kod normalnih uvjeta rasta (graf 4.4.1. a). *OsNCED3* je glavni gen koji kodira biosintezu ABA tijekom stresa suše kod riže (Ye i sur., 2011). RT-qPCR analiza otkrila je da su razine ekspresije *OsNCED3* u linijama bile više nego u WT (u ZUOErN3 0,99 puta više, u ZUOErN4 1,04 puta više) (graf 4.4.1. b). Također su analizirali ekspresiju gena koji kodiraju još dva važna enzima u biosintezi ABA, ksantoksin dehidrogenaza (gen *OsABA2*) i zeaksantin epoksidaza (gen *OsZEP1*). Međutim, nisu otkrivene značajne razlike u razini ekspresije bilo kojeg od ovih gena između transgeničnih i WT biljaka (graf 4.4.1. c i d). Ovi rezultati sugeriraju da povećana ekspresija nekih gena koji su uključeni u biosintezu ABA, kao što su *OsNCED1* i *OsNCED3*, mogu rezultirati višim sadržajem ABA u transgeničnim biljkama.

Graf 4.4.1. Relativna ekspresija gena *OsNCED1, OsNCED3, OsABA2* i *OsZEP1*



Izvor: Jiang i sur. (2019)

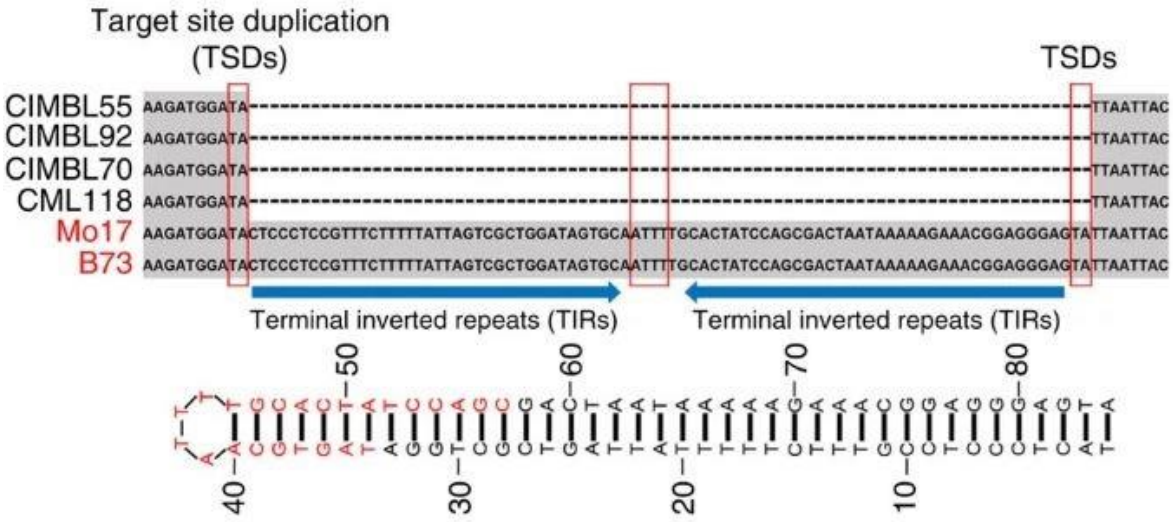
Da bi se utvrdilo je li ABA uključena u bolju toleranciju na sušu koja je zabilježena kod ZUOErN3 i ZUOErN4, autori su izmjerili koncentracije ABA u sadnicama tretiranih PEG-om. Prije tretmana sušom, sadržaj ABA u ZUOErN3 je iznosila 115,6 ± 2,5 ng/g, u ZUOErN4 je iznosila 110,6 ± 15,1 ng/g te kod WT biljaka je iznosila 51,0 ± 9,3 ng/g svježe tvari. Nakon tretmana PEG-om, iako je sadržaj ABA porastao i u transgeničnim i u WT biljkama, sadržaj ABA u transgeničnim biljkama ostao je značajno viši nego u WT biljkama nakon 1, 2 i 3 dana trajanja tretmana suše. Ovi rezultati sugeriraju da povećana razinu ABA u transgeničnim biljkama povećava njihovu toleranciju na sušu.

Daljnjim istraživanjem mogućih mehanizama pomoću kojih *OsNAC2* regulira ekspresiju gena povezanih sa stresom, autori su koristili RT-qPCR za procjenu ekspresije nekoliko važnih gena koji reagiraju na abiotski stres kod WT i linija sa prekomjernom ekspresijom *mOsNAC2.* Ekspresija gena izazvanog sušom *OsLEA3* (kodira proteine koji odgađaju embriogenezu) bila je dvostruko veća kod transgeničnih biljaka, dok je ekspresija gena, koji reagira na ABA, *OsRAB16* (kodira mali protein koji se veže na GTP) kod ovih biljaka bila je četverostruko veća. Prolin je jedan od najpoznatiji osmoprotektanata i njegovo nakupljanje utvrđeno je kod organizmima pod abiotskim stresom (Zhu i sur., 2009). Ekspresija gena odgovornog za biosintezu prolina *OsP5CS1* bila je oko 0,7 puta viša u transgeničnim biljkama u usporedbi s WT, dok se ekspresija gena *OsProt* nije značajno promijenila. Ovi rezultati sugeriraju da su geni *OsLEA3*, *OsRAB16* i *OsP5CS1* uključeni u biljnu reakciju na sušu.

4.5. Kukuruz (*Zea mays*)

Mao i sur. (2015) su identificirali gene povezane s tolerancijom na sušu kod kukuruza kroz analizu prirodne populacije kukuruza, koja se sastojala od 368 inbred linija koje su prikupljene iz subtropskih/tropsih (TST) i umjerenih regija svijeta. S obzirom na složenost tolerancije biljke na sušu, koja je pod utjecajem vremenskog razdoblja i intenziteta stresa nametnute biljkama, odlučili su se usredotočiti na toleranciju jakog intenziteta stresa suše u fazi sadnica, budući da je manje pod utjecajem promjena u okolinskim uvjetima, što pomaže identificirati osnovne genetske komponente. Tolerancija na sušu svakog genotipa određena je izračunavanjem SR (*survival rate*) indeksa – postotak preživjelih biljaka nakon ponovnog zalijevanja pod jakim sušnim stresom u fazi sadnice. U prosjeku, inbred linije iz TST pokazale su viši SR u odnosu na one iz umjerenih regija. Identificiran je SNP (*single nucleotide polymorphisms*) unutar gena *ZmNAC111* na kromosomu 10, značajno povezan s biljnom tolerancijom na sušu. *ZmNAC111* kodira NAC-tip transkripcijski faktor (TF). NAC proteini reguliraju više bioloških procesa u biljkama, uključujući: razvoj kotiledona i korijena, stvaranje sekundarnog tkiva, starenje lišća, remobilizaciju hranjivih tvari do zrna i odgovor na stres. S obzirom na moguću funkciju gena *ZmNAC111* u toleranciji biljke na sušu, autori su sekvencionirali gen kod 262 linije kukuruza. Pronađeno je ukupno 157 SNP-ova i 119 InDel-a (insercije i delecije). Novo identificirani InDel dug 82 bazna para, smješten 572 bazna para (InDel-572) uzvodno od početnog kodona gena *ZmNAC111*, značajno je povezan sa razinom preživljavanja sadnice u uvjetima teške suše.

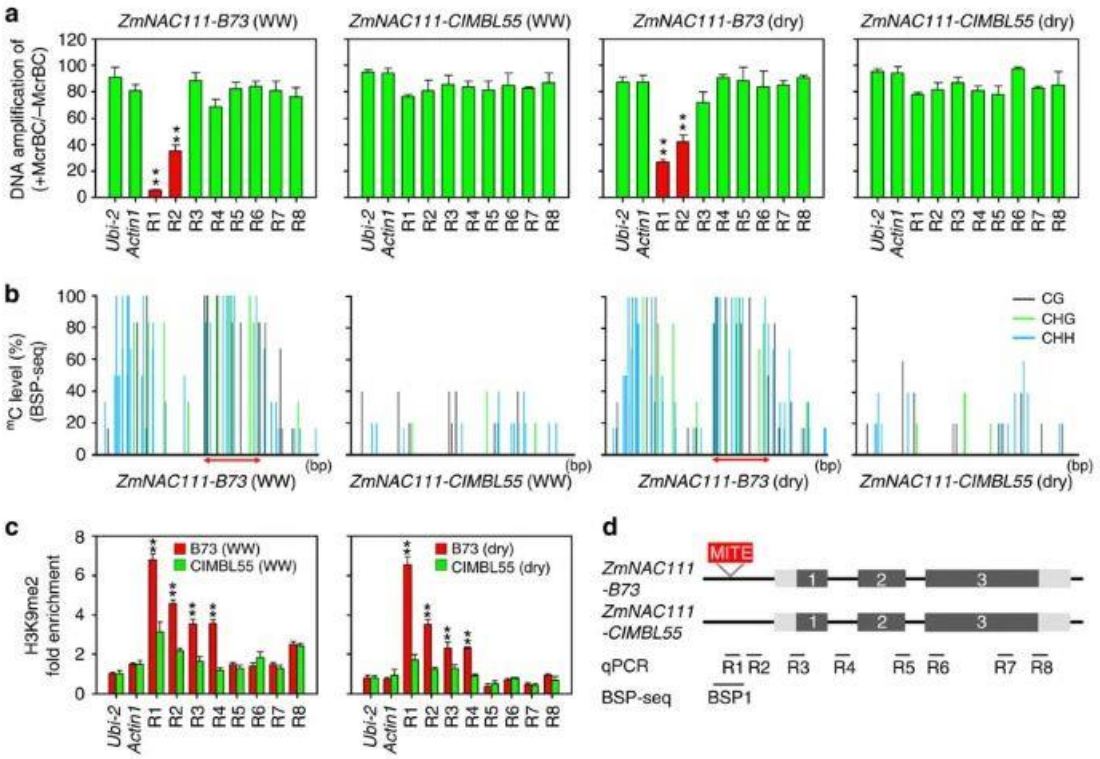
Analiza sekvence InDel-572 u promotorskoj regiji gena *ZmNAC111* otkrila je da se sastoji od *long-terminal inverted repeats* dugih 38 baznih parova, petlje duge 4 bazna para i dva dodatna nukleotida „TA“ na kraju i neposredno prije *long-terminal inverted repeats.* Ovo predstavlja tipičnu strukturu MITE (*Miniature Inverted-repeat Transposable Elements*) umetnutog unutar genoma. Dio sekvence, transpozona InDel-572, dužine 80 baznih parova može tvoriti savršenu strukturu petlje. Petlja je prisutna u promotoru gena *ZmNAC111* genotipova osjetljivih na sušu, dok ne postoji kod genotipova tolerantnih na sušu (slika 4.5.1.).



Slika 4.5.1. InDel-572 (Mite) u različitim sortama kukuruza
Izvor: Mao i sur. (2015)

Budući da se insercija MITE nalazi u regiji promotora *ZmNAC111*, autori su pretpostavili da to rezultira izmijenjenom ekspresijom *ZmNAC111* između različitih genotipova. Stoga su analizirali ekspresiju gena *ZmNAC111* kod 133 inbred linije u uvjetima bez stresa, te u umjerenim i teškim uvjetima suše. qRT-PCR analizom dobiveno je ukupno 399 uzoraka RNA, te je utvrđeno da su genotipovi bez MITE imali značajno veću ekspresiju *ZmNAC111* od onih sa insertiranim MITE. Ovo sugerira da insercija MITE može represirati ekspresiju *ZmNAC111* što rezultira višom osjetljivosti sorti kukuruza sa insertiranim MITE na stres suše.

Mao i sur. (2015) su provjerili status metilacije DNA i histona kod gena *ZmNAC111* u genotipovima sa MITE insercijom i bez nje. Osam regija (R1 – R8) koje obuhvaćaju područje *ZmNAC111* gena i promotora u dvije inbred linije (slika 4.5.1. d), B73 (osjetljiva na sušu, insertiran MITE) i CIMBL55 (tolerantnih na sušu, bez MITE insercije), reprezentativno su analizirane s McrBC (endonukleaza osjetljiva na metilaciju) te potom sekvencirane s qRT-PCR-om. Rezultati su otkrili da su samo R1 i R2, najbliže inserciji MITE, hipermetilirane kod *ZmNAC111*-B73, ali ne i kod *ZmNAC111*-CIMBL55, bez obzira na stres (slika 4.5.1. a). Bisulfitnim sekvenciranjem ovih regija otkrivena je hipermetilacija DNA, posebno u CHH kontekstu (slika 4.5.1. b). Imunoprecipitacija kromatina (ChIP) upotrebom specifičnog H3K9me2 antitijela i nakon toga qRT-PCR analiza je pokazala da je H3K9me2 značajno obogaćen u R1 – R4 regijama gena *ZmNAC111*-B73 u usporedbi s *ZmNAC111*-CIMBL55. Razine H3K9me2 u ostalim regijama je bila slična (slika 4.5.1. c). Na temelju tih podataka zaključuju da insercija MITE represira ekspresiju *ZmNAC111* kroz metilaciju DNA i histona u obližnjim regijama gena, a metilacija se odvija RdDM-om (*RNA-directed DNA methylation*).



Slika 4.5.2. Status metilacije DNA i H3K9me2 kod *ZmNAC111* alela osjetljivih i tolerantnih na sušu

Izvor: Mao i sur. (2015)

5. Zaključak

Epigenetika je relativno nova grana znanosti stara svega dvadesetak godina, ali usprkos kratkoj povijesti potpuno je promijenila teoriju nasljeđivanja i ukazala na važnost djelovanja okoline na ekspresiju gena. S obzirom na sve veće stresne uvjete koje biljke doživljavaju zbog globalnih klimatskih promjena, epigenetske promjene se smatraju važnim regulatornim mehanizmima na koji utječu podražaji iz okoline. Ovaj regulatorni mehanizam od iznimne je važnosti u smislu njegovog nasljeđivanja tijekom generacija. Napredak u tehnikama ultra visoke propusnosti revolucionarno je identificirao epigenetske promjene i poboljšao naše znanje o učinku epigenetskih promjena na regulaciju ekspresije gena. Razne vrste (de) metilacije DNA na određenim lokusima omogućava biljkama regulaciju ekspresije gena utječući na fiziologiju i biokemiju stanica. Stoga je korištenje epigenetske varijabilnosti za razvijanje kultiviranog poljoprivrednog bilja tolerantnog na abiotski stres vrlo važan iskorak u oplemenjivanju bilja. Različiti stresovi djeluju kao poticaj i mijenjaju razinu genske ekspresije pomoću metilacije DNA, modifikacije histona i djelovanja mikro RNA. „Sjećanje“ biljaka na stres može se zadržati samo kratko, budući da „pamćenje“ ovisi o životnom vijeku (*half-life*) proteina, RNA i metabolita izazvanih stresom, dok memorija može trajati dulje ukoliko uključuje reprogramiranje u fenologiji i morfologiji biljaka. Kako klimatske promjene sve više uzrokuju ekstremnije i duže suše važno je razviti sorte kultiviranih biljnih vrsta koje će se bolje nositi sa nedostatkom vode u tlu čime će se osigurati dovoljno hrane za ljude. Adaptabilnost na sušu, kao svojstvo pod kontrolom velikog broja gena, je izrazito složeno i vrlo niske heritabilnosti. Upravo zato poznavanje epigenetičkih promjena koje daju bolju adaptabilnost i tolerantnost biljaka na sušu može uvelike olakšati oplemenjivačke programe u cijelom svijetu.

6. Popis literature

1. Antonius-Klemola, K., R. Kalendar and A. H. Schulman. 2006. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. Theor. Appl. Genet. 112: 999–1008.

2. Aravind Jayaraman, Rinku Sharma, Pooja Banduni, Shikha Mittal, Kaliyugam Shiriga, Mallikarjuna Mallana Gowdra, Kumar Arun, Rao Atmakuri Ramakrishna, Nepolean Thirunavukkarasu (2017). Identification, Characterization, and Functional Validation of Drought-responsive MicroRNAs in Subtropical Maize Inbreds. Frontiers in plant science, 8, 941. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00941

3. Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee JH, LeProust EM, Park IH, Xie B, Daley GQ, Church GM. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. Nat Biotechnol. 2009 Apr;27(4):361-8. doi: 10.1038/nbt.1533. Epub 2009 Mar 29. Erratum in: Nat Biotechnol. 2009 May;27(5):485. PMID: 19329998; PMCID: PMC3566772.

4. Banovac, M. (2016). Prehrana i epigenetske modifikacije molekule DNA. Završni rad. Split. Prirodoslovno – matematički fakultet

5. Benes V., Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. Methods. 2010;50:244–249.

6. Benoit, M., Drost, H. G., Catoni, M., Gouil, Q., Lopez-Gomollon, S., Baulcombe, D., & Paszkowski, J. (2019). Environmental and epigenetic regulation of Rider retrotransposons in tomato. PLoS genetics, 15(9), e1008370. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008370

7. Cai S., Cao Z., Lau C. Label-free technology for the amplified detection of microRNA based on the allosteric hairpin DNA switch and hybridization chain reaction. Analyst. 2014;139:6022–6027.

8. Chandler, V. L. (2007). Paramutation: From Maize to Mice. Cell, Volume 128, Issue 4, P641-645. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.007

9. Chinnusamy V, Zhu JK. Epigenetic regulation of stress responses in plants. Curr Opin Plant Biol. 2009;12(2):133-139. doi:10.1016/j.pbi.2008.12.006

10. Deal, R. B. & Henikoff, S. (2011). Histone variants and modifications in plant gene regulation. Current opinion in plant biology, 14(2), 116–122. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.11.005

11. Deng J, Kou S, Zhang C, Zou Q, Li P, Yuan P (2018). DNA Methylation and Plant Stress Responses. J Plant Physiol Pathol 6:4. doi: 10.4172/2329-955X.1000182

12. elucija ili eluiranje. Proleksis Enciklopedija Online, 2020. https://proleksis.lzmk.hr/19599/ - pristup 16.7.2020.

13. Fabrício R. Lopes, Daudi Jjingo, Carlos R. M. da Silva, Alan C. Andrade, Pierre Marraccini, João B. Teixeira, Marcelo F. Carazzolle, Gonçalo A. G. Pereira, Luiz Filipe P. Pereira, André L. L. Vanzela, Lu Wang, I. King Jordan, Claudia M. A. Carareto (2013). Transcriptional Activity, Chromosomal Distribution and Expression Effects of Transposable Elements in Coffea Genomes. PLOS ONE 8(11): e78931. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078931

14. Ferdous, J., Hussain, S.S. and Shi, B.-J. (2015). Role of microRNA s in plant drought tolerance. Plant Biotechnol J, 13: 293-305. doi:10.1111/pbi.12318

15. Flavell, A. J., M. R. Knox, S. R. Pearce and T. H. Ellis. 1998. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. Plant J. 16: 643–650.

16. Gan Y.-B., Zhou Z.-J., An L.-J. A comparison between northern blotting and quantitative real-time PCR as a means of detecting the nutritional regulation of genes expressed in roots of arabidopsis thaliana. Agric. Sci. China. 2011;10:335–342.

17. Gene Regulation by the Polycomb Group pathway. Max Planck Institute for plant breeding research, 2020. https://www.mpipz.mpg.de/turck/project_2 - pristup 8.7.2020.

18. Hayashizaki, Y., Hirotsune, S., Okazaki, Y., Hatada, I., Shibata, H., Kawai, J., Hirose, K., Watanabe, S., Fushiki, S., Wada, S., Sugimoto, T., Kobayakawa, K., Kawara, T., Katsuki, M., Shibuya, T. and Mukai, T. (1993). Restriction landmark genomic scanning method and its various applications. Electrophoresis 14:251–258.

19. Holec, S. & Berger, F. (2012). Polycomb Group Complexes Mediate Developmental Transitions in Plants. Plant Physiology, 35-43; DOI: 10.1104/pp.111.186445

20. How does bisulfite sequencing (WGBS/RRBS) work?. EC SEQ Bioinformatics, 2020. https://www.ecseq.com/support/epigenetics/how-does-bisulfite-sequencing-wgbs-rrbs-work - pristup 16.7.2020.

21. Huang, S., Litt, M. D., Blakey, C. A. (2015). Epigenetic gene Expression and Regulation. Elsevier Inc, Academic Press is an imprint of Elsevier, New York, str. 21-38.

22. Huang Y, Jiang L, Liu BY, Tan CF, Chen DH, Shen WH, Ruan Y. Evolution and conservation of polycomb repressive complex 1 core components and putative associated factors in the green lineage. BMC Genomics. 2019 Jun 28;20(1):533. doi: 10.1186/s12864-019-5905-9. PMID: 31253095; PMCID: PMC6599366.

23. Huang, Y., W. A. Pastor, Y. Shen, M. Tahiliani, D. R. Liu, and A. Rao. 2010. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. PLoS One 5:e8888.

24. Jacobs C.B., Peairs M.J., Venton B.J. Review: carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. Anal. Chim. Acta. 2010;662:105–127.

25. Jiang, Dagang & Zhou, Lingyan & Chen, Weiting & ye, Nenghui & Jixing, Xia & Zhuang, Chuxiong. (2019). Overexpression of a microRNA-targeted NAC transcription factor improves drought and salt tolerance in Rice via ABA-mediated pathways. Rice 12, 76. https://doi.org/10.1186/s12284-019-0334-6

26. Kalendar, Ruslan & Antonius, Kristiina & Smykal, Petr & Schulman, Alan. (2010). iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. Theor Appl Genet 121, 1419–1430 https://doi.org/10.1007/s00122-010-1398-2

27. Karimi, M., S. Johansson, and T. J. Ekstrom (2006). Using LUMA: a luminometric-based assay for global DNA-methylation. Epigenetics 1:45–48.

28. Khulan B, Thompson RF, Ye K, Fazzari MJ, Suzuki M, Stasiek E, Figueroa ME, Glass JL, Chen Q, Montagna C, Hatchwell E, Selzer RR, Richmond TA, Green RD, Melnick A, Greally JM (2006). Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay. Genome Res. 16:1046–1055.

29. Konovalov, F. A., N. P. Goncharov, S. Goryunova, A. Shaturova, T. Proshlyakova and A. Kudryavtsev. 2010. Molecular markers based on LTR retrotransposons BARE-1 and Jeli uncover different strata of evolutionary relationships in diploid wheats. Mol. Genet. Genomics 283: 551–553.
30. Li C., Li Z., Jia H. One-step ultrasensitive detection of microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP) Chem. Commun. 2011;47:2595–2597.

31. Li R.-D., Yin B.-C., Ye B.-C. Ultrasensitive, colorimetric detection of microRNAs based on isothermal exponential amplification reaction-assisted gold nanoparticle amplification. Biosens. Bioelectron. 2016;86:1011–1016.

32. Li W., Ruan K. MicroRNA detection by microarray. Anal. Bioanal. Chem. 2009;394:1117–1124.

33. Li, Y., Kumar, S., & Qian, W. (2018). Active DNA demethylation: mechanism and role in plant development. Plant cell reports, 37(1), 77–85. https://doi.org/10.1007/s00299-017-2215-z

34. Liu Junzhong, Feng Lili, Li Jianming, He Zuhua (2015). Genetic and epigenetic control of plant heat responses. Frontiers in Plant Science. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00267

35. Liu Sheng-Rui, Zhou Jing-Jing, Hu Chun-Gen, Wei Chao-Ling, Zhang Jin-Zhi (2017). MicroRNA-Mediated Gene Silencing in Plant Defense and Viral Counter-Defense. Frontiers in microbiology, 8, 1801. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01801

36. Liu, R. and Lang, Z. (2020), The mechanism and function of active DNA demethylation in plants. J. Integr. Plant Biol, 62: 148-159. doi:10.1111/jipb.12879

37. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2008). Molecular cell biology, 4th edition, W. H. Freeman and Company, New York, str. 249-250.

38. Mao H, Wang H, Liu S, Li Z, Yang X, Yan J, Li J, Tran LS, Qin F. A transposable element in a NAC gene is associated with drought tolerance in maize seedlings. Nat Commun. 2015 Sep 21;6:8326. doi: 10.1038/ncomms9326. PMID: 26387805; PMCID: PMC4595727.

39. Matzke MA, Mosher RA. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. Nat Rev Genet. 2014 Jun;15(6):394-408. doi: 10.1038/nrg3683. Epub 2014 May 8. Erratum in: Nat Rev Genet. 2014 Aug;15(8):570. PMID: 24805120.

40. Methylated DNA Immunopreciptation (MeDIP) Kit. Active Motif, 2020. https://www.activemotif.com/catalog/736/medip - pristup 16.7.2020.

41. Mitchell, N., Deangelis, J. T. & Tollefsbol, T. O. (2011). Methylated-CpG Island Recovery Assay. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 791, 125–133. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-316-5_10

42. Nestor, C., A. Ruzov, R. Meehan, and D. Dunican. 2010. Enzymatic approaches and bisulfite sequencing cannot distinguish between 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in DNA. Biotechniques 48:317–319.

43. Neves DM, Almeida LADH, Santana-Vieira DDS, Freschi L, Ferreira CF, Soares Filho WDS, Costa MGC, Micheli F, Coelho Filho MA, Gesteira ADS. Recurrent water deficit causes epigenetic and hormonal changes in citrus plants. Sci Rep. 2017 Oct 20;7(1):13684. doi: 10.1038/s41598-017-14161-x. PMID: 29057930; PMCID: PMC5651809.

44. Olkhov-Mitsel, E. & Bapat, B. (2012). Strategies for discovery and validation of methylated and hydroxymethylated DNA biomarkers. Cancer medicine. 1. 237-60. 10.1002/cam4.22.

45. Overview of Chromatin IP Assay Methodology. Cell Signaling Technology, 2020. https://www.cellsignal.com/contents/resources-applications-chromatin-immunoprecipitation/overview-of-chromatin-ip-assay-methodology/chip-assay-overview - pristup 16.7.2020.

46. Pall G.S., Codony-Servat C., Byrne J. Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. Nucleic Acids Res. 2007;35:e60.

47. Qing Z., He X., He D. Poly(thymine)-Templated selective formation of fluorescent copper nanoparticles. Angew. Chem. Int. Ed. 2013;52:9719–9722.

48. Rauch, T., and G. P. Pfeifer. 2005. Methylated-CpG island recovery assay: a new technique for the rapid detection of methylated-CpG islands in cancer. Lab. Invest. 85:1172–1180.

49. Regulacija ekspresije gena u eukariota. Mrežni udžebenik iz genetike, 2020. http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl17.html - pristup 22.06.2020.

50. Robertson, A. B., J. A. Dahl, C. B. Vagbo, P. Tripathi, H. E. Krokan, and A. Klungland. 2011. A novel method for the efficient and selective identification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. Nucleic Acids Res. 39:e55.

51. Sang-Woon C., Simonetta F. (2010). Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health, Advances in Nutrition, Volume 1, Issue 1, Pages 8–16, https://doi.org/10.3945/an.110.1004

52. Saraswat, Saurabh & Yadav, Alok & Sirohi, Preeti & Singh, Nand. (2017). Role of epigenetics in crop improvement: Water and heat stress. Journal of Plant Biology. 60. 231-240. 10.1007/s12374-017-0053-8.

53. Shi C., Liu Q., Ma C. Exponential strand-displacement amplification for detection of microRNAs. Anal. Chem. 2014;86:336–339.

54. Shi, Gui-qing & Fu, Jing-ying & Rong, Ling-jie & Zhang, Pei-yue & Guo, Cheng-jin & Xiao, Kai (2018). TaMIR1119, a miRNA family member of wheat (Triticum aestivum), is essential in the regulation of plant drought tolerance. Journal of Integrative Agriculture. 17. 2369-2378. 10.1016/S2095-3119(17)61879-3.

55. Singroha, G. i Sharma, P. (2019). Epigenetic Modifications in Plants under Abiotic Stress. Intechopen. DOI:10.5772/intechopen.84455

56. Sutherland, E., L. Coe, and E. A. Raleigh. 1992. McrBC: a multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease. J. Mol. Biol. 225:327–348.

57. Taylor, K., Shi, H. & Caldwell, C. (2010). Next Generation Sequencing: Advances in Characterizing the Methylome. Genes. 1. 143-65. 10.3390/genes1020143.

58. Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP (1999). Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. Cancer Res. 59:2307–2312.

59. Valieva, M.E., Feofanov, A.V. & Studitsky, V.M. (2016). Histone chaperones: Variety and functions. Moscow Univ. Biol.Sci. Bull. 71, 165–169. https://doi.org/10.3103/S0096392516030123

60. Varotto, Serena & Tani, Eleni & Abraham, Eleni & Krugman, Tamar & Kapazoglou, Aliki & Melzer, Rainer & Radanović, Aleksandra & Miladinović, Dragana (2020). Epigenetics: Possible applications in climate-smart crop breeding. Journal of Experimental Botany. 10.1093/jxb/eraa188/5819247.

61. Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schübeler D. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. Nat Genet. 2005 Aug;37(8):853-62. doi: 10.1038/ng1598. Epub 2005 Jul 10. PMID: 16007088.

62. What is epigenetics?. Genetics Home Refrence. NIH U.S. National Library of Medicine, 2020. https://ghr.nlm.nih.gov/primer/howgeneswork/epigenome - pristup 20.06.2020.

63. Ye NH, Zhu GH, Liu YG, Li YX, Zhang JH (2011) ABA controls H_2O_2 accumulation through the induction of OsCATB in Rice leaves under water stress. Plant Cell Physiol 52:689–698

64. Ye, J., Xu, M., Tian, X., Cai, S., & Zeng, S. (2019). Research advances in the detection of miRNA. Journal of pharmaceutical analysis, 9(4), 217–226. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.05.004

65. Yoo, K. H., & Hennighausen, L. (2012). EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer. International journal of biological sciences, 8(1), 59–65. https://doi.org/10.7150/ijbs.8.59

66. Yuki, M. & Kentaro, Y. & Makoto, T. (2014). Application of iPBS in high-throughput sequencing for the development of retrotransposon-based molecular markers. Current Plant Biology. 1. 10.1016/j.cpb.2014.09.001.

67. Yuki, M. & Makoto, T. (2015). Plant Transposable Elements and Their Application to Genetic Analysis via High-throughput Sequencing Platform. The Horticulture Journal. 84. 10.2503/hortj.MI-IR02.

68. Zheng, X., Chen, L., Xia, H., Wei, H., Lou, Q., Li, M., Li, T., & Luo, L. (2017). Transgenerational epimutations induced by multi-generation drought imposition mediate rice plant's adaptation to drought condition. Scientific reports, 7, 39843. https://doi.org/10.1038/srep39843

69. Zhou L., Wang Y., Yang C. A label-free electrochemical biosensor for microRNAs detection based on DNA nanomaterial by coupling with Y-shaped DNA structure and non-linear hybridization chain reaction. Biosens. Bioelectron. 2019;126:657–663.

70. Zhu G, Ye N, Zhang J (2009). Glucose-induced delay of seed germination in rice is mediated by the suppression of ABA catabolism rather than an enhancement of ABA biosynthesis. Plant Cell Physiol 50:644 –651

71. Zhu JK. Epigenome sequencing comes of age. Cell. 2008;133:395–397

Životopis

Bernard Kuhar rođen je 11.10.1996. godine u Zagrebu. Pohađao je V. gimnaziju u Zagrebu, od 2011. do 2015. godine. Nakon srednjoškolskog obrazovanja, upisao je preddiplomski studij Hortikultura na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2015. godine. Uspješno je obranio završni rad naslova „*Domestikacijski centri i domestikacija životinja*“ te stekao titulu sveučilišni prvostupnik (baccalaureus) inženjer hortikulture u Zagrebu, 14. rujna 2018. godine. Upisao je diplomski studij Biljne znanosti 2018. godine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Odličan je poznavatelj i govornik engleskog jezika, a ima i osnovno znanje njemačkog i latinskog jezika. Posjeduje vozačku dozvolu B kategorije. Izuzetno se snalazi u Microsoft Office okruženju kao i u samom radu sa računalom.