



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Ana Mikelić

**ANALIZA NADEKSPRESORSKIH LINIJA
UROČNJAKA (*Arabidopsis thaliana* L.) ZA
AUKSIN-AMIDOHIDROLAZU AtILL2**

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za kemijsku biologiju na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Branke Salopek Sondi i neposrednim voditeljstvom Ane Smolko, dipl. ing. bio. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Fitohormoni u abiotskom stresu kupusnjača: mehanizmi tolerancije i primjena“ (IP-2014-09-4359).

Zahvale

Prvenstveno hvala mentorici dr. sc. Branki Salopek-Sondi što mi je omogućila da se upoznam sa svijetom biljne biokemije te hvala na izrazitoj ljubaznosti i korisnim savjetima.

Veliko hvala neposrednoj voditeljici Ani Smolko na pozitivnom stavu i zaraznom entuzijazmu. Hvala na ukazanom povjerenju, prenesenom znanju i strpljenju tijekom svih faza izrade ovog diplomskog rada. Posebno hvala na savjetima, trudu, pomoći i motivaciji, pogotovo onda kada nije išlo po planu.

Hvala nastavnici doc. dr. sc. Aleksandri Maršavelski na velikoj pomoći oko formalne strane diplomskog ispita i savjetima u vezi pismenog dijela rada.

Hvala mojim kemičarkama i kemičarima što su mi vrijeme studiranja učinili posebnim, hvala na svim zajedničkim kavama i kolačima, izlascima i plesnim satima, OD-ima i SiSK-ovima, razvijanjima fotki, (ne)učenjima, idejama o formiranju žive matrice i ostalim kemijskim forama.

Hvala mojim curama koje su uz mene od kad znam za sebe. Hvala im što me uvijek saslušaju i nakon toga daju najkorisnije *BLTB* savjete. Hvala na potpori, nebrojenim i nezaboravnim druženjima i svemu što smo zajedno proživjele i preživjele tijekom studentskih dana.

Najiskrenije hvala sestri, roditeljima, nonićima i cijeloj obitelji što su mi omogućili da studiram ono što želim i što su uvijek vjerovali u mene daleko više nego ja u samu sebe, hvala na nesebičnoj ljubavi uz koju je sve lakše. Posebno hvala mami na ogromnoj podršci bez koje sigurno ne bih uspjela.

Vaša A.

„So don't change the dizzle, turn it up a little!“

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Biljni hormoni auksini	3
2.1.1. Biosinteza.....	6
2.1.2. Transport.....	6
2.1.3. Degradacija	7
2.1.4. Skladišni oblici.....	7
2.2. Auksin-amidohidrolaze	8
2.2.1. Supstratna specifičnost i aktivnost.....	8
2.2.2. Struktura.....	10
2.2.3. Lokalizacija u stanicima	12
2.3. Auksini u odgovoru na abiotički stres.....	12
2.3.1. Auksinska signalizacija u odgovoru na stres	13
2.3.2. Transport auksina u odgovoru na stres	13
2.3.3. Regulacija enzima uključenih u homeostazu auksina u uvjetima stresa.....	14
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Materijali	16
3.1.1. Kemikalije	16
3.1.2. Nukleotidi i nukleinske kiseline.....	16
3.1.3. Proteini.....	16
3.1.4. Marker veličina.....	17
3.1.5. Antitijela.....	17
3.1.6. Plazmidi	17
3.1.7. Biljka <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
3.1.8. Hranjive podloge.....	21
3.1.9. Komercijalni kompleti.....	22
3.1.10. Instrumenti.....	22
3.1.11. Ostalo	22
3.2. Metode rada s biljnim materijalom.....	23
3.2.1. Sterilizacija sjemena	23

3.2.2. Uzgoj biljnog materijala	23
3.2.3. Prikupljanje i homogenacija biljnog materijala	23
3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama	24
3.3.1. Izolacija genomske DNA	24
3.3.2. Priprema za rad s RNA	24
3.3.3. Izolacija ukupne RNA	25
3.3.4. Određivanje koncentracije otopine RNA	25
3.3.5. Pročišćavanje RNA	26
3.3.6. Sinteza cDNA reakcijom reverzne transkriptaze	27
3.3.7. Lančana reakcije polimeraze (PCR)	28
3.3.8. Agarozna gel-elektroforeza	30
3.4. Metode rada s proteinima	31
3.4.1. Izolacija ukupnih staničnih proteina	31
3.4.2. Priprema gelova za SDS-PAGE	32
3.4.3. SDS-PAGE	33
3.4.4. Bojanje srebrom	34
3.4.5. Western-hibridizacijska analiza	35
3.4.6. Afinitetna kromatografija	37
3.5. Tretmani abiotskim stresorima	39
3.5.1. Test inhibicije rasta korijena	39
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	41
4.1. Analiza genomske DNA	41
4.2. Analiza ukupne RNA	43
4.3. Analiza staničnih proteina	48
4.4. Test inhibicije rasta korijena	54
§ 5. ZAKLJUČAK	60
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	61
§ 7. LITERATURNI IZVORI	63
§ 8. ŽIVOTOPIS	LXVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ANALIZA NADEKSPRESORSKIH LINIJA UROČNJAKA (*Arabidopsis thaliana* L.) ZA AUKSIN-AMIDOHIDROLAZU AtILL2

Ana Mikelić

Biljni hormoni auksini imaju važnu ulogu u biljnom rastu i razvitku te u odgovoru biljaka na čimbenike stresa. Aktivan hormon oslobađa se iz konjugata s aminokiselinama djelovanjem enzima auksin-amidohidrolaza koje sudjeluju u homeostazi auksina. Svrha ovog rada bila je istražiti ulogu auksin-amidohidrolaze AtILL2 iz uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) u odgovoru biljaka na solni i osmotski stres. Analizirane su četiri homozigotne linije *A. thaliana* ekotipa Ws potencijalnih nadekspresora za fuzijski protein AtILL2 s GFP- i/ili His-privjeskom. Prisutnost transgena provjerena je na razini insercije u genomsku DNA, prisutnosti RNA transkripta i rekombinantnog proteina korištenjem slijedećih metoda: PCR, RT-PCR, SDS-PAGE, afinitetna kromatografija i *western-hibridizacijska* analiza. U tri linije potvrđena je prisutnost transgena na razini insercije u genomsku DNA i transkripcije u RNA iako nije dokazana prisutnost rekombinantnih proteina niti u jednoj liniji. Testom inhibicije rasta korijena dokazana je povećana otpornost jedne linije na povišeni salinitet i osmolarnost.

(67 stranica, 20 slika, 14 tablica, 79 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: *Arabidopsis thaliana*, auksin, auksin-amidohidrolaza, linije nadekspresora, osmotski stres, rezistencija, solni stres

Mentor: dr. sc. Branka Salopek-Sondi, zn. savj. trajno zvanje

Neposredni voditelj: Ana Smolko, dipl. ing. bio.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
 2. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović-Cindrić
 3. prof. dr. sc. Davor Kovačević
- Zamjena: doc. dr. sc. Morana Dulić

Datum diplomskog ispita: 27. 02. 2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

ANALYSIS OF AUXIN AMIDOHYDROLASE AtILL2 OVEREXPRESSOR LINES IN *Arabidopsis thaliana* L.

Ana Mikelić

Phytohormones auxins play an important role in plant growth development and abiotic stress responses. The active auxin may be released from the amino acid conjugates by the action of auxin-amidohydrolase enzymes, which thereby participate in the auxin homeostasis. The aim of this study was to investigate the role of auxin-amidohydrolase AtILL2 from *Arabidopsis thaliana* in the plant response to salinity and osmotic stress. Four homozygous lines of *A. thaliana* ecotypes Ws of potential overexpressors for AtILL2 fusion protein with GFP and / or His tags were analyzed. The presence of transgene was verified as insertion into DNA, RNA transcript, and recombinant protein by using PCR, RT-PCR, SDS-PAGE, affinity chromatography and western-hybridization assay. In three lines, the presence of transgene in genomic DNA and RNA transcript was confirmed, although the recombinant protein was not demonstrated in any of the lines. Root growth bioassay confirmed the increased resistance of one line to the examined stressors.

(67 pages, 20 figures, 14 tables, 79 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: abiotic stress resistance, *Arabidopsis thaliana*, auxin, auxin-amidohydrolase, overexpressor line, osmotic stress, salinity stress

Mentor: Dr. Branka Salopek-Sondi, Senior Scientist Tenured

Assistant mentor: Ana Smolko, dipl. ing. bio.

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor
 2. Dr. Iva Juranović-Cindrić, Associate Professor
 3. Dr. Davor Kovačević, Professor
- Substitute: Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Date of exam: 27. 02. 2019.

Ana Mikelić

Diplomski rad

§ 1. UVOD

Biljke čine jedno od carstava u domeni eukariota. Za vrijeme svog životnog ciklusa često su izložene različitim čimbenicima biotičkog i abiotičkog stresa. Čimbenici biotičkog stresa su živi organizmi poput virusa i bakterija, dok se među čimbenike abiotičkog stresa ubrajaju povišeni salinitet tla, suša (osmotski stres), ekstremne temperature i sl. Kao sesilni organizmi, biljke su razvile brojne načine prilagodbe spomenutim nepovoljnim uvjetima. Smatra se da najznačajniju ulogu u moduliranju odgovora biljke na stres imaju biljni hormoni, između ostaloga i auksini.^{1,2}

Auksini su skupina biljnih hormona kojima je zajednička strukturna karakteristika prisutnost indolnog prstena i karboksilne skupine. Među njima najzastupljenija je indol-3-octena kiselina (engl. *indole-3-acetic acid*, IAA). Auksini općenito sudjeluju u većini procesa uključenih u rast i razvoj biljke kao što su npr. rast i razvoj korijena i izdanka, cvjetanje, rast plodova i sl. Povišena koncentracija slobodnih auksina inhibira spomenute procese, a prevelika količina djeluje toksično na biljni organizam. Važno je stoga održavanje niske koncentracije hormona u aktivnom obliku, što se postiže regulacijom procesa biosinteze, transporta, konjugacije i degradacije.^{3,4,5}

Pokazalo se da stres utječe na količinu slobodnog auksina preko signala induciranih tzv. hormonima stresa (apscizinska kiselina, salicilna kiselina i jasmonska kiselina), no brojne pojedinosti u vezi uloge auksina u odgovoru biljke na stres još su uvijek nepoznate.⁶ U svrhu razjašnjavanja homeostaze auksina u uvjetima abiotičkog stresa, u ovom je radu naglasak stavljen na istraživanje mehanizma reverzibilne konjugacije IAA.

U biljnom tkivu najviše 25% IAA nalazi se u slobodnom obliku, dok je većina pohranjena u obliku konjugata sa šećerima (esterski konjugati) te aminokiselinama, peptidima i proteinima (amidni konjugati).⁷ Amidni konjugati s određenim aminokiselinama mogu se hidrolizirati dajući slobodni hormon IAA djelovanjem enzima auksin-amidohidrolaza iz M20 obitelji metalopeptidaza. Prva auksin-amidohidrolaza otkrivena je u testu inhibicije rasta korijena s mutantom otpornom na djelovanje konjugata IAA-Leu te je stoga gen koji sadrži mutaciju nazvan *ILRI* (engl. *IAA-Leu-resistant 1*), a prema njemu se ostale amidohidrolaze nazivaju *ILL* (engl. *IAA-Leu-resistant-like*).⁸ Svaka od amidohidrolaza iz uročnjaka pokazuje različitu, ali

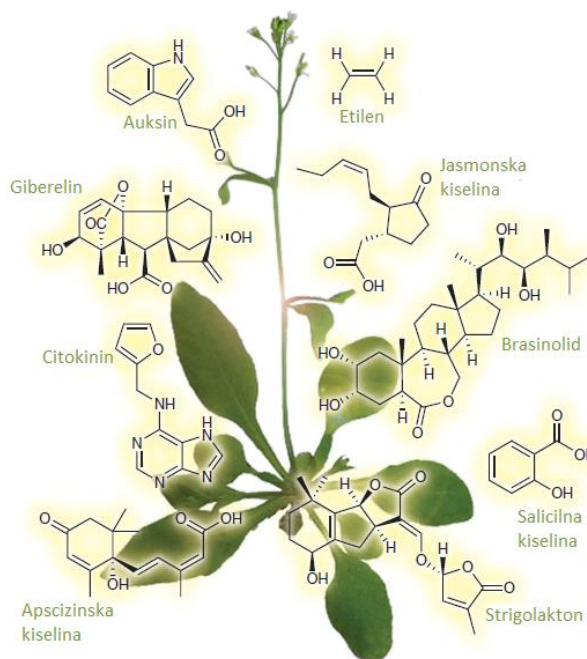
preklapajuću supstratnu specifičnost, a najveća aktivnost uočena je kod AtILL2 pri čemu enzim pokazuje najveći afinitet prema konjugatu IAA s alaninom.⁹

Cilj ovog rada je provjeriti postoji li prekomjerna ekspresija gena *AtILL2* u prethodno generiranim nadekspresorskim linijama *A. thaliana* ekotipa Ws koje su proizvedene u sklopu projekta PhytoBraCro i provjeriti njihov odgovor na uvjete solnog i osmotskog stresa te na taj način doprinijeti saznanjima o ulozi auksin-amidohidrolaza u regulaciji odgovora biljke na abiotički stres. Postavljene su dvije hipoteze: 1.) dobivene transgenične linije stabilni su nadekspresori auksin-amidohidrolaza *AtILL2*; 2.) dobivene transgenične linije s konstitutivnom nadekspresijom *AtILL2* pod kontrolom 35S promotora pokazuju veću otpornost na solni i osmotski stres u odnosu na divlji tip biljaka. U tu svrhu prethodno su proizvedene četiri transgenične linije *A. thaliana* s potencijalno povećanom ekspresijom gena za fuzijsku auksin-amidohidrolazu *AtILL2* s His-privjeskom odn. His- i GFP-privjeskom. Biljni materijal uzgojen je na selektivnim krutim MS-hranjivim podlogama. Zatim su izolirane genomska DNA (gDNA) i RNA te je sintetizirana komplementarna DNA (cDNA) metodom RT-PCR-a. Prisutnost gena za *AtILL2* u gDNA i transkripta u cDNA provjerena je metodom PCR-a. Nakon toga izolirani su ukupni stanični proteini te su odijeljeni prema masi SDS-poliakrilamidnom gel-elektroforezom, a prisutnost rekombinantnih proteina provjerena je *western-hibridizacijskom* analizom uz anti-His i anti-GFP primarna antitijela. Javlja li se kod potencijalnih nadekspresora otpornost na stres u vidu jače rozete, boljeg rasta korijena ili jačeg grananja bočnog korijenja transgeničnih linija u odnosu na divlji tip biljaka, provjereno je testom inhibicije rasta korijena u uvjetima povišenog saliniteta i osmolariteta.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biljni hormoni auksini

Biljni hormoni raznolika su skupina malih molekula koje se oslobađaju u različitim metaboličkim putovima. Imaju važnu ulogu u regulaciji svih razvojnih stadija biljke, od biljnog rasta i razvoja do prijenosa odgovora na biotički i abiotički stres. U biljkama su prisutni u vrlo niskim koncentracijama, a mogu djelovati lokalno, blizu mjesta sinteze, ili se mogu prenijeti do udaljenih tkiva. Konkretna razina hormona visoko je regulirana i povezana s promjenama u okolini. Biljni hormoni mogu se podijeliti u sljedeće skupine: auksini, giberelini, citokinini, apscizinska kiselina, etilen, brasinosteroidi, jasmonati, salicilna kiselina i strigolaktini (slika 1).^{1,2}



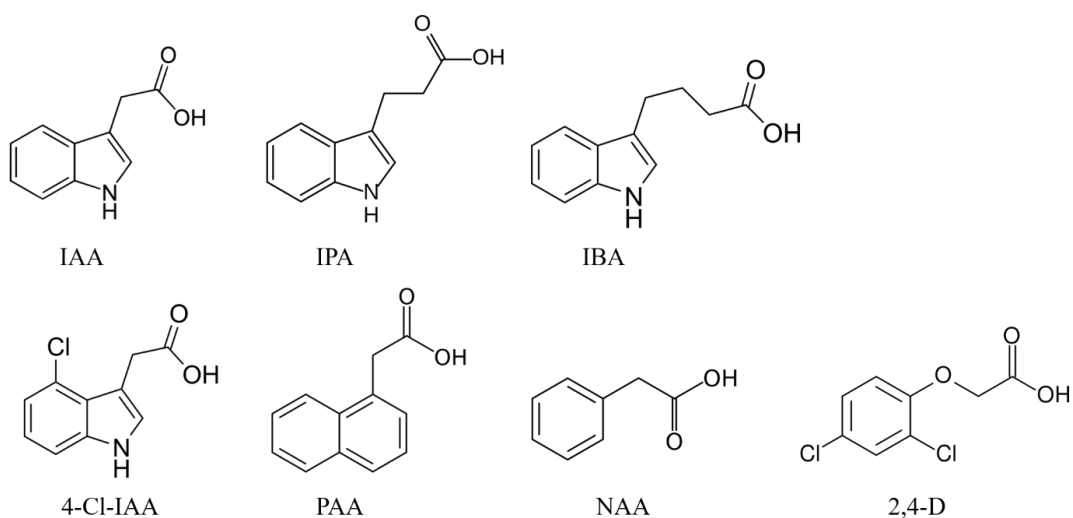
Slika 1. Biljni hormoni reguliraju sve aspekte rasta i razvoja biljke.

(Preuzeto i prilagođeno iz ref. 1).

Prvi otkriveni biljni hormoni bili su auksini.² Naziv potječe od grčke riječi „*αυξενία*“ što u prijevodu znači „rasti“ i upućuje na ključnu ulogu ove skupine hormona u regulaciji rasta i razvoja biljke.¹⁰ Među najstarijim zapisima u kojima je dokumentirana njihova prisutnost zasigurno je istraživanje Charlesa i Francisa Darwina iz 1880. godine,¹¹ u kojem su pratili fototropizam koleoptila i primijetili „prijenosni utjecaj“ odgovoran za promjenu smjera rasta neosvijetljenog dijela koleoptila prema izvoru svjetlosti.^{2,3,10} Opažena tvar prvi je put izdvojena iz koleoptila zobi (*Avena sp.*) jednostavnom tehnikom difuzije 1926. godine,¹² a nakon što je 1935. godine objavljena struktura tvari izolirane iz kultura gljiva,¹³ pokazalo se da se radi o indol-3-piruvinskoj kiselini (engl. *indole-3-pyruvic acid*, IAA). Desetak godina kasnije, 1946. godine,¹⁴ IAA je potvrđena i u kukuruзу (*Zea mays*).¹⁰

Osim IAA, koji je najzastupljeniji auksin u biljnom svijetu, identificirani su i drugi endogeni auksini, poput indol-3-propionske kiseline (engl. *indole-3-pyruvic acid*, IPA), indol-3-

maslačne kiseline (engl. *indole-3-butiric acid*, IBA), 4-klor-indol-3-octene kiseline (engl. *4-chloroindole-3-acetic acid*, 4-Cl-IAA) i 2-fenilactene kiseline (engl. *2-phenylacetic acid*, PAA). Osim toga, brojna istraživanja bave se i sintetskim auksinima kao što su npr. 1-naftalenoctenakiselina (engl. *1-naphthaleneacetic acid*, NAA) i 2,4-diklorfenoksiocetna kiselina (engl. *2,4-dichlorophenoxyacetic acid*, 2,4-D). Po svojoj kemijskoj strukturi svi pripadnici skupine auksina ubrajaju se u indolne spojeve, s aromatskim prstenom i karboksilnom skupinom (slika 2).^{3,4,5}

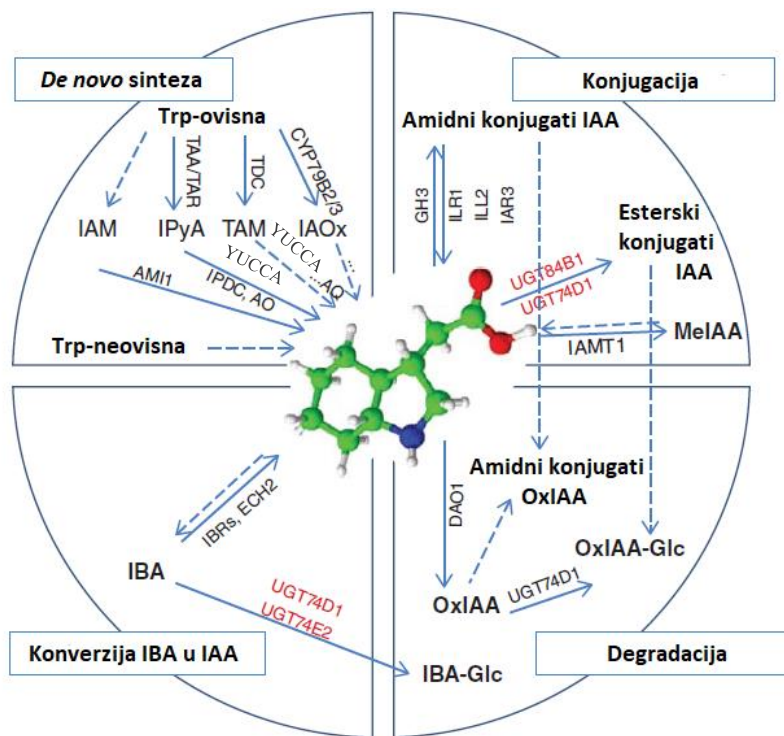


Slika 2. Kemijske strukture odabranih auksina. Endogeni auksini: **IAA** – indol-3-octena kiselina; **IPA** – indol-3-propionska kiselina; **IBA** – indol-3-maslačna kiselina; **4-Cl-IAA** – 4-klor-indol-3-octena kiselina; **PAA** – fenilactena kiselina. Sintetski auksini: **NAA** – 1-naftalenoctena kiselina; **2,4-D** – 2,4-diklorfenoksiocetna kiselina. (Prema ref. 5).

Djelovanje auksina potvrđeno je u većini procesa uključenih u rast i razvoj biljke,¹⁵ povezivanje različitih hormonskih signalnih putova,¹⁶ odgovor na abiotički stres,⁶ interakcije s mikroorganizmima i virusima¹⁷ te općenito u reakciju biljke na vanjske podražaje.¹⁸ Izravno utječu na diobu, elongaciju i diferencijaciju stanica, rast i razvoj korijena i izdanka, nastanak provodnog tkiva, cvjetanje, embriogenezu, i rast plodova te moduliraju različite tropizme.^{2,3,4}

Za pravilan rast biljke bitno je održavanje niske koncentracije auksina u organizmu budući da pri visokim koncentracijama ovi hormoni djeluju toksično i inhibitorno. Homeostaza auksina regulira se različitim procesima: biosintezom, transportom, razgradnjom i konjugacijom s aminokiselinama ili šećerima (slika 3).^{3,4} Ovisno o konkretnoj biljnoj vrsti i tkivu, maksimalno 25% IAA nalazi se u slobodnom obliku. Može se zaključiti da spomenuti procesi moraju biti

strogo regulirani kako bi se mogla održavati i relativno stalna koncentracija slobodne IAA, ali mehanizmi njihove regulacije još uvijek nisu dovoljno istraženi.⁷



Slika 3. Pregled metabolizma auksina. Procesi uključeni u regulaciju homeostaze auksina: *de novo* sinteza, konjugacija, konverzija IBA u IAA i degradacija. Crnim slovima označeni su poznati enzimi, a crvenim slovima pretpostavljeni koraci katalizirani *in vitro* opisanim enzimima. Pune strjelice označavaju potvrđene reakcijske korake, a isprekidanim strjelicama označeni su pretpostavljeni putovi koji mogu uključivati jedan ili više koraka. Kratice: **AMI1** – amidaza 1; **AO** – aldehyd oksidaza; **CYP79B2/3** – citokrom P450 79B2 i 79B3; **DAO1** – dioksigenaza za oksidaciju auksina 1; **ECH2** – enoil-CoA hidrataza 2; **GH3** – IAA konjugat-sintetaze; **Glc** – glukoza; **IAA** – indol-3-octena kiselina; **IAM** – indol-3-acetamid; **IAOx** – indol-3-acetaldoksim; **IAMT1** – IAA-karboksimetiltransferaza 1; **IBA** – indol-3-maslačna kiselina; **IBRs** – peroksisomski enzimi uključeni u odgovor indol-3-maslačne kiseline 1/3/10; **ILR, IAR, ILL** – auksin-amidohidrolaze; **IPDC** – indol-3-piruvat dekarboksilaza; **IPyA** – indol-3-piruvatna kiselina; **oxIAA** – oksindol-3-octena kiselina; **Me** – metil; **TAA** – triptofan aminotransferaza; **TAM** – triptamin; **TAR** – triptofan povezane aminotransferaze; **TDC** – triptofan dekarboksilaza; **Trp** – triptofan; **UGT** – UDP-glukoziltransferaze; **YUCCA** – flavin monooksigenaze. (Preuzeto i prilagođeno iz ref. 19).

2.1.1. Biosinteza

Indol-3-octena kiselina najbolje je istražen endogeni auksin i njezina *de novo* sinteza u biljkama kreće iz prekursora puta šikiminske kiseline u kojem općenito nastaju prekursori za različite indolne spojeve, aromatske aminokiseline, alkaloida i druge aromatske metabolite, lignine i flavonoide. Postoje dva puta biosinteze IAA: triptofan (Trp)-ovisan i Trp-neovisan put.^{19,20}

Trp-ovisan put kreće iz triptofana koji nastaje iz konačnog produkta puta šikiminske kiseline, korizmata. Čine ga četiri međusobno povezana puta koja su naziv dobila prema prvom sljedećem intermedijeru nakon triptofana: indol-3-acetamidni (engl. *indole-3-acetamide*, IAM) put, put indol-3-piruvatne kiseline (engl. *indole-3-pyruvic acid*, IPyA), triptaminski put (engl. *tryptamine*, TAM) i indol-3-acetaldoksimski (*indole-3-acetaldoxime*, IAOx) put. Put IPyA prepoznat je kao najznačajniji u različitim biljnim vrstama.²¹ U ovom putu, triptofan aminotransferaze TAA1 (engl. *tryptophan aminotransferase of arabidopsis 1*), TAR1 i TAR2 (engl. *tryptophan aminotransferase related 1 i 2*) najprije prevode triptofan u IPyA, a zatim flavin monooksigenaze YUCCA (YUC) kataliziraju sintezu IAA iz IPyA.^{20,22}

U Trp-neovisnom putu IAA nastaje iz ranog prekursora triptofana, vjerojatno indol-3-glicerol fosfata (engl. *indole-3-glycerol phosphate*, IGP).²³

Većina tkiva u korijenu i izdanku u većoj ili manjoj mjeri ima sposobnost sintetiziranja IAA. Uočeno je da se velik broj gena uključenih u biosintezu auksina snažno eksprimira u vršku izdanka i apikalnom meristemu korijena, a *YUCCA* geni pokazali su se ključnima u procesima poput embriogeneze i razvoja lista, cvijeta i ploda te u razvoju vaskularnog tkiva uročnjaka.²⁰

2.1.2. Transport

Za razliku od ostalih biljnih hormona, auksini se specifično i aktivno transportiraju unutar- i izvanstanično.¹⁰ U svom protoniranom obliku auksini su manje polarni i moguća je njihova difuzija kroz staničnu membranu, dok su za transport negativno nabijenog deprotoniranog oblika nužni specifični proteini nosači. Mogu se dakle razlikovati dva puta transporta IAA: nepolarni i polarni transport.²⁰

Polarnim transportom auksina uspostavlja se hormonski koncentracijski gradijent, a time i gradijent aktivnosti koji izravno utječe na rast i razvoj biljke. Identificirani transportni proteini pripadaju jednoj od sljedeće tri klase: proteini iz PIN obitelji koji su uključeni u izvoz auksina i njegovo dopremanje do različitih unutarstaničnih kompartimenata, ABCB proteini uključeni u unos i izvoz auksina iz stanice, te AUX/LAX proteini zaduženi za unos auksina u stanicu.

Transportni proteini smješteni su u staničnoj membrani što omogućava jednostavan prijenos auksina između različitih tipova stanica i tkiva.^{4,10,19}

Većina IAA se od mjesta sinteze do ostalih dijelova ipak prenosi pasivnim transportom floemom. Napolarni transport IAA brži je od polarnog transporta i odvija se na puno većim udaljenostima što je važno za procese poput razvoja bočnog korijena i grananja izdanka.^{24,25}

2.1.3. Degradacija

Konjugacija auksina s aminokiselinama aspartatom (IAA-Asp) i glutamatom (IAA-Glu) te šećerima odvija se ireverzibilno u svrhu inaktivacije auksina. Pokazalo se da se nastali konjugati potom dalje metaboliziraju. Osim toga, višak IAA može se ukloniti i oksidacijom slobodnog auksina ulaskom u put 2-oksindol-3-octene kiseline (engl. *2-oxindole-3-acetic acid*, oxIAA). Glavni katabolički produkt oxIAA može se dalje metabolizirati konjugacijom s glukozom, a u nekonjugiranom obliku ne pokazuje značajnu biološku aktivnost niti se prenosi preko poznatih putova transporta auksina. Istraživanjima na uročnjaku detektirani su i drugi katabolički produkti, ali su geni i enzimi koji sudjeluju u procesu razgradnje auksina još uvijek relativno nepoznati.^{19,26}

2.1.4. Skladišni oblici

U biljci se višak IAA može pohraniti i po potrebi prevesti u aktivan oblik. U skladišne oblike IAA ubrajaju se određeni amidni konjugati IAA i endogeni auksin IBA.

Skladištenje IAA u obliku IBA pokazalo se važnim za kontrolu razine auksina za vrijeme biljnog rasta, posebice za vrijeme izgradnje korijena te u uvjetima stresa. Još uvijek nije razjašnjeno ima li IBA i drugih bioloških uloga, na što upućuju činjenice da su u biljnom organizmu detektirani njezini konjugati²⁷ te da se aktivno transportira,^{28,29} ali je to s druge strane malo vjerojatno budući da nije pronađen put sinteze IBA koji ne uključuje konverziju iz IAA.⁴

Glavni oblici auksinskih konjugata uključuju esterske konjugate s ugljikohidratima te amidne konjugate s aminokiselinama, peptidima ili proteinima. Broj i vrsta prisutnih konjugata ovise o biljnoj vrsti i tkivu. U principu biljka može sintetizirati razne vrste konjugata budući da se različiti auksini (npr. IAA, IBA, IPA, 4-CI-IAA) mogu konjugirati s nizom različitih molekula.⁷

Tek dio konjugata može se hidrolizirati dajući slobodnu IAA (konjugati s aminokiselinama alaninom (IAA-Ala), leucinom (IAA-Leu), fenilalaninom (IAA-Phe) i dr.), a kao što je već

spomenuto u prethodnom poglavlju, dio služi za inaktivaciju auksina (IAA-Asp i IAA-Glu), dok se konjugat IAA s aminokiselinom triptofanom (IAA-Trp) smatra inhibitorom auksinskog djelovanja. Spomenuti konjugati detektirani su u većini istraženih biljnih vrsta.⁷

Neki konjugati IAA poput onih s alaninom, leucinom, fenilalaninom i valinom pokazuju aktivnost nalik slobodnom auksinu inducirajući razvojne odgovore biljke kao što su inhibicija rasta korijena i hipokotila, ali je funkcija endogenih konjugata i dalje slabo istražena. Smatra se da je njihova glavna uloga u skladištenju, transportu, kompartmentalizaciji i inaktivaciji auksina te zaštiti slobodne IAA od degradacije.⁹

Nastajanje konjugata sa šećerima katalizira enzim UDP-glukoza transferaza, dok konjugaciju auksina s aminokiselinama reguliraju geni i enzimi iz skupine auksin-konjugat sintetaza (GH3).⁷ Oko uloge hidrolaza auksinskih konjugata još je uvijek dosta nepoznanica zbog čega su i danas predmetom brojnih istraživanja. U ovom radu analizirana je amidohidrolaza AtILL2 iz biljke *A. thaliana* te je stoga u nastavku naglasak stavljen na auksin-amidohidrolaze iz uročnjaka i njihovu ulogu u odgovoru biljke na abiotički stres.

2.2. Auksin-amidohidrolaze

Amidohidrolaze općenito kataliziraju reakcije hidrolize različitih supstrata s amidnim ili esterskim funkcionalnim skupinama na C- i P-centrima.³⁰ Auksin-amidohidrolaze kataliziraju reakciju hidrolize amidne veze u konjugatima auksina i aminokiselina, pri čemu se oslobađa hormon u aktivnom obliku. Od 1995. godine, kada je otkrivena prva auksin-amidohidrolaza u uročnjaku,⁸ do danas, objašnjeni su brojni aspekti vezani uz strukturu i funkciju ovih enzima, ali je velik dio njih još uvijek neistražen.³

2.2.1. Supstratna specifičnost i aktivnost

Postojanje auksin-amidohidrolaza otkriveno je u testovima inhibicije rasta korijena *A. thaliana* mutanata koji gube osjetljivost prema određenom konjugatu IAA-aminokiselina.⁸ Prvi opisani mutant imao je smanjenu osjetljivost prema konjugatu IAA-Leu u odnosu na divlji tip što upućuje na to da gen s mutacijom kodira za enzim koji hidrolizira IAA-Leu, prema čemu je dobio i naziv *AtILR1* (*IAA-Leu-resistant1*, ILR1). Kasnije se pokazalo da *AtILR1* hidrolizira konjugate IAA s fenilalaninom⁹ i tirozinom. Na jednak način identificirana je amidohidrolaza *AtIAR3* (*IAA-Ala-resistant3*, IAR3): *AtIAR3* mutanti pokazivali su manju osjetljivost prema IAA-Ala.³¹ Nakon toga u uročnjaku je na temelju homologije identificirano još pet gena koji

nalikuju *ILR1* i kodiraju za tzv. ILL (engl. *IAA-Leu-resistant-like*) proteinsku obitelj: *AtILL1*, *AtILL2*, *AtILL3*, *AtILL5* i *AtILL6*.³ Članovi ove skupine proteina međusobno dijele između 40% i 90% identičnosti. Prvi opisani proteini, *AtILR1* i *AtILR3*, međusobno su 46% identični. Amidohidrolaze *AtILL1* i *AtILL2* međusobno su 87% identične, približno 57% identične s *AtIAR3* i približno 44% s *AtILR1*. Enzim *AtILL3* je 42-48% identičan s drugim hidrolazama, *AtILL6* pokazuje 45-48% identičnosti, a *AtILL5* detektiran je kao pseudogen najbližiji *AtIAR3*. Filogenetska analiza pokazala je da identificirane amidohidrolaze predstavljaju tri odvojene grane filogenetskog stabla: *ILR1/ILL3*, *IAR3/ILL5/ILL1/ILL2* i *ILL6*, što upućuje na to da je različita uloga amidohidrolaza uobičajena za više biljke.⁹

Od spomenutih gena, najviše su istraženi *AtILL1*, *AtILR1*, *AtILL2* i *AtIAR3* za koje su enzimska aktivnost i supstratna specifičnost dokazane u obliku fuzijskog proteina s glutation S-transferazom (GST)⁹, a za *AtILR1* i *AtIAR3* i u sustavu jedne biljne stanice.³² U uročnjaku ovi enzimi pokazuju različitu, ali preklapajuću supstratnu specifičnost.⁷ Za razliku od *AtILR1* koja ima veći afinitet prema IAA-Leu te IAA-Phe, hidrolaze *AtIAR3* i *AtILL2* pokazuju najveći afinitet prema konjugatu IAA-Ala, a enzim *AtILL1* ne pokazuje značajnu aktivnost *in vitro*, dok je aktivnost *AtILL3* i *AtILL6* ispod detekcijskih granica.⁹

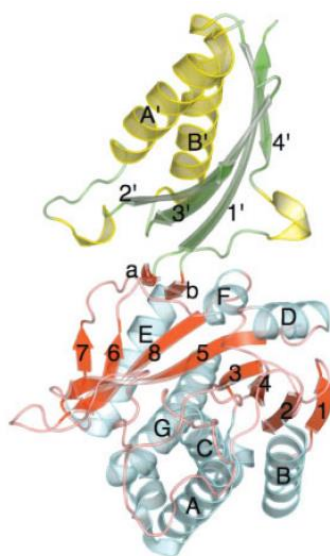
Među ispitanim enzimima najveća hidrolazna aktivnost *in vitro* uočena je kod *AtILL2*, a najmanja kod *AtILL1* unatoč velikoj sličnosti u primarnoj strukturi (87%).⁹ U usporedbi s *in vitro* eksperimentima, *AtILL2 in vivo* ipak pokazuje umjereniju kinetičku aktivnost.³² Iako je protein *AtIAR3* otkriven kao auksin-amidohidrolaza specifična za IAA-Ala konjugat, pokazalo se da ovaj enzim hidrolizira i amidnu vezu u IAA-Leu konjugatu³², ali je daleko učinkovitiji kao katalizator hidrolize aminokiselinskih konjugata jasmonske kiseline, što upućuje na potencijalnu ulogu u obrani organizma i povezivanju djelovanja različitih biljnih hormona, auksina i jasmonske kiseline, u odgovoru na stres.⁵

Sposobnost hidrolize aminokiselinskih konjugata IAA dokazana je i za amidohidrolaze iz drugih biljnih vrsta. Jedan primjer je enzim homologan *AtILR1* izoliran iz *Arabidopsis suecica*, *AsILR1*.³³ Neizravno je dokazana i aktivnost ILL homologa iz topole, *PcILL3*, tako što su proizvedene transgenične linije uročnjaka koje eksprimiraju protein od interesa. Amidohidrolaza *PcILL3* pokazala je afinitet prema konjugatu IAA-Leu.³⁴ Osim toga, neke amidohidrolaze pokazale su veću specifičnost za konjugate dugolančanih auksina. U pšenici je pronađena amidohidrolaza koja preferentno hidrolizira IBA-Ala,³⁵ dok su u kineskom kupusu detektirane dvije amidohidrolaze s većom preferencom za IPA-Ala.³⁶ Obitelj amidohidrolaza

iz *Medicago truncatula* pokazala je mogućnost hidrolize širokog raspona konjugata IAA, a neki enzimi hidrolizirali su i IBA konjugate.²⁷

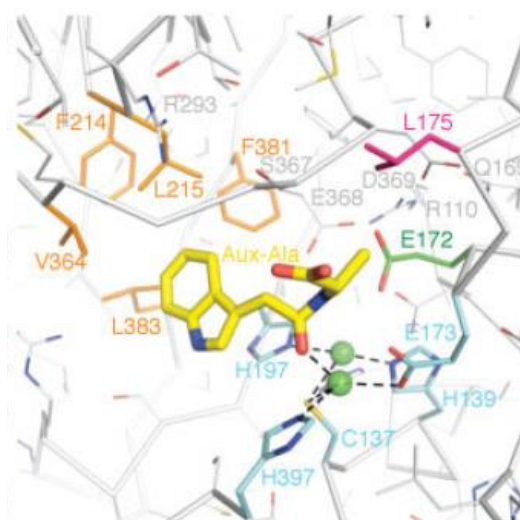
2.2.2. Struktura

Auksin-amidohidrolaze svrstavaju se u M20D podskupinu veće M20 obitelji peptidaza, koje u principu sadrže dva metala u katalitičkom centru. Dok se kao kofaktor kod bakterijskih peptidaza pojavljuje Zn^{2+} (ref. 37), za pravilnu aktivnost auksin-amidohidrolaza iz *A.thaliana* nužan je kofaktor Mn^{2+} (ref. 9). Analogno strukturama ostalih dinuklearnih metalopeptidaza iz M20 obitelji, i kod auksin-amidohidrolaza se mogu uočiti dvije karakteristične domene: veća katalitička domena amino-peptidazne topologije i manja „satelitska“ domena preko koje dolazi do dimerizacije i pretpostavlja se da ima ulogu u stabilizaciji i regulaciji enzimske aktivnosti (slika 4). Iako su auksin-amidohidrolaze aktivne kao monomeri, *in vivo* eksperimentima pokazalo se da enzimi imaju tendenciju ka polimerizaciji u svrhu povećanja stabilnosti.^{36,38} Više detalja o strukturi aktivnog mjesta otkriveno je nakon što su Bitto i suradnici 2009. godine riješili kristalnu strukturu AtILL2.³⁹



Slika 4. Struktura auksin-amidohidrolaze AtILL2. Mogu se uočiti dvije domene: katalitička domena sastoji se od osam β -niti koje čine β -ploču (crveno) okruženu s pet i dvije α -zavojnice (cijan) (motiv $\alpha\beta\alpha$) i satelitska domena umetnuta između β -niti 6 i zavojnice E, koja se sastoji od β -ploče sastavljene od 4 β -niti (zeleno) i 2 α -zavojnice (žuto) (motiv $\alpha\beta$). Elementi sekundarne strukture označeni su prema redosljedu pojavljivanja. (Preuzeto iz ref. 39).

Budući da je određena kristalna struktura AtILL2 kao apoenzima, usporedbom s poznatim strukturama drugih M20 peptidaza pretpostavljeno je vezno mjesto metalnog iona te je predloženo mjesto vezanja supstrata i model kojim se objašnjava supstratna specifičnost AtILL2 prema konjugatu IAA-Ala. Na slici 5 prikazano je aktivno mjesto enzima u koje je računalnim modeliranjem smješten supstrat IAA-Ala. Među aminokiselinama aktivnog mjesta uključenim u koordinaciju metalnog iona nalazi se i cistein, koji je karakterističan za AtILL2 i nije uočen u poznatim strukturama drugih M20 peptidaza. Na temelju *in silico* pozicioniranja supstrata u aktivno mjesto enzima pretpostavljeno je da aminokiselina leucin Leu175 ima ključnu ulogu u oblikovanju afiniteta za IAA konjugate s aminokiselinama s većim bočnim ograncima od alanina i serina. Pokazalo se međutim da ovaj leucin nije očuvan u amidohidrolazama iz uročnjaka, već se pojavljuje samo u AtILL2 i njezinom najbližem homologu AtILL1. Osim toga, u aktivnom mjestu nalazi se visoko očuvani glutamat (Glu172) koji općenito sudjeluje u kiselobaznim reakcijama. Također, hidrofobni džep blizu metalnog centra stabilizira indolilni dio supstrata.³⁹



Slika 5. Aktivno mjesto auksin-amidohidrolaze AtILL2 s vezanim supstratom. Žutom je označen modelirani supstrat IAA-Ala (*N*-(indol-3-acetil)-alanin). Različitim bojama istaknute su važne aminokiseline (ak) aktivnog mjesta: ak koje sudjeluju u koordinaciji metalnog iona (cijan), ak koje formiraju hidrofobni džep koji stabilizira indolni prsten supstrata (narančasto), ak Glu172 čiji je bočni ogranak potencijalno ključan za kiselobaznu reakciju (zeleno), ak Leu175 kao pretpostavljeni selektivni filter koji određuje supstratnu specifičnost enzima (magenta), ostale konzervirane ak uključene u mrežu vodikovih veza aktivnog mjesta (sivo). Karboksilna skupina peptidne veze supstrata koja se cijepa koordinira jedan od metala u aktivnom mjestu (zelene kugle). (Preuzeto iz ref. 39).

U enzimu AtILR1, koji pokazuje najveći afinitet za IAA-Phe, umjesto Leu175 u aktivnom mjestu pojavljuje se tirozin, koji bi mogao biti zaslužan za stabilizaciju aromatskih bočnih ogranaka aminokiselinskih konjugata π - π interakcijama. Homolog IAR3 iz pšenice, TaIAR3, koji pokazuje najveći afinitet za konjugate IBA, za razliku od spomenutih IAA-konjugat amidohidrolaza, umjesto Leu175 sadrži glicin te dodatnu aminokiselinu Thr375 u blizini hidrofobnog džepa, čime bi se mogla objasniti sposobnost vezanja i hidroliziranja većih auksinskih derivata.³⁹ Specifičnost amidohidrolaze BrILL2 iz biljke *Brassica rapa* za hidrolizu konjugata IPA istražena je metodama računalnog modeliranja i mjerenjem enzimske kinetike. Pritom je korištena kristalna struktura AtILL2 i pokazalo se da se u pretpostavljeno aktivno mjesto najbolje veže konjugat auksina IPA s aminokiselinom alaninom, IPA-Ala.³⁶ Također računalnim modeliranjem jedne bakterijske IAA-Asp hidrolaze iz *Enterobacter agglomerans*, pokazalo se da su aminokiseline His404 i His405 ključne za njezinu aktivnost.⁴⁰

Rezultati računalnog modeliranja aktivnosti enzima upućuju na to da se katalitički mehanizam AtILL2 ne razlikuje od onog pretpostavljenog za ostale M20 peptidaze.

2.2.3. Lokalizacija u stanicima

Većina poznatih auksin-amidohidrolaza sadrži signalne sljedove za unos u endoplazmatski retikulumu (ER).³³ Bioinformatičkim metodama pokazano je da izoforme AtILL1, AtIAR3 i AtILL5 iz uročnjaka sadrže poznate N- i C-terminalne (HDEL/KDEL) signalne sljedove koji služe za usmjeravanje proteina u ER. Za razliku od spomenutih enzima koji na C-kraju sadrže His/Lys-Asp-Glu-Leu signalni tetrapeptid, izoforme AtILR1 i AtILL2 posjeduju sljedove za unos proteina u ER koji do sada nisu uočeni u biljkama već samo u gljivama i životinjama (Lys-Ser-Glu-Leu kod AtILR1 odn. His-Glu-Glu-Leu kod AtILL2), dok u primarnoj strukturi AtILL3 i AtILL6 nisu prepoznati specifični signalni sljedovi.³⁹ Ipak, nedavni eksperimentalni dokazi o lokalizaciji IAR3, ali i ILR1 i ILL2 u ER upućuju na to da bi i ostale amidohidrolaze mogle svoju funkciju obavljati u ovom organelu.³²

2.3. Auksini u odgovoru na abiotički stres

Kao sesilni organizmi, biljke su razvile brojne mehanizme prilagodbe okolišnim uvjetima. Glavnu ulogu u moduliranju odgovora biljaka na uvjete stresa imaju tzv. hormoni stresa, apscizinska kiselina, salicilna kiselina i jasmonska kiselina. Iako je fiziološka uloga hormona stresa u odgovoru na nepovoljne okolišne uvjete predmetom brojnih istraživanja, složena mreža

njihovih međusobnih interakcija, kao i interakcija s drugim biljnim hormonima, još uvijek nije do kraja razjašnjena.

Poznato je da promjena razine auksina i njegove raspodjele izravno utječe na biljni rast i brojna istraživanja upućuje na to da je djelovanje auksina povezano s djelovanjem hormona stresa te su tako preko auksinske signalizacije i homeostaze izravno povezani procesi regulacije rasta biljke i odgovora biljke na uvjete abiotičkog stresa. U naredna tri poglavlja ukratko je prikazana uloga auksina u modulaciji odgovora na abiotički stres.⁶

2.3.1. Auksinska signalizacija u odgovoru na stres

U prevođenje informacije iz okoliša s ciljem prilagodbe biljke na nepovoljne uvjete uključeni su i auksinski receptori i signalni put auksina. U uročnjaku postoje tri receptora za auksin: TIR1/AFB (engl. *Transport Inhibitor Response1/Auxin Signaling F-Box Proteins*), ABP1 (engl. *Auxin Binding Protein1*), i SKP2A (engl. *S-Phase Kinase-Associated Protein2A*). Svaki od njih uključen je u različitu auksinsku signalnu kaskadu koja sudjeluje u regulaciji biljnog rasta i razvoja.¹⁰

U uvjetima stresa, rast biljke usporava se zaustavljanjem auksinske signalizacije. Prijenos auksinskog signala može se zaustaviti izravnim smanjenjem količine slobodnog auksina te inaktivacijom receptora i signalnih komponenti promjenama na razini transkripcije gena i aktivnosti enzima uključenih u homeostazu auksina odn. auksinsku signalizaciju. Važnu ulogu u posttranskripcijskoj regulaciji imaju male RNA (engl. *microRNA*, miRNA). Ova regulatorna RNA prepoznaje ciljnu mRNA i označava ju za razgradnju ili translacijsku represiju. Djelovanje mnogih miRNA povezano je sa signalima iz okoliša, a pokazalo se da su neke od njih uključene u regulaciju homeostaze auksina i auksinsku signalizaciju.

U uvjetima solnog stresa uočena je smanjena aktivnost auksinskog receptora TIR1/AFB2 i povećana količina miR393, što ukazuje na to da miR393 posttranskripcijski regulira protein TIR1/AFB2. Uključenost spomenutog receptora u modulaciju odgovora na stres, dodatno je potvrđena na *tir1afb2* mutantu uročnjaka, koji je pokazao povećanu otpornost na solni stres u usporedbi s divljim tipom.⁴¹

2.3.2. Transport auksina u odgovoru na stres

Poznato je da se uslijed gravitropizma pomoću transportnih proteina auksin akumulira u određenom dijelu stanice i time se preusmjerava rast korijena prema centru gravitacije.⁴²

U skladu s time, zaustavljanjem transporta auksina ne uočava se gravitropizam kao ni rast primarnog korijena te grananje. Pokazalo se da određeni uvjeti stresa utječu na transport auksina. U uročnjaku je u uvjetima blagog solnog stresa dokazano nakupljanje auksina u bočnom korijenu u početnoj fazi formiranja, a uočena proliferacija bočnog korijena uz smanjenje duljine glavnog i bočnog korijena karakterističan je odgovor biljke na abiotički stres. U mutantima koji nisu ekspimirali transportni protein, proliferacija bočnog korijena bila je potpuno inhibirana u uvjetima solnog stresa.⁴³

U novije vrijeme među učincima auksina spominje se i halotropizam.⁴⁴ Pokazalo se da ukoliko korijen biljke tijekom razvoja naiđe na područje povećane koncentracije soli, zaustavlja se gravitropizam, a rast korijena usmjerava se na suprotnu stranu. Za ovakav način prilagodbe solnom stresu zaslužna je relokalizacija auksin-transportnih proteina PIN2, a time i auksina koji izravno utječe na rast korijena. Također, u uvjetima povišenog saliniteta zaustavlja se ekspresija *PIN2* gena.⁴⁵

2.3.3. Regulacija enzima uključenih u homeostazu auksina u uvjetima stresa

Količina slobodnog auksina u uvjetima stresa smanjuje se u mnogim biljnim vrstama odgovarajućom regulacijom ekspresije gena i aktivnosti enzima uključenih u biosintezu, transport, konjugaciju i degradaciju auksina.¹⁹ Konkretni učinci auksina na fenotip biljke uslijed izloženosti stresnim uvjetima pokazani su eksperimentima s mutantima i overekspresorima za važne enzime uključene u homeostazu auksina. U nastavku je navedeno nekoliko odabranih primjera objavljenih istraživanja.

Nadekspresorske linije uročnjaka za enzim AtYUCCA7 i krumpira za enzim AtYUCCA6 (enzimi uključeni u IPyA biosintetski put IAA) pokazale su karakteristične fiziološke i razvojne učinke auksina uz povećanu otpornost na sušu.^{46,47} Kod trostrukih je mutanata uročnjaka *yuc1yuc2yuc6* rast korijena bio inhibiran, a stopa preživljavanja bila je smanjena (~30%) u odnosu na divlji tip.⁴⁸ Time je dokazano da povišena razina auksina pomaže prilagodbu na uvjete suše. Također, kod nadekspresora *YUCCA1* velika količina akumuliranih auksina potakla je proces degradacije slobodnog IAA te je detektirana znatna količina kataboličkog produkta oxIAA.⁴⁹

Linije uročnjaka koje prekomjerno ekspimiraju auksin-amidosintetazu GH3-5 (enzim zadužen za sintezu aminokiselinskih konjugata IAA kodiran genom *wes1*) bile su otpornije na

sušu, hladnoću, salinitet i visoke temperature, dok su mutanti *wes1* pokazivali lošiju prilagodbu na stres.⁵⁰

Povećana ekspresija auksin-hidrolaze PcILL3 iz topole pronađena je u tkivu topole tretiranom ionskim stresorima. Prekomjernom ekspresijom ovog enzima u uročnjaku povećava se otpornost biljaka na solni stres.³⁴

U divljem tipu biljaka rast i razvoj korijena u uvjetima osmotskog stresa općenito karakterizira promjena u tipičnoj arhitekturi korijena, koja se očituje u povećanju broja bočnog korijenja te inhibiciji rasta primarnog korijena. Za razvoj takvog fenotipa i prilagodbu na uvjete suše u uročnjaku, pokazala se važnom auksin-amidohidrolaza IAR3. Kod mutanata *iar3* u uvjetima osmotskog stresa uočeno je nakupljanje konjugata IAA te izostanak tipične promjene u rastu i razvoju korijena, tj. *iar3 mutante* nisu razvijale povećan broj bočnih korijena. Kao važan regulator odgovora na osmotski stres i sušu pokazala se miRNA167a, a IAR3 mRNA prepoznata je kao njezina ciljna RNA. U uvjetima stresa, pokazalo se da razina miR167a pada, a IAR3 mRNA raste. U transgeničnim linijama s mRNA otpornom na cijepanje putem miRNA167a, uočena je veća količina IAR3 transkripta i značajniji razvoj bočnog korijenja (u usporedbi s divljim tipom, tj. usporedbom transgeničnih linijama s divljim tipom IAR3 mRNA).⁵¹

Povišena temperatura utječe na formiranje konjugata auksina u uročnjaku povećanjem dostupne slobodne IAA. Sličan odgovor na povišene temperature pokazan je i kod *Physcomitrella patens* što upućuje na evolucijsku konzerviranost ovakvog odgovora na uvjete stresa.⁷

Očito je da su i procesi konjugacije auksina kao i hidrolize konjugata auksina uključeni u odgovor biljaka na stres, ali točne mehanizme treba još razjasniti. U ovom diplomskom radu pokušalo se doći do odgovora može li stabilna homologna nadekspresija auksin-amidohidrolaze u uročnjaku dovesti do povećane otpornosti biljaka na solni i osmotski stres.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

1,4-ditiotreitol (DDT) (*Sigma*), 2-merkaptotanol (*Fluka*), agar (*Duchefa Biochemie*), agarozna (*Sigma*), akrilamid/bisakrilamid, 30%, 29:1 (*Roth*), amonijev persulfat (APS) (*Fluka*), borna kiselina (*Kemika*, p.a.), bromfenol plavo (*Fisher Scientific Company*), Coomassie Brilliant blau R 250 (*Merck*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), 98,5%-101,5% (*Sigma*), etanol, v/v = 96% (*Gram-mol*, p.a.), etidijev bromid (*Sigma*), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) (*Fluka*), glicerol (*Kemika*, p.a.), formaldehid (*Kemika*), glicin (*Kemika*, p.a.), higromicin B, konc. (*Duchefa Biochemie*), imidazol (*Roth*, p.a.), inhibitori proteaza (*Sigma*), izosan (*Pliva*), kloridna kiselina, min. 99,5% (*Kemika*), 2-(N-morfolino)etansulfonska kiselina (MES) (*Sigma*), metanol (*Kemika*, p.a.), mlijeko u prahu (*Roth*), MS soli (*Duchefa Biochemie*), natrijev acetat (*Kemika*, p.a.), natrijev hidroksid (*Kemika*, p.a.), natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (*Kemika*, p.a.), natrijev karbonat (*Kemika*), natrijev klorid (*Kemika*, p.a.), natrijev tiosulfat (*Kemika*), octena kiselina (*Kemika*, p.a.), pufer otopine pH 4.00 i pH 7.00 (*Kemika*), saharozna (*Kemika*, p.a.), srebrov nitrat (*Kemika*), natrijev dodecilsulfat (SDS), $\geq 98,5\%$ (*Sigma-Aldrich*), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Serva*), Tris(hidroksimetil)-aminometan (TRIS), min. 99,9% (*Sigma*), Triton X-100 (*Fischer Biotech*), Tween 20 (*Sigma-Aldrich*).

3.1.2. Nukleotidi i nukleinske kiseline

Početak korištene u reakcijskim smjesama naručene su iz komercijalnih izvora (*Macrogen*), dNTP smjesa (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (*Roti-Mix PCR 3*, cat.no. L785.3, *Carl Roth*).

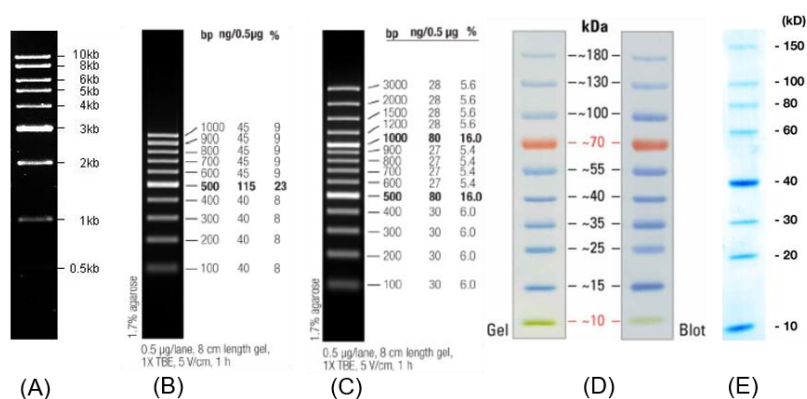
3.1.3. Proteini

DreamTaq DNA-polimeraza s odgovarajućim 10x *DreamTaq* puferom (cat.no. EP0702, *Thermo Scientific*), DNaza I s odgovarajućim 10x inkubacijskim puferom (*DNase I recombinant, RNase-free*, cat.no. 04716728001, *Roche*), inhibitor ribonukleaza (*RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor*, *Invitrogen*).

3.1.4. Markeri veličina

Markeri veličina za agaroznu gel-elektroforezu (*0,5-10KB DNA Ladder (Ready-to-use)*, cat.no. *M101R-1*, Bio Basic; *GeneRuler 100 bp DNA Ladder*, cat.no. *SM0242*, Fermentas/Thermo Scientific; *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*, cat.no. *SM0321*, Fermentas/Thermo Scientific).

Markeri veličina za SDS-PAGE (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, cat.no. *26616*, Thermo Scientific; *Roti-Mark 10-150*, Carl Roth).



Slika 6. Standardi veličine korišteni u radu. Marker *0,5-10KB DNA Ladder* (A), *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (B), *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* (C), *PageRuler Prestained Protein Ladder* (D), *Roti-Mark 10-150* (E).

3.1.5. Antitijela

Primarna antitijela: *6*His, His-Tag Mouse McAb*, cat.no. *66005-1-Ig* (Proteintech); *GFPTag Mouse McAb*, cat.no. *66002-1-Ig* (Proteintech); *Anti-His₆*, cat.no. *11922416001* (Roche).

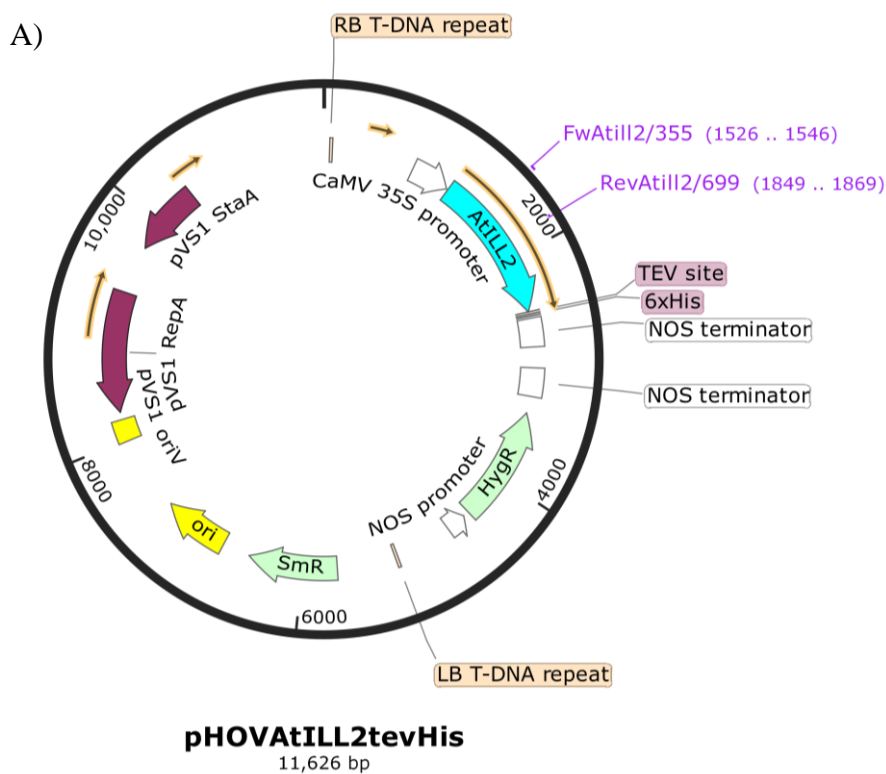
Sekundarna antitijela: *Anti-Mouse IgG (whole molecule) Peroxidase Conjugate*, cat.no. *A4416* (Sigma), *Goat anti-mouse IgG(H+L) HRP Conjugate*, *SA00001-1* (Proteintech).

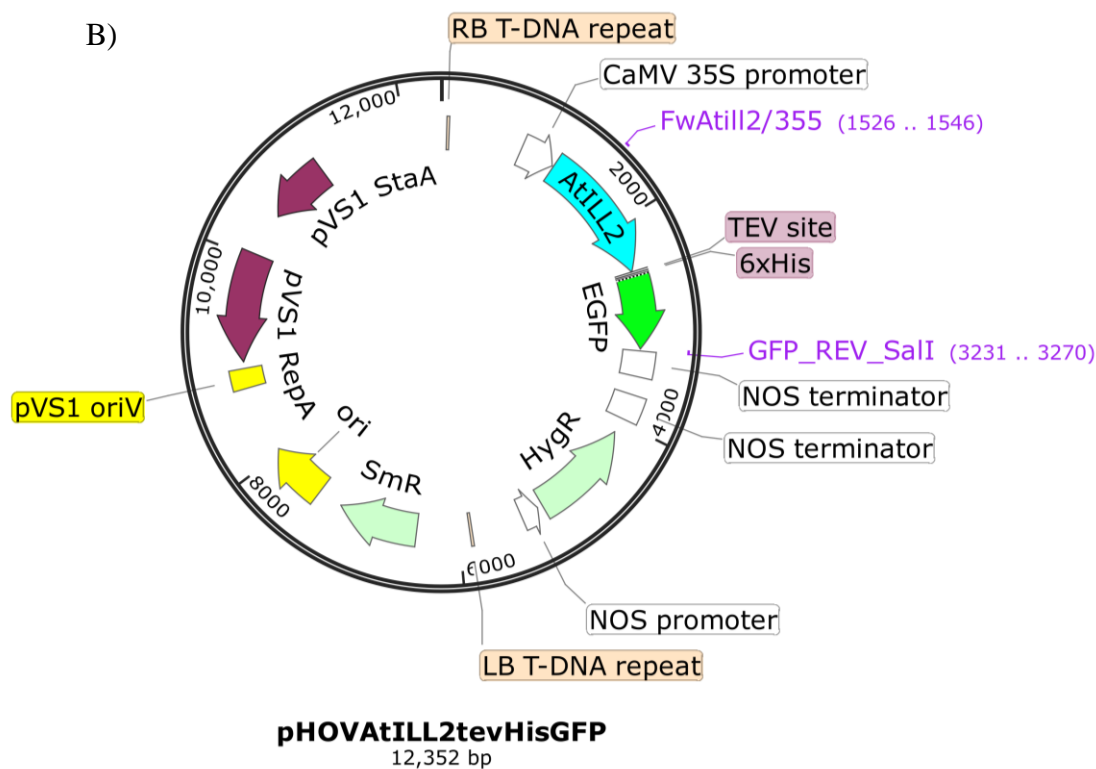
3.1.6. Plazmidi

Plazmidi pHOV korišteni kao pozitivne kontrole u PCR-u prethodno su dobiveni u sklopu HRZZ projekta PhytoBraCro.

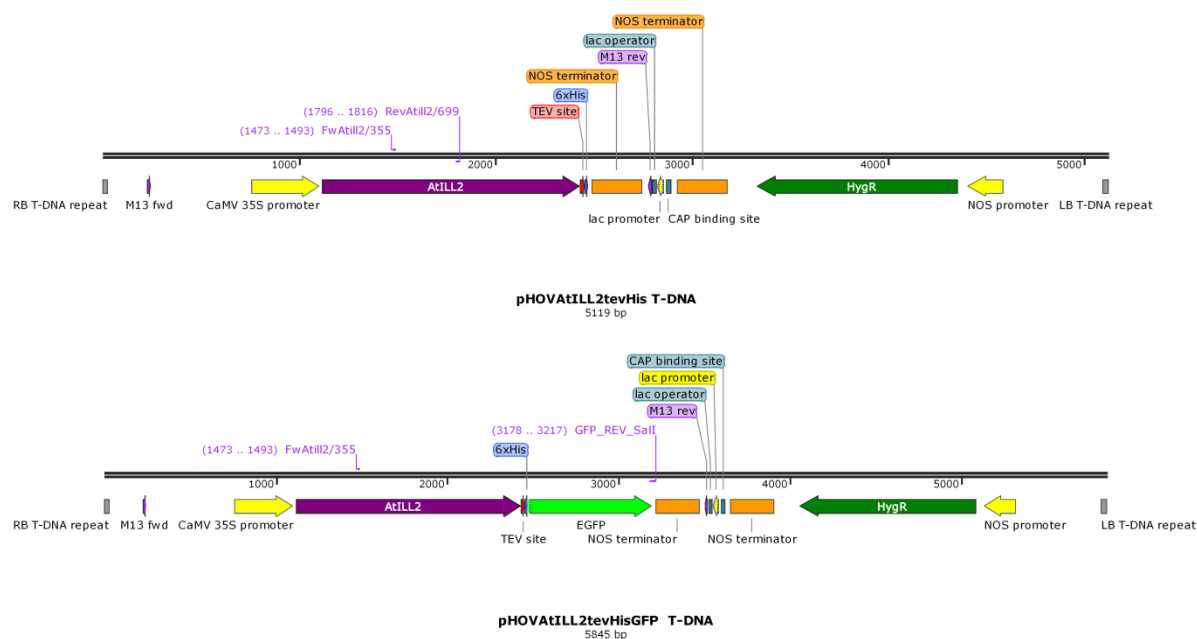
Gen za protein auksin-amidohidrolazu *AtILL2* (Ensembl Plants⁵²: *At5g56660*) kloniran je u vektor pHOV i korišten za daljnje transformacije agrobakterija u svrhu dobivanja transgeničnih biljaka. Transgen *AtILL2* ukloniran je u kazetu koju omeđuju lijeva i desna granica T-DNA (LB i RB) te su korištene dvije varijante vektora (slika 7). Vektor

pHOVAtILL2tevHis omogućuje nadekspresiju fuzije rekombinantnog proteina sa samo histidinskim privjeskom (6xHis) na C-kraju proteina, dok vektor *pHOVAtILL2tevHisGFP* ugradnjom kazete T-DNA u genom transgeničnih biljaka omogućuje nadekspresiju fuzije rekombinantnog proteina sa histidinskim privjeskom i zelenim fluorescentnim proteinom na C-kraju proteina (slika 7). Plazmidni vektor unutar T-DNA kazete sadrži, osim transgena, gen za rezistenciju na antibiotik higromicin B, tev mjesto – za cijepanje TEV proteazom između rekombinantnog proteina i His privjeska, te konstitutivni promotor 35S iz CMV-a (slike 7 i 8). Gen za rezistenciju na antibiotike spektinomycin i streptomycin za selekciju u bakterijama, dva ishodišta replikacije te geni koji kodiraju za proteine potrebne za replikaciju i stabilnost plazmida u bakterijama,⁵³ nalaze se izvan T-DNA kazete u plazmidnom vektoru (slika 7).





Slika 7. Shematski prikaz plazmidnih vektora korištenih u radu. Oznake: *SmR* – gen za rezistenciju na spektinomycin i streptomycin; *ori* – ishodište replikacije iz plazmida ColE1, pMB1, pBR322 i pUC koje olakšava replikaciju plazmida u *E. coli*; *pVS1 oriV* – ishodište replikacije iz plazmida pVS1 koje omogućava replikaciju u agrobakteriji; *pVS1 RepA* – gen za protein potreban za replikaciju u agrobakteriji; *pVS1 StaA* – gen za protein koji pomaže stabilnost plazmida u agrobakteriji; **RB** i **LB** – sekvence koje omeđuju T-DNA; *AtILL2* – gen za auksin-amidohidrolazu *AtILL2*; *HygR* – gen za rezistenciju na higromicin B; **CaMV 35S promotor** – jak konstitutivni promotor iz mozaičnog virusa cvjetače; **NOS promotor** – promotor gena za nopalín sintetazu, pod čijom je kontrolom gen *HygR*; **NOS terminator** – terminator gena za nopalín sintetazu i poliadenilacijski signal koji olakšava terminaciju transkripcije gena *AtILL2* i *HygR*; **TEV mjesto** – slijed koji prepoznaje i cijepa proteaza TEV; **6xHis** – slijed koji kodira za heksahistidinski privjesak; **EGFP** – slijed koji kodira za zeleni fluorescentni protein; **FwAtILL2/355**, **RevAtILL2/699**, **GFP_REV_Sal1** – slijedovi komplementarni početnicama korištenim u PCR-u.



Slika 8. Linearni prikaz T-DNA regije plazmida pHOVAtILL2tevHis (A) i pHOVAtILL2tevHisGFP (B). Sivom bojom označene su lijeva i desna granica T-DNA (LB i RB sljedovi), žutom bojom promotori (CaMV 35S i NOS promotor), narančastom terminatori (NOS terminator), ljubičastom gen za *AtILL2* (*AtILL2*), crvenom bojom označeno je mjesto koje prepoznaje i cjepa TEV proteaza (TEV-mjesto), plavom slijed koji kodira za heksahistidinski privjesak (His-privjesak), svjetlozelenom slijed za zeleni fluorescentni protein (GFP-privjesak), tamnozelenom gen za higromicinsku rezistenciju (*HygR*), a sljedovi komplementarni početnicama korištenim u PCR reakcijama podcrtni su (FwAtill2/355, RevAtill2/699 i GFP_REV_SalI).

3.1.7. Biljka *Arabidopsis thaliana*

Korišteno je sjeme biljke *A. thaliana* divljeg tipa (ekotip *Wassilewskija*, *Ws*) i sjeme rekombinantnih linija s ukloniranim genima za nadekspresiju auksin-amidohidrolaze (*AtILL2*) s heksahistidinskim privjeskom (linije *35S::AtILL2-His6* 25.6 i *35S::AtILL2-His6* 27.2) odn. s heksahistidinskim te GFP privjeskom (linije *35S::AtILL2-His6-GFP* 8.2 i *35S::AtILL2-His6-GFP* AN.6) dobiveno od prof. dr. sc. Nataše Bauer u sklopu HRZZ projekta PhytoBraCro. Korišteno je sjeme homozigotnih linija T4 generacije.

3.1.8. Hranjive podloge

Za uzgoj klijanaca korištena je kruta hranjiva podloga *Murashige i Skoog* (MS)⁵⁴.

Kruta hranjiva podloga MS0 (pH 5,7)

MS soli $\gamma = 4,4 \text{ g L}^{-1}$

Saharoza $m/V = 1\%$

MES monohidrat $w/v = 0,05\%$

Plant agar $m/V = 1\%$

Medij je autoklaviran na 121°C 20 min te je razdijeljen u laminaru na okrugle plastične Petrijeve pločice.

Kruta MS podloga za selekciju i provjeru homozigotnih nadekspresorskih linija

Sastav: kao u MS0

higromicin B do konačne koncentracije $50 \mu\text{g mL}^{-1}$

Medij je autoklaviran na 121°C 20 min, po hlađenju do ~55°C dodat mu je antibiotik higromicin B do konačne koncentracije $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ te je razdijeljen u laminaru na okrugle plastične Petrijeve pločice.

Kruta MS podloga za provjeru utjecaja solnog i osmotskog stresa na rast korijena biljaka

Sastav: kao u MS0

uz dodatak natrijevog klorida $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$,

ili

kao u MS0

uz dodatak manitola $c = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$

Medij je autoklaviran na 121°C 20 min te je razdijeljen u laminaru na okrugle plastične Petrijeve pločice.

3.1.9. Komercijalni kompleti

Komplet za detekciju proteina u *western-hibridizacijskoj* analizi (*Amersham ECL Prime Western Blotting System*, cat.no. RPN2236, GE Healthcare), komplet za izolaciju RNA (*Direct-zol RNA MiniPrep*, cat.nos. R2050, R2051, R2052 & R2053, Zymo Research) uz RNazol (*RNAzol RT*, cat.no. R4533, Sigma), komplet za pročišćavanje i ukoncentriravanje RNA (*GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit*, cat.no. K0842, Thermo Scientific), komplet za reverznu transkripciju (*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*, cat.no. K1622, Thermo Scientific).

3.1.10. Instrumenti

Aparatura za agaroznu gel-elektroforezu (*EP-2014 RunOne*, Embi Tec), aparatura za SDS-PAGE (*Mini-PROTEAN Tetra Cell*, Bio-Rad), aparatura za *western-hibridizacijsku* analizu (*Mini Trans-Blot Cell*, Bio-Rad), centrifuga (*5415R Microcentrifuge*, Eppendorf), homogenizator (*Mixer Mill MM 400*, Retsch), PCR uređaj (*GeneAmp 2700*, Applied Biosystems), pH-metar (744, Metrohm), skener (*ScanJet G3010*, HP), spektrofotometar (*NanoDrop 2000*, Thermo Scientific), termoblok (*Bio TDB-100*, Biosan), tresilice (*Bio RS-24 Mini-rotator*, Biosan; *PSU-10i Orbital Shaker*, Biosan), uređaj za detekciju UV fluorescencije (*G:BOX F3*, Syngene), uređaj za detekciju kemiluminescencije (*Alliance 4.7*, UVItec Cambridge).

3.1.11. Ostalo

Kuglice za homogenizaciju biljnog tkiva (kuglice cirkonijevog oksida promjera 2 mm, *Next Advance*; staklene kuglice promjera 0,5 mm, *Next Advance*), membrana za *western-hibridizacijsku* analizu s veličinom pora od 0,45 μM (*Immobilon-P PVDF Membrane*, cat.no. IPVH00010, Sigma Aldrich), Ni-NTA agarozna (*Qiagen*), parafinska film traka (*Parafilm M*, Sigma Aldrich), samoljepljiva porozna traka (*3M Micropore*).

3.2. Metode rada s biljnim materijalom

3.2.1. Sterilizacija sjemena

Prije nanošenja na hranjive podloge provedena je sterilizacija sjemena *A. thaliana* divljeg tipa i nadekspresorskih linija. Sterilizacija sjemena bila je potrebna radi potencijalno zaostalih mikroorganizama na površini sjemena te radi sprječavanja zagađenja podloga na kojima klijanci rastu kroz period od 5-10 dana. Sterilizacija sjemena i nanošenje na hranjive podloge provedeni su u laminaru. Sterilizirano je po 2 mg sjemena svake istraživane linije prema postupku opisanom u tablici 1.

Tablica 1. Sterilizacija 2 mg sjemena *A. thaliana*.

Korak	Dodatak	V / mL	Trajanje
1	etanol $\varphi = 70\%$	1	1 min
2	m _q H ₂ O, sterilna	1	1 ispiranje
3	izosan $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$	1	10 min uz okretanje
4	m _q H ₂ O, sterilna	1	5 ispiranja

3.2.2. Uzgoj biljnog materijala

Sterilizirano sjeme nanoseno je na pripremljene sterilne selekcijske hranjive podloge (MS + higromicin $\gamma = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Poklopljene ploče s nanesenim sjemenom zatvorene su *Micropore 3M* ljepljivom trakom i ostavljene 48 h u mraku na +4°C položene vodoravno radi ujednačavanja klijanja. Zatim su te iste ploče, tj. klijanci preneseni na svjetlo. U pokusu za selekciju i provjeru homozigotnih linija klijanci su uzgajani u klimatiziranoj komori 5 dana u uvjetima dugog dana (16 h dan, 8 h noć), na 22°C na pločama postavljenim u okomitom položaju.

3.2.3. Prikupljanje i homogenacija biljnog materijala

Prikupljanje tkiva provodi se u sterilnim uvjetima u laminaru, da se jednom otvorene ploče ne zagade nego da se višak klijanaca može kasnije iskoristiti. Biljno tkivo nastojalo se očuvati od razgradnje brzim zamrzavanjem u tekućem dušiku odmah po skupljanju u tubice.

U *Eppendorf* tubice od 1 mL s prikupljenim tkivom dodano je 0,1 mL staklenih kuglica promjera 0,5 mm te 3 cirkonijske kuglice promjera 2 mm. Tkivo je homogenirano bez dodatka pufera pomoću *Mixer Mill* homogenizatora 2 min pri frekvenciji od 30,0 Hz u nosačima prethodno ohlađenima na -20°C. Isti postupak proveden je pri prikupljanju tkiva za izolaciju

genomske DNA, RNA ili ukupnih staničnih proteina. S homogeniranim tkivom prosljedilo se odmah u gore navedene izolacije.

3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama

3.3.1. Izolacija genomske DNA

U svrhu izolacije genomske DNA, prikupljena su i homogenirana 2, 3 odn. 4 klijanca od svake istraživane linije. U svaki homogenirani uzorak klijanaca dodano je 400 μL pufera za izolaciju DNA nakon čega je postupak izolacije proveden na sobnoj temperaturi.

Pufer za izolaciju DNA⁵⁵

Tris-HCl $c = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 8

NaCl $c = 250 \text{ mmol dm}^{-3}$

EDTA $c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$

SDS $m/V = 0,5\%$

Uzorci su po dodatku pufera zagrijavani 10 min na 95°C u termobloku. Zatim su tubice centrifugirane 5 min na $16000 \times g$ i odvojen je supernatant u čiste tubice. U sljedećem koraku je na 1 volumen dobivenog supernatanta dodano 2,5 volumena 96%-tnog etanola i jedna desetina volumena natrijeva acetata ($c = 3 \text{ mol dm}^{-3}$), tj. na 400 μL supernatanta dodan je 1 mL etanola i 40 μL natrijeva acetata. Tubice su ostavljene minimalno pola sata na -80°C ili 1 h na -20°C u svrhu precipitacije DNA, a zatim su centrifugirane na $16000 \times g$ pri sobnoj temperaturi. Supernatant je odstranjen dekantiranjem, talog ispran s 1 mL 70%-tnog etanola, te 10 min centrifugiran na $16000 \times g$. Supernatant je ponovno dekantiran, a talog dodatno posušen zagrijavanjem na 37°C na termobloku dok sva tekućina nije ishlapila. Izolirana DNA resuspendirana je u 50 μL mqH_2O i spremljena na -20°C .

3.3.2. Priprema za rad s RNA

Prije početka rada s RNA pripremljen je detergent za uklanjanje RNaza „*RNase Away*“ i njime je prebrisan sav laboratorijski pribor i radna jedinica kako bi se spriječila kontaminacija uzoraka RNazom.

„RNase Away“ detergent

NaOH $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$

EDTA $c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ pH 8,0

SDS $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$

3.3.3. Izolacija ukupne RNA

Za izolaciju RNA prikupljeno je od svake linije po 5 klijanaca ili približno 50 mg biljnog materijala i homogenirano prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.

U tubice s homogeniranim tkivom dodano je po 600 μL RNAzola nakon čega se uzorci mogu čuvati preko noći na $+4^\circ\text{C}$ do izolacije RNA. Ukupna RNA izolirana je pomoću komercijalno dostupnog kompleta za izolaciju RNA (*Direct-Zol RNA Mini-Prep Kit*) prema uputama proizvođača (*Zymo Research*).⁵⁶ Ključan korak predstavlja odjeljivanje nukleinskih kiselina od proteina i lipida u staničnom ekstraktu. To se postiže dodatkom denaturirajućeg otapala na bazi fenola budući da su denaturirani proteini većinom hidrofobni. Hidrofilne nukleinske kiseline ostaju u vodenoj fazi, a proteini i lipidi prelaze u organsku fazu. Nakon toga se RNA izdvaja vezanjem za siliku (različite tvari koje u svom sastavu sadrže silicij i kisik) uz dodatak alkohola koji olakšava njezino vezanje, a nevezani dio staničnog ekstrakta se odstrani. Silika s vezanom RNA dodatno se ispere otopinom koja ne eluira RNA, primjerice alkoholom, a u posljednjem koraku RNA se oslobađa dodatkom pufera odgovarajućeg pH i količine soli i/ili kelirajućih tvari. Pritom je važno potpuno odstraniti otapala na bazi fenola zbog njihove toksičnosti i mogućeg ometanja daljnjih koraka analize RNA.⁵⁷

Tijekom izolacije uzorci su držani na ledu, a izolirana RNA pohranjena je na -80°C .

3.3.4. Određivanje koncentracije otopine RNA

Budući da nukleinske kiseline imaju maksimum apsorbancije pri 260 nm,⁵⁸ koncentracija otopine izolirane RNA određuje se spektrofotometrijski na *NanoDrop* spektrofotometru. Koncentracija je određivana nakon izolacije opisane u prethodnom poglavlju (3.3.3) te je ta RNA radi lakšeg praćenja u tekstu nazvana ukupnom RNA. Nakon DNaznog tretmana i pročišćavanja RNA (postupak opisan u poglavlju 3.3.5) također je izmjerena koncentracija otopine RNA te je ta RNA u daljnjem tekstu nazvana pročišćenom RNA.

Prije početka snimanja uzoraka RNA, snimljena je pozadina nanošenjem 2 μL mqH_2O . Nakon toga u odgovarajućem programu na računalu potrebno je odabrati tip nukleinske kiseline

koja će se snimati. Iz padajućeg izbornika odabrana je opcija „RNA-40“. Na predviđeno mjesto na uređaju nanošena su 2 μL uzorka.

3.3.5. Pročišćavanje RNA

Prilikom izolacije RNA postoji mogućnost da u otopini zaostane i DNA. U svrhu odstranjivanja DNA uzorci su tretirani DNazom I koja hidrolizira jednolančanu i dvolančanu DNA. Prema preporuci proizvođača (*Roche*),⁵⁹ dodaje se 1 U DNaze I na 1 μg ukupne RNA. S obzirom na izmjerenu koncentraciju RNA, u čiste tubice od 1 mL otpipetiran je odgovarajući volumen uzorka kako bi masa RNA odgovarala 1 μg . Za DNazni tretman pripremljene su otopine navedene u tablici 2. Pripremljena je ukupna reakcijska smjesa, razdijeljeno je po 16,1 μL u svaku tubicu s 1 μg RNA i dodane su odgovarajuće količine *nuclease-free* vode do ukupnog volumena od 50 μL . Sadržaj je zagrijavan na termobloku 30 min pri 37°C te je nakon toga DNaza I inaktivirana razrjeđivanjem reakcijske smjese sa RNA do 150 μL sa mqH20. DNaza I uklonjena je iz reakcijske smjese s RNA pročišćavanjem kroz kolonice iz komercijalnog kompleta za pročišćavanje i ukoncentriravanje RNA prema uputama proizvođača (*Thermo Scientific*).⁶⁰

Tablica 2. Sastav otopine za DNazni tretman nepročišćene RNA.

Komponenta	Koncentracija početne otopine	V / μL (za 1x <i>master mix</i>)	koncentracija (konačne smjese, V = 50 μL)
Reakcijski pufer s MgCl_2	10x	5	1x
DNaza I (<i>RNase free</i>)	10 U μL^{-1}	0,1	0,02 U μL^{-1}
<i>RNase OUT</i>	40 U μL^{-1}	1	0,8 U μL^{-1}
Ukupna RNA (m = 1 μg)		odgovarajući volumen koji sadrži 1 μg ukupne RNA	
H_2O <i>nuclease free</i>	-	do 50 μL	-

Kvaliteta dobivene RNA provjerena je gel-elektroforezom u 1% (m/V) agaroznom gelu.

3.3.6. Sinteza cDNA reakcijom reverzne transkriptaze

Izolirana RNA prevedena je u komplementarnu DNA (cDNA) pomoću komercijalnog kompleta za sintezu prvog lanca cDNA prema uputama proizvođača (*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific*).⁶¹ Reakciju reverzne transkripcije katalizira enzim reverzna transkriptaza koji kao kalup koristi RNA i na njemu stvara komplementarnu DNA (cDNA).⁵⁸ Za reakciju su osim kalupa potrebne početnice i dNTP-ovi.

Postupak se sastoji od pripreme dviju odvojenih smjesa (smjesa A i B, tablice 3 i 4) na +4°C. Smjesa A sadrži RNA, oligo(dT) početnice i vodu, dok reakcijska smjesa B sadrži reverznu transkriptazu *RevertAid M-MuIV RT*, inhibitor RNaza, reakcijski pufer i smjesu dNTP-ova. Smjesa A pripremljena je u PCR tubicama. U svaku tubicu dodan je odgovarajući volumen pročišćenih uzoraka RNA kako bi masa RNA kalupa u reakcijskoj smjesi bila 0,5 µg. Smjesi A također je dodan 1 µL oligo(dT) početnica koja je komplementarna poli(A) repu mRNA te *nuclease-free* voda do volumena od 12 µL. Dodatno je pripremljena otopina negativne kontrole u koju je umjesto kalupa RNA dodana voda. Smjesa A pripremljena je u alikvotima po 12 µL za svaku od otopina RNA iz proučavanih linija te je pripremljen jedan alikvot za negativnu kontrolu (tablica 3). Smjesa B pripremljena je prema tablici 4.

Tablica 3. Sastav smjese A za reakciju reverzne transkripcije.

Komponenta	Koncentracija početne otopine	V / µL (za 1x <i>master mix</i>)	koncentracija (konačne smjese A+B, V = 20 µL)
Ukupna RNA ($m = 0,5 \mu\text{g}$)		odgovarajući volumen koji sadrži 0,5 µg ukupne RNA	
oligo(dT)	100 µmol dm ⁻³	1	5 µmol dm ⁻³
<i>nuclease-free</i> voda		do ukupnog volumena od 12 µL	

Tablica 4. Sastav smjese B za reakciju reverzne transkripcije.

Komponenta	Koncentracija početne otopine	V / µL (za 1x <i>master mix</i>)	koncentracija (konačne smjese A+B, V = 20 µL)
Reakcijski pufer	5x	4,0	1x
<i>Ribolock RNase inhibitor</i>	20 U µL ⁻¹	1,0	1 U µL ⁻¹
dNTP smjesa	10 mmol dm ⁻³	2,0	1 mmol dm ⁻³
<i>RevertAid M-MuIV RT</i>	200 U µL ⁻¹	1,0	10 U µL ⁻¹

Ukoliko RNA kalupi sadrže velik udio GC-baza ili sekundarnih struktura preporuča se smjesu A lagano promiješati, kratko centrifugirati i inkubirati 5 min na 65°C, što je i učinjeno. Alikvoti smjese A zatim su naglo ohlađeni stavljanjem na led i u svaki alikvot smjese A razdijeljeno je po 8 μL pripremljenog *master mix*-a smjese B. Konačne smjese ($V = 20 \mu\text{L}$) kratko su centrifugirane, postavljene u uređaj za PCR te je započeta reakcija sinteze cDNA inkubacijom smjesa 60 min na 42°C. Reakcija je zaustavljena zagrijavanjem 5 min na 70°C. Dobivene otopine cDNA spremljene su na -20°C do daljnje upotrebe.

3.3.7. Lančana reakcije polimeraze (PCR)

Prisutnost određenog slijeda u DNA može se provjeriti lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction, PCR*). Metoda se temelji na reakciji sinteze DNA lanca u smjeru 5' \rightarrow 3' koju katalizira termostabilna DNA-polimeraza. Za reakciju je potreban kalup DNA, specifične početnice koje omeđuju ciljni slijed i dNTP-ovi. Tijekom PCR-a ponavlja se ciklus od tri koraka (toplinska denaturacija dvolančane DNA, sljepljivanje početnica na komplementarne dijelove lanca DNA i produženje komplementarnog lanca DNA) što dovodi do eksponencijalnog umnažanja specifičnog odsječka *in vitro*.⁶² Umnažanje fragmenata gDNA u ovom radu postignuto je uz pomoć *DreamTaq* polimeraze, u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 20 μL . Sastav reakcijskih smjesa za PCR dan je u tablici 5, a početnice korištene u ovom diplomskom radu dane su u tablici 6.

Tablica 5. Priprema smjese za PCR uz kalup gDNA/cDNA.

Komponenta	Koncentracija početne otopine	V / μL (za PCR 1x <i>master mix</i>)	koncentracija (konačne smjese za PCR; $V = 20 \mu\text{L}$)
Kalup	-	2,0	-
Uzvodna početnica	10 μM	0,6	0,3 μM
Nizvodna početnica	10 μM	0,6	0,3 μM
dNTP smjesa	2 mM (svaki)	2,0	0,2 mM (svaki)
<i>DreamTaq</i> pufer	10x	2,0	1x
<i>DreamTaq</i> DNA-polimeraza	5 U μL^{-1}	0,1	0,025 U μL^{-1}
mqH_2O	-	12,7	-

Tablica 6. Početnice korištene u lančanoj reakciji polimeraze s gDNA, odn. cDNA.

Početnica	T _m (<i>Macrogen</i>) / °C	Nukleotidni slijed
<i>FwAtill2/355</i>	63,3	AGGAAGGTGTTGAGTGGGAGC
<i>RevAtill2/699</i>	65,3	GGCAGCATGACCTCCTTTCCC
<i>GFP_REV_Sall</i>	75,7	GGAAATTCGTCAGTCGACTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
<i>Act3 fw</i>	54.8	GATTTGGCATCACACTTTCTACAATG
<i>Act3 rev</i>	54.4	GTTCCACCACTGAGCACAATG

Provedena je lančana reakcija polimeraze (PCR) pri različitim uvjetima ovisno o očekivanoj veličini fragmenata nastalih umnažanjem gDNA, odn. cDNA (tablice 7, 8 i 9).

Tablica 7. Postav PCR-a za reakcije umnažanja fragmenta *AtILL2-His6* od 344 pb.

Korak	Temperatura / °C	Trajanje ciklusa / min	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	3	1
Denaturacija	95	0,5	40
Sljepljivanje početnica	58	0,5	40
Produljenje	72	1	40
Završno produljenje	72	5	1
	10	∞	

Tablica 8. Postav PCR-a za reakcije umnažanja fragmenta *AtILL2-His6-GFP* od 1745 pb.

Korak	Temperatura / °C	Trajanje ciklusa / min	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	3	1
Denaturacija	95	0,5	40
Sljepljivanje početnica	58	0,5	40
Produljenje	72	2,5	40
Završno produljenje	72	10	1
	10	∞	

Tablica 9. Postav PCR-a za reakcije umnažanja fragmenta aktina 3 od 650, tj. 750 pb.

Korak	Temperatura / °C	Trajanje ciklusa / min	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	3	1
Denaturacija	95	0,5	40
Sljepljivanje početnica	60	0,5	40
Produljenje	72	1	40
Završno produljenje	72	10	1
	10	∞	

PCR produkti pohranjeni su na +4°C ili su odmah provedeni u kontrolnu agaroznu gel-elektroforezu.

3.3.8. Agarozna gel-elektroforeza

PCR-produkti analizirani su elektroforezom na gelu agaroze. Budući da se radi o fragmentima DNA koja je negativno nabijena zbog fosfatnih skupina, oni se pri neutralnom pH pod djelovanjem električnog polja kreću prema pozitivnoj elektrodi. S obzirom da je omjer mase i naboja gotovo jednak za sve polinukleotide, ključan je učinak gela kao molekulskog sita koji uvjetuje da se male molekule gibaju brže od velikih. Raspon molekulskih masa koje se mogu odijeliti ovisi o veličini pora gela koja se kontrolira mijenjanjem koncentracije agaroze u gelu.⁶²

U ovom radu za pripremu gelova i provođenje elektroforeze korištena je aparatura za horizontalnu elektroforezu (*Embi Tec*). S obzirom na očekivanu veličinu PCR-fragmenta, pripremljen je gel od 1 - 2% (*m/V*) agaroze u 1x TAE ili 1x TBE u puferu. Prilikom pripreme gela, da bi se agarozna potpuno otopila smjesa je zagrijana u mikrovalnoj pećnici. Otopina je kratko puštena da se ohladi pa je izlivena u kadicu za izlivanje gelova u koju je postavljen nosač. Postavljeni su češljići za formiranje jažica i otopina je puštena da se skrutne.

1% (*m/V*) otopina agaroze u 1x TAE ili 1x TBE puferu

$$\text{agarozna } \gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$$

Analogno pripremi 1% otopine agaroze, prema potrebi pripremljene su 1,5% otopina agaroze ($\gamma = 15 \text{ g dm}^{-3}$), tj. 2% agaroze ($\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$) u 1x TAE ili 1x TBE puferu.

Pufer 1x TAE

$$\text{Tris-HCl } c = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$$

$$\text{ledena octena kiselina } \varphi = 0,11\%$$

$$\text{EDTA } c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}, \text{ pH } 8,0$$

Pufer 1x TBE

$$\text{Tris-HCl } c = 90 \text{ mmol dm}^{-3}, \text{ pH } 8,3$$

$$\text{borna kiselina } c = 88 \text{ mmol dm}^{-3}$$

$$\text{EDTA } c = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$$

Pripremljen gel ostavljen je na nosaču i prebačen je u kadicu za elektroforezu napunjenu 1x TAE puferom ili 1x TBE puferom.

U prvu jažicu naneseo je 5 μL biljega molekulskih masa veličina 100-3000 pb (*Fermentas*), a u ostale jažice po 10 μL uzorka. Uzorci su pripremljeni tako da je na *parafilm* naneseo 10 μL PCR produkta, dodano 2 μL pufera za nanošenje i resuspendirano pomoću mikropipete. Pufer za nanošenje služi za lakše praćenje elektroforeze i za efikasno nanošenje uzoraka u jažice.

Pufer za nanošenje uzoraka DNA na gel

(*DNA Gel Loading Dye (6X)*, cat.no. R0611, *Thermo Scientific*)

Tris-HCl $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,6

bromfenol-plavo $\gamma = 0,3 \text{ g dm}^{-3}$

ksilen-cijanol FF $\gamma = 0,3 \text{ g dm}^{-3}$

glicerol $\varphi = 60\%$

EDTA $c = 60 \text{ mmol dm}^{-3}$

Elektroforeza je provedena pri 100 V u svim analizama, osim kod provjere kvalitete RNA gdje je provedena pri 50 V, dok fronta nije prešla otprilike polovicu gela.

Položaji pruga koji odgovaraju PCR produktima, tj. RNA vizualizirani su bojenjem agaroznog gela etidijevim bromidom. Etidijev bromid interkalirajući je reagens koji se umeće u dvolančanu strukturu DNA te se pobudom UV zračenjem može detektirati emisija narančastog svjetla.⁶² Gelovi su inkubirani u otopini etidijeva bromida približno 5 min. Zatim su kratko isprani u vodi i snimljeni pod UV svjetlom pri ekspoziciji od 300 ms.

3.4. Metode rada s proteinima

3.4.1. Izolacija ukupnih staničnih proteina

Za izolaciju ukupnih staničnih proteina prikupljeno je 5, 6 odn. 7 klijanaca od svake transgenične linije i 5 klijanaca divljeg tipa *A. thaliana* (ekotip Ws). Tubice su držane u tekućem dušiku, prikupljeno tkivo pohranjeno je na -80°C do postupka izolacije. Uzorci su homogenizirani u homogenizatoru *Mixer Mill*, prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.

U svaku tubicu s homogeniziranim tkivom dodano je po 200 μL 1x pufera za izolaciju u koji su prethodno dodani β -merkaptoetanol ($\varphi = 3\%$) i smjesa inhibitora proteaza (*protease inhibitor mix*, $\varphi = 0,01\%$). Uzorci su denaturirani zagrijavanjem 5 min na 99°C na termobloku. Nakon kratkog centrifugiranja, odvojen je supernatant u čiste tubice od 1 mL i centrifugiran je 5 min na sobnoj temperaturi pri 16000 x g. Supernatant je odvojen i spremljen na -20°C .

2x pufer za izolacijuTris-HCl (pH 6,8) $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ SDS $m/V = 8\%$ glicerol $\varphi = 40\%$ bromfenol plavo $\varphi = 0,002\%$ *3.4.2. Priprema gelova za SDS-PAGE*

Gel za SDS-poliakrilamidnu gel-elektroforezu sastoji se od gela za razdvajanje i gela za sabijanje. Pripremljeni su gelovi prema sastavu danom u tablici 10, pri čemu su APS i TEMED dodani neposredno prije izlijevanja gelova budući da je APS inicijator polimerizacije, a TEMED katalizator.

Tablica 10. Priprema gelova za SDS-PAGE.

Komponenta	Gel za razdvajanje	Gel za sabijanje
	V (za 2 gela) / μL	V (za 2 gela) / μL
m $\varphi\text{H}_2\text{O}$	$3,35 \times 10^3$	$3,05 \times 10^3$
$1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH 8,8	$2,5 \times 10^3$	-
$0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH 6,8	-	$1,25 \times 10^3$
Akrlamid/bisakrlamid (30%)	$4,0 \times 10^3$	660
10% (m/V) SDS	100	50
10% (φ) APS	50	50
TEMED	5	5

U pravilno složenu konstrukciju za izlijevanje gelova najprije je pomoću mikropipete od 1 mL nanesen gel za razdvajanje pazeći da ne zaostaju mjehurići zraka. Na rub nepolimeriziranog gela odmah je nanescena m $\varphi\text{H}_2\text{O}$ do vrha nižeg stakla. Gel je pušten da polimerizira približno 45 min. Zatim je voda izlivena i nanesen je gel za sabijanje do gornjeg ruba nižeg stakla također pazeći da nema mjehurića zraka. U gel za sabijanje umetnut je češalj za formiranje jažica. Nakon što je gornji gel polimerizirao (otprilike 30 min), konstrukcija je rastavljena, gel je ostavljen među stakalcima, omotan u vlažan papir da ne presuši i pohranjen na $+4^\circ\text{C}$ u plastičnoj vrećici.

Prilikom izvođenja SDS gel-elektroforeze gelovi se postavljaju u kadice s 1x elektroforetskim puferom.

Elektroforetski pufer 5x (pH 8,3)Tris-HCl $c = 123,8 \text{ mmol dm}^{-3}$ glicin $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ SDS $m/V = 0,5\%$ **3.4.3. SDS-PAGE**

Za analizu proteina odabrana je elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti SDS-a (SDS-PAGE). Radi se o denaturirajućoj elektroforezi budući da se SDS veže za hidrofobne dijelove proteina što dovodi do narušavanja sekundarne strukture. Pritom je količina SDS-a vezana po jedinici mase proteina konstantna, a naboj kompleksa određen je nabojem SDS-a. To omogućava odjeljivanje proteina elektroforezom isključivo na temelju njihove veličine.⁶²

Korišteni su ekstrakti ukupnih staničnih proteina spremljeni na -20°C te su stoga najprije ostavljeni na $+4^{\circ}\text{C}$ da se odlede. U svaki uzorak s proteinskim ekstraktom ($V = 200 \mu\text{L}$) dodano je još $5 \mu\text{L}$ bromfenol-plavog (konačni volumni udio $\varphi = 0,025\%$). SDS je otopljen do kraja zagrijavanjem uzoraka 3 min na 99°C na termobloku, a zatim su tubice centrifugirane na sobnoj temperaturi 5 min pri $14000 \times g$.

Po potrebi u uzorke je dodan i klasičan SB pufer za nanošenje proteina u jažice u omjeru 2 volumena uzorka: 1 volumen SB pufera.

SB pufera za nanošenje proteina na jažice:Tris-HCl $c = 62 \text{ mmol dm}^{-3}$ SDS $m/V = 2\%$ glicerol $\varphi = 10\%$ bromfenol-plavo $\varphi = 0,05\%$ β -merkptoetanol $c = 0,72 \text{ mol dm}^{-3}$

Na gel je nanoseno po $15 \mu\text{L}$ pripremljenih uzorka i $5 \mu\text{L}$ markera veličina *Roti-mark 10-150* (Carl Roth) ili $5 \mu\text{L}$ *prestained* markera (Thermo Scientific). Svaki uzorak nanosen je paralelno na dva gela kako bi se jedan gel iskoristio za *western-hibridizacijsku* analizu, a drugi za provjeru uspješnosti elektroforeze.

Elektroforeza je provedena najprije 10 min pri 100 V, a zatim pri 190 V dok fronta nije dosegla donji rub gela.

Kako bi vizualizirali proteinske pruge, gelovi su inkubirani u boji *Coomassie Brilliant Blue* približno 10 min uz ljuljanje i zatim odbojeni u kipućoj destiliranoj vodi. Sulfo-skupine iz boje vežu se za amino-skupine u proteinima preko Van der Waalsovih i ionskih interakcija što omogućava jednostavnu detekciju položaja proteina u gelu.⁶³

Otopine za bojanje gelova Coomassie Brilliant Blue bojom

Coomassie R-250 $m/V = 0,1\%$

metanol $\varphi = 40\%$

ledena octena kiselina $\varphi = 10\%$

3.4.4. Bojanje srebrom

Nakon elektroforeze SDS-poliakrilamidni gel je obojan srebrom kako bi se detektirale i izrazito male količine rekombinantnog proteina ukoliko je prisutan u uzorcima. Bojanje srebrom izrazito je osjetljiva metoda koja omogućava detekciju manje od 1 ng proteina.⁶⁴ Srebrovi ioni vežu se za proteine primarno preko interakcije s karboksilnim skupinama u bočnim ograncima aspartata i glutamata, imidazolnim prstenom histidina, sulfhidrilnom skupinom cisteina i amino-skupinom lizina. Vezani ioni zatim se reduciraju do elementarnog srebra što dovodi do pojave vidljivih smeđe-crnih pruga koje odgovaraju položajima proteina na gelu.⁶⁵ Postupak bojanja srebrom proveden je prema protokolu opisanom u tablici 11. Gelovi se mogu čuvati u STOP-otopini u frižideru, a prije skeniranja isprani su u 30% metanolu.

Tablica 11. Vizualizacija proteina u poliakrilamidnom gelu tehnikom bojanja srebrom.⁶⁶

Korak	Dodatak	Trajanje
Fiksiranje	metanol $\varphi = 50\%$ octena kiselina $\varphi = 12\%$	preko noći, uz ljuljanje
Ispiranje	EtOH $\varphi = 30\%$	3 x 20 min
Prethodna obrada	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ $\gamma = 0,2 \text{ g L}^{-1}$	1 min
Ispiranje	mqH_2O	3 x 20 s
Impregniranje	AgNO_3 $\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$ HCOH $\varphi = 37\%$	20 min
Ispiranje	mqH_2O	3 x 20 s
Razvijanje	Na_2CO_3 $\gamma = 60 \text{ g L}^{-1}$ HCOH $\varphi = 37\%$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ $\gamma = 0,2 \text{ g L}^{-1}$	do pojave vrpce na gelu
STOP (zakiseljavanje)	metanol $\varphi = 50\%$ octena kiselina $\varphi = 12\%$	min. 10 min

3.4.5. Western-hibridizacijska analiza

Proteini od interesa u ukupnom proteinskom ekstraktu mogu se identificirati *western-hibridizacijskom* tehnikom. Metoda se temelji na komplementarnosti između ciljnog proteina i primarnog antitijela. Postupak se sastoji od sljedećih koraka: proteini se odijele na temelju molekulske mase elektroforezom na gelu, zatim se imobiliziraju na čvrstoj podlozi, a prazni prostori između uzoraka blokiraju se otopinom neutralnih proteina kako bi se spriječile nespecifične interakcije membrane i primarnog antitijela, slijedi hibridizacija ciljnog proteina s primarnim antitijelom, ispiranje nespecifično vezanog antitijela i vezanje sekundarnog antitijela, koje se može jednostavno detektirati, na primarno antitijelo.⁵⁸

U ovom radu proteini s gela preneseni su na PVDF membranu mokrim prijenosom te su stoga pri kraju elektroforeze izrezane membrane nešto veće od veličine gela i ostavljene 5 min u 100%-tnom metanolu uz lagano potresanje. Pritom je bitno odrediti veličinu membrane budući da o tome ovise volumeni pufera koji će biti korišteni u narednim koracima analize.

Nakon provedene elektroforeze, kao što je već spomenuto, jedan gel od svakog para iskorišten je za *western-hibridizacijsku* analizu. Uklonjen je gel za sabijanje, a gel za razdvajanje ekvilibriran je u puferu za prijenos proteina. Gotovo istovremeno je u hladan pufer za prijenos prebačena i membrana, koja je nakon inkubacije u metanolu najprije kratko isprana u mqH₂O. Također, u veliku Petrijevu zdjelicu postavljene su spužvice i filter papiri na otvorenu kazetu i namočeni su puferom za prijenos. Složen je sendvič za prijenos tako da je na tamnu stranu kazete položeno redom: spužvica, filter papir, gel, membrana, drugi filter papir i spužvica, te je praznom *Falcon* tubicom istisnut zrak i zatvorena kazeta. Kazeta je postavljena u kadicu na način da tamna strana kazete bude okrenuta prema tamnoj strani kadice i kadica je napunjena hladnim puferom za prijenos toliko da čitava kazeta bude uronjena u pufer. U kadicu je prethodno stavljen magnetič i plastična posuda s ledom. Kadica je poklopljena i postavljena na miješalicu. Prijenos je išao 1 h pri 80 V uz lagano miješanje što osigurava jednoliku distribuciju iona i ujednačavanje temperature pufera.

Pufer za prijenos proteina

Tris baza $c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$

glicin $c = 192 \text{ mmol dm}^{-3}$

SDS $m/V = 0,1\%$

metanol $\varphi = 0,2\%$

Nakon što je prijenos bio gotov, sendvič je rastavljen, gel je obojen bojom *Coomassie Brilliant Blue* kako je opisano u prethodnom poglavlju (3.4.3), a membrane su prebačene u zasebne plastične kvadratne Petrijeve zdjelice s puferom TTBS (1% *Tween 20* u puferu TBS) i inkubirane 15 min uz potresanje. Volumen dodanog pufera TTBS iznosio je 26,4 mL prema preporuci da se membrane ispiru u 0,5 mL pufera po cm^2 membrane. Iz Petrijevih zdjelica izliven je TTBS pufer i uliveno je 26,4 mL svježeg pripremljenog pufera za blokiranje i otapanje protutijela (sastav: pufer TBS, 0,1% ili 1% (φ) *Tween 20* i 2% ili 5% (m/V) mlijeko u prahu). Blokiranje je provedeno 1 h uz lagano potresanje kako bi se za prazne prostore između proteina na membrani vezao protein kazein iz mlijeka.

Pufer TBS 1x

Tris-HCl (pH 7,5) $c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$

NaCl $c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$

Slijedi inkubacija s primarnim antitijelom u puferu za blokiranje i otapanje protutijela. Preporuča se otapanje antitijela u volumenu od 0,25 mL pufera po cm^2 membrane. Otpipetiran je dakle odgovarajući volumen od 13,5 mL svježeg pripremljenog pufera (sastav: pufer TBS, 0,1% ili 1% (φ) *Tween 20* i 2% ili 5% (m/V) mlijeko u prahu). Za proteine s GFP privjeskom dodano je primarno antitijelo (*GFPtag Mouse McAb, Proteintech*) u omjeru 1:1000, a za one s His-privjeskom (antitijelo *His-Tag Mouse McAb, Proteintech*) u omjeru 1:5000. Inkubacija je provedena preko noći na $+4^\circ\text{C}$ uz lagano potresanje.

Otopina s primarnim antitijelom može se ponovno iskoristiti pa je stoga spremljena na -20°C . Membrane su isprane 3 puta po 5 min s 26,4 mL pufera TTBS (1% *Tween 20* u TBS). U Petrijevu zdjelicu dodano je zatim 13,2 mL svježeg pripremljenog pufera za blokiranje i otapanje proteina (sastav: pufer TBS, 0,1% ili 1% (φ) *Tween 20* i 2% ili 5% (m/V) mlijeko u prahu) i sekundarno antitijelo (*Proteintech*) u omjeru 1:10000. Membrane su inkubirane približno 2 h na sobnoj temperaturi uz lagano potresanje. Otopina sa sekundarnim antitijelom izlivena je u otpad, a membrane su isprane 3 puta po 5 min s 26,4 mL pufera TTBS (1% *Tween 20* u TBS) i ostavljene u puferu do detekcije.

Sekundarno antitijelo jednim je krajem komplementarno primarnom antitijelu koje se specifično veže na His- odn. GFP-privjesak u proteinima, a na drugom je kraju konjugirano s hrenovom peroksidazom koja u prisutnosti peroksidnog pufera oksidira luminol, pri čemu se

nastali produkt nalazi u pobuđenom stanju te prelaskom u osnovno stanje emitira svjetlo.⁶⁷ Proteini preneseni na membrane koji imaju na sebi vezano sekundarno antitijelo detektirani su dakle kemiluminescencijom, pomoću *UVitec Cambridge Alliance 4.7* uređaja. S membrane je pokupljen višak TTBS pufera tapkanjem vrha membrane po papirnatom ručniku pazeći da membrana ne presuši te je stavljena na prozirnu foliju. Po membrani je ravnomjerno nakapan 1 mL otopine za detekciju svježe pripremljen miješanjem 500 µL otopina 1 i 2 iz komercijalnog kompleta (*Amersham ECL Prime Western Blotting System, GE Healthcare*). Nakon 1 min membrana je prenesena u uređaj. Prilikom snimanja membrane, vrijeme ekspozicije ovisi o jačini kemiluminescentnog signala.

3.4.6. Afinitetna kromatografija

Budući da analizirane nadekspresorske linije sadrže gen za ekspresiju rekombinantne auksin-amidohidrolaze s His-privjeskom, prisutnost proteina od interesa bilo je moguće provjeriti razdvajanjem staničnog ekstrakta na Ni-NTA agarozu. Ovim se postupkom proteini od interesa ukoncentriravaju što je pogodno za eventualnu analizu *western-hibridizacijskom* tehnikom.

Afinitetna kromatografija s imobiliziranim ionima nikla na agarozu uobičajena je tehnika pročišćavanja proteina s heksahistidinskim privjeskom. Nitrilotriocetna kiseline (engl. *nitrilotriacetic acid, NTA*) kovalentno vezana za agarozni nosač tetradentatno kelira ione Ni^{2+} , a preostala dva koordinacijska mjesta metalnog iona ostaju slobodna za vezanje imidazolnog prstena iz bočnog ogranka histidina. Na taj se način iz smjese proteina specifično odvajaju oni s His-privjeskom. Na kraju se vezani proteini mogu eluirati u denaturirajućim ili nativnim uvjetima ispiranjem otopinom niskog pH ili visoke koncentracije imidazola koji kompetira za vezna mjesta niklovog iona.⁶⁸

U tu je svrhu nakon homogenacije prikupljenog biljnog materijala, u *Eppendorf* tubice dodano po 200 µL hladnog ekstrakcijskog pufera te je sadržaj inkubiran 15 min na +4°C uz lagano miješanje pomoću tresilice. Za to vrijeme pripremljena je Ni-NTA agarozna tako što je u *Eppendorf* tubice razdijeljeno po 500 µL smjese agaroze u etanolu (1:1), tubice su kratko centrifugirane i odstranjen je etanol. Agarozna je isprana s 2 x 1 mL mQH_2O i uravnotežena dodatkom 2 x 1 mL ekstrakcijskog pufera (bez dodatka PMSF-a i β -merkaptioetanol), pritom su između svakog dodatka tubice kratko centrifugirane. Proteinski ekstrakt centrifugiran je 10 min na +4°C pri 16000 x g, supernatant je odvojen od kuglica za homogeniranje i centrifugiran je 5 min na +4°C pri 16000 x g, nakon toga supernatant je ponovno odvojen i još

jednom centrifugiran 5 min pri istim uvjetima. Konačni ekstrakti proteina pomiješani su s po 500 μL pripremljene Ni-NTA agaroze i inkubirani preko noći uz miješanje okretanjem. Tubice s agarozom i vezanim proteinima centrifugirane su 1 min na $+4^\circ\text{C}$ pri 1000 x g i supernatant je spremljen u čiste tubice. Agaroz je isprana s 4 x 1 mL ekstrakcijskog pufera (bez dodatka PMSF-a), između svakog dodatka tubice su centrifugirane 1 min na $+4^\circ\text{C}$ pri 1000 x g te je sačuvano prvo i četvrto ispiranje. Proteini od interesa eluirani su dodatkom 3 x 300 μL pripremljenog pufera za eluciju, pri čemu je nakon svakog dodatka sadržaj resuspendiran, ostavljen 5 min na ledu i centrifugiran 1 min na $+4^\circ\text{C}$ pri 1000 x g. Sve frakcije prikupljene su u čiste tubice. Agaroz je na kraju regenerirana ispiranjem s po 500 μL otopine imidazola ($c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$) i nakon toga s 3 x 1 mL mQH_2O . Nakon svakog dodatka tubice su centrifugirane 1 min na $+4^\circ\text{C}$ pri 1000 x g. Isprana agaroz može se ponovno iskoristiti te je stoga spremljena na $+4^\circ\text{C}$ u otopini 20% etanola.

Ekstrakcijski pufer

NaH_2PO_4 $c = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 8

NaCl $c = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$

imidazol $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$

Triton X-100 $\varphi = 1\%$

β -merkaptetanol $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$

PMSF $c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$

*Triton X-100, β -merkaptetanol i PMSF dodaju se neposredno prije upotrebe

Elucijski pufer

tris-HCl $c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,5

NaCl $c = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$

glicerol $m/V = 5\%$

imidazol $c = 400 \text{ mmol dm}^{-3}$

DTT $c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$

*DTT dodaje se neposredno prije upotrebe

Frakcije dobivene provođenjem afinitetne kromatografije provjerene su SDS-poliakriamidnom elektroforezom.

3.5. Tretmani abiotskim stresorima

3.5.1. Test inhibicije rasta korijena

U svrhu testa inhibicije rasta korijena, sjeme istraživanih linija sterilizirano je prema postupku navedenom u poglavlju 3.2.1 te je nasađeno na MS0 krute podloge bez dodatka antibiotika. Nakon stratifikacije od 48h te stavljanja sjemena na fotoperiod na 22°C, klijanci stari 5 dana od nasađivanja, preseljeni su na tretmane stresorima na 1x MS krute podloge uz dodatak NaCl ($c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$) ili manitola ($c = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$), tj. na 1x MS krute podloge bez stresora za kontrolu.

Klijanci su osmodnevne tretmane proveli na fotoperiodu (16 h dan, 8 h noć) na 22°C u vertikalnom položaju. Nakon 8 dana tretmana, klijanci divljeg tipa ekotipa Ws, te transgeničnih linija skenirani su te su uspoređeni fenotipski. Klijancima je izmjerena duljina korijena, broj lateralnog korijenja, te je promatrana veličina rozete. Eksperiment je proveden u 3-4 biološke replike.

Prirasti korijena (d_i) klijanaca izmjereni su pomoću računalnog programa *EZ-Rhizo* iz programskog paketa *Rhizo-II Root Biometrics Suite*.⁶⁹ Za svaku liniju izračunati su postotci prirasta (D_p) i inhibicije rasta korijena prema formulama:

$$D_p (\%) = \frac{\bar{d}_p}{\bar{d}_0} \times 100$$

$$\text{inhibicija rasta korijena (\%)} = D_0 - D_p$$

gdje je D_p postotak prirasta korijena jedne linije na danoj hranjivoj podlozi (p), a \bar{d}_p srednja vrijednost duljina prirasta korijena klijanaca na podlozi p, određena prema formuli:

$$\bar{d}_p = \sum_{i=1}^n \frac{d_i}{n}$$

$i = 1, \dots, n$

pri čemu se indeks p odnosi na hranjive podloge: MS0 (označeno s „0“ u indeksu fizikalne veličine), MS + 100 mmol dm⁻³ NaCl ili MS + 200 mmol dm⁻³ manitol, a d_i označava prirast korijena i -tog klijanca na podlozi p, pri čemu je ukupan broj klijanaca na podlozi p jednak n.

Odgovarajući postotci standardne devijacije (S_p) izračunati su prema sljedećoj formuli:

$$S_p (\%) = \frac{\sigma_p}{\sigma_0} \times 100$$

gdje je S_p postotak standardne devijacije prirasta korijena na hranjivoj podlozi p, a σ_p standardna devijacija prirasta korijena klijanaca na podlozi p, određena prema formuli:

$$\sigma_p = \sqrt{\frac{\sum_i^n (d_i - \bar{d}_p)^2}{n - 1}}$$

$i = 1, \dots, n$

pri čemu oznake p i d_i imaju gore opisano značenje.

Podaci su statistički obrađeni korištenjem *Real Statistics Resource Pack (Release 5.4)*⁷⁰ računalnog programa primjenom tehnike dvosmjerne analize varijancije (engl. *analysis of variance*, ANOVA) uz Tukey HSD (engl. *honestly significant difference*) *post hoc* test, kojima je utvrđena ukupna značajnost razlike među analiziranim linijama u postotku prirasta korijena odn. inhibicije rasta korijena u uvjetima stresa, te koje se konkretno skupine međusobno značajno razlikuju. Testovi su provedeni uz razinu značajnosti $\alpha = 0,05\%$.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Biljni hormoni auksini sudjeluju u većini procesa uključenih u rast i razvoj biljke kao i u odgovoru biljke na čimbenike stresa, ali točni mehanizmi regulacije spomenutih procesa još uvijek nisu do kraja razjašnjeni. Poznato je da pri niskim koncentracijama auksini stimuliraju diobu, diferencijaciju i elongaciju stanica, a time i procese poput rasta i razvoja korijena i izdanka i sl., dok pri visokim koncentracijama djeluju inhibitorno i toksično. Usljed nepovoljnih uvjeta, u biljkama se između ostalog usporavaju odn. zaustavljaju upravo procesi vezani uz rast i razvoj. Važno je stoga održavanje homeostaze auksina putem njihove biosinteze, degradacije, transporta i konjugacije (reverzibilne i ireverzibilne).

U ovom radu istražene su transgenične linije s nadeksprimiranim genom za fuzijski protein auksin-amidohidrolazu AtILL2 s His-privjeskom (linije 35S::*AtILL2-His6* 25.6 i 35S::*AtILL2-His6* 27.2) te linije s nadeksprimiranim genom za fuzijski protein auksin-amidohidrolazu AtILL2 sa His- i GFP-privjeskom (linije 35S::*AtILL2-His6-GFP* 8.2 i AN.6). Iz odabranih transgeničnih linija *A. thaliana* i divljeg tipa *A. thaliana* izolirana je i analizirana genomska DNA (gDNA), ukupna RNA i ukupni stanični proteini te je provjeren utjecaj odabranih abiotičkih stresora na spomenute potencijalne nadekspresorske linije.

4.1. Analiza genomske DNA

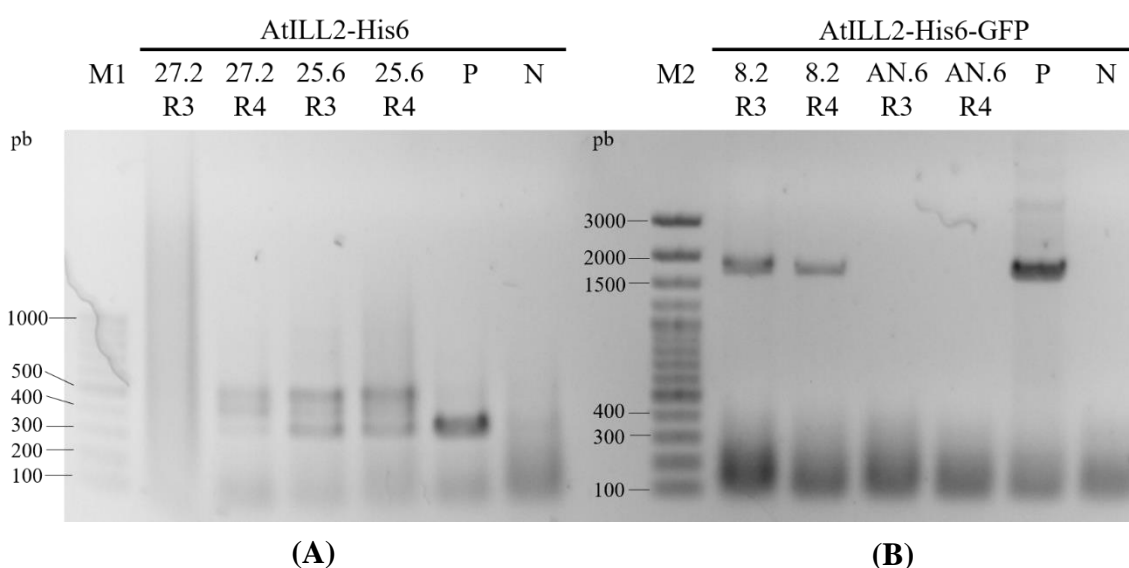
Za provjeru prisutnosti gena za auksin-amidohidrolazu AtILL2 u genomskoj DNA odabranih transgeničnih linija *A. thaliana* korištene su početnice date u tablici 6. Kao uzvodna početnica korištena je početnica *FwAtILL2/305*, a kao nizvodna početnica za provjeru prisutnosti transgena na razini gDNA u transgeničnim linijama 35S::*AtILL2-His6* korištena je početnica *RevAtILL2/699*. Početnica *GFP_Rev_Sall* korištena je kao nizvodna početnica u reakcijama umnažanja segmenta gDNA izolirane iz linija 35S::*AtILL2-His6-GFP*.

Metodom PCR-a uz specifične početnice za gen od interesa umnožen je fragment izolirane DNA, a produkti reakcije analizirani su agaroznom gel-elektroforezom. Genomska DNA izolirana iz 3 ili 4 klijanca (replike označene R3 i R4) iskorištena je kao kalup u PCR reakcijama. Provedene su i dvije kontrolne reakcije. U pozitivnoj kontrolnoj reakciji kao kalup dodan je 1 µL odgovarajućeg rekombinantnog plazmida i 1 µL mqH₂O, dok je smjesa u koju

nije dodan kalup poslužila kao negativna kontrola (dodana su 2 μL mqH₂O, bez dodatka kalupa).

Rezultati analize prikazani su na slici 9.

Očekivana veličina PCR-fragmenata koji odgovaraju genu za AtILL2-His6 iznosi 344 pb, dok je PCR-produkt umnožen iz gena za ILL2-His6-GFP dugačak 1745 pb. Dobiveni PCR-produkti bili su očekivane veličine te je time dokazana prisutnost transgena u svim transgeničnim linijama na razini gDNA, osim u liniji 35S::*AtILL2-His6-GFP* Ws AN.6 (slika 9B).



Slika 9. Provjera prisutnosti transgena u genomske DNA transgeničnih linija *A. thaliana* gel-elektroforezom u 1,5% (m/V) agaroznom gelu. Oznake: **M1** – marker 100 bp DNA Ladder (Fermentas); **M2** – marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas); **R3** odn. **R4** – replike gDNA izolirane iz 3 odn. 4 klijanaca; **AtILL2-His6 27.2** i **25.6** – fragmenti gDNA izolirane iz linija 35S::*AtILL2-His6* Ws; **AtILL2-His6-GFP 8.2** i **AN.6** – fragmenti gDNA izolirane iz linija 35S::*AtILL2-His6-GFP* Ws; **P** – pozitivna kontrola (odgovarajući rekombinantni plazmid *pHOV*); **N** – negativna kontrola (reakcija bez dodatka kalupa).

4.2. Analiza ukupne RNA

Ukupna RNA izolirana je iz 5 klijanaca ili iz 50 mg tkiva (replike označene R5 i R50). Izolirana RNA tretirana je DNazom i dodatno pročišćena pomoću dostupnog komercijalnog kompleta (*GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit, Thermo Scientific*).

Masene koncentracije RNA određene spektrofotometrijski prije i nakon pročišćavanja dane su u tablicama 12 i 13. U tablicama su navedeni i omjeri apsorbancija $A_{260/280}$ te $A_{260/230}$ koji upućuju na čistoću nukleinske kiseline. RNA smatra se čistom ukoliko omjer apsorbancije pri 260 i 280 nm iznosi približno 2. Budući da je apsorpcijski maksimum nukleinskih kiselina na 260 nm, omjer manji od 2 upućuje na prisutnost proteina, fenola ili drugih aromatskih spojeva koji snažno apsorbiraju pri valnoj duljini od 280 nm. Za omjer $A_{260/230}$ uobičajeno je da iznosi između 1,8 i 2,2,⁷¹ a niža vrijednost ukazuje na prisutnost soli, polisaharida, peptida, fenola i drugih tvari koje apsorbiraju pri 230 nm. Pokazalo se da je razlog povećane apsorpcije pri 230 nm gotovo uvijek zagađenje gvanidinijevim tiocijanatom koji se uobičajeno nalazi u sastavu pufera za ekstrakciju RNA, a pokazuje snažnu apsorpciju u području između 220 nm i 230 nm.⁷²

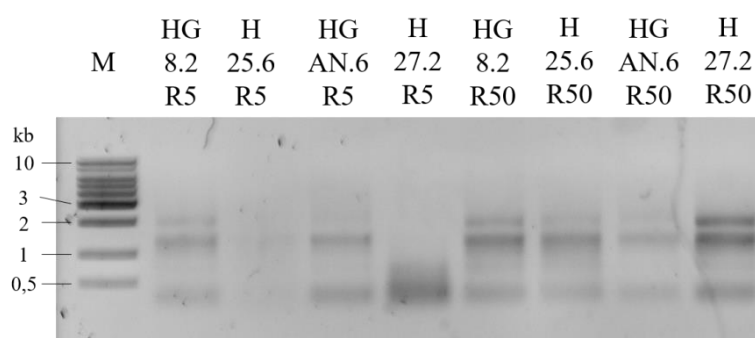
Dobiveni omjeri apsorbancija $A_{260/280}$ u svim replikama izolirane (tablica 12), a potom i pročišćene (tablica 13) ukupne RNA ukazuju na vrlo uspješnu izolaciju RNA bez onečišćenja proteinima, fenolima ili drugim zaostalim aromatskim spojevima. U određenim uzorcima prije DNaznog tretmana i pročišćavanja RNA omjer apsorbancija $A_{260/230}$ ukazuje na potencijalni zaostatak kaotropnih soli iz koraka izolacije ($A_{260/230} = 1,68$ u uzorku AtILL2-His6-GFP AN.6 R5 odn. $A_{260/230} = 2,28$ u replici R50), ali većina uzoraka ima zadovoljavajući omjer apsorbancija ($A_{260/230} \approx 2$). S druge strane, omjeri $A_{260/230}$ nakon tretmana DNazom i dodatnog pročišćavanja RNA znatno su niži. Razlog tome može biti prisutnost soli zaostalih iz postupka pročišćavanja, ali se u većini slučajeva pokazalo da su unatoč nižoj vrijednosti omjera uzorci RNA dovoljno čisti da se s njima nastavi u reakciju sinteze cDNA.⁷²

Prije reverzne transkripcije, kvaliteta izolirane i pročišćene RNA provjerena je agaroznom gel-elektroforezom (slika 10). Pripremljen je 1%-tni agarozni gel i na njega je nanoseno po 5 μ L uzoraka (sastav: 1 μ L uzorka pročišćene RNA, 4 μ L mqH₂O, 1 μ L boje za nanošenje DNA.) Korišteno je 5 μ L biljega molekulskih masa veličina 500-10000 pb (*Bio Basic*). Na elektroforetskoj slici (slika 10) u gotovo svim uzorcima vidljive su tri vrpce koje pretpostavljeno odgovaraju 25S, 18S i 5S rRNA,^{52,73} te bi omjer intenziteta vrpce koje odgovaraju 25S i 18S u slučaju očuvanog integriteta RNA tijekom postupka izolacije trebao

biti 2:1. U većini uzoraka ukupne RNA takav omjer vrpce 25S i 18S nije dobiven, vjerojatno zbog djelomične degradacije RNA prije ili tijekom elektroforeze. Ipak, vrpce na gelu su jasne i nisu razvučene što ukazuje na to da je RNA većinom ostala očuvana pa su stoga uzorci prosljeđeni u daljnji postupak sinteze cDNA.

Tablica 12. Određivanje koncentracije otopina ukupne RNA prije DNaznog tretmana i pročišćavanja. Replike otopina ukupne RNA izolirane iz 5 klijanca odn. 50 mg tkiva označene su oznakama R5 odn. R50.

Otopina ukupne RNA iz linije:	$\gamma / \text{ng } \mu\text{L}^{-1}$	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
35S::AtILL2-His6-GFP 8.2 R5	39,3	2,05	2,16
35S::AtILL2-His6 25.6 R5	39,8	2,00	1,75
35S::AtILL2-His6-GFP AN.6 R5	29,2	2,00	1,68
35S::AtILL2-His6 27.2 R5	60,1	2,07	2,10
35S::AtILL2-His6-GFP 8.2 R50	129,0	2,08	2,24
35S::AtILL2-His6 25.6 R50	129,8	2,07	2,00
35S::AtILL2-His6-GFP AN.6 R50	159,3	2,07	2,28
35S::AtILL2-His6 27.2 R50	172,5	2,07	2,20



Slika 10. Kontrolna elektroforeza pročišćene ukupne RNA transgeničnih biljaka *A. thaliana* u 1% (m/V) agaroznom gelu. Oznake: **M** – marker 0,5-10KB DNA Ladder (*Bio Basic*); **R5** odn. **R50** – replike RNA izolirane iz 5 klijanca odn. 50 mg tkiva; **HG 8.2** i **AN.6** – RNA izolirana iz linija 35S::AtILL2-His6-GFP Ws; **H 27.2** i **25.6** – RNA izolirana iz linija 35S::AtILL2-His6 Ws.

Tablica 13. Određivanje koncentracije otopina pročišćene RNA nakon DNaznog tretmana i pročišćavanja. Replike otopina pročišćene RNA izolirane iz 5 klijanca odn. 50 mg tkiva označene su oznakama R5 odn. R50.

Otopina pročišćene RNA iz linije:	γ / ng μL^{-1}	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
<i>35S::AtILL2-His6-GFP</i> 8.2 R5	88,5	2,06	1,19
<i>35S::AtILL2-His6</i> 25.6 R5	85,5	2,11	1,92
<i>35S::AtILL2-His6-GFP</i> AN.6 R5	81,3	2,10	1,18
<i>35S::AtILL2-His6</i> 27.2 R5	97,0	2,12	1,79
<i>35S::AtILL2-His6-GFP</i> 8.2 R50	93,5	2,19	0,32
<i>35S::AtILL2-His6</i> 25.6 R50	75,0	2,02	1,17
<i>35S::AtILL2-His6-GFP</i> AN.6 R50	54,8	1,93	1,28
<i>35S::AtILL2-His6</i> 27.2 R50	86,4	2,10	1,35

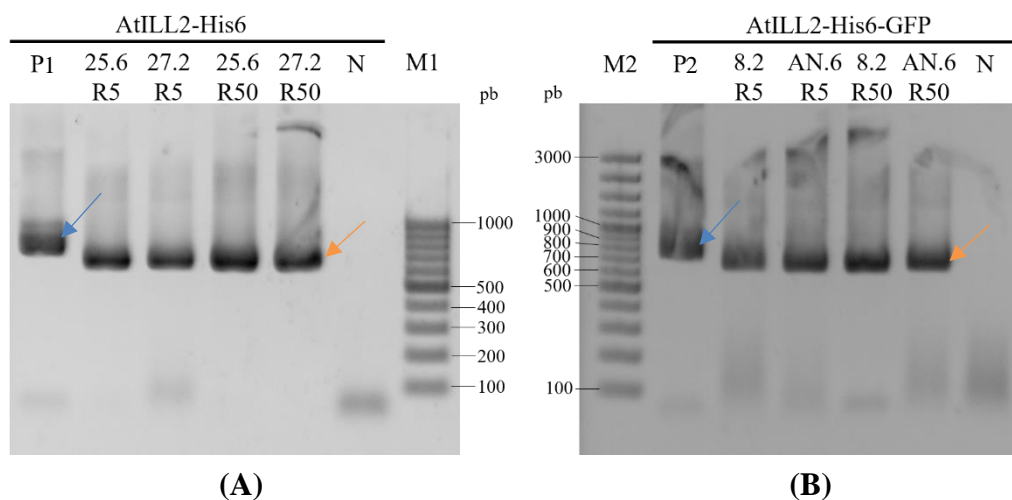
Nakon sinteze komplementarnog lanca DNA (cDNA), provjereno je ima li u uzorcima zaostale gDNA metodom PCR-a uz aktinske početnice (tablica 6). Istim PCR-om ujedno je provjerena uspješnost i kvaliteta sinteze cDNA.

U pozitivnoj kontrolnoj PCR-reakciji kao kalup dodana je odgovarajuća genomna DNA, u kojoj je dokazana prisutnost transgena. U reakcijama umnažanja fragmenta cDNA aktinskim početnicama u linijama sa nadekspresijom *AtILL2-His6* korištena je kao pozitivna kontrola gDNA izolirana iz linije *35S::AtILL2-His6* 25.6. U linijama s nadekspresijom *AtILL2-His6-GFP* kao pozitivna kontrola korištena je gDNA izolirana iz linije *35S::AtILL2-His6-GFP* 8.2. Za negativnu kontrolu upotrijebljen je produkt negativne kontrolne reakcije iz sinteze cDNA. Kao kalup su u reakcijsku smjesu za PCR dodana 2 μL otopine cDNA ili 2 μL pozitivne ili negativne kontrole. Za pripremanje reakcijskih smjesa upotrijebljena je 10 puta razrijeđena otopina cDNA odn. upotrijebljen je 10 puta razrijeđen produkt negativne kontrolne reakcije iz sinteze cDNA kao negativna kontrola za PCR.

Očekivana veličina PCR produkta koji odgovara aktinu 3 u genomskoj DNA je 750 pb, a kod cDNA je 657 pb. Produkti PCR reakcije nakon reverzne transkripcije provjereni su elektroforezom u agaroznom gelu. Slika 11A prikazuje produkte PCR-a aktinskih početnica sa cDNA iz linija *35S::AtILL2-His6* te odgovarajuće kontrole, dok slika 11B prikazuje produkte PCR-a aktinskih početnica sa cDNA iz linija *35S::AtILL2-His6-GFP* te produkte pripadnih kontrolnih reakcija, razdvojene agaroznom gel-elektroforezom.

Provjera PCR produkata agaroznom gel-elektroforezom (slika 12) ukazuje na to da je u svim uzorcima cDNA uspješno sintetizirana reverznom transkripcijom. Naime, u svim se uzorcima pojavljuje samo jedna vrpca koja odgovara kraćem fragmentu od oko 650 pb karakterističnom

za aktin 3 na cDNA (oznaka narančasta strjelica). Također, u svim linijama nema zagađenja s gDNA koje bi (kao i u pozitivnoj kontroli) dovelo do stvaranja PCR-produkta (jedne dodatne vrpce) veličine oko 750 pb (označen plavom strjelicom).



Slika 11. Provjera kvalitete sintetizirane cDNA nakon PCR-a uz aktinske početnice te provjera prisutnosti gDNA u uzorcima cDNA agaroznom gel elektroforezom u 2% (m/V) gelu u TBE puferu. Oznake: M1 – marker *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Fermentas); M2 – marker *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas); R5 odn. R50 – replike RNA izolirane iz 5 klijanca odn. 50 mg tkiva; **AtILL2-His6 27.2 i **25.6** – fragmenti cDNA dobivene reverznom transkripcijom RNA linija *AtILL2-His6* Ws; **AtILL2-His6-GFP 8.2** i **AN.6** – fragmenti cDNA dobivene reverznom transkripcijom RNA linija *AtILL2-His6-GFP* Ws; **P1** – pozitivna kontrola (gDNA izolirana iz 4 klijanca linije *AtILL2-His6* Ws 25.6); **P2** – pozitivna kontrola (gDNA izolirana iz 3 klijanca linije *AtILL2-His6-GFP* Ws 8.2); **N** – negativna kontrola (produkt reakcije reverzne transkripcije bez dodatka kalupa RNA). Plava strjelica pokazuje fragment veličine 750 pb koji odgovara aktinu 3 u gDNA, narančasta strjelica pokazuje fragment veličine 650 pb koji odgovara aktinu 3 u cDNA.**

Nakon provjere kvalitete sintetizirane cDNA i provjere onečišćenja uzoraka cDNA eventualno zaostalom gDNA, moglo se pristupiti provjeri prisutnosti transgena u odabranim linijama na razini transkripcije, tj. na razini cDNA. Prisutnost transgena od interesa u pojedinim linijama uročnjaka provjerena je metodom PCR. U tu svrhu korištene su početnice specifične za određeni transgen, bilo za *AtILL2-His6*, bilo za *AtILL2-His6-GFP*, iste kao i kod kontrolnih PCR-a reakcija na gDNA (vidjeti poglavlje 3.3.7). Za umnažanje fragmenta cDNA koji

odgovara dijelu kodirajuće sekvencije za AtILL2-His6 pripravljena je smjesa za PCR uz početnice *FwAtILL2/355* i *RevAtILL2/699* (kao što je dano u tablici 7, poglavlje 3.3.7). Za umnažanje fragmenta cDNA koji odgovara dijelu kodirajuće sekvencije za AtILL2-His6-GFP pripravljena je smjesa za PCR uz početnice *FwAtILL2/355* te *GFP_Rev_Sall* (kao u tablici 8, poglavlje 3.3.7).

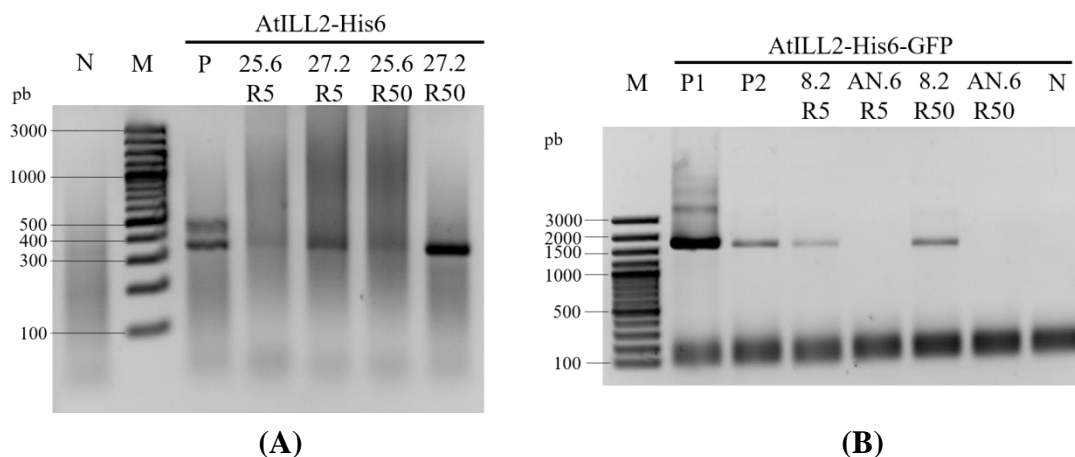
Kao pozitivna kontrola dodan je odgovarajući kalup gDNA u kojoj je prethodno dokazana prisutnost transgena i/ili rekombinantni plazmid *pHOV*. Za negativnu kontrolu iskorišten je PCR produkt negativne kontrolne reakcije iz sinteze cDNA.

Budući da se pokazalo da u uzorcima cDNA nije bilo prisutne gDNA, PCR-om uz početnice specifične za transgen mogla se provjeriti prisutnost transgena u cDNA, a time i dokazati prisutnost transgena na razini transkripcije. Proveden je PCR sa početnicama specifičnima za transgen, kao i u slučaju analize gDNA. Elektroforezom na agaroznom gelu provjereni su produkti PCR reakcije (slika 12). Kao pozitivna kontrola korištena je gDNA transgenične linije kod koje je dokazana prisutnost transgena, konkretno, korištena je gDNA izolirana iz linije *35S::AtILL2-His6* Ws 25.6 ili gDNA izolirana iz linije *35S::AtILL2-His6-GFP* 8.2, odnosno odgovarajući rekombinantni plazmid *pHOV*. U negativnoj kontrolnoj reakciji umjesto kalupa korištena je otopina negativne kontrole iz sinteze cDNA. Za PCR reakcije umnažanja transgena korištena su 2 µL 10 puta razrijeđene otopine cDNA porijeklom iz linija *35S::AtILL2-His6-GFP* (slika 12B) odn. 1 µL originalne otopine cDNA iz linija *35S::AtILL2-His6* (slika 12A) budući da u PCR-reakciji s 10 puta razrijeđenom cDNA iz linija *35S::AtILL2-His6* nisu detektirani PCR-fragmenti (slika nije prikazana).

U linijama *35S::AtILL2-His6* dokazana je prisutnost transkripta za AtILL2-His6 (slika 12) jer je na gelu jasno vidljiva vrpca od 344 pb koja odgovara transgenu/transkriptu za AtILL2-His6. Na slici 12A vidljivo je da je intenzitet vrpce koja odgovara fragmentu veličine 344 pb puno jači u liniji 27.2 (replike R5 i R50), nego u liniji 25.6 (R5 i R50). Budući da je u sintezu cDNA stavljena ista masa RNA (500 ng RNA) u sve reakcije, pojačani intenziteti vrpce u liniji 27.2 upućuje na jaču razinu ekspresije gena u liniji 27.2 u odnosu na liniju 25.6. Točna razina nadekspresije trebala bi se utvrditi kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (engl. *real-time quantitative PCR*, RT-qPCR), međutim u vremenskom okviru ovog diplomskog rada nije bilo moguće provesti spomenuti pokus.

Slično tome, postojanje transkripta za AtILL2-His-GFP dokazano je u liniji 8.2, ali ne i u liniji AN.6, prisutnošću vrpce od 1745 pb na elektroforetskoj slici (slika 12B). Osim toga,

budući da su za dokazivanje transkripta u slučaju linija za nadekspresiju AtILL2-His-GFP korištene deset puta razrijeđene otopine cDNA, može se zaključiti da je razina nadekspresije vjerojatno jača u liniji 35S::AtILL2-His6-GFP 8.2 u odnosu na linije s nadekspresijom AtILL2-His6, međutim konkretna razina nadekspresije trebala bi se još utvrditi qPCR-om.



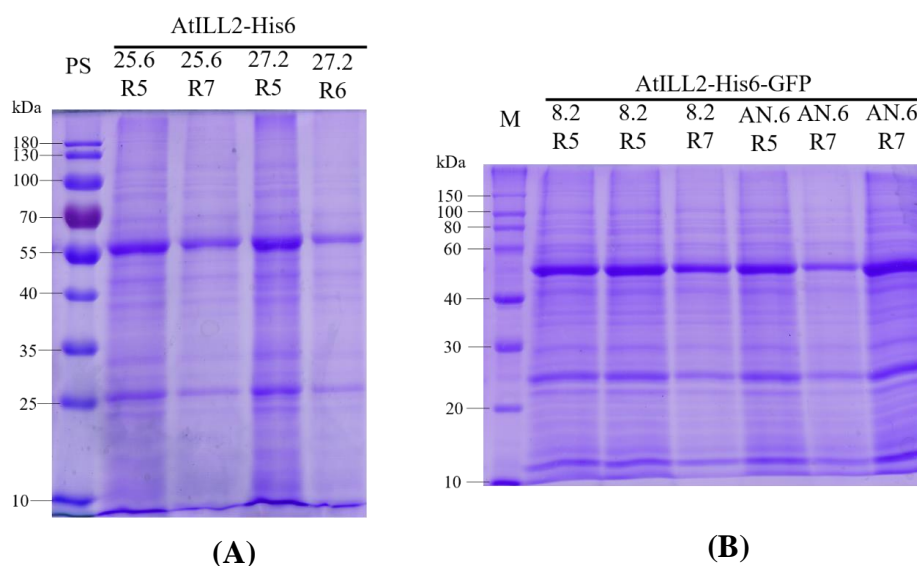
Slika 12. Provjera prisutnosti transgena u cDNA dobivenoj reverznom transkripcijom RNA transgeničnih linija *A. thaliana* elektroforezom u 1,5% (m/V) agaroznom gelu u 1x TAE puferu. Oznake: **M** – marker *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas); **R5** odn. **R50** – replike RNA izolirane iz 5 klijanca odn. 50 mg tkiva; **AtILL2-His6 27.2** i **25.6** – fragmenti cDNA linija 35S::AtILL2-His6 Ws; **AtILL2-His6-GFP 8.2** i **AN.6** – fragmenti cDNA linija 35S::AtILL2-His6-GFP Ws; **P1** – pozitivna kontrola (plazmid *pHOV AtILL2-His6-GFP*); **P2** – pozitivna kontrola (gDNA izolirana iz 3 klijanca linije 35S::AtILL2-His6-GFP Ws 8.2); **P** – pozitivna kontrola (gDNA izolirana iz 4 klijanca linije 35S::AtILL2-His6 Ws 25.6); **N** – negativna kontrola (produkt reakcije reverzne transkripcije bez dodatka kalupa RNA).

4.3. Analiza staničnih proteina

Ukupni stanični proteini izolirani su iz 5-7 klijanaca. Nakon izolacije proteini su pripremljeni za nanošenje na poliakrilamidni gel. SDS-PAG elektroforezom provjerena je uspješnost izolacije ukupnih staničnih proteina, kao i uspješnost razdvajanja proteina (slike 13 i 15). Ukupni stanični proteini iz svih linija razdvojeni su paralelno na dva gela, budući da je jedan gel obojen *Commasie* bojom za vizualizaciju proteinskih vrpca, a drugi gel prosljeđen u protokol za *western-hibridizacijsku* analizu.

Proteini iz linija *35S::AtILL2-His6* (slike 13A i 15A) i linija *35S::AtILL2-His6-GFP* (slike 13B i 15B) te iz divljeg tipa *A. thaliana* (slika 15) uspješno su izolirani i razdvojeni SDS-PAG elektroforezom. Na svim gelovima može se uočiti intenzivna vrpca pri približno 56 kDa i vrpca nešto slabijeg, ali također izraženog intenziteta pri približno 26 kDa te niz proteinskih vrpca koje odgovaraju ostatku staničnih proteina uročnjaka. Kod razdvajanja ekstrakta ukupnih staničnih proteina elektroforezom, vrpce koje bi odgovarale fuzijskom proteinu s histidinskim privjeskom, *AtILL2-His6* ($M_r = 49,7$ kDa) odn. rekombinantnom proteinu s His- i GFP-privjeskom, *AtILL2-His6-GFP* ($M_r = 76,6$ kDa) nije moguće detektirati vizualno nakon bojanja *Coomassie* bojom.

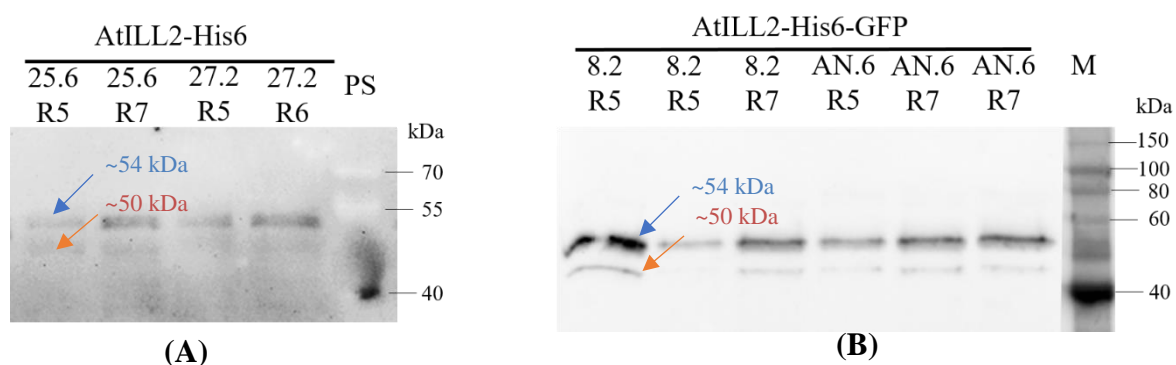
Jesu li u uzorcima prisutni ciljni proteini provjereno je osjetljivijom *western-hibridizacijskom* analizom, budući da su proteini u količini manjoj od 0,2-0,5 μg slabo vidljivi kod detekcije proteina u gelu bojanjem *Coomassie* bojom.⁷⁴ Ukoliko je u transgeničnim linijama došlo do ekspresije rekombinantnih proteina, *western-hibridizacijskom* analizom očekuje se specifična detekcija fuzijskih proteina *AtILL2* s His-privjeskom odn. His- i GFP-privjeskom. Prag detekcije kemiluminiscentnog signala putem *ECL Prime Western Blotting* kita je 1 pg proteina,⁷⁵ što je vrlo osjetljiva metoda čak i za vrlo rijetko zastupljene proteine.



Slika 13. Provjera izolacije ukupnih staničnih proteina iz transgeničnih linija *A. thaliana* SDS-poliakrilamidnom gel-elektroforezom. Oznake: **R5-R7** – replike uzoraka proteina izoliranih iz 4-8 klijanaca; **M** – marker *Roti-mark 10-150* (*Carl Roth*); **PS** – *prestained* marker (*Thermo Scientific*); **AtILL2-His6-GFP 8.2** i **AN.6** – proteini izolirani iz transgeničnih linija *35S::AtILL2-His6-GFP* Ws; **AtILL2-His6 25.6** i **27.2** – proteini izolirani iz transgeničnih linija *35S::AtILL2-His6* Ws.

Nakon elektroforeze, proteini s gela preneseni su na membranu tehnikom mokrog prijenosa. Membrana je zatim blokirana pa inkubirana u otopini primarnog, a potom i sekundarnog antitijela. Proteini na membrani s vezanim sekundarnim antitijelom detektirani su kemiluminescencijom pomoću *UVItec Cambridge Alliance 4.7* uređaja (slike 14 i 16).

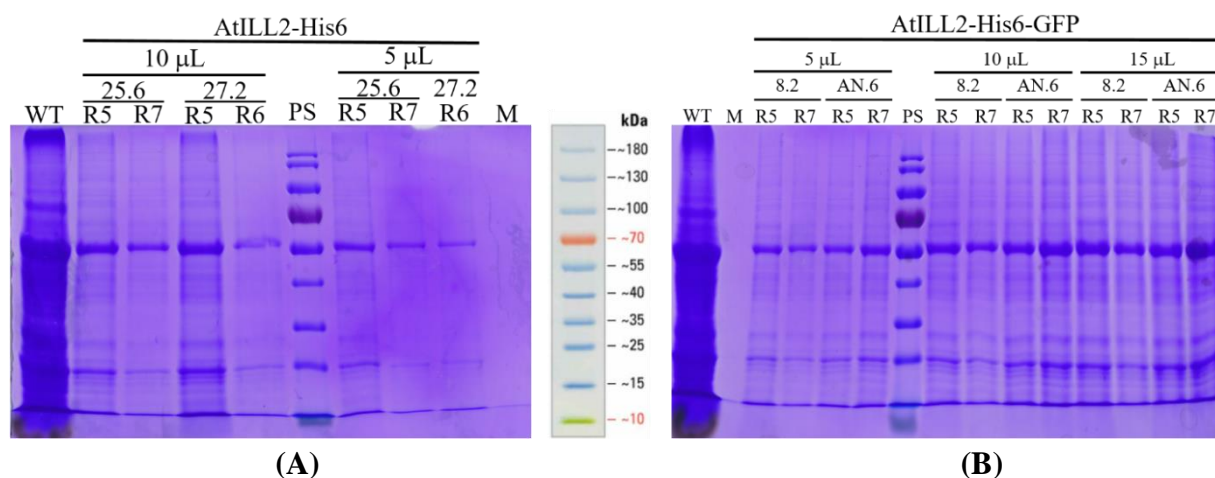
Na imunoblotu prikazanom na slici 14 jasno se vide signali u uzorcima proteina izoliranih iz obiju transgeničnih linija, linija *35S::AtILL2-His-6* (slika 14A) i linija *35S::AtILL2-His6-GFP* (slika 14B). Signali koji odgovaraju proteinima mase oko 50 i 54 kDa javljaju se u svim linijama, čak i u liniji *35S::AtILL2-His6-GFP AN.6* koja dokazano nema transgen niti na razini gDNA niti na razini cDNA.



Slika 14. Imunodetekcija proteina s vezanim sekundarnim antitijelom. Oznake: v. slika 13.

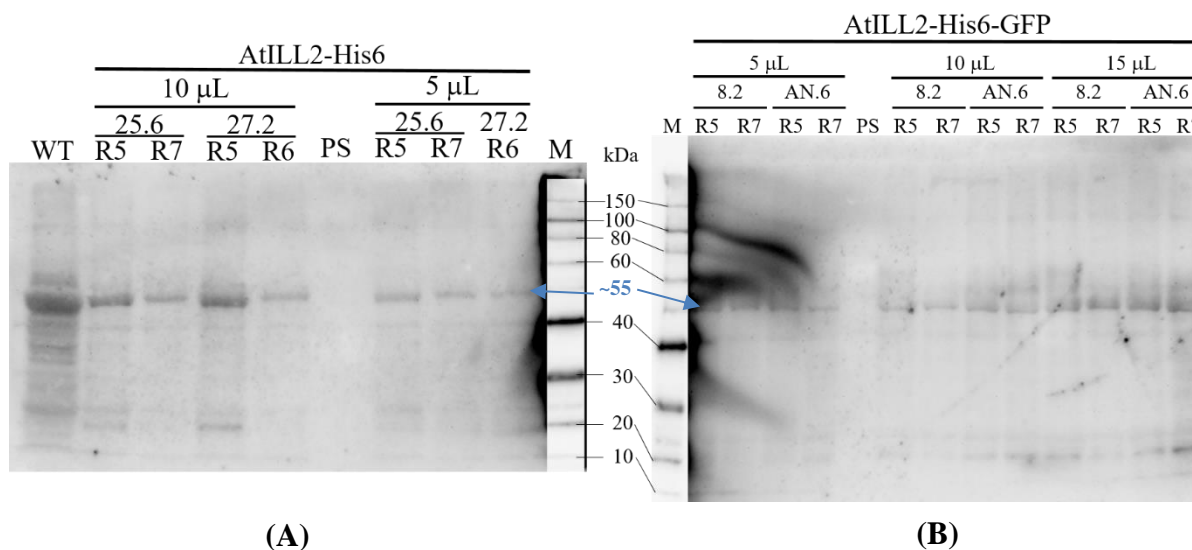
Budući da se u prvim analizama pojavila sumnja jesu li vrpce na imunoblotovima doista očekivane proteinske vrpce ili su rezultat nespecifičnog vezanja, a pritom na gelove nisu nanesene negativne kontrole koje bi to eventualno potvrdile, provedena je druga *western-hibridizacijska* analiza. U ponovljenoj analizi na gel su naneseni uzorci proteina izoliranih iz transgeničnih linija (*35S::AtILL2-His6* i *35S::AtILL2-His6-GFP*) te uzorci iz divljeg tipa uročnjaka kao negativna kontrola.

Ponovljene elektroforeze bile su uspješne (slika 15).



Slika 15. Provjera izolacije ukupnih staničnih proteina iz transgeničnih linija *A. thaliana* SDS-poliakrilamidnom gel-elektroforezom. Oznake: **R5** odn. **R8** – replike uzoraka proteina izoliranih iz 5 odn. 7 klijanaca; **5 µL-15 µL** – volumeni uzoraka nanesenih u jažice; **PS** – *prestained* marker (*Thermo Scientific*); **M** – 100 puta razrijeđen marker *Roti-mark 10-150* (*Carl Roth*); **WT** – negativna kontrola (proteini izolirani iz 4 klijanca divljeg tipa *A. thaliana* Ws); **AtILL2-His6 25.6** i **27.2** – proteini izolirani iz transgeničnih linija *35S::AtILL2-His6* Ws; **AtILL2-His6-GFP 8.2** i **AN.6** – proteini izolirani iz transgeničnih linija *35S::AtILL2-His6-GFP* Ws.

Detekcija proteina kod ponovljene *western-hibridizacijske* analize bila je otežana zbog prejakog signala markera (slika 16), iako je korišten 100 puta razrijeđen marker *10-150 Roti Mark*. Uočeno je znatno nespecifično vezanje posebno vidljivo u negativnoj kontroli. Proteinske vrpce u analiziranim nadekspresorskim linijama ne pojavljuju se pri očekivanoj molekularnoj masi od 49,7 kDa (u linijama *35S::AtILL2-His6*), odnosno pri 76,6 kDa (u linijama *35S::AtILL2-His6-GFP*). Umjesto toga, sve linije pokazuju kemiluminescentni signal pri veličini od oko 55 kDa, uključujući divlji tip *A. thaliana* i transgeničnu liniju *35S::AtILL2-His6-GFP* AN.6. Može se zaključiti da se kod detekcije tretiranih ukupnih staničnih proteina kemiluminescencijom dogodilo nespecifično vezanje primarnog i/ili sekundarnog antitijela koje je rezultiralo nespecifičnim signalima.

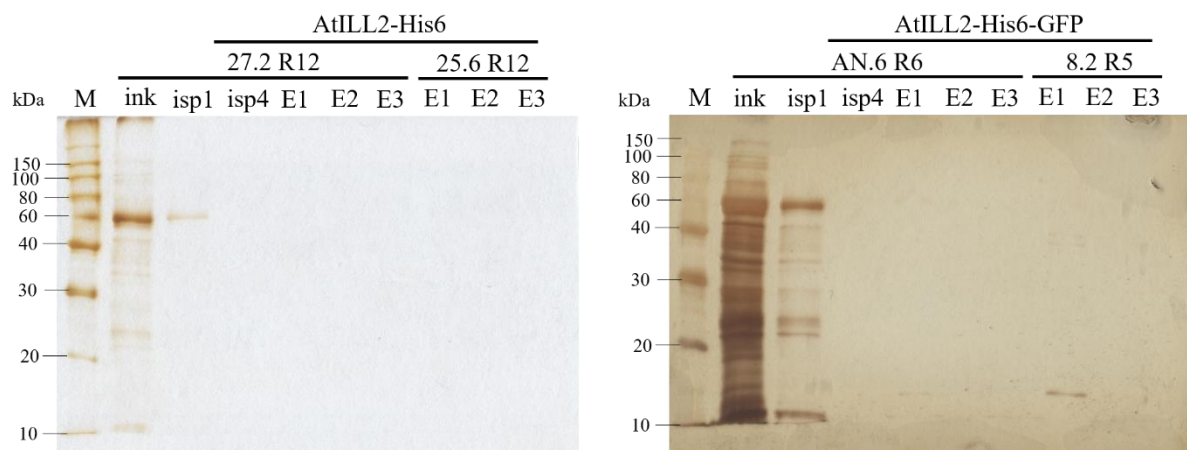


Slika 16. Imunodetekcija proteina s vezanim sekundarnim antitijelom. Oznake: v. slika 15.

Sljedeća opcija je bila pokušati obogatiti ekstrakte proteina, tj. povećati prinos eventualno prisutnih nadeksprimiranih proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA nosaču. U svrhu izolacije i pročišćavanja rekombinantne AtILL2 prikupljeno je i homogenirano po 8 i 12 klijanaca transgeničnih linija *35S::AtILL2-His6* 25.6 i 27.2 i divljeg tipa *A. thaliana Ws* kao kontrole, te po 5 i 6 klijanaca linija *35S::AtILL2-His6-GFP* 8.2 i AN.6, na način opisan u poglavlju 3.2.3.

Izolacija proteina provedena je u ekstrakcijskom puferu kompatibilnom uvjetima potrebnima za afinitetnu kromatografiju (sastav: v. pogl. 3.4.6). Dobivene frakcije proteina nakon afinitetne kromatografije, podvrgnute su SDS-PAG elektroforezi. Prisutnost i uspješnost pročišćavanja fuzijskih proteina provjerena je elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Na gel su nanese frakcije prikupljene tijekom kromatografskog pročišćavanja (aliquoti smjesa prekonoćne inkubacije proteinskih ekstrakata s agarozom, prvo i četvrto ispiranje agaroze s potencijalno vezanim proteinima te tri frakcije prikupljene tijekom koraka elucije proteina vezanih na Ni-NTA agarozu). U uzorke je prethodno dodan SB pufer (sastav: v. pogl. 3.4.3), nakog čega su uzorci denaturirani zagrijavanjem 5 min na 99°C u termobloku i centrifugirani 3 min pri 8000 x g na sobnoj temperaturi. Na gel je nanese po 15 µL pripremljenih uzoraka odn. 5 µL markera veličina *Roti-mark 10-150* (*Carl Roth*).

Gelovi su nakon elektroforeze obojani srebrom, a rezultat je prikazan na slici 17.



Slika 17. Provjera izolacije i pročišćavanja fuzijskih proteina transgeničnih linija *A. thaliana* SDS-poliakrilamidnom gel-elektroforezom. Oznake: **M** – marker *Roti-mark 10-150* (*Carl Roth*); **ink** – proteinski ekstrakt nakon prekonoćne inkubacije s Ni-NTA agarozom; **isp1** i **isp4** – prvo odn. četvrto ispiranje Ni-NTA agaroze s vezanim proteinima; **E1-E4** – redom skupljene frakcije tijekom elucije proteina s Ni-NTA agaroze; **AtILL2-His6 25.6** i **27.2** – proteinski ekstrakti iz transgeničnih linija *35S::AtILL2-His6* Ws; **AtILL2-His6-GFP 8.2** i **AN.6** – proteinski ekstrakti iz transgeničnih linija *35S::AtILL2-His6-GFP* Ws; **R5-R12** – replike uzoraka proteina izoliranih iz 5-12 klijanaca.

Na oba gela može se uočiti proteinska vrpca u uzorcima nakon prekonoćne inkubacije ekstrakta proteina s Ni-NTA agarozom te u prvom ispiranju nakon inkubacije. Spomenuta vrpca javlja se pri približno 60 kDa, što ne odgovara masi nijednog fuzijskog proteina (masa *AtILL2-His6* iznosi 49,7 kDa, a masa *AtILL2-His6-GFP* 76,6 kDa). U eluatima se ne uočava nijedna jače izražena proteinska vrpca. Čak i da postoji vrlo malo eksprimiranog proteina, bojanje gelova srebrom (kojemu je osjetljivost manja od 1 ng)⁶⁴ nakon SDS gel-elektroforeze nije ukazalo na postojanje proteinskih vrpca odgovarajućih veličina.

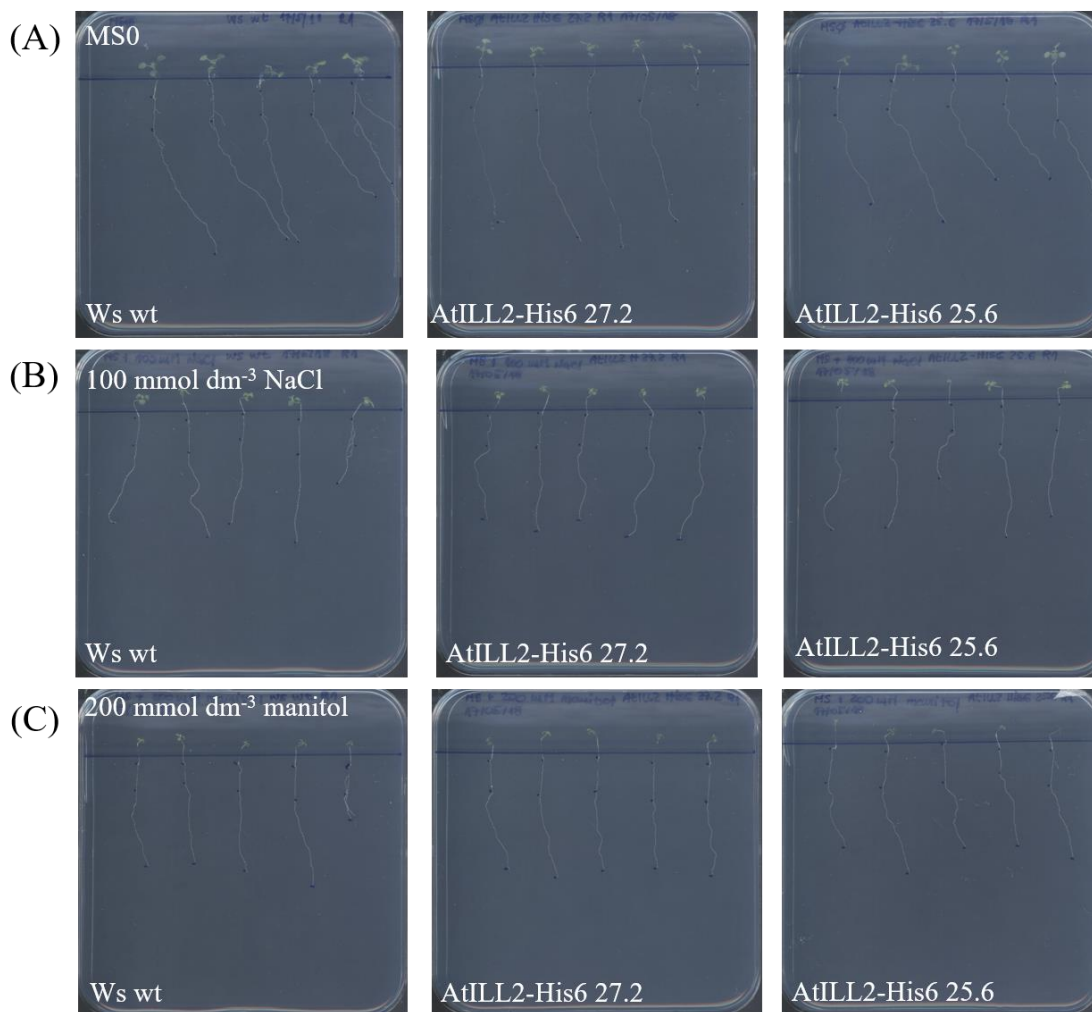
S obzirom na dobivene rezultate analize gDNA i ukupne RNA, ustanovljeno je da se u svim linijama, izuzev *35S::AtILL2-His6-GFP* AN.6, uspješno ugradila T-DNA s odgovarajućim transgenom, te da se u svim linijama, izuzev *35S::AtILL2-His6-GFP* AN.6, događa transkripcija ugrađenog transgena. Međutim, *western-hibridizacijska* analiza proteina pokazala je da ekspresije rekombinantnih proteina nema ili je nedostatak signala rezultat nedostatnog blokiranja membrane, iako je korak blokiranja proveden na dva načina: 1 h u 5% mlijeku u prahu ili minimalno 8 h u 2% mlijeku u prahu. Također, postoji i mogućnost da je ekspresija proteina u uročnjaku regulirana kroz posttranskripcijsko utišavanje transgena.⁷⁶ Naime, moguće

je da ulogu u cijepanju mRNA za AtILL2-His6 ili za AtILL2-His6 GFP, imaju miRNA poput miR167a koja utišava IAR3 mRNA⁵¹ ili miR393 koja posttranskripcijski regulira auksinski receptor TIR1.⁴¹ Također, moguće da je došlo do međugeneracijskog utišavanja transgena, budući da je u T2 i T3 generaciji biljaka dokazana jača ekspresija proteina (neprikazani podaci dobiveni u sklopu projekta PhytoBraCro), za razliku od negativnog rezultata kod T4 generacije biljaka analiziranih u ovom diplomskom radu. Razlog tome može biti metilacija promotora i transgena koja dovodi do smanjenja ekspresije gena ili njegovog potpunog utišavanja. U literaturi su zabilježeni primjeri postupne metilacije promotora i odgovarajućeg smanjenja ekspresije gena, te potpunog zaustavljanja ekspresije u kasnijim generacijama homozigotnih linija zbog proširivanja metilacije na transgen.⁷⁷ Za analizu ekspresije proteina potencijalno je bitan i trenutak sabiranja tkiva budući da je primjerice u transgeničnim biljkama *Nicotiana attenuata* u kasnijim fazama razvoja zabilježena povećana metilacija 35S promotora.⁷⁸

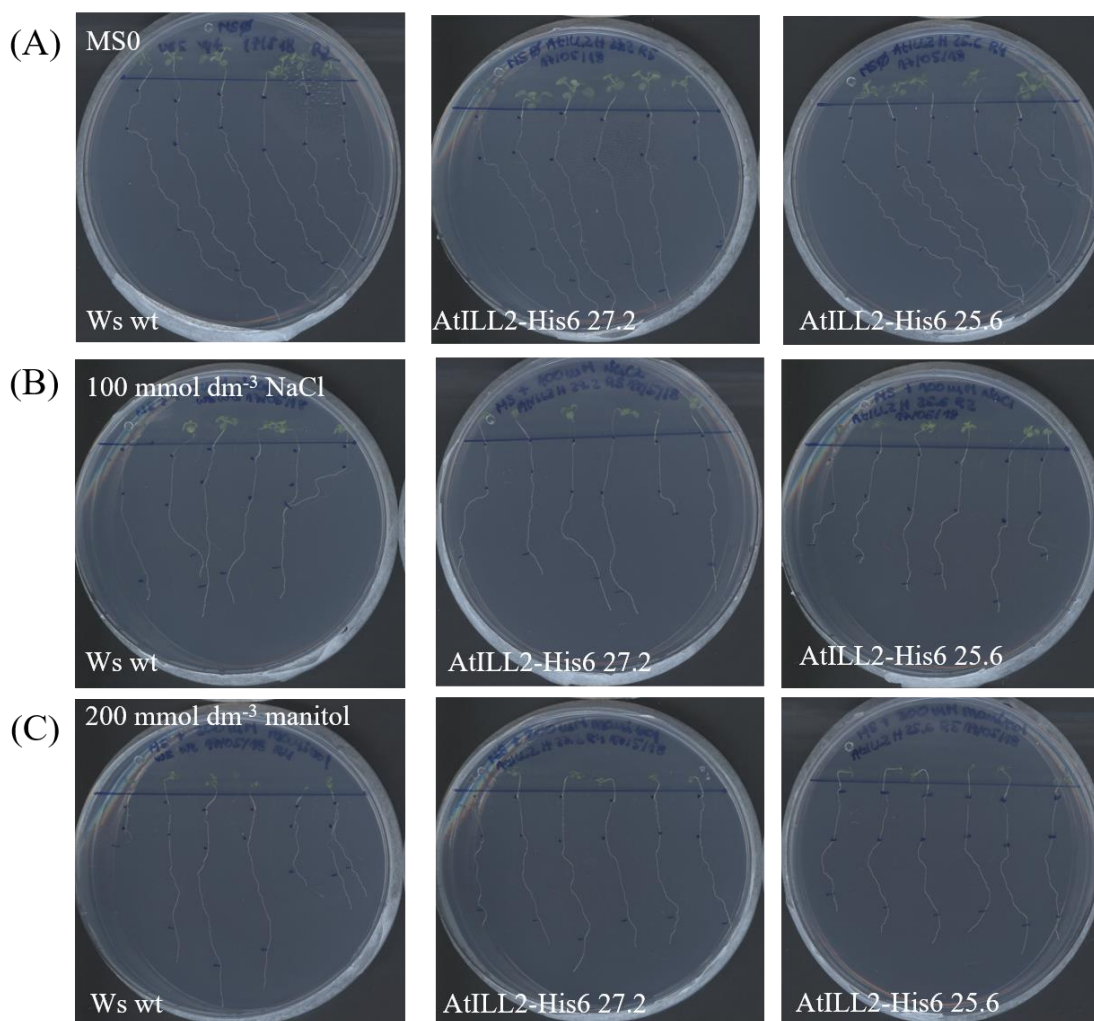
S druge strane, neke linije sa T-DNA insercijom gube tijekom generacija rezistenciju na antibiotike⁷⁹ te bi u ovom radu bilo za očekivati vidljivo utišavanje transgena za rezistenciju na antibiotik. Međutim dobivenim linijama istraživanima u ovome radu rezistencija na higromicin B ostala je očuvana.

4.4. Test inhibicije rasta korijena

Radi provjere odgovora odabranih linija potencijalnih nadekspresora AtILL2 na čimbenike solnog i osmotskog stresa proveden je test inhibicije rasta korijena. Klijanci biljaka linija *35S::AtILL2-His6* i klijanci divljeg tipa nasađeni su na hranjive podloge bez stresora (MS0) te na podloge s dodatkom ionskog (NaCl) odn. osmotskog (manitol) stresora. U svrhu provjere utjecaja solnog i osmotskog stresa na nadekspresorske linije za auksin-amidohidrolazu, praćen je rast korijena transgeničnih biljaka *35S::AtILL2-His6 25.6* te *35S::AtILL2-His6 27.2* i biljaka divljeg tipa ekotipa Ws nasađenih na hranjive podloge bez stresora i uz dodatak natrijeva klorida odn. manitola. Slika 18 prikazuje kvadratne ploče s 11 dana starim klijancima koji su 8 dana bili na tretmanu. Slika 19 prikazuje okrugle ploče s 14 dana starim klijancima koji su 11 dana bili na tretmanu. Klijanci sa kvadratnih ploča iskorišteni su u analizi testa inhibicije rasta korijena programom *EZ-Rhizo* i statističkom obradom. Klijanci sa okruglih ploča uspoređeni su s obzirom na fenotipske karakteristike, duljinu primarnog korijena, broj lateralnog korijenja te veličinu rozete. Utvrđeno je da se broj lateralnog korijenja te veličina rozete ne razlikuju od divljeg tipa pri istim uvjetima.



Slika 18. Utjecaj solnog i osmotskog stresa na rast korijena *A. thaliana*. Jedanaest dana stari klijanci nakon 8 dana tretmana: na hranjivoj podlozi MS bez dodatka stresora (A), na hranjivoj podlozi uz dodatak ionskog stresora ($100 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$) (B), na hranjivoj podlozi uz dodatak osmotskog stresora ($200 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ manitol}$) (C). **Ws wt** – divlji tip *A. thaliana* (Ws); **AtILL2-His6 27.2** i **25.6** – transgenične linije *A. thaliana* (Ws).



Slika 19. Utjecaj solnog i osmotskog stresa na rast korijena *A. thaliana*. Četrnaest dana stari klijanci nakon 11 dana tretmana: na hranjivoj podlozi MS bez dodatka stresora (A), na hranjivoj podlozi uz dodatak ionskog stresora ($100 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$) (B), na hranjivoj podlozi uz dodatak osmotskog stresora ($200 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ manitol}$) (C). **Ws wt** – divlji tip *A. thaliana* (Ws); **AtILL2-His6 27.2** i **25.6** – transgenične linije *A. thaliana* (Ws).

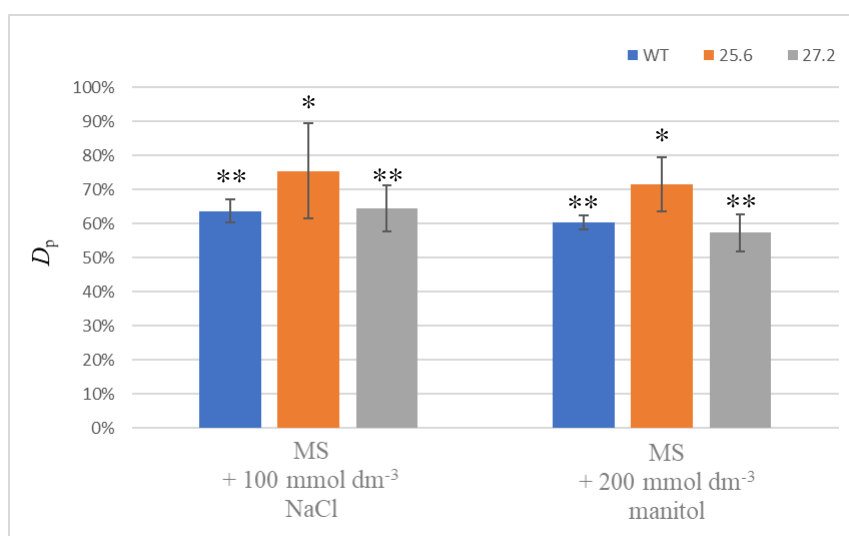
Usporedbom rasta klijanaca na hranjivim podlogama uz dodatak ionskog (slika 19B) odn. osmotskog stresora (slika 19C) s rastom na podlozi bez stresora (slika 19A) može se uočiti određen stupanj inhibicije rasta glavnog korijena i razvoja bočnog korijenja kod svih linija.

Navedena opažanja kvantificirana su pomoću računalnog programa *EZ-Rhizo* koji omogućava određivanje duljine korijena. Podaci su zatim statistički obrađeni, a rezultati su prikazani tablično (tablica 14) i grafički (slika 20).

Tablica 14. Test inhibicije rasta korijena klijanaca *A. thaliana* uslijed solnog i osmotskog stresa. Tri dana stari klijanci prebačeni su 8 dana na tretman. Praćen je rast korijena 4-5 klijanaca transgeničnih linija 35S::*AtILL2-His6* 25.6 i 27.2 uročnjaka te divljeg tipa (WT) kao kontrole. Postotak inhibicije rasta korijena dan je u odnosu na D_0 . Oznake: indeks **p** – vrsta hranjive podloge (za MS0, $p = 0$); \bar{d}_p – srednja vrijednost prirasta korijena klijanaca jedne linije na podlozi p; σ_p – standardna devijacija prirasta korijena klijanaca jedne linije na podlozi p; D_p – postotak prirasta korijena klijanaca jedne linije na podlozi p, u odnosu na \bar{d}_0 (uz D_0 – postotak prirasta na MS0); S_p – postotak standardne devijacije prirasta korijena klijanaca jedne linije na podlozi p, u odnosu na σ_0 .

	<i>A. Thaliana</i> Ws WT		
	MS0	MS + NaCl ($c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$)	MS + manitol ($c = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$)
\bar{d}_p / cm	5,34	3,40	3,22
σ_p / cm	0,68	0,18	0,12
D_p (%)	100	64	60
S_p (%)	13	3	2
Inhibicija rasta korijena (%)	0	36	40
	35S:: <i>AtILL2-His6</i> 25.6		
	MS0	MS + NaCl ($c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$)	MS + manitol ($c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$)
\bar{d}_p / cm	4,29	3,24	3,07
σ_p / cm	0,73	0,60	0,34
D_p (%)	100	76	72
S_p (%)	17	14	8
Inhibicija rasta korijena (%)	0	24	28
	35S:: <i>AtILL2-His6</i> 27.2		
	MS0	MS + NaCl ($c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$)	MS + manitol ($c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$)
\bar{d}_p / cm	5,41	3,49	3,10
σ_p / cm	0,55	0,37	0,30
D_p (%)	100	65	57
S_p (%)	10	7	5
Inhibicija rasta korijena (%)	0	35	43

Izračunate statističke veličine ukazuju na utjecaj abiotičkih stresora na rast korijena. Prirast korijena klijanaca linije *35S::AtILL2-His6* 27.2 pod utjecajem stresora (NaCl ili manitol) iznosi 57 ili 65% prirasta dobivenog na podlogama bez stresora. Prirast korijena na podlogama bez stresora iskazan je kao 100%-ni prirast. Statističkom analizom utvrđeno je da takav prirast linije *35S::AtILL2-His6* 27.2 nije signifikantno različit od prirasta korijena klijanaca divljeg tipa uročnjaka pri istim uvjetima. S druge strane, prirast korijena klijanaca linije *35S::AtILL2-His6* 25.6 iznosi 74% prirasta dobivenog na podlogama bez stresora i statistički je značajan (p -vrijednost manja je od 0.05) (slika 20). Međutim, pokus bi se trebao ponoviti na većem broju klijanaca da bi se potvrdila značajnost inhibicije statističkim testom. Promatranjem prirasta korijena svih linija može se zaključiti da se isti nalaze u rasponu određenom postotkom standardne devijacije prirasta korijena, što upućuje na to da razlika između divljeg tipa i nadekspresorskih linija nije statistički signifikantna, osim u slučaju rasta linije 25.6 na osmotskom i solnom stresu, koja pokazuje određenu značajnu otpornost na te stresore.



Slika 20. Prirast korijena klijanaca *A. thaliana* uslijed solnog i osmotskog stresa. Podaci prema tablici 14. Plavom je označen postotak prirasta korijena (D_p) divljeg tipa uročnjaka (WT), a narančastom i sivom transgeničnih linija *35S::AtILL2-His6* 25.6 (narančasto) i 27.2 (sivo), na hranjivim podlogama uz dodatak ionskog stresora (MS + 100 mmol dm⁻³ NaCl) i osmotskog stresora (MS + 200 mmol dm⁻³ manitol), u odnosu na prirast korijena na kontrolnim podlogama MS0 (bez dodatka stresora). Vrijednosti označene različitim brojem zvjezdica međusobno se statistički značajno razlikuju (uz $\alpha = 0,05\%$).

Dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim podacima, koji ukazuju na inhibiciju rasta korijena kao odgovor biljaka na uvjete stresa.^{43,48,51} Dosadašnja istraživanja također upućuju na to da bi nadekspresorske linije trebale pokazivati bolju prilagodbu na stres.³⁴ Međutim po izradi ovog rada hipoteza da su dobivene stabilne nadekspresorske linije nije bila potvrđena, iako postoji naznaka povećane otpornosti linije 25.6 na solni i osmotski stres. Takva povećana otpornost linije 25.6 treba biti provjerena daljnjim testovima te može biti rezultat mjesta insercije T-DNA u genom, a ne direktno nadekspresije transkripta/proteina AtILL2.

§ 5. ZAKLJUČAK

Analizirane su četiri potencijalne nadekspresorske linije za auksin-amidohidrolazu AtILL2 iz uročnjaka (*A. thaliana*): 35S::*AtILL2-His6* 25.6 i 27.2 te 35S::*AtILL2-His6-GFP* 8.2 i AN.6. Kod svih linija potvrđena je prisutnost transgena na razini insercije u genomsku DNA i transkripcije u RNA, osim kod linije 35S::*AtILL2-His6-GFP* AN.6.

Prva pretpostavljena hipoteza, da su spomenute linije stabilni nadekspresori AtILL2, nije potvrđena. *Western-hibridizacijskom* analizom i afinitetnom kromatografijom nije dokazana prisutnost rekombinantnih proteina u nijednoj liniji.

Druga pretpostavljena hipoteza, da su dobivene transgenične linije otpornije na solni i osmotski stres u odnosu na divlji tip *A. thaliana*, djelomično je potvrđena. Linija 35S::*AtILL2-His6* 25.6 pokazala je statistički značajniju otpornost na uvjete stresa u odnosu na linije 35S::*AtILL2-His6* 27.2 i divljeg tipa, u testu inhibicije rasta korijena.

Rezultati dobiveni u ovom diplomskom radu ukazuju na to da je ekspresija proteina ili vrlo slabo izražena u trenutku sabiranja tkiva, ili da postoji regulacija ekspresije proteina kroz posttranskripcijsko i/ili međugeneracijsko utišavanje transgena. U daljnjim istraživanjima trebalo bi provjeriti razinu nadekspresije metodom qPCR te istražiti mehanizme posttranskripcijske regulacije.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

4-Cl-IAA	engl. <i>4-chloroindole-3-acetic acid</i> (4-klor-indol-3-octena kiselina)
APS	amonijev-persulfat
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> (komplementarna DNA)
DDT	1,4-ditiotreitol
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> (deoksiribonukleinska kiselina)
dNTP	engl. <i>deoxyribonucleoside triphosphate</i> (deoksiribonukleozid-trifosfat)
EDTA	engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (etilendiamintetraoctena kiselina)
gDNA	genomska DNA
GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i> (zeleni fluorescentni protein)
His-privjesak	heksahistidinski privjesak
IAA	engl. <i>indole-3-acetic acid</i> (indol-3-octena kiselina)
IAA-Ala	<i>N</i> -(indol-3-acetil)-alanin
IAA-Asp	<i>N</i> -(indol-3-acetil)-aspartat
IAA-Glu	<i>N</i> -(indol-3-acetil)-glutamat
IAA-Leu	<i>N</i> -(indol-3-acetil)-leucin
IAA-Phe	<i>N</i> -(indol-3-acetil)-fenilalanin
IAA-Trp	<i>N</i> -(indol-3-acetil)-triptofan
IBA	engl. <i>indole-3-butiric acid</i> (indol-3-maslačna kiselina)
IPA	engl. <i>indole-3-propionic acid</i> (indol-3-propionska kiselina)
IPyA	engl. <i>indole-3-pyruvic acid</i> (indol-3-piruvatna kiselina)
MES	2-(<i>N</i> -morfolino)etansulfonska kiselina
miRNA	mikroRNA
mqH ₂ O	engl. <i>milli-Q</i> ® (ultračista voda)
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i> (glasnička RNA)
MS0	Murashige i Skoog hranjiva podloga
Ni-NTA	engl. <i>nickel(II)-nitrilotriacetic acid</i> (nikal(II)-nitrilotrioctena kiselina)
oxIAA	engl. <i>2-oxindole-3-acetic acid</i> (2-oksindol-3-octena kiselina)

PAA	engl. <i>2-phenylacetic acid</i> (2-feniloctena kiselina)
pb	par baza
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> (lančana reakcija polimeraze)
PMSF	engl. <i>phenylmethanesulphonyl fluoride</i> (fenilmetilsulfonil fluorid)
PVDF	poli(vinilden-fluorid)
qPCR	engl. <i>quantitative PCR</i> (kvantitativna lančana reakcija polimeraze)
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> (ribonukleinska kiselina)
rRNA	ribosomska RNA
RT-PCR	engl. <i>reverse transcription PCR</i> (lančana reakcija polimeraze uz reverznu transkripciju)
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> (natrijev dodecilsulfat)
SDS-PAGE	SDS-poliakrilamidna gel-elektroforeza
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamin
Tris	Tris(hidroksimetil)-aminometan
UV	engl. <i>ultraviolet</i> (ultraljubičasto)
Ws	Wassilewskija ekotip
wt	engl. <i>wild type</i> (divlji tip)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. A. Stantner, L. I. Calderon Villalobos, M. Estelle, *Nat. Chem. Biol.* **5** (2009) 301-307.
2. P. J. Davies, u P. J. Davies (ur.), *Plant Hormones*, 3. izd., Springer, Dodrecht, 2010, str. 1-15.
3. A. Smolko, J. Ludwig-Müller, B. Salopek-Sondi, *Croat. Chem. Acta* **91** (2018) 233-239.
4. S. Simon, J. Petrášek, *Plant. Sci.* **180** (2011) 454-460.
5. A. Bajguz, A. Piotrowska, *Phytochemistry* **70** (2009) 957-969.
6. S. Wang, Y. Bai, C. Shen, Y. Wu, S. Zhang, D. Jiang, T.J. Guilfoyle, M. Chen, Y. Qi, *Funct. Integr. Genomics* **10** (2010) 533-546.
7. J. Ludwig-Müller, *J. Exp. Bot.* **62** (2011) 1757-1773.
8. B. Bartel, G. R. Fink, *Science* **268** (1995) 1745-1748.
9. S. LeClere, R. Tellez, R. A. Rampey, S. P.T. Matsuda, B. Bartel, *J. Biol. Chem.* **227** (2002) 20446-20452.
10. W. D. Teale, I. A. Paponov, K. Palme, *Mol. Cell. Biol.* **7** (2016) 847-859.
11. C. Darwin, *The power of movement in plants*. Appleton, 1897.
12. F. Went, *Proc. K. ned. Akad. Wet.* **30** (1926) 10-19.
13. F. Went, K. Thimann, *Phytohormones*, The Macmillan Company, New York, 1937.
14. A. J. Haagen-Smit, W. B. Dandliker, S. H. Wittwer, A. E. Murneek *Am. J. Bot.* **33** (1946) 118-120.
15. D. Weijers, D. Wagner, *Annu. Rev. Plant. Biol.* **67** (2016) 539-574.
16. S. Han, J. Hwang, *J. Exp. Biol.* **69** (2018) 189-200.
17. W. Kohlen, J. L. P. Ng, E. E. Deinum, U. Mathesius, *J. Exp. Biol.* **69** (2018) 229-244.
18. S. Mroue, A. Simeunovic, H. S. Robert, *J. Exp. Biol.* **69** (2018) 201-212.
19. B. Salopek-Sondi, A. Smolko, D. Šamec, u G. K. Pandey (ur.), *Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress*, 1. izd., John Wiley & Sons, Hoboken, 2017, str. 1-36.
20. K. Ljung, *Development* **140** (2013) 943-950.
21. K. Mashiguchi, K. Tanaka, T. Sakai, S. Sugawara, H. Kawaide, M. Natsume, A. Hanada, T. Yaeno, K. Shirasu, H. Yao, P. McSteen, Y. Zhao, K. Hayashi, Y. Kamiya, H. Kasaahara, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** (2011) 18512-18517.

22. N. D. Tivendale, J. J. Ross, J. D. Cohen, *Trands Plant Sci.* **19** (2014) 44-51.
23. J. Ouyang, X. Shao, J. Li, *Plant J.* **24** (2000) 327-333.
24. R. Swarup, J. Friml, A. Marchant, K. Ljung, G. Sandberg, K. Palme, M. Bennett, *Genes Dev.* **15** (2001) 2648-2653.
25. E. Zazimalová, A. S. Murphy, H. Yang, K. Hoyerová, P. Hosek, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2** (2010) 1-4.
26. S. Porco, A. Pěňčík, A. Rashed, U. Voß, R. Casanova-Sáez, A. Bishopp, A. Golebiowska, R. Bhosale, R. Swarup, K. Swarup, P. Peňáková, O. Novák, P. Staswick, P. Hedden, A. L. Phillips, K. Vissenberg, M. J. Bennett, K. Ljung, *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* **113** (2016) 11016-11021.
27. J. J. Campanella, M. Stephanie, D. Leib, S. Wexler, J. Ludwig-Müller, *J. Plant Growth Regul.* **27** (2008) 26-38.
28. A. M. Rashotte, J. Poupert, C. S. Waddell, G. K. Muday, *Plant Physiol.* **133** (2003) 761-772.
29. D. Weijers, J. Nemhauser, Z. Yang, *J. Exp. Bot.* **69** (2018) 133-136.
30. C. M. Siebert, F. M. Raushel, *J. Biochem.* **44** (2005) 6383-6391.
31. R. T. Davies, D. H. Goetz, J. Lasswell, M. N. Anderson, B. Bartel, *Plant Cell* **11** (1999) 365-376.
32. A. P. Sanchez-Carranza, A. Singh, K. Steinberger, K. Panigrahi, K. Palme, A. Dovzhenko, C. Dal Bosco, *Sci. Rep.* **6:24212** (2016) 1-11.
33. J. J. Campanella, J. Ludwig-Müller, V. Bakllamaja, V. Sharma, A. Cartier, *Plant Growth Regul.* **41** (2003) 215-223.
34. U. Junghans, A. Polle, P. DÜchting, E. Weiler, B. Kuhlman, F. Gruber, T. Teichmann, *Plant Cell Environ.* **29** (2006) 1519-1531.
35. J. J. Campanella, A. F. Olajide, V. Magnus, J. Ludwig-Müller, *Plant Physiol.* **135** (2004) 2131-2142.
36. B. Savić, S. Tomić, V. Magnus, K. Gruden, K. Barle, R. Grenković, J. Ludwig-Müller, B. Salopek-Sondi, *Plant Cell Physiol* **50** (2009) 1587-1599.
37. N. D. Rawlings, A. J. Barrett, *Methods Enzymol.* **248** (1995) 183-228.
38. A. Smolko, F. Šupljika, J. Martinčić, N. Jajčanin-Jozić, M. Grabar-Branilović, S. Tomić, J. Ludwig-Müller, I. Piantanida, B. Salopek-Sondi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13** (2016) 8890-8900.

39. E. Bitto, C. A. Bingman, L. Bittova, N. L. Houston, R. S. Boston, B. G. Fox, G. N. Phillips Jr., *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **74** (2009) 61-71.
40. J. C. Chou, W. H. Welch, J. D. Cohen, *Plant Cell Physiol.* **45** (2004) 1335-1341.
41. 48-41M. J. Iglesias, M. C. Terrile, D. Windels, M. C. Lombardo, C. G. Bartoli, F. Vazquez, M. Estelle, C. A. Casalongué, *PLoS One.* **9**(9):e107678 (2010)
42. J. Friml, *Eur. J. Cell. Biol.* **89** (2010) 231-235.
43. G. Zolla, Y. M. Heimer, S. Barak, *J. Exp. Bot.* **61** (2010) 211-224.
44. M. R. Rosquete, J. Kleine-Vehn, *Curr. Biol.* **23** (2013) R927-R929.
45. J. Sun, Q. Chen, L. Qi, H. Jiang, S. Li, Y. Xu, F. Liu, W. Zhou, J. Pan, X. Li, K. Palme, C. Li, *New Phytol.* **19** (2011) 360-375.
46. M. Lee, J. H. Jung, D. Y. Han, P. J. Seo, W. J. Park, C. M. Park, *Planta* **235** (2013) 923-938.
47. J. I. Kim, D. Baek, H. C. Park, H. J. Chin, D.-H. Oh, M. K. Lee, J.-Y. Cha, W.-Y. Kim, M. C. Kim, W. S. Chung, *Mol. Plant.* **6** (2013) 337-349.
48. H. Shi, L. Chen, T. Ye, X. Liu, K. Ding, Z. Chan, *Plant Physiol. Biochem.* **82** (2014) 209-217.
49. A. Pěňčík, B. Simonovik, S. V. Petersson, E. Henyková, S. Simon, K. Greenham, Y. Zhang, M. Kowalczyk, M. Estelle, E. Zažímalová, O. Novák, G. Sandberg, K. Ljung, *Plant Cell* **25** (2013) 3858-3870.
50. C.-M. Park, *Sign. Behav.* **24** (2007) 306-307.
51. N. Kinoshita, H. Wang, H. Kasahara, J. Liu, C. MacPherson, Y. Machida, Y. Kamiya, M. A. Hannah, N. H. Chua, *Plant Cell* **24** (2012) 3590-3602.
52. *Ensembl*, verzija 95, D. R. Zerbino i sur., *Nucleic Acid Res.* **46** (2018) D745-D761.
53. S. Heeb, Y. Itoh, T. Nishijyo, U. Schnider, C. Keel, J. Wade, U. Walsh, F. O'Gara, D. Haas, *Mol. Plant Microbe Interact.* **13** (2000) str. 232-237.
54. T. Murashige, F. Skoog, *Physiol. Plant.* **15** (1962) 473-497.
55. K. Edwards, C. Johnstone, C. Thompson, *Nucleic Acids Res.* **19** (1991) str. 1349.
56. Zymo Research, Instruction Manual, *Direct-zol RNA MiniPrep Catalog Nos. R2050, R2051, R2052, & R2053*, <https://www.zymoresearch.eu> (datum pristupa 08. veljače 2019.)
57. S. Forman, X. Jia, *Nucleic Acid Purification*, U. S. Patent 9051563, 2015.
58. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2004, str. 278.

59. Sigma Aldrich, *DNase I Recombinant, RNase-free* Roche Cat. No 4716728001 Bulletin, 2008, <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/04716728001bul.pdf> (datum pristupa 08. veljače 2019.)
60. Thermo Scientific *GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit #K0841, #K0842*, PRODUCT INFORMATION, <https://www.thermofisher.com> (datum pristupa 08. veljače 2019.)
61. Thermo Scientific *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1622*, PRODUCT INFORMATION, Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, <https://www.thermofisher.com> (datum pristupa 08. veljače 2019.)
62. H. F. Lodish, A. Berk, C. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, A. Bretscher, H. L. Ploegh, P. T. Matsudaira, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman, New York, 2008, str. 375.
63. M. Tal, A. Silberstein, E. Nusser, *J. Biol. Chem.* **260** (1985) str. 9976-9980.
64. W. Weiss, F. Weiland, A. Görg, *Methods Mol. Biol.* 564 (2009) 59-82.
65. Thermo Fisher, *Protein Gel Staining Methods*, <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/protein-gel-stains.html> (datum pristupa 12. veljače 2019.)
66. H. Blum, H. Beier, H. J. Gross, *Electrophoresis* 8 (1987) 93-99.
67. GE Healthcare Life Science, 2011, *Western Blotting Principles and Methods Handbook*, https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/ge-western-blotting.pdf (datum pristupa 08. veljače 2019.)
68. Thermo Fisher, *Protein Purification Protocols*, <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-purification-protocol/purification-of-polyhistidine-containing-recombinant-proteins-with-ni-nta-purification-system.html> (datum pristupa 12. veljače 2019.)
69. Z. Shahzad, F. Kelermeier, E. M. Armstrong, S. Rogers, G. Lobet, A. Amtmann, A. Hills, *Plant Physiol.* **117** (2018) 1368-1381.
70. Zaiontz C. (2018) *Real Statistics Using Excel*, www.real-statistics.com (datum pristupa 14. veljače 2019.)
71. Thermo Scientific, *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual*, 2009, <https://www.thermofisher.com> (datum pristupa 08. veljače 2019.)

72. Qiagen, *Newsletter*, 15.02.2010. <https://www.qiagen.com/us/resources/faq?id=c59936fb-4f1e-4191-9c16-ff083cb24574&lang=en> (datum pristupa 08. veljače 2019.)
73. <http://www.econferences.de/the-impact-of-miqe-guidelines-in-the-plant-science-community/> (datum pristupa 13. veljače 2019.)
74. B. P. Brandhorst, u C. Ettensohn, G. Wessel, G. Wray (ur.), *Methods in Cell Biology*, 1. izd., Academic Press, 2004, str. 579-599.
75. GE Healthcare, *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent Product booklet*, 2014, www.gelifesciences.com (datum pristupa 13. veljače 2019.)
76. M. Floris, H. Mahgoub, E. Lanet, C. Robaglia, B. Menand, *Int. J. Mol. Sci.* **10** (2009) 3168-3185.
77. A. Klöti, X. He, I. Potrykus, T. Hohn, J. Fütterer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **6** (2002) 10881-10886
78. A. Weinhold, M. Kallenbach, I. T. Baldwin, *BMC Plant Biol.* **13:99** (2013) doi: 10.1186/1471-2229-13-99.
79. Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, *Arabidopsis sequence indexed TDNA insertion*, http://signal.salk.edu/tdna_FAQs.html (datum pristupa 15. veljače 2019.)

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ana Mikelić

Datum rođenja: 11. 01. 1994.

Mjesto rođenja: Pula

Obrazovanje

2000–2008	Osnovna škola Veli Vrh, Pula
2008–2012	Srednja škola Gimnazija Pula, Pula
2012–2016	Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
2016–	Diplomski studij kemije (smjer: istraživački, grane: biokemija i fizikalna kemija), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Nagrade i priznanja

2013	Posebna rektorova nagrada u području prirodnih znanosti za projekt <i>6. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka PMF-a</i>
2017	Rektorova nagrada za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici za organizaciju <i>Simpozija studenata kemičara (SiSK)</i>
2012–2014	Stipendije Grada Pule
2017–2019	Stipendije Istarske županije

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2012–2015	Otvoreni dan Kemijskog odsjeka
2016	<i>Popularizacijski odred Entropija</i> – volonterski projekt Studentske sekcije Hrvatskog kemijskog društva
2017	XXII. Smotra Sveučilišta u Zagrebu

Sudjelovanja u nastavi

2015–2016 Demonstratorica iz kolegija *Praktikum fizikalne kemije 1 i 2*

Sudjelovanja u organizaciji znanstvenih skupova

2014–2016 Članica Organizacijskog odbora *Simpozija studenata kemičara*

2018 Članica Mjesnog organizacijskog odbora (*Local Organizing Committee*)
znanstvene konferencije *Computational Chemistry Day*

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. M. Bakija, A. Mikelić, K. Sović, T. Hrenar, *Grid search conformational analysis of carnitine and acetylcarnitine*, Computational Chemistry Day, Zagreb, 2018, Book of abstracts (Zbornik radova) str. 36.

2. M. Bakija, A. Mikelić, K. Sović, T. Hrenar, *Utjecaj solvatacijskih efekata na potpuni konformacijski prostor L-karnitina*, 5. Simpozij studenata kemičara, Zagreb, 2018, Knjiga sažetaka str. 56