Učinak promijenjene ekspresije gena BPM na de novo metilaciju DNA uročnjaka (Arabidopsis thaliana L.)

Mohorović, Petar

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:216748

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Petar Mohorović

Učinak promijenjene ekspresije gena *BPM* na *de novo* metilaciju DNA uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.)

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad, izrađen pri Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Nataše Bauer, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem se

... svojoj obitelji koja mi je svojom podrškom omogućila i bodrila me kroz sve godine mojeg studiranja

... svojim prijateljima i kolegama koji su moje studentske dane i godine učinili jednim od najljepših razdoblja u mom životu

... profesorici Dunji Leljak-Levanić koja mi je uvijek bila na raspolaganju i spremna pomoći

... Ani koja je uvela posebnu čar i dušu u labos

... i iznad svega, posebno se zahvaljujem svojoj mentorici Nataši Bauer koja je svojim savjetima i podučavanjem upotpunila moje znanje i pomogla mi učvrstiti temelje samostalnog rada u laboratoriju na kojima ću graditi svoju znanstvenu karijeru.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Učinak promijenjene ekspresije gena *BPM* na *de novo* metilaciju DNA uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.)

Petar Mohorović
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Proteini BPM, kojima je dosada opisana uloga u degradaciji proteina putem ubikvitin proteasoma, ulaze u interakciju s proteinima koji su uključeni u *de novo* metilaciju DNA uročnjaka *Arabidopsis thaliana*. Nije poznato utječu li proteini BPM na metiliranost molekule DNA, a kako bi se provjerila potencijalna uloga proteina BPM u metilaciji DNA, koristile su se linije biljaka u kojima je promijenjena ekspresija gena *BPM*. Analizirala se metiliranost lokusa molekule DNA koji bi mogli biti pod utjecajem *de novo* metilacije. Analiza metiliranosti DNA provela se enzimatskom digestijom restrikcijskim enzimima koji su ovisni ili osjetljivi na metilaciju DNA, nakon koje je uslijedilo umnažanje istraživanih lokusa lančanom reakcijom polimerazom. Nakon gel elektroforeze i denzitometrijske obrade, te usporedbe rezultata dobivenih za nepocijepanu DNA i DNA pocijepanu metilacijski ovisnim enzimima MspJI i metilacijski osjetljivim enzimima HaeIII ili AluI, utvrdile su se promjene u metiliranosti u biljaka divljeg tipa kao i u biljaka koje različito eksprimiraju gene *BPM*. Rezultati pokazuju da promijenjene ekspresije gena *BPM* dovode do promjene u stupnju metiliranosti ponavljajućih sekvenci molekule DNA dok rezultati istraživanja promotorskih regija određenih gena ne daju jasnu sliku promjene obrasca metiliranosti te su potrebna dodatna istraživanja kako bi se to utvrdilo.

(61 stranica, 32 slike, 6 tablica, 7 priloga, 40 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: BPM, ubikvitin-proteasomni put, *de novo* metilacija DNA, RdDM, metilacijski ovisni restrikcijski enzimi, metilacijski osjetljivi restrikcijski enzimi, MspJI, *Arabidopsis thaliana*

Voditelj: doc. dr. sc. Nataša Bauer

Ocjenjitelji: doc. dr. sc. Nataša Bauer
izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek
izv. prof. dr. sc. Vesna Benković

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

Effect of altered *BPM* gene expression on *de novo* DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* L.

Petar Mohorović
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

BPM proteins, which have a known role in protein degradation via the ubiquitin proteasome pathway, interact with proteins involved in *de novo* DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. It is still unknown how BPMs effect DNA methylation. To assess the role of BPMs in DNA methylation, different plant mutants with altered expression of *BPM* genes were used. DNA methylation analysis was performed using the methylation dependent and methylation sensitive restriction enzymes after which the polymerase chain reaction was used to amplify specific, targeted regions of DNA which may be under the influence of *de novo* methylation. After the gel electrophoresis and densitometric analysis of the amplified undigested DNA and DNA digested with methylation dependant MspJI enzyme and with methylation sensitive HaeIII or AluI enzymes, changes of DNA methylation in wild type, as well in plants with altered *BPM* gene expression,were determined. Results show that there is a change in methylation pattern in repeating DNA sequences while the results of examined promotor regions of specific genes don't give clear image on how the methylation pattern changes so further research is needed.

(61 pages, 32 figures, 6 tables, 7 appendices,40 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: BPM, ubiquitin proteasome pathway, *de novo* DNA methylation, RdDM, methylation dependant restriction enzymes, methylation sensitive restriction enzymes, MspJI, *Arabidopsis thaliana*

Supervisor: Dr. sc. Nataša Bauer, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Nataša Bauer, Asst. Prof.
Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.
Dr. sc. Vesna Benković, Assoc. Prof

Sadržaj

1. Uvod 1
1.1. Sustav razgradnje proteina u biljaka 2
1.1.1. Ligaze E3 s domenom HECT 5
1.1.2. RING-finger ligaze E3 5
1.1.3. Ligaze E3 temeljene na CUL3 7
1.1.4. Proteini AtBPM i njihovi proteinski supstrati 8
1.2. Epigenetika u biljaka 10
1.2.1. Održavanje metiliranosti molekule DNA 11
1.2.2. *De novo* metilacija DNA 12
1.2.3. Put RdDM 16
1.3. Cilj istraživanja 18
2. Materijali i metode 20
2.1. Materijali 20
2.1.1. Biljni materijal 20
2.1.2. Enzimi 21
2.1.3. Hranjivi mediji i puferi 23
2.1.4. Elektroforeza i detekcija DNA 24
2.1.5. DNA markeri 25
2.1.6. Ponavljajuće sekvence i geni 26
2.1.7. Početnice 31
2.2. Metode 32
2.2.1. Sterilizacija sjemenki i uzgoj klijanaca 32
2.2.2. Izolacija DNA 32
2.2.3. Mjerenje koncentracije i čistoće izolirane DNA 34
2.2.4. Razgradnja biljne DNA restrikcijskim endonukleazama 34
2.2.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR) 35
2.2.6. Denzitometrija 36
3. Rezultati 37
3.1. Izolacija DNA 37
3.2. Razgradnja biljne DNA restrikcijskim endonukleazama 37
3.3. Analiza metiliranosti molekule DNA upotrebom restrikcijske digestije i lančane reakcije polimerazom - PCR 38

3.3.1. Metilacija DNA ponavljajućih sekvenci 39
3.3.2. Metilacija DNA izabranih gena 45
4. Rasprava 52
4.1. Metilacija ponavljajućih sekvenci 52
4.2. Metilacija gena 55
5. Zaključak 58
6. Literatura 59
7. Životopis 59
8. Prilozi 63

Popis kratica

ABA – Apscizinska kiselina

AGO – engl. *Argonaute*

amiR – engl. *Artificial microRNA*

APC/C – engl. *Anaphase-promoting compleks/cyclosome*

BPM – BTB/POZ-MATH

BTB/POZ – engl. *Broad-complex,* tramtrack*, bric-à-brac/Pox virus and zinc finger*

CLSY1 – engl. *Classy 1*

CMT3 – Kromometilaza 3, engl. *Chromo methylase 3*

CRL – engl. *Cullin-RING E3 ligase*

CTAB – Cetiltrimetilamonij bromid

CUL – Cullin

cul3^{hyp} - engl. *Cullin3 Hypomorph*

DLC3 – engl. *Dicer-like 3*

DMS3 – engl. *Defective in Meristem Silencing 3*

DNA Pol – DNA polimeraza, engl. *DNA Polymerase*

DRD1 – engl. *Defective in RNA-directed DNA methylation 1*

DRM2 – engl. *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 2*

FT – engl. *Flowering locus T*

GFP – zeleni fluorescentni protein, engl. *Green Fluorescent Protein*

GST – engl. *Glutathione S-transferase*

HECT – engl. *Homologous to E6-associated protein C-terminus*

HEN1 – engl. *Hua Enhancer 1*

IGN – engl. *Intergenic noncoding region*

Lys (K) – Lizin

MET1 – DNA metiltransferaza 1, engl. *DNA Methyltransferase 1*

PCR – Lančana reakcija polimerazom, engl. *Polymerase Chain Reaction*

Pol – RNA polimeraza

RdDM – Metilacija DNA posredovana molekulama RNA, engl. *RNA-directed DNA Methylation*

RDM1 – engl. *RNA-Directed Methylation 1*

RDR – RNA-ovisna RNA polimeraza, engl. *RNA-dependent RNA polymerase*

RIR – engl. *RING in between RING-RING*

SHH1 – engl. *Sawadee Homeodomain Homologue 1*

SINE– engl. *Short Interspersed Nuclear Element*

siRNA – male interferirajuće RNA, engl. *Small interfering RNA*

SKP1 – engl. *S-phase kinase-associated protein 1*,

SMC – Strukturno održavanje kromosoma, engl. S*tructural Maintenance of Chromosomes*

KTF1 – engl. *Kow domain-containing transcription factor 1*

SUVH4 – engl. *Su(var) homologue 4*

Ub – Ubikvitin, engl. *Ubiquitin*

VIM – engl. *Variant in Methylation*

1. Uvod

Svaka stanica jednog višestaničnog organizma, bilo da se radi o životinjskoj ili biljnoj vrsti, sadrži isti genetički materijal. Osim spolnih, tumorskih i stanica imunološkog sustava u kojima se genetički materijal razlikuje, sve ostale stanice posjeduju istu sekvencu molekule DNA. Stanica kože posjeduje isti broj identičnih gena kao i živčana stanica, no opet, one se međusobno morfološki, funkcionalno i biokemijski razlikuju. U jezgri stanice čovjeka, *Homo sapiens*, nalazi se približno 20,000 gena (Ezkurdia i sur. 2014) dok ta brojka u jezgri stanice biljke *Arabidopsis thaliana* iznosi oko 27,000 (Bolle i sur. 2011). Međutim, ni u stanici čovjeka, ni u stanici uročnjaka, kao ni u stanici bilo kojeg višestaničnog organizma, geni nisu jednako eksprimirani. Upravo ta nejednolika ekspresija pojedinih gena omogućuje specifičnu funkciju stanica i, zahvaljujući tome, stanica kože može normalno vršiti svoju ulogu, sintetizirajući proteine neophodne za njezin rad, kao što živčane stanice mogu pravilno obnašati svoju i omogućiti normalnu funkciju cijelog živčanog sustava. Stanice uspijevaju održati specifičnu ekspresiju pojedinih gena vrlo preciznim i vrlo osjetljivim mehanizma koji su evoluirali milijunima godina i naposljetku postali dio savršeno ugođenog stroja koji je temelj svakog živog organizma.

Kontrola i regulacija ekspresije gena zbiva se na nekoliko razina, počevši od modifikacija same molekule DNA i/ili kromatina (poput metilacije citozina ili modifikacija histona), preko regulacije transkripcije, post-transkripcijske dorade glasničke molekule RNA i njezinog transporta, do regulacije translacije i post-translacijske obrade samih proteina. Ovi su procesi regulirani brojnim faktorima gdje najmanja greška, ukoliko nije popravljena, može dovesti do kolapsa cijelog sustava i u konačnici do smrti stanice i organizma. Ti su faktori najčešće upravo produkti ekspresije gena – proteini, koji su glavni efektori i obnašatelji funkcija u stanici.

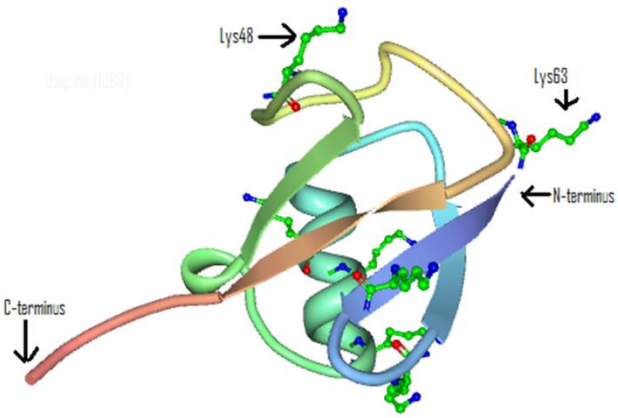
Kad je transkripcija u pitanju, proteini također predstavljaju glavne igrače koji sudjeluju u njezinoj regulaciji i samoj izvedbi. Čitav niz proteina preuzelo je ulogu u kontroli tog procesa, poput općih transkripcijskih faktora (koji dovode RNA polimerazu do promotora gena), aktivatora (koji stabiliziraju interakciju između RNA polimeraze i određenih promotora gena čime se aktivira sama ekspresija), inhibitora (koji inhibiraju ekspresiju ometajući progresiju polimeraze duž lanca molekule DNA), itd. Kako bi cijeli sustav uspješno funkcionirao, razine transkripcijskih faktora strogo su kontrolirane, ne samo njihovom sintezom, već i jednako važnom degradacijom.

Proces razgradnje proteina igra važnu ulogu u očuvanju integriteta stanice budući da eliminira abnormalne i nepotrebne proteine i održava zalihu slobodnih aminokiselina u vrijeme rasta i gladovanja. Bez njihove razgradnje, proteini bi se nakupljali u stanici čime bi ometali njezinu funkciju i doveli do njezine smrti. Samim time što se eliminiraju abnormalni proteini smanjuje se rizik od grešaka tokom staničnih procesa koje bi mogle dovesti do pojave raznih bolesti. Također, ovaj je proces uključen u niz drugih životno važnih procesa, kao što su prilagodba raznim okolišnim uvjetima, kontrola rasta i razvoja, itd.

Biljke, kao sesilni organizmi koji nemaju mogućnosti promjene svoje lokacije kad nastupe nepovoljni uvjeti, morale su dodatno razviti niz mehanizama kojima se prilagođuju promjeni okolišnih uvjeta. Pod kontrolom biljnih hormona, koji reguliraju gotovo sve aspekte biljnog rasta i razvoja, od klijanja do cvjetanja, kao i regulacijom sinteze i razgradnje proteina, biljke već milijunima godina odoljevaju izazovima koje im predstavljaju brojni, ponekad vrlo negostoljubivi okolišni uvjeti, kao i prisustvo brojnih patogena i predatora te su postale sveprisutne u živom svijetu.

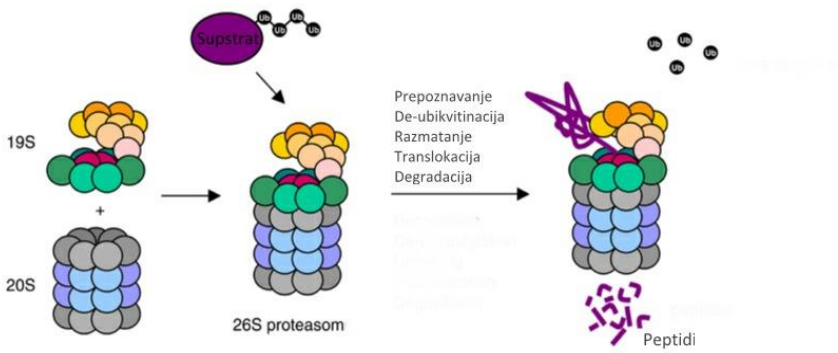
1.1. Sustav razgradnje proteina u biljaka

Regulirana razgradnja proteina omogućuje biljkama održavanje određene razine proteina, ali i mogućnost rješavanja onih abnormalnih i potencijalno štetnih. Biljke, a i drugi organizmi koriste brojne mehanizme kako bi to postigli, a jedan od najprisutnijih je regulirana proteinska razgradnja ubikvitin-proteasomnim putem. U ovom sustavu, glavna komponenta je protein ubikvitin. Toje maleni protein, molekularne mase od otprilike 8,5 kDa, građen od 76 aminokiselina i prisutan u svim eukariotskim stanicama (Slika 1). Razgradnja proteina ubikvitin-proteasomnim putem uključuje dva odvojena i uzastopna koraka: obilježavanje ciljanog proteina supstrata kovalentnim vezanjem molekule ubikvitina (ubikvitinacija) i posljedična razgradnja obilježenog proteina u proteasomu 26S (Liu i sur. 2014; Smalle i Vierstra 2004). U procesu ubikvitinacije najčešće se zadnja aminokiselina ubikvitina (karboksilna grupa glicina 76) izopeptidnom vezom veže s ε-aminogrupom lizina proteina



Slika 1. Struktura molekule ubikvitina. Preuzeto s http://middlab.middlebury.edu/files/2010/08/ubiquitin.png

supstrata. Na ciljani protein može se vezati samo jedan (monoubikvitinacija) ili lanac ubikvitina (poliubikvitinacija) što naposljetku odlučuje o sudbini ubikvitiniranog proteina. Lanac ubikvitina se gradi vezanjem C-kraja nadolazećeg ubikvitina s jednim od sedam lizina već vezanog ubikvitina. Samo poliubikvitinacija na definiranim lizinima (najčešće K48 i K29) obilježava proteine za degradaciju proteasomom (što se često naziva „molekularni poljubac smrti“) (Komier i Rape 2012; Zhang i sur. 2013).



Slika 2. Prikaz degradacije ubikvitiniranih proteina proteasomom 26S. Ubikvitinirane proteine prepoznaje 19S podjedinica koja razmata i translocira protein u katalitičku 20S podjedinicu gdje se on razgrađuje na oligopeptide. Preuzeto i pilagođeno iz http://www.nature.com/leu/journal/v20/n9/images/2404319f2.jpg

Proteasom 26S je proteinski kompleks od 2,5 MDa, sastavljen od približno 31 različite podjedinice, čija je uloga razgradnja proteina proteolizom (Slika 2) (Voges i sur. 1999). Sadrži proteolitičku jezgru u obliku bačve (proteasom 20S) koja je s jedne ili s obje strane zatvorena s regulatornim kompleksima 19S koji prepoznaju ubikvitinirane proteine. Regulatorni kompleksi su također uključeni u razmatanje i translokaciju ubikvitiniranih proteina u unutrašnjost kompleksa 20S gdje se oni razgrađuju na oligopeptide.

Tek kada je genom vrste *Arabidopsis thaliana* bio u potpunosti sekvenciran, shvatilo se koliko je taj put krucijalan u biljnim stanicama. Istraživanja genoma predvidjela su da više od 5% proteoma roda *Arabidopsis* sudjeluje u ubikvitin-proteasomnom putu i, štoviše, pokazano je da ovaj put utječe na gotovo sve aspekte biljnog rasta i razvoja uključujući stanični ciklus, embriogenezu, senescenciju, obranu, odgovor na okolišne uvjete i signalizaciju hormonima.

Proces dodavanja ubikvitina na protein supstrat zahtijeva prisustvo tri tipa enzima: ubikvitin-aktivirajući enzim E1, ubikvitin-konjugirajući enzim E2 i ubikvitin-ligaze E3. Ubikvitin-konjugirajuća kaskada proces je od tri koraka (Slika 3), a započinje aktivacijom molekule ubikvitina.

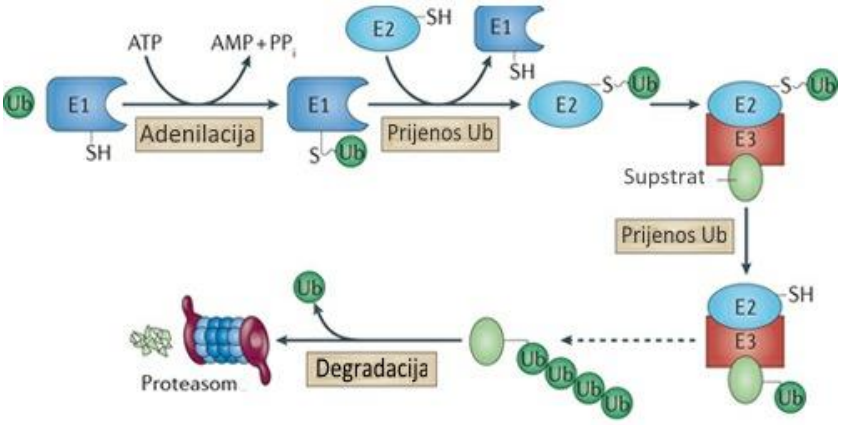
1. Aktivacija ubikvitina

Kako bi se ubikvitin uspješno vezao za protein supstrat, prvo mora biti aktiviran. Aktivacija je reakcija od dva koraka koja uključuje ubikvitin-aktivirajući enzim E1, a sam proces je ovisan o ATP-u. Enzimi E1 su polipeptidi građeni od ~1100 aminokiselina koji sadrže pozicijski konzerviran cistein, kojim vežu ubikvitin, i motiv za vezanje nukleotida potreban za interakciju s ATP. Biljka *A. thaliana* eksprimira samo dvije izoforme E1 (Smalle i Vierstra 2004).

Prvi korak aktivacije ubikvitina uključuje stvaranje ubikvitin-adenilata: enzim E1 istovremeno veže ATP i ubikvitin te katalizira vezanje molekule ATP na C-kraj molekule ubikvitina. Drugi korak uključuje prijenos aktiviranog ubikvitina na cistein aktivnog mjesta enzima E1 čime se oslobađa AMP. Ovaj korak rezultira u tioesterskoj vezi između karboksilne skupine C-kraja ubikvitina i sulfhidrilne skupine cisteina enzima E1. Bez obzira što je u stanici prisutan u niskim razinama, ovaj enzim osigurava dovoljne razine aktiviranog ubikvitina koji se koristi u nizvodnim reakcijama budući da ima visoku katalitičku efikasnost.

2. Konjugacija ubikvitina

Biljka *Arabidopsis thaliana* u svom genomu ima najmanje 37 gena koji kodiraju za razne izoforme enzima E2, no sve izoforme sadrže očuvanu katalitičku jezgru od 150 aminokiselina koja okružuje cistein aktivnog mjesta (Smalle i Vierstra 2004). Iako su poznata biokemijska svojstva brojnih biljnih E2, vrlo se malo zna o njihovoj specifičnoj funkciji *in vivo*, prvenstveno jer E2 mutanti još uvijek nisu dostupni.



Slika 3. Prikaz procesa ubikvitinacije u tri koraka. Aktivacija molekule ubikvitina vezanjem za enzim E1 nakon čega slijedi njegov prijenos na enzim E2. Ligaze E3 dovode protein supstrat u neposrednu blizinu Ub-E2 konjugata čime olakšava prijenos ubikvitina. Poliubikvitinirani protein se razgrađuje u proteasomu. Preuzeto i prilagođeno iz Maupin i Furlow 2011.

Ubikvitin-konjugirajući enzimi E2 kataliziraju prijenos aktiviranog ubikvitina s E1 na cistein aktivnog mjesta enzima E2 reakcijom trans(tio)esterifikacije (Slika 3.) (Smalle i Vierstra 2004).

3. **Ligacija ubikvitina**

Kao zadnje komponente ove kaskade, ligaze E3 su odgovorne za prepoznavanje proteina supstrata na koji se prenosi aktivirani ubikvitin. Upravo su zbog toga ligaze E3 nabrojniji i najrazličitiji faktori ove kaskade. Poznato je da genom roda *Arabidopsis* sadrži više od 1300 gena koji kodiraju za podjedinice ligaza E3 (Smalle i Vierstra 2004).

Postoje dvije glavne skupine ligaza E3: HECT (engl. *Homologous to E6-associated protein C-terminus*) i RING-finger ligaze E3. U dodatku, definirane su još dvije potklase RING-finger ligaza: ligaze s domenom RIR (engl. *RING in between RING-RING*) i kompleks kojeg sačinjava više proteina – CRL (engl. *Cullin-RING* ligaze E3) (Ardley i sur. 2005).

1.1.1. Ligaze E3 s domenom HECT

Jedna od prvih identificiranih i opisanih ligaza E3 bila je E6-AP1. Nakon toga su otkriveni i brojni drugi proteini sa sličnom katalitičkom domenom od 350 aminokiselina. Ove domene HECT funkcioniraju slično kao E1 i E2: svaka sadrži središnji cistein koji se ponaša kao akceptor ubikvitina. Funkcionalna skupina cisteina stvara tioestersku vezu s karboksilnom skupinom glicina C-kraja ubikvitina prije nego se veže na protein supstrat. Pretpostavlja se da C-terminalna domena HECT obnaša ulogu ligaze E3, dok je N-terminalna domena uključena u vezanje različitih supstrata (Ardley i sur. 2005).

1.1.2. RING-finger ligaze E3

Za razliku od ligaza s domenom HECT, one s domenom *RING-finger* nemaju katalitičku ulogu i ne stvaraju intermedijer s ubikvitinom. Umjesto toga, ovaj tip ligaza u najmanju ruku služi kao okosnica koja pozicionira E2 i protein supstrat u blizinu čime se olakšava prijenos ubikvitina s E2 na protein supstrat (Metzger i sur. 2012).

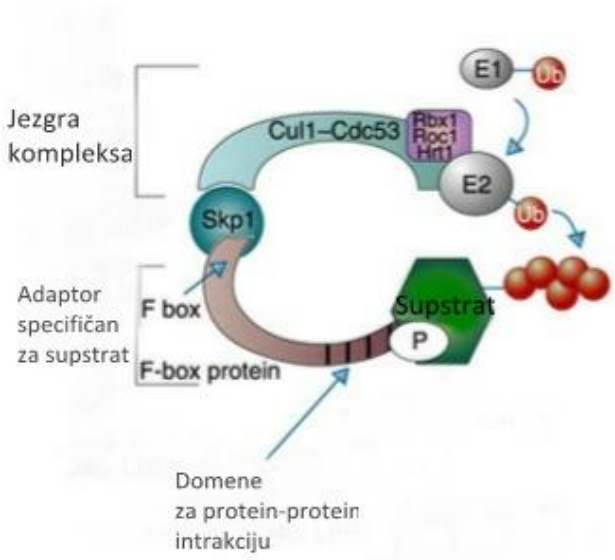
Članovi ove skupine ligaza mogu funkcionirati kao monomeri, dimeri, ali najčešće u sklopu kompleksa sastavljenih od više podjedinica. Najveću podskupinu ovih ligaza čini obitelj Cullin-RING ligaza (CRL), a svima je zajedničko da jezgru kompleksa čini protein Cullin (CUL) koji služi kao okosnica koja povezuje katalitički dio kompleksa s dijelom koji prepoznaje i stupa u interakciju s proteinskim supstratom. U ovu skupinu spada kompleks SCF (koji se sastoji od proteina SKP1 (engl. *S-phase kinase-associated protein 1*), CUL i proteina F-box), i detaljno istražen kompleks APC/C (engl. *Anaphase-promoting compleks/cyclosome*).

1.1.2.1 APC/C

Pravilno odvijanje staničnog ciklusa uvelike ovisi o dvije obitelji ligaza RING, a to su APC/C i SCF. Kompleks APC/C sastoji se od najmanje trinaest različitih podjedinica, uključujući i protein *RING-finger* - APC11 i protein CUL - APC2. Jedan od dva ko-aktivatora, CDC20 i CDH1, bitni su za specifičnost supstrata te se vežu za kompleks APC/C u različitim stadijima staničnog ciklusa. Kompleks APC/CCDC20 je aktivan od prometafaze do telofaze, a njegovi su supstrati sekurin, čija razgradnja omogućuje pravilno odvajanje sestrinskih kromatida, i ciklin B, čija je razgradnja potrebna za sprječavanje daljnje aktivnosti kinaza CDK1 nakon završetka mitoze. U G1 fazi, CDC20 zamjenjuje CDH1 i time je drugi set supstrata ciljan za razgradnju. Jedan od supstrata je i fosfataza CDC25 čime se aktiviraju inhibitori kinaze CDK – p21 i p27. Prijelaz u S fazu je omogućen inaktivacijom CDH1 fosforilacijom s CDK2 (čime se odvaja od APC/C) (Metzger i sur. 2012).

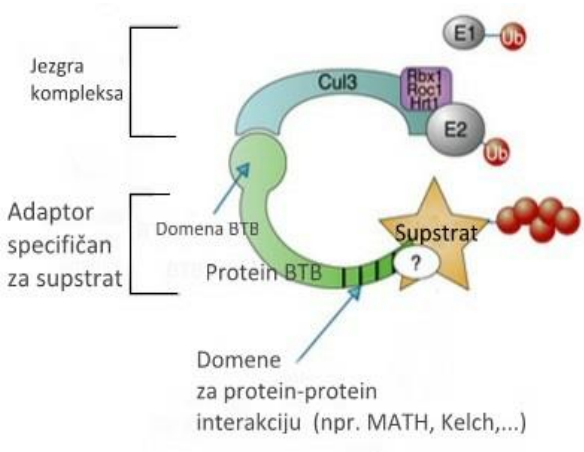
1.1.2.2. SCF

Kompleks SCF također ima važnu ulogu u progresiji kroz stanični ciklus, točnije, regulira prijelaz između faza G1/S i faza G2/M (Ardley i sur. 2005; Smalle i Vierstra 2004). Kompleks SCF sastoji se od tri ključne podjedinice i nekoliko dodatnih komponenti (Slika 4.). Protein F-box (npr. protein Cdc4) doprinosi specifičnosti kompleksa SCF tako što veže proteine supstrate neovisno o kompleksu te se zatim veže za komponentu Skp1 čime se ciljani protein dovodi u blizinu enzima E2. Protein F-box je također važan u regulaciji aktivnosti kompleksa SCF tijekom staničnog ciklusa. Protein Skp1 je esencijalan za prepoznavanje i vezanje proteina F-box te ga povezuje s proteinom *Cullin* 1 (CUL1 ili Cdc53). Protein CUL1 u kompleksu SCF



Slika 4. Kompleks SCF i njegove najvažnije komponente. Protein CUL1 formira strukturnu okosnicu oko koje se sastavljaju ostale komponente kompleksa SCF. Protein F-box povezuje protein supstrat s proteinom Skp1 koji je preko proteina CUL1 povezan s proteinom Rbx1. Na ovaj se način enzim E2 dovodi u povoljnu poziciju za prijenos aktiviranog ubikvitina na protein supstrat. Preuzeto i prilagođeno iz Krek 2003.

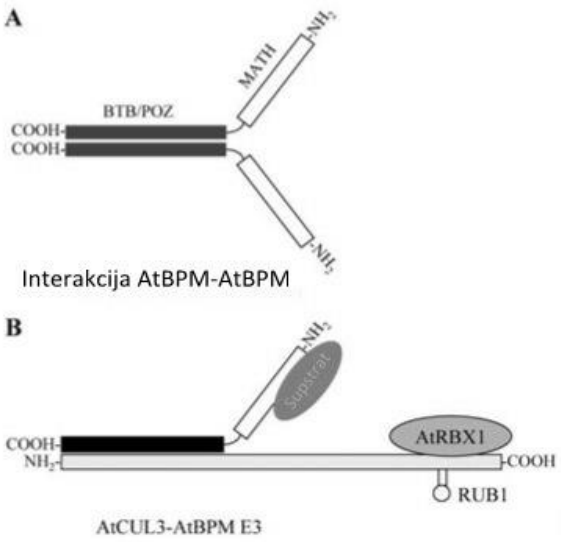
formira strukturnu okosnicu i povezuje Skp1 s *RING–finger* proteinom Rbx1. Protein Rbx1 je protein *RING-finger* koji veže konjugat enzima E2 i ubikvitina s CUL1 te ga dovodi u povoljnu poziciju za prijenos aktiviranog ubikvitina na lizin proteina supstrata.



Slika 5. Proteini BTB se s proteinom CUL3 povezuju preko svoje domene BTB. Sekundarna domena ima ulogu adaptora koji omogućuje vezanje supstrata i dovođenja kompleksa CRL3 u povoljnu blizinu za ubikvitinaciju. Preuzeto i prilagođeno iz Krek 2003.

1.1.3. Ligaze E3 temeljene na CUL3

Ligaze E3 temeljene na CUL3 sastoje se od proteina CUL3 koji na svojoj C-terminalnoj regiji veže protein Rbx1, a na svojoj N-terminalnoj regiji ulazi u interakciju s proteinima koji sadrže domenu BTB/POZ (engl. *Broad-complex,* tramtrack, bric-*à*-brac/Pox *virus i zinc finger*). Proteini BTB/POZ čine raznoliku grupu proteina koja u biljci *Arabidopsis* sadrži osamdesetak članova. Ovi su proteini podijeljeni u 12 podgrupa, ovisno o njihovoj sekundarnoj domeni (npr. domena MATH, Kelch,...). Dok je njihova domena BTB/POZ potrebna za interakciju s proteinom CUL3 i s drugim proteinima BTB/POZ, sekundarna domena ima ulogu adaptora koji omogućuje vezanje supstrata i dovođenja kompleksa CRL3 u povoljnu poziciju za ubikvitinaciju (Slika 5).



Slika 6. Shematski prikaz sastavljanja proteina AtBPM i AtCUL3

a) Proteini AtBPM se s ostalim proteinima AtBPM sastavljaju preko svoje domene BTB/POZ (crni kvadrat)

b) N-terminalna domena AtCUL3 ulazi u interakciju s domenom BTB/POZ od AtBPM. Preuzeto i prilagođeno iz Weber i sur. 2005.

Jedan dio obitelji proteina BTB/POZ čine proteini koji, uz C-terminalnu domenu BTB/POZ, sadrže i domenu MATH unutar prvih 200 aminokiselina N-terminalne regije (Gingerich i sur. 2005). U biljci *Arabidopsis*, kompleks ligaze E3 ovog tipa građen je od jedne od dviju izoformi CUL3 – AtCUL3a ili AtCUL3b, proteina AtRbx1 i jednog od proteina obitelji BTB/POZ-MATH. Rod

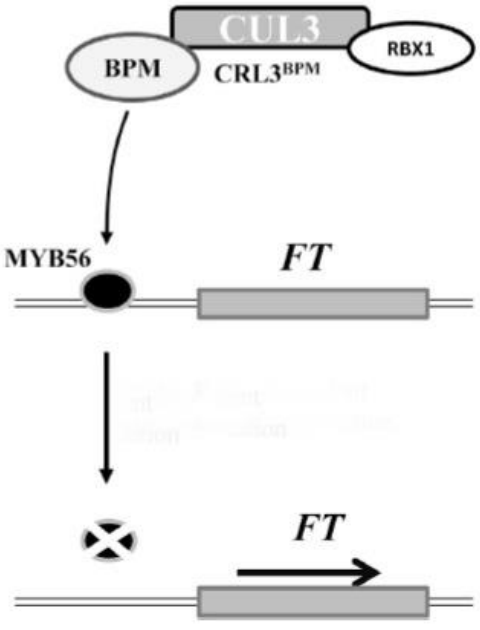
Arabidopsis ima šest gena (*AtBPM1, AtBPM2, AtBPM3, AtBPM4, AtBPM5, AtBPM6*) koji kodiraju za proteine s domenama MATH i BTB/POZ, a proteini BPM su lokalizirani ili u jezgri ili u citoplazmi te sa svojom domenom BTB ulaze u interakciju s AtCUL3a ili AtCUL3b dok domena MATH služi za prepoznavanje proteinskih supstrata (Slika 6) (Weber i sur. 2005).

1.1.4. Proteini AtBPM i njihovi proteinski supstrati

Funkcionalna karakterizacija proteina MATH-BTB u uročnjaka pokazala je da su oni dio kompleksa E3 ubikvitin ligaze uključenog u proteasomalnu degradaciju najmanje triju familija transkripcijskih regulatora (ERF/AP2, R2R3-MYB i HD-ZIP klase 1) i imaju ulogu u regulaciji brojnih razvojnih procesa (Cheni sur. 2013, 2015) kao i u odgovoru na stres (Weber i sur. 2009, Lechner i sur. 2011).

1.1.4.1. Uloga proteina AtBPM u cvjetanju

Cvjetanje je u mnogim biljnim vrstama kontrolirano fotoperiodom, kao i sezonskim promjenama u prirodi. Najvažniji okolišni signali koji 'govore' biljkama da su nastupili optimalni uvjeti za reprodukciju su sezonske fluktuacije u temperaturi i duljini dana. Gen *Flowering locus T* (*FT,* TAIR oznaka: AT1G65480) jedan je od ključnih gena koji je uključen u cvjetanje vezano uz dugi dan. Gen *FT* je tkivno-specifičan, što znači da se eksprimira u točno određenim biljnim tkivima: glasnička RNA tog gena sintetizira se i prevodi u protein jedino u floemu lista, a protein se zatim prenosi u vršni meristem gdje služi kao transkripcijski ko-regulator te mijenja razvojni program iz vegetativnog u reproduktivni (Turck i sur. 2008).



Slika 7. Model regulacije transkripcije gena *FT* razgradnjom proteina AtMYB56 posredovanom ligazom $CRL3^{BPM}$. Preuzeto i prilagođeno iz Chen i sur. 2015

Ekspresija gena *FT* ovisi o raznim okolišnim i razvojnim čimbenicima i značajno se mijenja tijekom dana. Složena ekspresija usko je vezana i regulirana aktivnošću velikog broja različitih transkripcijskih faktora. Jedan od regulatora gena *FT* je i transkripcijski faktor AtMYB56 čija je ekspresija u suprotnom odnosu s ekspresijom gena *FT*. Drugim riječima, AtMYB56 je transkripcijski inhibitor gena *FT* kao i samog cvjetanja. Chen i suradnici (2015) su u svojim istraživanjima otkrili, ne samo da protein AtMYB56 ulazi u interakciju s proteinima BPM, već da proteini BPM pozitivno utječu na sam proces cvjetanja. Zbog ovih saznanja predložen je model koji opisuje ulogu E3 ligaza $CRL3^{BPM}$ u proteolitičkoj degradaciji proteina AtMYB56 čime se regulira ekspresija gena *FT*. Degradacija proteina AtMYB56 dovodi do povećane ekspresije FT i posljedično inducira razvoj cvijeta (Slika 7) (Chen i sur. 2015).

1.1.4.2. Uloga proteina AtBPM u odgovoru na apscizinsku kiselinu i stres

Biljni hormon apscizinska kiselina (ABA) regulira brojne aspekte biljnog rasta i razvoja uključujući dormanciju i klijanje sjemenki, reprodukciju, a ujedno je i ključna sastavnica odgovora biljaka na biotički i abiotički stres, posebice hladnoću, salinitet i sušu. Jedan od gena uključen u odgovor na ABA-u je gen *AtHB6* (TAIR oznaka: AT2G22430). Protein AtHB6 spada u klasu I transkripcijskih faktora HD-ZIP (engl. *Homeodomain leucine zipper*). Proteini HD-ZIP sadrže dvije funkcionalne domene, a to su homeodomena (HD), kojom vežu molekulu DNA, i domene ZIP (engl. *leucine zipper*) koja je uključena u interakciju protein-protein (Elhiti i Stasolla 2009). Protein AtHB6 je najvjerojatnije dio signalnog puta koji je uključen u odgovor na sušu. Uz to je uključen u osjetljivost na ABA-u tokom klijanja sjemenki te u zatvaranje puči. Čini se da protein AtHB6 negativno regulira odgovor na ABA-u. Lechner i suradnici (2011) su pokazali da smanjenje ekspresije gena *BPM* dovodi do povećane količine proteina AtHB6 te da pojačana ekspresija BPM3 smanjuje prisutnost proteina AtHB6 i fenotipske promjene poput smanjenog rasta kojeg uzrokuje ektopična ekspresija gena *AtHB6*. Sve ovo upućuje na to da je protein AtHB6 reguliran proteinima BPM na postranslacijskoj razini proteasomnom degradacijom. Pored toga, AtHB6 regulira vlastitu ekspresiju tako što se veže za promotor vlastitog gena, a služi i kao represor gena *AtGST11* (TAIR oznaka: AT1G02920).

Uloga enzima glutation S-transferaza (GST) u biljaka je detoksifikacija niza štetnih endogenih i ksenobiotičkih spojeva u mnogim biotičkim i abiotičkim stresnim uvjetima. GST su u biljkama inducirane gljivičnim infekcijama, uvjetima koji uzrokuju oksidacijski stres,

vodikovim peroksidom, glutationom, biljnim hormonima, teškim metalima, toplotnim šokom, dehidracijom, ozljedama, i dr. U biljci *A. thaliana*, superobitelj GST obuhvaća više od 50 gena (Kouno i Ezaki 2013). Ovi geni imaju kompliciranu regulaciju koja uključuje mnogo transkripcijskih faktora. Jedan od gena koji spada u superobitelj GST je i *AtGST11* kojeg inducira prisustvo aluminija kao i oksidativni ili toplinski stres (Kouno i Ezaki 2013). Geni *GST* imaju kompliciranu regulaciju koja uključuje mnogo transkripcijskih faktora. Jedan od njih je i protein AtHB6 za kojeg je otkriveno da služi kao represor gena *AtGST11*.

1.2. Epigenetika u biljaka

Ekspresija gena u eukariota uvelike ovisi o strukturi kromatina. Tako je, primjerice, ekspresija gena inaktivirana u kompaktnom kromatinu koji se sastoji od gusto pakiranih nukleosoma (heterokromatin), ali je aktivna u manje gustom kromatinu s rjeđe pakiranim nukleosomima (eukromatin). Iako su mehanizmi koji definiraju gustoću pakiranja kromatina još uvijek nepotpuno istraženi, neke od kemijskih modifikacija molekule DNA i proteina histona, znane kao epigenetičke modifikacije, utvrđene su kao bitni čimbenici koji utječu na strukturu kromatina.

Metilacija citozina u molekuli DNA je jedna od najbolje istraženih epigenetičkih modifikacija i u biljaka i u sisavaca. Dok je metilacija citozina u sisavaca uglavnom ograničena na simetričnu sekvencu CG, biljke, uz ove, metiliraju i citozine u slijedovima CHG i CHH (gdje je H = A, C ili T) (Xie i Yu 2015). Metilacija DNA je relativno stabilna modifikacija i može se održavati kroz proces replikacije molekule DNA i prenijeti na stanice kćeri. Stabilnost je također važna za obranu biljaka od mobilnih elemenata transpozona koji, kad nisu metilirani postaju aktivni temogu inducirati mutacije i kromosomsku nestabilnost (Chan i sur. 2005). Pravilna regulacija metilacije DNA također je važna za rast i razvoj te odgovor na promjene u okolišu.

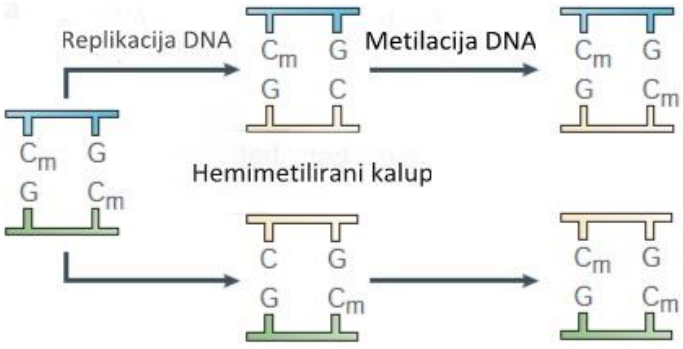
Zanimljivo je da eukariotske DNA metiltransferaze imaju strukturne homologe u prokariotima gdje su one dio sustava za restrikciju i modifikaciju čime se selektivno razgrađuje strana, nedomaćinska DNA (Chan i sur. 2005). Zbog toga se može pretpostaviti da je posljednji univerzalni zajednički predak svih organizama koristio metilaciju DNA za zaštitu genoma. Sisavci ovaj proces koriste za uspostavljanje genomskog utiska, inaktivaciju X-kromosoma i utišavanje gena koji kodiraju tumor-supresore, a biljke koriste metilaciju DNA za genomski utisak i za regulaciju ekspresije obitelji ponavljajućih gena (Chan i sur. 2005).

Metilacija DNA u biljci *A. thaliana* ima dvije uloge: zaštita genoma i održavanje njegove stabilnosti te regulacija ekspresije gena. U suglasnosti s prvotnom ulogom metilacije u zaštiti genoma, najvećim se dijelom metiliraju upravo transpozoni i ostale ponavljajuće sekvence čime se održava stabilnost genoma. Ove su sekvence najčešće smještene oko centromera, ali su također pronađene i u eukromatinu. Sekvence koje sadrže uzastopna ili inverzna ponavljanja su također često metilirane. Primjerice, transpozoni imaju inverzna ponavljanja na svojim krajevima, a retrotranspozoni su okruženi uzastopno ponavljajućim sekvencama i u oba slučaja njihova metiliranost ujedno uzrokuje njihovu utišanost. Još uvijek nije jasno kako biljke razlikuju ove ponavljajuće sekvence od onih jedinstvenih (Chan i sur. 2005).

U nekim slučajevima, metilacija DNA može kontrolirati ekspresiju gena. Primjer za to su geni za ribosomnu RNA čije su brojne kopije većim dijelom utišane. Gen koji kodira za transkripcijski faktor FWA, uključen u razvojne procese, također je reguliran metilacijom DNA. Taj se gen prepisuje samo u endospermu dok je u svim ostalim biljnim tkivima utišan metilacijom ponavljajućih slijedova ispred sekvence koja se prepisuje. Metilacija promotorskh regija najčešće inhibira transkripciju dok metilacija kodirajućih regija u pravilu ne utječe na ekspresiju gena. Geni koji su iznimka tom pravilu su *SUPERMAN* i *AGAMOUS* koji su utišani kad je njihova transkribirajuća regija metilirana (Chan i sur. 2005).

1.2.1. Održavanje metiliranosti molekule DNA

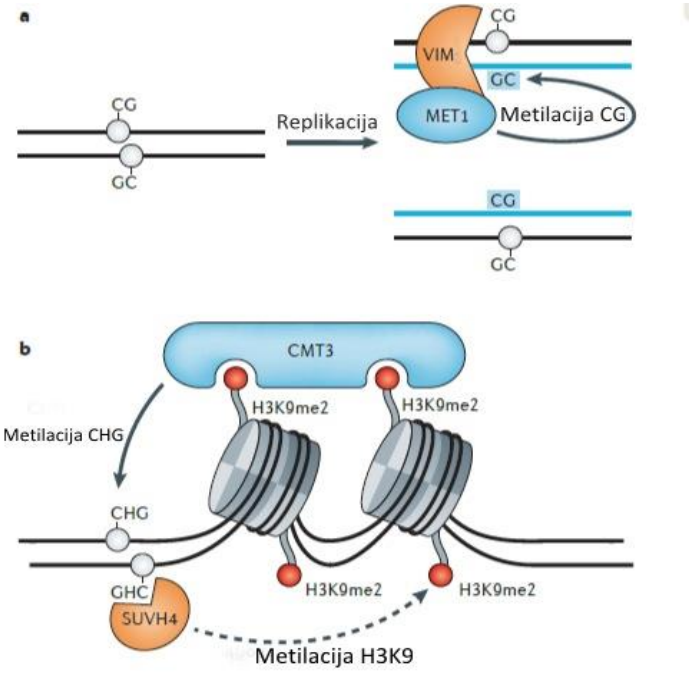
Metilaciju u slijedovima CG i CHG moguće je, zbog simetričnosti, održavati nakon replikacije na temelju metilacije lanca u novoj hemimetiliranoj molekuli DNA. U biljci *A. thaliana*, metiliranost molekule DNA je održavana s dva tipa DNA metiltransferaza, a to su DNA metiltransferaza 1 (MET1) i kromometilaza 3 (CMT3).



Slika 8. Nakon razdvajanja lanaca tijekom replikacije DNA, oba su lanca hemimetilirana. Hemimetilirana mjesta prepoznaju proteini VIM koji dovode MET1 potrebnu za metilaciju nemetiliranih citozina u slijedu CG. Preuzeto i pilagođeno iz Chan i sur. 2005.

DNA metiltransferaza 1 (MET1) metilira citozine u slijedovima CG. Ova je metiltransferaza homolog Dnmt1 metiltransferaze sisavaca. Hemimetilirana CG mjesta, stvorena tokom replikacije DNA, prepoznaje obitelj proteina VIM (engl. *Variant in methylation*) koji zatim dovode MET1 na mjesto replikacije DNA. Metiltransferaza MET1 metilira citozine nemetiliranog lanca prateći obrazac metilacije sestrinskog lanca (Slika 8 i 9a).

Kromometilaza 3 (CMT3) metilira citozine u sljedovima CHG. Metilacija CHG se održava mehanizmom pozitivne povratne sprege koja ujedno uključuje dimetilaciju lizina 9 histona H3 (H3K9me2). CMT3 prepoznaje i veže histon H3 metiliran na lizinu 9, a zatim metilira obližnje citozine u slijedu CHG. Na metilirani slijed CHG veže se protein SUVH4 (engl. *Su(var) homologue 4*) uključen u dimetilaciju H3K9. Metilacija histona s proteinom SUVH4 oko metiliranih CHG predstavlja jedan način pozitivne povratne sprege jer jedna metilacija dovodi do druge (Slika 9b). Još uvijek nije jasno veže li CMT3 metilacijske oznake histona dva različita ili istog nukleosoma (Chan i sur. 2005).



Slika 9. a) Hemimetilirana CG mjesta nakon replikacije DNA prepoznaje obitelj proteina VIM koji zatim dovode MET1 na mjesto replikacije DNA **b)** CMT3 prepoznaje i veže histon H3 dimetiliran na lizinu 9, a zatim metilira obližnja mjesta CHG. Metilirani CHG dovodi protein SUVH4 koji dimetilira histon H3. Preuzeto i prilagođeno iz Kawashima i Berger 2014.

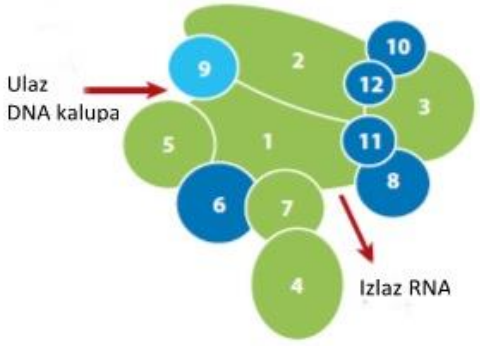
1.2.2. *De novo* metilacija DNA

Sljedovi CG i CHG predstavljaju simetrične sljedove, dok su metilirani sljedovi CHH asimetrični. Nakon replikacije DNA, metilacijska oznaka se ne može prepisati na hemimetiliranom kalupu, stoga je potreban neki drugi aktivni signal koji će iznova omogućiti metilaciju tokom svakog staničnog ciklusa. Drugim riječima, metiliranost asimetričnih slijedova CHH se iznova uspostavlja u svakom staničnom ciklusu i zbog toga se naziva i *de novo* metilacija DNA. *De novo* metilacija DNA zahtijeva prisustvo 24 nukleotida dugih

interferirajućih molekula RNA (24-nt siRNA) koje dovode čitavu mašineriju za metilaciju DNA i usmjeravanju je na mjesto *de novo* metilacije citozina. Zbog toga što je ova metilacija usmjeravana molekulama RNA, naziva se i metilacija DNA posredovana molekulama RNA (engl. *RNA-directed DNA methylation* – RdDM) (Xie i Yu 2015).Ovaj put prvenstveno cilja transpozone i druge vrste ponavljanja čime doprinosi njihovom transkripcijskom utišavanju i održavanju stabilnosti genoma. Geni koji sadrže ostatke transpozona u svojim promotorskim regijama također mogu biti meta puta RdDM što ima ulogu u brojnim procesima poput obrane od patogena, odgovoru na stres i u razvoju gametofita i embrija (Kawashima i Berger 2014).

1.2.2.1. Proteini uključeni u put RdDM

Biljke, uz ostale, uobičajene RNA polimeraze ovisne od DNA, sadrže još dvije koje su specifične samo za njih, a to su RNA polimeraza IV (Pol IV) i RNA polimeraza V (Pol V). Ove polimeraze su veliki proteinski kompleksi s molekularnom masom od približno 1 MDa. Utvrđeno je da su evoluirale od RNA polimeraze II (Pol II) budući da imaju mnoge zajedničke podjedinice (Slika 10) (Xie i Yu 2015). Pol IV i Pol V dijele osam identičnih podjedinica, uključujući drugu najveću podjedinicu NRPD2/NRPE2. Također dijele četiri slične podjedinice, a u njih spadaju najveće podjedinice NRPD1 od Pol IV odnosno NRPE1 od Pol V. Iako ove podjedinice dijele neke karakteristike koje su evolucijski očuvane, one se ipak značajno razlikuju. Primjerice, N-terminalne regije NRPD1, NRPE1 i NRPB1 (najveća podjedinica Pol II) se javljaju u sve tri polimeraze, ali njihove C-terminalne regije pokazuju varijacije iz čega proizlaze njihove različite aktivnosti. Mutacije u NRPD1 i NRPE1 ukidaju metilaciju DNA na lokusima koje cilja put RdDM što potvrđuje bitnu ulogu Pol IV i Pol V u putu RdDM. Međutim, mutanti *nrpd1* i *nrpe1* imaju različite utjecaje na RdDM. Akumulacija siRNA (>94%) je ovisna o NRPD1 što pokazuje da Pol IV sudjeluje u njihovoj sintezi (Xie i Yu 2015).



Slika 10. Prikaz odnosa podjedinica u RNA Pol IV i RNA Pol V. Broj 1 obilježava najveću podjedinicu. Podjedinice koje su zajedničke Pol II, RNA Pol IV i RNA Pol V su prikazane tamno plavom bojom, a podjedinice jedinstvene RNA Pol IV i/ili RNA Pol V su prikazane zelenom bojom. Podjedinica označena brojem 9 je zajednička svim trima polimerazama i obnaša regulatornu funkciju u RNA Pol V. Preuzeto i prilagođeno iz Matzke i sur. 2014

Za pravilnu funkciju Pol IV i V potrebni su brojni proteinski faktori. Svaki od ovih faktora na neki način pridonosi pravilnoj funkciji puta RdDM što rezultira ispravnom metilacijom molekule DNA. Niže su navedeni proteini vezani za put RdDM.

Protein **CLSY1** (engl. *Classy 1*) – faktor remodeliranja kromatina potreban za sintezu 24-nt siRNA. U mutantima *clsy1*, signali podjedinice NRPD1 raspršeni su kroz cijelu nukleoplazmu za razliku od lokaliziranih signala oko konkretnih lokusa u divljem tipu. Ovo pokazuje da je protein CLSY1 potreban za pravilnu lokalizaciju Pol IVi produljivanje dsRNA (Chan i sur. 2005; Xie i sur. 2004).

Protein **SHH1** (engl. *Sawadee homeodomain homologue 1*) – dovođenje Pol IV do specifičnih regija zahtijeva protein SHH1 koji sa svojom domenom nalik Tudoru veže metilirani lizin 9 i nemetilirani lizin 4 histona H3 (H3K9me i H3K4) a ujedno ulazi u interakciju s Pol IV. Na ovaj način SHH1 pozicionira Pol IV na specifične regije omeđene histonima s navedenim epigenetičkim oznakama (Xie i Yu 2015).

Protein **KTF1** (engl. *Kow domain-containing transcription factor 1*) – homolog transkripcijskog elongacijskog faktora iz kvasacapotrebnog za pravilno funkcioniranje i pozicioniranje Pol V (Xie i Yu 2015).

Aktivnost Pol V također zahtijeva kompleks DDR koji se sastoji od proteina **DRD1** (engl. *Defective in RNA-directed DNA methylation1*), proteina **DMS3** (engl. *Defective in meristem silencing3*) i proteina **RDM1** (engl. *RNA-directed methylation 1*). Ovaj je kompleks potreban za dovođenje Pol V do kromatina te sintezu Pol V transkripata (Xie i Yu 2015).

Protein **DRD1** je član potporodice kromatin-remodelirajućih proteina Snf2 koji je prisutan samo u kopnenih biljka. Proteini Snf2 koriste energiju ATP-a za lokalno remodeliranje kromatina pomičući nukleosome i narušavajući kontakt između DNA i histona, a uključeni su u brojne stanične procese poput replikacije, transkripcije, popravka DNA i rekombinacije. U biljci *Arabidopsis*, potporodica DRD1 sastoji se od šest članova i gotovo su svi uključeni u put RdDM, najvjerojatnije na način da remodeliraju kromatin kako bi se omogućila progresija Pol IV i Pol V (Chan i sur. 2005; Matzke i sur. 2014).

Protein **DMS3** je neobičan protein koji sadrži domenu prisutnu u proteinima SMC (engl. *Structural maintenance of chromosomes*) koji su uključeni u strukturno održavanje kromosoma. Autentični proteini SMC sadrže središnju šarku (engl. *hinge domain*) omeđenu s dvije duge zavojnice koje završavaju s ATP veznim mjestima. Za razliku od Snf2 ATPaza, koje lokalno modificiraju strukturu kromatina, proteini SMC su uključeni u globalno modeliranje kromosoma i njegove dinamike. Postoji šest proteina SMC u eukariota, koji djeluju kao heterodimeri povezani središnjom šarkom: SMC1 i SMC3 su najvažnije

podjedinice kohezina koji reverzibilno obuhvaća sestrinske kromatide i regulira njihovo razdvajanje tokom stanične diobe, SMC2 i SMC4 dio su kondenzina, proteina uključenog u kondenzaciju kromosoma, a SMC5 i SMC6 su uključeni u popravak DNA. Protein DMS3 je protein koji je puno manji od autentičnih proteina SMC, a domena sa šarkom se razlikuje od one u proteinima SMC. Utvrđena je interakcija proteina DMS3 i MORC6. Ovaj kompleks remodelira kromatin i stabilizira razmotano stanje molekule DNA (Matzke i sur. 2014).

Protein **RDM1** je najtajanstveniji protein uključen u put RdDM. To je mali, biljno specifičan protein, sastavljen od 163 aminokiseline, koji ima jedinstven proteinski nabor i domenu čija je funkcija još uvijek nepoznata. Budući da u mutantima *rdm1* dolazi do gotovo potpunog gubitka metiliranosti DNA, zaključeno je da protein RDM1 igra bitnu ulogu u putu RdDM. Utvrđeno je da RDM1 povezuje proteine AGO4 i DRM2, ali i kao komponenta kompleksa DDR olakšava transkripciju Pol V (Matzke i sur. 2014).

Uz ove najvažnije proteinske faktore, tri histon metiltransferaze, SUVH2, SUVH9 i SUVR2 imaju ulogu u putu RdDM (Matzke i sur. 2014). Ovi proteini mogu vezati metiliranu DNA sa svojom domenom *SET and RING associated* i time olakšati interakciju između Pol V i kromatina na nekim lokusima s već postojećom metilacijom DNA.

RNA polimeraza ovisna o RNA (RDR) je polimeraza koja koristi RNA transkripte Pol IV kao kalup za sintezu dvolančanih RNA. Ovi su proteini pronađeni u biljkama, gljivama, obliću *Caenorhabditis elegans*, ali ne i u miševima i ljudima. U uročnjaku postoji šest proteina RDR (RDR1-6) od kojih RDR1, -2 i -6 dijele C-terminalni katalitički motiv DLDGD, prisutan u svim eukariotskim RDR (Xie i Yu 2015). Polimeraza **RDR2** jedina sudjeluje u metilaciji DNA posredovanom 24-nt siRNA. Polimeraza RDR2 kolokalizira s proteinima DCL3 i AGO4 u jezgrinim Cajalovim tjelešcima. Činjenica da je 98,5 % siRNA prepisanih s Pol IV izgubljeno u mutantima *rdr2* i da su Pol IV i RDR2 fizički povezani *in vivo*, pokazuje da RDR2 zajedno s Pol IV sudjeluje u sintezi dsRNA koje dalje obrađuje protein DCL3 (engl. *Dicer-like 3*) (Xie i Yu 2015).

Protein **DCL3** je član obitelji ribonukleaza III (RNaza III) koja procesira dsRNA u ~21-24 pb dvolančane strukture s 5' fosfatom i 2 nukleotida 3' stršećim krajem na svakom lancu. Proteini Dicer sadrže nekoliko domena: DEAD box, helikaza-C, DUF283, PAZ, dvije RNaza III domene i dsRBD. Dvije RNaza III domene čine dimere unutar samog proteina koji hidroliziraju dsRNA. Domena PAZ je važna za prepoznavanje supstrata. Biljke kodiraju nekoliko proteina DCL koji su uključeni u nekoliko puteva malih molekula RNA. U biljci *Arabidopsis* postoje četiri proteina DCL (DCL1-DCL4). Protein DCL3 je glavni enzim uključen u sintezu 24-nt siRNA iz dugih dvolančanih RNA. Iako je protein DCL3 esencijalan

za stvaranje 24-nt siRNA, njegov nedostatak samo umjereno djeluje na metilaciju DNA što govori da drugi proteini DCL mogu imati ulogu u putu RdDM. Poznato je da protein DCL3 može stvarati 24-nt siRNA iz transkripata Geminivirusa koji imaju jednolančane DNA genome. Rezultirajuća 24-nt siRNA dobivena prepisivanjem virusnog genoma ulazi u sastav proteina AGO4 te usmjerava metilaciju DNA virusnog podrijetla što pomaže domaćinu u obrani protiv virusa. Međutim, ovaj proces ne uključuje RDR2 (Xie i Yu 2015).

Proteini **AGO** (engl. *Argonaute*) su efektorski proteini u putevima utišavanja gena molekulama siRNA. Protein AGO najčešće sadrži četiri glavne domene: N-terminalnu domenu i domene PAZ, MID i PIWI. Domena PAZ je odgovorna za vezanje 3' kraja, a domena MID 5' kraja molekule siRNA. Domena PIWI pokazuje sličnosti s enzimom ribonukleaza-H i odgovorna je za cijepanje ciljanih mRNA. Međutim, ne pokazuju svi proteini AGO aktivnost cijepanja (Vaucheret 2008). U uročnjaku postoji deset proteina AGO, a AGO4 i AGO6 sudjeluju u RdDM. Funkcija proteina AGO4 je dobro istražena. Protein AGO4 veže lokuse RdDM i igra esencijalnu ulogu metilaciji DNA. Molekule siRNA nastale djelovanjem DCL3 preuzima protein AGO4. Na temelju hibridizacije siRNA (koja je originalno nastala transkripcijom s Pol IV) i transkripta Pol V, proteini AGO4 asociraju s Pol V (točnije s njezinom podjedinicom NRPE1). Dovođenje proteina AGO4 do transkripata Pol V zahtijeva asistenciju proteina KTF1 (Vaucheret 2008; Xie i Yu 2015).

DNA metiltransferaze uključene u RdDM, od kojih je najvažnija DNA metiltransferaza 2 (DRM2), ulaze u interakciju s kompleksom AGO4-siRNA i metiliraju citozine na regiji DNA koju prepisuje Pol V. Ovo pokazuje da dovođenje DRM2 na ciljane lokuse uključuje AGO4-siRNA i sparivanje baza između siRNA i transkripata Pol V (Xie i Yu 2015).

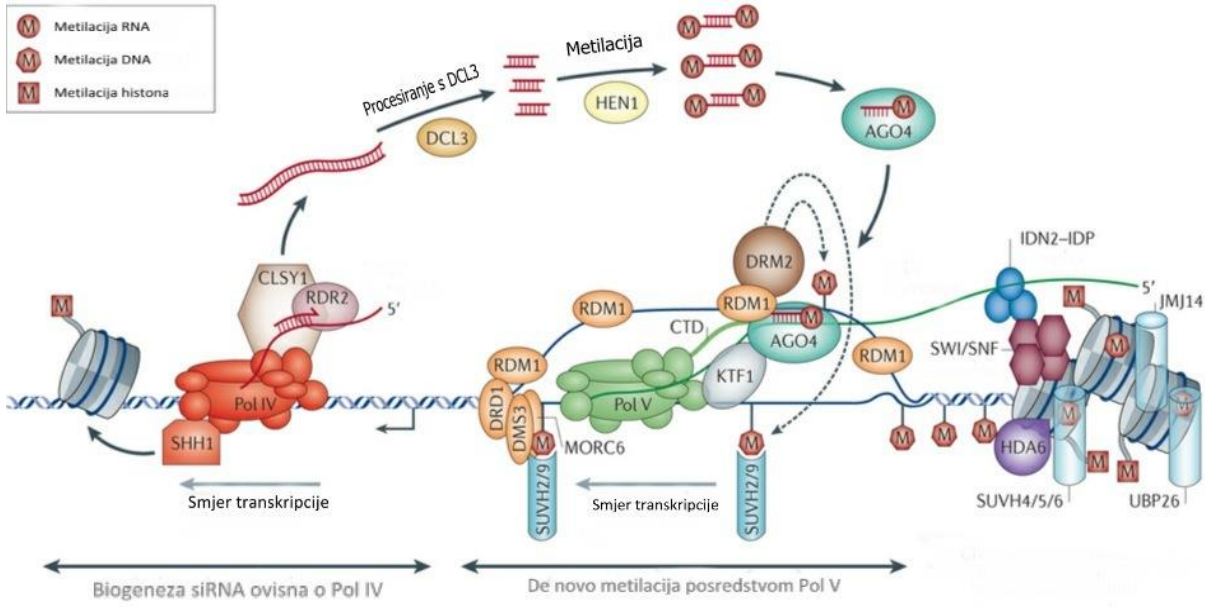
1.2.3. Put RdDM

Metilacija DNA posredovana molekulama RNA je proces koji dovodi do *de novo* metilacije citozina u slijedovima CG, CHG i CHH. Na slici 11 prikazane su ključne komponente puta RdDM.

Protein SHH1 prepoznaje i veže metilirani lizin 9 i nemetilirani lizin 4 histona H3 (H3K9me i H3K4) i dovodi RNA polimerazu IV koja prepisuje okolnu DNA. Protein RDR2 je fizički povezan s Pol IV i prepisuje jednolančane transkripte Pol IV u dvolančane molekule RNA (dsRNA). Novosintetizirane dsRNA se dalje procesiraju u 24-nt siRNA pomoću proteina DCL3, a nastali produkti, koji imaju 3' stršeće krajeve, metilira protein HEN1 (engl.

Hua enhancer 1) čime se štite od degradacije. 24-nt siRNA preuzima protein AGO4 ili AGO6, te ga one navode do dijela puta RdDM u koji je uključena RNA polimeraza V.

Nakon replikacije, kada je molekula DNA hemimetilirana, Pol V na te lokuse dovode proteini SUVH2 i SUVH9 koji prepoznaju već metiliranu DNA. Pol V zatim prepisuje ciljani lokus u molekule RNA koje služe kao okosnice oko kojih se sastavljaju ostale komponente puta RdDM. Transkripti RNA Pol V se sparuju sa siRNA vezane za AGO4/6. Interakcija između AGO4/6 i C-terminalne domene NRPE1 dodatno je učvršćena vezanjem proteina KTF1. Protein AGO4/6 zatim asocira s metiltransferazom DRM2 čime je pozicionira na lokus kojeg je potrebno metilirati *de novo*. Protein RDM1 služi kao veza između proteina AGO4 i DRM2, ali također funkcionira s proteinima DRD1 i DMS3 u kompleksu DDR remodelirajući kromatin kako bi omogućio transkripciju Pol V. Proteini MORC1 (ili MORC2) i MORC6 asociraju s proteinom SUVH2/9 i interagiraju s proteinom DMS3 te stabiliziraju razmotano stanje molekule DNA.



Slika 11. Prikaz puta RdDM i njegovih komponenti. Pol IV prepisuje jednolančanu molekulu RNA koju enzim RDR2 uz pomoć proteina CLSY1 prepisuje u dvolančanu RNA. Dvolančanu molekulu RNA dalje obrađuje enzim DCL3 u 24 nukleotida duge siRNA koje enzim HEN1 metilira na 3' krajevima te njih preuzima protein AGO4. Protein SHH1, koji veže metilirani histon H3, ulazi u interakciju s Pol IV i dovodi je do ciljanih lokusa. Pol V prepisuje molekulu RNA koja se sparuje sa siRNA koja se nalazi u proteinu AGO4. Protein AGO4 ulazi u interakciju s C-terminalnom domenom najveće podjedinice Pol V i s proteinom KTF1 koji stabilizira tu interakciju. Protein RDM1 povezuje protein AGO4 s proteinom DRM2 koji katalizira *de novo* metilaciju molekule DNA. Transkripcija Pol V je omogućena s aktivnošću proteina DRD1 koji odmata zavojnicu DNA, dok proteini DMS3 i MORC6 mogu pomoći u stvaranju i stabilizaciji razmotanog stanja. Dovođenje Pol V je potpomognuto s proteinima SUVH2 ili SUVH9 koji se vežu za metiliranu DNA. Preuzeto i prilagođeno iz Matzke i Mosher 2014.

Brojna su istraživanja provedena ne bi li se shvatilo što uzrokuje specifičnost puta RdDM ili transkripcije Pol IV i Pol V. Filogenetičkim analizama podjedinica 4, 5 i 7 Pol IV i Pol V pokazale su da su ove polimeraze u biljci *Arabidopsis* evoluirale kroz više koraka iz Pol II. Zbog toga postoji mogućnost da Pol IV i/ili Pol V na mjesto transkripcije dovode transkripcijski faktori kao što se događa sPol II. Metoda kromatinske imunoprecipitacije korištena je za pronalaženje mjesta genoma koja zauzima Pol V, ali nisu dobiveni nikakvi informativni rezultati, vjerojatno zato što je teško definirati promotorsku regiju za transkripciju s Pol V (Zhang i sur. 2013). Postoji mogućnost da specifične epigenetičke oznake igraju ulogu u dovođenju Pol IV i/ili Pol V. U biljci *Arabidopsis*, put RdDM ima ulogu u metilaciji repetitivnih sekvenci i transpozona, od kojih je većina jako metilirana ili 'označena' drugim modifikacijama histona poput monometilacije lizina 27 histona H3 i mono- i dimetilacije lizina 9 histona H3. Pol IV i Pol V možda imaju sklonost za kromatinskim regijama s ovakvim obilježjima. Mnogi aspekti puta RdDM ostaju misterija. Primjerice, još uvijek nije jasno koji nizvodni efektori doprinose utišanom stanju nakon *de novo* metilacije. U dodatku, nije poznato kako 24-nt siRNA u sklopu AGO4 fizički ciljaju i dovode DRM2 na određene lokuse. No ipak, najvažnije je pitanje kako RdDM mašinerija prepoznaje određene nemetilirane sekvence DNA, tj. koja je to specifična sekvenca ili sekundarna struktura koja dovodi mašineriju do svog cilja, kao i endogeni faktori koji su dio odgovora na invazivnu DNA.

1.3. Cilj istraživanja

U biljkama *A. thaliana* koje pojačano eksprimiraju proteine BPM1-TAP, pročišćavanjem proteina i identifikacijom tekućinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom, pronađeni su partneri proteina BPM1, a to su, između ostalih, proteini DMS3 i RDM1 uključeni u *de novo* metilaciju DNA. Sustavom dvaju kvaščevih hibrida dodatno je potvrđeno da proteini DMS3 i RDM1 direktno ulaze u interakciju s proteinima BPM1 i BPM3.

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju važnost proteina BPM u degradaciji transkripcijskih faktora, kao i direktnu interakciju proteina BPM s kromatinom. Budući da proteini BPM ulaze u interakciju s komponentama ključnim za *de novo* metilaciju DNA, u ovom će radu biti istraženo utječe li promjena ekspresije gena *BPM* na obrazac metilacije DNA. Koristeći metilacijski ovisne kao i metilacijski osjetljive restrikcijske enzime, provest ću digestiju DNA izolirane iz linija biljaka koje različito eksprimiraju gene *BPM*. Nakon

umnažanja istraživanih regija lančanom reakcijom polimerazom (PCR), pokušat ću utvrditi kako pojačana ekspresija ili utišavanje gena *BPM* utječe na *de novo* metilaciju DNA u izabranim lokusima.

2. Materijali i metode

2.1. Materijali

2.1.1. Biljni materijal

U radu su korištene biljke divljeg tipa uročnjaka *Arabidopsis thaliana,* ekotip Columbia, kao i različiti mutanti *A. thaliana,* ekotip Columbia.

Divlji tip (**wt**) – klijanci divljeg tipa služe kao kontrola u kojoj je *de novo* metilacija DNA standardna.

Linija **amiR-bpm** – Lechner i suradnici (2011) su uz pomoć tehnologije amiR (engl. *artificial microRNA*) dobili mutante u kojima je utišano nekoliko gena *BPM.* Poravnavanjem nukleotidnih sekvenci pokazano je savršeno podudaranje između sekvenci gena *BPM1, BPM4* i *BPM6* i sekvenci odabranih mikroRNA. Dobivene transgene linije su dalje istražili i dokazali smanjenu akumulaciju transkripta gena *BPM1*, *BPM4, BPM5* i *BPM6*. Na ovaj je način smanjena ekspresija gena *BPM1, BPM4, BPM5* i *BPM6*, dok je ekspresija gena *BPM2 i BPM3* normalna, pa čak i blago pojačana u odnosu na ekspresiju ovih gena u divljem tipu (Lechner i sur. 2011).

Linija **HB6** – linija u kojoj je pojačana ekspresija gena *AtHB6.* Dobivena je transformacijom divljeg tipa *A. thaliana* s konstruktom u kojem je gen *AtHB6* fuzioniran s genom za zeleni fluorescentni protein (gen *GFP*). Ekspresija ovog rekombinantnog gena je pod kontrolom jakog, konstitutivnog promotora 35S, te ova linija proizvodi rekombinantni protein AtHB6-GFP.

Linija ***cul3^{hyp}*** **–** udosadašnjim istraživanjima (Thomann i sur. 2009), pokazali su da mutacije u genima *AtCUL3a* i *AtCUL3b* u *A. thaliana* uzrokuju letalnost embrija. Kako bi dalje istražili funkciju proteina CUL3 u biljkama, znanstvenici su koristili linije *A. thaliana* s insercijama T-DNA. Jedna od linija koja im je poslužila bila je ona u kojoj je T-DNA ugrađena na sam kraj kodirajuće sekvence gena *AtCUL3a.* Ovaj mutantni alel, nazvan *cul3a-3* dalje je istraživan i utvrđeno je da insercija T-DNA stvara mutaciju u kojoj su zadnje dvije aminokiseline proteina zamijenjene s peptidom od 8 aminokiselina. Mutantna linija *cul3a-3* većinom prepisuje

mutirani gen *AtCUL3a* u obliku skraćenih, nefunkcionalnih transkripata, a rijetko prepisuje i cjeloviti, produženi gen. Zanimljivo je da je promijenjeni, za 8 aminokiselina duži protein AtCUL3a prisutan u manjoj količini te je pojačano rubiliran. Važno je napomenuti da su ciklusi rubilacije/de-rubilacije važni za aktivnost CRL. Nadalje, znanstvenici su proizveli dvostrukog mutanta koristeći linije u kojoj je cul3b-1 utišan (Thomann i sur. 2009). Dvostruki homozigot *cul3a-3 cul3b-1*, nazvan je *cul3 hipomorf* (*cul3^{hyp}*) i upravo njega ću koristiti u ovom radu.

Linija ***dms3-1*** – ova linija sintetizira nefunkcionalni protein DMS3, neophodan za provođenje metilacije DNA posredovanom molekulama RNA. Kao komponenta kompleksa DDR, uključen je u transkripcijsku aktivnost RNA polimeraze V te je neophodan za *de novo* metilaciju DNA. Mutacija ovog gena dovodi do niske razine ili čak nedostatka *de novo* metilacije DNA. Zahvaljujući tome, ova linija poslužit će kao dobra kontrola u kojoj je smanjena metiliranost molekule DNA.

Linija **104** – linija u kojoj je pojačana ekspresija gena *AtBPM1*. Dobivena je transformacijom divljeg tipa *A. thaliana* s konstruktom u kojem je gen *AtBPM1* fuzioniran s genom *GFP*. Ekspresija ovog rekombinantnog gena je pod kontrolom jakog, konstitutivnog promotora 35S, te ova linija proizvodi rekombinantni protein BPM1-GFP.

2.1.2. Enzimi

U ovom radu su korištene restrikcijske endonukleaze koje su osjetljive ili ovisne o metilaciji DNA. Uz pomoć ovih enzima može se provjeriti metiliranost molekule DNA.



Slika 12. Mjesta prepoznavanja i cijepanja enzima MspJI. Preuzeto i prilagođeno iz https://www.neb.com/products/r0661-mspji

MspJI (*NEB*) – endonukleaza ovisna o modifikacijama koja prepoznaje metilirana mjesta ^{m}CNNR i stvara dvolančane lomove molekule DNA na 3' kraju od modificiranog citozina (Slika 12). Modifikacije citozina koje enzim MspJI prepoznaje uključuju C5-metilaciju (5-mC) i C5-hidroksimetilaciju (5-hmC). Endonukleaza MspJI cijepa oba lanca čime stvara

fragmente od tridesetak parova baza. Enzim MspJI ne cijepa nemodificiranu DNA. Za restrikcijsku digestiju s enzimom MspJI korišten je pripadni pufer CutSmart i enzimski aktivator.

HaeIII (*Roche*) – restrikcijska endonukleaza koja prepoznaje i cijepa nemetilirane palindrome GGCC (Slika 13). Ukoliko je restrikcijsko mjesto metilirano, enzim neće cijepati molekulu DNA. Za restrikcijsku digestiju s enzimom HaeIII korišten je pripadni pufer MSuRE/Cut.



Slika 13. Palindrom GGCC koje prepoznaje i cijepa enzim HaeIII. Preuzeto i prilagođeno iz https://www.neb.com/products/r0108-haeiii

AluI (*NEB*) – restrikcijska endonukleaza koja prepoznaje i cijepa nemetilirane palindrome AGCT (Slika 14.). Za restrikcijsku digestiju s enzimom AluI korišten je pripadni pufer NEBuffer 2.



Slika 14. Palindrom AGCT koje prepoznaje i cijepa enzim AluI. Preuzeto i prilagođeno iz https://www.neb.com/products/r0137-alui

EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (*Clontech*)

Ovaj sam premiks koristio u lančanoj reakciji polimerazom (PCR), a sastoji se od optimiziranog pufera, DNA polimeraze, smjese dNTP-ova, komponente koja mu daje gustoću i boje (*Bromophenol Blue/Orange G*) tako da se uzorak nakon provedene reakcije PCR direktno nanosi na agarozni gel. Korištenjem ovog premiksa moguće je umnažanje fragmenata veličine do 10kb.

2.1.3. Hranjivi mediji i puferi

Za uzgoj klijanaca *A. thaliana* koristio sam hranjivi medij MS0 prikazan u tablici 1. Nakon što su se sve komponente dobro otopile, izmjerio sam i podesio pH vrijednost, a zatim kao posljednji dodao agar. Medij sam autoklavirao te ga u sterilnim uvjetima izlio u petrijevke promjera 9 cm te ostavio da se skrutne.

Tablica 1. Sastojci hranjive podloge MS0 korištene za uzgoj klijanaca *A. thaliana*

Hranjiva podloga MS0	**mg/L**
MAKROELEMENTI	
KNO_3	1900
NH_4NO_3	1650
$CaCl_2$ x H_2O	755
KH_2PO_4	170
$MgSO_4$ x 7 H_2O	370
MIKROELEMENTI	
H_3BO_3	6,2
$CoCl_2$ x 6 H_2O	0,025
KI	0,83
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	0,25
$CuSO_4$ x 5 H_2O	0,025
$MnSO_4$ x 4 H_2O	16,9
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	8,6
$FeSO_4$ x 7 H_2O	27,8
Na_2EDTA	37,3
ORGANSKI DODACI	
m-inozitol	100
nikotinska kiselina	0,5
piridoksin-HCl	0,5
tiamin-HCl	0,1
glicin	2
puferirati s MES	0,5
agar	8000
pH	5,7-5,8
saharoza	2%

U pokusima su koršteni sljedeći puferi:

1 x TAE pufer – 40 mmol/L Tris,

– 1mmol/L EDTA titrirana octenom kiselinom do pH = 8,0

DNA sam iz biljnog materijala izolirao metodom CTAB u kojoj se koriste sljedeće kemikalije/puferi:

Pufer EP (za 10 mL)	**Pufer PP (za 20 mL)**	**Pufer RE**
1 mL 1M Tris HCl	1 mL 1M Tris HCl	1,5 M NaCl
2,8 mL 5M NaCl	0,4 mL 0,5 M EDTA	4 μL 10 ng/ml RNaza A
0,4 mL 0,5M EDTA	200 mg CTAB	
200 mg CTAB		
1,4 μL 14,3 M merkaptoetanola		

DNA sam nakon izolacije otapao u vodi mili-Q.

2.1.4. Elektroforeza i detekcija DNA

Elektroforeza

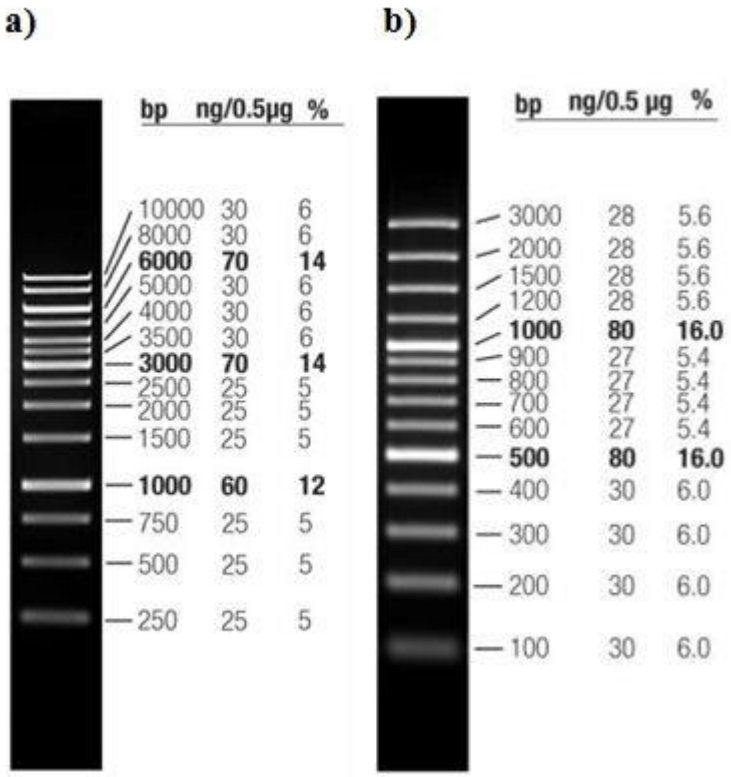
Provjeru izolacije genomske DNA proveo sam na 0,9 % agaroznom gelu kojeg sam pripremio tako da sam 0,9 g agaroze (*Sigma*) otopio u 100 mL pufera TAE. Za analizu digestije DNA koristio sam 1 % agarozni gel (1 g agaroze otopiti u 100 mL pufera TAE), a za uzorke reakcije PCR 2 % (2 g agaroze otopiti u 100 mL pufera TAE). Elektroforeza je provođena u elektroforetskom puferu 1 x TAE pri naponu od 100 V na sobnoj temperaturi u aparaturi za horizontalnu elektroforezu *Sub Cell GT Cell* (*Bio-Rad*).

Detekcija DNA

Vrpce DNA na gelu detektirao sam uz pomoć etidij bromida koji se interkalira u dvolančanu molekulu DNA i fluorescira pod UV zračenjem. Vrpce sam vizualizirao na transiluminatoru, a gel fotografirao aparatom Kodak i analizirao EDAS 290 sustavom za analizu elektroforeze.

2.1.5. DNA markeri

U radu sam koristio markere DNA prikazane na slici 15.



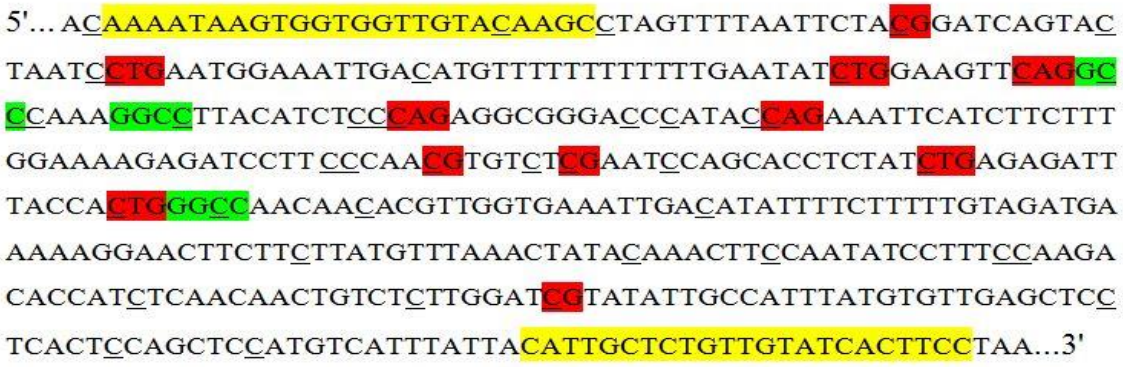
Slika 15. Prikaz korištenih komercijalnih markera i veličine fragmenata molekule DNA na agaroznom gelu a) 1kb DNA marker (*Thermo*) za agaroznu gel-elektroforezu sadrži fragmente veličine 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000 i 10000 parova baza, **b)** 100 pb DNA marker (*Thermo*) za agaroznu gel-elektroforezu sadrži fragmente veličine 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000 i 3000 parova baza. Preuzeto i prilagođenoizhttps://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013007_GeneRuler_1kb_DNALadder_RTU_50ug_UG.pdf i https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013011_GeneRuler_100bp_Plus_DNALadder_RTU_250ug_UG.pdf

2.1.6. Ponavljajuće sekvence i geni

Ponavljajuće sekvence:

AtSN1

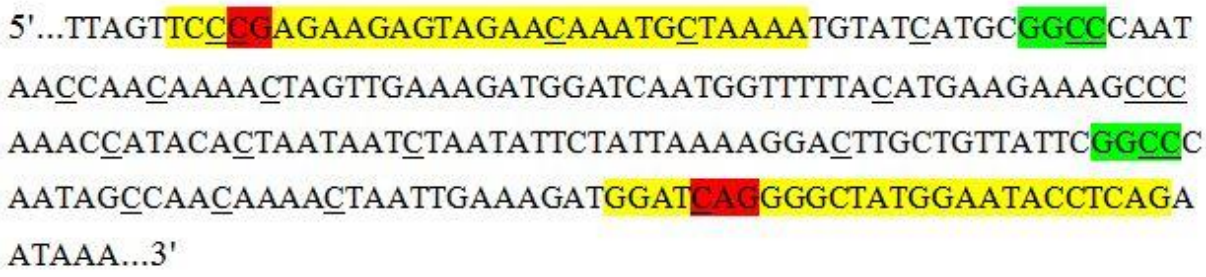
AtSN1 je retrotranspozon SINE (engl. *Short Interspersed Nuclear Element*) lociran između lokusa AT3G44000 i AT3G44005 i odgovara poziciji od 15,794,544 do 15,794,976 nukleotida kromosoma 3. Njegova je transkripcija spriječena snažnom metilacijom sljedova CG, CHG i CHH. Retrotranspozon *AtSN1* podliježe *de novo* metilaciji navođenoj malim interferirajućim molekulama RNA u čijoj sintezi sudjeluju polimeraza IV i V. Unutar samog retrotranspozona nalaze se tri restrikcijska mjesta za endonukleazu HaeIII (Slika 15). U prethodnim istraživanjima (Haag i sur. 2009), provedena je digestija genomske DNA s enzimom HaeIII nakon čega je uslijedio PCR s početnicama kojima se umnaža regija koja obuhvaća ta tri restrikcijska mjesta. Do umnažanja dotične regije doći će samo ako su sva tri mjesta metilirana. U biljkama divljeg tipa, lokus *AtSN1* je metiliran zbog čega je neosjetljiv na cijepanje s enzimom HaeIII. Budući da nema cijepanja, ovaj se lokus može umnožiti reakcijom PCR. Međutim, u mutantima *nrpd* i *nrpe* (mutirane podjedinice polimeraze IV i V), *de novo* metilacija je narušena zbog čega enzim HaeIII može cijepati i ne dolazi do umnažanja ovog lokusa reakcijom PCR. *AtSN1* je zbog toga izvrsna kontrola koju sam koristio ne bih li provjerio mijenja li se metiliranost ovog lokusa kao posljedica promijenjene ekspresije gena *BPM*. Dizajnirao sam početnice kojima sam obuhvatio regiju lokusa *AtSN1* prikazanu na slici 16.



Slika 16. Regija lokusa *AtSN1* koja se umnaža reakcijom PCR. Zeleno obilježeni slijedovi su palindromi koje prepoznaje enzim HaeIII. Podcrtani citozini označavaju one citozine koji se mogu metilirati samo procesom *de novo* metilacije DNA (CHH slijed) a koje bi ujedno enzim MspJI pocijepao (^{m}CNNR). Crveno obilježeni slijedovi predstavljaju slijedove koje MspJI može prepoznati i pocijepati a koji nisu *de novo* već su metilirani drugim procesima (CG i CHG). Mjesta vezanja početnica su obilježena žuto.

IGN5

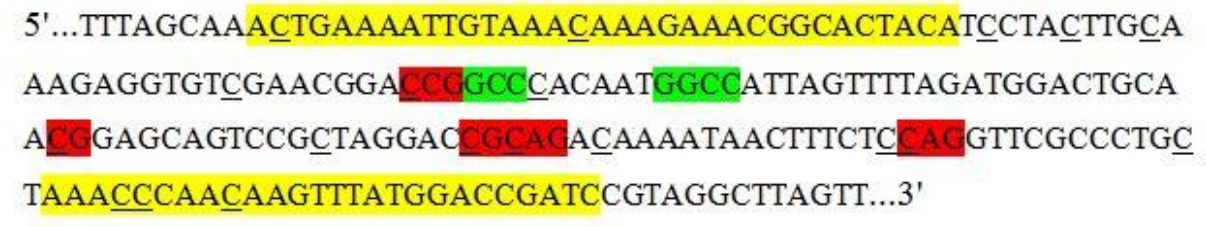
IGN5 (engl. *Intergenic noncoding region 5*, TAIR oznaka: AT4TE10775) je lociran u regijama bogatim transpozonskim elementima koji su utišani hipermetilacijom – karakteristike heterokromatinskih domena. Transkripti IGN5, detektirani u divljem tipu, nedostaju u mutantima *nrpe1* odnosno *nrpd2* što pokazuje da je Pol V potrebna za njihovu sintezu, a time i da su ove regije metilirane *de novo* (Wierzbicki i sur. 2009). U divljem tipu utvrđene su visoke razine metilcitozina u IGN5 dok u linijama u kojima su mutirane određene komponente kompleksa za *de novo* metilaciju DNA, metiliranost DNA je značajno smanjena. Zahvaljujući tome, IGN5 također mogu koristiti ne bih li provjerio mijenja li se metiliranost tog dijela molekule DNA promjenom ekspresije gena *BPM*. Dizajnirao sam početnice kojima sam obuhvatio regiju lokusa *IGN5* prikazanu na slici 17.



Slika 17. Regija lokusa *IGN5* koja se umnaža reakcijom PCR. Zeleno obilježeni slijedovi su palindromi koje prepoznaje enzim HaeIII. Podcrtani citozini označavaju one citozine koji se mogu metilirati samo procesom *de novo* metilacije DNA (CHH slijed) a koje bi ujedno enzim MspJI pocijepao (^{m}CNNR). Crveno obilježeni slijedovi predstavljaju slijedove koje MspJI može prepoznati i pocijepati a koji nisu *de novo* već su metilirani drugim procesima (CG i CHG). Mjesta vezanja početnica su obilježena žuto.

IGN23

Slično kao i s *IGN5*, obrazac metilacije *IGN23* je također uspostavljan *de novo* metilacijom (TAIR oznaka: AT4TE12070). U nekoliko je istraživanja utvrđeno da mutacije određenih komponenti kompleksa za *de novo* metilaciju DNA dovode do smanjene metiliranosti ovih ponavljajućih slijedova (Rowley i sur. 2011). Zbog ovih saznanja, ovi se slijedovi koriste kako bi se eksperimentalno pratila promjena metilacije stoga sam lokus *IGN23* koristio ne bih li provjerio promjenu metilacije i zbog promjene ekspresije gena *BPM*. Dizajnirao sam početnice kojima sam obuhvatio regiju lokusa *IGN23* prikazanu na slici 18.



Slika 18. Regija lokusa *IGN23* koja se umnaža reakcijom PCR. Zeleno obilježeni slijedovi su palindromi koje prepoznaje enzim HaeIII. Podcrtani citozini označavaju one citozine koji se mogu metilirati samo procesom *de novo* metilacije DNA(CHH slijed) a koje bi ujedno enzim MspJI pocijepao (^{m}CNNR). Crveno obilježeni slijedovi predstavljaju slijedove koje MspJI može prepoznati i pocijepati a koji nisu *de novo* već su metilirani drugim procesima (CG i CHG). Mjesta vezanja početnica su obilježena žuto.

Geni

Gen *Flowering locus T*

Više podataka o genu *FT* i njegovoj regulaciji i ulozi navedeno je u poglavlju *1.1.4.1*. Kako bih istražio promjenu metiliranosti gena *FT*, dizajnirao sam početnice na taj način da reakcijom PCR umnožim dio promotora, 5' netranslatirajuću regiju, prvi egzon i dio prvog introna gena *FT*. Na slici 19 prikazana je regija koja se umnaža reakcijom PCR.



Slika 19. Regija gena *FT* koja se umnaža reakcijom PCR. Zeleno obilježeni slijedovi su palindromi koje prepoznaje enzim HaeIII. Podcrtani citozini označavaju one citozine koji se mogu metilirati samo procesom *de novo* metilacije DNA (CHH slijed) a koje bi ujedno enzim MspJI pocijepao (^{m}CNNR). Crveno obilježeni slijedovi predstavljaju slijedove koje MspJI može prepoznati i pocijepati a koji nisu *de novo* već su metilirani drugim procesima (CG i CHG). Mjesta vezanja početnica su obilježena žuto.

Gen *AtHB6*

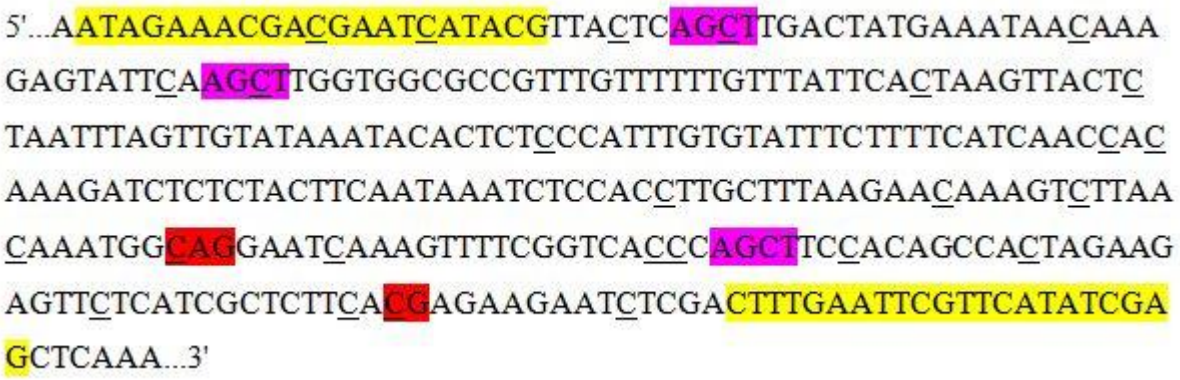
Uloga gena *AtHB6* i njegova regulacija opisana je u poglavlju *1.1.4.2*. Kako bih istražio promjenu metiliranosti gena *AtHB6*, dizajnirao sam početnice kojima se umnaža dio promotora, 5' netranslatirajuću regiju, prvi egzon i dio prvog introna gena *AtHB6*. Na slici 20 prikazana je regija koja se umnaža reakcijom PCR.



Slika 20. Regija gena *AtHB6* koja se umnaža reakcijom PCR. Ljubičasto označen slijed je restrikcijsko mjesto enzima AluI.Podcrtani citozini označavaju one citozine koji se mogu metilirati samo procesom *de novo* metilacije DNA (CHH slijed) a koje bi ujedno enzim MspJI pocijepao (^{m}CNNR). Crveno obilježeni slijedovi predstavljaju slijedove koje MspJI može prepoznati i pocijepati a koji nisu *de novo* već su metilirani drugim procesima (CG i CHG). Mjesta vezanja početnica su obilježena žuto.

Gen *Glutation S-transferaza 11*

Više podataka o genu *GST11* i njegovoj regulaciji i ulozi napisano je u poglavlju *1.1.4.2*. Na slici 20 prikazana je regija koja se umnaža, a ona obuhvaća dio promotora, 5' netranslatirajuću regiju, prvi egzon i dio prvog introna gena *GTS11* (Slika 21).



Slika 21. Regija gena *GST11* koja se umnaža reakcijom PCR. Ljubičasto označen slijed je restrikcijsko mjesto enzima AluI. Podcrtani citozini označavaju one citozine koji se mogu metilirati samo procesom *de novo* metilacije DNA (CHH slijed) a koje bi ujedno enzim MspJI pocijepao (^{m}CNNR). Crveno obilježeni slijedovi predstavljaju slijedove koje MspJI može prepoznati i pocijepati a koji nisu *de novo* već su metilirani drugim procesima (CG i CHG). Mjesta vezanja početnica su obilježena žuto.

Aktin7

Kao kontrolu koristio sam gen *Aktin 7* (TAIR oznaka: AT5G09810). Ovaj lokus nije pod utjecajem *de novo* metilacije DNA (Slika 22).



Slika 22. Regija gena *Aktin7* koja se umnaža reakcijom PCR. U umnažanoj regiji ne postoje paindromi koje prepoznaju enzimi HaeIII i AluI. Podcrtani citozini označavaju one citozine koji se mogu metilirati samo procesom *de novo* metilacije DNA (CHH slijed) a koje bi ujedno enzim MspJI pocijepao (^{m}CNNR). Crveno obilježeni slijedovi predstavljaju slijedove koje MspJI može prepoznati i pocijepati a koji nisu *de novo* već su metilirani drugim procesima (CG i CHG). Mjesta vezanja početnica su obilježena žuto.

2.1.7. Početnice

U tablici 2 navedene su početnice koje sam koristio u svom istraživanju.

Tablica 2. Početnice korištene za umnažanje istraživanih gena/lokusa

Gen/Lokus	Početnice	Sekvenca početnice	Očekivana veličina fragmenta
AtSN1	AtSN1fw	5' AAAATAAGTGGTGGTTGTACAAGC 3'	434 pb
	AtSN1rev	5' GGAAGTGATACAACAGAGCAATG 3'	
IGN5	IGN5fw	5' TCCCGAGAAGAGTAGAACAAATGCTAAAA 3'	210 pb
	IGN5rev	5' CTGAGGTATTCCATAGCCCCTGATCC 3'	
IGN23	IGN23fw	5' ACTGAAAATTGTAAACAAAGAAACGGCACTACA 3'	180 pb
	IGN23rev	5' GATCGGTCCATAAACTTGTTGGGTTT 3'	
FT	FTmfw	5' ATGTGTAGAGGGTTCATGCC 3'	485 pb
	FTmrev	5' AAAACAGAGAAAAGGAAAGCG 3'	
AtHB6	HB6fw	5' CTTCTCTTACACGAGTTCCAG 3'	231 pb
	HB6rev	5' GTTGATGAGCGTTTTCCATATG 3'	
GST11	GST11mfw	5'ATAGAAACGACGAATCATACG 3'	320 pb
	GST11mrev	5' CTCGATATGAACGAATTCAAAG 3'	
Aktin 7	Act7fw	5' TGCTGACCGTATGAGCAAAG 3'	112 pb
	Act7rev	5' AAGGATTGATCCTCCGATCC 3'	

2.2. Metode

Biljke *A. thaliana* korištene za istraživanje uzgajao sam u uvjetima *in vitro*. Pokus sam ponovio dva puta (dvije biološke replike) trudeći se da uvjeti uzgoja i eksperimentalne procedure (izolacija DNA, digestija, PCR) budu identični u obje replike.

2.2.1. Sterilizacija sjemenki i uzgoj klijanaca

Kako bi se izbjegle bilo kakve kontaminacije uzrokovane raznim bakterijama ili gljivicama, potrebno je sterilizirati sjemenke prije nasađivanja na ploče s hranjivom podlogom. Ovo je vrlo važan korak budući da kontaminacije mogu stvoriti uvjete (stres, patogeni,...) u kojima se obrazac metilacije može promijeniti i dati iskrivljene rezultate. Kako bih sjemenke sterilizirao, koristio sam sterilizacijsku otopinu – otopinu Izosana G (*PLIVA sept*) koja se prema dosadašnjem iskustvu u laboratoriju pokazala kao najučinkovitije sredstvo za sterilizaciju sjemenki uročnjaka.

Sjemenke šest linija odvojio sam u šest zasebnih epruveta od 1,5 mL u koje sam dodao po 1 mL 70 % etanola. Nakon što su sjemenke inkubirane 1 minutu u etanolu, pažljivo sam otpipetirao etanol, pazeći da ne otpipetiram i sjemenke, te dodao po 1 mL sterilizacijske otopine (u 1 mL destilirane vode otopi se 10 mg Izosana G (1 % otopina) te doda 1 µLantimikotika mukazola (0,1 % otopina). Sjemenke se 10 minuta vrte/miješaju u sterilizacijskoj otopini, pri čemu se uništavaju potencijalni zagađivači, budući da je Izosan G bakteriocid i fungicid. Nakon 10 minuta inkubacije u sterilizacijskoj otopini, sjemenke sam pet puta ispirao sterilnom vodom u sterilnim uvjetima laminara. Nakon zadnjeg ispiranja, sjemenke sam ostavio u približno 200 µL sterilne vode te pohranio na +4°C, 48 sati. Nakon 48 sati vernalizacije na +4 °C, sjemenke sam uz pomoć mikropipete i sterilne vode pažljivo nasadio na prethodno označene petrijevke (tri petrijevke za svaku liniju). Petrijevke sa sjemenkama sam zatvorio parafilmom te ostavio u uvjetima dugog dana, okomito postavljene kako bi korijenje raslo po površini podloge.

2.2.2. Izolacija DNA

Nakon sedam dana, kad su klijanci dovoljno narasli, pažljivo sam ih izvadio iz krutog medija, pazeći da ih izvadim zajedno s korijenom i bez oštećenja, višak vode upio pomoću staničevine, a zatim izvagao masu. DNA sam izolirao iz 6-500 mg tkiva.

Izolaciju DNA izvršio sam po metodi CTAB (cetiltrimetilamonij bromid) (Kocik i sur. 1996). CTAB je kationski detergent koji se koristi za izolaciju DNA iz biljnog materijala. Ovaj detergent istovremeno otapa staničnu membranu i membrane organela te denaturira proteine, kao što mijenja konformaciju DNA u kompaktno klupko čime se pospješuje njezino precipitiranje. Također, ovom metodom, zahvaljujući prisutnosti beta-merkaptoetanola, odstranjuju se polifenoli i ostali sekundarni metaboliti koji mogu inhibirati reakciju PCR i onemogućiti daljnju manipulaciju izolirane DNA. Puferi koji se koriste u ovoj metodi izolacije DNA navedeni su u poglavlju 2.1.3.

Klijance pojedinih linija pažljivo sam prebacio u tarionik te dodao 0,5 mL toplog pufera EP. Važno je da pufer EP bude što topliji kako bi već u ovom koraku denaturiao većinu enzima, uključujući DNaze koje bi mogle pocijepati genomsku DNA. Klijance sam dobro samljeo pomoću tučka nakon čega sam homogenat izlio u unaprijed označene epruvete od 1,5 mL. Ostatak sam iz tarionika isprao s još 0,5 mL pufera EP (sveukupno 1 mL pufera EP) te dodao ostatku u epruvetama. Epruvete sam stavio u vodenu kupelj prethodno zagrijanu na 65 °C te inkubirao 30 minuta. Tokom tih 30 minuta, nekoliko sam puta dobro pomiješao sadržaj izvrtanjem epruveta. Nakon inkubacije, u ohlađenu smjesu dodao sam isti volumen kloroform-izoamila (24:1) te 10 minuta lagano miješao, a zatim centrifugirao 10 minuta na 14000 g. Nakon centrifugiranja uočio sam dvije faze – gornju vodenu fazu koja je od donje organske odvojena tankim bijelim slojem. DNA se nalazi u gornjoj vodenoj fazi stoga sam tu fazu pažljivo otpipetirao, pazeći da ne probijem međusloj, te na nju ponovno dodao isti volumen kloroform-izoamila (24:1). Nakon 10 minuta laganog miješanja, ponovio sam centrifugiranje na 14000 g 10 minuta. Ponovno sam odvojio gornju vodenu fazu i na nju dodao dva volumena pufera PP i inkubirao 60 minuta na sobnoj temperaturi. U ovom se koraku može uočiti bjelkasti talog koji pluta u otopini (precipitirana DNA). Nakon sat vremena, ponovio sam centrifugiranje na 14000 g u trajanju od 10 minuta. Na dnu epruvete može se uočiti bijeli talog. Supernatant sam odlio i na talog dodao 600 µL pufera RB te inkubirao 30 minuta na 55 °C. Nakon inkubacije, dodao sam 1200 µL hladnog 96 % etanola i ostavio da precipitira 1 sat na sobnoj temperaturi. Centrifugirao sam 10 minuta na 14000 g nakon čega sam talog isprao s hladnim 70 % etanolom. Ponovno sam centrifugirao 5 minuta na 7000 g, a zatim odlio supernatant i osušio talog te ga otopio u 50 µL mqH_2O. Epruvete s izoliranom DNA ostavio sam preko noći na +4 °C kako bi se DNA što bolje otopila u vodi.

2.2.3. Mjerenje koncentracije i čistoće izolirane DNA

Koncentraciju čistoću izolirane DNA odredio sam mjerenjem apsorbancije pomoću spektrofotometra *NanoVue Plus*. Prije nanošenja 2 µL uzorka DNA čiju koncentraciju mjerim, uređaj sam nulirao s istim volumenom mqH_2O, odnosno medija u kojem je DNA otopljena. Uz koncentraciju, na uređaju se može očitati i omjer A_{260}/A_{280} koji je dobar indikator čistoće izolirane DNA, a za čistu DNA najčešće je u rasponu od 1,7-1,9.

2.2.4. Razgradnja biljne DNA restrikcijskim endonukleazama

Potpuna digestija genomske DNA podrazumijeva da će restrikcijska endonukleaza pocijepati svako mjesto prepoznavanja, a to zahtijeva visoku čistoću DNA. Za restrikcijsku digestiju koristio sam 1 µg genomske DNA za svaku liniju, a ukupni volumen reakcije bio je 50 µL. Pojedine sastavnice reakcijskih smjesi i njihovi volumeni prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Reakcijske smjese i volumeni komponenti za reakciju digestije

Enzim	Reakcija digestije
HaeIII	1 µL enzima HaeIII 5 µL pufera M 1 µg DNA mqH_2O do 50 µL
AluI	1 µL enzima AluI 5 µL pufera NEBuffer2 1 µg DNA mqH_2O do 50 µL
MspJI	2 µL enzima MspJI 5 µL pufera CutSmart 1 µL Enzim aktivator 1 µg DNA mqH_2O do 50 µL

Kako bi genomska DNA u reakcijskim smjesama bila u potpunosti pocijepana, digestiju sam provodio preko noći (18 h) na 37 °C, a nakon toga sam u reakcijsku smjesu nadodao po 1 µL enzima HaeIII ili AluI odnosno 2 µL enzima MspJI te smjesu dodatno inkubirao još 3 sata. Enzime sam inaktivirao 20 minuta na temperaturi od 65 °C.

Uspješnost digestije provjerio sam elektroforezom na 1 % agaroznom gelu. Nanosio sam po 300 ng uzoraka intaktne i pocijepane genomske DNA.

2.2.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Nakon provedene restrikcijske digestije, uzorci pocijepane i intaktne genomske DNA podvrgnuti su umnažanju sa specifičnim početnicama navedenim u tablici 2. U reakciju PCR dodavao sam po 12 ng genomske odnosno pocijepane DNA. Sve su reakcije izvođene u uređaju *GeneAmp PCR System 2700* (*Applied Biosystems*) prema programu iz tablice 5. Pojedine sastavnice reakcijskih smjesa prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Volumeni pojedinih sastavnica reakcijske smjese za reakciju PCR

PCR reakcije:	**Volumen**
EmeraldAmp GT PCR Master Mix	12,5μL
Forward početnica	0,5 μL
Reverse početnica	0,5 μL
H_2O	do 25μL
Volumen genomske/pocijepane DNA	12 ng po reakciji

Tablica 5. Program reakcije PCR korišten za umnažanje istraživanih regija molekule DNA

Vrijeme	**Temperatura/ °C**	**Broj ciklusa**
1 min	98	1
10 sek	98	35
30 sek	58	
1 min	72	
7 min	72	1

U koraku elongacije 28. ciklusa uzimao sam po 10 μL svakog PCR uzorka i prebacio u nove PCR epruvete te ostavio da se program PCR izvrši do kraja. Na ovaj sam način izbjegao potencijalni plato kojeg bi reakcije PCR mogle doseći zbog čega se ne bi vidjela razlika u intenzitetu različitih vrpci nakon elektroforeze.

2.2.6. Denzitometrija

Intenzitete vrpci na gelovima mjerio sam uz pomoć programa ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/download.html, pristupio 1. kolovoza 2016. godine). ImageJ je program koji mjeri intenzitete pojedinih vrpci na agaroznom gelu nakon elektroforeze i detekcije etidij-bromidom. Usporedbom dobivenih vrijednosti intenziteta vrpci između različitih linija, donio sam zaključke o promjeni metiliranosti molekule DNA kao posljedici promijenjene ekspresije gena u istraživanim linijama.

3. Rezultati

3.1. Izolacija DNA

Biljnu DNA izolirao sam po metodi CTAB kao što je opisano u poglavlju 2.2.2.

Koncentracija i čistoća izolirane DNA prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Masene koncentracije i omjeri apsorbancije DNA izolirane iz različitih linija

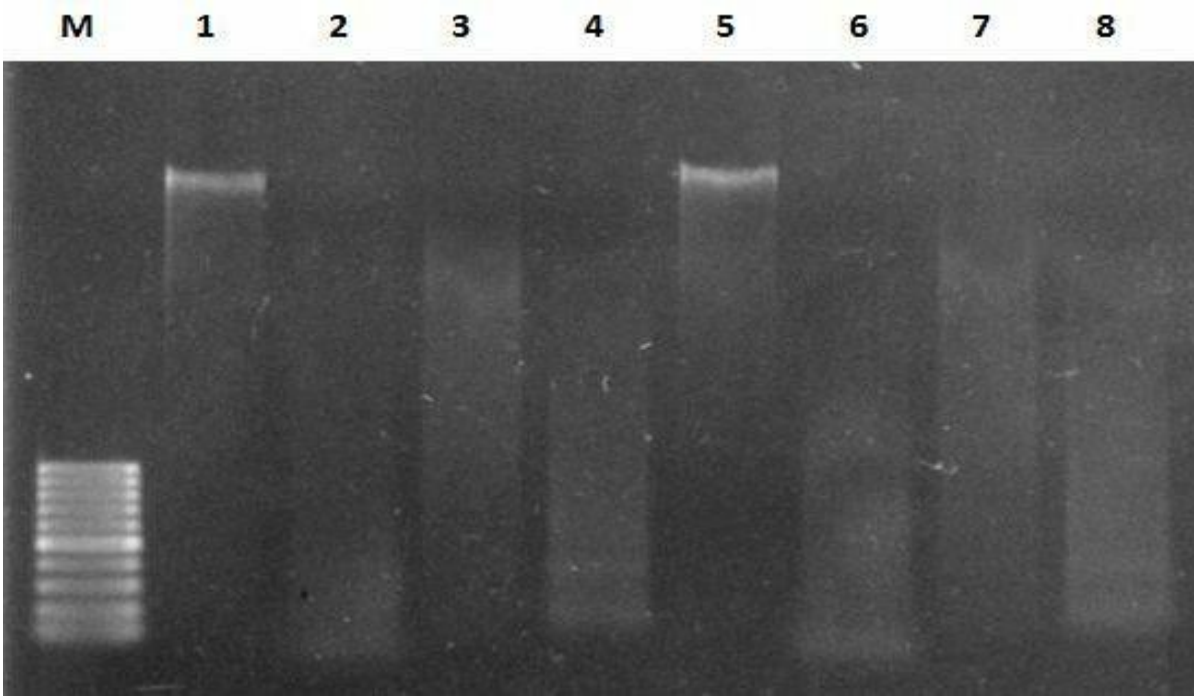
Biljna linija	**Masena koncentracija (ng/µL)**	**A_{260}/A_{280}**
amiR-bpm	595,0	1,93
cul3^{hyp}	215,0	1,56
104	1945,0/452,0*	1,95
HB6	130,0	1,91
Wt	430,0	1,92
dms3-1	11,0	1,41

* Početna koncentracija izolirane DNA uzorka 104 razrijeđena je na 452,0 ng/µL, omjer A_{260}/A_{280} prikazan je za razrijeđen uzorak.

Omjer A_{260}/A_{280} je dobar indikator čistoće izolirane DNA, a za čistu DNA najčešće je u rasponu od 1,7-1,9. Iz dobivenih vrijednosti mogu zaključiti da je izolirana DNA dovoljno dobra i da je mogu koristiti za sljedeći dio eksperimenta, a to je digestija restrikcijskim endonukleazama.

3.2. Razgradnja biljne DNA restrikcijskim endonukleazama

Uspješnost digestije provjerio sam elektroforezom na 1,5 % agaroznom gelu. Nanosio sam po 300 ng uzoraka intaktne i pocijepane genomske DNA, a rezultati digestije prikazani su na slici 23.



Slika 23. Primjer uspješne digestije restrikcijskim endonukleazama provjerene na 1 % agaroznom gelu. M –marker 100 pb,1 – Genomska DNA linije HB6, 2-4 – DNA uzorka HB6 pocijepana s MspJI (2), HaeIII (3), AluI (4), 5 – genomska DNA uzorka WT, 6-8 –DNA uzorka WT pocijepana s MspJI (6), HaeIII (7), AluI (8)

Provjerom digestije elektroforezom, zaključio sam da su sve digestije uspješno provedene budući da je vrpca genomske DNA u potpunosti nestala, a pocijepana DNA se može lijepo vidjeti na agaroznom gelu

3.3. Analiza metiliranosti molekule DNA upotrebom restrikcijske digestije i lančane reakcije polimerazom - PCR

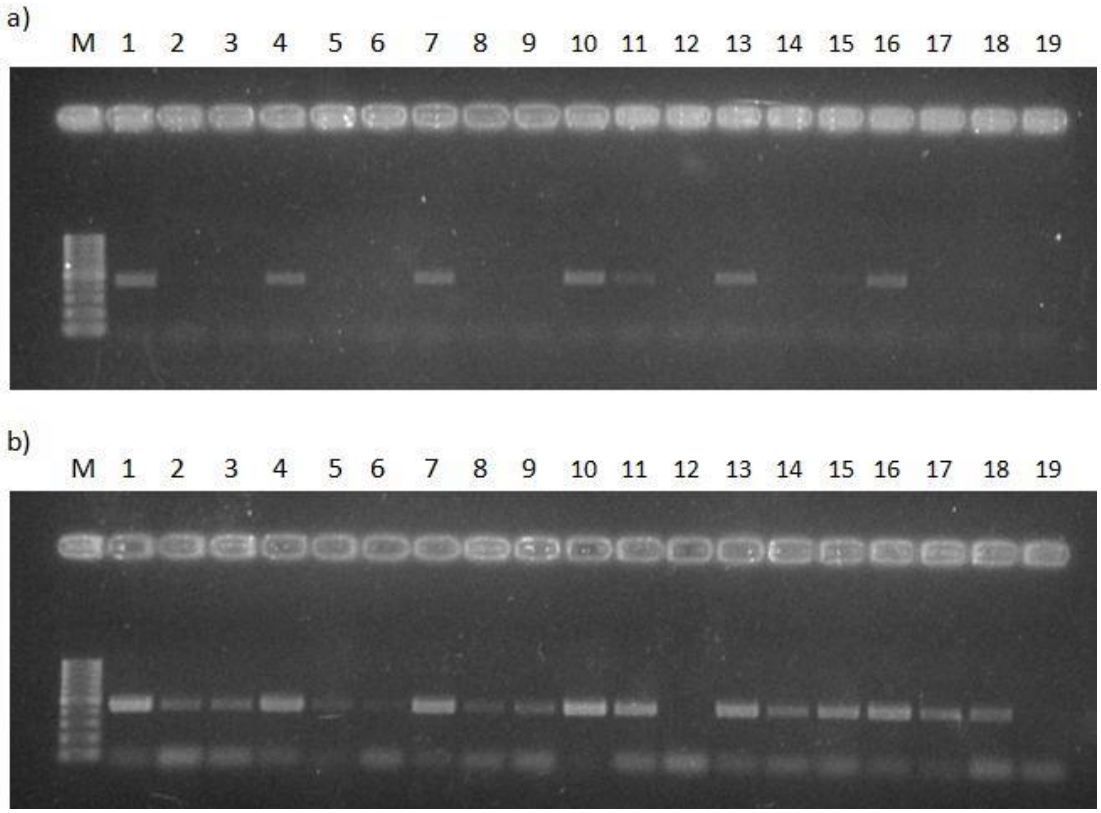
U ovom radu, koristeći restrikcijske endonukleaze osjetljive ili ovisne o metilaciji DNA, nastojao sam utvrditi postoji li razlika u metilaciji DNA između različitih mutanti uročnjaka. Kako bih utvrdio utječu li proteini BPM na metilaciju DNA, analizirao sam stupanj metilacije različitih ponavljajućih lokusa (*AtSN1*, *IGN5* i *IGN23*) i promotorskih regija gena (*GST11, AtHB*6i *FT*) s kojima bi proteini BPM mogli biti u interakciji. Metilacijski osjetljive restrikcijske endonukleaze HaeIII i AluI cijepaju DNA ukoliko palindromi koje oni prepoznaju nisu metilirani nakon čega ne dolazi do njihovog umnažanja reakcijom PCR zbog čega izostaje vrpca na gelu nakon agarozne elektroforeze. U drugu ruku, metilacijski ovisna

endonukleaza MspJI prepoznaje metilirane i hidroskimetilirane citozine i cijepa u njihovoj blizini, stoga smanjenje ili izostajanje PCR produkta upućuje na pojačanu metilaciju ili hidroksimetilaciju. Nakon enzimatske digestije i umnažanja reakcijom PCR, denzitometrijski sam izmjerio intenzitete vrpci nakon elektroforeze na agaroznom gelu i na temelju razlika u intenzitetima izvodio zaključke o učinku promijenjene ekspresije gena *BPM* na *de novo* metilaciju.

3.3.1. Metilacija DNA ponavljajućih sekvenci

3.3.1.1. Lokus *AtSN1*

Kako bih utvrdio metiliranost DNA ponavljajućih sekvenci, nakon restrikcijske digestije DNA umnažao sam retroelement *AtSN1*. Veličina umnožene regije lokusa *AtSN1* je 434 nukleotida i obuhvaća 3 HaeIII restrikcijska palindroma te 42 mjesta prepoznavanja restrikcijskog enzima MspJI koje enzim može pocijepati ukoliko su unutar mjesta prepoznavanja hidroksimetilirani ili metilirani citozini. U lokusu *AtSN1* postoje četiri slijeda CG i CHG koji se mogu metilirati i mehanizmima drugačijim od *de novo* metilacije (Slika 16). Metiliranost DNA analizirao sam za svaku pojedinu liniju tako što sam za umnažanje koristio jednake količine nepocijepane genomske DNA, genomske DNA pocijepane s enzimom HaeIII i uzorak genomske DNA pocijepane s MspJI. Kako bih utvrdio metiliranosti DNA pojedinih linija te eventualne promjene s obzirom na biljke divljeg tipa, intenzitete vrpci na agaroznom gelu nakon elektroforeze (Slika 24) dobivene za svaku analiziranu liniju sam normalizirao prema intenzitetu vrpce za nepocijepanu genomsku DNA. Rezultati analize metiliranosti DNA (replika 2) prikazani su na slici 25, a u prilogu ovog rada nalaze se rezultati analize obje replike (Prilog 1).



Slika 24. Primjer analize produkata reakcije PCR u kojoj se umnažao lokus *AtSN1* na 2 % agaroznom gelu.a) produkti reakcije PCR nakon 28.ciklusa i **b)** nakon 35. ciklusa.

M – marker veličine 100 pb; 1-3 – Divlji tip, 1- Genomska DNA, 2 - gDNA pocijepana s MspJI, 3 – gDNA pocijepana s HaeIII; 4-6 – amiR-bpm, 4 - Genomska DNA, 5 - gDNA pocijepana s MspJI, 6 – gDNA pocijepana s HaeIII; 7-9 – 104, - 7 Genomska DNA, 8 - gDNA pocijepana s MspJI, 9 – gDNA pocijepana s HaeIII; 10-12 – *dms3-1,* 10 - Genomska DNA, 11 - gDNA pocijepana s MspJI, 12 – gDNA pocijepana s HaeIII; 13-15 –*cul3^{hyp}*, 13 - Genomska DNA, 14 - gDNA pocijepana s MspJI, 15 – gDNA pocijepana s HaeIII; 19 – reakcija PCR bez DNA.

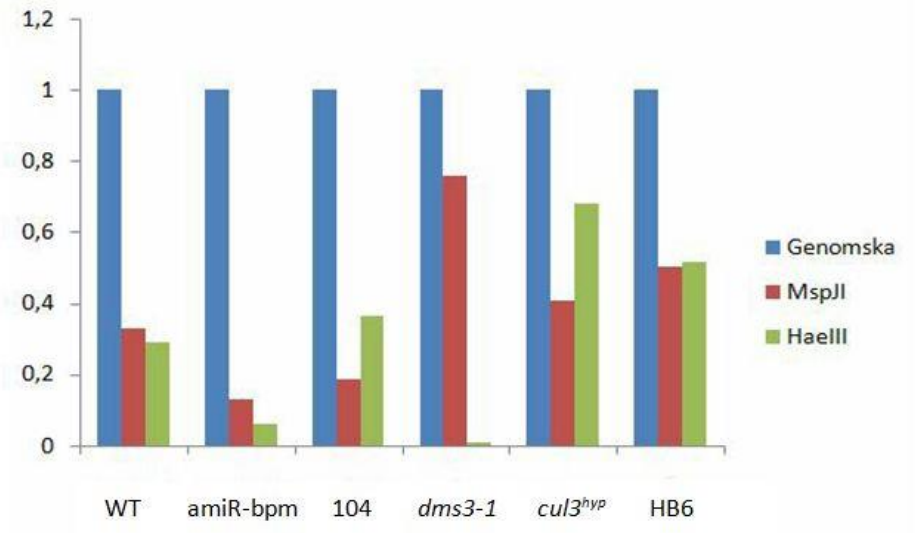
Linija *dms3-1* jasno pokazuje veliku promjenu u metiliranosti DNA u usporedbi s onom u biljkama divljeg tipa. Palindromi restrikcijskog enzima HaeIII uopće nisu metilirani te nakon restrikcijske digestije s enzimom HaeIII u ovoj liniji nije došlo do umnažanja retroelementa *AtSN1*. Poremećaj u metiliranosti DNA jasno je vidljiv i nakon digestije s enzimom MspJI budući da se nakon digestije s MspJI lokus umnažao u puno većoj mjeri (replika 2) nego pocijepana DNA u divljem tipu.

U obje replike pokusa vrlo je uočljiva manja metiliranost palindroma HaeIII lokusa *AtSN1* u liniji amiR-bpm za razliku od biljaka divljeg tipa što ukazuje na poremećaj u *de novo* metilaciji ove linije. S druge strane, umnažanje lokusa *AtSN1* nakon restrikcije s MspJI bilo je isto (replika 1, prilog 1) ili manje (replika 2) što ukazuje na moguću pojačanu metiliranost ovog lokusa.

Kod linije 104 uočene su promjene u metilaciji lokusa *AtSN1* s obzirom na divlji tip iako one nisu bile jednoznačne u obje replike. Analiza metiliranosti DNA linije 104 pokazuje da je općenito pojačana metilacija lokusa *AtSN1*, no moguća je i smanjena *de novo* metilacija (replika 1, prilog 1).

Kod linije HB6 uočena je jača *de novo* metilacija lokusa *AtSN1*.

De novo metilacija palindroma HaeIII linije *cul3*^{hyp} je značajno pojačana, dok je ukupna metiliranost citozina lokusa *AtSN1* ove linije bila nešto manja nego kod divljeg tipa. Zbog nedovoljne količine izolirane genomske DNA, liniju *cul3*^{hyp} analizirao sam samo u drugom eksperimentu (replika 2).



Slika 25. Metiliranost DNA lokusa *AtSN1* analizirana umnažanjem na kalupu nepocijepane genomske DNA (genomska), genomske DNA pocijepane s enzimom MspJI (MspJI) i genomske DNA pocijepane s enzimom HaeIII (HaeIII). Nakon lančane reakcije polimerazom vrpce su razdvojene elektroforezom u 2% agaroznom gelu i obojane etidij bromidom Denzitometrijom je utvrđen intenzitet pojedine vrpce, a rezultati su normalizirani prema intenzitetu vrpce dobivene na kalupu nepocijepane genomske DNA. Analizirani su 7 dana stari klijanci divljeg tipa (wt), linije u kojoj je tehnologijom RNAi poremećena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm), linije u kojoj je pojačana ekspresija gena *BPM1* (104), linije s nefunkcionalnim genom *DMS3* (*dms3-1*), linije s nefunkcionalnim proteinima CULLIN3 (*cul3*^{hyp}) i linije s pojačanom ekspresijom gena *HB6* (HB6). Prikazani su rezultati dobiveni u drugom eksperimentu.

3.3.1.2. Lokus *IGN23*

Uz lokus *AtSN1,* analizirao sam i metiliranost lokusa *IGN23.* Umnažanjem ovog lokusa nastao je fragment veličine 180 nukleotida koji obuhvaća 21 mjesto koje enzim MspJI može pocijepati ukoliko su unutar mjesta prepoznavanja hidroksimetilirani ili metilirani citozini, a u ova mjesta spadaju tri slijeda CG koja se mogu metilirati i mehanizmima drugačijim od *de novo* metilacije (Slika 18). Ovaj lokus također sadrži dva palindroma koje će pocijepati enzim HaeIII ukoliko ti sljedovi ne sadrže metilirane citozine. Nakon restrikcijske digestije i umnažanja lokusa *IGN23*, dobiveni rezultati prikazani su na slici 26 (replika 2), a u prilogu se nalaze rezultati analize obje replike (Prilog 3).

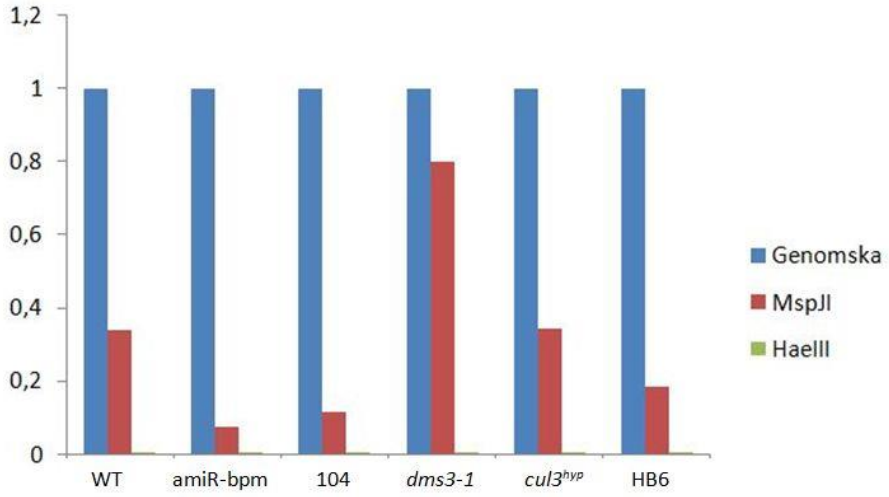
Isto kao i kod lokusa *AtSN1,* linija *dms3-1* pokazuje značajno odstupanje u metiliranosti DNA u usporedbi s divljim tipom. Nakon digestije restrikcijskim enzimom HaeIII ne dolazi do umnažanja ove regije lokusa *IGN23* budući da ovi palindromi nisu metilirani. Također, nakon digestije enzimom MspJI i reakcije PCR, ovaj se lokus umnažao u puno većoj mjeri nego DNA linije divljeg tipa pocijepana enzimom MspJI što ponovno ide u prilog činjenici da je u ovoj liniji *de novo* metilacija DNA narušena (replika 2).

U liniji amiR-bpm je smanjena metilacija na mjestima prepoznavanja i cijepanja enzima HaeIII te je intenzitet vrpce nakon restrikcije enzimom HaeIII i umnažanja reakcijom PCR značajno manji nego kod divljeg tipa (replika 1, prilog 3). Rezultati digestije i umnažanja fragmenta nakon restrikcije enzimom MspJI u obje replike ukazuju na moguću pojačanu metiliranost lokusa *IGN23*.

U liniji 104 uočava se značajno jača metiliranost lokusa *IGN23* u usporedbi s divljim tipom, ali u obje replike nema promjene u metiliranosti palindroma koje prepoznaje enzim HaeIII.

U liniji *cul3*^{hyp} nema značajne promjene u metiliranosti lokusa *IGN23* u odnosu na divlji tip ni u slučaju digestije enzimom MspJI ni enzimom HaeIII. Zbog nedovoljne količine izolirane genomske DNA, liniju *cul3*^{hyp} analizirao sam samo u drugom eksperimentu (replika 2).

U liniji HB6 uočena je jača metiliranost ovog lokusa u obje replike.



Slika 26. Metiliranost DNA lokusa *IGN23* analizirana umnažanjem na kalupu nepocijepane genomske DNA (genomska), genomske DNA pocijepane s enzimom MspJI (MspJI) i genomske DNA pocijepane s enzimom HaeIII (HaeIII). Nakon lančane reakcije polimerazom vrpce su razdvojene elektroforezom u 2% agaroznom gelu i obojane etidij bromidom. Denzitometrijom je utvrđen intenzitet pojedine vrpce, a rezultati su normalizirani prema intenzitetu vrpce dobivene na kalupu nepocijepane genomske DNA. Analizirani su 7 dana stari klijanci divljeg tipa (wt), linije u kojoj je tehnologijom RNAi poremećena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm), linije u kojoj je pojačana ekspresija gena *BPM1* (104), linije s nefunkcionalnim genom *DMS3* (*dms3-1*), linije s nefunkcionalnim proteinima CULLIN3 (*cul3^{hyp}*) i linije s pojačanom ekspresijom gena *HB6* (HB6). Prikazani su rezultati dobiveni u drugom eksperimentu nakon 28. ciklusa reakcije PCR.

3.3.1.3. Lokus *IGN5*

Fragment veličine 210 nukleotida nastao umnažanjem lokusa *IGN5* obuhvaća 23 mjesta koje enzim MspJI može pocijepati ukoliko su unutar mjesta prepoznavanja hidroksimetilirani ili metilirani citozini, a u ova mjesta spada jedan slijed CG i jedan slijed CHG koji se mogu metilirati i mehanizmima drugačijim od *de novo* metilacije. Lokus *IGN5* također sadrži dva palindroma koje će pocijepati enzim HaeIII ukoliko ti sljedovi ne sadrže metilirane citozine (Slika 17). Metiliranost ovog lokusa analizirao sam na isti način kao i *AtSN1* i *IGN23*. Rezultati analize metiliranosti DNA (replika 2) prikazani su na slici 27, a u prilogu ovog rada nalaze se rezultati analize obje replike (Prilog 2).

Linija *dms3-1* u obje replike ne pokazuje značajnu promjenu u metilaciji s obzirom na divlji tip nakon restrikcijske digestije enzimom MspJI i reakcije PCR. Nakon digestije enzimom HaeIII i reakcije PCR, nije došlo do umnažanja lokusa *IGN5* (replika 2) što, u skladu s očekivanim, ukazuje da palindromi koje ovaj enzim prepoznaje nisu metilirani.

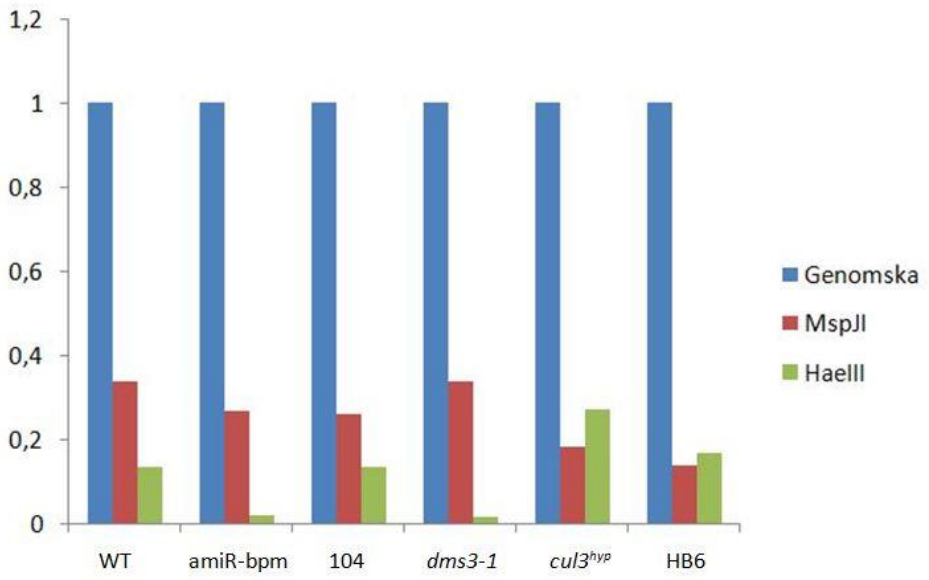
U liniji amiR-bpm, rezultati digestije s MspJI upućuju na povećanu metilaciju ovog lokusa u obje replike. S druge strane, umnažanje ovog lokusa nakon restrikcije enzimom

HaeIII bilo je slično (replika 1, prilog 2) ili značajno manje (replika 2) u odnosu na divlji tip što upućuje na vrlo nisku stopu *de novo* metilacije palindroma HaeIII.

Analiza metiliranosti linije 104 nakon digestije enzimom MspJI pokazuje da je opća metiliranost ovog lokusa malo pojačana u odnosu na divlji tip. U drugu ruku, nakon digestije enzimom HaeIII, ovaj se lokus umnažao gotovo jednako kao i kod divljeg tipa (replika 2).

Analiza metiliranosti nakon digestije enzimom MspJI pokazuje da je u obje replike sveukupna metiliranost lokusa *IGN5* u liniji HB6 pojačana u odnosu na divlji tip. S druge strane, ovaj se lokus nakon digestije enzimom HaeIII umnažao u približno jednakoj mjeri kao i kod divljeg tipa što upućuje na to da se *de novo* metiliranost DNA nije mijenjala.

Analiza metiliranosti u liniji *cul3^{hyp}* ukazuje na pojačanu metilaciju i *de novo* metilaciju lokusa *IGN5*.

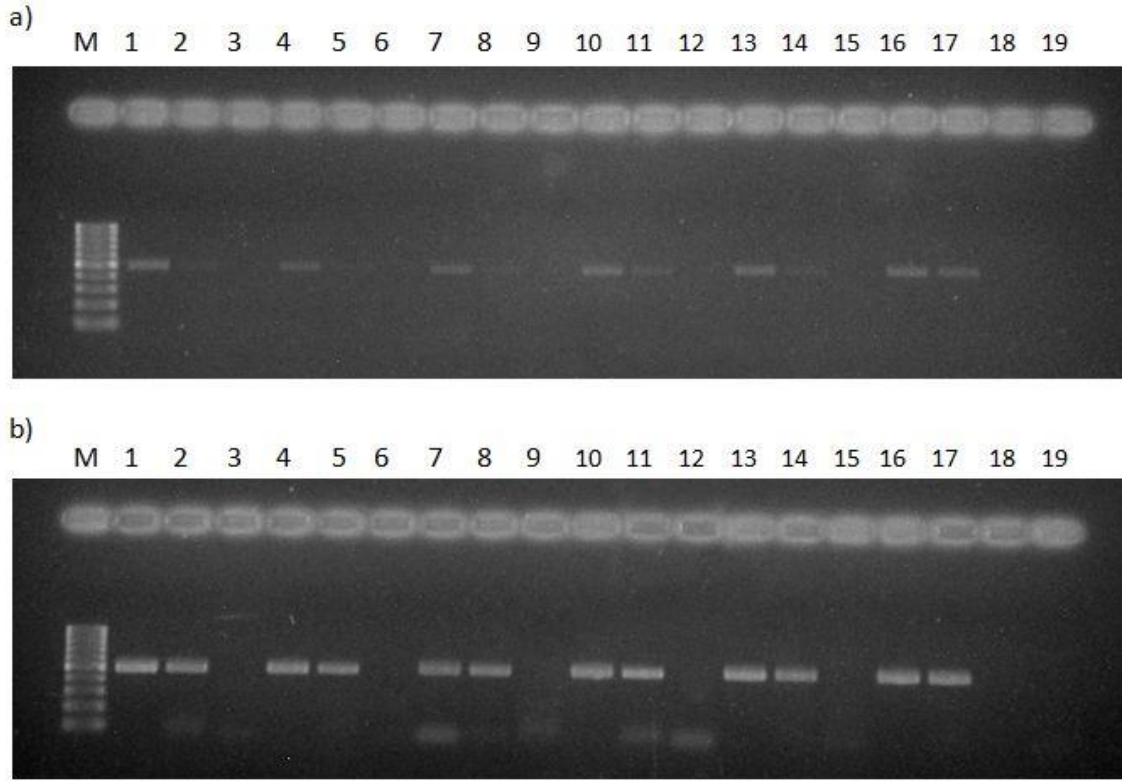


Slika 27. Metiliranost DNA lokusa *IGN5* analizirana umnažanjem na kalupu nepocijepane genomske DNA (genomska), genomske DNA pocijepane s enzimom MspJI (MspJI) i genomske DNA pocijepane s enzimom HaeIII (HaeIII). Nakon lančane reakcije polimerazom vrpce su razdvojene elektroforezom u 2 % agaroznom gelu i obojane etidij bromidom. Denzitometrijom je utvrđen intenzitet pojedine vrpce, a rezultati su normalizirani prema intenzitetu vrpce dobivene na kalupu nepocijepane genomske DNA. Analizirani su 7 dana stari klijanci divljeg tipa (wt), linije u kojoj je tehnologijom RNAi poremećena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm), linije u kojoj je pojačana ekspresija gena *BPM1* (104), linije s nefunkcionalnim genom *DMS3* (*dms3-1*), linije s nefunkcionalnim proteinima CULLIN3(*cul3^{hyp}*) i linije s pojačanom ekspresijom gena *HB6* (HB6). Prikazani su rezultati dobiveni u drugom eksperimentu.

3.3.2. Metilacija DNA izabranih gena

3.3.2.1. Gen *Flowering locus T*

Kako bih utvrdio metiliranost gena *FT*, nakon restrikcijske digestije DNA umnažao sam dio DNA koja obuhvaća dio promotora, 5' netranslatirajuću regiju, prvi egzon i dio prvog introna gena *FT*. Veličina dobivenog fragmenta je 485 nukleotida i obuhvaća 41 mjesto koje enzim MspJI može pocijepati, a ova mjesta uključuju 8 slijedova CHG koji se mogu metilirati i mehanizmima drugačijim od *de novo* metilacije. Fragment ne sadrži slijedove CG. Umnažana regija također sadrži dva palindroma koje će pocijepati enzim HaeIII ukoliko ti slijedovi ne sadrže metilirane citozine (Slika 19). Metiliranost DNA analizirao sam za svaku pojedinu liniju tako što sam za umnažanje koristio jednake količine nepocijepane genomske DNA, genomske DNA pocijepane s enzimom HaeIII i uzorak genomske DNA pocijepane s MspJI. Kako bih utvrdio metiliranosti DNA pojedinih linija te eventualne promjene s obzirom na biljke divljeg tipa, intenzitete vrpci na agaroznom gelu nakon elektroforeze (Slika 28) dobivene za svaku analiziranu liniju sam normalizirao prema intenzitetu vrpce za nepocijepanu genomsku DNA. Rezultati analize metiliranosti DNA (replika 2) prikazani su na slici 29, a u prilogu ovog rada nalaze se rezultati analize obje replike (Prilog 4).



Slika 28. Primjer analize produkata reakcije PCR u kojoj se umnažao gen *FT* na 2 % agaroznom gelu. a) produkti reakcije PCR nakon 28.ciklusa i **b)** nakon 35. ciklusa.

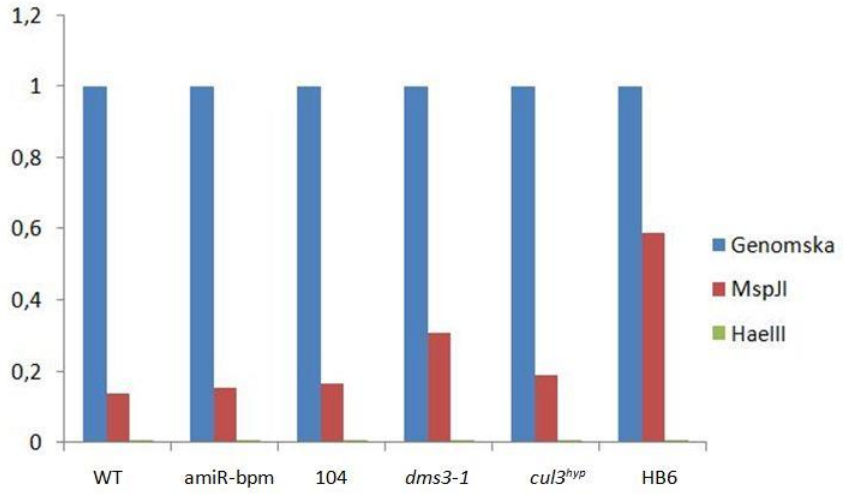
M – marker veličine 100 pb; 1-3 – Divlji tip, 1- Genomska DNA, 2 - gDNA pocijepana s MspJI, 3 – gDNA pocijepana s HaeIII; 4-6 – AmiR-bpm, 4 - Genomska DNA, 5 - gDNA pocijepana s MspJI, 6 – gDNA pocijepana s HaeIII; 7-9 – 104, - 7 Genomska DNA, 8 - gDNA pocijepana s MspJI, 9 – gDNA pocijepana s HaeIII; 10-12 – *dms3-1,* 10 - Genomska DNA, 11 - gDNA pocijepana s MspJI, 12 – gDNA pocijepana s HaeIII; 13-15 –*cul3^{hyp}*, 13 - Genomska DNA, 14 - gDNA pocijepana s MspJI, 15 – gDNA pocijepana s HaeIII; 19 – reakcija PCR bez DNA.

U svim linijama umnažanje *FT* izostaje ukoliko je kalup genomska DNA pocijepana enzimom HaeIII. Dakle, ova regija gena *FT* nije metilirana u palindromima koje prepoznaje enzim HaeIII.

Sukladno očekivanom, linija *dms3-1* pokazuje smanjenu metiliranost gena *FT* u usporedbi s linijom biljaka divljeg tipa. Nakon digestije enzimom MspJI ova se regija umnažala značajnije više (replika 2) u odnosu na divlji tip.

U linijama u kojima je promijenjena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm i 104), kao i u liniji *cul3^{hyp}* nema značajne promjene u metiliranosti analizirane regije gena *FT* jer se DNA nakon digestije enzimom MspJI umnažala jednako kao i kod biljaka divljeg tipa.

Zanimljivo, u obje replike najznačajnije smanjenje metiliranosti analizirane regije gena *FT* pokazuje linija HB6 s pojačanom ekspresijom gena *AtHB6*.



Slika 29. Metiliranost DNA gena *FT* analizirana umnažanjem na kalupu nepocijepane genomske DNA (genomska), genomske DNA pocijepane s enzimom MspJI (MspJI) i genomske DNA pocijepane s enzimom HaeIII (HaeIII). Nakon lančane reakcije polimerazom vrpce su razdvojene elektroforezom u 2 % agaroznom gelu i obojane etidij bromidom. Denzitometrijom je utvrđen intenzitet pojedine vrpce, a rezultati su normalizirani prema intenzitetu vrpce dobivene na kalupu nepocijepane genomske DNA. Analizirani su 7 dana stari klijanci divljeg tipa (wt), linije u kojoj je tehnologijom RNAi poremećena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm), linije u kojoj je pojačana ekspresija gena *BPM1* (104), linije s nefunkcionalnim genom *DMS3* (*dms3-1*), linije s nefunkcionalnim proteinima CULLIN3 (*cul3^{hyp}*) i linije s pojačanom ekspresijom gena *HB6* (HB6). Prikazani su rezultati dobiveni u drugom eksperimentu

3.3.2.2. Gen *GST11*

Uz gen *FT,* na isti sam način analizirao i metiliranost gena *GST11*. Nakon restrikcijske digestije DNA umnažao sam dio DNA koja obuhvaća dio promotora, 5' netranslatirajuću regiju, prvi egzon i dio prvog introna gena *GST11*. Dobiveni fragment je veličine 320 nukleotida te obuhvaća 25 mjesta koje prepoznaje i cijepa enzim MspJI ukoliko sadrži hidroksimetilirane ili metiliranecitozine. Tu spada jedan slijed CG i jedan slijed CHG koji se mogu metilirati mehanizmima nevezanim za *de novo* metilaciju. Regija koja se umnaža također sadrži 3 palindroma koje prepoznaje enzim AluI a koji se metiliraju mehanizmima *de novo* metilacije (Slika 21). Dobiveni rezultati prikazani su na slici 30 (replika 2), a u prilogu se nalaze rezultati analize obje replike (prilog 5).

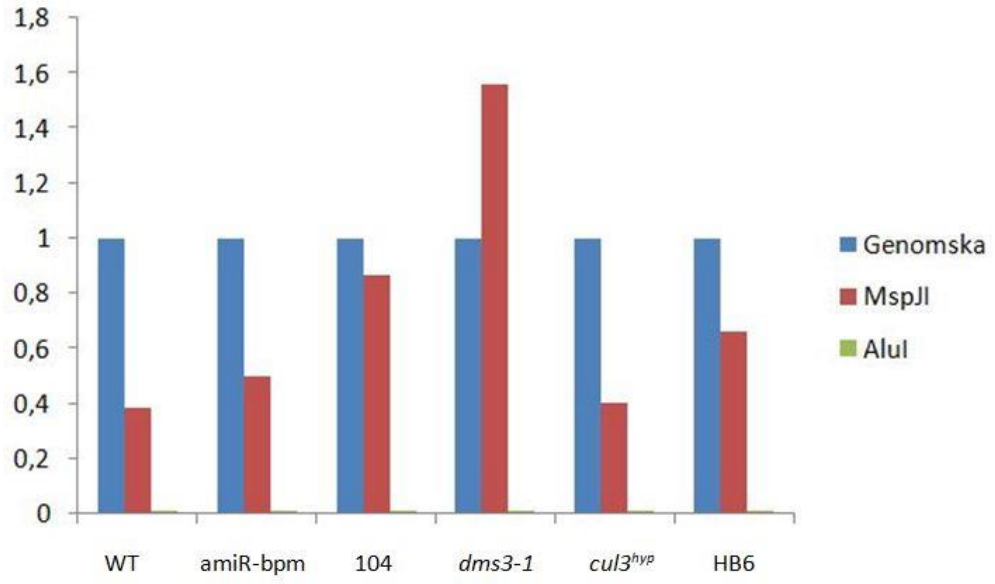
Rezultati pokazuju da niti u jednoj liniji nije došlo do umnažanja uzorka pocijepanih enzimom AluI što znači da palindromi AGCT analiziranog dijela gena *GST11* nisu metilirani mehanizmom *de novo* metilacije.

U liniji *dms3-1* jače umnažanje gena *GST11* nakon digestije enzimom MspJI naspram genomske DNA sugerira da analizirana regija gena *GST11* nije uopće metilirana u ovoj liniji.

Linije s promijenjenim ekspresijama gena *BPM*, amiR-bpm i 104, pokazuju značajne promjene u metiliranosti umnažane regije u odnosu na divlji tip. U prvom pokusu, linija amiR-bpm pokazuje slabiju metiliranost od linije 104 dok je u drugom pokusu to obrnuto – linija 104 pokazuje slabiju metiliranost naspram linije amiR-bpm. Međutim, u oba pokusa obje linije pokazuju smanjenu metiliranost u odnosu na divlji tip. Oprečni rezultati u dvije replike ne mogu ukazati na koji se način mijenja metiliranost, tj. pojačava li se ona ili smanjuje, ali u svakom slučaju ukazuju na njezinu promjenu.

Analiza metiliranosti nakon digestije enzimom MspJI pokazuje da je u obje replike sveukupna metiliranost *GST11* u liniji HB6 smanjena u odnosu na divlji tip jer se ova regija više umnažala nakon digestije s MspJI u odnosu na divlji tip.

Linija *cul3^{hyp}* nije pokazivala značajnije promjene u metiliranosti DNA naspram divljeg tipa.



Slika 30. Metiliranost DNA gena *GST11* analizirana umnažanjem na kalupu nepocijepane genomske DNA (genomska), genomske DNA pocijepane s enzimom MspJI (MspJI) i genomske DNA pocijepane s enzimom AluI (AluI). Nakon lančane reakcije polimerazom vrpce su razdvojene elektroforezom u 2 % agaroznom gelu i obojane etidij bromidom. Denzitometrijom je utvrđen intenzitet pojedine vrpce, a rezultati su normalizirani prema intenzitetu vrpce dobivene na kalupu nepocijepane genomske DNA. Analizirani su 7 dana stari klijanci divljeg tipa (wt), linije u kojoj je tehnologijom RNAi poremećena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm), linije u kojoj je pojačana ekspresija gena *BPM1* (104), linije s nefunkcionalnim genom *DMS3* (*dms3-1*), linije s nefunkcionalnim proteinima CULLIN3 (*cul3^{hyp}*) i linije s pojačanom ekspresijom gena *HB6* (HB6). Prikazani su rezultati dobiveni u drugom eksperimentu.

3.3.2.3. Gen *AtHB6*

Fragment veličine 231 nukleotida nastao umnažanjem dijela promotora, 5' netranslatirajuće regije, prvog egzona i dijela prvog introna gena *AtHB6* obuhvaća 27 mjesta koje enzim MspJI može pocijepati ukoliko su unutar mjesta prepoznavanja hidroksimetilirani ili metilirani citozini, a u ova mjesta spadaju četiri slijeda CHG koji se mogu metilirati i mehanizmima drugačijim od *de novo* metilacije. U ovom fragmentu nema slijedova CG. Ovdje se također nalazi jedan palindrom kojeg prepoznaje enzim AluI (Slika 20). Metiliranost ovog gena analizirao sam na isti način, koristeći isti kalup DNA kao i za prethodno opisane gene. Rezultati analize metiliranosti DNA (replika 1) prikazani su na slici 31, a u prilogu ovog rada nalaze se rezultati analize obje replike (Prilog 6).

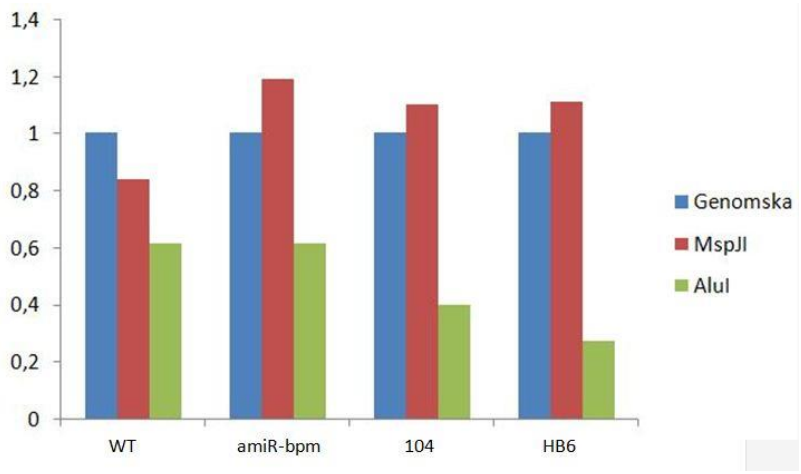
Linija *dms3-1* obrađena je u jednoj replici (prilog 6b) i digestija s enzimom MspJI ukazuje na očekivano smanjenje metiliranosti DNA ove regije s obzirom na divlji tip. Također, u toj je liniji enzim AluI pocijepao DNA jer palindromi koje on prepoznaje nisu bili metilirani (replika 2 u prilogu 6)

U prvom pokusu, u liniji amiR-bpm uočeno je smanjenje opće metiliranosti gena *AtHB6* nakon digestije s enzimom MspJI u odnosu na divlji tip, dok se u drugom pokusu javlja jača metiliranost naspram divljeg tipa (prilog 6). Također, analiza s enzimom AluI ne ukazuje na promjenu u *de novo* metiliranosti njegovih palindroma.

Isto kao i s linijom amiR-bpm, u liniji 104 uočena je smanjena metiliranost ovog gena u prvoj replici dok se u drugoj javlja pojačana metiliranost u usporedbi s divljim tipom. U ovoj se liniji može uočiti smanjena metiliranost palindroma koje prepoznaje enzim AluI.

U obje replike, linija HB6 pokazuje smanjenu opću metiliranost ovog gena naspram divljeg tipa. Nakon digestije s enzimom MspJI dolazi do jačeg umnažanja ove regije u reakciji PCR u usporedbi s divljim tipom što upućuje na smanjenu metiliranost u obje replike. Digestija s enzimom AluI daje oprečne rezultate jer u prvom pokusu ukazuje na smanjenu metiliranost ovih palindroma, u drugom pokusu na povećanu u odnosu na divlji tip.

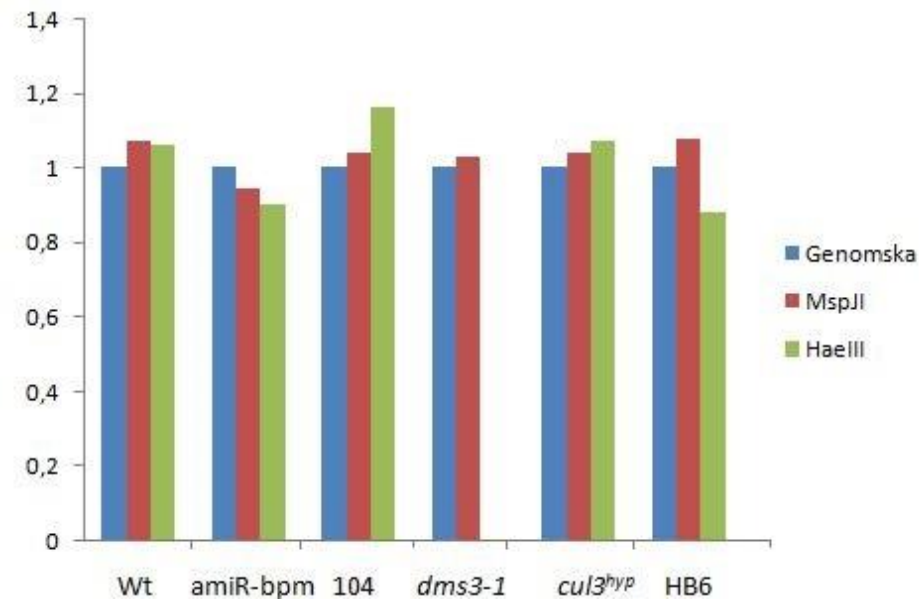
Linija *cul3*^{hyp} ukazuje na smanjenu metiliranost ovog gena (prilog 6) dok analiza s enzimom AluI ukazuje na povećanu *de novo* metiliranost palindroma koje on prepoznaje.



Slika 31. Metiliranost DNA gena *AtHB6* analizirana umnažanjem na kalupu nepocijepane genomske DNA (genomska), genomske DNA pocijepane s enzimom MspJI (MspJI) i genomske DNA pocijepane s enzimom AluI (AluI). Nakon lančane reakcije polimerazom vrpce su razdvojene elektroforezom u 2 % agaroznom gelu i obojane etidij bromidom. Denzitometrijom je utvrđen intenzitet pojedine vrpce, a rezultati su normalizirani prema intenzitetu vrpce dobivene na kalupu nepocijepane genomske DNA. Analizirani su 7 dana stari klijanci divljeg tipa (wt), linije u kojoj je tehnologijom RNAi poremećena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm), linije u kojoj je pojačana ekspresija gena *BPM1* (104) i linije s pojačanom ekspresijom gena *HB6* (HB6). Prikazani su rezultati dobiveni u prvom eksperimentu.

3.3.2.4. Gen *Aktin 7*

Kao kontrolu koristio sam gen *Aktin 7* (Slika 22). Ovaj lokus nije pod utjecajem *de novo* metilacije DNA. Rezultati su prikazani na slici 32.



Slika 32. Metiliranost DNA gena *Aktin 7* koji je korišten kao kontrola jer nije po utjecajem *de novo* metilacije DNA. Metiliranost je analizirana umnažanjem na kalupu nepocijepane genomske DNA (genomska), genomske DNA pocijepane s enzimom MspJI (MspJI) i genomske DNA pocijepane s enzimom AluI (AluI). Nakon lančane reakcije polimerazom vrpce su razdvojene elektroforezom u 2 % agaroznom gelu i obojane etidij bromidom. Denzitometrijom je utvrđen intenzitet pojedine vrpce, a rezultati su normalizirani prema intenzitetu vrpce dobivene na kalupu nepocijepane genomske DNA. Analizirani su 7 dana stari klijanci divljeg tipa (wt), linije u kojoj je tehnologijom RNAi poremećena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm), linije u kojoj je pojačana ekspresija gena *BPM1* (104), linije s nefunkcionalnim proteinima CULLIN3 (*cul3*^{hyp}) i linije s pojačanom ekspresijom gena *HB6* (HB6). Prikazani su rezultati dobiveni u prvom eksperimentu.

4. Rasprava

U preliminarnim istraživanjima izolirao sam DNA pomoću komercijalnog kita - DNeasy Plant Mini Kit (*Qiagen*) no ona nije bila zadovoljavajuće čistoće te je restrikcijske endonukleaze nisu potpunosti mogle degradirati. Vrlo je važno da se digestija provede do kraja jer zaostala nepocijepana genomska DNA može dati krive rezultate. Stoga je DNA izolirana metodom CTAB savršena za analizu restrikcijskim enzimima.

U biljci *A. thaliana* metilirano je gotovo 5-6 % citozina, a glavna uloga metilacije DNA je sprječavanje ekspresije potencijalno štetnih genetičkih elemenata kao što su transpozoni (Zilberman i sur. 2007). Ponavljajuće sekvence i gotovo svi transpozoni sadrže visok postotak metilcitozina, no metilirani citozini prisutni su i unutar gena iako rjeđe u promotorskim regijama (Lister i sur. 2008). Ipak, metilacija citozina u promotorskoj regiji povezuje se sa smanjenom ekspresijom gena dok metilacija samog gena može imati različite učinke na ekspresiju. Dok metilacija sljedova CG ne ometa Pol II u transkripciji, pokazano je da metilacija sljedova CHH može inhibirati ekspresiju gena (You i sur. 2012; Gonzales i sur. 2011).

4.1. Metilacija ponavljajućih sekvenci

Retrotranspozoni i ponavljajući elementi DNA, kao što su lokusi *AtSN1*, *IGN5* i *IGN23*, utišani su *de novo* metilacijom, tj. putem RdDM (Wierzbicki i sur. 2009). Upravo se zbog toga ovi lokusi koriste za istraživanje utjecaja mutacija u genima esencijalnim za *de novo* metilaciju na metiliranost ovih regija. Poznato je da se u retrotranspozonu *AtSN1* nalaze tri restrikcijska mjesta koje prepoznaje enzim HaeIII dok se u *IGN5* nalaze dva takva mjesta. Za analizu metiliranosti lokusa *AtSN1*, znanstvenici (Haag i sur. 2009) su genomsku DNA pocijepali s enzimom HaeIII i koristeći početnice koje omeđuju ova tri restrikcijska mjesta umnažali lokus *AtSN1*. Samo ako su sva tri mjesta metilirana, doći će do umnažanja lokusa *AtSN1* reakcijom PCR. U divljem tipu, retrotranspozon *AtSN1* je metiliran što ga čini neosjetljivim na digestiju enzimom HaeIII i dolazi do umnažanja ovog lokusa. Međutim, u biljkama u kojima su mutirani geni koji kodiraju za podjedinice Pol IV i Pol V (*nrpd1* i *nrpe1*), metilacija je narušena zbog čega enzim HaeIII može cijepati i ne dolazi do umnažanja reakcijom PCR (Haag i sur. 2009). Slično je i s lokusima *IGN23* i *IGN5* gdje su znanstvenici dokazali da ne dolazi do umnažanja ovog lokusa nakon digestije enzimom HaeIII u

mutantima *nrpe1* i *dms3* gdje nedostaju ove važne komponente mašinerije za *de novo* metilaciju (Lorković i sur. 2012; Wierzbicki i sur. 2009). Upravo zbog ovih činjenica, u ovom sam radu koristio lokuse *AtSN1*, *IGN5* i *IGN23* ne bih li provjerio mijenja li se njihov obrazac metilacije i kao posljedica promijenjene ekspresije gena *BPM*. Prema dostupnoj literaturi, za analizu metilacije DNA biljke *Arabidopsis*, po prvi put korišten je enzim MspJI u kombinaciji s enzimima HaeIII i AluI.

U svim umnažanim regijama nalaze se sljedovi (CG i CHG) koje bi enzim MspJI mogao pocijepati a koji se mogu metilirati mehanizmima drugačijim od *de novo* metilacije. Zbog prisutnih CG i CHG sljedova u analiziranim sekvencama moguća su odstupanja u rezultatima, budući da ovi sljedovi mogu ostati metilirani bez obzira je li *de novo* metilacija narušena. Čak štoviše, postoji mogućnost da su se procesi održavanja metilacije DNA pojačali te da je pojačana metilacija sljedova CG i CHG kad se *de novo* metilacija, koju sam analizirano s enzimima HaeIII i AluI, smanjila.

Liniju *dms3-1* koristio sam kao svojevrsnu kontrolu budući da je iz prethodnih istraživanja poznato da je u ovoj liniji *de novo* metilacija DNA narušena i da ne dolazi do umnažanja testiranih lokusa nakon digestije s enzimom HaeIII, što sam potvrdio i u svojim pokusima. Ovo je ujedno dokaz da su testirani lokusi uistinu metilirani *de novo* i da se stupanj metilacije ovih lokusa mijenja zbog mutacija u komponentama mašinerije za *de novo* metilaciju DNA, a ujedno da su eksperimentalni uvjeti pravilno postavljeni i da je eksperiment pravilno izveden. U ovom sam radu osim metilacijski osjetljivih restrikcijskih enzima HaeIII i AluI, koristio i metilacijski ovisnu restrikcijsku endonukleazu MspJI koja prepoznaje metilirane i hidroksimetilirane citozine i cijepa u njihovoj blizini. Digestija ovim enzimom pruža još jedan način provjere na koji se način mijenja obrazac metilacije ovih lokusa. Što je jače lokus metiliran, enzim će više cijepati što naposljetku dovodi do slabijeg umnažanja nakon reakcije PCR. Zbog toga je intenzitet vrpce u liniji *dms3-1* nakon digestije s enzimom MspJI vrlo jak što ponovno potvrđuje da je *de novo* metilacija DNA u ovoj liniji narušena i da su tri testirana lokusa hipometilirana u odnosu na liniju divljeg tipa gdje je metilacija standardna.

Dosadašnja istraživanja (N. Bauer, neobjavljeni rezultati) su pokazala interakciju proteina BPM1 i BPM3 s proteinima DMS3 i RDM1. Budući da su proteini DMS3 i RDM1 dio kompleksa DDR nužnog za *de novo* metilaciju DNA, još nije poznato koje značenje imaju proteini BPM u ovom procesu. U ovom sam radu koristio dvije linije koje bi mogle ukazati na promjenu u metiliranosti kao posljedicu promijenjene ekspresije gena *BPM1* i *BPM3*. To su linija amiR-bpm, u kojoj je smanjeno eksprimiran gen *BPM1* i pojačano eksprimiran gen

BPM3, te linija 104, koja ima gen *BPM1* pojačano eksprimiran, a ekspresija *BPM3* je kao u divljem tipu. Usporedbom rezultata dobivenih digestijom enzimima HaeIII i enzimom MspJI te usporedbom različitih linija, provjerio sam na koji se način mijenja metiliranost lokusa *AtSN1*, *IGN5* i *IGN23* ukoliko je promijenjena ekspresija gena *BPM*.

Rezultati dobiveni analizom linija s promjenama u ekspresiji gena *BPM* jasno upućuju na to da promjena ekspresije gena *BPM* uzrokuje promjenu metiliranosti sva tri testirana lokusa. U liniji amiR-bpm i u liniji 104, analiza s enzimom MspJI ukazuje na hipermetiliranost ovih lokusa u odnosu na divlji tip no još uvijek nije jasno na koji točno način promjena ekspresije gena *BPM1* i *BPM3* dovodi do ovakve fluktuacije u metiliranosti. U liniji 104 pojačana je ekspresija gena *BPM1*, a u liniji amiR-bpm ekspresija gena *BPM3*. Ukoliko su povećane i razine proteina BPM u linijama amiR-bpm i 104 naspram divljeg tipa, onda bi se moglo zaključiti da ovi proteini pojačavaju *de novo* metilaciju DNA.

Druga mogućnost je da proteini BPM ulaze u interakciju s proteinima DMS3 i RDM1 te ih obilježavaju za degradaciju ubikvitin-proteasomnim putem, međutim do sada nije utvrđena povećana razina ubikvitiniranih proteina DMS3 u stanicama s pojačanom ekspresijom gena *BPM* (N. Bauer, neobjavljeni rezultati). Također, degradacija proteina DMS3 i RDM1 ovim putem bi dovela do smanjene metiliranosti, a ne do povećane kao što je ovdje slučaj, te moji rezultati analize metiliranosti repetitivnih lokusa upućuju na to da pojačana ekspresija BPM1 ima stimulativni učinak na metilaciju DNA.

S druge strane, metiliranost palindroma HaeIII mijenja se na nešto drugačiji način, ali vrijedi primijetiti da je u liniji 104, gdje je pojačana ekspresija gena *BPM1*, stupanj metiliranost palindroma HaeIII na istoj razini kao i u divljem tipu, dok je u liniji amiR-bpm njihova metiliranost narušena. Zasad još nije potpuno jasno je li promjena u *de novo* metilaciji HaeIII palindroma ovih lokusa vezana uz smanjenu ekspresiju gena *BPM1* ili pojačanu ekspresiju *BPM3*. U svakom slučaju, rezultati ukazuju da promijenjena ekspresija gena *BPM* zaista dovodi do promjena u obrascu metilacije ponavljajućih sekvenci, ali su potrebna dodatna istraživanja u kojima će se utvrditi kako su proteini BPM uključeni u *de novo* metilaciju.

U liniji $cul3^{hyp}$, gdje je funkcija proteina CUL3 izmijenjena, ne može se pouzdano zaključiti na koji se način mijenja metiliranost ovih lokusa jer se u svakom lokusu mijenja na drugačiji način. Ipak, došlo je do promjene u stupnju metilacije. Pojačana *de novo* metilacija ovih lokusa možda je posljedica nemogućnosti degradacije ubikvitin-proteasomnim putem proteina uključenih u ovaj proces, budući da u ovoj liniji nedostaju funkcionalni proteini

CUL3. Moji rezultati ukazuju na važnost CUL3 u *de novo* metilaciji DNA no za utvrđivanje mehanizma djelovanja CUL3 u ovom procesu potrebna su daljnja istraživanja.

Pojačana ekspresija gena *AtHB6* utjecala je na promjenu u metilaciji DNA, no kao i kod linije *cul3*^{hyp} rezultati nisu bili jednoznačni.

4.2. Metilacija gena

Proteini AtBPM, koji su sastavni dio kompleksa ligaza E3, sudjeluju u proteasomalnoj degradaciji najmanje triju familija transkripcijskih regulatora i imaju ulogu u regulaciji brojnih razvojnih procesa (Cheni sur. 2013, 2015) kao i u odgovoru na stres (Weber i sur. 2009, Lechner i sur. 2011). Neki od transkripcijskih faktora koji su supstrati proteina BPM i koji bivaju degradirani ovim putem su transkripcijski inhibitori AtHB6 i AtMYB56 koji u kombinaciji s dodatnim faktorima, reguliraju ekspresiju gena *AtHB6, GST11* i *FT*. Protein AtMYB56 regulira ekspresiju gena *FT*, dok protein AtHB6 regulira ekspresiju vlastitog, ali i gena *GST11*. Gen *AtHB6* je uključen u regulaciju niza odgovora na apscizinsku kiselinu – biljni hormon koji regulira brojne aspekte biljnog rasta i razvoja uključujući dormanciju i klijanje sjemenki, reprodukciju te je ključna komponenta odgovora na biotičke i abiotičke stresne uvjete poput hladnoće, saliniteta i suše (Lechner i sur. 2011). Gen *GST11* je također uključen u odgovore na razne stresne uvjete kao što su gljivične infekcije, oksidativni stres, toplinski šok, dehidracija, ranjavanje, senescencija i drugo, a protein GST11 detoksificira štetne endogene i ksenobiotičke spojeve (Kouno i Ezaki 2013). Produkt gena *FT* uključen je u regulaciju cvjetanja kao i u odgovor na dugi dan (Chen i sur. 2015). U uvjetima bez stresa, ekspresija gena *AtHB6* i *GST11* je inhibirana navedenim transkripcijskim inhbitorima – AtHB6 i MYB56. Ovi inhibitori vezani su za promotore gena i time onemogućuju transkripciju. U stresnim uvjetima, inhibitori se degradiraju ubikvitin-proteasomnim putem u kojem sudjeluju proteini BPM (Chen i sur. 2015; Lechner i sur. 2011). Zbog toga što proteini BPM ulaze u interakciju s transkripcijskih inhibitorima vezanim za promotore gena, a ujedno i s proteinima DMS3 i RDM1 uključenim u *de novo*metilaciju DNA, smatrao sam da transkripcijski inhibitori privlače mašineriju za *de novo* metilaciju DNA te da tijekom inhibicije transkripcije RNA polimerazom II dolazi do metilacije DNA (posredovane s RNA polimerazom V) u promotorskoj regiji gena. Očekivao sam da će u liniji u kojoj je bila pojačana ekspresija gena *BPM*, metiliranost promotorske regije biti jača budući da će više proteina BPM dovoditi metilacijsku mašineriju do promotora. Zbog bolje stabilnosti transkripcijskih inhibitora AtHB6 i AtMYB56, u liniji s poremećenom funkcijom proteina

CUL3, kao i u liniji s prekomjernom ekspresijom AtHB6, očekivao sam jače metilirane promotorske regije.

Jedan od regulatora gena *FT* je transkripcijski inhibitor AtMYB56. Chen i suradnici (2015) su u svojim istraživanjima otkrili da protein AtMYB56 ulazi u interakciju s proteinima BPM. Zbog ovih saznanja predložen je model koji opisuje ulogu E3 ligaza u proteolitičkoj degradaciji proteina AtMYB56 čime se regulira ekspresija gena *FT*. Također, utvrđeno je da je obrazac ekspresije gena *FT* suprotan ekspresiji gena *AtMYB56*.

Moji rezultati pokazuju da se metiliranost analizirane regije gena *FT* značajno ne mijenja kao posljedica promijenjene ekspresije gena *BPM* i *CUL3* u odnosu na divlji tip, no uočena je značajno smanjena metilacija DNA u liniji HB6 naspram divljeg tipa, kao i u liniji *dms3-1*. Postoji nekoliko mogućih objašnjenja. Za početak, linija *dms3-1* pokazuje da dolazi do promjene u metilaciji što ukazuje da je ova regija zaista pod utjecajem *de novo* metilacije. Međutim, čini se da obrazac metilacije promotorske regije gena *FT* ne ovisi o proteinima BPM već o drugim mehanizmima. Dokazano je da razina proteina AtMYB56 u stanici ovisi o dobu dana (Chen i sur. 2015). Jedno od daljnjih istraživanja bi moglo uključiti eksperimente kojima bi se istražilo utječu li uopće, i na koji način, različite razine proteina AtMYB6 tokom dana na metiliranost molekule DNA.

Nadalje, pojačana ekspresija gena *AtHB6* dovodi do značajno smanjene metilacije naspram divljeg tipa, ali još uvijek nije jasno na koji je način ovaj protein povezan s metilacijom promotorske regije gena *FT*.

Geni *GST11* i *AtHB6* pod kontrolom su istog transkripcijskog inhibitora, a to je protein AtHB6 koji blokira transkripciju kad je vezan za njihove promotore (Kouno i Ezaki 2013). Moji rezultati govore da se u slučaju pojačane ekspresije gena *AtHB6* metilacija promotora gena *AtHB6* smanjila što je u suprotnosti s početnom hipotezom. Isti je slučaj s genom *GST11* čiju ekspresiju regulira protein AtHB6 koji također, čini se, uzrokuje smanjenu metilaciju DNA promotora gena *GST11*. Možda rekombinantni protein AtHB6-GFP ne može dobro vezati promotor ili možda GFP ometa interakciju s BPM. Također, poznato je da proteini AtHB6 mogu stvarati homodimere s ostalim proteinima s homeodomenom i to ometa interakciju s proteinima BPM (Lechner i sur. 2011). Možda zbog povećane razine proteina AtHB6 postoje veće šanse formiranja homodimera čime bi se smanjila interakcija s proteinima BPM, a time bi se ujedno smanjila metiliranost promotora gena.

Kod linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1*, rezultati govore da se metilacija DNA gena *GST11* smanjila. Lechner i suradnici (2011) su pokazali da smanjenje u ekspresiji gena *BPM* dovodi do povećane količine proteina AtHB6 te da pojačana ekspresija *BPM3*

smanjuje prisutnost proteina AtHB6. Jedna od mogućnosti je da se s pojačanom ekspresijom proteina BPM veći broj proteina AtHB6 degradira i zbog toga se mašinerija za *de novo* metilaciju ne dovodi, ili dovodi u manjoj mjeri do promotora ovih gena čime se posljedično smanjuje njihova metiliranost. Međutim, ova pretpostavka ne uzima u obzir prisustvo drugih protein BPM koji mogu na neki drugi način utjecati na metilaciju, a ujedno bi se trebala pratiti razina proteina AtHB6 u stanici ne bi li se provjerilo dolazi li zaista do njegove pojačane degradacije zbog više razine proteina BPM1.

Linija koja eksprimira nefunkcionalne proteine CUL3 pokazuje promjenu u metiliranosti umnažanih regija istraživanih gena. Prema pretpostavci, veća stabilnost transkripcijskih inhibitora koji ne bivaju degradirani zbog nedostatka proteina CUL3, trebala bi dovesti do jače metiliranosti ovih regija. Oprečni rezultati stupnja metilacije dobiveni u ovom radu ne mogu potvrditi ovu pretpostavku, ali je ne mogu niti osporiti. U nekim replikama ipak dolazi do pojačane metiliranosti gena dok se u drugima metiliranost DNA smanjuje. Potrebna su daljnja istraživanja i dodatne replike koje će potvrditi veliku promjenjivost ovih regija s obzirom na metilaciju ili koje će dati konzistentnije rezultate i uvid o tome kako se metilacija tih gena mijenja te kakva je, posljedično, njihova ekspresija.

U konačnici, moji rezultati pokazuju da se metiliranost ponavljajućih sekvenci zaista mijenja pod utjecajem promijenjene ekspresije gena *BPM*. Linije amiR-bpm i 104 pokazuju hipermetiliranost ponavljajućih sekvenci u odnosu na divlji tip što ukazuje da na neki način smanjena odnosno povećana ekspresija gena *BPM1* i *BPM3* utječe na metiliranost. Koji su točno mehanizmi i kakve su to interakcije između proteina BPM i proteina uključenih u metiliranje molekule DNA odgovorne za ovakve promjene, još se treba utvrditi. Rezultati dobiveni za gene ne daju jasnu sliku na koji se točno način mijenja njihova metiliranost kao posljedica promijenjene ekspresije gena *BPM*, ali može se zaključiti da ipak dolazi do promjene u metilacije molekule DNA.

5. Zaključak

Prethodna istraživanja su pokazala da proteini BPM interagiraju s komponentama ključnim za *de novo* metilaciju DNA (proteini DMS3 i RDM1), stoga sam u ovom radu istražio utječe li promjena ekspresije gena *BPM* na obrazac metilacije DNA. Analiza metiliranosti molekule DNA ponavljajućih sekvenci pokazala je da se njihova metiliranost mijenja kao posljedica promijenjene ekspresije gena *BPM*. Ova pojava može biti posljedica interakcija između proteina uključenih u *de novo* metilaciju i proteina BPM no još uvijek nije poznato koji se to mehanizmi kriju iza ovakve promjene metiliranosti i na koji način promijenjena ekspresija gena *BPM* utječe na promjenu metiliranosti DNA ponavljajućih sekvenci. Analiza metiliranosti molekule DNA gena čiji transkripcijski regulatori ulaze u interakciju s proteinima BPM ne daju jasnu sliku o tome kako se mijenja metilacija istraživanih regija. Potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se dobili rezultati koji bi dali jasniji uvid u utjecaj promijenjene ekspresije gena *BPM* na ciljne gene.

6. Literatura

Ardley, H. C., Robinson, P. A. (2005): E3 ubiquitin ligases. Essays in Biochemistry **41**:15–30.

Bolle, C., Schneider, A., Leister D. (2011): Perspectives on systematic analyses of gene function in *Arabidopsis thaliana*: New tools, topics and trends. Current Genomics **12**: 1–14

Chan, S. W. L., Henderson, I. R., Jacobsen, S. E. (2005): Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. Nature Reviews Genetics **6**: 351–360.

Chen, L., Bernhardt, A., Lee, J. H., Hellmann, H. (2015): Identification of *Arabidopsis* MYB56 as a novel substrate for $CRL3^{BPM}$ E3 ligases. Molecular Plant **8**: 242–250.

Elhiti, M., Stasolla, C. (2009): Structure and function of homodomain-leucine zipper (HD-Zip) proteins. Plant Signaling &Behavior **4**: 86–8.

Ezkurdia, I., Juan, D., Rodriguez, J. M., Frankish, A., Diekhans, M., Harrow, J., Vazquez, J., Valencia, A., Tress M. L. (2014): Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes. Human Molecular Genetics **23**: 5866-5878

Gingerich, D. J., Gagne, J. M., Salter, D. W., Hellmann, H., Estelle, M., Ma, L., Vierstra, R. D. (2005): Cullins 3a and 3b assemble with members of the broad complex/tramtrack/ bric-a-brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin-protein ligases (E3s) in *Arabidopsis*. Journal of Biological Chemistry **280**: 18810–18821.

Haag, J. R., Pontes, O., Pikaard, C. S. (2009): Metal A and metal B sites of nuclear RNA polymerases Pol IV and Pol V are required for siRNA-dependent DNA methylation and gene silencing. PLoS ONE **4**

Kawashima, T., Berger, F. (2014) Epigenetic reprogramming in plant sexual reproduction. Nature Reviews Genetics **15**: 613–624.

Komander, D., Rape, M. (2012): The ubiquitin code. Annual Review of Biochemistry **81**: 203–229.

Kouno, T., Ezaki, B. (2013): Multiple regulation of *Arabidopsis* AtGST11 gene expression by four transcription factors under abiotic stresses. Physiologia Plantarum **148**: 97–104.

Krek, W. (2003): BTB proteins as henchmen of Cul3-based ubiquitin ligases. Nature Cell Biology **5**: 950–951.

Lechner, E., Leonhardt, N., Eisler, H., Parmentier, Y., Alioua, M., Jacquet, H., Leung, J., Genschik, P. (2011): MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling. Developmental Cell **21**: 1116–1128.

Liu, Z. W., Shao, C. R., Zhang, C. J., Zhou, J.X., Zhang, S. W., Li, L., Chen, S., Huang, H. W., Cai, T., He, X. J. (2014): The SET domain proteins SUVH2 and SUVH9 are required for Pol V occupancy at RNA-Directed DNA Methylation loci. PLoS Genetics **10**.

Lorković, Z. J., Naumann, U., Matzke, A. J. M., Matzke, M. (2012): Involvement of a GHKL ATPase in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. Current Biology, **22**: 933–938.

Matzke, M. A., Mosher, R. A. (2014): RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. Nature Reviews Genetics, **15**: 94–408.

Matzke, M. A., Kanno, T., Matzke, A. J. M. (2014): RNA-Directed DNA Methylation: The evolution of a complex epigenetic pathway in flowering plants. Annual Review of Plant Biology: 1–25.

Maupin-Furlow, J. (2011): Proteasomes and protein conjugation across domains of life. Nature Reviews Microbiology**10**: 100–111.

Metzger, M. B., Hristova, V. A., Weissman, A. M. (2012): HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. Journal of Cell Science **125**: 531–537.

Rowley, M. J., Avrutsky, M. I., Sifuentes, C. J., Pereira, L., Wierzbicki, A. T. (2011): Independent chromatin binding of ARGONAUTE4 and SPT5L/KTF1 mediates transcriptional gene silencing. PLoS Genetics **7**: 1–9.

Smalle, J., Vierstra, R.D. (2004): The Ubiquitin 26S Proteasome Proteolytic Pathway. Annual Review of Plant Biology **55**: 555–590.

Thomann, A., Lechner, E., Hansen, M., Dumbliauskas, E., Parmentier, Y., Kieber, J., Scheres, B., Genschik, P. (2009): *Arabidopsis* CULLIN3 genes regulate primary root growth and patterning by ethylene-dependent and -independent mechanisms. PLoS Genetics **5**.

Turck, F., Fornara, F., Coupland, G. (2008): Regulation and Identity of Florigen: FLOWERING LOCUS T Moves Center Stage. Annual Review of Plant Biology **59**: 573–594.

Vaucheret, H. (2008): Plant ARGONAUTES. Trends in Plant Science **13**: 350–358.

Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W. (1999): The 26S P Roteasome: a Molecular Machine Designed for Controlled. Annual Review of Biochemistry **68**: 1015–1068.

Weber, H., Bernhardt, A., Dieterle, M., Hano, P., Mutlu, A., Estelle, M., Genschik, P., Hellmann, H. (2005): *Arabidopsis* AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. Plant Physiology**137**: 83–93.

Wierzbicki, A. T., Ream, T., Haag, J. R., Pikaard, C. S. (2009): RNA Polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. Nature Reviews Genetics **41**: 630–634.

Xie, M., Yu, B. (2015): siRNA-directed DNA Methylation in Plants. Current genomics **16**: 23–31.

Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E., Carrington, J. C. (2004): Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. PLoS Biology **2**: 642–652.

Zhang, H., He, X., Zhu, J. K., (2013): RNA-directed DNA methylation in plants: Where to start? RNA Biology **10**: 1593–1596.

Zhang , L., Xu, M., Scotti , E., Chen, Z. J., Tontonoz, P. (2013): Both K63 and K48 ubiquitin linkages signal lysosomal degradation of the LDL receptor. Journal of lipid research **54**: 1410–1420.

http://middlab.middlebury.edu/files/2010/08/ubiquitin.png, pristupljeno 2.01.2017

http://www.nature.com/leu/journal/v20/n9/images/2404319f2.jpg, pristupljeno 2.01.2017

https://imagej.nih.gov/ij/download.html, pristupljeno 2.01.2017

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013007_GeneRuler_1kb_DNALadder_RTU_50ug_UG.pdf, pristupljeno 2.01.2017

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013011_GeneRuler_100bp_Plus_DNALadder_RTU_250ug_UG.pdf, pristupljeno 2.01.2017

www.clontech.com/TW/Products/PCR/High_Yield_PCR/EmeraldAmp_MAX_PCR_Master_Mix, pristupljeno 2.01.2017

www.neb.com/products/r0108-haeiii, pristupljeno 2.01.2017

www.neb.com/products/r0137-alui, pristupljeno 2.01.2017

www.neb.com/products/r0661-mspji, pristupljeno 2.01.2017

7. Životopis

Rođen sam 10. studenog 1992. godine u Zagrebu. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje stekao sam u Rovinju. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao sam 2011. godine, a akademski stupanj sveučilišnog prvostupnika molekularne biologije stekao sam 2014. godine završetkom preddiplomskog sveučilišnog studija molekularne biologije. Iste godine upisao sam diplomski sveučilišni studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Tokom svog studija, odradio sam laboratorijsku praksu u Laboratoriju za molekularnu genetiku Zavoda za molekularnu biologiju te bio demonstrator na kolegiju „Genetičko inženjerstvo u biotehnologiji“.

Odlično poznajem engleski i talijanski jezik te imam osnove njemačkog jezika. Dobro sam upoznat s radom u operativnom sustavu MS Windows te programskim paketima MS Office.

U slobodno vrijeme bavim se kreativnim pisanjem, crtanjem, fotografiranjem.

8. Prilozi

Prilog 1: Lokus *AtSN1*

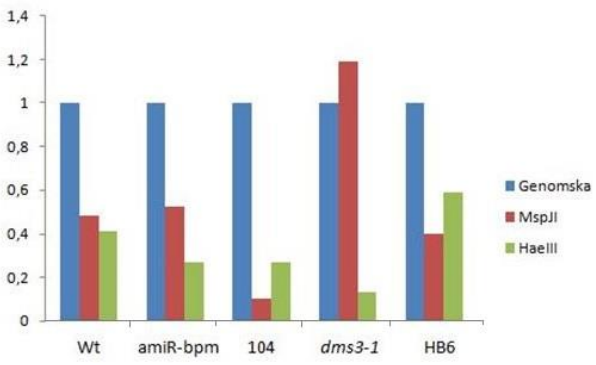
a)

Linija	Genomska	MspJI	HaeIII	% Genomske	%MspJI	% HaeIII
wt	15841	7644	6512	1	0,482545	0,411085
amiR-bpm	16065	8468	4347	1	0,527109	0,270588
104	15947	1572	4263	1	0,098577	0,267323
dms3-1	2871	3422	372	1	1,191919	0,129572
HB6	12942	5201	7601	1	0,40187	0,587313

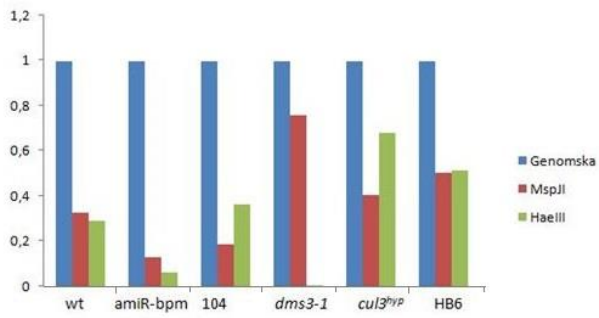
b)

Linija	Genomska	MspJI	HaeIII	% Genomske	%MspJI	% HaeIII
wt	14663	4836	4273	1	0,3298097	0,2914138
amiR-bpm	10995	1431	644	1	0,1301501	0,0585721
104	11454	2121	4150	1	0,1851755	0,3623188
dms3-1	14305	10823	54	1	0,7565886	0,0037749
cul3^{hyp}	11480	4652	7790	1	0,4052265	0,6785714
HB6	10877	5466	5585	1	0,5025283	0,5134688

c)



d)



Prilog 1. Lokus *AtSN1*

Brojčane vrijednosti iz replike 1 (**a**) i replike 2 (**b**) dobivene denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu linije divljeg tipa (wt), linije u kojoj je tehnologijom RNAi poremećena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm), linije u kojoj je pojačana ekspresija gena *BPM1* (104), linije s nefunkcionalnim genom *DMS3* (*dms3-1*), linije s nefunkcionalnim proteinima CUL3 (*cul3^{hyp}*)i linije s pojačanom ekspresijom gena *HB6* (HB6). Vrijednosti su također izražene kao postotak u odnosu na intenzitet vrpce nepocijepane genomske DNA. **c)** i **d)** Grafički prikaz vrijednosti dobivenih denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu za pojedine linije. Plavi stupac predstavlja intenzitet vrpce nepocijepane genomske DNA, crveni stupac predstavlja intenzitet vrpce genomske DNA pocijepane enzimom MspJI, a zeleni stupac enzimom HaeIII. Viši stupac predstavlja jači intezitet vrpce. Uzorci su na agarozni gel nanošeni nakon 35. ciklusa reakcije PCR.

Prilog 2: Lokus *IGN5*

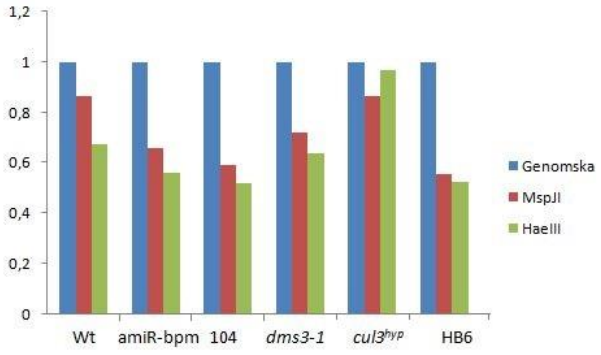
a)

Linija	Genomska	MspJI	HaeIII	% Genomske	%MspJI	% HaeIII
wt	10228	9250	10024	1	0,90438	0,980055
amiR-bpm	10527	8900	9390	1	0,845445	0,891992
104	10553	8800	10034	1	0,833886	0,95082
dms3-1	10512	10273	0,1	1	0,977264	9,51E-06
cul3^{hyp}	9303	8659	9452	1	0,930775	1,016016
HB6	8966	8399	8686	1	0,936761	0,968771

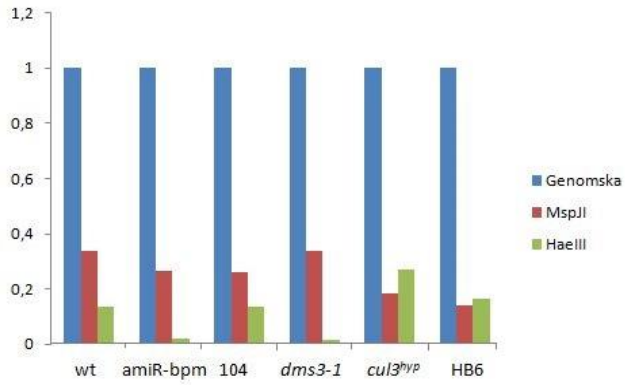
b)

Linija	Genomska	MspJI	HaeIII	% Genomske	%MspJI	% HaeIII
wt	10974	3715	1468	1	0,338527	0,133771
amiR-bpm	7931	2118	134	1	0,267053	0,016896
104	9236	2398	1236	1	0,259636	0,133824
dms3-1	8772	2961	117	1	0,337551	0,013338
cul3^{hyp}	7716	1400	2089	1	0,181441	0,270736
HB6	7767	1067	1284	1	0,137376	0,165315

c)



d)



Prilog 2. Lokus *IGN5*

Brojčane vrijednosti iz replike 1 (**a**) i replike 2 (**b**) dobivene denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu linije divljeg tipa (wt), linije u kojoj je tehnologijom RNAi poremećena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm), linije u kojoj je pojačana ekspresija gena *BPM1* (104), linije s nefunkcionalnim genom *DMS3* (*dms3-1*), linije s nefunkcionalnim proteinima CULLIN3 (*cul3^{hyp}*)i linije s pojačanom ekspresijom gena *HB6* (HB6). Vrijednosti su također izražene kao postotak u odnosu na intenzitet vrpce nepocijepane genomske DNA. **c)** i **d)** Grafički prikaz vrijednosti dobivenih denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu za pojedine linije. Plavi stupac predstavlja intenzitet vrpce nepocijepane genomske DNA, crveni stupac predstavlja intenzitet vrpce genomske DNA pocijepane enzimom MspJI, a zeleni stupac enzimom HaeIII. Viši stupac predstavlja jači intezitet vrpce. Uzorci su na agarozni gel nanošeni nakon 35. ciklusa reakcije PCR.

Prilog 3: Lokus *IGN23*

a)

Linija	Genomska	MspJI	HaeIII	% Genomske	%MspJI	% HaeIII
wt	14275	9884	1836	1	0,692399	0,128616
amiR-bpm	11912	7097	258	1	0,595786	0,021659
104	14621	6141	1244	1	0,420012	0,085083
dms3-1	453	440	400	1	0,971302	0,883002
HB6	15561	9539	8725	1	0,613007	0,560697

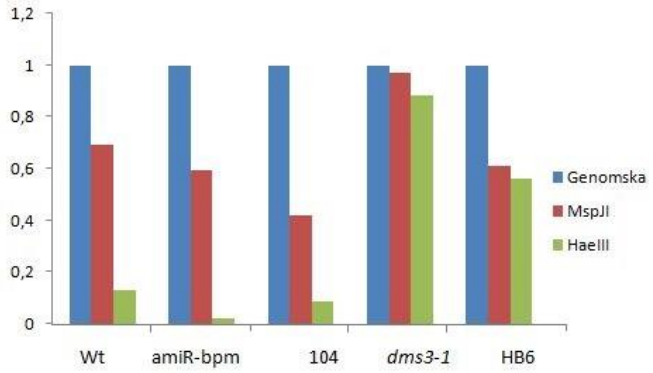
b)

Linija	Genomska	MspJI	HaeIII	% Genomske	%MspJI	% HaeIII
wt	5592	1892	197	1	0,33834	0,035229
amiR-bpm	6125	456	139	1	0,074449	0,022694
104	6428	738	84	1	0,11481	0,013068
dms3-1	9594	7690	165	1	0,801543	0,017198
cul3^{hyp}	8192	2798	86	1	0,341553	0,010498
HB6	10438	1930	453	1	0,184901	0,043399

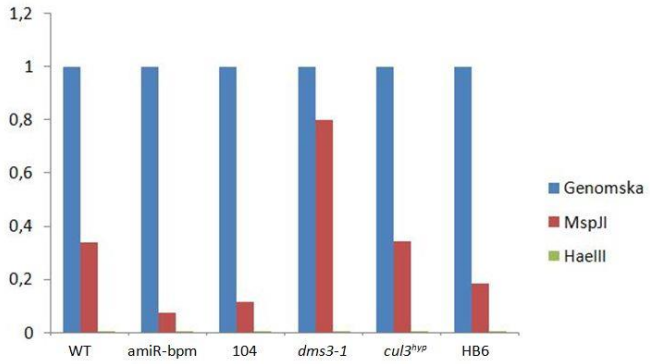
c)

Linija	Genomska	MspJI	HaeIII	% Genomske	%MspJI	% HaeIII
wt	10499	11353	6515	1	1,081341	0,620535
amiR-bpm	13295	10587	771	1	0,796314	0,057992
104	12018	7064	7457	1	0,587785	0,620486
dms3-1	14864	12983	60	1	0,873453	0,004037
cul3^{hyp}	11165	10900	7271	1	0,976265	0,651232
HB6	13866	10539	7613	1	0,760061	0,549041

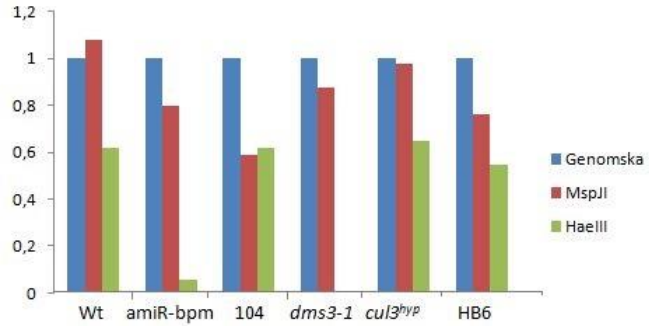
d)



e)



f)



Prilog 3. Lokus *IGN23*

Brojčane vrijednosti iz replike 1 (**a**) i replike 2 (**b**) dobivene denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu linije divljeg tipa (wt), linije u kojoj je tehnologijom RNAi poremećena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm), linije u kojoj je pojačana ekspresija gena *BPM1* (104), linije s nefunkcionalnim genom *DMS3* (*dms3-1*), linije s nefunkcionalnim proteinima CULLIN3 (*cul3^{hyp}*)i linije s pojačanom ekspresijom gena *HB6* (HB6). Vrijednosti su također izražene kao postotak u odnosu na intenzitet vrpce nepocijepane genomske DNA. **c)** Brojčane vrijednosti iz replike 2 dobivene denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci uzoraka 28. ciklusa reakcije PCR i **d)** Grafički prikaz vrijednosti dobivenih denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu za pojedine linije iz prve replike. Plavi stupac predstavlja intenzitet vrpce nepocijepane genomske DNA, crveni stupac predstavlja intenzitet vrpce genomske DNA pocijepane enzimom MspJI, a zeleni stupac enzimom HaeIII. Viši stupac predstavlja jači intezitet vrpce. **e)** Grafički prikaz vrijednosti dobivenih denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu za pojedine linije u 28. ciklusu reakcije PCR druge replike. **f)** Grafički prikaz vrijednosti dobivenih denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu za pojedine linije u 35. ciklusu reakcije PCR druge replike.

Prilog 4: Gen *Flowering locus T*

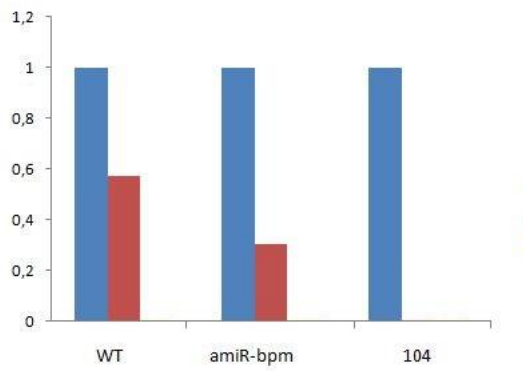
a)

Linija	Genomska	MspJI	HaeIII	% Genomske	%MspJI	% HaeIII
wt	15407	8858	1	1	0,574933	0,005
amiR-bpm	4100	1255	1	1	0,306098	0,005
104	10222	1	1	1	0,005	0,005

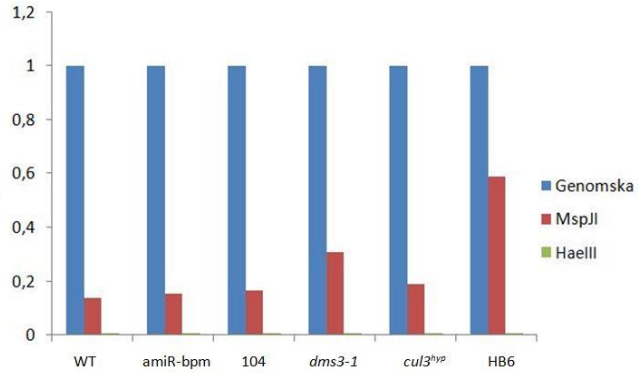
b)

Linija	Genomska	MspJI	HaeIII	% Genomske	%MspJI	% HaeIII
wt	7623	1046	1	1	0,137216	0,000131
amiR-bpm	2958	450	1	1	0,15213	0,000338
104	3777	622	1	1	0,164681	0,000265
dms3-1	4065	1259	1	1	0,309717	0,000246
cul3^{hyp}	5389	1029	1	1	0,190945	0,000186
HB6	5788	3410	1	1	0,58915	0,000173

c)



d)



Prilog 4. Gen *Flowering locus T*

Brojčane vrijednosti iz replike 1 (**a**) i replike 2 (**b**) dobivene denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu linije divljeg tipa (wt), linije u kojoj je tehnologijom RNAi poremećena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm), linije u kojoj je pojačana ekspresija gena *BPM1* (104), linije s nefunkcionalnim genom *DMS3* (*dms3-1*), linije s nefunkcionalnim proteinima CULLIN3 (*cul3^{hyp}*) i linije s pojačanom ekspresijom gena *HB6* (HB6). Vrijednosti su također izražene kao postotak u odnosu na intenzitet vrpce nepocijepane genomske DNA. **c)** i **d)** Grafički prikaz vrijednosti dobivenih denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu za pojedine linije. Plavi stupac predstavlja intenzitet vrpce nepocijepane genomske DNA, crveni stupac predstavlja intenzitet vrpce genomske DNA pocijepane enzimom MspJI, a zeleni stupac enzimom HaeIII. Viši stupac predstavlja jači intezitet vrpce. Uzorci su na agarozni gel nanošeni nakon 35. ciklusa reakcije PCR.

Prilog 5: Gen *GST11*

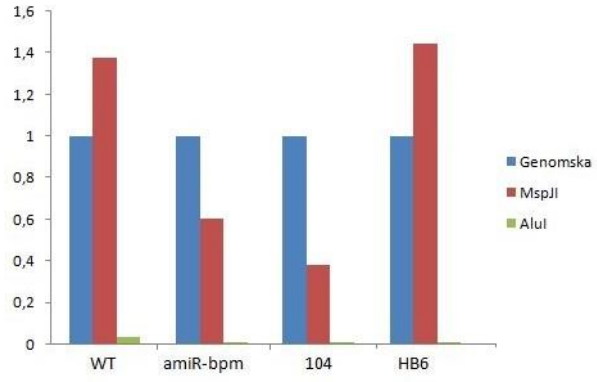
a)

Linija	Genomska	MspJI	AluI	% Genomske	%MspJI	% AluI
wt	8789	12127	317	1	1,379793	0,036068
amiR-bpm	10028	6076	1	1	0,605903	0,015
104	6946	2673	1	1	0,384826	0,015
HB6	6493	9366	1	1	1,442477	0,015

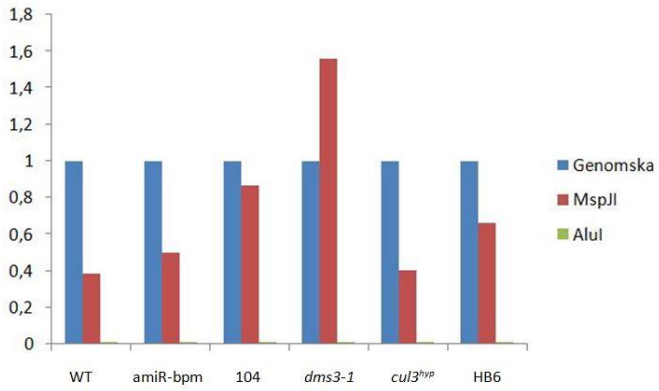
b)

Linija	Genomska	MspJI	AluI	% Genomske	%MspJI	% AluI
wt	6585	2555	1	1	0,388003	0,01
amiR-bpm	2995	1501	1	1	0,501169	0,01
104	3186	2756	1	1	0,865035	0,01
dms3-1	3616	5633	1	1	1,557799	0,01
cul3^{hyp}	3309	1341	1	1	0,405258	0,01
HB6	6638	4389	1	1	0,661193	0,01

c)



d)



Prilog 5. Gen *GST11*

Brojčane vrijednosti iz replike 1 (**a**) i replike 2 (**b**) dobivene denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu linije divljeg tipa (wt), linije u kojoj je tehnologijom RNAi poremećena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm), linije u kojoj je pojačana ekspresija gena *BPM1* (104), linije s nefunkcionalnim genom *DMS3* (*dms3-1*), linije s nefunkcionalnim proteinima CULLIN3 (*cul3^{hyp}*) i linije s pojačanom ekspresijom gena *HB6* (HB6). Vrijednosti su također izražene kao postotak u odnosu na intenzitet vrpce nepocijepane genomske DNA. **c)** i **d)** Grafički prikaz vrijednosti dobivenih denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu za pojedine linije. Plavi stupac predstavlja intenzitet vrpce nepocijepane genomske DNA, crveni stupac predstavlja intenzitet vrpce genomske DNA pocijepane enzimom MspJI, a zeleni stupac enzimom AluI. Viši stupac predstavlja jači intezitet vrpce. Uzorci su na agarozni gel nanošeni nakon 35. ciklusa reakcije PCR.

Prilog 6: Gen *AtHB6*

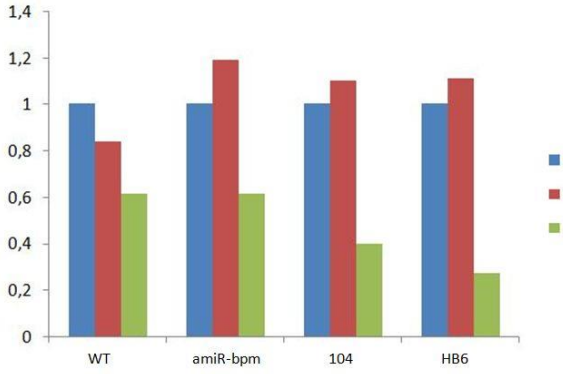
a)

Linija	Genomska	MspJI	AluI	% Genomske	%MspJI	% AluI
wt	10578	8847	6506	1	0,836358	0,61505
amiR-bpm	9481	11261	5817	1	1,187744	0,613543
104	8319	9160	3318	1	1,101094	0,398846
HB6	9047	10032	2461	1	1,108876	0,272024

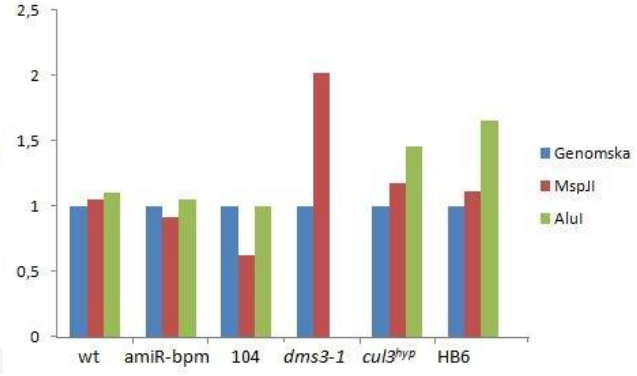
b)

Linija	Genomska	MspJI	AluI	% Genomske	%MspJI	% AluI
wt	9611	10125	10633	1	1,05348	1,106336
amiR-bpm	5475	4997	5783	1	0,912694	1,056256
104	9164	5751	9132	1	0,627564	0,996508
dms3-1	4638	9371	1	1	2,020483	0,000216
cul3^{hyp}	6615	7791	9664	1	1,177778	1,460922
HB6	6256	6973	10342	1	1,11461	1,653133

c)



d)



Prilog 6. Gen *AtHB6*

Brojčane vrijednosti iz replike 1 (**a**) i replike 2 (**b**) dobivene denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu linije divljeg tipa (wt), linije u kojoj je tehnologijom RNAi poremećena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm), linije u kojoj je pojačana ekspresija gena *BPM1* (104), linije s nefunkcionalnim genom *DMS3* (*dms3-1*), linije s nefunkcionalnim proteinima CULLIN3 (*cul3^{hyp}*)i linije s pojačanom ekspresijom gena *HB6* (HB6). Vrijednosti su također izražene kao postotak u odnosu na intenzitet vrpce nepocijepane genomske DNA. **c)** i **d)** Grafički prikaz vrijednosti dobivenih denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu za pojedine linije. Plavi stupac predstavlja intenzitet vrpce nepocijepane genomske DNA, crveni stupac predstavlja intenzitet vrpce genomske DNA pocijepane enzimom MspJI, a zeleni stupac enzimom AluI. Viši stupac predstavlja jači intezitet vrpce. Uzorci su na agarozni gel nanošeni nakon 35. ciklusa reakcije PCR.

Prilog 7: Gen *Aktin 7*

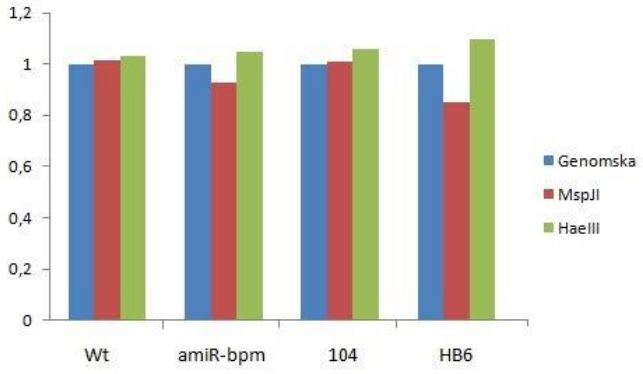
a)

Linija	Genomska	MspJI	HaeIII	% Genomske	%MspJI	% HaeIII
wt	17197	17455	17730	1	1,015003	1,030994
amiR-bpm	16471	15303	17232	1	0,929087	1,046202
104	15516	15694	16431	1	1,011472	1,058971
HB6	14314	12212	15685	1	0,853151	1,09578

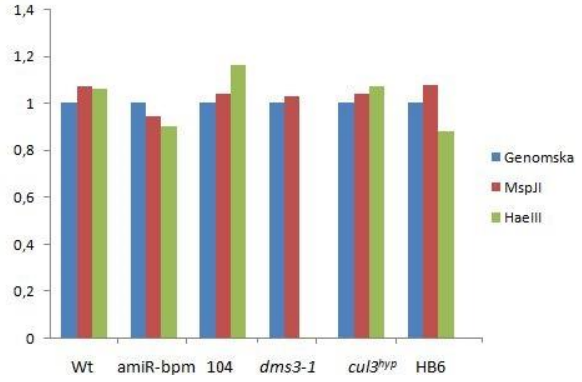
b)

Linija	Genomska	MspJI	HaeIII	% Genomske	%MspJI	% HaeIII
wt	10096	10820	10703	1	1,071712	1,060123
amiR-bpm	10282	9725	9243	1	0,945828	0,89895
104	9945	10313	11545	1	1,037004	1,160885
dms3-1	12177	12534	1	1	1,029318	0,005
cul3^{hyp}	10880	11313	11630	1	1,039798	1,068934
HB6	11024	11855	9686	1	1,075381	0,878628

c)



d)



Prilog 7. Gen *Aktin 7*

Brojčane vrijednosti iz replike 1 (**a**) i replike 2 (**b**) dobivene denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu linije divljeg tipa (wt), linije u kojoj je tehnologijom RNAi poremećena ekspresija gena *BPM* (amiR-bpm), linije u kojoj je pojačana ekspresija gena *BPM1* (104), linije s nefunkcionalnim genom *DMS3* (*dms3-1*), linije s nefunkcionalnim proteinima CULLIN3 (*cul3^{hyp}*)i linije s pojačanom ekspresijom gena *HB6* (HB6). Vrijednosti su također izražene kao postotak u odnosu na intenzitet vrpce nepocijepane genomske DNA. **c)** i **d)** Grafički prikaz vrijednosti dobivenih denzitometrijskim mjerenjem intenziteta vrpci na agaroznom gelu za pojedine linije. Plavi stupac predstavlja intenzitet vrpce nepocijepane genomske DNA, crveni stupac predstavlja intenzitet vrpce genomske DNA pocijepane enzimom MspJI, a zeleni stupac enzimom HaeIII. Viši stupac predstavlja jači intezitet vrpce. Uzorci su na agarozni gel nanošeni nakon 35. ciklusa reakcije PCR.