

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Amel Zulji

Auksin-hidrolaze: analiza i regeneracija mutanata uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.)

Diplomski rad

Zagreb 2017

Zahvaljujem se

... svojoj obitelji, koja mi je tijekom svih godina studiranja predstavljala neizmjernu podršku i motivaciju.

... svojim prijateljima i kolegama, s kojima sam sam se uvjerio da ne postoji problem kojeg studentska mudrost ne može riješiti.

... Ani koja je stvaranjem posebne atmosfere u labosu učinila svaki radni dan posebnim iskustvom.

... i iznad svega, posebno se zahvaljujem svojoj mentorici Nataši Bauer na iznimnom teorijskom i praktičnom znanju kojeg mi je pružila, na strpljenju i neizmornoj podršci, i na savjetima koji su mi pomogli učvrstiti kritičko znanstveno razmišljanje.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biljnu razvojnu biologiju Zavoda za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nataše Bauer u akademskoj godini 2015./2016. Rad je izrađen u okviru projekta “Fitohormoni u abiotskom stresu kupusnjača: mehanizam tolerancije i primjena” (PhytoBraCro), Hrvatske zaklade za znanost (broj: IP-2014-09-4359). Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Auksin-hidrolaze: analiza i regeneracija mutanata uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.)

Amel Zulji

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovom radu su opisani mehanizmi biosinteze, transporta i konjugacije indol-3-octene kiseline (IAA), kao dominantnog oblika auksina, i njen učinak na razvojne i fiziološke procese, s posebnim osvrtom na spoznaje o detaljima tih procesa kod eksperimentalne biljke *Arabidopsis thaliana*. Tehnologijom *in-fusion* sintetiziran je binarni vektor pHOV:AtILL2-GFP, te su metodom *floral dip* regenerirane transgenične biljke *A. thaliana* ekotip WS i Col-0 s pojačanom ekspresijom gena *AtILL2* i rekombinantnog gena *AtILL2-GFP*. Lokalizacija fuzijskog proteina *AtILL2-GFP*, praćena fluorescencijskom mikroskopijom, sugerira endoplazmatski retikulum kao mjesto djelovanja hidrolaze *ILL2*, što je u skladu s dosadašnjim rezultatima istraživanja. Analizirane su mutante s utišanom ekspresijom gena *AtILR1*, *AtILL2* i *AtIAR3*, te je metodama PCR-a i elektroforeze izdvojena jednostruka nul mutanta *ill2-1* u kojoj je identificirana insercijska mutacija u genu *AtILL2* koja uzrokuje pomak u okviru čitanja i sintezu krnjeg, nefunkcionalnog proteina. Metodama PCR-a i sekvenciranja izdvojene su jednostruke mutante *ilr1-1* i *iar3-2* u kojima je identificirana mutacija Gly224Glu u genu *AtIAR3* (mutanta *iar3-2*) i mutacija Gly139Asp u genu *AtILR1* (mutanta *ilr1-1*) koje uzrokuju potpuni ili djelomični gubitak funkcije hidrolaza *ILR1* i *IAR3*. Kombinacijom PCR-a, elektroforeze i sekvenciranja izdvojena je dvostruka mutanta *ill2-1/iar3-2* koja ima mutaciju Gly224Glu u genu *AtIAR3* i insercijsku mutaciju u genu *AtILL2*, i trostruka mutanta *ilr1-1/ill2-1/iar3-2* koja ima mutaciju Gly139Asp u genu *AtILR1*, insercijsku mutaciju u genu *AtILL2* i mutaciju Gly224Glu u genu *AtIAR3*. Mutante dobivene i analizirane u ovom radu dalje će se koristiti za istraživanja metabolizam IAA naročito tijekom izloženosti biljaka abiotikom stresu.

(54 stranice, 21 slika, 10 tablica, 54 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: indol-3-octena kiselina, konjugati indol-3-octene kiseline, pojačana ekspresija, *floral dip*

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Nataša Bauer

Ocjenjitelji: izv. prof. dr. sc. Nataša Bauer
doc. dr. sc. Marin Ježić
doc. dr. sc. Ivana Šola

Rad prihvaćen: 16. veljače 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation thesis

Auxin hydrolases: analysis and regeneration of *Arabidopsis thaliana* mutants

Amel Zulji

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Indole acetic acid (IAA) is the most dominant form of the naturally occurring auxin in *Arabidopsis thaliana*. Here, the mechanisms of biosynthesis, transport and conjugation of IAA in *A. thaliana* are reviewed, and mutants involved in IAA-aminoacid hydrolyze analyzed and regenerated. Binary vector pHOV:AtILL2-GFP was synthesized by using *in-fusion* technology, and transgenic *A. thaliana* plants, ecotypes WS and Col-0, with overexpression of *AtILL2* and *AtILL2-GFP* transgenes were regenerated after *floral dip* transformation. Localization of protein AtILL2-GFP, tracked by fluorescence microscopy, suggest endoplasmic reticulum as the site of action of hydrolase ILL2. Mutants with reduced expression of *AtILR1*, *AtILL2* and *AtIAR3* genes were analyzed. Using PCR and electrophoresis mutant *ill2-1* with insertional mutation in gene *AtILL2*, which causes synthesis of truncated nonfunctional protein, was confirmed. Mutants *ilr1-1* and *iar3-2* were analysed using PCR and sequencing. The mutations Gly224Glu, and Gly139Asp were confirmed in *AtIAR3* (*iar3-2* mutant) and *AtILR1* gene (*ilr1-1* mutant), respectively. The double mutant *ill2-1/iar3-2* contained mutation Gly224Glu in gene *AtIAR3* and insertional mutation in gene *AtILL2*, and the triple mutant *ilr1-1/ill2-1/iar3-2* contained mutation Gly139Asp in gene *AtILR1*, insertional mutation in gene *AtILL2* and mutation Gly224Glu in gene *AtIAR3*. All mutants will be used further to investigate IAA metabolism, especially during abiotic stress.

(54 pages, 21 figures, 10 tables, 54 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: indole-3-acetic acid, indole-3-acetic acid conjugates, overexpression, *floral dip*

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

Reviewers: Dr. sc. Nataša Bauer, Assoc. Prof.
Dr. sc. Marin Ježić, Asst. Prof.
Dr. sc. Ivana Šola, Asst. Prof

Thesis accepted: 16. February 2017.

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	Biosinteza auksina	2
1.1.1	Triptofan-ovisni mehanizam sinteze IAA	2
1.1.1.1	Put indol-3-piruvatne kiseline (IPA)	2
1.1.1.2	Put indol-3-acetonitrila (IAOx)	3
1.1.1.3	Put indol-3-acetamida (IAM)	3
1.1.1.4	Put triptamina (TAM)	4
1.1.2	Triptofan-neovisni mehanizam sinteze IAA	4
1.2	Transport IAA	5
1.2.1	Polarni transport IAA	6
1.2.2	Nepolarni transport IAA floemom	7
1.3	Fiziološki učinci auksina	9
1.3.1	Elongacija stanica i produžni rast	9
1.3.2	Fototropizam	9
1.3.3	Gravitropizam	10
1.4	Razvojni učinci auksina	11
1.4.1	Apikalna dominacija	11
1.4.2	Razvitak bočnog i adventivnog korijenja	11
1.5	Inaktivacija auksina	12
1.6	Konjugacija IAA i hidroliza njezinih konjugata	13
2	Ciljevi rada	16
3	Materijali i metode	17
3.1	Materijali	17
3.1.1	Hranljivi mediji	17
3.1.2	Oligonukleotidne početnice	18
3.1.3	Bakterije	20
3.1.3.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
3.1.3.2	<i>Escherichia coli</i>	20
3.1.4	Plazmidi	21
3.1.5	Biljke	23
3.1.6	Standard za određivanje veličine DNA	25
3.2	Metode	25
3.2.1	Sterilizacija sjemenki <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
3.2.2	Nasađivanje biljnog sjemena i uzgoj u uvjetima <i>in vitro</i>	26
3.2.3	Uzgoj biljaka u zemlji	26

3.2.4	Uzgoj bakterija na krutom mediju	27
3.2.5	Uzgoj bakterija u tekućem mediju.....	27
3.2.6	Izolacija DNA.....	27
3.2.6.1	Minipreparacija plazmidne DNA	27
3.2.6.2	Izolacije biljne genomske DNA	28
3.2.7	Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	28
3.2.8	Restriksijska analiza	29
3.2.9	Agarozna gel elektroforeza.....	30
3.2.10	Izolacija DNA iz agaroznog gela.....	31
3.2.11	Mjerenje koncentracije DNA	32
3.2.12	Kloniranje gena tehnologijom <i>In-fusion</i>	32
3.2.13	Transformacija bakterija.....	34
3.2.14	<i>Floral dip</i>	35
3.2.15	Fluorescencijska mikroskopija	36
4	Rezultati	37
4.1	Stvaranje transgeničnih biljaka <i>A.thaliana</i> ekotip WS i Col-0 s konstitutivnom ekspresijom gena <i>At ILL2</i> i fuzijskog gene <i>AtILL2-GFP</i>	37
4.1.1	Konstrukcija vektora pHOV:AtILL2-GFP	37
4.1.2	Transformacija bakterija <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
4.1.3	Transformacija i probiranje transgeničnih biljaka <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
4.1.4	Detekcija transgena <i>AtILL2</i> i <i>AtILL2-GFP</i> u transgeničnim biljkama <i>A. thaliana</i>	40
4.1.5	Detekcija fuzijskog proteina <i>AtILL2-GFP</i> u transgeničnim biljkama <i>A. thaliana</i>	41
4.2	Analiza mutanata <i>A. thaliana</i> s utišanom ekspresijom gena <i>AtILR1</i> , <i>AtILL2</i> i <i>AtIAR3</i>	41
4.2.1	Mutante gena <i>AtILR1</i>	42
4.2.2	Mutante gena <i>AtILL2</i>	43
4.2.3	Mutante gena <i>AtIAR3</i>	44
5	Rasprava	46
6	Zaključci	49
7	Literatura	50
8	Životopis	55

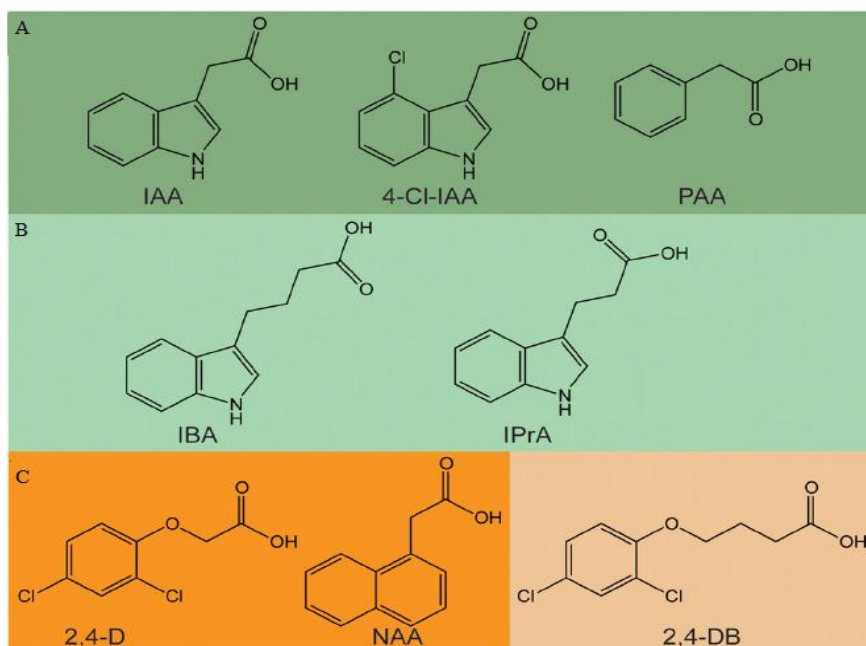
Popis kratica

2,4-D	– 2,4-diklorfenoski octena kiselina (<i>engl. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid</i>),
2,4-DB	– 4-(2,4-diklorofenoksi)maslačna kiselina (<i>engl. 4-(2,4-dichlorophenoxy)butyric acid</i>)
4-Cl-IAA	– 4-klorindol-3-octena kiselina (<i>engl. 4-chloroindole-3-acetic acid</i>)
ABA	– abscizinska kiselina
ABP	– auksin vezujući protein (<i>engl. auxin binding protein</i>)
AUX1	– auksinska permeaza (<i>engl. auxin permease</i>)
CaMV	– virus mozaika cvjetače (<i>engl. Cauliflower mosaic virus</i>)
Col-0	– ekotip Columbia
ER	– endoplazmatski retikulum
IAA	– indol-3-octena kiselina (<i>engl. indole-3-acetic acid</i>)
IAA-ak	– IAA-aminokiselina
IAlD	– indol-3-acetaldehid (<i>engl. indole-3-acetaldehyde</i>)
IAM	– indol-3-acetamid (<i>engl. indole-3-acetamide</i>)
IAN	– indol-3-acetonitril (<i>engl. indole-3-acetonitrile</i>)
IAOx	– indol-3-acetaldoksim (<i>engl. indole-3-acetaldoxime</i>)
IBA	– indol-3-maslačna kiselina (<i>engl. indole-3-butyric acid</i>)
IPA	– indol-3-piruvatna kiselina (<i>engl. indole-3-pyruvic acid</i>)
IPrA	– indol-3-propionska kiselina (<i>engl. indole-3-propionic acid</i>)
LB	– lijeva granična sekvenca (<i>engl. left border</i>),
NAA	– 1-naftalenoctena kiselina (<i>engl. 1-naphthaleneacetic acid</i>)
NIT	– nitrilaza
OxIAA	– oksiiindol-3-acetilaspargat (<i>engl. oxindole-3-acetylaspargate</i>)
PAA	– fenil octena kiselina (<i>engl. phenylacetic acid</i>)
RB	– desna granična sekvenca (<i>engl. right border</i>)
TAA1	– Triptofan aminotransferaza iz <i>Arabidopsis1</i> (<i>engl. Tryptophane Aminotransferase of Arabidopsis 1</i>)
TAM	– triptamin
TDC	– triptofan dekarboksilaza (<i>engl. Tryptophan decarboxylase</i>)
T-DNA	– (<i>engl. transfer DNA</i>)
Trp	– triptofan
WS	– ekotip Wassilewskija

1 UVOD

Prve spoznaje o auksinu kao biljnom hormonu, koje su kasnije dovele do njegovog otkrića, datiraju još iz doba kraja devetnaestog stoljeća, a proizašle su iz istraživanja ovisnosti rasta biljnih organa o smjeru upada svjetlosti (fototropizam), kojeg su provodili Charles Darwin i njegov sin Francis. Ponukani saznanjem da biljka svoj rast usmjerava prema izvoru svjetlosti, proučavali su koleoptile kanarske trave (*Phalaris canariensis*), kao najosjetljivijeg organa na svjetlo. Došli su do zaključka da se u vršku koleoptila sintetizira tvar koja ima potencijal potaknuti elongaciju stanica u području ispod samog vrška, zvanom zona rasta (Darwin i Darwin, 1880). Zbog činjenice da spomenuta tvar potiče produženi rast koleoptila, nazvana je auksin od grčke riječi auxein, što znači „povećati“ ili „rasti“.

Danas je poznato da su auksini skupina biljnih hormona koji, osim u fototropizmu, sudjeluju u gotovo svim stadijima rasta i razvoja biljaka regulirajući staničnu diobu i elongaciju, diferencijaciju, tropizme, apikalnu dominaciju, senescenciju, opadanje lišća i cvjetanje (Enders i Strader, 2015). Bitno je naglasiti da auksini nisu primarno određeni kemijskom strukturom, već predstavljaju skupinu organskih tvari koje na isti ili vrlo sličan način djeluju na biljni organizam. Stoga se auksinom definira bilo koji spoji koji može u biljaka potaknuti elongaciju stanica koleoptila i stabljike, staničnu diobu kalusa uz prisustvo citokina, te razvitak bočnog i adventivnog korijena na otkinutim listovima i stabljikama (Taiz i Zeiger, 2002). Najzastupljeniji prirodni oblik auksina koji se pojavljuje u svim biljkama je indol-3-octena kiselina (IAA), te će se dalje u radu mehanizmi djelovanja i funkcije auksina objašnjavati na primjeru IAA. Manje zastupljeni prirodni oblici auksina koji se pojavljuju u specifičnim vrstama biljaka su: 4-klorindol-3-octena kiselina (4-Cl-IAA) i feniloctena kiselina (PAA) (slika 1 A). Indol-3-maslačna kiselina (IBA) i indol-3-propionska kiselina (IPrA) su skladišteni oblici IAA i služe kao njegovi prekursori (slika 1 B). Također postoje i sintetski spojevi poput 2,4-diklorfenoksiocetene kiseline (2,4-D), 1-naftalenoctene kiseline (NAA) koji imaju auksinsku aktivnost (slika 1 C). Premda auksini nisu određeni kemijskom strukturom, sve spojeve s auksinskom aktivnosti, između ostalog, odlikuje aromatični prsten sa slabim pozitivnim nabojem, bočni ogranak koji završava karboksilnom skupinom s jakim negativnim nabojem i specifičan prostorni odnos između pozitivnog i negativnog naboja (Enders i Strader, 2015)



Slika 1. Struktura prirodnih i sintetskih auksina. A – prirodni auksini, indol-3-octena kiselina (IAA), 4-klorindol-3-octena kiselina (4-Cl-IAA), feniloctena kiselina (PAA). B – prekursori IAA koji služe za njegovo skladištenje indol-3-maslačna kiselina (IBA) i indol-3-propionska kiselina (IPrA). C – sintetski oblici auksina 2,4-diklorfenoksiocetene kiseline (2,4-D) i 1-naftalenoctena kiselina (NAA), 4-(2,4-diklorofenoksi)maslačna kiselina (2,4-DB) sintetski spremišni oblik auksina. Preuzeto i prilagođeno prema (Kasahara, 2015).

1.1 Biosinteza auksina

Iako se biosinteza auksina zbiva u gotovo svim tkivima, u malim koncentracijama, vršni meristem izdanka, mladi listovi, plodovi i sjemenke u razvoju, kao tkiva koja brzo rastu i čije stanice brzo proliferiraju, glavna su mjesta biosinteze auksina (Ljung *i ostali*, 2005). Postoje dva glavna mehanizma sinteze auksina: triptofan (Trp)-ovisni mehanizam i Trp-neovisni mehanizam (slika 2).

1.1.1 Triptofan-ovisni mehanizam sinteze IAA

Trp-ovisni mehanizam (slika 2 B) je način biosinteze u kojem je Trp glavni prekursor u sintezi IAA. Postoje četiri različita Trp-ovisna puta sinteze IAA: put indol-3-piruvatne kiseline (IPA), put triptamina (TAM), put indole-3-acetaldoksima (IAN) i put indol-3-acetamida (IAM) put (Zhao, 2010).

1.1.1.1 Put indol-3-piruvatne kiseline (IPA)

Put IPA (slika 2 B) predstavlja dominantni mehanizam sinteze IAA ovisnom o Trp i jedini je put čiji su detalji u potpunosti poznati (Zhao, 2012). Konverziju Trp do IPA, u dva koraka, kataliziraju produkti gena *TAA1* (Triptofan aminotransferaza iz *Arabidopsis1*) i

YUCCA (*YUC*). Geni *TAA1* kodiraju triptofan aminotransferaze koji kataliziraju reakciju deaminacije Trp do IPA. Geni *YUC* kodiraju monooksigenaze koje sadrže flavin i kataliziraju reakciju konverzije IPA do IAA. Prvotno se smatralo da su geni *TAA1* i *YUC* uključeni u različitim putevima sinteze IAA međutim danas je poznato da zajedno sudjeluju u putu IPA (Ljung, 2013). Kod biljke *A. thaliana* su identificirana 4 gena iz obitelji *TAA1*, *TAR1-TAR4* (Mano i Nemoto, 2012) i 11 članova obitelji gena sličnim monooksigenazama koje sadrže flavin, *YUC1-YUC11* od kojih je za YUC4 i YUC6 potvrđeno da kataliziraju reakciju pretvorbe IPA u IAA u uvjetima *in vitro* (Kasahara, 2015). Indol-3-acetaldehid (IAld) se u putu IPA spominje kao prekursor budući da neke bakterije koje koriste ovaj put sinteze IAA, koriste IAld kao prekursor za sintezu IAA (Patten i Glick, 1996). Spomenuti geni *TAA1* i *YUC* kod uročnjaka imaju značajnu ulogu u embriogenezi, cvjetanju, formiranju vaskularnog tkiva, tropizmima, klijanju i stvaranju bočnog korijenja, te se zbog toga smatra da je put IPA najznačajniji oblik sinteze IAA kod *A. thaliana* (Mashiguchi *i sur.*, 2011).

1.1.1.2 Put indol-3-acetonitrila (IAOx)

Prvi korak sinteze IAA u putu IAOx je konverzija Trp do indol-3-acetaldoksima (IAOx) (slika 2 B) koju kataliziraju citokrom P450 monooksigenaze CYP79B2 i CYP79B3. Pretpostavlja se da je ovaj put sinteze IAA ograničen samo na biljke iz porodice *Brassicaceae*, budući da su geni *CYP79B* uglavnom identificirani samo kod pripadnika te porodice (Kasahara, 2015). Tu pripada i *A. thaliana* pa se smatra da je pored puta IPA, IAOx drugi najznačajniji oblik sinteze kod uročnjaka (Zhao *i sur.*, 2002). Iz IAOx nastaje IAN koji pored što sudjeluje u stvaranju IAA sudjeluje još i u adaptaciji u uvjetima biotičkog stresa (Ljung, 2013). Detalji reakcije konverzije IAN u IAA nisu poznati, međutim smatra se da kod *A. thaliana*, tu reakciju katalizira nitrilaza (NIT) (Normanly *i sur.*, 1997).

1.1.1.3 Put indol-3-acetamida (IAM)

Put IAM (slika 2 B) je način sinteze IAA karakterističan samo za bakterije (Mano i Nemoto, 2012). Za proizvodnju IAA kod bakterija nužan je gen *iaaM* koji kodira triptofan 2-monooksigenazu i gen *iaaH* koji kodira indol-3-acetamid hidrolazu. Enzim *iaaM* katalizira reakciju konverzije Trp u IAM a zatim enzim *iaaH* katalizira pretvorbu IAM u IAA (Patten i Glick, 1996). Sintetizirani auksin bakterije koriste za morfološke promjene organizma domaćina u kojemu se nalaze. Postoje indicije da IAM put postoji i kod biljaka, naime kod *Arabidopsis thaliana* je identificirana amidaza 1 (AMI1) koje može konvertirati IAM u IAA u uvjetima *in vitro*. No, ne postoje izravni dokazi za fiziološki značaj i biološku aktivnost AMI1

u uvjetima *in vivo*, stoga se IAM put za sada navodi kao specifičan samo za bakterije (Kasahara, 2015)

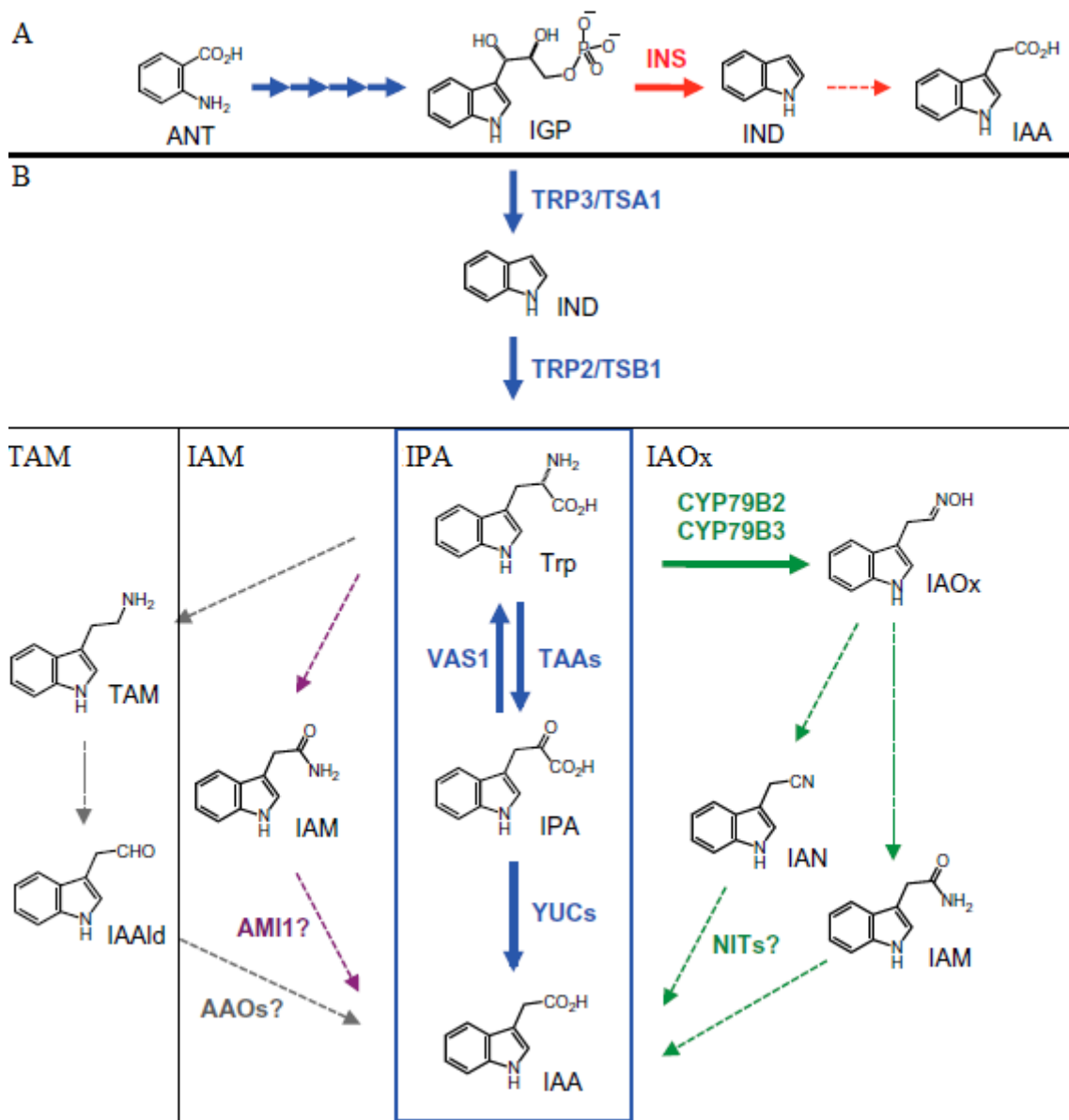
1.1.1.4 Put triptamina (TAM)

Smatra se da konverziju Trp do TAM (slika 2 B 1) katalizira triptofan dekarboksilaza TDC, međutim to nije potvrđeno u uvjetima *in vivo*. Dalje reakcije pretvorbe TAM do IAA su vrlo slične kao u putu IPA. Razina TAM kod biljke *A. thaliana* je relativno niska u odnosu na razinu IAA ili Trp, pa je moguće da put TAM nema značajnu ulogu u sintezi IAA kod *A.thaliana* (Ljung, 2013).

1.1.2 Triptofan-neovisni mehanizam sinteze IAA

Triptofan-neovisni mehanizam je mehanizam sinteze IAA u kojem se, umjesto trp, koriste drugi prekursori za sintezu IAA. Otkriće ovog mehanizma je usko povezano s mutantima *orp*, auksotrofnim mutantama kukuruza kojima nedostaju funkcionalni enzimi za sintezu trp. Unatoč tome imaju 50 puta veću koncentraciju IAA u odnosu na divlji tip (Scott *i sur.*, 1990) što sugerira postojanje alternativnog puta sinteze IAA neovisnog o trp. Uzgajanjem mutanata na podlozi s [¹⁵N]antranilat, te praćenjem dušikovog izotopa ustanovljeno je da se on ugrađuje u krajnji produkt IAA ali ne i trp (Taiz i Zeiger, 2002). Izostanak ugradnje dušikovog izotopa ¹⁵N u trp, sugerira da mutante nisu iskoristile [¹⁵N]antranilat za sintezu trp koji će poslužiti kao prekursor za sintezu IAA, već su ga izravno koristile za sintezu IAA, što potvrđuje postojanje alternativnog mehanizma sinteze IAA neovisnog o trp. Za sada se zna da su prekursori za sintezu IAA, mehanizmom neovisnom o trp, indol i indol-3-glicerol fosfat, međutim detalji o čitavom mehanizmu i dalje ostaju nepoznati.

Iako postoje dokazi da se npr. kod mrkve tijekom rane embriogeneze IAA sintetizira trp-neovisnim mehanizmom, dok se trp-ovisnim mehanizmom sintetizira IAA tek nakon uspostave apikalno-bazalne osi, točna povezanost između ova dva mehanizma i dalje se ne zna (Michalczuk *i sur.*, 1992). Međutim postojanje velikog broja načina sinteze IAA je svakako adaptacija biljke da u svakom trenu osigura dovoljnu količinu IAA, što je ujedno i pokazatelj da je IAA jedan od najbitnijih biljnih hormona.



Slika 2. Shematski prikaz sinteze auksina. A – sinteza auksina neovisna o Trp. B – sinteza auksina ovisna o Trp koja uključuje četiri različita puta, TAM, IAM, IPA i put IAOx. Put IPA jedini je potpuno okarakterizirani put sinteze IAA. Put IAOx je specifičan za porodicu biljaka *Brassicaceae* a prikazani mehanizam se odnosi na biljku *A. thaliana*. Punim strelicama su označene reakcije u kojim su okarakterizirani enzimi koji ih kataliziraju. Isprekidanim strelicama su označene reakcije za koje se ne zna kojim enzimima su katalizirane. Preuzeto i prilagođeno prema (Kasahara, 2015).

1.2 Transport IAA

Postojanje koncentracijskog gradijenta IAA duž apikalno-bazalne osi je nužno za odvijanje razvojnih procesa, elongaciju stanica, apikalnu dominaciju, zacjeljivanje rana, senescenciju, itd. Stoga se IAA iz vršnih meristema izdanka, glavnog mjesta njegove sinteze, transportira do korijena. Transport IAA, odvija se na dva načina: polarni transport i nepolarni transport floemom.

1.2.1 Polarni transport IAA

Polarni transport predstavlja usmjereno, bazipetalno kretanje u kojemu se IAA duž stanica prenosi od mjesta njegove sinteze (vršni meristem izdanka) prema bazalnim dijelovima biljke (korijen), uspostavljajući koncentracijski gradijent. Među biljnim hormonima ovakav oblik transporta je karakterističan samo za auksin. Za ovakvo bazipetalno kretanje IAA je potrebna energija te je neovisno o gravitaciji.

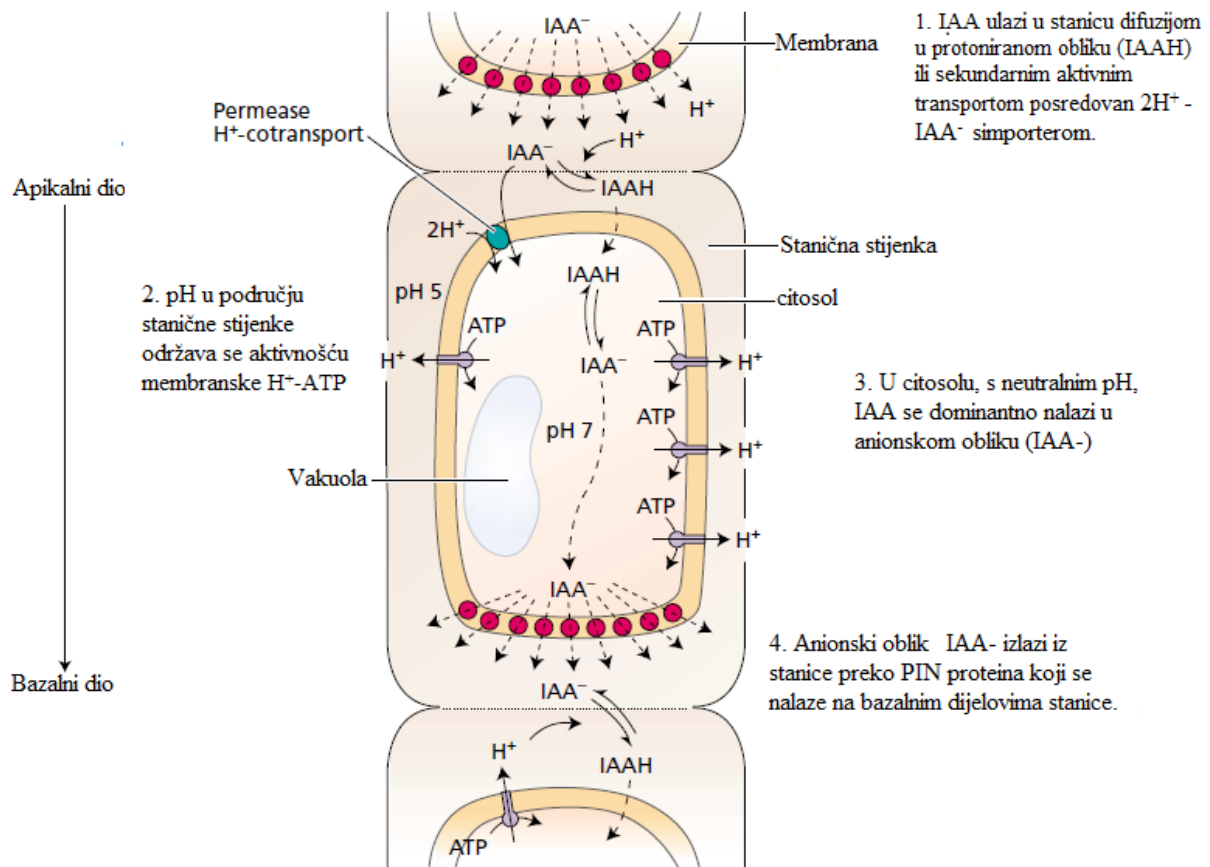
Polarni transport se temelji na kemiosmotskom modelu, i na postojanju specifičnih proteinskih nosača isključivo na bazalnim dijelovima stanice kojima se IAA prenosi, a bez kojih polarni transport ne bi bio moguć. Za razumijevanje samog mehanizma bitno je naglasiti procese koji se zbivaju tijekom ulaska i izlaska IAA iz stanice te da oni uvelike ovise o pH.

Ulazak IAA u stanicu je prvi korak polarnog transporta i prema kemiosmotskom modelu auksin ulazi u stanicu na dva različita načina.

Prvi način prijenosa je difuzijom. S obzirom da pK za IAA iznosi 4,75 te da je pH u području stanične stjenke 5, onda je kod tog pH otprilike polovica IAA protonirano (IAAH) te u takvom, nenabijenom obliku može prolaziti kroz staničnu membranu, kretati se niz koncentracijski gradijent i ulaziti u stanicu (citosol). Međutim, preostala polovica IAA je u disociranom obliku (IAA⁻) te u takvom, ionskom obliku ne može prolaziti kroz nepolarni fosfolipidni membranski dvosloj, te se u stanicu prenosi aktivnim transportom. Aktivni transport je način prijenosa disociranog oblika auksina (IAA⁻) u stanicu pomoću specifičnog 2H⁺-IAA⁻ simportera, koji uz utrošak energije unosi IAA⁻ i to uz koncentracijski gradijent, pritom prebacujući još dva vodikova iona unutar stanice (slika 3).

Izlazak IAA iz stanice. Nakon što IAA uđe u stanicu (citosol), u kojem je pH 7,2, gotovo sav prisutan IAA je u disociranom obliku, te kao takav ne može prolaziti kroz membranu i dolazi do njegove akumulacije u citosolu. Međutim, gore spomenuti proteinski nosači nalaze se na bazalnom dijelu membrane i omogućavaju izlaz disociranog oblika IAA⁻ iz stanice. Takvi nosači su proteini PIN i osnova su polarnog transporta auksina (Křeček *i sur.*, 2009). Ulazak IAA u stanicu difuzijom ili aktivnim transportom, njihov izlazak posredovan specifičnim nosačima, proteinima PIN, koji se nalaze isključivo na bazalnom dijelu membrane omogućava polarno kretanje IAA, neovisno o gravitaciji (slika 3).

S obzirom da su vršni meristemi izdanka glavna mjesta sinteze IAA, te da se koncentracijski gradijent auksina uspostavlja duž apikalno-bazalne osi, s njegovim maksimumom u vršnom meristemu i minimumom u korijenu, dugo se smatralo da je polarni transport jedini



Slika 3. Shematski prikaz kemiosmotskog modela kojim se objašnjava polarni transport. Slika prikazuje glavne procese u stanici tijekom polarnog transporta auksina od apikalnog prema bazalnom dijelu biljke Preuzeto i prilagođeno prema (Taiz i Zeiger, 2002).

način prijenosa IAA. Međutim, danas se zna da postoji alternativni način prijenosa IAA, koji se odvija puno većom brzinom i na znatno veće udaljenosti nego polarni transport.

1.2.2 Napolarni transport IAA floemom

Većina IAA koja se sintetizira u listovima, do ostatka biljke se prenosi napolarnim transportom floemom. IAA se zajedno s ostalim asimilatima floemom prenosi do udaljenih dijelova biljke, puno većom brzinom i na znatno veće udaljenosti nego polarnim transportom. Ovakav prijenos IAA na velike udaljenosti je iznimno važan za diobu stanica kambija, nakupljanje i/ili uklanjanje kaloze iz sitastih cijevi floema i grananje korijena (Swarup i suri, 2001).

Sprega između polarnog i napolarnog transporta nedvojbeno postoji, i dokazana je u pokusima koji su rađeni na uročnjaku (Swarup i suri, 2001). Naime, utvrđeno je da su permeaze AUX1 asimetrično lokalizirane na apikalnim (vršnim) dijelovima stanica protofloema (najraniji stadij floema formiran iz prokambija). IAA koji se prenosi floemom, dolazi do protofloema u razvojnom dijelu korijena. U stanicama protofloema kreće njegov polarni transport zahvaljujući asimetričnoj lokalizaciji permeaza AUX1 (Taiz i Zeiger, 2002). Time se postiže polarni

transport, u ovom slučaju akropetalno (od bazalnog dijela biljke prema vršnim dijelovima korijena). Ovo istraživanje je potvrdilo postojanje sprege između polarnog i nepolarnog oblika transporta, u kojem nepolarni oblik transporta služi kao nespecifični dotok IAA, nakon čega IAA biva transportirana polarnim putem, te se specifično doprema na mjesta na kojima će potaknuti specifične fiziološke i razvojne procese.

1.3 Fiziološki učinci auksina

1.3.1 Elongacija stanica i produžni rast

Jedan od glavnih učinaka IAA je elongacija stanica i produžni rast. Uzgojem koleoptila u mediju s IAA opaža se znatno veći rast u odnosu na mediji bez auksina. Također je poznato da je nužna optimalna koncentracija IAA za odgovarajuće učinke. Npr. optimalna koncentracija za elongaciju stanica koleoptila je 10^{-6} - 10^{-5} M, veća koncentracija djeluje inhibitorno i sprječava elongaciju stanica. Nadalje, optimalna koncentracija za elongaciju stanica je tkivno specifična, stoga specifična koncentracija koja potiče elongaciju stanica koleoptila ujedno inhibira elongaciju stanica korijena (Taiz i Zeiger, 2002). Međutim, da bi se objasnio mehanizam kojim IAA omogućava elongaciju stanica i produžni rast, potrebno je spomenuti procese koji prethode elongaciji stanica. Naime, elongacija stanica se zbiva u tri koraka. Najprije dolazi do ulaska vode u stanicu uslijed razlike u vodnom potencijalu. Posljedično se povećava turgor, nakon čega slijedi slabljenje stanične stijenke čime se omogućava ekspanzija stanica zbog prethodno povećanog turgora. Opće prihvaćena teorija kiselog rasta smatra da IAA djeluje na posljednji korak tj. na slabljenje stanične stijenke. Taj učinak postiže povećanjem aktivnosti i broja samih membranskih H^+ -ATP crpki, koje uz utrošak energije u obliku ATP-a, prenose H^+ iz citosola u međustanični prostor, što dovodi do zakiseljavanja i slabljenja stanične stijenke (Taiz i Zeiger, 2002).

Aktivacija H^+ -ATP crpke. Aktivaciju crpke IAA postiže neizravno, preko adaptorskih proteina. Istraživanje rađeno na proteinu ABP57 (auxin binding protein) je potvrdilo da se preko spomenutog proteina postiže povećana aktivnost samo u prisutnosti IAA (Kim *i sur.*, 2001). Ukoliko IAA nije prisutana, ne dolazi do konformacijske promjene proteina ABP57 koja je nužna za aktivaciju H^+ -ATP crpke. Još jedan mogući način djelovanja IAA na produžni rast je, smatra se, povećana sinteza samih H^+ -ATP crpki, čime se u kombinaciji s povećanom aktivnosti crpke postiže sinergistički učinak.

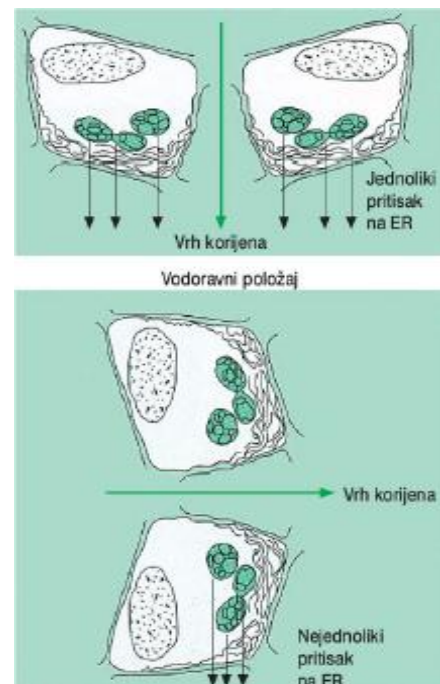
1.3.2 Fototropizam

Fototropizam predstavlja usmjereni rast potaknut jednosmjernom osvjetljenošću. Ako je rast usmjeren prema izvoru svjetlosti što je slučaj s izdancima, radi se o pozitivnom fototropizmu, ako je pak rast usmjeren od izvora svjetlosti, što je slučaj s korijenom, radi se o negativnom fototropizmu. Naime, uslijed jednosmjernog osvjetljenja npr. koleoptila, dolazi do elongacije stanica samo na neosvjetljenoj strani, te se rast usmjerava prema izvoru svjetla, kako bi se svjetlost što bolje iskoristila u svrhu fotosinteze. Na molekularnoj razini fototropizam je

posljedica svjetlom potaknute sinteze IAA u vršku, i njegovog lateralnog transporta u smjeru neosvijetljenog dijela biljke (Christie, 2007). Za takav lateralni transport su odgovorni flavoproteini, fototropin 1 i 2. To su autofosforilirajuće kinaze ovisne o svjetlu. Na osvijetljenoj strani dolazi do, svjetlom inducirane, autofosforilacije i aktivacije kinazne domene fototropina, čime se stvara gradijent aktivnih fototropina na osvijetljenom dijelu biljke. Aktivirani fototropini na tom dijelu, nizom fosforilacija utječu na relokalizaciju PIN proteina i na njihovo dovođenje u takav položaj da se polarni transport lateralno usmjeri prema neosvijetljenom dijelu biljke (Blakeslee *i sur.*, 2004). Jednom kada IAA dođe na neosvijetljeni dio biljke, gdje fototropini nisu aktivni i gdje je lokalizacija PIN proteina na bazalnom dijelu stanice, kreće normalni bazopetalni polarni transport IAA prema dijelu zvanom zona rasta. U tom dijelu stimulira elongaciju stanica (vidi poglavlje 1.3.1) i dolazi do produžnog rasta samo neosvijetljenog dijela, što dovodi do „savijanja“ i usmjerenog rasta biljke prema jednosmjernom izvoru svjetlosti.

1.3.3 Gravitropizam

Gravitropizam predstavlja usmjereni rast i kretanje biljke ovisno o smjeru djelovanja gravitacijske sile. Kod izdanka uočava se negativni gravitropizam, dok se kod korijena izražava pozitivni gravitropizam. Za razliku od fototropizma, gdje osvjetljenje samo jednog dijela biljke dovodi do asimetrične raspodjele auksina, kod gravitropizma gravitacijska sila je jednaka na svim dijelovima organa bez obzira na njihovu orijentaciju. Stoga, jedini način da se percipira smjer djelovanja gravitacijske sile je percepcija kretanja gušćih tijela i njihove relokalizacije do kojih dolazi uslijed djelovanja gravitacijske sile prilikom promjene položaja određenog organa. Amiloplasti čija je gustoća veća od gustoće citoplazme, su organeli pomoću kojih biljka percipira smjer djelovanja gravitacije i nazivaju se statoliti. Stanice u kojima se statoliti nalaze se pak nazivaju statociste. Budući da su statoliti gušći od ostatka citoplazme uslijed djelovanja gravitacijske sile oni uvijek sedimentiraju na dno stanice. Ukoliko se biljka postavi u horizontalni položaj, dolazi do



Slika 4. Percepcija gravitacije statocistama. Slika prikazuje promjene koje se dešavaju tijekom promjene položaja organa iz okomitog u horizontalni. Kad je stanica u okomitom položaju statoliti vrše jednolični pritisak na ER, prilikom prelaska u horizontalni položaj dolazi do relokalizacije statolita i pritisak na ER više nije jednoličan što predstavlja informaciju za asimetričnu raspodjelu IAA.

kretanja statolita, i njihovog sedimentiranja na drugi dio stanice. Upravo to kretanje i sedimentiranje predstavlja signal za asimetričnu raspodjelu IAA, i samim tim prodženi rast u određenom smjeru. Postoje dvojbe oko načina na koji statoliti svojim premještanjem dovode do asimetrične raspodjele auksina. Zasad postoje dva modela, prvi model pretpostavlja da kada se biljka nalazi u okomitom položaju, statoliti jednakom silom djeluju na endoplazmatski retikulum (ER), ukoliko se biljka pomakne iz okomitog položaja dolazi do relokalizacije statolita i time sila kojom statoliti djeluju na ER više nije jednolična, i upravo je to signal koji dovodi do asimetrične raspodjele auksina i produžnog rasta u određenom smjeru (Taiz i Zeiger, 2002) (slika 4). Drugi model pretpostavlja da samo kretanje statolita uslijed promjene položaja, narušava postojeću citoskeletnu mrežu u stanici i to ustvari predstavlja signal za asimetričnu raspodjelu IAA (Yoder, 2001).

1.4 Razvojni učinci auksina

Pored brojnih fizioloških učinaka i njegove povezanosti s produžnim rastom, IAA i njeno prisustvo odnosno odsustvo, povezano je i s brojnim razvojnim procesima. Tako su razvojni procesi kao što su: apikalna dominacija, razvitak bočnog i adventivnog korijenja, razvoj provodnog tkiva i plodova također pod kontrolom IAA.

1.4.1 Apikalna dominacija

Apikalna dominacija, koja je prisutna kod gotovo svih viših biljaka, je pojava u kojoj vršni pup, u većoj ili manjoj mjeri, inhibira bočne pupove i razvoj bočnih izdanaka iz njih. Uklanjanje vršnog pupa dovodi do razvoja bočnih izdanaka. Budući da je vršni pup mjesto u izdanku u kojem se u najvećoj mjeri sintetizira IAA, dugo se smatralo da je IAA izravno povezan s inhibicijom rasta bočnih izdanaka. Međutim kasnija istraživanja su pokazala da se nakon uklanjanja vršnog pupa u bočnim pupovima koncentracija IAA povećava (Gocal *i sur.*, 1991), čime se potvrdilo da IAA nema izravan učinak na inhibiciju bočnih pupova i razvoj bočnih izdanaka. Potvrđivanjem da se nakon uklanjanja vršnog pupa povećava koncentracija citokina i smanjuje koncentracija apscizinske kiseline (ABA), dokazuje se da IAA nema izravni učinak s inhibicijom bočnih pupova, te da postoji sprega između IAA, citokina i ABA-e koja regulira razvoj bočnih izdanaka (Taiz i Zeiger, 2002).

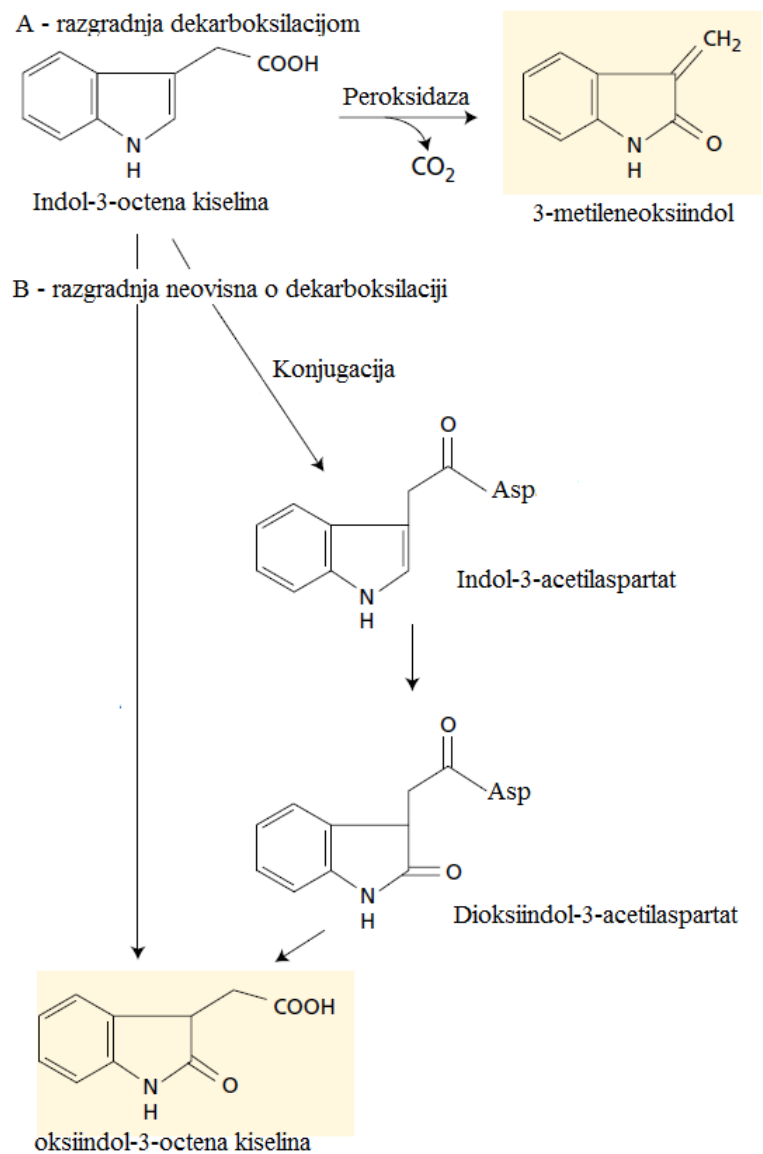
1.4.2 Razvitak bočnog i adventivnog korijenja

Koncentracija IAA veća od 10^{-8} M inhibira rast korijena, no rast bočnog i adventivnog korijenja je potaknut visokom koncentracijom IAA. Bočno korijenje se razvija iznad područja

korijenovih dlačica iz skupine stanica pericikla. IAA stimulira diobu tih stanica i razvija se bočno korijenje. Adventivni korijen se pak razvija na različitim mjestima iz skupine diferenciranih stanica. Takve stanice moraju ponovno steći sposobnost za staničnu diobu kako bi nizom mitozata stvorile adventivno korijenje. Za povratak sposobnosti stanične diobe upravo je potrebna IAA (Taiz i Zeiger, 2002).

1.5 Inaktivacija auksina

Poznato je da je optimalna koncentracija IAA tkivno specifična, te da koncentracija koja potiče rast jednog organa može inhibirati rast drugog organa (Taiz i Zeiger, 2002). Stoga za normalnu homeostazu IAA, potrebno je razinu IAA držati optimalnom te se određena količina sintetizirane IAA mora inaktivirati. Jedan od načina inaktivacije IAA je njegova razgradnja. Dugo se smatralo da su peroksidaze glavni enzimi koji su uključeni u proces razgradnje auksina (slika 5 A), međutim istraživanja u kojima se manipuliralo genima za peroksidaze su pokazala da deseterostruko povećanje ili smanjenje koncentracije peroksidaza nema utjecaj na razinu IAA u eksperimentalnim biljkama (Normanly *i sur.*, 1995). Danas je poznato da postoje dva različita puta



Slika 5 Mehanizmi razgradnje auksina. A – razgradnja auksina peroksidazama. B, 1 – razgradnja auksina do konačnog produkta OxIAA bez prethodne dekarboksilacije. B, 2 razgradnja auksina kojoj prethodi konjugiranje auksina s Aspartatom nakon čega slijedi oksidacija naprije do dioksiindol-3-acetilaspertat a zatim od konačnog produkta OxIAA. Preuzeto i prilagođeno prema (taiz i Zeiger, 2010)

oksidativne razgradnje (slika 5 B), koji predstavljaju dominantne mehanizme degradacije IAA (Novák *i sur.*, 2012). Krajnji produkt u oba puta oksidativne degradacije je oksiindol-3-acetilaspargat (OxIAA). U jednom putu IAA se, bez dekarboksilacije, oksidira do OxIAA (slika 5 B), dok u drugom putu dolazi do konjugacije IAA s Asp nakon čega slijedi oksidacija najprije do međuprodukta dioksiindol-3-acetilaspargata a zatim do krajnjeg produkta oksidacije, OxIAA.

1.6 Konjugacija IAA i hidroliza njezinih konjugata

Kod biljaka se u prosjeku 25 % IAA nalazi u slobodnom obliku (Ludwig-Müller, 2011), dok se ostatak veže s različitim spojevima, odnosno konjugira se. Konjugati auksina se dijele na (i) konjugate male molekulske mase koji nastaju vezivanjem sa šećerima, stvaranjem esterske veze, (ii) konjugate male molekulske mase koji se stvaranjem amidne veze vežu s aminokiselinama i (iii) konjugate velike molekulske mase koji nastaju također stvaranjem amidne veze a vežu se s polipeptidima (Bajguz i Piotrowska, 2009). Uloga konjugacije IAA je višestruka i događa se prilikom degradacije, skladištenja, transporta, kompartmentalizacije i zaštiti auksina od oksidativne razgradnje (Kasahara, 2015)

Biljka *A. thaliana* koja je korištena u ovom radu, sadrži samo 1 % IAA u slobodnom obliku, oko 10 % IAA se stvaranjem esterske veze konjugira sa šećerima, dok se oko 90 % IAA stvaranjem amidne veze konjugira s aminokiselinama i/ili polipeptidima (Tam *i sur.*, 2000). Što se tiče konjugata sa šećerima kod biljke *A. thaliana* potvrđeno je postojanje konjugata IAA-glukoza (Tam *i sur.*, 2000), a stvaranje esterske veze između IAA i glukoze katalizirano je enzimom UDP-glukoza transferazom (Ludwig-Müller, 2011). Postoje indicije da je konjugacija IAA s glukozom reverzibilan proces (Kowalczyk *i sur.*, 2003) te da služi za privremenu inaktivaciju IAA i njeno skladištenje. Od konjugata koji nastaju stvaranjem peptidne veze, kod *A. thaliana*, identificirani su uglavnom konjugati male molekulske mase odnosno IAA-aminokiselina (IAA-ak) konjugati, IAA-Leu, IAA-Ala, IAA-Asp, IAA-Glu i IAA-Trp čije je postojanje potvrđeno (Kasahara, 2015), i konjugati IAA-Val i IAA-Phe, čije je postojanje pretpostavljeno na temelju identifikacije oksidativnih metabolita 6-OH-IAA-Val i 6-OH-IAA-Phe (Ludwig-Müller, 2011).

Reakcije konjugacije IAA s aminokiselinama katalizirane su enzimima članovima obitelji GH3 (Gretchen Hagen³). Obitelj gena *GH3* se kod *A. thaliana* sastoji od 19 članova od kojih je za najmanje sedam potvrđeno da kataliziraju reakcije konjugacije IAA s aminokiselinama (Staswick *i sur.*, 2005).

U pokušaju da se istraži potencijalna uloga IAA-ak konjugata, stvorene su mutante čiji korijen naknadno gubi osjetljivost na pojedine IAA-ak konjugate, te su tom prilikom otkriveni enzimi IAA-ak konjugat hidrolaze (Bartel, 1995) koji kataliziraju reakciju hidrolize amidne veze i oslobađanje IAA. IAA-ak konjugat hidrolaze su kodirane genima obitelji M20 peptidaza (Ludwig-Müller, 2011), a proces konjugacije IAA je reverzibilan, te slijede istraživanja koja će dovesti do razumijevanja nastanka i degradacije IAA-ak konjugata kao i detaljnijeg razmatranja njihove funkcije.

Činjenica da uzgojem *A. thaliana* u mediju s visokom koncentracijom slobodnog IAA dolazi do nakupljanja IAA-Asp i IAA-Glu (Barratt *i sur.*, 1999) i da IAA-Asp i IAA-Glu egzogenom primjenom ne mogu inhibirati rast korijena (LeClere *i sur.*, 2002), sugerira da konjugati IAA-Asp i IAA-Glu nisu biološki aktivni i da sudjeluju u razgradnji IAA, gdje Asp i Glu konjugacijom trajno inaktiviraju IAA usmjeravajući ju u oksidativni put razgradnje IAA (vidi 1.5 Inaktivacija auksina). S druge strane uzgojem uročnjaka na mediju bogatom slobodnom IAA ne dolazi do nakupljanja konjugata IAA-Ala i IAA-Leu (Ostin *i sur.*, 1998) a njihova egzogena primjena može inhibirati rast korijena (LeClere *i sur.*, 2002). Stoga, može se zaključiti da konjugati IAA-Ala i IAA-Leu posjeduju biološku aktivnost te da sudjeluju u skladištenju IAA. Konjugacijom Ala i Leu s IAA stvara se zaliha, privremeno inaktiviranog, IAA-ak konjugata koji se u svakom trenutku može hidrolizirati IAA-ak konjugat hidrolazama i poslužiti kao izvor aktivnog IAA za potrebe razvojnih i fizioloških procese ili pak u uvjetima stresa. Konjugat IAA-Trp djeluje kao inhibitor rasta induciranog auksinom (Staswick, 2009).

Kod *A. thaliana* identificirano je sedam gena *ILR1*, *ILL1*, *ILL2*, *ILL3*, *IAR3* (*ILL4*), *ILL5* i *ILL6* koji kodiraju za IAA-ak konjugat hidrolaze (Sanchez Carranza *i sur.*, 2016). Gen *ILR1* (IAA-Leu resistant) otkriven je kod mutanata koji gube osjetljivost na konjugat IAA-Leu. Gen *IAR3* (IAA-Ala resistant) otkriven je kod mutanta koji gube osjetljivost na IAA-Ala. Geni *ILL* (*ILR1* like) su otkriveni tijekom analize genoma *A. thaliana* kao geni s DNA sekvencom vrlo sličnom genu *ILR1* (Rampey *i sur.*, 2004). Od svih sedam, samo hidrolaze *ILR1*, *ILL2* i *IAR3* kataliziraju hidrolizu u uvjetima *in vitro*, pri koncentracijama konjugata koji su od fiziološkog značaja (LeClere *i sur.*, 2002), stoga će predmet istraživanja u ovom radu biti hidrolaze *ILR1*, *ILL2* i *IAR3*. Geni *ILL3* i *ILL6* kodiraju hidrolaze koje ne kataliziraju hidrolizu IAA-ak konjugata u uvjetima *in-vitro*, a gen *ILL5* je pseudogen koji je prisutan u *A.thaliana* ekotipa Col-0 (Rampey *i sur.*, 2004). Hidrolaze *ILR1* i *IAR3* su međusobno slične 46 %, dok hidrolaza *ILL2* dijeli ≈57 % sličnosti s *IAR3* (LeClere *i sur.*, 2002). Dolje opisana svojstva hidrolaza se odnose na *A. thaliana* ekotip WS.

Hidrolaza ILR1, čiji su supstrati IAA-Leu i IAA-Phe (Sanchez Carranza *i sur.*, 2016), se eksprimira u centralnim dijelovima kotiledona i hipokotila, u radikuli (klicin korijen) zrelog embrija i u klijancima starim jedan dan (Rampey *i sur.*, 2004), što upućuje na značaj hidrolaze ILR1 u oslobađanju IAA potrebnog za procese klijanja. Analiza jednostrukih, dvostrukih i trostrukih mutanta uročnjaka, pokazala je da je hidrolaza ILR1 jedina potrebna za hidrolizu IAA-Leu u hipokotilu te da, pored hidrolaze IAR3, sudjeluje u hidrolizi IAA-Leu u korijenu pritom pokazujući veći afinitet za IAA-Leu od hidrolaze IAR3 (Rampey *i sur.*, 2004). Što se tiče konjugata IAA-Phe, njegova endogena prisutnost nije potvrđena, ali hidrolaza ILR1 uspješno hidrolizira egzogeno aplicirani konjugat IAA-Phe u korijenu i hipokotilu, pritom pokazujući najveći afinitet za IAA-Phe od svih hidrolaza. (Rampey *i sur.*, 2004)

Hidrolaza ILL2, koja ima najveći afinitet za IAA-Ala, i znatno manji za IAA-Phe (Sanchez Carranza *i sur.*, 2016), se eksprimira u distalnim dijelovima kotiledona i listova klijanca a posebice u hidatodama listova zrelih biljaka, što sugerira zajedničku aktivnost hidrolaza ILR1 i ILL2 u procesima klijanja (Rampey *i sur.*, 2004). Jednostruka mutanta *ill2-1* je jednako osjetljiva na egzogeno primjenjene konjugate kao i divlji tip, što sugerira da hidrolaze ILR1 i IAR3 nadomještaju nedostatak hidrolaze ILL2 (Rampey *i sur.*, 2004).

Hidrolaza IAR3, s najvećim afinitetom prema IAA-Ala i IAA-Leu (Sanchez Carranza *i sur.*, 2016), se eksprimira u osam dana starim kotiledonima i korijenu kao i u razvijenim listovima, i to se prvenstveno uočava u provodnom tkivu upućujući na njenu ulogu u hidrolizi konjugata u tom tkivu i u oslobađanju IAA potrebne za rast i oblikovanje provodnog tkiva (Rampey *i sur.*, 2004). Analizom dvostruke i trostruke mutante pokazalo se da je hidrolaza IAR3 bitna za hidrolizu IAA-Ala u korijenu te da djelomično hidrolizira IAA-Leu i IAA-Phe u odsustvu hidrolaze ILR1 (Rampey *i sur.*, 2004).

2 Ciljevi rada

Cilj ovog rada je regenerirati transgenične biljke *A.thaliana* ekotip WS i Col-0, s pojačanom ekspresijom gena *AtILL2* i rekombinantnog gena *AtILL2-GFP*.

Drugi cilj je da se iz dostupnih biljaka koje imaju mutirane gene *ILR1*, *ILL2* i *IAR3* izdvoje homozigotne mutante koji su nosioci bialelnih mutacije spomenutih gena.

Specifični ciljevi:

1. Sintetizirati binarni vektor pHOV:AtILL2-GFP pogodan za transformaciju *A.thaliana* u kojem će rekombinantni gen *AtILL2-GFP* biti pod kontrolom jakog konstitutivnog promotora 35S.
2. Transformirati biljke *A.thaliana* ekotipa WS i Col i regenerirati transgenične biljke s pojačanom, konstitutivnom ekspresijom gena *AtILL2* te mutante s pojačanom ekspresijom rekombinantnog gena *AtILL2-GFP*.
3. Analizirati mutante *A.thaliana* s mutiranim genima *ILR1*, *ILL2* i *IAR3* te izdvojiti homozigotne trostruke mutantne (*ill2-1/iar3-2/ilr1-1*) koje imaju mutacije u sva tri gena, dvostruke mutante s mutiranim genima *AtILL2* i *AtIAR3* (*ill2-1/iar3-2*), te jednostruke mutante koje imaju mutiran gen *AtILR1* (*ilr1-1*), gen *AtILL2* (*ill2-1*) ili gen *AtIAR3* (*iar3-2*).

3 Materijali i metode

3.1 Materijali

3.1.1 Hranljivi mediji

Za uzgoj bakterija koristio sam kruti medij LB, tekući medij LB (bez agara) (Bertani, 1951) i mediji SOC. Njihov sastav je prikazan na tablici 1 i 2.

Za uzgoj klijanaca *A.thaliana* koristio sam krutu hranljivu podlogu MS0 (Murasnige i Skoog, 1962) čiji je sastav prikazan na tablici 3.

Tablica 1. Sastav medija LB, za uzgoj bakterija (pH 7,0)

Sastojci medija	Koncentracija (g/l)
Bakto-tripton	10,0
Ekstrakt bakto-kvasca	5,0
NaCl	10,0
Agar	15,0

Tablica 2 Sastav medija SOC za uzgoj bakterija

Sastojci medija	Koncentracija (g/l)
Bakto tripton	20,0
Ekstrakt kvasca	5,0
NaCl	0,5
MgCl ₂	0,95
KCl	0,186
Glukoza	2,0

Tablica 3. Sastav krute hranljive podloge MS0 za uzgoj klijanaca *A.thaliana* (pH 5,7-5,8)

Sastojci podloge MS0	Koncentracija (mg/l)
MAKROELEMENTI	
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ x H ₂ O	755
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370
MIKROELEMENTI	
H ₃ BO ₃	6,2
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	16,9
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,6
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
ORGANSKI DODACI	
Saharoza	20000
m-inozitol	100
nikotinska kiselina	0,5
piridoksin-HCl	0,5
tiamin-HCl	0,1
Glicin	2
agar	8000
pH	5,7-5,8

3.1.2 Oligonukleotidne početnice

Početnice koje sam koristio za umnažanje gena *GFP* lančanom reakcijom polimeraze (PCR) u svrhu njegovog kloniranja u vektor pHOV:AtILL2 tehnologijom *in-fusion* prikazane su u tablici 4.

Početnice koje sam koristio da bih potvrdio uspješnost transformacije kod biljaka *A. thaliana* ekotip WS i Col-0, odnosno potvrdio prisustvo gena *AtILL2* i *AtILL2-GFP* u njima, prikazane su u tablici 5.

Početnice koje sam koristio za umnažanje gena *AtILR1*, *AtILL2* i *AtIAR3* reakcijom PCR radi potvrde njihove prisutnosti u jednostrukim, dvostrukim i trostrukim mutantama, kao i veličine očekivanih umnoženih fragmenta za divlji tip i mutirani oblik gena, navedene su u tablici 6.

Tablica 4. Nukleotidni slijed i naziv početnica za umnažanje gena *GFP* r pomoću PCR. Prvih 15 nukleotida (crvena boja) komplementarno je s vektorom pHOV:AtILL2 u koji se gen *GFP* treba ugraditi. Ostatak sekvence (crna boja) komplementaran je kalupu (genu *GFP*) iz kojeg se umnožava gen *GFP*.

Gen	Početnica	Nukleotidni slijed početnica	Očekivana veličina fragmenta
<i>GFP</i>	GFP_IF_Fw_SalI	5' TCACCATCACGTCG ACATGGTG AGCAAGGGCG 3'	752 pb
	GFP_IF_Rev_SalI	5' AAATTCGTCAGTCG ACTTACTT GTACAGCTCGTCCATG 3'	

Tablica 5. Nukleotidni slijed i naziv početnica za umnažanje gena *AtILL2* i *AtILL2-GFP* radi potvrde njihove prisutnosti u transformiranim biljkama *A.thaliana* ekotip WS i Col-0.

Gen	Početnica	Nukleotidni slijed početnice	Očekivana veličina fragmenta (pb)
<i>AtILL2</i>	FwAtill2/355	5' AGGAAGGTGTTGAGTGGGAGC 3'	1042
	AtILL2rev_SalI	5' GATCGGGGAAATTCGTCAGTCGACGTGA TGGTGATGGTGATGACCCTGAAAATACA AATTCTCGTGTTCTTCATGAAAGCCTGAG 3'	
<i>AtILL2-GFP</i>	FwAtill2/355	5' AGGAAGGTGTTGAGTGGGAGC 3'	1745
	GFP_IF_Rev_SalI	5' AAATTCGTCAGTCGACTTACTT GTACAGCTCGTCCATG 3'	

Tablica 6. Nukleotidni slijed i naziv početnica za umnažanje gena *AtILR1*, *AtILL2* i *AtIAR3* reakcijom PCR radi potvrde njihove prisutnosti u mutantima. Prikazane su i očekivane veličine fragmenta za divlji tip gena i mutirani oblik gena.

Gen	Početnica	Nukleotidni slijed početnica	Očekivana veličina fragmenta (pb)	
			Mutirani gen	Divlji tip
<i>AtILR1</i>	FwAtiar3/585	5' CCTGTGGCGAAGACTGGCG 3'	696	696
	RevAtilr1/621	5' ACCACCTGATGGGATCGATGG 3'		
<i>AtILL2</i>	FwAtill2	5' ATGGCTCTAAACAAGCTCCTCAG 3'	670	943
	Revill2-1LB	5' TATATCCATGAAGCCATGGTGGCG 3'		
	RevAtill2/699	5' GGCAGCATGACCTCCTTTCCC 3'		
<i>AtIAR3</i>	FwAtiar3/585	5' CACAAATCAATTGGCATTAGGTCAAG3'	513	513
	RevAtiar3Davies	5' GCTCGCTTGCCTTGTGATAACCTG 3'		

3.1.3 Bakterije

3.1.3.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens (agrobakterije) su gram pozitivne bakterije koje prebivaju u zemlji, i imaju sposobnost da normalne biljne stanice transformiraju u tumorske, insercijom kratke sekvence DNA, T-DNA (*engl. transfer DNA*) u biljni genom. T-DNA koja je omeđena desnom graničnom sekvencom RB (*engl. right border*) i lijevom graničnom sekvencom LB (*engl. left border*) nalazi se na Ti (*engl. tumor inducing*) plazmidu, koji pored T-DNA sadrži i gene *vir* koji su potrebni za prijenos T-DNA i inserciju u biljni genom. Zbog svog potencijala da insertiraju određeni dio DNA sekvence u biljni genom, agrobakterije imaju široku primjenu u genetičkom inženjerstvu te se koriste za transformaciju biljka, prethodno modificiranom T-DNA (ovisno o cilju istraživanja). Međutim, budući da je veličina nemodificiranog Ti plazmida $\approx 200 - 800$ kb (Gelvin, 2003) te da ne sadrži jedinstvena restrikcijska mjesta, što je za manipulacije T-DNA u uvjetima *in vitro* prilično nepraktično, za potrebe genetičkog inženjerstva postojeće agrobakterije su modificirane te je stvoren sustav binarnih vektora. U takvom sustavu modificirani Ti plazmid sadrži sve svoje gene, osim sekvence T-DNA. Sekvenca T-DNA se pak nalazi na zasebnom plazmidu, binarnom vektoru (koji je puno manji od Ti plazmida, te je jednostavniji za manipulaciju), i njime se manipulira u bakterijama *Escherichia coli*. Nakon manipulacije u *E. coli*, plazmid se transformacijom prebacuje u agrobakterije metodom elektroporacije. Kad takav plazmid dospije u agrobakterije, T-DNA s tog plazmida biva insertirana u biljni genom posredstvom proteina kodiranih genima s Ti plazmida. Budući da je za opstanak plazmida nužna njegova replikacija, binarni vektori moraju imati ishodišta replikacije koje prepoznaju organizmi u kojima se oni nalaze, pa stoga ovi vektori moraju imati ishodište replikacije koje prepoznaje *E. coli* i ishodište replikacije koje prepoznaju agrobakterije, te su stoga nazvani binarni vektori.

U ovom radu sam za potrebe transformacije biljaka *A.thaliana* ekotip WS i Col-0 koristio soj elektrokompetentnih agrobakterija GV3101 (pMP90) (Koncz i Schell, 1986). GV3101 označava soj agrobakterija koje na svom kromosomu nose gen za rezistenciju na rifampicin, pMP90 označava Ti plazmid u kome je deletirana sekvenca T-DNA te sadrži gen za rezistenciju na gentamicin, a u agrobakterijama služi kao pomoćnički plazmid i posreduje u prenošenju i inserciji T-DNA s binarnog vektora u biljni genom.

3.1.3.2 *Escherichia coli*

Prilikom transformacije biljaka agrobakterijama, nužan je sustav u kome će se binarni vektor (plazmid koji nosi T-DNA koja će se pak ugraditi u biljni genom) umnožiti. Za tu svrhu

bakterije *E.coli* su se pokazale kao najbolji organizmi koji omogućavaju prinos željenog plazmida do izrazito visokih koncentracija što je nužno za uspješnu transformaciju. Metodom kemijske transformacije željeni plazmid se unosi u *E.coli*. Inkubacijom *E.coli* u određenim uvjetima i određeno vrijeme dolazi do umnažanja unesenog plazmida. Slijedi selekcija uspješno transformiranih bakterija te izolacija plazmida iz njih. Izoliranim plazmidima će se transformirati agrobakterije, a agrobakterijama će biti transformirane biljke.

U ovom radu sam koristio komercijalno dostupne, kemijski kompetentne bakterijske stanice *Stellar*TM *Competent Cells* (Clontech). To je bakterijski soj *E. coli* HST08 genotipa: *F-*, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *phoA*, $\Phi80d$ *lacZ* Δ *M15*, Δ (*lacZYA-argF*) *U169*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Δ *mcrA*, $\lambda-$ koji ima vrlo široku primjenu u genetičkom inženjerstvu te je pogodan za kloniranje i umnažanje plazmida od interesa.

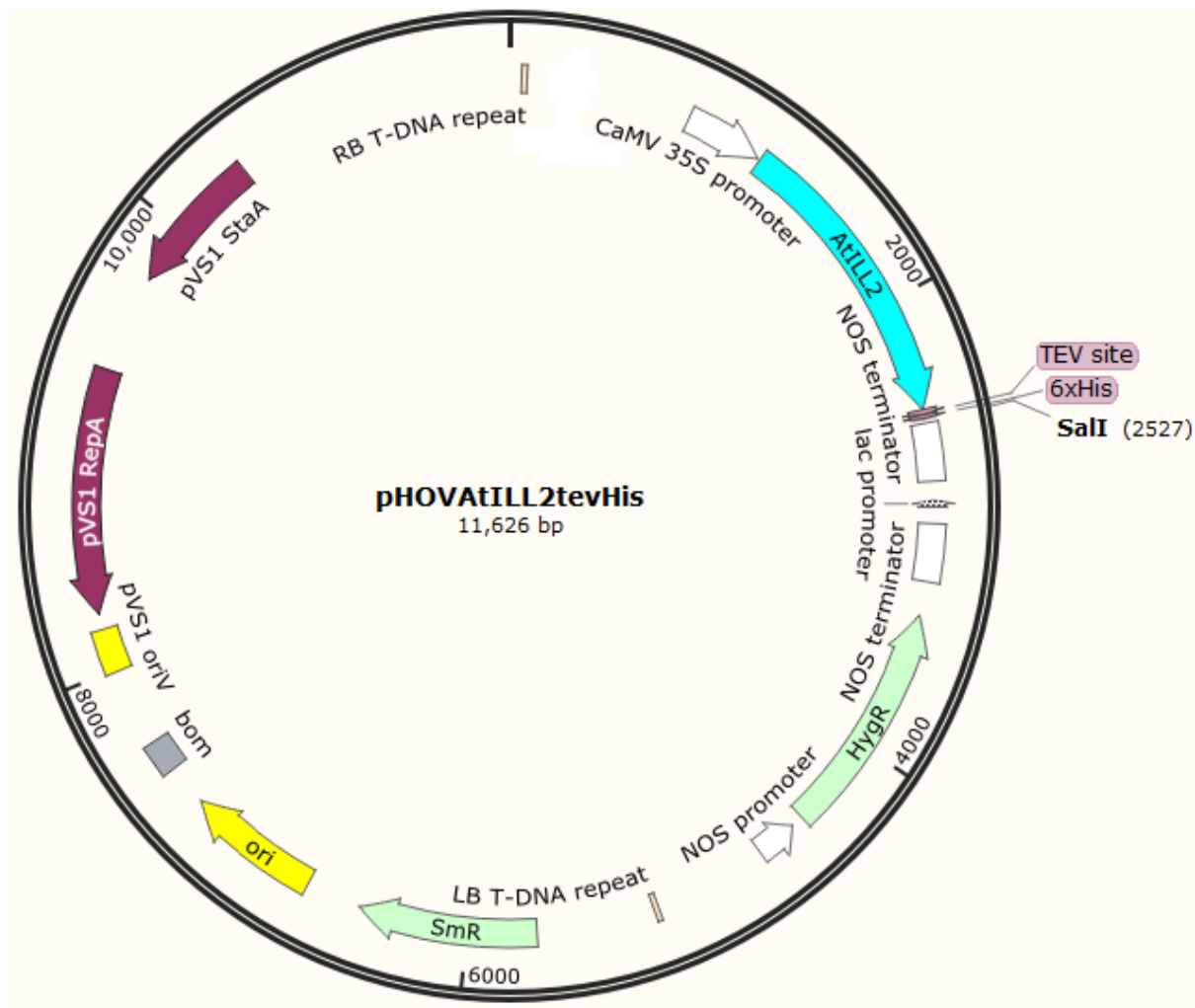
3.1.4 Plazmidi

Prilikom transformacije biljaka od presudnog je značaja izbor plazmida. Tijekom izbora plazmida potrebno je uzeti u obzir nekoliko uvjeta koje plazmid mora zadovoljavati kako bi transformacija bila uspješna.

- i. Plazmid mora sadržavati T-DNA sekvencu omeđenu s RB i LB.
- ii. Veličina plazmida bi trebala biti najviše 15-20 kb (Gelvin, 2003)
- iii. Budući da se plazmidom manipulira u dva različita organizma (agrobakterije i *E.coli*) plazmid mora sadržavati ishodište replikacije koje prepoznaju oba organizma.
- iv. S obzirom da se plazmid u *E.coli* treba umnožiti do izrazito visoke koncentracije, potrebno je da ishodište replikacije koje prepoznaje *E.coli* bude prilagođeno za visoku reprodukciju plazmida (*engl. high copy number plasmids*).
- v. Plazmid mora sadržavati gene za rezistenciju na antibiotike, radi selekcije uspješno transformiranih bakterija.
- vi. Potrebni su geni za rezistenciju na antibiotike radi selekcije uspješno transformiranih biljaka. Taj gen se mora nalaziti unutar sekvence T-DNA (dio DNA koji se prenosi u biljke) i to što je više moguće bliže LB sekvenci. Budući da prilikom transformacije prijenos T-DNA kreće svojom RB sekvencom, moguća razgradnja dijela sekvence koja je blizu RB, a također je povoljno da se gen za rezistenciju nalazi bliže LB sekvenci, iza gena od interesa koji se nalazi bliže RB sekvenci.
- vii. Postojanje jedinstvenih restrikcijskih mjesta na MCS (*engl. multiple cloning site*).

Plazmid pHOV:AtILL2 (slika 6) kojeg sam koristio kao binarni vektor u procesu transformacije biljaka *A. thaliana* ekotip WS i Col-0, i kao početni materijal za stvaranje vektora pHOV:AtILL2-GFP tehnologijom *in-fusion*, ispunjava sve gore navedene uvjete. Veličina plazmida je 11626 pb. Sekvenca T-DNA omeđena graničnim sekvencama RB i LB sadrži gen za auksin hidrolazu *AtILL2* (AT5G56660), i gen za rezistenciju na antibiotik higromicin *Hyg^R*. Gen *AtILL2* je u plazmid kloniran tehnologijom *in-fusion* i nalazi se pod kontrolom promotora 35S koji je jaki konstitutivni promotor porijeklom iz virusa mozaika cvjetače (CaMV). Nizvodno od gena *AtILL2* nalazi se sekvenca koju prepoznaje i reže proteaza TEV kao i heksahistidinski privjesak (His 6). TEV sekvenca i polihistidinski privjesak služe za pročišćavanje proteina i proučavanje međuproteinskih interakcija. Gen *Hyg^R* koji služi za selekciju uspješno transformiranih biljaka, nalazi se pod kontrolom promotora NOS (*engl. nopaline synthase*) porijeklom iz agrobakterija. Terminator NOS je porijeklom također iz agrobakterija i terminira transkripciju oba gena, *AtILL2* i *Hyg^R*.

Izvan T-DNA sekvence nalaze se geni koji kodiraju proteine potrebne za replikaciju (*StmA* i *RepA* porijeklom iz plazmida pVS1 (Heeb *i sur.*, 2000)), dva ishodište replikacije (OriV porijeklom iz pVS1 plazmida (Heeb *i sur.*, 2000) te Ori porijeklom iz bakterije *E.coli* koji služi za visoku reprodukciju plazmida i dobivanje visoke koncentracije plazmida od interesa. Izvan T-DNA sekvence se nalazi i gen *Sm^R* za rezistenciju na antibiotike streptomycin i spektinomycin koji služi za selekciju uspješno transformiranih bakterija. Plazmid sadrži i veliki broj restrikcijskih mjesta koje prepoznaju različite restrikcijske endonukleaze (na slici je prikazano samo restrikcijsko mjesto *SalI*).



Slika 6 Prikaz binarnog vektora pHOV:AtILL2 (11626 pb) napravljena u programu *Snappgene*[®]. T-DNA sekvenca koja sadrži gen za auksin hidrolazu *AtILL2* i gen za rezistenciju na higromicin *Hyg^R* radi selekcije transformiranih biljaka, omeđena je graničnim sekvencama LB i RB. Izvan T-DNA nalaze se dva različita ishodišta replikacije (pVS1 oriV i ori), geni koji kodiraju proteine za kontrolu replikacije kao i gen *Sm^R* za rezistenciju na streptomycin i spektinomycin radi selekcije transformiranih bakterija

3.1.5 Biljke

Za transformaciju biljaka u svrhu regeneracije transgeničnih biljaka s pojačanom ekspresijom gena *AtILL2* i rekombinantnog gena *AtILL2-GFP* koristio sam biljke divljeg tipa *A. thaliana* ekotip WS i Col-0.

Za potrebe izdvajanja jednostrukih mutanata *ilr1-1*, *ill2-1* i *iar3-2*, dvostruke mutante *ill2-1/iar3-2* i trostruke mutante *ill2-1/iar3-2/ilr1-1*, te potvrde mutacije u genima *AtILR1*, *AtILL2* i *AtIAR3* analizirao sam biljke *A. thaliana* ekotip WS. Sjeme iz kojih sam uzgojio biljke za analizu dobio sam od Bartel (1995)

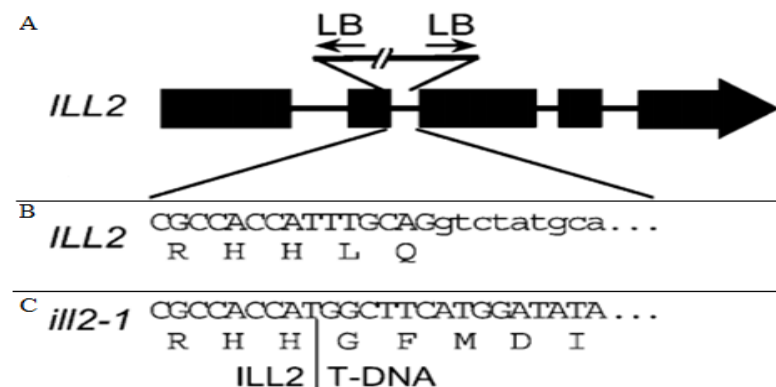
Jednostruke mutante imaju mutacije u samo jednom genu redom *AtILR1*, *AtILL2* ili *AtIAR3*, dvostruka mutanta ima mutaciju u dva gena *AtILL2* i *AtIAR3* a trostruka mutanta ima mutacije u sva tri gena *AtILR1*, *AtILL2* i *AtIAR3*.

Gen *AtILR1*

Mutirani gen *ilr1-1* ima točkastu mutaciju koja je nastala primjenom mutagena etil metansulfonat (EMS) te uzrokuje smanjenu ili nikakvu funkcionalnost hidrolaze ILR1 kodirane ovim genom. Iz literaturnih podataka nije potpuno jasno gdje se točno mutacija nalazi. U jednom radu se navodi da točkasta mutacija uzrokuje zamjenu aminokiseline na poziciji 139 (Gly139Asp) (Baretl *i sur.*, 1995), u drugom radu (Rampey *i sur.*, 2004) se navodi da točkasta mutacija uzrokuje promjenu aminokiseline Leu u aminokiselinu Arg, točno mjesto mutacije se ne navodi, osim da se mutacija nalazi u drugom eksonu gena.

Gen *AtILL2*

Mutirani gen *ill2-1* ima insercijsku mutaciju. T-DNA insercija je locirana +644 pb od start kodona i nalazi se blizu 3' kraja drugog eksona (Rampey *i sur.*, 2004) te uzrokuje pomak u okviru čitanja i sintezu krnjeg, nefunkcionalnog proteina ILL2 (slika 7). Insercijska sekvenca sadrži gen za rezistenciju na kanamicin pa je svaka mutanta koja ima mutirani oblik gena *ill2* rezistentna na kanamicin.



Slika 7 A – Shematski prikaz mutiranog gena *AtILL2*. Deblje linije predstavljaju eksoni, tanje linije između njih predstavljaju introne. Trokutom je označeno mjesto insercije T-DNA. Lijeva granična sekvenca (LB) locirana je na oba, 3' i 5', kraja insercijske sekvence. B – Nukleotidni i aminokiselinski slijed divljeg tipa gena *ILL2*. C – Nukleotidni i aminokiselinski slijed mutiranog gena *ill2-1*. Vertikalna linija označava mjestu insercije T-DNA. Preuzeto i prilagođeno prema (Rampey *i sur.*, 2004)

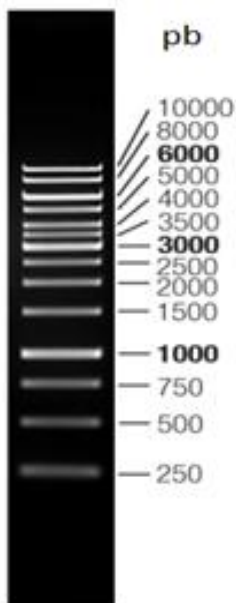
Gen *AtIAR3*

Mutirani gen *iar3-2* također ima točkastu mutaciju i nastao je primjenom mutagena EMS, i uzrokuje sintezu hidrolaze IAR3 sa smanjenom ili nikakvom funkcionalnošću. Prema (Davies *i sur.*, 1999) točkasta mutacija uzrokuje promjenu aminokiselina na poziciji 124 (Gly124Glu). U radu (Rampey *i sur.*, 2004) se navodi da se mutacija događa na poziciji 224

(Gly224Glu). Posljedično ova mutanta ima manju osjetljivost na IAA-Ala konjugate (Davies *i sur.*, 1999).

3.1.6 Standard za određivanje veličine DNA

Prilikom razdvajanja DNA u agaroznom gelu koristio sam ljestvičasti biljeg *Gene ruler 1 kb DNA ladder* (Thermo Scientific) prikazan na Slici 8.



Slika 8 Ljestvičavi biljeg veličine DNA *Gene ruler 1 kb DNA ladder* (Thermo Scientific). Brojevima su označene duljine fragmenata DNA (pb). Preuzeto i prilagođeno prema <https://www.lifetechnologies.com/hr/en/home.html>

3.2 Metode

3.2.1 Sterilizacija sjemenki *Arabidopsis thaliana*

Sterilizacija sjemenki je proces kojim se uklanjaju kontaminacija u vidu različitih mikroorganizama, a koji mogu utjecati na ishod istraživanja. Sterilizaciju sam provodio sterilizacijskom otopinom Izosana G (Pliva) i mukazola u sterilnim uvjetima laminara.

Sjemenke biljaka divljeg tipa *A. thaliana* ekotip WS i Col-0 i sjemenke mutantnih biljaka (jednostruke, dvostruke i trostruke mutante) razdvojio sam u zasebne mikroeprevete 1,5 ml. U epruvete sa sjemenkama dodao sam 1 ml 70% etanola i inkubirao 1 min. Potom sam odstranio etanol i na sjemenke dodao 1 ml vodene otopine izosana i mukazola (1% Izosan G (Pliva); 0,1% mukazol) i inkubirao 10 min na sobnoj temperaturi (22 °C) uz miješanje na rotoru.

Nakon inkubacije odstranio sam supernatant te sam sjemenke isprao pet puta s 1 ml destilirane, sterilne vode. Sjemenke u epruvetama s $\approx 200 \mu\text{l}$ sterilne, destilirane vode sam pohranio na $+4^\circ\text{C}$, 48 sati radi vernalizacije.

3.2.2 Nasađivanje biljnog sjemena i uzgoj u uvjetima *in vitro*

Sterilizirano i vernalizirano sjeme nasađivao sam na krutim hranljivim podlogama MS0 (tablica 3) s različitim vrstama i koncentracijama antibiotika ovisno o vrsti prisutnih gena za rezistenciju kod različitih linija.

Tablica 7 Prikaz vrste podloge, antibiotika i njihove koncentracije za uzgoj različitih ekotipova i linija *A. thaliana*.

Linija/ekotip	Hranljiva podloga	Antibiotik	Koncentracija antibiotika (mg/l)
Divlji tip <i>A. thaliana</i>			
WS	MS0	/	/
Col-0	MS0	/	/
Transgenične biljke s pojačanom ekspresijom gena <i>AtILL2</i> i <i>AtILL2-GFP</i> nakon <i>floral dip</i> transformacije			
WS	MS0	higromicin B	50
Col-0	MS0	higromicin B	50
Mutante s mutacijama u genima <i>AtILR1</i>, <i>AtILL2</i> i <i>AtIAR3</i>			
<i>ilr1-1</i>	MS0	/	/
<i>iar3-2</i>	MS0	/	/
<i>ill2-1</i>	MS0	Kanamicin	50
<i>ill2-1/iar3-2</i>	MS0	Kanamicin	50
<i>ilr1-1/ill2-1/iar3-2</i>	MS0	Kanamicin	50

Nasađivanje sam radio s pipetama s odrezanim vrškom nastavka. Nasađivao sam oko 100 sjemenki po ploči (ϕ 9 cm). Ploče sam omotao parafilmom, položio vertikalno te ih uzgajao u uvjetima dugog dana (16 sati dan, 8 sati noć) s intenzitetom svjetla $25\text{-}45 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-2}$ na temperaturi od 22°C .

3.2.3 Uzgoj biljaka u zemlji

Nakon što su se na podlogama razvili klijanci s dužinom korijena 3-4 cm, prebacio sam ih na komercijalno dostupnu zemlju (*Steckmedium*). Prebacivanje s krute hranjive podloge u zemlju radio sam s pincetom pazeći da im ne polomim korijen. Biljke sam položio u zemlju tako da se osim listova čitava biljka nalazila pod zemljom. Biljke sam uzgajao u uvjetima dugog dana s intenzitetom osvjetljenja ($25\text{-}45 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-2}$) na temperaturi $22 - 25^\circ\text{C}$. Prvih 7 dana biljke sam poklopio prozirnim poklopcem tako da se održavala 100% vlaga.

3.2.4 Uzgoj bakterija na krutom mediju

Za potrebe selekcije transformiranih bakterije, bakterije sam uzgajao na pločama (ϕ 9 cm) s krutim medijem LB (tablica 1). U rashlađeni medij dodao sam filtar sterilizirane termolabilne antibiotike. Za selekciju *E.coli* dodao sam antibiotik streptomycin konačne koncentracije (50 mg/l). Za selekciju bakterija *A. tumefaciens* dodao sam antibiotike gentamicin (50 mg/l), streptomycin (100 mg/l) i rifampicin (50 mg/l). Transformirane bakterije sam na medij nasađivao u sterilnim uvjetima i sterilnim priborom. Nakon nasađivanja bakterije *E.coli* su inkubirane preko noći na 37 °C, a *A. thumefaciens* su inkubirane 3 dana na 28 °C. Nakon inkubacije ploče su omotane parafilmom i čuvane na 4 °C.

3.2.5 Uzgoj bakterija u tekućem mediju

Nakon selekcije na krutom mediju LB, kolonije bakterija su presađene u tekući medij LB radi umnažanja konstruiranog plazmida (*E.coli*) ili radi pripremanja bakterija za *floral dip* (agrobakterije). S krutog medija bakterijske kolonije sam sterilnim čačkalicama prebacio u epruvete u 3 ml tekućeg medija LB u koji sam prethodno dodao odgovarajuće antibiotike. Za uzgoj bakterija *E.coli* u medij sam dodao antibiotik streptomycin konačne koncentracije 50 mg/l a za uzgoj bakterija *A. tumefaciens* dodao sam antibiotike rifampicin (50 mg/l), gentamicin (50 mg/l) i streptomycin (100 mg/l). Epruvete u kojima su se nalazile bakterije *E.coli* inkubirao sam 16 h na 37 °C, dok sam epruvete u kojima su se nalazile bakterije *A. tumefaciens* inkubirao 2 dana na 28 °C.

3.2.6 Izolacija DNA

U svrhu analize ili daljnje manipulacije gena, DNA je izolirana iz bakterija metodom minipreparacije a biljna genomska DNA izolirana je metodom „Rapid DNA preparation“.

3.2.6.1 Minipreparacija plazmidne DNA

Minipreparacija je metoda kojom se izolirala plazmidna DNA pomoću komercijalnog kompleta *The Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Protokol s detaljnim opisom čitavog procesa izolacije plazmidne DNA dostupan je na (<https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/wizard-plus-sv-minipreps-dna-purification-system-protocol/> preuzeto 20.12.2016)

3.2.6.2 Izolacije biljne genomske DNA

Biljna genomska DNA je izolirana metodom „Rapid DNA preparation“ (Edwards *i sur.*, 1991). Čitav proces izolacije biljne DNA provodio sam na sobnoj temperaturi (22 °C). Otkinuo sam komadić lista i stavio u epruvetu od 1,5 ml. Malim tučkom usitnio sam biljno tkivo u epruveti. Na zdrobljeno tkivo u epruveti sam dodao 400 µl ekstrakcijskog pufera (tablica 8), smjesu sam vorteksirao 5 sec. Uslijedilo je centrifugiranje na 16000 g u trajanju od 1 min. Prebacio sam 300 µl supernatanta u novu epruvetu od 1,5 ml. Dodao sam 300 µl izopropanola, lagano promiješao te inkubirao na sobnoj temperaturi 2 min potom centrifugirao na 16000 g 5 min. Uklonio sam supernatant a talog posušio inkubacijom epruveta s otvorenim čepovima na 37 °C. Na kraju sam na osušeni talog (nukleinske kiseline) dodao 100 µl pufera T10E1 (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8). Talog je otopljen laganim miješanjem bez vorteksiranja.

Tablica 8 Sastav ekstrakcijskog pufera za izolaciju genomske DNA

Sastojci pufera	Koncentracija (mol/l)
NaCl	0,250
EDTA	0,025
*SDS	*0,5

* udio SDS-a izražen je u postotcima (%)

3.2.7 Lančana reakcija polimerazom (PCR)

PCR je metoda za eksponencijalno umnožavanje ciljanog fragmenta DNA u uvjetima *in vitro*. Za samu reakciju potreban je pufer, magnezij, deoksitri nukleotidi (dNTP), oligonukleotidne početnice, kalup (fragment DNA koji će se umnožavati) i termostabilna DNA polimeraza koja ne gubi integritet i funkcionalnost na temperaturama do 98 °C, i u tu svrhu se najčešće koristi *Taq* DNA polimeraza izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus*. Reakcija se odvija u uređaju koji automatski i precizno regulira temperaturu i trajanje pojedinog koraka u ciklusu umnažanja DNA. Prvi korak u ciklusu je denaturacija DNA na temperaturi od (95-98) °C, u kojem dolazi do odvajanja lanaca DNA. U drugom koraku temperatura se spušta na oko 58 °C i dolazi do hibridizacije oligonukleotidnih početnica s komplementarnim dijelom jednolančane molekule DNA. U trećem koraku temperatura se podiže na 72 °C i dolazi do sinteze komplementarnog lanca DNA katalizirane enzimom *Taq* DNA polimerazom, čime se završava jedan ciklus umnožavanja DNA. Broj ciklusa ovisi o početnoj koncentraciji kalupa.

U radu su napravljene tri različite reakcije PCR korištenjem uređaja PCR 2720 *Thermal Cycler* (Applied biosystem)

Gen *GFP* sam umnažao kako bih dobio dovoljnu količinu gena za potrebe tehnologije *in-fusion*. Kao kalup za umnažanje koristio sam plazmid pNGKM/NAPI:GFP-GUS.

Ukupni volumen PCR reakcije je bio 50 μ l, a reakciju sam priredio tako da sam pomiješao 25 μ l otopine *CloneAmp™ HiFi PCR Premix* (Clontech) (sadrži pufer, magnezij, deoksitri nukleotide (dNTP) i termostabilnu DNA polimerazu), po 2 μ l nizvodne i uzvodne početnice (tablica 4) koncentracije 10 mM, 0,5 μ l plazmida pNGKM/NAPI:GFP-GUS (40,5 ng/ μ l) i 20,5 μ l sterilne, destilirane vode. Početna denaturacija DNA bila je na 98 °C 1 min, umnažanje gena *GFP* odvijalo se kroz 30 ciklusa prema programu: 98 °C na 10 sec, 58 °C na 10 sec i 72 °C na 5 sec. Na kraju su uzorci inkubirani na 72 °C 7 min.

Umnažanje gena *AtILL2*, *AtILR1*, *AtIAR3* sam provodio radi potvrde njihove prisutnosti u jednostrukim, dvostrukim i trostrukim mutantima. Kao kalup za umnažanje koristio sam biljnu genomsku DNA izoliranu metodom „rapid DNA preparation“ iz jednostrukih dvostrukih i trostrukih mutanta. Ukupni volumen reakcije je bio 25 μ l (12,5 μ l *EmeraldAmp® GT PCR Master Mix* (Clontech) (sadrži pufer, magnezij, deoksitri nukleotide (dNTP) i termostabilnu DNA polimerazu), po 0,5 μ l nizvodne i uzvodne početnice (tablica 6) koncentracije 10 mM, 2 μ l biljne genomske DNA i 9,5 μ l sterilne, destilirane vode). Početna denaturacija DNA bila je na 98 °C 3 min, umnažanje gena odvijalo se kroz 40 ciklusa prema programu: 98 °C 10 sec, 58 °C na 30 sec i 72 °C na 1 min. Na kraju su uzorci inkubirani na 72 °C 7 min.

Umnažanje gena *AtILL2* i *AtILL2-GFP* sam provodio kako bi detektirao njihovo prisustvo u transgeničnim biljkama transformiranim s *AtILL2* i *AtILL-GFP* (T-DNA sekvenca) i time potvrdio uspješnost transformacije. Ukupni volumen reakcije je bio 25 μ l (12,5 μ l *EmeraldAmp® GT PCR Master Mix* (Clontech) (sadrži pufer, magnezij, deoksitri nukleotide (dNTP) i termostabilnu DNA polimerazu), po 0,5 μ l nizvodne i uzvode početnice (tablica 5) koncentracije 10 mM, 2 μ l biljne genomske DNA i 9,5 μ l sterilne, destilirane vode). Početna denaturacija DNA bila je na 98 °C 3 min, umnažanje gena odvijalo se kroz 40 ciklusa prema programu: 98 °C 10 sec, 58 °C na 30 sec i 72 °C na 2 min. Na kraju su uzorci inkubirani na 72 °C 7 min.

3.2.8 Restriksijska analiza

Restriksijska analiza je analitička metoda koja se temelji na uporabi restriksijskih endonukleaza. To su enzimi koji kataliziraju reakciju cijepanja dvolančane molekule DNA na restriksijskim mjestima, specifičnim sljedovima DNA (palindromima) koji su jedinstveni za svaki enzim. Ukoliko znamo sekvencu DNA te lokaciju restriksijskih mjesta unutar sekvence,

može se predvidjeti duljina fragmenta DNA nakon cijepanja restrikcijskih enzima. Na taj način se restrikcijskom analizom može potvrditi prisustvo/odsustvo određene sekvence DNA u uzorku.

U ovom radu napravljena je preparativna, potpuna restrikcijska digestija plazmida pHOV-AtILL2 koji sadrži samo jedno restrikcijsko mjesto koje prepoznaje restrikcijska endonukleaza *SalI*. Na taj način dolazi do linearizacije plazmida što je uvjet za kloniranje gena *GFP* u plazmid tehnologijom *in-fusion*. Volumen preparativne restrikcijske smjese bio 50 µl, a sadržavao je 30 µl vektora pHOV:AtILL2 (62 ng/µl), 1 µl restrikcijskog enzima *SalI* (Roche), 5 µl pripadajućeg pufera H (Roche), 14 µl destilirane, sterilne vode. Reakcijska smjesa je inkubirana 3 h na 37 °C pri čemu je došlo do cijepanja svih palindroma enzima *SalI*. Očekivane veličine fragmenta prikazane su u tablici 9.

Kontrolnu restrikcijsku digestiju sam koristio kako bi provjerio autentičnost plazmida pHOV:AtILL2-GFP i pHOV:AtILL2 kojima sam transformirao agrobakterije. U tom slučaju volumen reakcijske smjese je bio 10 µl i sastojao se od 5 µl plazmida (oko 100 ng/µl), 0,1 µl odgovarajućeg restrikcijskog enzima (Thermo Scientific), 1 µl odgovarajućeg pufera (Thermo Scientific) i 3,9 µl destilirane vode. Reakcijska smjesa je inkubirana 15 min na 37 °C i potom analizirana gel elektroforezom. Veličine očekivanih fragmenta nakon restrikcijske digestije prikazane su u tablici 9.

Tablica 9 Očekivane veličine fragmenta nakon potpune digestije plazmida pHOV:AtILL2 te nakon kontrolne restrikcijske digestije vektora pHOV:AtILL2 i pHOV:AtILL2-GFP, odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama.

Plazmid	Restrikcijska endonukleaza	Očekivana veličina fragmenta (pb)
pHOV:AtILL2	<i>SalI</i>	11626
pHOV:AtILL2-GFP	<i>SalI</i>	11626 + 752
pHOV:AtILL2	<i>HindIII</i>	9690 + 1936

3.2.9 Agarozna gel elektroforeza

Gel elektroforeza u agaroznom gelu je analitička i kvantitativna metoda za analizu i/ili izolaciju DNA i RNA. Uzorci se nanose u jažicama na gelu koji se sastoji od polimeriziranih polisaharida agaroze. Gel se uranja u kadnicu za elektroforezu u kojoj se nalazi elektroforetski pufer. Sastav pufera je takav da provodi struju i održava pH konstantnim. Spajanjem uređaja u strujno kolo dolazi do uspostave konstantnog električnog polja i to je osnova za razdvajanje nukleinskih kiselina koje se nalaze u gelu. Zbog prisustva negativno nabijene okosnice fosfatnih skupina, nukleinske kiseline se pod utjecajem električnog polja počinju kretati prema pozitivno

nabijenoj elektrodi (anodi). Brzina kretanja nukleinskih kiselina ovisi o veličini nukleinske kiseline i o stupnju zavijenosti molekule (kraće i superzavijene molekule nukleinskih kiselina najbrže putuju kroz gel), koncentraciji agaroze, ionskoj jakosti pufera i jačini električnog polja.

Elektroforeza je provedena u 1%-tnom agaroznom gelu. Gel sam pripremio tako da sam u 100 ml pufera TAE (0,04 M Tris, 0,02 M octena kiselina, 1 mM EDTA, pH 8,0) dodao 1 g agaroze. Agarozu je otopljen zagrijavanjem do ključanja i potom izlivena i kalup. Nakon polimerizacije gela u jažice sam nanosio uzorak. Restriksijske smjese su prije nanošenja na gel pomiješane s puferom $6\times$ Loading Dye (Thermo Scientific) u omjeru 5:1. Uzorke PCR-a nanosio sam direktno na gel jer u sebi sadrže sve potrebne komponente za provođenje elektroforeze u agaroznom gelu. Uz uzorke na gel sam nanosio i 3 μ l DNA markera *Gene ruler 1 kb DNA ladder* (Thermo Scientific). Nakon nanošenja uzorka primijenjeno je električno polje napona 25 V u trajanju od 5 min radi sabijanja uzorka, nakon toga napon je povećan na 100 V u trajanju od 30-40 min (ovisno o veličini uzorka). Nakon završetka elektroforeze gel sam uronio u otopinu etidij bromida konačne koncentracije 10 μ g/l u puferu TAE i inkubirao 15 min. Nakon inkubacije gel je fotografiran pod UV svjetlom transiluminatora. Slike su obrađene u programu Kodak 1D.

3.2.10 Izolacija DNA iz agaroznog gela

Izolacija DNA iz gela je metoda kojom se DNA izolira iz agaroznog gela za daljnje manipulacije, nakon što se potvrdi njena autentičnost. Izolaciju DNA iz gela radio sam s komercijalno dostupnim kompletom *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Postupak izolacije DNA iz gela je sljedeći: gel se osvjetli UV svjetlom, fragmenti DNA na gelu postaju vidljivi i onda se izrezuju iz gela korištenjem čiste pincete i skalpela. Izrezani dio gela se stavlja u prethodno obilježene i izvagane epruvete od 1,5 ml. Ponovnim vaganjem epruveta odredi se masa gela te se na svakih 10 mg gela dodaje 10 μ l otopine (*engl. Membrane binding solution*). Epruvete se potom inkubiraju na 50-65 °C sve dok se gel u potpunosti ne otopi te se sadržaj epruveta prebacuje u kolone za centrifugiranje, i centrifugiraju se 1 min na 16000 g. Slijedi ispiranje s otopinom (*engl. Membrane wash solution*) i centrifugiranje ponovno na 16000g 1 min. U zadnjem koraku kolone se centrifugiraju s otvorenim poklopcem kako bi etanol prisutan u otopinu potpuno ishlapio. Na samom kraju dodaje se 50 μ l vode (*engl. nuclease-free water*), centrifugira se 1 min na 16000 g te se eluat (DNA) prikupi u čistu obilježenu epruvetu od 1,5 ml i čuva se na +4 °C. Detaljan postupak izolacije DNA iz gela, kao i sastav svih otopina koje se u procesu koriste navedeni su u protokolu dostupnom na:

<https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/wizard-sv-gel-and-pcr-cleanup-system-protocol/> Preuzeto 20.12.2016) .

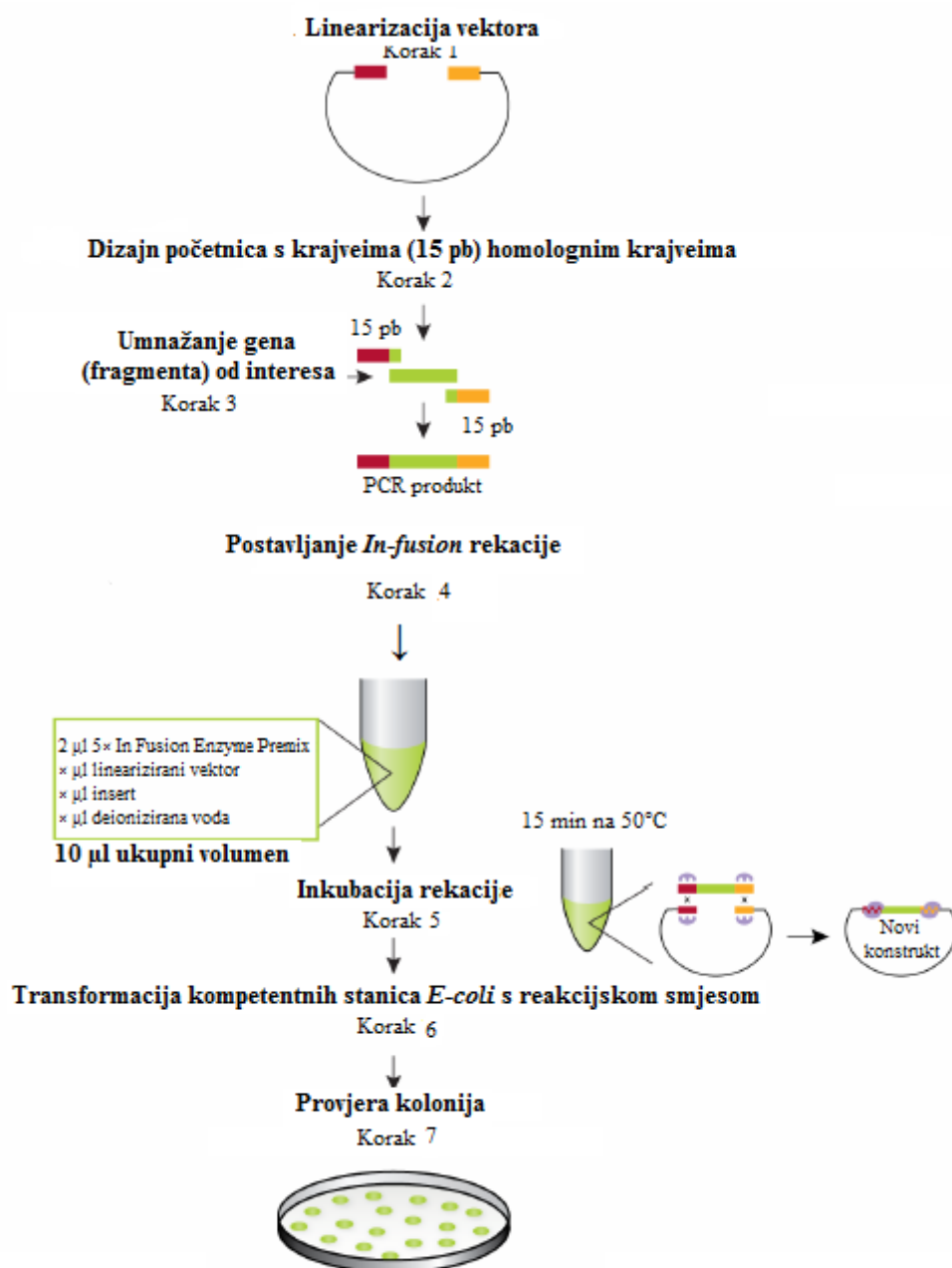
3.2.11 Mjerenje koncentracije DNA

Za mjerenje koncentracije izolirane plazmidne ili DNA umnožene reakcijom PCR korišten je spektrofotometar *NanoVue™ Plus Spectrophotometer* (GE Healthcare). Prethodno, čistom vodom baždareni uređaj, mjeri koncentraciju DNA na temelju izmjerene apsorbancije na valnoj duljini 260 nm. Čistoća uzorka računa se iz omjera apsorbancija 260/280 nm i za čisti uzorak DNA iznosi 1,7-1,9.

Uređaj se prvo baždari s 2 µl vode (destilirane i sterilne), čime se postavlja referentna vrijednost. Nakon toga dodaje se 2 µl željenog uzorka i očitava se koncentracija.

3.2.12 Kloniranje gena tehnologijom *In-fusion*

Tehnologija *in-fusion* predstavlja metodu za brzo i izravno kloniranje jednog ili više fragmenta u željeni vektor. Tehnologija se temelji na korištenju lineariziranog vektora i željenog fragmenta koji na 5' i 3' kraju ima 15 pb koji su komplementarni s krajevima lineariziranog vektora u koji se fragment želi ugraditi. Fragmenti koji posjeduju 15 pb komplementarnosti sa željenim vektorom konstruiraju se pomoću PCR-a i specifičnih početnica. Prednost metode je ta što je za čitav proces potrebno samo 15 pb komplementarnosti, na krajevima fragmenta i lineariziranog vektora, koje prepoznaju specifični *in-fusion* enzimi te na njima rade jednolančane krajeve. Zbog komplementarnosti dolazi do sparivanja jednolančanih krajeva fragmenta i lineariziranog vektora, a zatim se nativnim bakterijskim enzimima katalizira popravljjanje lomova stvaranjem fosfodiesterske veze i dolazi do ugradnje željenog fragmenta u linearizirani vektor. Metoda nije ograničena veličinom fragmenta i veličinom vektora. Pojedini koraci *in-fusion* kloniranja su prikazani na slici 9.



Slika 9 Shemataski prikaz kloniranja tehnologijom *In-fusion*. Korak 1 – Linearizacija vektora odgovarajućim restriktivnim enzimima. Korak 2 – dizajn specifičnih početnica za umnažanje gena (fragmenta) od interesa, koje na krajevima imaju 15 pb homologije s krajevima lineariziranog vektora. Korak 3 – umnažanje fragmenta PCR-om korištenjem specifičnih početnica (korak 2). Korak 4 – Postavljanje *in-fusion* reakcije koja se sastoji od 5x *in-fusion HD enzyme premix* (Clontech), lineariziranog vektora i PCR-om umnoženog fragemnta. Korak 5 – inkubacija 15 min na 50 °C. Korak 6 – transformacija komepetentnih bakterija *E.coli* reakcijskom smjesom *in-fusion*. Korak 7 – provjera uspješnosti reakcije *in-fusion* i uspješnosti transformacije *E.coli*. preuzeto i prilagođeno prema www.clontech.com/xxclt_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17497

Tehnologiju *in-fusion* sam koristio kako bih gen *GFP* ugradio u linearizirani vektor pHOV:AtILL2 te u konačnici dobio plazmid (binarni vektor) pHOV:AtILL2-GFP kojim ću transformirati biljke *A. thaliana* ekotip WS i Col-0. Vektor pHOV:AtILL2 je lineariziran restriksijskim enzimom *SaII*. Fragment koji se ugrađuje u vektor, umnožen je reakcijom PCR. Ukupni volumen reakcijske smjese *In-fusion* je bio 10 µl a sastojao se od 2 µl *5x in-fusion HD enzyme premix* (Clontech), 7 µl lineariziranog vektora pHOV:AtILL2 (10 ng/µl) i 1 µl umnoženog i pročišćenog gena *GFP* (40,5 ng/µl). Reakcijska smjesa je inkubirana 15 min na 50 °C. Nakon inkubacije reakcijskom smjesom transformiraju se bakterije *E.coli* u kojima će djelovanjem bakterijskih enzima doći do konačnog stvaranja stabilnog plazmida pHOV:AtILL2-GFP i njegovog umnažanja. Protokol s detaljnim opisom svih kemikalija i čitavog procesa kloniranja dostupan je na

www.clontech.com/xxclt_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17497 preuzeto 20.12.2016.

3.2.13 Transformacija bakterija

Transformacija bakterija predstavlja proces unošenja egzogene, slobodne molekule DNA u kompetentne bakterijske stanice koje se nalaze u logaritamskoj fazi rasta. Sam proces transformacije se može postići na dva načina, elektroporacijom i kemijskom transformacijom. Elektroporacija je transformacija stanica posredovana električnim poljem. Bakterije se izlažu kratkom električnom pulsnu visoke voltaže, čime se stvaraju pore na membrani bakterije i time se stvara prostor za ulazak molekula DNA unutar bakterijskih stanica. S druge strane, kemijska transformacija je proces unošenja egzogene DNA u bakterijske stanice koja je posredovana s CaCl₂ i temperaturnim šokom pri temperaturi od 42 °C. Temperaturnim šokom se stvaraju pore na membranama bakterijskih stanica, dok se kalcijevi ioni vežu za membranu stanica neutralizirajući naboj na njima te smanjujući elektrostatsko odbijanje između negativno nabijene molekule DNA i membrane bakterijske stanice čime se povećava učinkovitost transformacije. Izbor tehnike kojom će se bakterije transformirati ovisi o tipu bakterijskih stanica i o vrsti njihove kompetencije. U svojem radu koristio sam bakterije *E.coli* pogodne za kemijsku transformaciju i bakterije *A. tumefaciens* pogodne za transformaciju elektroporacijom.

Kemijski kompetentne bakterije *E.coli* HST08 (*Stellar*TM *Competent Cells* (Clontech)), transformirao sam metodom kemijske transformacije. Bakterije sam transformirao smjesom *In-fusion* koja je sadržavala vektor pHOV-AtILL2 i gen *GFP*. Kompetentne bakterije su cijelo vrijeme držane na ledu. U epruvetu sam dodao 50 µl kompetentnih stanica i 2,5 µl smjese *In-fusion*. U drugu epruvetu sam pipetirao 40 µl kompetentnih stanica i 3 µl lineariziranog vektora

pHOV:AtILL2 (bez gena *GFP*) te je ovaj uzorak služio kao negativna kontrola za provjeru uspješnosti linearizacije vektora. Stanice sam inkubirao 30 min na ledu, a potom izložio temperaturnom šoku na 42 °C 45 sec. Potom sam stanice inkubirao 2 min na ledu te im dodao 500 µl medija SOC (tablica 2) pregrijanog na 37 °C. Tako tretirane bakterije inkubirao sam na tresilici 200 o/min na 37 °C u vremenu od 1 sata u svrhu regeneracije integriteta bakterijskih membrana. Potom sam bakterije nasadio na kruti medij LB radi selekcije.

Elektrokompetentne bakterije *A. tumefaciens* transformirao sam metodom elektroporacije. Transformirao sam ih vektorom pHOV:AtILL2-GFP i vektorom pHOV:AtILL2. Alikvoti agrobakterija koje se nalaze u epruveti od 1,5 ml inkubirao sam na ledu. Kivete za elektroporaciju u kojima se odvija transformacija sam također držao na ledu. U epruvete s bakterijama sam dodao 1 µl vektora pHOV:AtILL2-GFP odnosno pHOV:AtILL2 i smjesu inkubirao 10 min na ledu. Zatim sam smjesu vektora i agrobakterija prenio u kivete za transformaciju. Kivete su postavljene na elektroporator i izložene električnom pulsom od 2200 V u trajanju od oko 5 ms. Nakon električnog pulsa u kivetu za elektroporaciju sam dodao 500 µl pregrijanog medija SOC (tablica 2), resuspendirao i čitavu smjesu prebacio u obilježenu epruvetu. Tako transformirane stanice sam inkubirao na tresilici 200 o/min 3 sata na 28 °C radi regeneracije integriteta bakterijskih membrana. Nakon inkubacije bakterije sam nasadio na kruti medij LB kako bih izvršio selekciju uspješno transformiranih bakterija.

3.2.14 Floral dip

Floral dip je tehnika koja se koristi za transformaciju biljaka *A. thaliana* u laboratorijskim uvjetima (Bent, 2006). Cvatovi biljke uranjaju se u suspenziju agrobakterija u kojima se nalazi željeni binarni vektor s T-DNA koja sadrži sekvencu DNA s kojom se želi transformirati biljka. Prilikom transformacije T-DNA se prenosi i nasumično ugrađuje u genom jajne stanice ili zigote. Nakon transformacije, zigota izraste u transgenični embrio koji je najvažniji dio sjemenke. Kad se takva sjemenka posadi iz nje će narasti transgenična biljka.

Za umnažanje bakterija *A. tumefaciens* u svrhu transformacije biljaka metodom *floral dip* prethodno transformirane agrobakterije, vektorima pHOV:AtILL2-GFP odnosno pHOV:AtILL2, uzgajao sam u tekućem mediju LB (tablica 1) s antibioticima rifampicin 50 mg/l, gentamicin 50 mg/l i streptomycin 100 mg/l. Nakon toga sam 500 µl uzgojenih bakterija dodao u 200 ml tekućeg medija LB (bez antibiotika) i inkubirao 24 h na 28 °C. Poslije inkubacije suspenziju bakterija sam centrifugirao 20 min na 5500 g. Odlio sam supernatant (medij) a talog sam resuspendirao u 200 ml vodene otopine saharoze i deterdženta Silwet (5% saharoza; 0,003 % deterdženta Silwet). U takvu bakterijsku otopinu uronjene su biljke *A.*

thaliana ekotipa Col-0 i WS koje su bile u fazi cvjetanja. Nakon 2 min inkubacije cvijetića i cvjetnih pupova u agrobakterijskoj suspenziji biljke su umotane u prozirnu najlonsku vrećicu i inkubirane u tami 24 h kako bi se povećao učinak transformacije. Potom sam s biljaka skinuo vrećice i dalje ih uzgajao u komori za uzgoj biljaka u uvjetima dugog dana (16 h dan / 8 h mrak). Tehnikom *floral dip* svaku biljku sam transformirao dva puta (s razmakom od tjedan dana). Nakon druge transformacije biljke sam uzgajao 3 tjedna. Zatim sam skupio sjemenke transformanata te ih nakon sterilizacije selekcionirao na hranjivoj podlozi MS uz dodatak 50 mg/l higromicina B.

3.2.15 Fluorescencijska mikroskopija

Fluorescencijska mikroskopija je tehnika koja omogućava praćenje supstanci koje imaju svojstvo fluorescencije, odnosno apsorbiraju svjetlost manje valne duljine a emitiraju svjetlost veće valne duljine. Na taj se način u biološkim uzorcima može pratiti lokalizacija pojedinih proteina koji su fuzionirani s nekom vrstom tvari koje fluoresciraju. Najčešće se u tu svrhu koristi zeleni fluorescentni protein (engl. green fluorescent protein; GFP). Spajanjem gena *GFP* s genom čija se lokalizacija želi pratiti, eksprimira se fuzijski protein te se zbog fluorescencije GFP-a može pratiti mjesto njegove lokalizacije u stanici kao i interakcija s drugim proteinima u stanici.

Fluorescencijskim mikroskopom promatrao sam stanice korijena transgeničnih biljaka *A. thaliana* ekotipa WS koje ekspimiraju fuzijski protein *AtILL2-GFP* čiji se geni nalaze pod konstitutivnim promotorom 35S. Kao negativna kontrola služile su biljke divljeg tipa WS koje nemaju gen *GFP*. Sa selektivne podloge uzeo sam klijance i stavio na predmetno stakalce u kapljicu pufera PBS-a (tablica 10) i prekrrio pokrovnim stakalcem. Koristio sam fluorescencijski mikroskop *BX51* (Olympus), objektiv *UplanFI 20x NA 0,25* (Olympus). Kao izvor svjetlosti korištena je UV lampa u kombinaciji s filterom *FITC* (ekscitacijske valne duljine 467 – 498 nm i emisijske valne duljine 513 – 536 nm).

Tablica 10 Sastav pufera PBS (pH 7,4)

Sastojci pufera	Koncentracija (mol/l)
NaCl	0,14
KCl	0,0027
Na ₂ HPO ₄	0,010

4 Rezultati

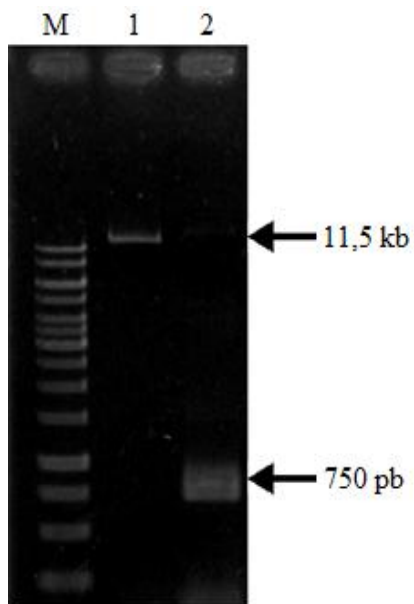
4.1 Stvaranje transgeničnih biljaka *A.thaliana* ekotip WS i Col-0 s konstitutivnom ekspresijom gena *At ILL2* i fuzijskog gene *AtILL2-GFP*

4.1.1 Konstrukcija vektora pHOV:AtILL2-GFP

Nakon umnažanja gena *GFP* produkt reakcije PCR sam detektirao elektroforezom u 1% agaroznom gelu (slika 10, uzorak 2). Na gelu se vidi fragment DNA, veličine ≈ 750 pb što odgovara očekivanoj veličini (752 pb) s dodacima od 15 pb na 5' i 3' krajevima. Fragment sam pročistio iz agaroznog gela. Koncentracija pročišćenog fragmenta je bila 40,5 ng/ μ l i dalje je korišten u reakciji *in-fusion*.

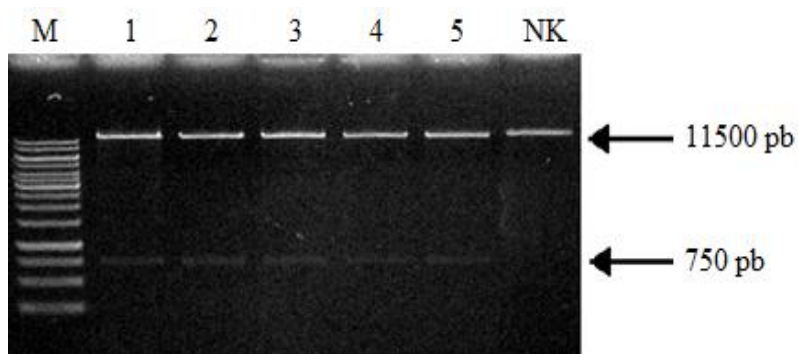
Vektor pHOV-AtILL2 lineariziran je restrikcijom enzimom *SaI*. Nakon restrikcijske digestije plazmid sam detektirao elektroforezom u 1% agaroznom gelu (slika 10, uzorak 1). Na gelu se vidi fragment DNA, veličine ≈ 11500 pb što odgovara veličini lineariziranog vektora pHOV-AtILL2 (11626 pb). Fragment sam pročistio iz agaroznog gela. Koncentracija pročišćenog fragmenta je bila 11,2 ng/ μ l, i dalje je korišten u reakciji *in-fusion*.

Za kloniranje gena *GFP* u vektor pHOV-AtILL2 napravljena je reakcija *in-fusion*. Bacterije *E. coli* transformirao sam smjesom reakcije *in-fusion*, a kao kontrolu napravio sam transformaciju *E. coli* s lineariziranim vektorom pHOV-AtILL2. Nakon transformacije, na selekcijskoj ploči na koju sam nasadio bakterije transformirane s produktom reakcije *in-fusion* naraslo je preko 100 kolonija. Na ploči na kojoj sam nasadio kontrolne bakterije bilo je 20-ak kolonija, što potvrđuje visoku uspješnost linearizacije vektora pHOV-AtILL2 i uspješnost reakcije *in-fusion*.



Slika 10 Detekcija gena *GFP* umnoženog rekacijom PCR i vektora pHOV-AtILL2 lineariziranog restriksijskom digestijom, na 1% agaroznom gelu. M – DNA marker (*Gene ruler 1 kb DNA ladder*), 1 – linearizirani vektor pHOV-AtILL2, 2 – gen *GFP* umnožen rekacijom PCR.

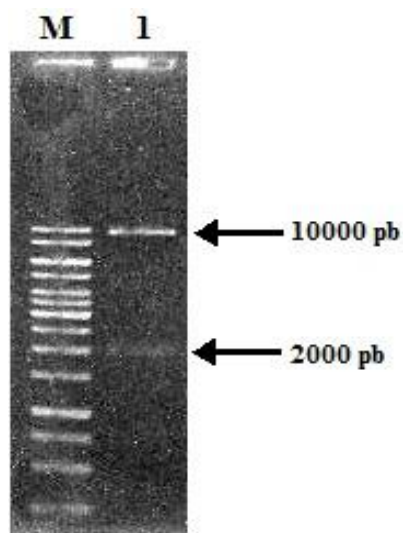
Na ploči na kojoj su narasle kolonije transformiranih bakterija, odabrao sam i obilježio pet kolonija. Obilježene kolonije sam uzgojio u tekućem mediju LB te sam iz njih izolirao rekombinantne plazmide metodom minipreparacije. Plazmide sam potom podvrgnuo restriksijskoj digestiji enzimom *SaI*, nakon koje je slijedila elektroforeza u 1% agaroznom gelu (slika 11) radi potvrde autentičnosti plazmida. Detektirao sam fragmente veličine ≈ 750 pb i ≈ 11500 pb što je u skladu s očekivanim veličinama fragmenata (tablica 9). Kao negativnu kontrolu koristio sam pHOV-AtILL2 bez gena *GFP*, u tom uzorku nisam detektirao fragment veličine ≈ 750 pb (slika 11 uzorak NK) što dodatno potvrđuje uspješnost ugradnje gen *GFP* u vektor pHOV-AtILL2.



Slika 11 Detekcija fragmenata nakon restriksijske digestije vektora pHOV:AtILL2-GFP, na 1% agaroznom gelu. M – DNA marker (*Gene ruler 1 kb DNA ladder*), 1-5 – replike pHOV:AtILL2-GFP izoliranih iz pet neovisnih transformanata *E. coli*, i restriktiranih restriksijskim enzimom *SaI*. U uzorcima se uočavaju fragmenti veličine ≈ 750 pb što odgovara veličini gena *GFP*, i fragmenti veličine ≈ 11500 pb što odgovara veličini ostatka plazmida. NK predstavlja negativnu kontrolu odnosno vektor pHOV:AtILL2, tu se uočava samo jedan fragment veličine ≈ 11500 što odgovara veličini lineariziranog vektora. Nakon restriksijske digestije uzorci su analizirani u 1% agaroznom gelu i obojani etidij bromidom.

4.1.2 Transformacija bakterija *Agrobacterium tumefaciens*

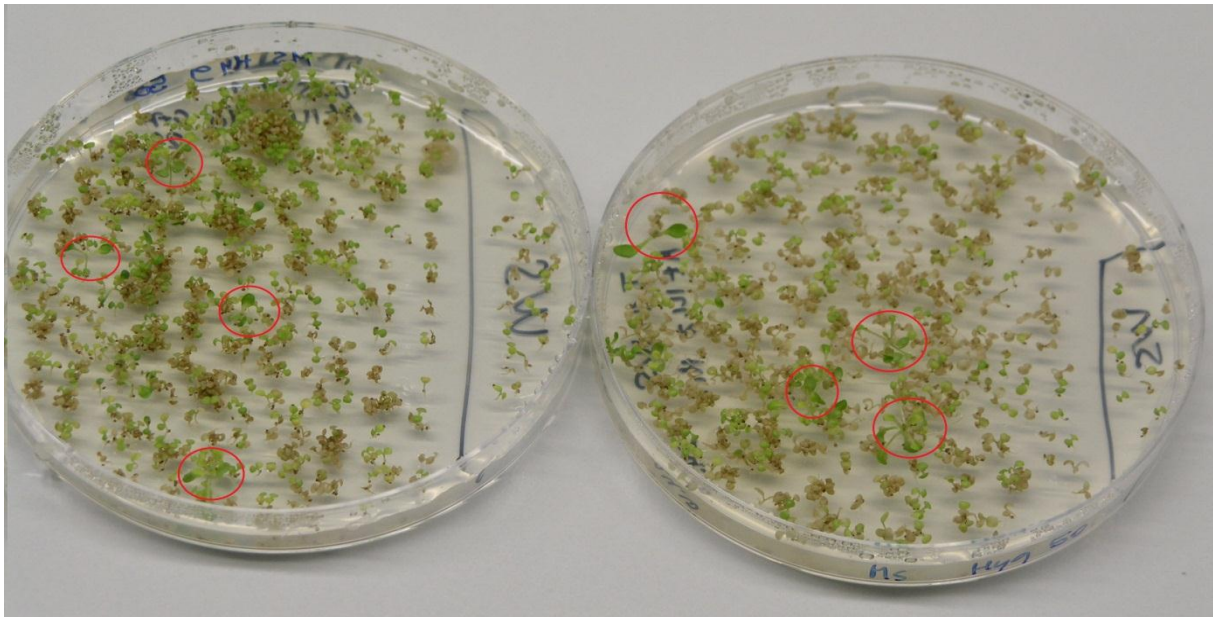
Agrobakterije sam transformirao vektorima pHOV:AtILL2 i pHOV:AtILL2-GFP metodom elektroporacije. Vrijeme izloženosti električnom pulsu tijekom transformacije je bilo 5,1 ms. Nakon što su narasle bakterijske kolonije presađene su u tekući medij te sam iz agrobakterija izolirao plazmidnu DNA metodom minipreparacije. Plazmidnu DNA sam analizirao metodom restrikcijske analize i elektroforeze u 1% agaroznom gelu. Identifikacijom fragmenata ≈ 750 pb što odgovara veličini gena *GFP* (752 pb), i fragment veličine ≈ 11500 što odgovara veličini ostatka vektora (11626 pb) potvrdio sam autentičnost plazmida pHOV:AtILL2-GFP. Plazmid pHOV:AtILL2 sam dodatno restriktirao enzimom *HindIII* te sam nakon elektroforeze identificirao fragmente veličine ≈ 10000 pb i ≈ 2000 pb (slika 12). Usporedbom s veličinom očekivanih fragmenata (tablica 9) potvrđena je autentičnost plazmida pHOV:AtILL2.



Slika 12 Detekcija fragmenata vektora pHOV:AtILL2 nakon restrikcijske digestije enzimom *HindIII*, u 1% agaroznom gelu. M – marker. 1 – restriktirani plazmid pHOV:AtILL2.

4.1.3 Transformacija i probiranje transgeničnih biljaka *Arabidopsis thaliana*

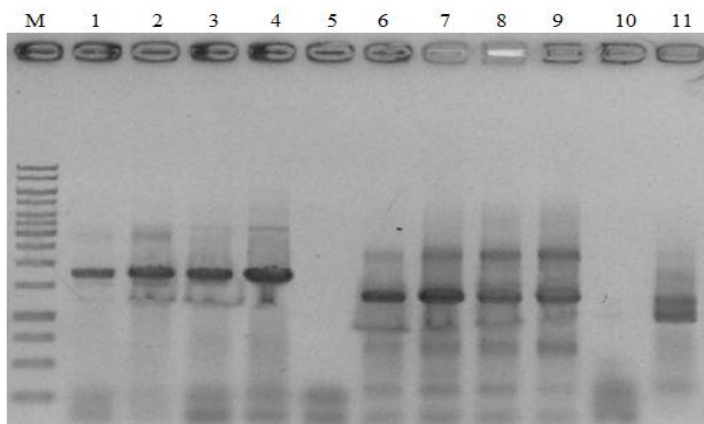
Biljke *A. thaliana* ekotipa Col-0 i WS transformirao sam agrobakterijama koje sadrže binarni vektor pHOV:AtILL2 ili pHOV:AtILL2-GFP. Transformaciju sam napravio metodom *floral dip*. Nakon transformacije sakupio sam sjeme T_0 generacije i selektirano na selektivnim podlogama s higromicinom B kako bi se izdvojile uspješno transformirane biljke (slika 13).



Slika 13 Selekcija transformanata *A. thaliana* na selekcijskim podlogama s higromicinom B. Lijevo na slici su transformanti transformirani agrobakterijama s vektorom pHOV:AtILL2 dok se desno nalaze transformanti transformirani agrobakterijama s vektorom pHOV:AtILL2-GFP. Crvenim kružnicama su označene uspješno transformirane biljke. Kod njih se uočava znatno bujniji rast korijena i intenzivnija zelena boja. Netransformirane biljke nemaju otpornost na higromicin B i nakon klijanja ne mogu rasti na hranjivoj podlozi s dodatkom 50 mg/l higromicina B.

4.1.4 Detekcija transgena *AtILL2* i *AtILL2-GFP* u transgeničnim biljkama *A. thaliana*

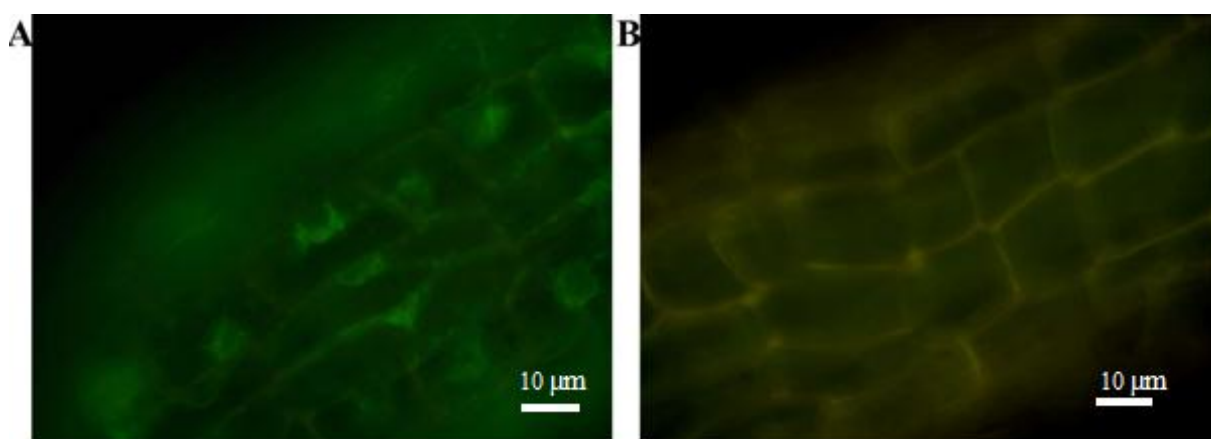
Nakon selekcije na podlogama s higromicinom B iz transformanata sam izolirao genomsku DNA metodom Rapid DNA preparation. Izolirana genomsku DNA je umnožena reakcijom PCR s početnicama AtILL2fw, GFP_{rev} ili AtILL2rev (tablica 5) radi provjere njihove prisutnosti odnosno uspješnosti transformacije. PCR produkti su analizirani elektroforezom u 1% agaroznom gelu (slika 14) te je potvrđena prisutnost transgena *AtILL2* i rekombinantnog gena *AtILL2-GFP*.



Slika 14 Detekcija gena *AtILL2* i *AtILL2-GFP* umnoženih reakcijom PCR, u 1% agaroznom gelu. M – marker, 1-4 – fragmenti umnoženi iz transformanata *A.thaliana* ekotip WS transformiranih s *AtILL2-GFP*, 6-9 – fragmenti umnoženi iz transformanata *A. thaliana* ekotip WS transformiranih s *AtILL2*, 5 i 10 – negativna kontrola , 11 – pozitivna kontrola (pHOV:AtILL2)

4.1.5 Detekcija fuzijskog proteina AtILL2-GFP u transgeničnim biljkama *A. thaliana*

Nakon što sam potvrdio prisutnost gena *AtILL2* i *AtILL2-GFP* klijance uročnjaka sam analizirao fluorescencijskom mikroskopijom da potvrdim ekspresiju gena. U biljčicama transformiranim s *AtILL2-GFP* uočio sam fluorescenciju fuzijskog proteina *AtILL2-GFP* (slika 15 A) što predstavlja dokaz da biljke uspješno ekspimiraju spomenuti fuzijski protein čime sam nedvojbeno potvrdio uspješnost transformacije biljaka *A. thaliana*. S druge strane na slici 15 B je preparat biljke divljeg tipa koji je služio kao kontrola. Na tom preparatu se ne uočava fluorescencija karakteristična za GFP.



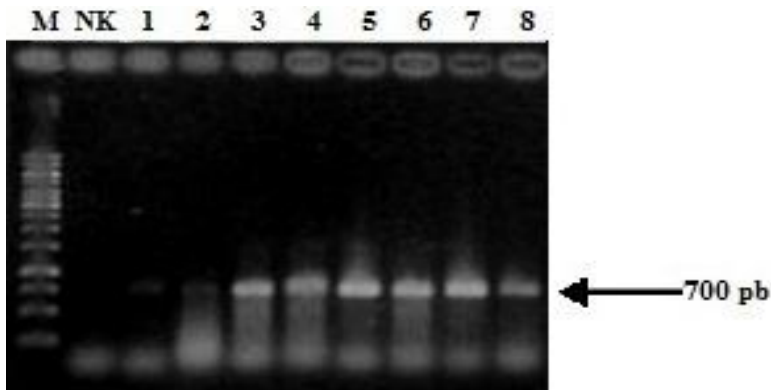
Slika 15 Stanice korijena *A.thaliana* ekotip WS pod fluorescencijskim mikroskopom. A – stanice korijena transformirane vektorom s *AtILL2-GFP*. Uočava se fluorescencija u području oko jezgre. B – stanice korijena divljeg tipa. Uočava se pozadinska fluorescencija a fluorescencija karakteristična za GFP izostaje. Skala je 10 µm

4.2 Analiza mutanata *A. thaliana* s utišanom ekspresijom gena *AtILR1*, *AtILL2* i *AtIAR3*

Prisustvo mutiranih gena *AtILR1*, *AtILL2* i *AtIAR3* u jednostrukim mutantima (*ilr1-1*; *ill2-1*; *iar3-2*); dvostrukoj mutanti (*ill2-1/iar3-2*); i trostrukoj mutanti (*ilr1-1/ill2-1/iar3-2*) *A.thaliana* ekotip WS potvrdio sam provođenjem PCR-a s gen specifičnim početnicama (tablica 6) i selekcijom na podlozi s dodatkom odgovarajućeg antibiotika (tablica 7). Mutacije u genima *AtILR1* i *AtIAR3* potvrdio sam sekvenciranjem.

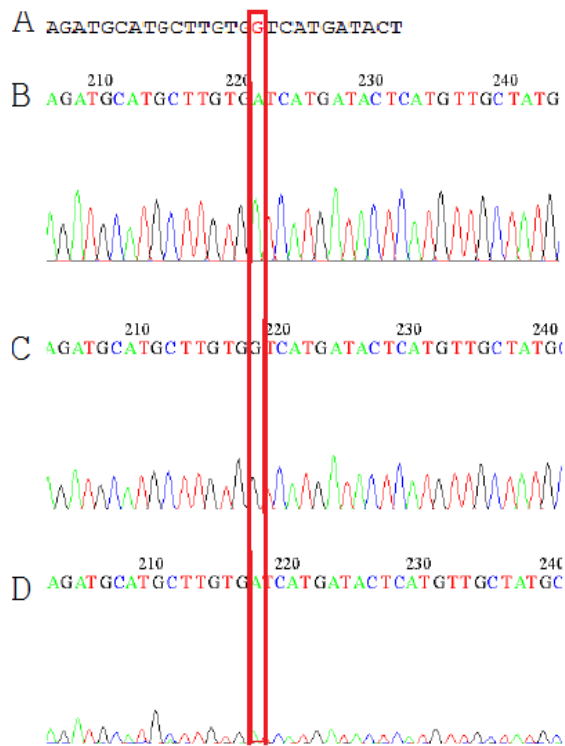
4.2.1 Mutante gena *AtILR1*

Gen *AtILR1* sam umnožio reakcijom PCR a produkte sam analizirao gel elektroforezom (slika 16). U biljkama divljeg tipa, jednostrukim, dvostrukim i trostrukim mutantama detektiran je fragment veličine ≈ 700 pb što odgovara veličini očekivanog fragmenta 696 pb. (tablica 6)



Slika 16 Detekcija gena *AtILR1* umnoženog reakcijom PCR u divljem tipu, jednostrukim, dvostrukoj i trostrukoj mutanti, na 1% agaroznom gelu. M – marker, NK – negativna kontrola, 1-2 – divlji tip (*A.thaliana* ekotip WS), 3 –mutanta (*ilr1-1*), 4 – *iar3-2*, 5 – mutanta *ill2-1*, 6 – dvostruka mutanta (*ill2-1/iar3-2*), 7-8 – trostruke mutante (*ilr1-1/ill2-2/iar3-2*).

Sekvenciranjem je u jednostrukim mutantama (*ilr1-1*) i trostrukim mutantama (*ilr1-1/ill2-2/iar3-2*) potvrđeno prisustvo točkaste mutacije GGT u GAT koja uzrokuje promjenu aminokiselina Gly u aminokiselinu Asp na poziciji 139 (Gly139Asp) (slika 17). Mutacija nije uočena kod biljaka divljeg tipa, mutante *iar3-2* i *ill2-1*, dvostruke mutantne (*ill2-1/iar3-2*). Pikovi kod nukleotida u kojima se pojavljuje točkasta mutacija su vrlo jasni, nema nikakvih preklapanja te ne postoji pozadinski šum što potvrđuje da su biljke u kojima je detektirana mutacija nosioci bialelnih mutacija za gen *AtILR1*, odnosno homozigoti.

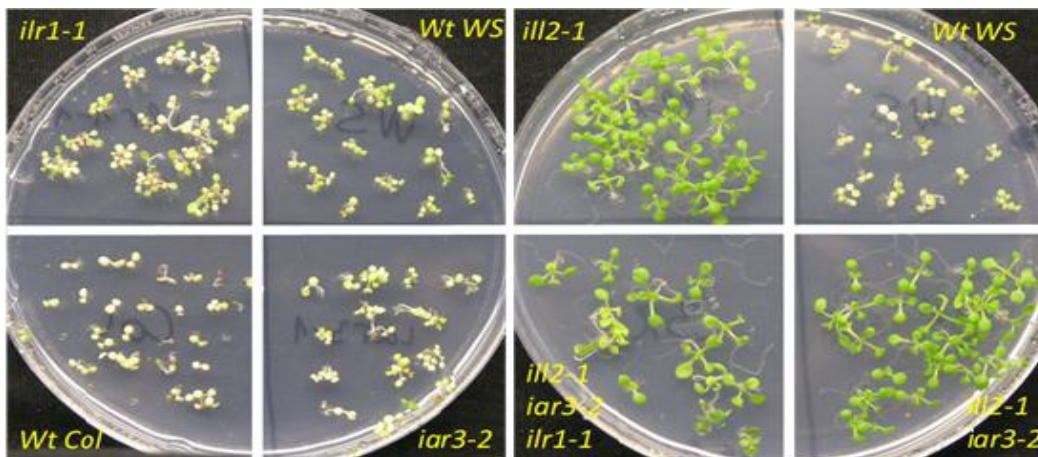


Slika 17. Kromatogram sekvenca gena *AtILL1*. A – Dio sekvence divljeg tipa gena *AtILL1*, B – kromatogram sekvenca gena *AtILL1* jednostruke mutante (*ilr1-1*); C – kromatogram gena *AtILL1* dvostruke mutante (*ill2-1/iar3-2*), D – kromatogram gena *AtILL1* trostruke mutante (*ilr1-1/ill2-2/iar3-2*).

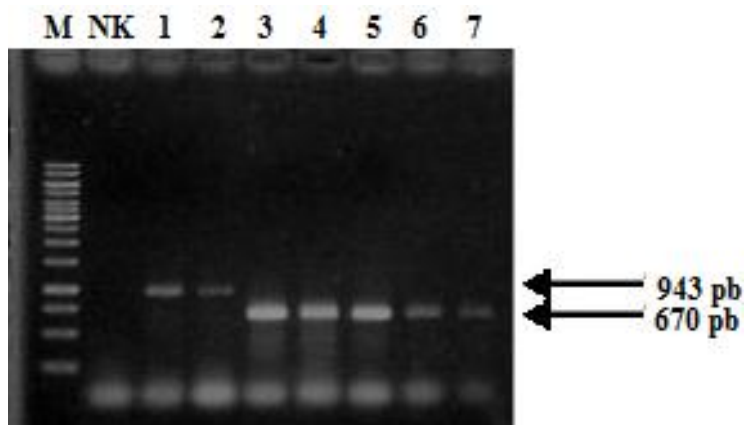
4.2.2 Mutante gena *AtILL2*

Mutacija u genu *AtILL2* nastala je insercijom T-DNA. Budući da se na T-DNA nalazi gen za otpornost na kanamicin sve sjemenke s T-DNA insercijom moraju rasti na hranjivoj podlozi s kanamicinom. Sjemenke su nakon sterilizacije nasađene na selekcijsku podlogu (slika 18) te su prema očekivanju sve biljčice divljeg tipa i jednostruke mutante *iar3-2* i *ilr1-1* bile osjetljive na kanamicin dok su sve biljke jednostruke mutante *ill2-1* te dvostruke *iar3-2/ill2-1* i trostruke mutante *ilr1-1/ill2-1/iar3-2* bile otporne.

Gen *AtILL2* je umnožen reakcijom PCR. U reakciji su korištene tri početnice (tablica 6), a produkti reakcije su analizirali gel elektroforezom (slika 19). U svim uzorcima osim u NK uočava se umnažanje. U divljem tipu (uzorak 1 i 2) detektira se fragment veličine ≈ 1000 pb što odgovara veličini očekivanog fragmenta divljeg tipa gena (943 pb). Kod ostalih uzoraka (3-7) se detektira fragment veličine ≈ 700 pb što odgovara veličini fragmenta mutiranog oblika gena (670 pb) što potvrđuje prisustvo mutacije u genu *AtILL2*. Pojavljivanje samo jednog benda u uzorcima 3 – 7 potvrđuje da se radi o homozigotnim mutantnim biljkama nosiocima bialelnih mutacija za gen *AtILL2* (u slučaju heterozigota pojavljivala bi se dva benda, jedan koji odgovara veličini fragmenta divljeg tipa gena, a drugi koji odgovara veličini fragmenta mutiranog oblika gena).



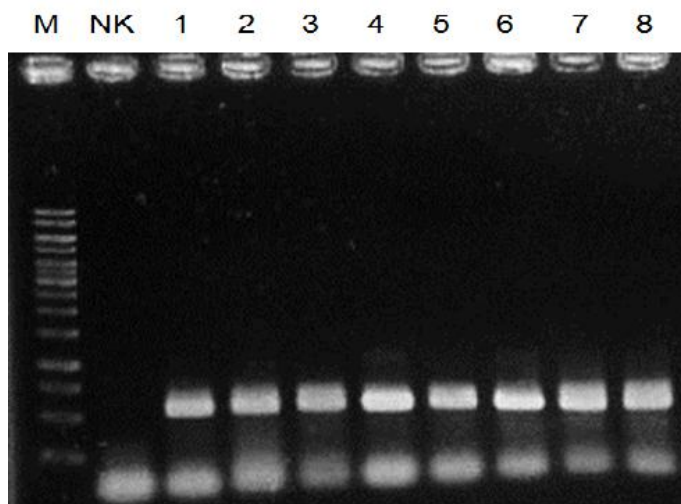
Slika 18 Selekcija biljaka na podlozi s kanamicinom. Biljke, *ill2-1*, *iar3-2/ill2-1* i *ilr1-1/ill2-1/iar3-2* koji imaju insercijsku mutaciju u genu *AtILL2*, obilježenu genom za razistenciju na kanamicin, imaju znatno bujniji rast i intenzivniju zelenu boju. Biljke koje nemaju mutirani gen *ILL2* pokazuju osjetljivost na kanamicin u obliku zakržljalog rasta i gubitka pigmentacije.



Slika 19 Umnažanje gena *AtILL2* i provjera prisutnosti mutacija. M – marker, NK – negativna kontrola, 1 – divlji tip (*A.thaliana* ekotip WS), 2 –mutanta *iar3-2*, 3 – mutanta *ill2-1*, 4-5 – dvostruke mutante (*ill2-1/iar3-2*) 6-7 – trostruke mutante (*ilr1-1/ill2-2/iar3-2*).

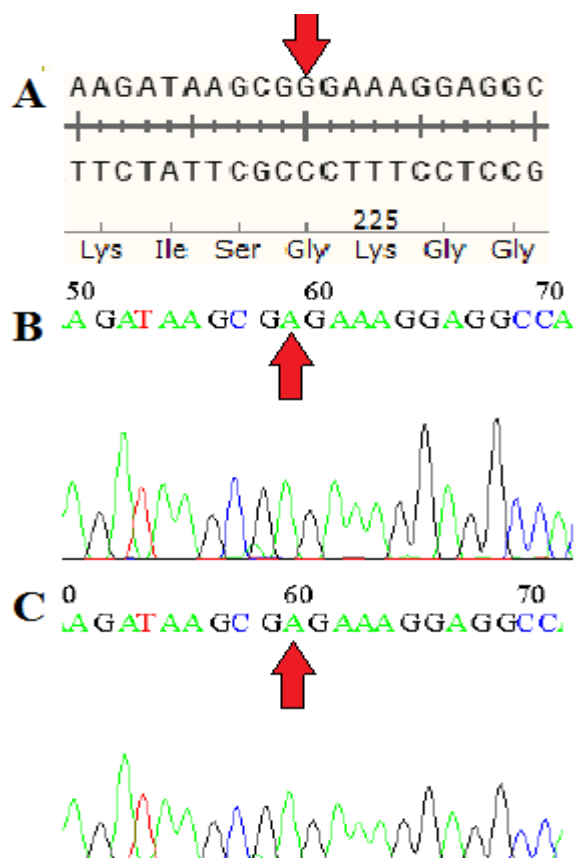
4.2.3 Mutante gena *AtIAR3*

Gen *AtIAR3* je umnožen reakcijom PCR, a produkti reakcije su analizirali gel elektroforezom (slika 20). U svim uzorcima osim u NK detektiran je fragment veličine ≈ 500 pb što odgovara očekivanoj veličini fragmenta (513 pb) (tablica 6). Analizirane su biljke *A. thaliana* ekotipa WS, divlji tip, jednostruka (*iar3-2*), dvostruka (*ill2-1/iar3-2*) i trostruka mutanta (*ilr1-1/ill2-1/iar3-2*).



Slika 20 umnažanje gena *AtIAR3* i provjera prisutnosti mutacija M – marker, NK – negativna kontrola, 1-3 – divlji tip (*A.thaliana* ekotip WS), 4 – *iar3-2*, 5-7 – mutanta *ill2-1/iar3-2* 8 – trostruke mutante *ilr1-1/ill2-2/iar3-2*.

Sekvenciranjem je u dvostrukim mutantama (*ill2-1/iar3-2*) i trostrukim mutantama (*ilr1-1/ill2-1/iar3-2*) detektirana točkasta mutacija GGG → GAG što dovodi do besmislene mutacije Gly224Glu (slika 21).



Slika 21 Kromatogram sekvence gena *AtIAR3*. A – Dio sekvence divljeg tipa gena *AtIAR3*, B – kromatogram gena *AtIAR3* dvostruke mutante (*ill2-1/iar3-2*), C – kromatogram gena *AtIAR3* trostruke mutante (*ilr1-1/ill2-2/iar3-2*).

5 Rasprava

Iako se o IAA-ak konjugat hidrolazama zna relativno malo, dosadašnji rezultati nedvojbeno ukazuju na značaj IAA-ak konjugat hidrolaza i njihove pravilne ekspresije u regulaciji homeostaze auksina. Trostruka mutanta *ilr1-1/ill2-1/iar3-2* u kojoj hidrolaze ILR1, ILL2 i IAR3 imaju smanjenu ili nikakvu aktivnost pokazuje fenotip koji je karakterističan za biljke u kojima je smanjena razina IAA (Rampey *i sur.*, 2004). Uzgojem uročnjaka u uvjetima suše pojačava se ekspresija gena *IAR3* kao i endogena razina slobodnog IAA koja posljedično dovodi do inhibicije rasta korijena i poticanja rasta bočnog korijena što predstavlja prilagodbu biljke na uvjete suše (Kinoshita *i sur.*, 2012). Mutanta *iar3-5*, koja ne posjeduje hidrolazu IAR3 uslijed suše i osmotskog stresa, pokazuje 40 % manje preživljenje u uvjetima osmotskog stresa u odnosu na divlji tip, što potvrđuje značaj gena *IAR3* u prilagodbi biljke na stresne uvjete (Kinoshita *i sur.*, 2012).

Temperatura je također faktor koji dovodi do promjena u razinama konjugata i slobodnog IAA. Uzgojem klijanaca uročnjaka na temperaturi od 29 °C dolazi do produženog rasta hipokotila u odnosu na biljku uzgajanu na 20 °C. Ovaj temperaturno-ovisni produženi rast hipokotila u potpunosti izostaje kod mutanata s poremećenom sintezom ili transportom IAA, što ukazuje na promijenjenu dinamiku auksina, njegovih konjugata kao i aktivnosti njegovih hidrolaza u uvjetima povećane temperature (Gray *i sur.*, 1998). Također, postoji niz dokaza o sudjelovanju IAA-ak konjugat hidrolaza u uvjetima biotskog i abiotskog stresa (Tognetti *i sur.*, 2010).

Stoga su u ovom radu, za potrebe istraživanja funkcije IAA-ak konjugat hidrolaza, njihove vremenske i prostorne ekspresije te njihovog utjecaja u homeostazi auksina, regenerirane transgenične biljke *A. thaliana* ekotipa WS i Col-0 s pojačanom ekspresijom gena *AtILL2* i rekombinantnog gena *AtILL2-GFP*. Također, u radu su analizirane biljke *A. thaliana* ekotipa WS s utišanom ekspresijom gena *AtILR1*, *AtILL2* i *AtIAR3*, identificirane su homozigotne biljke nosioci bialelnih mutacija, te su uspješno izdvojene jednostruke mutante *ilr1-1* s mutacijom u genu *AtILR1*, insercijske mutante *ill2-2* s mutacijom u genu *AtILL2* i *iar3-2* s mutacijom u genu *AtIAR3*; dvostruka mutanta *ill2-1/iar3-2* s mutiranim genima *AtILL2* i *AtIAR3* i trostruka mutanta *ilr1-ill2-1/iar3-2* koja ima mutacije u sva tri gena.

Biljke s pojačanom ekspresijom gena *AtILL2* i gena *AtILL2-GFP* su regenerirane kombinacijom tehnologije *in-fusion*, kojom je konstruiran binarni vektor pHOV:AtILL2-GFP pogodan za transformaciju uročnjaka, i metode *floral dip* kojom su biljke *A. thaliana* transformirane agrobakterijama s binarnim plazmidima pHOV:AtILL2 ili pHOV:AtILL2-GFP.

Nakon selekcije transformanata na podlozi s higromicinom B, uspješnost transformacije je potvrđena uspješnim umnažanjem transgena PCR-om i fluorescencijskom mikroskopijom kojom se u stanicama korijena biljaka transformiranih s *AtILL2-GFP* potvrdila ekspresija fuzijskog proteina AtILL2-GFP. Fluorescencija fuzijskog proteina AtILL2-GFP je u tim stanicama uočena u području oko jezgre što je u skladu s izvješćem (Sanchez Carranza *i sur.*, 2016) da hidrolaza ILL2 posjeduje aminokiselinski slijed koji ju lokalizira u ER.

Prema izvješću (Rampey *i sur.*, 2004) jednostruka mutanta *ill2-1* ne pokazuje smanjenu osjetljivost na IAA-Ala koji je preferentni supstrat hidrolaze ILL2 (Rampey *i sur.*, 2004) te se smatra da hidrolaze IAR3 i ILR1 nadomještaju nedostatak hidrolaze ILL2, ukoliko bi se korištenjem biljaka s pojačanom ekspresijom gena *AtILL2*, regenerirane u ovom radu, pokazalo da pojačana ekspresija *AtILL2* dovodi do povećane osjetljivosti biljke na konjugat IAA-Ala to bi potvrdilo konstataciju o preklapajućim funkcijama hidrolaza te bi tvrdnja da ILR1 i IAR3 mogu kompenzirati nedostatak ILL2 dodatno dobila na težini. Međutim kod tog istraživanja će se morati voditi računa o posebnim karakteristikama konjugata IAA-Ala, jer je uočeno da trostruka mutanta *ilr1-1/ill2-1/iar3-2* djelimično zadržava osjetljivost na konjugat IAA-Ala što sugerira postojanje alternativnog puta aktivacije konjugata IAA-Ala koji je neovisan o hidrolizi posredovanoj hidrolazama ILR1, ILL2 i IAR3. Također, postoje izvješća koje upućuju na to da konjugat IAA-Ala posjeduje auksinsku potentnost i u konjugiranom obliku budući da se radi o aminokiselini s malim bočnim ogrankom (Woodward i Bartel, 2005). Stoga, morat će se voditi briga o gore navedenim činjenicama kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati.

Nadalje, prema tvrdnjama (Rampey *i sur.*, 2004) razina ekspresije hidrolaze ILL2 je jako mala u korijenu, što je zanimljivo budući da se konjugat IAA-Leu, supstrat hidrolaze ILL2 u uvjetima *in vitro* (LeClere *i sur.*, 2002), nalazi u visokim koncentracijama u korijenu (Korasick *i sur.*, 2013). Biljke s pojačanom ekspresijom ILL2 u korijenu, regenerirane u ovom radu mogu imati transgen eksprimiran u korijenu, za razliku od divljeg tipa biljaka kod kojih je ILL2 eksprimirana u organima koji se nalaze iznad zemlje. Stoga transgenične biljke mogu poslužiti da se ispita je li IAA-Leu *in situ* supstrat hidrolaze ILL2. Ukoliko daljnja istraživanja pokažu da je kod takvih biljaka inhibiran rast korijena te potaknuto stvaranje bočnog korijenja (uslijed prekomjerne hidrolize IAA-Leu i posljedičnog povećanja endogene razine IAA) to bi potvrdilo *in situ* interakciju između IAA-Leu i ILL2 te bi razlog za smanjenu ekspresiju ILL2 u korijenu trebalo tražiti novim istraživanjima.

Mutante u ovom radu su izdvojene kombinacijom metoda PCR-a, elektroforeze i sekvenciranja. PCR-om u kombinaciji s elektroforezom su identificirane homozigotne biljke te su izdvojene nul mutante *ill2-1* koje imaju insercijsku mutaciju, dok je sekvenciranje bilo

potrebno da se identificiraju točkaste mutacije u genima *ILR1* i *IAR3* i izdvoje mutante koje imaju mutirane gene *ILR1* i *IAR3*. Sekvenciranjem se u mutantama koje imaju mutirani gen *IAR3* identificirala točkasta mutacija koja uzrokuje promjenu aminokiseline Gly u Glu na poziciji 224 (Gly224Glu) što je u skladu s izvješćem (Rampey *i sur.*, 2004) međutim ne podudara se s rezultatima (Davies *i sur.*, 1999) koji tvrde da do navedene mutacije dolazi na poziciji 124 (Gly124Glu). Mutirana aminokiselina se prema (https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=aa_sequence&id=1009105192) nalazi katalitičkoj domeni proteina te vrlo vjerojatno utječe na aktivnost hidrolaze budući da se radi o promjeni Gly, aminokiseline s nepolarnim bočnim ogrankom, u aminokiselinu Glu s negativno nabijenim bočnim ogrankom.

Sekvenciranjem gena *AtILR1* iz izdvojenih mutanata ustanovilo se da točkasta mutacija u genu dovodi do promjene aminokiseline Gly u Asp na poziciji 139 (Gly139Asp) što je u skladu s rezultatima koje navodi (Bartel, 1999) međutim rezultati se ne podudaraju s izvješćem (Rampey *i sur.*, 2004) koji tvrdi da mutacija rezultira u promjeni aminokiseline Leu u Arg i pritom ne naglašava točnu poziciju promijenjene aminokiseline. Aminokiselina na poziciji 139 se nalazi u katalitičkoj domeni

(https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=aa_sequence&id=1009120696) te vrlo vjerojatno pridonosi jako smanjenoj aktivnosti enzima ILR1 jer se radi o promjeni aminokiseline s nepolarnim bočnim ogrankom u aminokiselinu s negativno nabijenim bočnim ogrankom.

Također nije isključena mogućnost da uslijed točkaste mutacije hidrolaza mijenja preferencije za supstrat (Ludwig-Müller, 2011). Jednostruka mutanta *iar3-2* pokazuje smanjenu osjetljivost za preferentni supstrat, konjugat IAA-Ala, dok trostruka mutanta *ilr1-1/ill2-1/iar3-2* i dalje posjeduje, doduše vrlo nisku, osjetljivost na IAA-Ala, što se može tumačiti gore spomenutim potencijalnim svojstvom IAA-Ala konjugata da posjeduje auksinsku aktivnost neovisnu o hidrolizi ili pak da mutacija Gly224Glu u genu *AtIAR3* predstavlja propusnu mutaciju te hidrolaza IAR3 u mutantama ipak posjeduje određenu bazalnu aktivnost. Daljnja istraživanja u kojima će se koristiti biljni materijal iz ovog rada su potrebna da razriješe tu dilemu, kao i ulogu hidrolaze ILL2 u odgovoru biljke na abiotski stres.

6 Zaključci

- Sintetiziran je binarni vektor pHOV:AtILL2-GFP pogodan za transformaciju biljke *A.thaliana* u kojem se rekombinantni gen *AtILL2-GFP* nalazi pod kontrolom konstitutivnog promotora 35S.
- Regenerirane su transgenične biljke *A. thaliana* ekotip WS i Col-0, s pojačanom ekspresijom gena *AtILL2* i rekombinantnog gena *AtILL2-GFP*
- Praćenjem fluorescencije rekombinantnog proteina *AtILL2-GFP* potvrđena je njegova lokalizacija u području oko jezgre, što je u skladu s novim istraživanjima da hidrolaza ILL2 lokalizira u endoplazmatskom retikulumu.
- Analizirane su mutante *A. thaliana* ekotipa WS s poremećenom ekspresijom gena *AtILR1*, *AtILL2* i *AtIAR3*.
- U mutanti *ilr1-1* je identificirana mutacija Gly139Asp, te je riješena dilema uslijed nepodudaranja literaturnih podataka o točnoj poziciji mutacije.
- U mutanti *iar3-2* je identificirana mutacija Gly224Glu te je riješena dilema uslijed nepodudaranja literaturnih podataka o točnoj poziciji mutacije.
- Prikupljeno je i pohranjeno sjeme T1 generacije biljaka s pojačanom ekspresijom gena *AtILL2* i *AtILL2-GFP*, i sjeme homozigotnih mutanata *Ill2-1*, *ilr1-1*, *iar3-2*, *iar3-2/ill2-1* te *iar3-2/ill2-1/ilr1-1*

7 Literatura

- Bajguz, A. i Piotrowska, A. (2009) „Conjugates of auxin and cytokinin“, *Phytochemistry*, 70(8), str. 957–969. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.05.006.
- Barratt, N. M., Dong, W., Gage, D. A., Magnus, V. i Town, C. D. (1999) „Metabolism of exogenous auxin by *Arabidopsis thaliana*: Identification of the conjugate N-(indol-3-ylacetyl)-glutamine and initiation of a mutant screen“, *Physiologia Plantarum*, 105(2), str. 207–217. doi: 10.1034/j.1399-3054.1999.105204.x.
- Bent, A. (2006) „*Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method.“, *Methods in Molecular Biology*, 343(1), str. 87–103. doi: 10.1385/1-59745-130-4:87.
- Bertani, G. (1951) „Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*.“, *Journal of Bacteriology*, 62(3), str. 293–300. doi: citeulike-article-id:149214.
- Blakeslee, J. J., Bandyopadhyay, A., Peer, W. A., Makam, S. N. i Murphy, A. S. (2004) „Relocalization of the PIN1 auxin efflux facilitator plays a role in phototropic responses.“, *Plant Physiology*, 134(1), str. 28–31. doi: 10.1104/pp.103.031690.
- Christie, J. M. (2007) „Phototropin Blue-Light Receptors“, *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), str. 21–45. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103951.
- Davies, R. T., Goetz, D. H., Lasswell, J., Anderson, M. N. i Bartel, B. (1999) „IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from *Arabidopsis*.“, *The Plant Cell*, 11(3), str. 365–376. doi: 10.1105/tpc.11.3.365.
- Darwin, C. Darwin, F. (1880) „The power of movement in plants“. London: John Murray.
- Edwards, K., Johnstone, C. i Thompson, C. (1991) „A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis“, *Nucleic Acids Research*, 19(6), str. 1349. doi: 10.1093/nar/19.6.1349.
- Enders, T. A. i Strader, L. C. (2015) „Auxin activity: Past, present, and future“, *American Journal of Botany*, 102(2), str. 180–196. doi: 10.3732/ajb.1400285.
- Gelvin, S. B. (2003) „*Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the ‚gene-jockeying‘ tool.“, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), str. 16–37. doi: 10.1128/MMBR.67.1.16.
- Gocal, G. F., Pharis, R. P., Yeung, E. C. i Pearce, D. (1991) „Changes after Decapitation in Concentrations of Indole-3-Acetic Acid and Abscisic Acid in the Larger Axillary Bud of *Phaseolus vulgaris* L. cv Tender Green.“, *Plant Physiology*, 95(2), str. 344–350. doi: 10.1104/pp.95.2.344.
- Gray, W. M., Ostin, A., Sandberg, G., Romano, C. P. i Estelle, M. (1998) „High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*.“, *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 95(12), str. 7197–7202. doi: 10.1073/pnas.95.12.7197.

Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schnider, U., Keel, C., Wade, J., Walsh, U., O’Gara, F. i Haas, D. (2000) „Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria.“, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2), str. 232–237. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.2.232.

Kasahara, H. (2015) „Current aspects of auxin biosynthesis in plants.“, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(1), str. 34–42. doi: 10.1080/09168451.2015.1086259.

Kim, Y. S., Min, J. K., Kim, D. i Jung, J. (2001) „A soluble auxin-binding protein, ABP57: Purification with anti-bovine serum albumin antibody and characterization of its mechanistic role in the auxin effect on plant plasma membrane H⁺-ATPase“, *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), str. 10730–10736. doi: 10.1074/jbc.M009416200.

Kinoshita, N., Wang, H., Kasahara, H., Liu, J., MacPherson, C., Machida, Y., Kamiya, Y., Hannah, M. A. i Chua, N.-H. (2012) „IAA-Ala Resistant3, an Evolutionarily Conserved Target of miR167, Mediates Arabidopsis Root Architecture Changes during High Osmotic Stress“, *The Plant Cell*, 24(9), str. 3590–3602. doi: 10.1105/tpc.112.097006.

Koncz, C. i Schell, J. (1986) „The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector“, *Molecular and General Genetics*, 204(3), str. 383–396. doi: 10.1007/BF00331014.

Korasick, D. A., Enders, T. A. i Strader, L. C. (2013) „Auxin biosynthesis and storage forms“, *Journal of Experimental Botany*, 64(9), str. 2541–2555. doi: 10.1093/jxb/ert080.

Kowalczyk, S., Jakubowska, A., Zielinska, E. i Bandurski, R. S. (2003) „Bifunctional indole-3-acetyl transferase catalyses synthesis and hydrolysis of indole-3-acetyl-myoinositol in immature endosperm of Zea mays“, *Physiologia Plantarum*, 119(2), str. 165–174. doi: 10.1034/j.1399-3054.2003.00158.x.

Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J. i Zažímalová, E. (2009) „The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters“, *Genome Biology*, 10(12), str. 249. doi: 10.1186/gb-2009-10-12-249.

LeClere, S., Tellez, R., Rampey, R. A., Matsuda, S. P. T. i Bartel, B. (2002) „Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from Arabidopsis“, *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), str. 20446–20452. doi: 10.1074/jbc.M111955200.

Ludwig-Müller, J. (2011) „Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants“, *Journal of Experimental Botany*, 62(6), str. 1757–1773. doi: 10.1093/jxb/erq412.

Ljung, K. (2013) „Auxin metabolism and homeostasis during plant development“, *Development*, 140(5), str. 943–950. doi: 10.1242/dev.086363.

Ljung, K., Hull, A. K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J. i Sandberg, G. (2005) „Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots.“, *The Plant Cell*, 17(4), str. 1090–1104. doi: 10.1105/tpc.104.029272.

Mano, Y. i Nemoto, K. (2012) „The pathway of auxin biosynthesis in plants“, *Journal of Experimental Botany*, 63(8), str. 2853–2872. doi: 10.1093/jxb/ers091.

Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K. -i., Kamiya, Y. i Kasahara, H. (2011) „The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(45), str. 18512–18517. doi: 10.1073/pnas.1108434108.

Michalczyk, L., Ribnicky, D. M., Cooke, T. J. i Cohen, J. D. (1992) „Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures“, *Plant Physiology*, 100(3), str. 1346–1353.

Murasnige, T. i Skoog, F. (1962) „A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures“, *Physiologia Plantarum*, str. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Normanly, J., Grisafi, P., Fink, G. R. i Bartel, B. (1997) „Arabidopsis mutants resistant to the auxin effects of indole-3-acetonitrile are defective in the nitrilase encoded by the NIT1 gene.“, *The Plant Cell*, 9(10), str. 1781–1790. doi: 10.1105/tpc.9.10.1781.

Normanly, J., Slovin, J. P. i Cohen, J. D. (1995) „Rethinking Auxin Biosynthesis and Metabolism.“, *Plant Physiology*, 107(2), str. 323–329. doi: 10.1111/j.1399-3054.1980.tb02643.x.

Novák, O., Hényková, E., Sairanen, I., Kowalczyk, M., Pospíšil, T. i Ljung, K. (2012) „Tissue-specific profiling of the Arabidopsis thaliana auxin metabolome“, *Plant Journal*, 72(3), str. 523–536. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05085.x.

Ostin, A., Kowalczyk, M., Bhalerao, R. P. i Sandberg, G. (1998) „Metabolism of indole-3-acetic acid in Arabidopsis.“, *Plant Physiology*, 118(1), str. 285–296. doi: 10.1104/pp.118.1.285.

Patten, C. L. i Glick, B. R. (1996) „Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid“, *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), str. 207–220. doi: 10.1139/m96-032.

Rampey, R. A., LeClere, S., Kowalczyk, M., Ljung, K., Sandberg, G. i Bartel, B. (2004) „A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during Arabidopsis germination.“, *Plant Physiology*, 135(2), str. 978–988. doi: 10.1104/pp.104.039677.

Sanchez Carranza, A. P., Singh, A., Steinberger, K., Panigrahi, K., Palme, K., Dovzhenko, A. i Dal Bosco, C. (2016) „Hydrolases of the ILR1-like family of Arabidopsis thaliana modulate auxin response by regulating auxin homeostasis in the endoplasmic reticulum.“, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(April), str. 24212–24223. doi: 10.1038/srep24212.

Scott, D. H., Greeley, R., Guest, J. E., Scott, D. H., Fisher, D. S., Solomon, S. C., Hon, R. A. De, Wilson, L., Peale, S. J., Reynolds, R. T. i Morrison, D. (1990) „orange pericarp, a“, *Plant Physiology* 254(1986), str. 998–1000.

Staswick, P. E. (2009) „The Tryptophan Conjugates of Jasmonic and Indole-3-Acetic Acids Are Endogenous Auxin Inhibitors“, *Plant Physiology*, 150(3), str. 1310–1321. doi: 10.1104/pp.109.138529.

Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C. i Suza, W. (2005) „Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid.“, *The Plant Cell*, 17, str. 616–627. doi: 10.1105/tpc.104.026690.

Swarup, R., Marchant, A., Marchant, A., Ljung, K., Ljung, K., Sandberg, G., Sandberg, G., Palme, K., Palme, K., Bennett, M. i Bennett, M. (2001) „Root Apex“, *Genes and Development*, 15(20), str. 2648–2653. doi: 10.1101/gad.210501.2648.

Taiz i Zeiger (2002) „Plant physiology, 3rd edition“, *Cell*, 1, str. 782. Dostupno na: <http://www.amazon.com/dp/0878938567>.

Tam, Y. Y., Epstein, E. i Normanly, J. (2000) „Characterization of auxin conjugates in Arabidopsis. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose“, *Plant Physiology*, 123(2), str. 589–596. doi: 10.1104/pp.123.2.589.

Tognetti, V. B., Van Aken, O., Morreel, K., Vandenbroucke, K., van de Cotte, B., De Clercq, I., Chiwocha, S., Fenske, R., Prinsen, E., Boerjan, W., Genty, B., Stubbs, K. a, Inzé, D. i Van Breusegem, F. (2010) „Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates Arabidopsis architecture and water stress tolerance“, *The Plant Cell*, 22(8), str. 2660–2679. doi: 10.1105/tpc.109.071316.

Woodward, A. W. i Bartel, B. (2005) „Auxin: Regulation, action, and interaction“, *Annals of Botany*, 95(5), str. 707–735. doi: 10.1093/aob/mci083.

Yoder, T. L. (2001) „Amyloplast Sedimentation Dynamics in Maize Columella Cells Support a New Model for the Gravity-Sensing Apparatus of Roots“, *Plant Physiology*, 125(2), str. 1045–1060. doi: 10.1104/pp.125.2.1045.

Zhao, Y. (2010) „Auxin biosynthesis and its role in plant development“, *Annual Review of Plant Biology*, 61, str. 49–64. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112308.

Zhao, Y. (2012) „Auxin biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-Acetic acid in plants“, *Molecular Plant*, 5(2), str. 334–338. doi: 10.1093/mp/ssr104.

Zhao, Y., Hull, A. K., Gupta, N. R., Goss, K. A., Alonso, J., Ecker, J. R., Normanly, J., Chory, J. i Celenza, J. L. (2002) „Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: Involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3“, *Genes and Development*, 16(23), str. 3100–3112. doi: 10.1101/gad.1035402.

https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=aa_sequence&id=1009105192

preuzeto 25.12.2016

https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=aa_sequence&id=1009120696

preuzeto 25.12.2016

<https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/wizard-plus-sv-mini-preps-dna-purification-system-protocol/> preuzeto 20.12.2016

<https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/wizard-sv-gel-and-pcr-cleanup-system-protocol/> preuzeto 20.12.2016

www.clontech.com/xxclt_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17497 preuzeto 20.12.2016

8 Životopis

Rođen sam 30. lipnja 1991. godine u Prizrenu, Republika Kosovo. Osnovnu i srednješkolsku naobrazbu stekao sam u Prizrenu. Po završetku srednje škole, kao strani student sam 2011. godine upisao Prirodoslovno-matematički fakultet na Sveučilištu u Zagrebu, smjer molekularna biologija. Zvanje prvostupnika molekularne biologije stekao sam 2014. godine s temom završnog seminara „Bioaktivne sastavnice hrane i tumori“. Iste godine sam upisao diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom studiranja odradio sam labaratorijsku stručnu praksu u Labaratoriju za biokemiju, Zavoda za biokemiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Praksu sam također radio i u Labaratoriju za biljnu razvojnu biologiju, Zavoda za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

Jako dobro poznajem hrvatski, engleski i albanski jezik, nešto manje bugarski jezik te sam djelomično upoznat s francuskim jezikom. Vrlo sam detaljno upoznat s operativnim sustavom MS Windows te se izvrsno služim programima iz paketa MS Office.

U slobodno vrijeme bavim se šahom, stolnim tenisom i biciklizmom.