

Diferencijalna ekspresija varijanti alternativnog prekrajanja uročnjakova gena BPM2 u uvjetima temperaturnog stresa

Frlin, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:483467>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marta Frlin

**Diferencijalna ekspresija varijanti
alternativnog prekrajanja uročnjakova gena
BPM2 u uvjetima temperaturnog stresa**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za kulturu biljnog tkiva na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dunje Leljak-Levanić, te komentorstvom dr. sc. Mateje Jagić. Rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekta „Alternativno prekrajanje gena *BPM2* kao mehanizam uspostave funkcionalne raznolikosti porodice proteina MATH-BTB u uročnjaku *Arabidopsis thaliana*“ IP-2022-10-7874. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Neizmjerne hvala mojoj mentorici, prof. dr. sc. Dunji Leljak-Levanić, na svojoj pomoći tijekom izrade ovog rada. Hvala Vam na pruženom znanju, podršci i svim savjetima! Hvala Vam što ste mi, prihvaćanjem mentorstva za izradu mog diplomskog rada, omogućili da budem dio ovog istraživačkog tima.

Veliko hvala dr. sc. Mateji Jagić na pomoći u eksperimentalnom dijelu, savjetima tijekom pisanja, ohrabrivanju i odličnom prijevozu.

Hvala i prof. dr. sc. Nataši Bauer na susretljivosti i svim savjetima.

Zahvaljujem i Ani-Mariji Boljkovac i dr. sc. Sandri Vitko što su uvijek bile spremne pomoći. Hvala vam svima na izrazito ugodnoj atmosferi!

Hvala od srca mojim prijateljima što su mi uljepšali studentske dane. Posebno hvala Dori što je uvijek bila tu.

Najviše hvala mojoj obitelji i Nikoli na ljubavi, podršci i strpljenju. Bez vas sve ovo ne bi bilo moguće.

Hvala vam što ste vjerovali u mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Diferencijalna ekspresija varijanti alternativnog prekrajanja uročnjakova gena *BPM2* u uvjetima temperaturnog stresa

Marta Frlin

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Proteini MATH-BTB sudjeluju u proteasomalnoj razgradnji proteina ovisnoj o ubikvitinu kao adaptori ligaza E3 ovisnih o kulinu 3 i odgovorni su za specifičnost prema supstratu. Na ovaj način proteini MATH-BTB reguliraju i biljni odgovor na temperaturni stres. Dok je ova porodica u genomu uročnjaka *Arabidopsis thaliana* zastupljena sa samo šest gena *BPM1-6*, genomi različitih vrsta trava sadrže desetke gena uslijed vrsno-specifične ekspanzije. Ovaj fenomen najčešće se povezuje s porodicama proteina uključenim u odgovor na stresne uvjete u okolišu. U ovom radu provedena je *in silico* analiza promotorske regije gena *BPM2* te su utvrđeni regulatorni elementi. Metodama standardne i kvantitativne lančane reakcije polimerazom analizirana je ekspresija odabranih varijanti alternativnog prekrajanja gena *BPM2* u klijancima, cvjetnim pupovima i oplođenim cvjetovima biljaka izloženih niskim ili povišenim temperaturama. Na ovaj način je istražen utjecaj temperaturnog stresa na zastupljenost varijanti alternativnog prekrajanja gena *BPM2*, ali i potencijalna uloga alternativnog prekrajanja kao mehanizma kompenzacije smanjenog broja gena porodice MATH-BTB u uročnjaku. Temperaturni tretman utjecao je na zastupljenost i razinu ekspresije varijanti alternativnog prekrajanja *BPM2.3*, *BPM2.8*, *BPM2.9* i *BPM2.15*. Razlike su bile najizraženije u klijancima. Detektirane su i neočekivane, potencijalno nove varijante alternativnog prekrajanja gena *BPM2*.

Ključne riječi: MATH-BTB, *BPM2*, alternativno prekrajanje gena, promotorski motivi
(67 stranica, 32 slike, 9 tablica, 6 slika u prilogu, 1 tablica u prilogu, 100 literaturnih navoda,
jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Komentor: dr. sc. Mateja Jagić

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Prof. dr. sc. Nataša Bauer

Prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Zamjena: Prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

Rad prihvaćen: 4.7.2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Differential expression of arabidopsis *BPM2* gene splicing variants in response to temperature stress

Marta Frlin

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

MATH-BTB proteins participate in ubiquitin-dependent protein degradation as substrate-specific adaptors of cullin3-dependent E3 ligases. Through this mechanism they are involved in the regulation of plant response to temperature stress. Only six genes from this family are present in *Arabidopsis thaliana* genome (*BPM1-6*), while genomes of different grass species contain dozens of them due to lineage-specific expansion. Many protein families which underwent lineage-specific expansion are involved in response to environmental stress. In this thesis, an *in silico* analysis of *BPM2* gene promoter region was performed. The expression of selected *BPM2* gene splicing variants was analysed in seedlings, flower buds and flowers of plants exposed to low or elevated temperature by standard and quantitative polymerase chain reactions. Using these methods, the effect of temperature stress on the expression of *BPM2* gene splicing variants was studied. The role of alternative splicing as a compensatory mechanism for the presence of only six *BPM* genes in arabidopsis genome was investigated. Temperature stress affected the expression of *BPM2.3*, *BPM2.8*, *BPM2.9* and *BPM2.15* splicing variants. The differences were the most pronounced in seedlings. Unexpectedly, potentially new *BPM2* gene splicing variants were also detected.

Keywords: MATH-BTB, *BPM2*, alternative gene splicing, promoter motifs
(67 pages, 32 figures, 9 tables, 6 supplemental figures, 1 supplemental table, 100 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. Dunja Leljak-Levanić, PhD

Co-mentor: Mateja Jagić, PhD

Reviewers:

Prof. Dunja Leljak-Levanić, PhD

Prof. Nataša Bauer, PhD

Prof. Željka Vidaković-Cifrek, PhD

Replacement reviewer: Prof. Mirjana Pavlica, PhD

Thesis accepted: 4.7.2024.

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Odgovor biljaka na temperaturni stres.....	1
1.2.	Regulacija ekspresije gena <i>cis</i> -regulatornim promotorskim elementima.....	3
1.3.	Konstitutivno i alternativno prekranje molekula pre-mRNA.....	4
1.4.	Proteinska porodica MATH-BTB	6
1.4.1.	Razvojne uloge proteina MATH-BTB u animalnim organizmima	7
1.4.2.	Razvojne uloge proteina MATH-BTB u biljaka	8
1.4.3.	Proteini BPM vrste <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
2.	Cilj istraživanja	10
3.	Materijali i metode	11
3.1.	Materijali.....	11
3.1.1.	Biljni materijal.....	11
3.1.2.	Medij za uzgoj klijanaca	11
3.1.3.	Početnice.....	12
3.1.4.	Puferi za elektroforezu.....	15
3.1.5.	DNA molekularni standardi	15
3.2.	Metode.....	16
3.2.1.	<i>In silico</i> analiza promotora gena <i>BPM2</i>	16
3.2.2.	Sterilizacija i nasađivanje sjemenki	16
3.2.3.	Uvjeti uzgoja.....	17
3.2.4.	Uvjeti temperaturnog tretmana	17
3.2.5.	Izolacija genomske DNA.....	19
3.2.6.	Izolacija ukupne RNA iz klijanaca	20
3.2.7.	Izolacija mRNA iz cvjetnih pupova i oplodjenih cvjetova.....	20
3.2.8.	Reverzna transkripcija	20
3.2.9.	Lančana reakcija polimerazom (PCR)	21
3.2.10.	Analiza relativne ekspresije varijanti alternativnog prekranja kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)	21
3.2.11.	Agarozna gel elektroforeza	22
3.2.12.	Statistička obrada podataka.....	22

4.	Rezultati	24
4.1.	Regulatorni motivi u promotoru gena <i>BPM2</i>	24
4.2.	Utjecaj temperaturnog stresa na morfologiju biljaka	25
4.3.	Uspješnost izolacije RNA i reverzne transkripcije	27
4.3.1.	Koncentracija i čistoća izolirane RNA	27
4.3.2.	Kvaliteta cDNA dobivene reverznom transkripcijom	29
4.4.	Analiza ekspresije varijanti alternativnog prekrajanja gena <i>BPM2</i> metodom PCR	29
4.4.1.	Analiza ekspresije varijanti <i>BPM2.3</i> i <i>BPM2.15</i>	30
4.4.2.	Analiza ekspresije varijante <i>BPM2.8</i>	32
4.4.3.	Analiza ekspresije varijante <i>BPM2.9</i>	34
4.5.	Analiza relativne ekspresije varijanti alternativnog prekrajanja gena <i>BPM2</i> metodom qRT-PCR	36
4.5.1.	Kvantifikacija ukupne ekspresije gena <i>BPM2</i>	36
4.5.2.	Kvantifikacija ekspresije grupe varijanti <i>BPM2.3</i> , <i>BPM2.13</i> i <i>BPM2.16</i>	39
4.5.3.	Kvantifikacija ekspresije grupe varijanti <i>BPM2.1</i> , <i>BPM2.2</i> , <i>BPM2.5</i> , <i>BPM2.6</i> , <i>BPM2.7</i> , <i>BPM2.10</i> i <i>BPM2.15</i>	39
4.5.4.	Kvantifikacija ekspresije grupe varijanti <i>BPM2.3</i> , <i>BPM2.4</i> , <i>BPM2.7</i> i <i>BPM2.14</i>	40
4.5.5.	Kvantifikacija ekspresije varijanti <i>BPM2.3</i> i <i>BPM2.15</i>	41
4.5.6.	Kvantifikacija ekspresije varijante <i>BPM2.8</i>	43
4.5.7.	Kvantifikacija ekspresije varijante <i>BPM2.9</i>	44
4.6.	Analiza produkata reakcije qRT-PCR	46
4.6.1.	Analiza krivulje taljenja produkta reakcije qRT-PCR za varijantu <i>BPM2.8</i>	46
4.6.2.	Gel elektroforeza produkta reakcije qRT-PCR za varijantu <i>BPM2.8</i>	47
4.6.3.	Analiza krivulje taljenja produkta reakcije qRT-PCR za varijantu <i>BPM2.9</i>	48
5.	Rasprava	49
6.	Zaključak	57
7.	Literatura	58
8.	Prilozi	i
9.	Životopis	

1. Uvod

Kao sesilni organizmi, biljke su konstantno izložene promjenjivim uvjetima okoliša u kojem se nalaze. Neki od okolišnih uvjeta nepovoljno utječu na rast, razvoj i razmnožavanje biljaka. Najčešći negativni okolišni čimbenici koji uzrokuju razvojne poremećaje u biljaka su nedovoljan ili previsok intenzitet svjetlosti, ograničena dostupnost kisika i mineralnih tvari u području korijena, povišeni salinitet te odstupanja od optimalne temperature okoliša (Mareri i sur., 2022).

Temperature variraju ovisno o geografskom položaju, no predviđanja ukazuju da porast okolišne temperature uslijed globalnog zatopljenja predstavlja ozbiljnu prijetnju poljoprivrednoj produktivnosti i očuvanju ekosustava. U narednim će godinama, stoga, toplinski stres najvjerojatnije postati glavni čimbenik abiotičkog stresa za mnoge vrste biljaka. Dok blagi stres samo usporava rast biljke, aktivira obrambene mehanizme i može promijeniti obrasce rasta i razvoja, jači stres zaustavlja rast, uzrokuje nakupljanje štetnih metabolita, umanjuje reproduktivni kapacitet i u konačnici može uzrokovati smrt biljke. Unatoč štetnim učincima toplinskog stresa, većina biljaka sposobna je prilagoditi se promjenama temperature kroz procese obuhvaćene pod pojmom termotolerancije. Postoje različite kategorije termotolerancije uključujući onu osnovnu termotoleranciju povezanu sa kratkotrajnim izlaganjem temperaturama u rasponu od 40 °C do 45 °C, te termotoleranciju koja se uspostavlja nakon produženog izlaganja temperaturama između 30 °C i 38 °C (Yeh i sur., 2012)

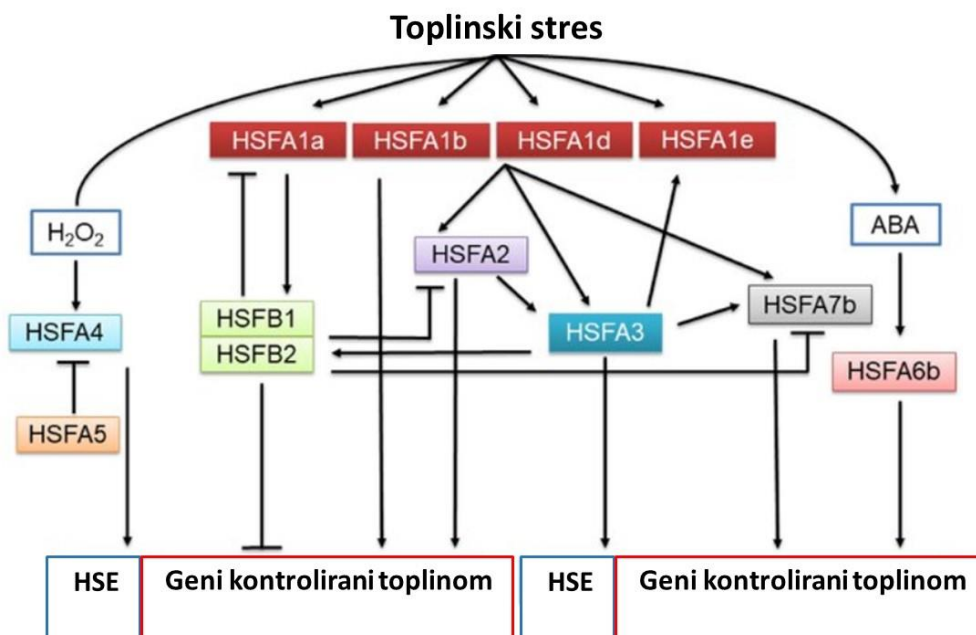
Drugi tip temperaturnog stresa jest hladni stres. Dok se toplinski stres definira kao stanje u kojem je temperatura okoline 10 °C do 15 °C viša od optimalnog temperaturnog raspona za uzgoj biljaka, hladni stres podrazumijeva temperature niže od 15 °C i/ili temperature smrzavanja (<0 °C), koje kao i povišene temperature utječu na metaboličku aktivnost, rast i razvoj biljaka (Yadav, 2010).

1.1. Odgovor biljaka na temperaturni stres

Toplinski stres može značajno utjecati na staničnu homeostazu, uključujući promjene u fotosintezi, pogrešno smatanje i/ili agregaciju proteina, nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta i oštećenje stanične membrane (Howarth, 2005). Neki od odgovora biljaka na ovaj tip stresa odnose se na kontrolu fotosinteze, stabilnost membrana, regulaciju cvjetanja, te na zaštitu od oksidativnog stresa (Chen i sur., 2022).

Hladni stres inhibira metaboličke reakcije izravno ili neizravno preko nemogućnosti primanja vode što dovodi do osmotskog i oksidativnog stresa (Chinnusamy i sur., 2007). Kao i toplinski, hladni stres uključuje brojne metaboličke promjene na razini membranskih sustava, proteina i nukleinskih kiselina te nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta.

Izlaganje biljaka visokoj temperaturi rezultira sintezom proteina toplinskog stresa (engl. *heat shock proteins*, HSP) koji prepoznaju i vežu izložena hidrofobna područja krivo smotanih staničnih proteina. Kao posljedica toga faktori toplinskog stresa (engl. *heat stress factors*, HSF) se otpuštaju iz kompleksa s proteinima HSP i premještaju u jezgru (Al-Whaibi, 2011; Benarroch, 2011; Ul-Haq i sur., 2019). U jezgri se proteini HSF vežu za elemente toplinskog stresa (engl. *heat shock element*, HSE) u promotorima ciljnih gena i reguliraju njihovu transkripciju (Slika 1).



Slika 1. Transkripcijska kaskada transkripcijskih faktora potaknuta toplinskim stresom u uročnjaku. Prilagođeno prema Haider i sur. (2022).

Biljni proteini HSF svrstavaju se u klase A, B i C, koje dijele evolucijski očuvane mehanizme regulacije. Funkcionalne domene proteina HSF sastoje se od DNA-vezujuće domene na N-terminalnom kraju, nakon koje slijedi: (i) nekoliko hidrofobnih aminokiselinskih ostataka bitnih za oligomerizaciju HSF-a, (ii) nekoliko bazičnih aminokiselinskih ostataka odgovornih za lokalizaciju u jezgri (engl. *nuclear localisation signal*, NLS), (iii) signali za transport iz jezgre u citoplazmu (engl. *nuclear export signal*, NES) koji su smješteni na C-kraju proteina i okruženi kratkim peptidnim motivima značajnim za transkripcijsku aktivaciju HSF-a. Aktivacijski motivi smješteni proksimalno od NES-a ključni su za aktivaciju transkripcije putem interakcije s transkripcijskim elementima nizvodnih regulatornih gena (von Koskull-Döring i sur., 2007). Transkripcijski faktori (TF) koji imaju važnu ulogu u odgovoru na toplinski stres su: DREB2A (DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING 2A), DREB2C, MBF1C (Multiprotein Bridging Factor 1C), NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2), WRKY, bZIP (Basic Region/Leucine Zipper), i MYB. Sve više podataka ukazuje da je DREB2A, protein porodice AP2/ERF (APETALA 2/ethylene response factor) važan regulator toplinskog stresa. Protein DREB2A aktiviran je transkripcijskim faktorom HSFA1.

Zatim DREB2A izravno aktivira ekspresiju HSFA3 koji je odgovoran za daljnju uspostavu termotolerancije. Zanimljivo je da protein DREB2A posreduje u signaliziranju pri toplinskom i stresu izazvanom sušom, što ukazuje na njegovu specifičnu ulogu u bilo kojem abiotičkom stresu, uključujući i stres od hladnoće (Wang i sur., 2023).

Ključni TF-i u odgovoru biljaka na hladni stres uključuju proteine CBF (C-repeat Binding Factor), DREB, MYB, bHLH (basic Helix-Loop-Helix), NAC, WRKY i bZIP (Zhao i sur., 2018). Najbolje proučen mehanizam biljnog odgovora na hladni stres je mehanizam ICE (Inducer of CBF Expression) – CBF – COR (Cold Regulated) koji uključuje regulaciju 12% gena kontroliranih hladnoćom. Ovaj regulatorni put aktiviran je hladnoćom koja kroz više razina signalizacije utječe na ekspresiju nizvodnih gena (Wang i sur., 2020). Kada su biljke izložene niskim temperaturama, geni *CBF* se brzo aktiviraju, a zatim se inducira ekspresija nizvodnih ciljnih gena *COR*. Do danas su opisana četiri gena *CBF* pronađena u biljkama, a poznati su kao *CBF1*, *CBF2*, *CBF3* i *CBF4*, odnosno *DREB1B*, *DREB1C*, *DREB1A* i *DREB1D*.

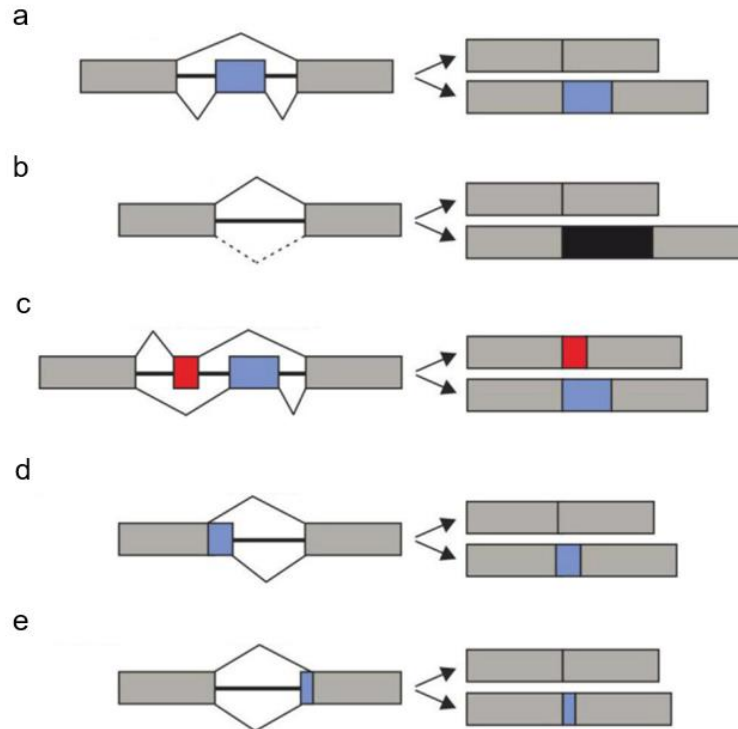
1.2. Regulacija ekspresije gena *cis*-regulatornim promotorskim elementima

Regulacija genske ekspresije iznimno je važna u normalnom razvoju biljaka, ali i odgovoru na stres. Ekspresija gena primarno je regulirana vezanjem TF-a na *cis*-regulatorne elemente promotorske regije gena (Ludwig i sur., 2009). Samu inicijaciju transkripcije kontrolira vezanje općih TF-a na temeljni promotor što dovodi do sklapanja preinicijacijskog kompleksa. Temeljni promotor uglavnom se definira kao regija 50 pb uzvodno i nizvodno od mjesta početka transkripcije (engl. *transcription start site*, TSS), a uloga mu je određivanje točnog TSS i smjera transkripcije. U vezanju TF-a na DNA ključni su specifični *cis*-elementi koje oni prepoznaju (Andersson i Sandelin, 2020). Ovi elementi prisutni su u promotorima gena kao evolucijski očuvani motivi zajednički mnogim organizmima (Edwards i sur. 1998). Najpoznatiji elementi temeljnog promotora su motiv TATA-box i inicijatorski element (Inr; Andersson i Sandelin, 2020). Sekvenca motiva TATA-box bogata je bazama A i T, a najčešće se nalazi 25-35 pb uzvodno od TSS (Molina i Grotewold, 2005). Dok se motiv TATA-box nalazi u relativno malom postotku eukariotskih temeljnih promotora (24%), motiv Inr je najčešći element (53%). Motiv Inr najčešći je promotorski element i kod uročnjaka (52%), ali se i motiv TATA-box pojavljuje vrlo često (48%; Brázda i sur., 2021). Još neki elementi temeljnog promotora su motiv CCAAT-box, GC-box i nizvodni promotorski element (engl. *downstream promoter element*, DPE). Vezanje općih TF-a na temeljni promotor omogućava inicijaciju transkripcije, a vezanje specifičnih TF-a na odgovarajuće *cis*-elemente uzvodno od temeljnog promotora omogućava modulaciju stope transkripcije. Velika raznolikost specifičnih TF-a omogućava preciznu regulaciju transkripcije, a samim time i ekspresije gena, u različitim tkivima i uvjetima (Biłas i sur., 2016).

1.3. Konstitutivno i alternativno prekrajanje molekula pre-mRNA

Posttranskripcijsko (kotranskripcijsko) procesiranje pre-mRNA (engl. *precursor messenger RNA*) je proces kojim se iz molekule pre-mRNA izrezuju introni te dodaje 7-metilgvanozin na 5' kraj i poli (A) rep na 3' kraj molekule mRNA. Mehanizam izrezivanja introna sličan je kod svih eukariota (Lorković i sur., 2000). Izrezivanje se vrši pomoću kompleksa za prekrajanje građenog od pet RNA-proteinskih kompleksa snRNP (engl. *small nuclear ribonucleoprotein*) bogatih uridinom (U1, U2, U4, U5 i U6 snRNP) i velikog broja ostalih faktora prekrajanja (Shang i sur., 2017). Ribonukleoproteinski kompleks prepoznaje specifične signale u pre-mRNA, pozicionira se u blizinu mjesta izrezivanja (Szakonyi i Duque, 2018) te kroz dvije transesterifikacijske reakcije uklanja intron i spaja susjedne egzone (Shang i sur., 2017). Visoko konzervirani signali za izrezivanje introna prisutni su i kod biljaka i kod životinja, s razlikom da su introni biljaka relativno mali (70 - 73 nt; Goodall i Filipowich, 1990) u odnosu na animalne introne (oko 160 pb; Reddy i sur., 2013).

Za razliku od klasičnog, alternativno prekrajanje (engl. *alternative splicing*) je važan posttranskripcijski mehanizam obrade prekursora pre-mRNA koji rezultira nastankom različitih mRNA kodiranih istim genom, na temelju različitih kombinacija mjesta prekrajanja. Ovaj proces ima važnu ulogu u proširivanju regulatornog kapaciteta genoma, održavanju stanične homeostaze i regulacije stanične diferencijacije i razvoja. Nekoliko glavnih tipova alternativnog prekrajanja uključuje preskakanje egzona, zadržavanje introna, egzone koji se međusobno isključuju, alternativno 3' i 5' mjesto prekrajanja (Slika 2), a svi su navedeni mehanizmi zabilježeni u svim eukariontima (Grau-Bové i sur., 2018).



Slika 2. Osnovni mehanizmi alternativnog prekrajanja uključuju: a) preskakanje egzona (kazete egzoni), b) zadržavanje introna, c) međusobno isključivanje egzona, d) i e) korištenje alternativnih 5' ili 3' mjesta prekrajanja (modifikacije egzona). Egzoni su prikazani kao pravokutnici, a crna linija predstavlja introne. Konstitutivno izraženi egzoni prikazani su u sivoj boji, a alternativno prekrajeni u plavoj, crnoj ili crvenoj. Preuzeto i prilagođeno prema Matlin i sur. (2005).

Preskakanje egzona je najčešći mehanizam alternativnog prekrajanja u životinjskim organizmima u kojem se kazeta egzona može uključiti ili isključiti iz konačnog prijepisa, što dovodi do sinteze produljenog ili skraćenog proteina. Kod biljaka je najčešće korišten mehanizam zadržavanje introna (Reddy i sur., 2012), u kojem su aminokiseline kodirane intronom integrirane unutar okvira čitanja susjednih egzona. Uzajamno isključivanje egzona odnosi se na one egzone koji ne mogu biti u istom okviru čitanja i rezultira zadržavanjem samo jednog od njih. Drugi alternativni mehanizmi prekrajanja uključuju korištenje alternativnih promotora i alternativnih poliadenilacijskih mjesta, koja nisu nužno regulirana na razini pre-mRNA procesiranja (Matlin i sur., 2005), a moguće su i kombinacije gore navedenih mehanizama.

Procjenjuje se da oko 61% gena s multiplim egzonomima kod vrste *Arabidopsis thaliana* podliježe alternativnom prekrajanju u normalnim uvjetima razvoja, te se pretpostavlja da je, vezano uz promjenjivost okolišnih uvjeta, stvarni postotak još i veći. Iako je mehanizam zadržavanja introna najčešći, 42% svih alternativnih prekrajanja u biljkama nastaje kombinacijom različitih mehanizama (Marquez i sur., 2012). Alternativno prekrajanje uključeno je u regulaciju stresnog odgovora biljke na abiotičke stresove, uključujući temperaturni i solni stres, UV zračenje i sušu te posreduje u odgovoru na abscizinsku kiselinu (engl. *abscisic acid*, ABA; Shang i sur., 2017). Primjer jedne takve regulacije je ekspresija varijanti

alternativnog prekrajanja TF-a HSFA2 u uročnjaku inducirana različitim temperaturama. Na temperaturi od 22 °C nastaje potpuni transkript HSFA2, na umjerenoj temperaturi (37 °C) se sintetizira varijanta HSFA2-II s preuranjenim stop kodonom koja se degradira, a na povišenoj temperaturi (42 °C) nastaje varijanta HSFA2-III iz koje se sintetizira krnji protein. Ovakav krnji protein veže elemente HSE u promotoru gena *HSFA2* čime se uspostavlja pozitivna povratna sprega kojom se kontrolira vlastita ekspresija kroz alternativno prekrajanje (Shang i sur., 2017). Također je važno napomenuti da kod proteina DREB2B pri normalnim uvjetima nastaje transkript koji sadrži dodatni egzon 2, što dovodi do pomaka okvira čitanja i pojave preuranjenog stop kodona te stvaranja nefunkcionalne izoforme proteina (Staiger i Brown, 2013).

Novija komparativna analiza učestalosti alternativnog prekrajanja u uročnjaku i životinjama istaknula je ulogu alternativnog prekrajanja u adaptaciji biljaka na stres. U usporedbi s alternativnim prekrajanjem u životinja, pokazano je da se u uročnjaku alternativno prekrajanje dominantnije događa kao posljedica djelovanja abiotičkog stresa nego tkivno specifično (Martin i sur., 2021).

1.4. Proteinska porodica MATH-BTB

Porodica proteina MATH-BTB je velika grupa proteina široko rasprostranjenih među eukariotima. Proteini ove porodice sadrže N-terminalnu domenu MATH (Meprin and TRAF-homology) i C-terminalnu domenu BTB/POZ (Bric a brac, Tramtrack and Broad Complex/Pox virus and Zinc finger; Weber i sur., 2005), iako postoje slučajevi u kojima se položaji ove dvije domene mijenjaju ili se pojavljuju kao višestruke kopije (Zapata i sur., 2007). Svaka od ove dvije domene ima kapacitet za interakcije s različitim skupinama proteina, čime proteini MATH-BTB ostvaruju čitavu mrežu potencijalnih uloga tijekom razvoja i rasta biljaka. Najdetaljnije proučavan mehanizam djelovanja proteina MATH-BTB je njihovo sudjelovanje u proteasomalnoj razgradnji. U tom procesu protein MATH-BTB čini modul kompleksa ubikvitinske ligaze E3 (CULLIN 3 (CUL3)-based REALLY INTERESTING NEW GENE (RING) E3 ligases; Gingerich i sur., 2007; Pintard i sur., 2003) koji je odgovoran za specifičnost prema supstratu. Pri tome domena BTB stupa u interakciju s proteinom kulinom 3 (CUL3), dok N-terminalna domena MATH specifično veže supstrat, posredujući u nizu različitih razvojnih procesa u biljkama. U značajnom broju proteina MATH-BTB također postoji BACK (BTB i C-terminalna KELCH)-AtBPM slična domena (Jagić i sur., 2022) za koju se uglavnom smatra da igra ulogu u orijentaciji ciljanih supstrata (Stogios i sur., 2005). Na samom C-terminalnom kraju proteina BPM1 i BPM2 nalazi se signal NLS nužan za usmjeravanje proteina u jezgru i jezgricu (Leljak Levanić i sur., 2012).

Otkriće uloge proteina MATH-BTB u putu ubikvitin-ovisne proteasomalne razgradnje popraćeno je nizom istraživanja njihove funkcije, zbog čega je danas uloga upravo ove potporodice proteina BTB najbolje opisana.

1.4.1. Razvojne uloge proteina MATH-BTB u animalnim organizmima

Proteini MATH-BTB sudjeluju u posljednjem koraku ubikvitinacije, kao dio kompleksa kulin 3-ovisnih E3 ligaza. Njihova je uloga prvo opisana u obliku *Caenorhabditis elegans* (Pintard i sur., 2003). MEL-26 (MATERNAL EFFECT LETHAL 26) iz *C. elegans* je postmejotski negativni regulator proteina MEI-1. Protein MEI-1 je uključen u uspostavu kratkog mejotskog vretena kroz degradaciju mikrotubula (Srayko i sur., 2000). Budući da se mejotsko i mitotsko diobeno vreteno morfološki razlikuju, uklanjanje proteina MEI-1 prilikom tranzicije iz mejoze u mitozu nužno je za uspostavu funkcionalnog i izduženog mitotskog vretena. Za ovaj proces odgovoran je protein MEL-26 koji kroz interakciju s proteinom CUL3 prepoznaje i usmjerava regulator mikrotubula MEI-1 u razgradnju. Uz prethodno opisanu ulogu, utvrđena je i dodatna funkcija proteina MEL-26 neovisna o kompleksu s proteinom CUL3. Do ovog zaključka dovela je identifikacija nove interakcije proteina MEL-26 s aktin-vezujućim proteinom POD-1 (polarity and osmotic sensitivity defective). Iako se ova interakcija ostvaruje putem domene MATH, dokazano je da svrha ove interakcije nije proteasomalna degradacija. Protein POD-1 regrutira MEL-26 te zajedno tvore kompleks koji je potreban za normalno formiranje i održavanje diobene brazde u citokinezi. Prema tome, protein MEL-26 ima dvostruku ulogu u ranoj embriogenezi: kao supstrat-specifični adaptor kompleksa CUL3 ovisnih ligaza E3, te kao aktivator citokineze u kompleksu s proteinom POD-1 mehanizmom neovisnim o proteasomalnoj razgradnji (Luke-Glaser i sur., 2005).

Jedini dosad opisani protein MATH-BTB u vrsti *Drosophila melanogaster* jest protein HIB (Hedgehog-induced BTB protein). Protein HIB je negativni regulator signalnog puta Hedgehog bitnog u mnogim razvojnim procesima (Ingham i McMahon, 2001). Kao dio kompleksa CUL-3 ovisnih E3 ligaza, protein HIB veže transkripcijski faktor Ci (Cubitus interruptus), te ga usmjerava u ubikvitinaciju i proteasomalnu degradaciju. Opisana regulacija ključna je u normalnom razvoju oka vinske mušice (Zhang i sur., 2006).

Homolog proteina HIB u sisavcima je protein SPOP (Speckle-type POZ protein) koji također ima ulogu adaptoru u procesu ubikvitinacije i regulira niz signalnih puteva. Neki od supstrata proteina SPOP su transkripcijski regulator Ci, fosfataza Puc (Puckered) te protein DAXX (death-associated protein 6) uključeni u transkripciju, regulaciju staničnog ciklusa i apoptozu (Zhuang i sur., 2009; Mani, 2014). Uz primarnu ulogu u procesu ubikvitinacije, utvrđene su i dodatne specijalizirane funkcije ovog proteina koje nisu posredovane procesom proteasomalne razgradnje. Primjerice, opisana je uloga proteina SPOP u vezanju histona MacroH2A1 na X kromosom prilikom X-inaktivacije (Hernández-Muñoz i sur., 2005).

Humani protein SPOP (HsSPOP) također ostvaruje interakcije s nizom supstrata te kroz njihovu regulaciju sudjeluje u hormonskoj signalizaciji, regulaciji staničnog ciklusa te epigenetičkoj kontroli. Među supstrate ovog proteina spadaju hormonski receptori, ali i transkripcijski faktori poput PDX1 (pancreatic and

duodenal homeobox 1) s ulogom u dijabetesu (Claiborn i sur., 2010), te proteini BET (bromodomain and extraterminal domain) i BRMS1 (breast cancer metastasis suppressor 1) s ulogom u razvoju raka (Kim i sur., 2011; Dai i sur., 2017). U kontekstu ovog rada zanimljiv je podatak da gen *HsSPOP* kodira 23 funkcionalne varijante na temelju alternativnog prekrajanja s različitim razvojnim ulogama (Juranić i Dresselhaus, 2014).

1.4.2. Razvojne uloge proteina MATH-BTB u biljaka

U biljkama je opisan homolog proteina MEL-26, protein ZmMAB1 iz kukuruza. Ovaj protein eksprimiran je isključivo u muškom i ženskom gametofitu te zigoti (Juranić i sur., 2012). Opisana funkcija ovog proteina je u organizaciji mikrotubula diobenog vretena, kao i pozicioniranju i određivanju identiteta jezgri tijekom mezoje II i prve mitotske diobe u obje spolne linije biljaka. Protein ZmMAB1 može stvarati homodimere te stupa u interakciju s CUL3a, što upućuje na njegovu ulogu u kompleksu kulin 3-ovisnih E3 ligaza (Juranić i sur., 2012).

U pšenici je opisan protein TaMAB2 koji je eksprimiran isključivo u zigoti i proembriju (Leljak-Levanić i sur., 2013). Dokazana je direktna interakcija proteina TaMAB2 s proteinom CUL3, što upućuje na to da i ovaj protein može vršiti ulogu adaptoru opisanu za većinu proteina MATH-BTB. Kao potencijalni interaktori i supstrati za degradaciju identificirani su citoskeletni proteini aktin i tubulin i eukariotski faktori inicijacije translacije (engl. *eukaryotic initiation factors*, eIF) eIF3 i eIF4. Ove interakcije upućuju na ulogu proteina TaMAB2 u inicijaciji translacije u ranoj embriogenezi (Bauer i sur., 2019).

1.4.3. Proteini BPM vrste *Arabidopsis thaliana*

Genom uročnjaka sadrži šest gena *MATH-BTB* imenovanih *AtBPM1-6*. Kao njihovi ciljni proteini identificirani su brojni TF-i koji pripadaju različitim porodicama. Primjerice, utvrđena je interakcija s dva pripadnika porodice HD-ZIP (homeodomain-leucine zipper): proteinom ATHB6 (*Arabidopsis thaliana* homeobox protein 6) koji je uključen u regulaciju odgovora na apscizinsku kiselinu (Himmelbach i sur., 2002), te s proteinom ATHB16 koji sudjeluje u regulaciji odgovora na svjetlost (Wang i sur., 2003). Također, dokazana je negativna regulacija TF-a porodice AP2/ERF. Protein BPM1 ostvaruje interakciju sa sljedećim članovima ove obitelji: ERF1, ERF4, RAV1 (RELATED TO ABI3/VP1), WRI1 (WRINKLED 1; Chen i sur., 2013) i DREB2A (Morimoto i sur., 2017). Treća obitelj TF-a koju mogu regulirati proteini BPM jest R2R3-MYB, a najpoznatiji predstavnik ove obitelji jest MYB56 (MYB Domain Protein 56) uključen u regulaciju cvjetanja (Chen i sur., 2015). Morimoto i sur. (2017) otkrili su važnu ulogu proteina BPM u odgovoru biljke na toplinski stres dokazavši da protein BPM2 negativno regulira protein DREB2A. Kako je ranije navedeno, protein DREB2A značajan je transkripcijski faktor koji regulira biljni odgovor na toplinski stres i sušu aktivacijom niza gena ključnih za mehanizme otpornosti biljke na te stresne uvjete. To otkriće izrazito je zanimljivo obzirom na istraživanje koje je pokazalo da se protein BPM1

inducira i ne degradira na povišenim temperaturama, posebno na 37°C, iako je na optimalnim temperaturama podložan degradaciji (Škiljaica i sur., 2020). Nadalje, isti autori pokazuju kako povišene temperature potiču ekspresiju gena *BPM1*, *BPM2* i *BPM3*, a najjači učinak zabilježen je na gen *BPM2*. Njegova varijanta *BPM2.5* najosjetljivija je na povišene, ali i niske temperature što dodatno ukazuje na potencijalnu ulogu alternativnog prekrajanja uročnjakove genske porodice *BPM* u odgovoru na abiotičke stresove.

I na kraju, intriganta je činjenica da, iako je čini samo šest gena, porodica proteina BPM kroz interakcije s navedenim transkripcijskim faktorima indirektno regulira niz staničnih procesa. U tom smislu važno je istaknuti da šest gena *BPM* kodira najmanje 16 različitih proteina (Škiljaica i sur., 2020). Prema bazi TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <https://www.arabidopsis.org/>) gen *BPM2*, povezan s temperaturnim stresom, kodira pet alternativnih varijanti, što je najveći broj varijanti alternativnog prekrajanja kodiranih jednim genom *BPM*. Ove se varijante značajno razlikuju u sadržaju aminokiselina, duljini sekvence (Prilog I) i cjelovitosti domena na C-terminalnom kraju proteinske sekvence.

2. Cilj istraživanja

Središnji cilj ovog istraživanja bio je utvrditi povezanost alternativnog prekrajanja gena porodice BPM s temperaturnim stresom. Budući da je najveći broj alternativnih izoformi opisan za uročnjakov gen *BPM2*, analize u ovom radu provedene su na ovom genu.

Cilj prvog dijela istraživanja bila je *in silico* analiza promotorske regije gena *BPM2* te pronalazak *cis*-regulatornih motiva temeljnog promotora te elemenata i mjesta vezanja transkripcijskih faktora povezanih s odgovorom na temperaturni stres.

U drugom dijelu istraživanja analizirana je ekspresija odabranih varijanti alternativnog prekrajanja gena *BPM2* u različitim tkivima (klijanci, cvjetni pupovi i oplođeni cvjetovi) nakon izlaganja biljaka temperaturama od 5 °C, 37 °C i 44 °C s ciljem utvrđivanja povezanosti pojedinih izoformi s temperaturnim stresom.

Dodatni cilj istraživanja bila je identifikacija potencijalnih novih varijanata alternativnog prekrajanja na temelju rezultata ekspresijske analize i na temelju detekcije neočekivanih amplikona.

Navedeni ciljevi posredno će doprinijeti i razjašnjavanju velikog broja različitih funkcija proteina porodice BPM koja je u genomu uročnjaka zastupljena sa svega šest gena.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijal

U svrhu analize ekspresije varijanti alternativnog prekraranja gena *BPM2* u uvjetima temperaturnog stresa koristila sam klijance, cvjetne pupove i oplodene cvjetove divljeg tipa uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.), ekotip Columbia (Col-0).

3.1.2. Medij za uzgoj klijanaca

Za uzgoj klijanaca uročnjaka koristila sam kruti hranjivi medij MS0 (Murashige i Skoog, 1962; Tablica 1.).

Tablica 1. Sastav krutog hranjivog medija MS0 za uzgoj klijanaca (pH 5,7 – 5,8).

Komponenta medija	Masena koncentracija (mg/L)
Makronutrijenti	
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ × H ₂ O	755
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	370
Mikronutrijenti	
H ₃ BO ₃	6,2
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,025
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,025
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	16,9
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	8,6
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3

Tablica 1. nastavak

Vitaminski i organski dodaci	
saharoza	20000
m-inozitol	100
glicin	2
nikotinska kiselina	0,5
piridoksin-HCl	0,5
tiamin-HCl	0,1
agar	8000

3.1.3. Početnice

Korištene početnice i njihove temperature taljenja (T_m , engl. *melting temperature*) navedene su u Tablicama 2 i 3. Za potvrdu uspješnosti reverzne transkripcije i provjeru kontaminacije genomskom DNA (gDNA) koristila sam početnice za umnažanje gena *ACT3*. Ostale početnice iz tablice koristila sam za analizu ekspresije varijanti alternativnog prekrivanja gena *BPM2*. U svrhu kvantifikacije ukupne ekspresije gena *BPM2* koristila sam univerzalne početnice koje umnažaju sve poznate varijante alternativnog prekrivanja, dok sam za analizu i kvantifikaciju pojedinih varijanti koristila specifične početnice koje umnažaju tu varijantu. U slučaju varijanti *BPM2.3* i *BPM2.15* koristila sam početnice koje umnažaju obje varijante gena, ali umnažanjem nastaju fragmenti različitih veličina. U svrhu kvantifikacije ekspresije koristila sam i početnice za umnažanje referentnih gena *OGIO* i *PUX7* (Škiljaica i sur., 2022). Kombinacije početnica koje sam koristila za umnažanje pojedinih gena i varijanti alternativnog prekrivanja gena *BPM2* navedene su u Tablici 4. Prethodno osmišljeni parovi početnica za kvantifikaciju ekspresije varijanti alternativnog prekrivanja (*BPM2.3-4* fw, *BPM2.3* rev, *BPM2.4* rev, *BPM2.5* fw i rev, *BPM2.6* fw i rev) dizajnirani su prema podacima iz baze podataka TAIR10 i Pali (2020) na način da umnažaju samo pojedinačne varijante iz te baze. Međutim, analiza baze AtRTD3 (*Arabidopsis thaliana* Reference Transcript Dataset 3, Zhang i sur., 2022; Keresteš 2024) pokazala je da ovi parovi početnica umnažaju veći broj novootkrivenih varijanti (Tablica 5). Početnice za analizu ekspresije varijanti gena *BPM2* su naručene i sintetizirane preko servisa Macrogen Inc. Matičnu otopinu početnica pripremila sam otapanjem liofiliziranog praha u redestiliranoj vodi (Mili-Q®) u koncentraciji od 100 μ M i pohranila preko noći na 4 °C. Idući dan pripremila sam radne otopine početnica koncentracije 10 μ M razrjeđenjem matične otopine u redestiliranoj vodi. Matične i radne otopine početnica pohranila sam na -20 °C.

Tablica 2. Nukleotidne sekvence i temperature taljenja korištenih početnica, prethodno dizajniranih prema bazi TAIR10 i Pali (2020).

Naziv početnice	Nukleotidna sekvenca početnice 5' → 3'	T _m (°C)	Dizajnirane u sklopu rada
ACT3_fw	CTGGCATCATACTTTCTACAATG	59,3	Tokić, 2024
ACT3_rev	CACCACTGAGCACAATGTTAC	59,4	
OGIO_fw	ATCCAAGAGCAGTTCAAGCAAG	60,3	Škiljaica i sur., 2022
OGIO_rev	GAGAGCCATACCTTCCACTG	60,5	
PUX7_fw	GTTTCTCAGACTATCAAAGCCA	58,4	
PUX7_rev	ATCAATTACAAGCACACGG	56,4	
BPM2_fw	TCTATCCGGGTAATAAGATCGAAGA	62,5	Škiljaica, 2022
BPM2_rev	CCTTGGAACCCTAATTGTGTC	60,3	
BPM2.3-4_fw	TCAAGGATTTTCTGTTTACGAGTG	60,1	
BPM2.3_rev	AGTAGAAAGATTAACCTTATCCCG	60,9	
BPM2.4_rev	AAATGAAGCAACATCTTATCCCG	59,3	
BPM2.5_fw	CCTGAAAGGTACAGAAGATCAC	60,3	
BPM2.5_rev	CCATCACAGCTAAAGAAATTACAG	60,1	
BPM2.6_fw	CCCTATTTTCAAGGTTCTCCCT	60,3	
BPM2.6_rev	CAGCCTCAACTTCTAAAGCTAC	60,3	

Tablica 3. Nukleotidne sekvence i temperature taljenja korištenih početnica, dizajniranih u sklopu projekta IP-2022-10-7874, a prema bazi AtRTD3.

Naziv početnice	Nukleotidna sekvenca početnice 5' → 3'	T _m (°C)
BPM2_univ_fw	CTGCAGTTTTTCAGGGCACAGC	63,3
BPM2_univ_rev	GCTAGCTGAACAACACAGATCAAC	63,5
BPM2.3-15_fw	TTCTCCCTTTAACTCTCTTTCTGGAC	64,7
BPM2.8_fw	CTTTAGAAGTTGAGGCTGAAAGCTG	64,2
BPM2.9_fw	GTACAAGCCCCTATTTTCAAGACTTG	64,7
qBPM2.9_rev	AGAGTTGATGCCATTTCAGTCTTG	62,0

Tablica 4. Korišteni parovi početnica i očekivane veličine fragmenata dobivene umnažanjem na kalupu komplementarne DNA (cDNA) i gDNA. Početnice korištene za kvantifikaciju ekspresije varijanti *BPM2.3-6* dizajnirane su prema bazi TAIR10 i Pali (2020), dok su ostale početnice za analizu i kvantifikaciju ekspresije varijanti gena *BPM2* dizajnirane prema bazi AtRTD3.

Naziv gena ili varijante	Naziv početnice	Veličina fragmenta cDNA (pb)	Veličina fragmenta gDNA (pb)
Provjera uspješnosti reverzne transkripcije			
<i>ACT3</i>	ACT3_fw	650	733
	ACT3_rev		
Analiza ekspresije			
<i>BPM2.3</i> i <i>BPM2.15</i>	BPM2.3-15_fw	<i>BPM2.3</i> = 1221	1221
	BPM2_univ_rev	<i>BPM2.15</i> = 876	
<i>BPM2.8</i>	BPM2.8_fw	310	–
	BPM2_univ_rev		
<i>BPM2.9</i>	BPM2.9_fw	565	–
	BPM2_univ_rev		
Kvantifikacija ekspresije			
<i>OGIO</i>	OGIO_fw	130	130
	OGIO_rev		
<i>PUX7</i>	PUX7_fw	120	120
	PUX7_rev		
<i>BPM2</i>	BPM2_fw	101	101
	BPM2_rev		
<i>BPM2.3</i> (prema TAIR10)	BPM2.3-4_fw	104	104
	BPM2.3_rev		
<i>BPM2.4</i> (prema TAIR10)	BPM2.3-4_fw	102	–
	BPM2.4_rev		
<i>BPM2.5</i> (prema TAIR10)	BPM2.5_fw	114	114
	BPM2.5_rev		
<i>BPM2.6</i> (prema Pali 2020)	BPM2.6_fw	107	107
	BPM2.6_rev		
<i>BPM2.8</i>	BPM2.8_fw	310	–
	BPM2_univ_rev		
<i>BPM2.9</i>	BPM2_univ_fw	115	115
	qBPM2.9_rev		

Tablica 5. Popis varijanata alternativnog prekranja gena *BPM2* iz baze AtRTD3 koje umnaža pojedini par početnica dizajniran prema bazi TAIR10 i Pali (2020). Ekvivalentne varijante su podcrtane.

Par početnica dizajniran prema bazi TAIR10 i Pali (2020)	Novootkrivene varijante iz baze AtRTD3 koje umnažaju
<i>BPM2.3</i>	<i>BPM2.3</i> , <u><i>BPM2.13</i></u> , <i>BPM2.16</i>
<i>BPM2.4</i>	<i>BPM2.1</i> , <i>BPM2.2</i> , <u><i>BPM2.5</i></u> , <i>BPM2.6</i> , <i>BPM2.7</i> , <u><i>BPM2.10</i></u> , <i>BPM2.15</i>
<i>BPM2.5</i>	<i>BPM2.3</i> , <u><i>BPM2.4</i></u> , <i>BPM2.7</i> , <u><i>BPM2.14</i></u>
<i>BPM2.6</i>	<u><i>BPM2.3</i></u> , <u><i>BPM2.15</i></u>

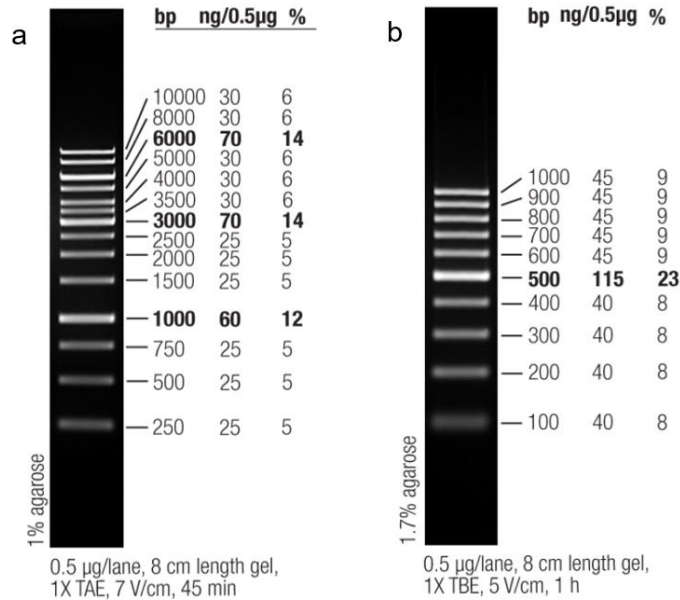
3.1.4. Pufferi za elektroforezu

Za pripremu 1,5% agaroznih gelova i provedbu elektroforeze fragmenata DNA dobivenih reakcijom PCR koristila sam puffer $1 \times$ TAE (engl. *Tris-HCl acetate ethylenediaminetetraacetic acid*; 40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0).

U svrhu boljeg razdvajanja kraćih fragmenata DNA dobivenih reakcijom qPCR, za pripremu 2% agaroznog gela i provedbu elektroforeze sam koristila puffer $0,5 \times$ TBE (engl. *Tris borate ethylenediaminetetraacetic acid*; 45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8,0).

3.1.5. DNA molekularni standardi

Za analizu fragmenata DNA nakon agarozne gel elektroforeze koristila sam molekularne standarde GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific; Slika 3.a) i GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific; Slika 3.b), ovisno o očekivanoj veličini produkta.



Slika 3. DNA molekularni standardi za provjeru veličine fragmenta DNA. a) GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific), b) GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

3.2. Metode

3.2.1. *In silico* analiza promotora gena *BPM2*

S ciljem detaljnije karakterizacije gena *BPM2* promotorsku regiju sam analizirala pretraživanjem baze podataka EPD (Eukaryotic promoter database, <https://epd.expasy.org/epd/>). Gen *BPM2* pronašla sam u bazi TAIR10 A. *thaliana* prema njegovoj oznaci AT3G06190. Pretraživanja sam radila na regiji od -2000 pb do +100 pb u odnosu na TSS uz p-vrijednost 0,001. U knjižnici promotorskih motiva (*Promoter Motifs*) pretražila sam sve dostupne motive: TATA-box, Inr, GC-box i CCAAT-box. U knjižnici motiva transkripcijskih faktora (*Transcription Factor Motifs*, iz JASPAR CORE 2018 Plants) pretražila sam mjesta prepoznavanja transkripcijskih faktora vezanih uz hladni i toplinski stres te onih koji ostvaruju interakcije s proteinom BPM2: ATHB6, ATHB16, bZIP52, CBF1, CBF2, DREB2, ERF4, MYB15, MYB56, MYC2, MYC3, RAV1, WRKY6, WRKY18, WRKY22, WRKY25, WRKY26, WRKY32, WRKY33, WRKY40, WRKY46. Kako bih utvrdila postoje li u promotoru specifični motivi njihove sam sekvence pretraživala ručno unutar sekvence gena *BPM2* na istoj regiji (-2000 pb do +100 pb u odnosu na TSS). Na ovaj način pretražila sam postoje li u promotoru gena *BPM2* motivi ABRE (ABA-responsive element), CE1 (coupling element), DRE (dehydration-responsive element), CE3 i HSE. Specifične sekvence navedenih motiva nalaze se u Prilogu II.

3.2.2. Sterilizacija i nasađivanje sjemenki

U svrhu sterilizacije, sjemenke sam prvo inkubirala 1 minutu (min) u 70% (v/v) etanolu. Etanol sam zatim uklonila, a na sjemenke dodala sterilizacijsku otopinu koja sadrži 1% Izosana G (100% natrij

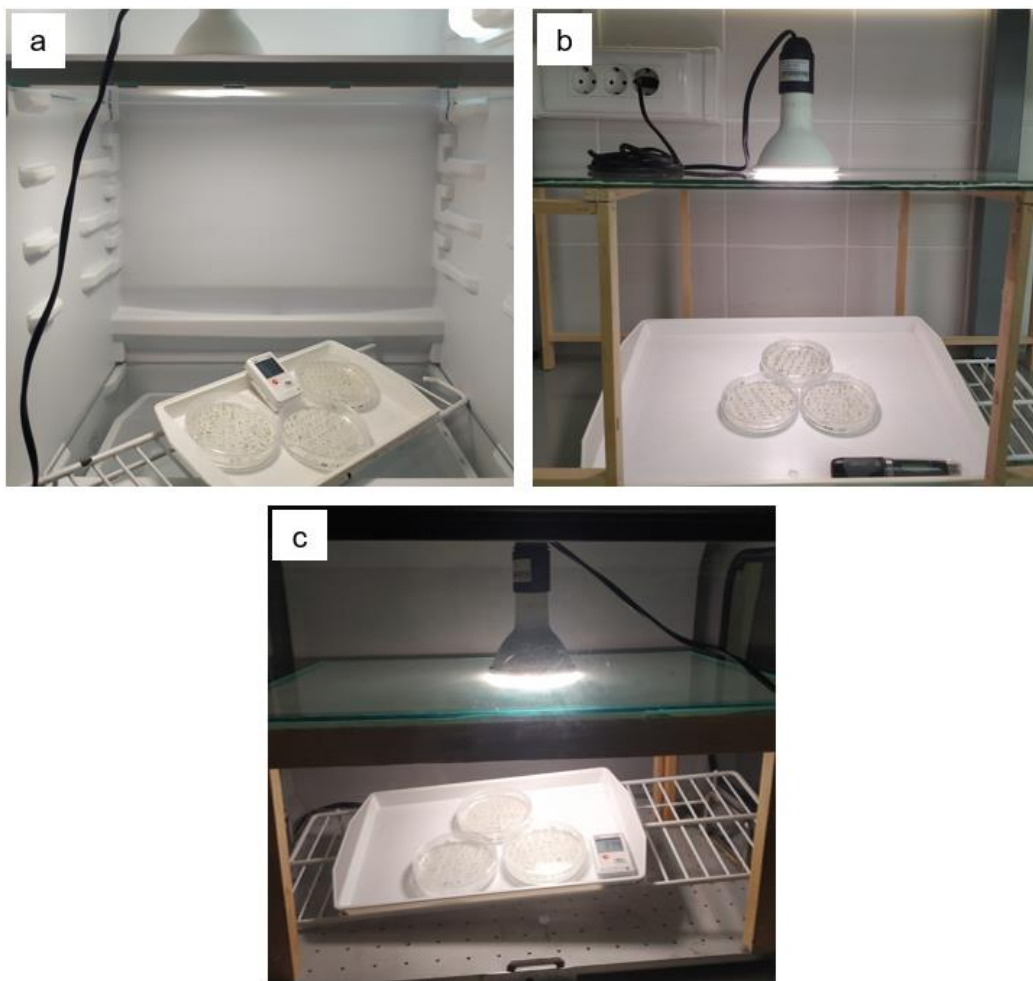
dikloroizocijanurat dihidrat, Pliva®) i 0,1% mukazola (Sigma). Sjemenke sam inkubirala u sterilizacijskoj otopini 10 min na miješalici (DYNAL Sample mixer). Nakon inkubacije sam u sterilnim uvjetima u laminaru uklonila sterilizacijsku otopinu i sjemenke pet puta isprala sterilnom destiliranom vodom. Na sjemenke sam ponovno dodala sterilnu destiliranu vodu i pomoću mikropipete ih pojedinačno nasadila na kruti hranjivi medij MS0 u petrijevim zdjelicama.

3.2.3. Uvjeti uzgoja

Petrijeve zdjelice s pojedinačno nasadenim sjemenkama stavila sam na 4 °C tijekom 24 sata (h) u svrhu stratifikacije. Nakon stratifikacije, petrijeve zdjelice su premještene u klima komoru kako bi sjemenke proklijale. Klijanci su u klima komori uzgajani na 23 °C u uvjetima dugog dana (16 h svjetla i 8 h tame), pri intenzitetu svjetlosti 172 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Klijance sam 11. dan rasta u komori presadila u mješavinu bijelog treseta i perlita (Stekcmedium KLASMANN, Klasmann-Deilmann, GmbH), poklopila prozirnim poklopcem i premjestila u fitotron (Kambič RK-500 CH). U fitotronu su biljke rasle na 22 °C u uvjetima kratkog dana (8 h svjetla i 16 h tame), pri intenzitetu svjetlosti 70 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i vlažnosti zraka 60%. Nakon osam dana, biljke su otklopljene. Biljke su 38. dan rasta premještene u klima komoru u uvjete dugog dana, na temperaturu od 21 °C, gdje su uzgajane do tretmana.

3.2.4. Uvjeti temperaturnog tretmana

Kako bih analizirala utjecaj temperaturnog stresa na ekspresiju varijanti alternativnog prekrajanja gena *BPM2* u stadiju klijanaca, klijance sam šesti dan uzgoja u klima komori izložila temperaturnom stresu. Prije tretmana sam u klima komoru, hladnjak (Končar) i inkubator (Edmund Bühler GmbH TH 30) postavila dvije staklene ploče između kojih se nalazi celulozni papir i na njih stavila LED lampu (VÄXER LED 10 W, IKEA) kako bi intenzitet svjetlosti na razini klijanaca bio ujednačen, a iznosio je 90-100 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Slika 4). Prije i nakon tretmana fotografirala sam sve petrijeve zdjelice s klijancima i odabrala 10 pojedinačnih klijanaca iz svake petrijeve zdjelice koje sam fotografirala pod lupom (Zeiss Stemi 2000-C, AxioCam ERc 5s) kako bih utvrdila je li došlo do morfoloških promjena nakon tretmana. Dio klijanaca izložila sam hladnom (5 °C), a dio toplinskom stresu (37 °C), dok sam dio klijanaca ostavila u uvjetima rasta i oni su služili kao kontrolni materijal. Klijance sam izložila hladnom stresu premještanjem u hladnjak na 5 °C, odnosno umjerenom toplinskom stresu premještanjem u inkubator na 37 °C. Temperaturni tretmani trajali su 12 h. Nakon tretmana, klijance sam izbrojila i izvagala te prebacila u mikroperuvete s dodanim staklenim kuglicama za homogenizaciju i smrznula u tekućem dušiku.



Slika 4. Izlaganje klijanaca temperaturnom stresu. a) Petrijeve zdjelice s klijancima u hladnjaku, tretman temperaturnom od 5 °C, b) Petrijeve zdjelice s klijancima u klima komori (kontrola), 23 °C, c) Petrijeve zdjelice s klijancima u inkubatoru, tretman temperaturnom od 37 °C.

U svrhu analize utjecaja temperaturnog stresa na ekspresiju varijanti alternativnog prekranja gena *BPM2* u odraslom stadiju, biljke sam 76. dan nakon stratifikacije izložila temperaturnom stresu. Za tretman biljaka koristila sam isti hladnjak i inkubator s postavljenom LED lampom (Slika 5). Biljke sam fotografirala prije i nakon tretmana. Biljke u odraslom stadiju izložila sam niskoj temperaturi i dvjema povišenim temperaturama, a biljke ostavljene u uvjetima rasta služile su kao kontrolni materijal. Dio biljaka izložila sam hladnom stresu tako što sam ih premjestila u hladnjak na 5 °C, dok sam dio premještanjem u inkubator na 37 °C izložila umjerenom toplinskom stresu. Ovi temperaturni tretmani trajali su 12 h. Nakon tretmana sakupljeni su uzorci cvjetnih pupova i oplodjenih cvjetova i smrznuti u tekućem dušiku. Dodatno, dio biljaka sam u inkubatoru izložila toplinskom stresu pri temperaturi od 44 °C, a tretman je trajao 45 min. Uzorci pupova i cvjetova s ovih biljaka sakupljeni su u dvije vremenske točke – odmah nakon tretmana i nakon 11 h i 15 min oporavka.



Slika 5. Izlaganje odraslih biljaka temperaturnom stresu. a) Odrasle biljke u hladnjaku, tretman temperaturnom od 5 °C, b) Odrasle biljke u klima komori (kontrola), 21 °C, c) Odrasle biljke u inkubatoru, tretman temperaturnom od 37 °C, d) Odrasle biljke u inkubatoru, tretman temperaturnom od 44 °C.

3.2.5. Izolacija genomske DNA

Za izolaciju genomske DNA koristila sam tkivo ovalnog lista uročnjaka. Brzu izolaciju gDNA provela sam prema protokolu opisanom u Jagić (2023). Tkivo sam stavila u mikroeprijetu s dodanim staklenim kuglicama, smrznula u tekućem dušiku i homogenizirala u uređaju Silver Mix (C.M.F. Srl.) dva puta po 8 s. Na smrznuto homogenizirano tkivo dodala sam 100 µL ekstrakcijskog pufera (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 0,5% SDS) i vorteksirala. Nakon toga sam uzorak centrifugirala 5 min pri 16000 × g (Eppendorf 5415C). Nakon centrifugiranja, 75 µL supernatanta prebacila sam u čistu mikroeprijetu i dodala 150 µL 96% (v/v) etanola. Otopinu sam ponovno vorteksirala i centrifugirala 10 min pri 16000 × g. Zatim sam uklonila supernatant i uzorak ostavila da se suši u otvorenoj mikroeprijeti 20 min. Na suhi uzorak sam dodala 50 µL pufera TE (engl. *Tris-EDTA*; 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0) i vorteksirala. Uzorak sam centrifugirala 5 min pri 16000 × g i supernatant s DNA prebacila u čistu mikroeprijetu. Izoliranu DNA sam razrijedila 10 × u redestiliranoj vodi i pohranila na 4 °C.

3.2.6. Izolacija ukupne RNA iz klijanaca

Za izolaciju ukupne RNA iz klijanaca koristila sam komercijalni komplet MagMAX™ Plant RNA Isolation Kit (Thermo Scientific) prema uputama proizvođača. Uzorci su sadržavali 31-46 mg klijanaca smrznutih u tekućem dušiku. Tkivo sam homogenizirala u uređaju Silver Mix (C.M.F. Srl.) dva puta po 8 sekundi (s) i na smrznuto homogenizirano tkivo dodala 600 µL pufera za lizu s dodatkom ditiotreitolu iz komercijalnog kompleta. Uzorke sam nakon homogenizacije inkubirala 5 min na 56 °C i zatim centrifugirala 10 min pri 16000 × g. Nakon centrifugiranja sam 400 µL supernatanta prebacila u čistu mikroeprevetu i slijedila protokol za ručnu izolaciju RNA. Izoliranoj RNA sam izmjerila koncentraciju i čistoću na uređaju NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Dio RNA sam odmah koristila kao kalup u reakciji reverzne transkripcije, a ostatak pohranila na -80 °C.

3.2.7. Izolacija mRNA iz cvjetnih pupova i oplodjenih cvjetova

Za izolaciju mRNA iz cvjetnih pupova i oplodjenih cvjetova koristila sam komercijalni komplet Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Ambion) prema uputama proizvođača za izolaciju mRNA iz tkiva. U završnom koraku sam mRNA eluirala s magnetnih kuglica dodatkom dva puta po 10 µL hladne otopine 10 mM Tris-HCl i inkubacijom 2 min na 80 °C. Izoliranoj mRNA sam izmjerila koncentraciju i čistoću na uređaju NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Dio mRNA sam odmah koristila kao kalup u reakciji reverzne transkripcije, a ostatak pohranila na -80 °C.

3.2.8. Reverzna transkripcija

Kako bih izoliranu RNA prevela u cDNA koju mogu koristiti za analizu ekspresije provela sam reakciju reverzne transkripcije. Kako bi razine ekspresije varijanti alternativnog prekrajanja bile usporedive između uzoraka u sve reakcije reverzne transkripcije dodala sam istu masu RNA. Za uzorke klijanaca u reakciju sam dodala 1 µg ukupne RNA. Za uzorke cvjetnih pupova i oplodjenih cvjetova u reakciju sam dodala maksimalni volumen uzorka najmanje koncentracije, a ostale uzorke razrijedila na način da količina mRNA bude jednaka onoj najmanje koncentracije. U reakcije za cvjetne pupove dodala sam 23 ng mRNA za prvu repliku, 47 ng za drugu i 84 ng za treću repliku. U reakcije za cvjetove dodala sam 67 ng mRNA za prvu repliku, 65 ng za drugu i 89 ng za treću repliku. Reakciju reverzne transkripcije za uzorke ukupne RNA provodila sam u ukupnom volumenu od 20 µL, a za uzorke mRNA u ukupnom volumenu od 14 µL. Reakciju sam provela pomoću enzima RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) prema uputama proizvođača, uz korištenje početnica oligo(dT)₁₈ Primer (Thermo Scientific). Prva reakcijska smjesa sadržavala je RNA kalup, otopinu početnica i vodu s dodatkom dietil pirokarbonata (engl. *diethyl pyrocarbonate*, DEPC), dok je druga reakcijska smjesa sadržavala odgovarajući reakcijski pufer, inhibitor RNaza RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific), smjesu deoksiribonukleotida (dNTP) i reverznu transkriptazu. Reverznu transkripciju sam provela u dva koraka. Prvu reakcijsku smjesu sam inkubirala

5 min na 65 °C i nakon toga ohladila na 4 °C. Kad se prva reakcijska smjesa ohladila, u nju sam dodala drugu i ukupnu reakcijsku smjesu inkubirala 60 min na 42 °C pa terminirala reakciju na 70 °C 10 min. Reakcije sam provela u uređaju GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems). Dobivenu cDNA iz klijanaca sam razrijedila 10 ×, a cDNA iz pupova i cvjetova 5 × u redestiliranoj vodi. Nerazrijedenu cDNA sam pohranila na –80 °C, a razrijedenu na 4 °C.

3.2.9. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

U svrhu potvrde uspješnosti reverzne transkripcije i provjere kontaminacije gDNA te analize ekspresije varijanti alternativnog prekrajanja gena *BPM2* provela sam lančanu reakciju polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Za reakciju sam koristila EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (Takara Bio) prema uputama proizvođača, u ukupnom volumenu 25 µL. U reakciju sam dodala 2 µL razrijedene cDNA. Reakcije PCR provela sam i na uzorku gDNA te sam kao negativnu kontrolu reakcije umjesto kalupa DNA dodala isti volumen redestilirane vode. Program reakcije PCR razlikovao se ovisno o genu koji sam umnažala zbog različite temperature taljenja korištenih početnica i očekivane veličine umnoženog fragmenta. Programi reakcija PCR prikazani su u Tablici 6. Reakcije sam provela u uređaju GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems).

Tablica 6. Program reakcija PCR za umnažanje gena *ACT3*, *BPM2* i varijanti alternativnog prekrajanja *BPM2.3*, *BPM2.15*, *BPM2.8* i *BPM2.9*.

		<i>ACT3</i>	<i>BPM2.3-15</i>	<i>BPM2.8</i>	<i>BPM2.9</i>
početna denaturacija		98 °C 3 min			
40 ciklusa	denaturacija	98 °C 10 s			
	prianjanje početnica	60 °C 30 s	61 °C 30 s	60 °C 30 s	60 °C 30 s
	elongacija	72 °C 1 min	72 °C 1 min 30 s	72 °C 30 s	72 °C 30 s
završna elongacija		72 °C 5 min			

3.2.10. Analiza relativne ekspresije varijanti alternativnog prekrajanja kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

U svrhu kvantifikacije ekspresije varijanti alternativnog prekrajanja gena *BPM2* provela sam kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *quantitative real-time PCR*, qRT-PCR). Za umnažanje varijanti *BPM2.3-6* (prema bazi TAIR10 i Pali 2020) i varijante *BPM2.9* koristila sam početnice dizajnirane za qRT-PCR, dok sam za umnažanje varijante *BPM2.8* koristila iste početnice koje sam koristila u standardnoj PCR reakciji. Za reakciju sam koristila GoTaq® qPCR MasterMix (Promega). Kao endogenu

kontrolu koristila sam referentne gene *OGIO* i *PUX7*. Reakcijska smjesa sastojala se od 5 μL $2 \times$ GoTaq[®] qPCR MasterMix, 0,2 μL uzvodne i 0,2 μL nizvodne početnice za pojedini gen, 1 μL kalupa cDNA i 3,6 μL redestilirane vode. Kao negativnu kontrolu sam umjesto cDNA kalupa dodala 1 μL redestilirane vode. Za svaki uzorak radila sam dvije tehničke replike. Prvi korak u reakciji qRT-PCR bila je početna denaturacija 5 min na 95 °C. Zatim je slijedio korak Pre-Cyclinga s 8 ciklusa denaturacije i elongacije. Denaturacija se odvijala 5 s na 95 °C, a elongacija 20 s na različitim temperaturama. Temperatura elongacije snižavala se s 62 °C do 58 °C po 0,5 °C po ciklusu. Nakon koraka Pre-Cyclinga slijedilo je 40 ciklusa denaturacije 5 s na 95 °C i elongacije 20 s (60 s za umnažanje varijante *BPM2.8*) na 60 °C. Određena je i krivulja taljenja (engl. *melting curve*) nastalog produkta povećanjem temperature s 72 °C na 95 °C po 0,3 °C po ciklusu. Reakcije qRT-PCR provela sam u uređaju MIC (Bio Molecular Systems). Relativnu ekspresiju gena izračunala sam prema $\Delta\Delta\text{Ct}$ metodi (Pfaffl i sur. 2004; Vandesompele i sur. 2002). Vrijednosti graničnog ciklusa (engl. *cycle threshold*, Ct) i efikasnosti parova početnica izračunate su u softveru MIC qPCR Cycler (Bio Molecular Systems). Vrijednost ΔCt izračunala sam normalizacijom ekspresije varijante od interesa na referentne gene. Vrijednost $\Delta\Delta\text{Ct}$ izračunala sam normalizacijom dobivenih ΔCt vrijednosti za uzorke tretirane sniženim i povišenim temperaturama na kontrolni uzorak.

3.2.11. Agarozna gel elektroforeza

U svrhu vizualizacije fragmenata DNA dobivenih umnažanjem u reakciji PCR ili qRT-PCR provela sam agaroznu gel elektroforezu. Za elektroforezu produkata reakcije PCR koristila sam 1,5% gel pripremljen u puferu TAE, a za produkte reakcije qRT-PCR 2% gel pripremljen u puferu $0,5 \times$ TBE. Na gelove sam nanosila 5 μL reakcijske smjese za PCR, ili reakcijske smjese za qRT-PCR pomiješane s 1 μL otopine $6 \times$ DNA Gel Loading dye (Thermo Scientific). Uz uzorke, na svaki gel sam nanijela 3 μL odgovarajućeg DNA molekularnog standarda, ovisno o veličini očekivanog produkta. Elektroforezu sam provodila u kadici RunOne[™] Electrophoresis Unit (Embi Tec) u puferu $1 \times$ TAE ili $0,5 \times$ TBE, pri naponu 25 V prvih 5 min, a zatim 100 V 20 min u slučaju produkata reakcije PCR, odnosno 50 V 45 min u slučaju produkata reakcije qRT-PCR. Gelove sam nakon elektroforeze inkubirala u otopini etidij bromida koncentracije 10 ng/L tijekom 15 min pa potom vrpce detektirala izlaganjem UV svjetlu (Kodak EDAS 290, ekspozicija 2 s, 100% UV) te fotografirala digitalnom kamerom koristeći program Kodak 1D.

3.2.12. Statistička obrada podataka

Dobivene podatke obradila sam u programu Microsoft Excel 365 uz dodatak Real Statistics Resource Pack (<https://www.real-statistics.com/free-download/real-statistics-resource-pack/>). Podatke sam obradila na temelju svih tehničkih replika (dvije tehničke replike po uzorku po biološkoj replici) kako bih dobila što precizniju varijabilnost bioloških replika. Rezultate sam prikazala kao geometrijsku srednju vrijednost od dvije ili tri biološke replike, a odstupanje izrazila kao standardnu pogrešku. Prije statističke analize

podataka, testirala sam distribuciju i varijancu podataka Shapiro-Wilkovim, odnosno Levenovim testom. Za podatke s normalnom distribucijom i jednakim varijancama koristila sam jednosmjernu analizu varijance (*one-way ANOVA*), a kao *post hoc* test odabrala sam test Tukey HSD. Za podatke koji nisu imali normalnu distribuciju ili jednake varijance koristila sam test Kruskal-Wallis, a kao *post hoc* test odabrala sam Dunnov test. Razlike sam smatrala značajnim ukoliko je p-vrijednost manja ili jednaka 0,05 ($p \leq 0,05$).

4. Rezultati

4.1. Regulatorni motivi u promotoru gena *BPM2*

Pretraživanjem regije pomotora gena *BPM2* u području od -2000 pb do $+100$ pb u odnosu na TSS nije pronađen nijedan motiv TATA-box. S druge strane, motiv Inr pronađen je na tri mjesta ove regije, na pozicijama $+94$, -885 i -1387 . Uz to su pronađena dva motiva GC-box na pozicijama -846 i -875 i tri motiva CCAAT-box na pozicijama -1281 , -1414 i -1785 .

U regiji od -2000 pb do $+100$ pb u odnosu na TSS nije pronađen niti jedan element osjetljiv na apscizinsku kiselinu ABRE, DRE i CE3. Međutim, pronađeno je nekoliko elemenata CE1 na pozicijama -663 , -688 , -914 , -1176 , -1377 i -1783 . Pretraživanjem ove regije nije pronađen nijedan motiv HSE.

U regiji promotora gena *BPM2* u području od -2000 pb do $+100$ pb u odnosu na TSS pronađena su vezna mjesta svih istraživanih TF-a. Pozicije mjesta prepoznavanja ovih TF-a u promotoru gena *BPM2* navedene su u Tablici 7.

Tablica 7. Popis transkripcijskih faktora povezanih s hladnim i toplinskim stresom te onih koji ostvaruju interakcije s proteinima BPM i pozicije njihovih mjesta prepoznavanja u promotorskoj regiji gena *BPM2* od -2000 pb do $+100$ pb u odnosu na TSS. p-vrijednost = 0,001.

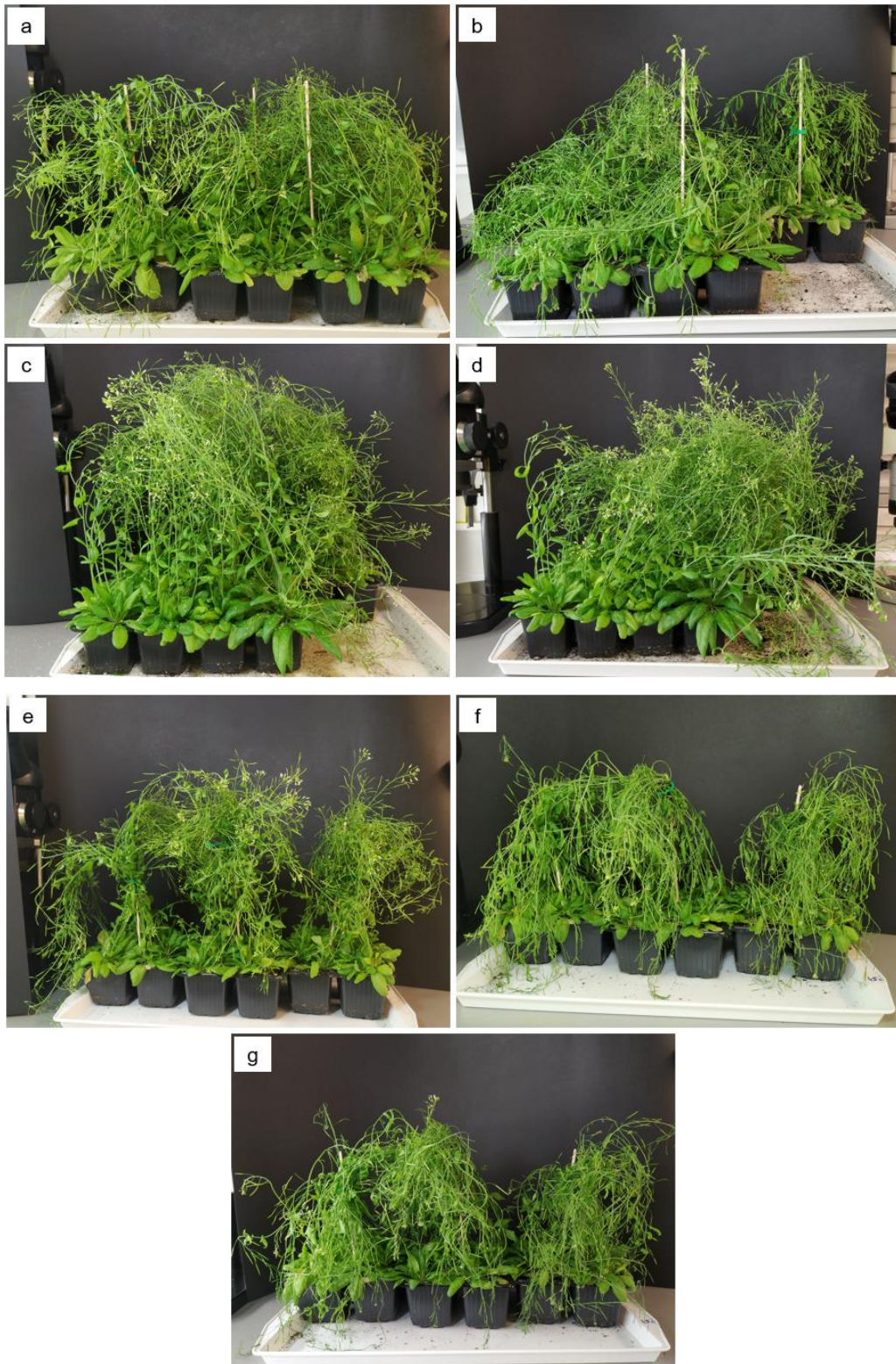
Transkripcijski faktor	Pozicija mjesta prepoznavanja u odnosu na TSS
ATHB6	$-62, -1002$
ATHB16	$-61, -469, -760$
bZIP52	$-663, -1808$
CBF1	$+71, -1025, -1425$
CBF2	$+61, -202, -1117$
DREB2	$+70, -19, -202, -991, -1117$
ERF4	$-674, -991, -1011, -1012, -1381, -1462$
MYB15	$-17, -274, -716, -942, -1053, -1089, -1409$
MYB56	-364
MYC2	$-418, -419, -1833, -1834, -1992, -1993$
MYC3	$-418, -419$
RAV1	$-9, -521, -808, -1109$

Tablica 7. nastavak

WRKY6	-438, -614, -660, -1687
WRKY18	-443, -665, -1194, -1319, -1433, -1682
WRKY22	-443, -459, -665, -1194
WRKY25	-269, -443, -665, -886, -1433, -1682
WRKY26	+61, +58, -450, -619, -665, -1285, -1682
WRKY33	-442, -664, -1683
WRKY40	-443, -1433, -1682
WRKY46	-438, -614, -660, -1687

4.2. Utjecaj temperaturnog stresa na morfologiju biljaka

Na klijancima izloženim bilo hladnom (5 °C), bilo toplinskom (37 °C) stresu nisu bile vidljive nikakve morfološke promjene. S druge strane, na odraslim biljkama primjećivale su se morfološke promjene uslijed izlaganja temperaturnom stresu. Biljke su venule nakon izlaganja svim tretmanima (5 °C, 37 °C i 44 °C). Venuće je bilo jako izraženo kod biljaka izloženih temperaturi od 5 °C (Slika 6 a, b), a manje izraženo kod biljaka izloženih temperaturi od 37 °C (Slika 6 c, d). Izlaganje temperaturi od 44 °C također je imalo velik utjecaj na biljke (Slika 6 e, f). Oporavak od 11 h i 15 min kod biljaka izloženih temperaturi od 44 °C samo je malo smanjio venuće biljaka (Slika 6 f, g).



Slika 6. Morfologija odraslih biljaka prije i nakon izlaganja temperaturnim tretmanima. a) biljke prije izlaganja temperaturi od 5 °C, b) biljke nakon izlaganja 12 h temperaturi od 5 °C, c) biljke prije izlaganja temperaturi od 37 °C, d) biljke nakon izlaganja 12 h temperaturi od 37 °C, e) biljke prije izlaganja temperaturi od 44 °C, f) biljke nakon izlaganja 45 min temperaturi od 44 °C, g) biljke izložene 45 min temperaturi od 44 °C nakon 11 h i 15 min oporavka.

4.3. Uspješnost izolacije RNA i reverzne transkripcije

4.3.1. Koncentracija i čistoća izolirane RNA

Za potrebe analize ekspresije varijanti alternativnog prekraranja gena *BPM2* izolirala sam RNA iz klijanaca, cvjetnih pupova i oplodjenih cvjetova uročnjaka izloženih temperaturnom stresu i ekvivalentnih kontrolnih tkiva. Iz uzoraka klijanaca izolirala sam ukupnu RNA, a iz uzoraka pupova i cvjetova mRNA prema uputama proizvođača korištenih komercijalnih kompleta. Koncentracije izolirane ukupne RNA iz klijanaca iznosile su 192,4 – 238,0 ng/μL, koncentracije mRNA iz pupova 2,5 – 12,7 ng/μL, a iz cvjetova 7,1 – 13,5 ng/μL (Tablica 8). Čistoću izoliranih RNA analizirala sam prema omjerima apsorbancije A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} (Tablica 8). Vrijednosti omjera niže od 2,0 ukazuju na nečistoće u uzorku koje apsorbiraju na valnim duljinama od 280, odnosno 230 nm, a mogu potjecati od ostataka kemikalija ili magnetnih kuglica korištenih u izolaciji.

Tablica 8. Koncentracija i čistoća izolirane ukupne RNA iz klijanaca, odnosno mRNA iz cvjetnih pupova i oplodjenih cvjetova. R1 – prva replika, R2 – druga replika, R3 – treća replika.

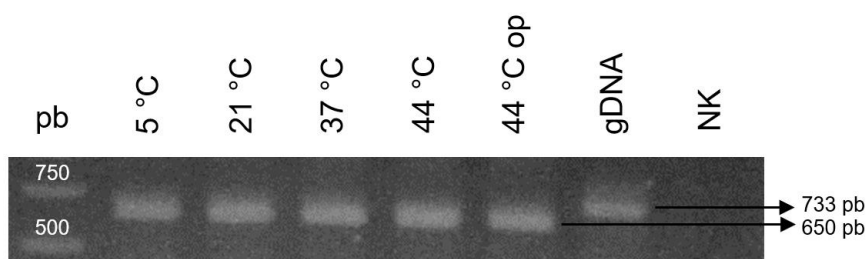
Uzorak		Koncentracija (ng/μL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	
Klijanci	R1	5 °C	200,1	2,23	2,33
		23 °C	126,5	2,29	2,56
		37 °C	138,7	2,30	2,31
	R2	5 °C	204,5	2,23	1,48
		23 °C	228,1	2,23	2,00
		37 °C	176,7	2,24	1,43
	R3	5 °C	235,7	2,19	1,47
		23 °C	238	2,23	2,00
		37 °C	191,8	2,23	1,50
Cvjetni pupovi	R1	5 °C	4,1	1,51	0,87
		21 °C	2,5	2,57	0,91
		37 °C	4,8	1,96	1,36
		44 °C	4,8	1,59	1,87
		44 °C op	3,9	1,56	1,52

Tablica 8. nastavak

Cvjetni pupovi	R2	5 °C	5,1	2,28	1,72
		21 °C	5,7	2,17	2,05
		37 °C	8	2,34	1,63
		44 °C	8	2,93	1,12
		44 °C op	7,3	2,95	1,42
	R3	5 °C	10,1	2,29	2,18
		21 °C	12,7	1,97	2,23
		37 °C	12,5	2,24	2,20
		44 °C	9,1	2,25	2,05
		44 °C op	11,4	1,97	1,98
Oplođeni cvjetovi	R1	5 °C	9,3	1,71	1,55
		21 °C	7,3	1,48	1,52
		37 °C	7,6	1,91	1,59
		44 °C	7,5	2,02	2,27
		44 °C op	9,5	1,97	2,15
	R2	5 °C	10,6	2,35	2,39
		21 °C	10,3	2,21	2,33
		37 °C	10,9	2,15	1,96
		44 °C	7,1	2,23	1,51
		44 °C op	8,3	2,46	1,56
	R3	5 °C	12	1,75	1,33
		21 °C	13,5	1,92	1,41
		37 °C	11,7	1,95	1,95
		44 °C	9,7	1,76	1,74
		44 °C op	11,3	1,92	1,94

4.3.2. Kvaliteta cDNA dobivene reverznom transkripcijom

Izoliranu RNA sam u reakciji reverzne transkripcije prevela u cDNA na način da je svaka reakcija tretiranog i kontrolnog uzorka sadržavala jednaku početnu količinu RNA. Uspješnost reverzne transkripcije i moguću kontaminaciju dobivene cDNA genomskom DNA provjerila sam umnažanjem gena *ACT3* metodom PCR-a i agaroznom gel elektroforezom nastalog produkta. U slučaju umnažanja na kalupu cDNA nastaje produkt veličine 650 pb, a umnažanjem na kalupu gDNA produkt veličine 733 pb. Na svim gelovima bile su vidljive vrpce veličine 650 pb što ukazuje da je RNA uspješno prevedena u cDNA u svim uzorcima. Dobivene cDNA nisu bile kontaminirane gDNA jer na gelu nije bila prisutna vrpca veličine 733 pb, a koja je bila vidljiva u uzorku gDNA (Slika 7, Prilog III).



Slika 7. Provjera uspješnosti reverzne transkripcije i čistoće dobivene cDNA u oplodjenim cvjetovima biljaka kontrolne skupine (21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C). Donji fragment veličine 650 pb odgovara produktu umnažanja gena *ACT3* na kalupu cDNA, a fragment od 733 pb produktu umnažanja na kalupu gDNA. pb – molekularni standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 5 °C, 21 °C, 37 °C, 44 °C – temperaturni tretmani, op – oporavak 11 h i 15 min nakon tretmana, NK – negativna kontrola. Još dvije biološke replike istog eksperimenta, te umnažanje u klijancima i cvjetnim pupovima prikazani su u Prilogu III.

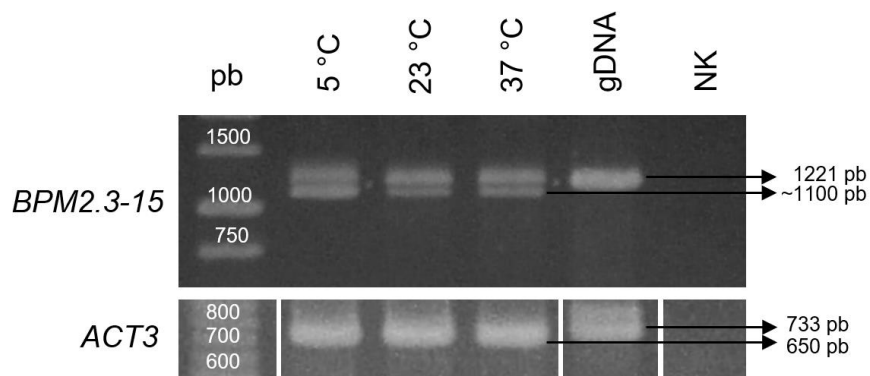
4.4. Analiza ekspresije varijanti alternativnog prekrajanja gena *BPM2* metodom PCR

Kako bih utvrdila povezanost varijanti alternativnog prekrajanja gena *BPM2* s temperaturnim stresom analizirala sam ekspresiju pojedinih varijanti u klijancima, cvjetnim pupovima i oplodjenim cvjetovima biljaka kontrolne skupine (21 °C, odnosno 23 °C) i onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C). Dodatno, ekspresiju u pupovima i cvjetovima biljaka izloženih temperaturi od 44 °C analizirala sam i nakon oporavka (44 °C op). Ekspresiju varijanti alternativnog prekrajanja analizirala sam umnažanjem pojedine varijante metodom PCR-a i agaroznom gel elektroforezom nastalog produkta. Reakcije umnažanja sam provela na uzorcima cDNA dobivenim reverznom transkripcijom i na uzorku gDNA. Reprezentativna replika svakog tkiva prikazana je u rezultatima, a ostale su prikazane u prilogu.

4.4.1. Analiza ekspresije varijanti *BPM2.3* i *BPM2.15*

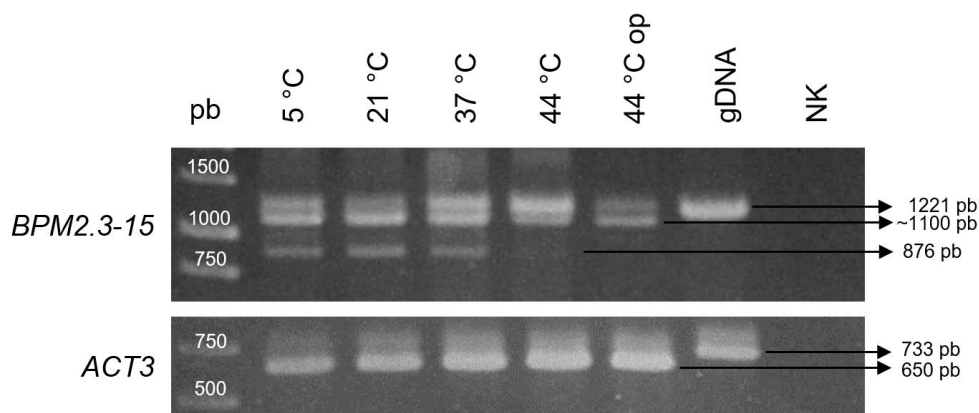
U svrhu analize ekspresije varijanti alternativnog prekrajanja *BPM2.3* i *BPM2.15* te sam varijante umnožila početnicama koje umnažaju obje varijante transkripta. Navedene varijante translacijom daju isti protein. Umnažanjem varijante *BPM2.3* ovim parom početnica očekuje se fragment od 1221 pb, a umnažanjem varijante *BPM2.15* fragment od 876 pb što omogućuje razlikovanje ovih dviju varijanti na gelu. Umnažanjem na kalupu gDNA također se očekuje fragment veličine 1221 pb (Slike 8, 9, 10, Prilog IV).

Varijanta *BPM2.3* je bila dominantna u klijancima, a njezina ekspresija je detektirana pri svim temperaturnim tretmanima (Slika 8). S druge strane, varijanta *BPM2.15* bila je umnožena samo na 37 °C u jednoj od tri replike (Prilog IV a). Stoga postoje naznake da se ekspresija ove varijante povećala na povišenoj temperaturi. Na gelovima je bila prisutna dodatna vrpca veličine oko 1100 pb koja potječe od umnažanja potencijalne nove varijante koja nije zastupljena u bazama, niti TAIR10, a niti AtRTD3 (Slika 8, Prilog IV a, b). Ova varijanta (~1100 pb) bila je prisutna u kontrolnim uvjetima te pri povišenoj temperaturi, međutim njezina ekspresija detektirana je na 5 °C u samo jednoj od tri replike (Slika 8, Prilog IV a, b).



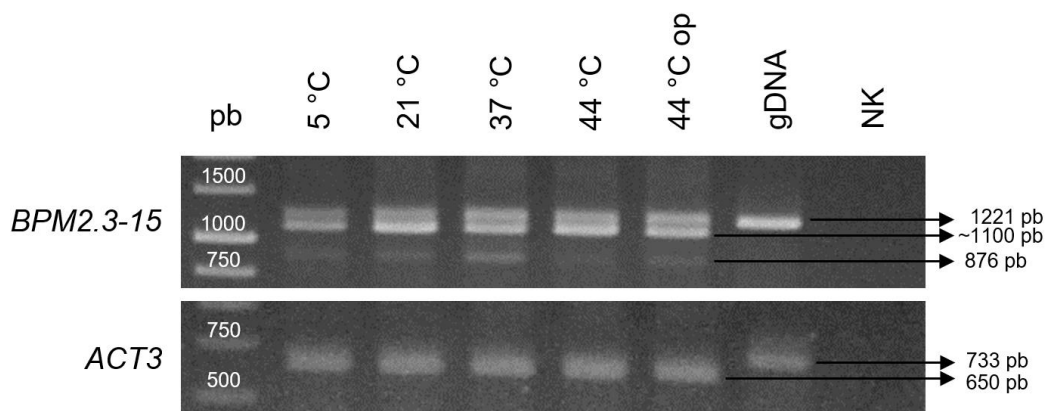
Slika 8. Analiza ekspresije varijanti alternativnog prekrajanja *BPM2.3* i *BPM2.15* u klijancima kontrolne skupine (23 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C). Gornji fragment veličine 1221 pb predstavlja očekivanu varijantu *BPM2.3*, a fragment veličine 876 pb koji odgovara varijanti *BPM2.15* nije se umnažao u ovoj replici. Fragment veličine oko 1100 pb najvjerojatnije pripada novoj varijanti. Donji gel prikazuje produkte umnažanja gena *ACT3* pri čemu fragment od 650 pb odgovara produktu umnažanja na kalupu cDNA, a fragment od 733 pb produktu umnažanja na kalupu gDNA. pb – molekularni standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder za *BPM2.3-15*, GeneRuler 100 bp DNA Ladder za *ACT3*; 5 °C, 23 °C, 37 °C – temperaturni tretmani; NK – negativna kontrola. Još dvije biološke replike istog eksperimenta prikazane su u Prilogu IV a, b.

Varijanta *BPM2.3* bila je dominantna i u cvjetnim pupovima (Slika 9, Prilog IV c, d). Ekspresija ove varijante je detektirana pri svim temperaturama, iako smanjenog intenziteta nakon oporavka (Slika 9, Prilog IV d). Varijanta *BPM2.15* bila je manje zastupljena i njezina se ekspresija smanjila na 44 °C (Slika 9, Prilog IV c, d) ukazujući na povezanost s toplinskim stresom. Kao i u klijancima, i u pupovima je detektirana dodatna vrpca veličine oko 1100 pb koja potječe od umnažanja potencijalne nove varijante koja nije zastupljena u bazama. Ova varijanta je u cvjetnim pupovima bila prisutna na svim temperaturama (Slika 9, Prilog IV c, d).



Slika 9. Analiza ekspresije varijanti alternativnog prekranja *BPM2.3* i *BPM2.15* u cvjetnim pupovima biljaka kontrolne skupine (21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C). Gornji fragment veličine 1221 pb predstavlja očekivanu varijantu *BPM2.3*, a fragment veličine 876 pb varijantu *BPM2.15*. Fragment veličine oko 1100 pb najvjerojatnije pripada novoj varijanti. Donji gel prikazuje produkte umnažanja gena *ACT3* pri čemu fragment od 650 pb odgovara produktu umnažanja na kalupu cDNA, a fragment od 733 pb produktu umnažanja na kalupu gDNA. pb – molekularni standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 5 °C, 21 °C, 37 °C, 44 °C – temperaturni tretmani; op – oporavak 11 h i 15 min nakon tretmana; NK – negativna kontrola. Još dvije biološke replike istog eksperimenta prikazane su u Prilogu IV c, d.

U svim uzorcima oplodjenih cvjetova bili su prisutni fragmenti veličine 1221 pb i 876 pb koji odgovaraju varijantama *BPM2.3* i *BPM2.15* (Slika 10, Prilog IV e, f). Varijanta *BPM2.3* je bila dominantna u cvjetovima, dok je varijanta *BPM2.15* bila manje zastupljena. Ekspresija varijante *BPM2.3* je detektirana na svim temperaturama, dok se ekspresija varijante *BPM2.15* smanjila na 44 °C ukazujući i u ovom tkivu, kao i u pupovima, na povezanost s toplinskim stresom. Na gelovima je bila prisutna prethodno spomenuta dodatna vrpca veličine oko 1100 pb koja potječe od umnažanja potencijalne nove varijante. Ona je bila prisutna na svim temperaturama (Slika 10, Prilog IV e, f).

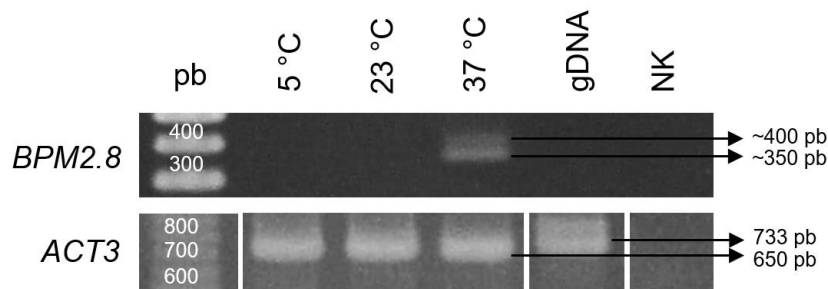


Slika 10. Analiza ekspresije varijanti alternativnog prekrajanja *BPM2.3* i *BPM2.15* u oplodjenim cvjetovima biljaka kontrolne skupine (21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C). Gornji fragment veličine 1221 pb predstavlja očekivanu varijantu *BPM2.3*, a fragment veličine 876 pb varijantu *BPM2.15*. Fragment veličine oko 1100 pb najvjerojatnije pripada novoj varijanti. Donji gel prikazuje produkte umnažanja gena *ACT3* pri čemu fragment od 650 pb odgovara produktu umnažanja na kalupu cDNA, a fragment od 733 pb produktu umnažanja na kalupu gDNA. pb – molekularni standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 5 °C, 21 °C, 37 °C, 44 °C – temperaturni tretmani; op – oporavak 11 h i 15 min nakon tretmana; NK – negativna kontrola. Još dvije biološke replike istog eksperimenta prikazane su u Prilogu IV e, f.

4.4.2. Analiza ekspresije varijante *BPM2.8*

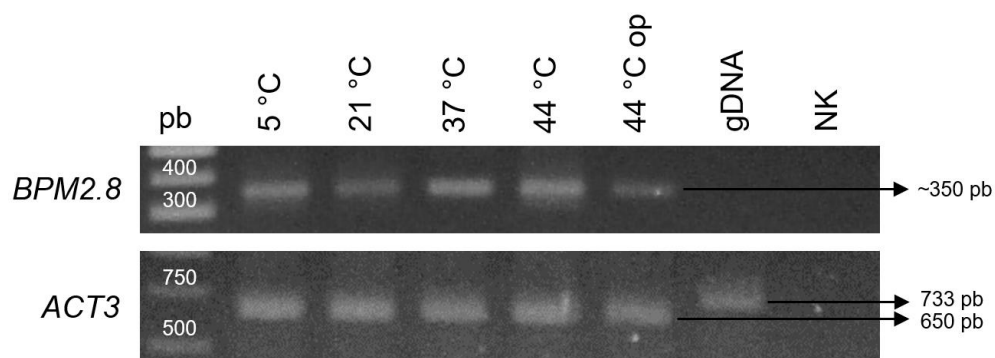
U svrhu analize ekspresije varijante alternativnog prekrajanja *BPM2.8* koristila sam početnice čijim se umnažanjem na kalupu cDNA očekuje fragment veličine 310 pb, dok se na kalupu gDNA ne očekuje nikakvo umnažanje (Slike 11, 12, 13, Prilog V).

U dvije od tri replike klijanaca bio je prisutan fragment veličine oko 350 pb samo na temperaturi od 37 °C (Slika 11, Prilog V a). Uz to je na gelovima detektirana još jedna vrlo bliska vrpca veličine oko 400 pb (Slika 11, Prilog V a, b). Postoji mogućnost da obje navedene vrpce (~350 pb i ~400 pb) potječu od umnažanja novih varijanti koje nisu zastupljene u bazama, niti TAIR10, a niti AtRTD3. Međutim, zbog slične veličine ovih dviju dobivenih vrpca ne može se sa sigurnošću reći jesu li to dvije odvojene vrpce koje potječu od dviju različitih varijanti ili samo artefakt elektroforeze (tzv. *ghost band*). U svakom slučaju, pojava oba dobivena fragmenta bila je povezana sa 37 °C. Dakle, neupitno je da je tretman povišenom temperaturom u klijanacima potaknuo ekspresiju novih varijanata, po sekvenci bliskih očekivanoj *BPM2.8* (Slika 11, Prilog V a).



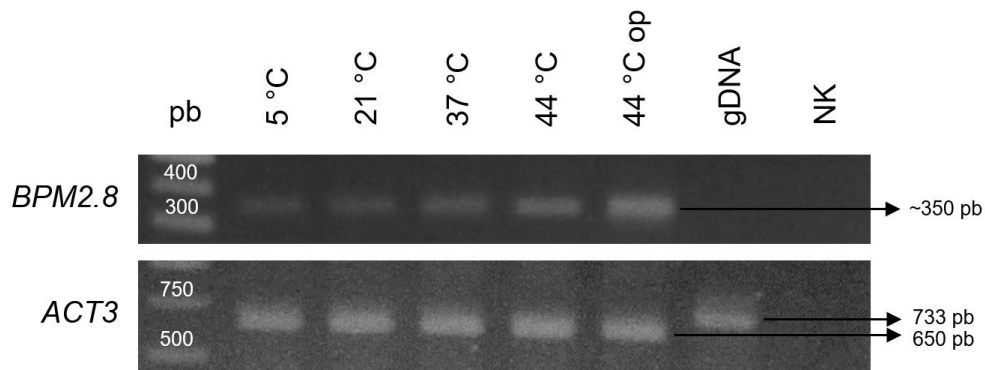
Slika 11. Analiza ekspresije varijante alternativnog prekrajanja *BPM2.8* u klijancima kontrolne skupine (23 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C). Fragmenti veličine oko 350 pb i 400 pb najvjerojatnije pripadaju novim varijantama. Donji gel prikazuje produkte umnažanja gena *ACT3* pri čemu fragment od 650 pb odgovara produktu umnažanja na kalupu cDNA, a fragment od 733 pb produktu umnažanja na kalupu gDNA. pb – molekularni standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 5 °C, 23 °C, 37 °C, 44 °C – temperaturni tretmani; op – oporavak 11 h i 15 min nakon tretmana; NK – negativna kontrola. Još dvije biološke replike istog eksperimenta prikazane su u Prilogu V a, b.

U uzorcima cvjetnih pupova također je bio prisutan fragment od 350 pb (Slika 12, Prilog V c, d), a ne očekivani fragment od 310 pb koji bi predstavljao varijantu *BPM2.8*. Navedeni fragment bio je detektiran na povišenim temperaturama u svim replikama, a na sniženoj temperaturi u dvije od tri replike (Slika 12, Prilog V d). S druge strane, na normalnoj temperaturi je bio prisutan u samo jednoj replici (Slika 12). Zanimljivo, vrpca prisutna u uzorku tretiranom temperaturom od 44 °C uzorkovanom nakon oporavka u jednoj replici bila je niža u odnosu na ostale vrpce koje su procijenjene na 350 pb te se vjerojatno radi o fragmentu od 310 pb koji ukazuje na prisutnost varijante *BPM2.8* (Prilog V d). Stoga postoji mogućnost da su i u tkivu cvjetnih pupova detektirane dvije vrlo slične varijante, potencijalna nova varijanta (~350 pb), čija je ekspresija povezana i sa hladnim i sa toplinskim stresom, te nešto manja detektirana samo u jednoj od tri replike (Slika 12, Prilog V c, d). Radi li se o fragmentu od 310 pb koji ukazuje na očekivanu varijantu *BPM2.8* trebalo bi potvrditi sekvenciranjem.



Slika 12. Analiza ekspresije varijante alternativnog prekrajanja *BPM2.8* u cvjetnim pupovima biljaka kontrolne skupine (21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C). Fragment veličine oko 350 pb najvjerojatnije pripada novoj varijanti. Donji gel prikazuje produkte umnažanja gena *ACT3* pri čemu fragment od 650 pb odgovara produktu umnažanja na kalupu cDNA, a fragment od 733 pb produktu umnažanja na kalupu gDNA. pb – molekularni standard GeneRuler 100 bp DNA Ladder za *BPM2.8*, GeneRuler 1 kb DNA Ladder za *ACT3*; 5 °C, 21 °C, 37 °C, 44 °C – temperaturni tretmani; op – oporavak 11 h i 15 min nakon tretmana; NK – negativna kontrola. Još dvije biološke replike istog eksperimenta prikazane su u Prilogu V c, d.

U svim uzorcima oplođenih cvjetova detektiran je fragment veličine oko 350 pb, prisutan na svim temperaturama. Temperaturni tretman nije utjecao na ekspresiju potencijalne nove varijante (~350 pb) (Slika 13, Prilog V e, f).

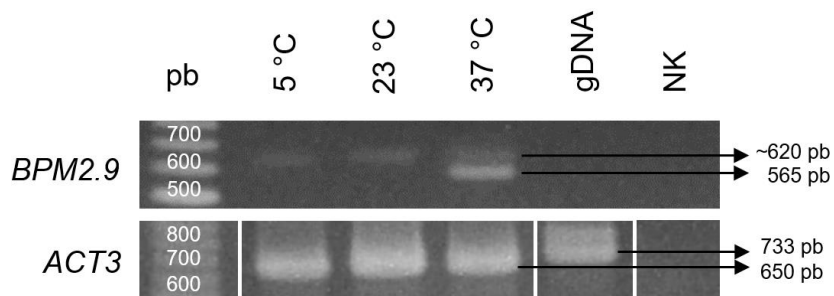


Slika 13. Analiza ekspresije varijante alternativnog prekrajanja *BPM2.8* u oplođenim cvjetovima biljaka kontrolne skupine (21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C). Fragment veličine oko 350 pb najvjerojatnije pripada novoj varijanti. Donji gel prikazuje produkte umnažanja gena *ACT3* pri čemu fragment od 650 pb odgovara produktu umnažanja na kalupu cDNA, a fragment od 733 pb produktu umnažanja na kalupu gDNA. pb – molekularni standard GeneRuler 100 bp DNA Ladder za *BPM2.8*, GeneRuler 1 kb DNA Ladder za *ACT3*; 5 °C, 21 °C, 37 °C, 44 °C – temperaturni tretmani; op – oporavak 11 h i 15 min nakon tretmana; NK – negativna kontrola. Još dvije biološke replike istog eksperimenta prikazane su u Prilogu V e, f.

4.4.3. Analiza ekspresije varijante *BPM2.9*

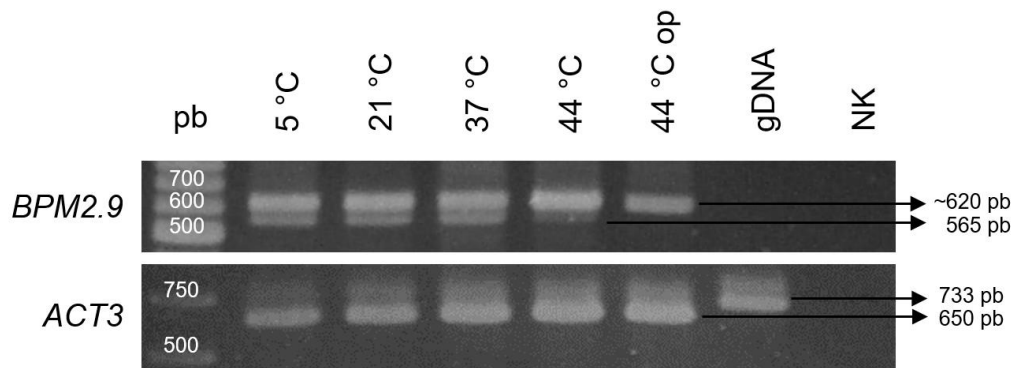
U svrhu analize ekspresije varijante alternativnog prekrajanja *BPM2.8* koristila sam početnice čijim se umnažanjem na kalupu cDNA očekuje fragment veličine 565 pb, dok se na kalupu gDNA ne očekuje nikakvo umnažanje (Slike 14, 15, 16, Prilog VI).

U svim uzorcima klijanaca na 37 °C bio je prisutan fragment veličine 565 pb koji odgovara varijanti *BPM2.9* što ukazuje da je ekspresija ove varijante u klijancima potaknuta toplinskim stresom. Uz fragment veličine 565 pb koji odgovara varijanti *BPM2.9*, u klijancima je detektiran fragment veličine oko 620 pb koji potječe od umnažanja potencijalne nove varijante koja nije zastupljena u bazama, niti TAIR10, a niti AtRTD3 (Slika 14, Prilog VI a, b). Ova je vrpca (~620 pb) u dvije od tri replike bila prisutna na svim temperaturama (Slika 14, Prilog VI b), dok je u jednoj replici detektirana samo na povišenoj temperaturi (Prilog VI c). U replikama u kojima je veći fragment (~620 pb) detektiran na svim temperaturama, razina njegove ekspresija bila je manja od razine ekspresije varijante *BPM2.9* (Slika 14, Prilog VI b).



Slika 14. Analiza ekspresije varijante alternativnog prekrajanja *BPM2.9* u klijancima kontrolne skupine (23 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C). Donji fragment veličine 565 pb predstavlja očekivanu varijantu *BPM2.9*. Fragment veličine oko 620 pb najvjerojatnije pripada novoj varijanti. Donji gel prikazuje produkte umnažanja gena *ACT3* pri čemu fragment od 650 pb odgovara produktu umnažanja na kalupu cDNA, a fragment od 733 pb produktu umnažanja na kalupu gDNA. pb – molekularni standard GeneRuler 100 bp DNA Ladder; 5 °C, 23 °C, 37 °C – temperaturni tretmani; NK – negativna kontrola. Još dvije biološke replike istog eksperimenta prikazane su u Prilogu VI a, b.

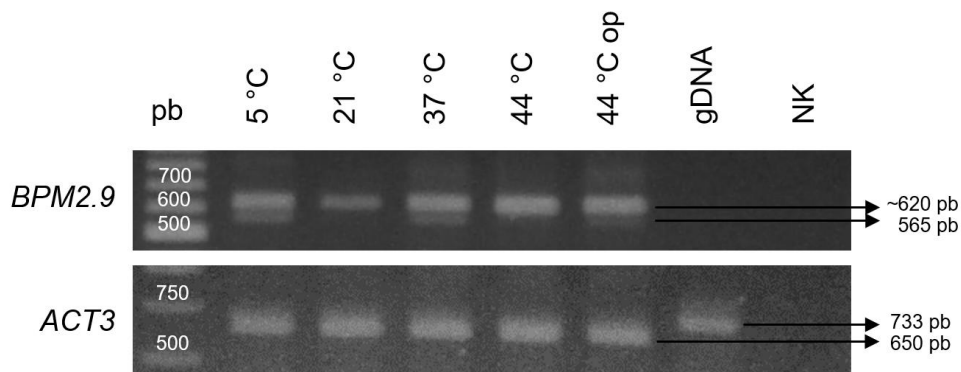
U svim uzorcima cvjetnih pupova bio je prisutan fragment veličine 565 pb koji potječe od umnažanja varijante *BPM2.9* (Slika 15, Prilog VI c, d). Ova varijanta je detektirana pri svim temperaturnim tretmanima (Slika 15, Prilog VI d). Na svim temperaturama bio je prisutan i dodatni fragment veličine oko 620 pb s jačim signalom u odnosu na varijantu *BPM2.9* (Slika 15, Prilog VI d).



Slika 15. Analiza ekspresije varijante alternativnog prekrajanja *BPM2.9* u cvjetnim pupovima biljaka kontrolne skupine (21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C). Donji fragment veličine 565 pb predstavlja očekivanu varijantu *BPM2.9*. Fragment veličine oko 620 pb najvjerojatnije pripada novoj varijanti. Donji gel prikazuje produkte umnažanja gena *ACT3* pri čemu fragment od 650 pb odgovara produktu umnažanja na kalupu cDNA, a fragment od 733 pb produktu umnažanja na kalupu gDNA. pb – molekularni standard GeneRuler 100 bp DNA Ladder; 5 °C, 21 °C, 37 °C, 44 °C – temperaturni tretmani; NK – negativna kontrola. Još dvije biološke replike istog eksperimenta prikazane su u Prilogu VI c, d.

U uzorcima oplodjenih cvjetova detektirana je varijanta *BPM2.9* fragmentom na gelu veličine 565 pb (Slika 16, Prilog VI e, f). Ekspresijski obrazac povezan s temperaturnim tretmanom nije bio jednoznačan. Varijanta *BPM2.9* je na 37 °C bila prisutna u svim replikama (Slika 16, Prilog VI e, f). Na 5 °C (Slika 16, Prilog VI f), 21 °C (Prilog VI e, f) i 44 °C nakon oporavka (Slika 16, Prilog VI f) bila je prisutna u dvije od tri replike, a na 44 °C nije detektirana. Uz varijantu *BPM2.9*, u svim uzorcima cvjetova pri svim

temperaturama bio je dominantno prisutan dodatni fragment veličine oko 620 pb. Ekspresija nove varijante (~620 pb) u cvjetovima bila je konstitutivna, dok bi se ekspresija očekivane varijante *BPM2.9* mogla povezati s temperaturnom regulacijom, ali nije primijećen jednoznačan obrazac ekspresije (Slika 16, Prilog VI e, f).



Slika 16. Analiza ekspresije varijante alternativnog prekrajanja *BPM2.9* u oplodjenim cvjetovima biljaka kontrolne skupine (21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C). Donji fragment veličine 565 pb predstavlja očekivanu varijantu *BPM2.9*. Fragment veličine oko 620 pb najvjerojatnije pripada novoj varijanti. Donji gel prikazuje produkte umnažanja gena *ACT3* pri čemu fragment od 650 pb odgovara produktu umnažanja na kalupu cDNA, a fragment od 733 pb produktu umnažanja na kalupu gDNA. pb – molekularni standard GeneRuler 100 bp DNA Ladder za *BPM2.9*, GeneRuler 1 kb DNA Ladder za *ACT3*; 5 °C, 21 °C, 37 °C, 44 °C – temperaturni tretmani; op – oporavak 11 h i 15 min nakon tretmana; NK – negativna kontrola. Još dvije biološke replike istog eksperimenta prikazane su u Prilogu VI e, f.

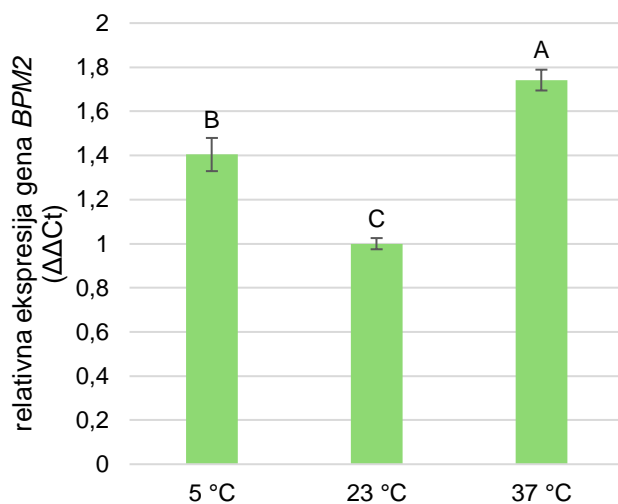
4.5. Analiza relativne ekspresije varijanti alternativnog prekrajanja gena *BPM2* metodom qRT-PCR

Kako bih utvrdila povezanost varijanti alternativnog prekrajanja gena *BPM2* s temperaturnim stresom kvantificirala sam ekspresiju pojedinih varijanti u klijancima te cvjetnim pupovima i oplodjenim cvjetovima biljaka kontrolne skupine (21 °C, odnosno 23 °C) i onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C). Dodatno, ekspresiju u pupovima i cvjetovima biljaka izloženih temperaturi od 44 °C analizirala sam i nakon oporavka (44 °C op). Relativnu ekspresiju varijanti alternativnog prekrajanja analizirala sam metodom qRT-PCR. Reakcije umnažanja sam provela na uzorcima cDNA dobivenim reverznom transkripcijom. Relativnu ekspresiju gena izrazila sam preko vrijednosti $\Delta\Delta Ct$.

4.5.1. Kvantifikacija ukupne ekspresije gena *BPM2*

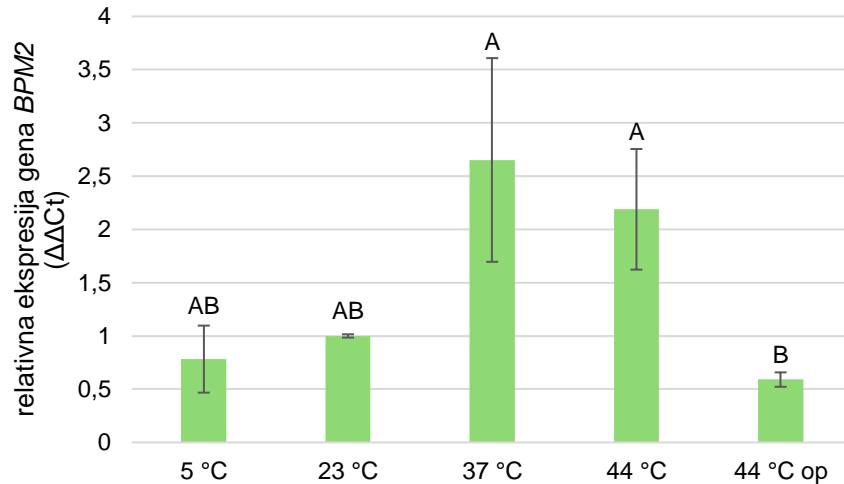
U svrhu kvantifikacije ukupne ekspresije gena *BPM2* koristila sam početnice koje umnažaju sve poznate varijante gena. Umnažanjem ovim početnicama očekuje se fragment od 101 pb (Slike 17, 18, 19).

Razina ukupne ekspresije gena *BPM2* u klijancima izloženim oba tipa temperaturnog stresa bila je značajno veća od razine ekspresije u klijancima kontrolne skupine (Slika 17). Pri tome je razina ekspresije u klijancima izloženim toplinskom stresu bila značajno veća od razine ekspresije u klijancima izloženim hladnom stresu.



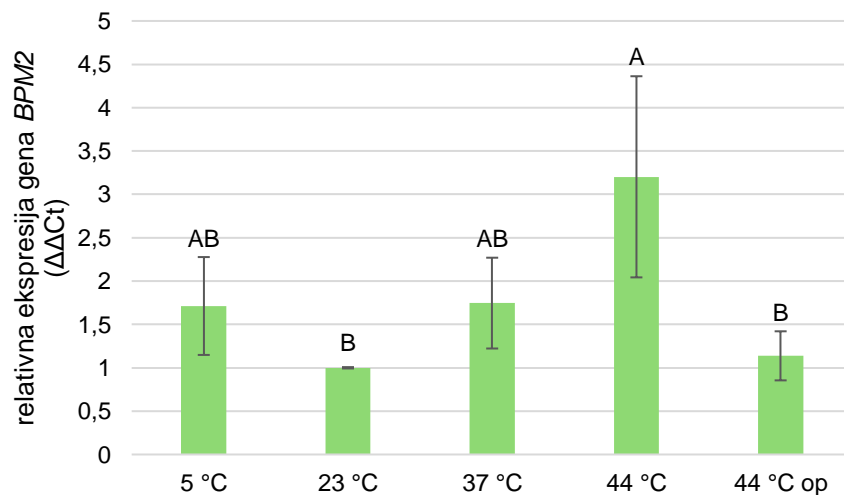
Slika 17. Relativna ekspresija gena *BPM2* u klijancima kontrolne skupine (23 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C), izražena kao vrijednost $\Delta\Delta Ct$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije biološke replike \pm standardna pogreška. Usporedba relativnih ekspresija kontrolne skupine i skupina izloženih temperaturnim tretmanima provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD. Značajne razlike ($p \leq 0,05$) obilježene su različitim slovima.

U cvjetnim pupovima razina ukupne ekspresije gena *BPM2* nije bila značajno promijenjena između kontrolnih biljaka i onih izloženih temperaturnim tretmanima (Slika 18). Ipak, u pupovima biljaka izloženih povišenim temperaturama primijećen je trend porasta ekspresije u odnosu na kontrolne biljke. Razina ekspresije u pupovima biljaka izloženih temperaturi od 44 °C bila je značajno manja nakon oporavka u odnosu na razinu odmah nakon tretmana.



Slika 18. Relativna ekspresija gena *BPM2* u cvjetnim pupovima biljaka kontrolne skupine (21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C) uzorkovanih odmah nakon tretmana ili nakon 11 h i 15 min oporavka (op), izražena kao vrijednost $\Delta\Delta Ct$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije biološke replike \pm standardna pogreška. Usporedba relativnih ekspresija kontrolne skupine i skupina izloženih temperaturnim tretmanima provedena je testom Kruskal-Wallis i Dunnovim *post hoc* testom. Značajne razlike ($p \leq 0,05$) obilježene su različitim slovima.

U oplodjenim cvjetovima primijećen je trend porasta ukupne ekspresije gena *BPM2* pri temperaturnom stresu u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 19). Međutim, porast je bio statistički značajan samo u cvjetovima biljaka izloženih temperaturi od 44 °C. U cvjetovima ovih biljaka razina ekspresije gena *BPM2* nakon oporavka pala je na razinu kontrolnog tkiva.

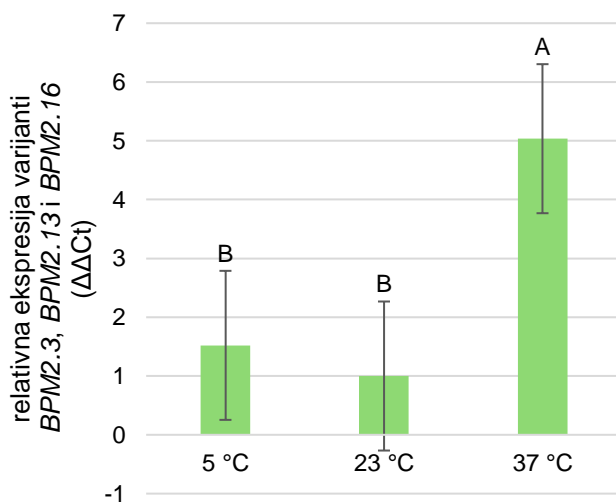


Slika 19. Relativna ekspresija gena *BPM2* u oplodjenim cvjetovima biljaka kontrolne skupine (21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C) uzorkovanih odmah nakon tretmana ili nakon 11 h i 15 min oporavka (op), izražena kao vrijednost $\Delta\Delta Ct$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije biološke replike \pm standardna pogreška. Usporedba relativnih ekspresija kontrolne skupine i skupina izloženih temperaturnim tretmanima provedena je testom Kruskal-Wallis i Dunnovim *post hoc* testom. Značajne razlike ($p \leq 0,05$) obilježene su različitim slovima.

4.5.2. Kvantifikacija ekspresije grupe varijanti *BPM2.3*, *BPM2.13* i *BPM2.16*

Korištenjem početnica dizajniranih za umnažanje varijante *BPM2.3* prema bazi TAIR10 analizirala sam relativnu ekspresiju varijanti *BPM2.3*, *BPM2.13* i *BPM2.16* opisanih nakon analize baze AtRTD3 (Keresteš, 2024). Varijanta *BPM2.3* iz baze TAIR10 ekvivalentna je varijanti *BPM2.13* iz baze AtRTD3. Varijante *BPM2.3*, *BPM2.13* i *BPM2.16* translacijom daju tri različita proteina. Dakle, uz primarno ciljanu varijantu umnožila sam još dvije dodatne varijante. Umnažanjem ovim početnicama očekuje se fragment veličine 104 pb (Slika 20).

U klijancima izloženim niskim temperaturama nije primijećena značajna promjena razine ekspresije varijanti *BPM2.3*, *BPM2.13* i *BPM2.16* u odnosu na klijance kontrolne skupine (Slika 20). S druge strane, u klijancima izloženim povišenoj temperaturi razina ekspresije ovih varijanti bila je značajno veća nego u kontrolnim klijancima i onim izloženim hladnom tretmanu.



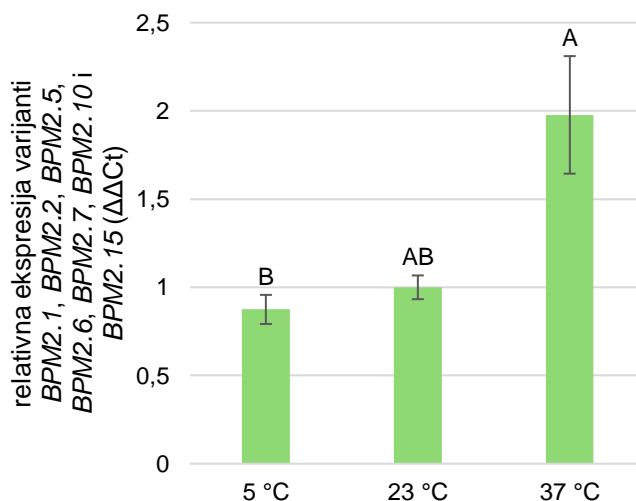
Slika 20. Relativna ekspresija varijanti alternativnog prekranja *BPM2.3*, *BPM2.13* i *BPM2.16* u klijancima kontrolne skupine (23 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C), izražena kao vrijednost $\Delta\Delta Ct$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri biološke replike \pm standardna pogreška. Usporedba relativnih ekspresija kontrolne skupine i skupina izloženih temperaturnim tretmanima provedena je testom Kruskal-Wallis i Dunnovim *post hoc* testom. Značajne razlike ($p \leq 0,05$) obilježene su različitim slovima.

4.5.3. Kvantifikacija ekspresije grupe varijanti *BPM2.1*, *BPM2.2*, *BPM2.5*, *BPM2.6*, *BPM2.7*, *BPM2.10* i *BPM2.15*

Korištenjem početnica dizajniranih za umnažanje varijante *BPM2.4* prema bazi TAIR10 analizirala sam relativnu ekspresiju grupe varijanti *BPM2.1*, *BPM2.2*, *BPM2.5*, *BPM2.6*, *BPM2.7*, *BPM2.10* i *BPM2.15* opisanih u Keresteš (2024). Varijanta *BPM2.4* iz baze TAIR10 ekvivalentna je varijanti *BPM2.5* ili *BPM2.10* iz baze AtRTD3. Uz to, varijanta *BPM2.7* vrlo je slična ovim dvjema varijantama i sve tri translacijom daju isti protein. Varijante *BPM2.1* i *BPM2.6* translacijom daju isti protein, a varijante *BPM2.2*

i *BPM2.15* kodiraju svaka zaseban protein. Dakle, uz primarno ciljanu varijantu umnožila sam još četiri dodatne varijante. Umnažanjem ovim početnicama dobiva se fragment veličine 102 pb (Slika 21).

U klijancima izloženim hladnom stresu nije bilo značajne promjene razine ekspresije grupe varijanti *BPM2.1*, *BPM2.2*, *BPM2.5*, *BPM2.6*, *BPM2.7*, *BPM2.10* i *BPM2.15* u odnosu na kontrolne klijance (Slika 21). Pri povišenoj temperaturi uočen je trend porasta razine ekspresije ovih varijanti, ali ta razlika nije bila statistički značajna.

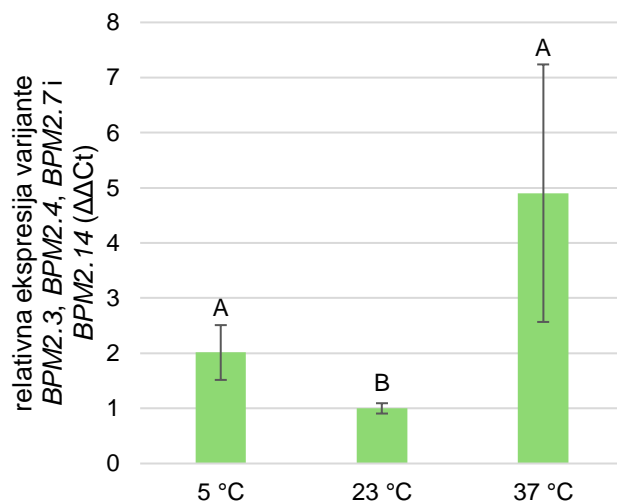


Slika 21. Relativna ekspresija grupe varijanti alternativnog prekranjanja *BPM2.1*, *BPM2.2*, *BPM2.5*, *BPM2.6*, *BPM2.7*, *BPM2.10* i *BPM2.15* u klijancima kontrolne skupine (23 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C), izražena kao vrijednost $\Delta\Delta C_t$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri biološke replike \pm standardna pogreška. Usporedba relativnih ekspresija kontrolne skupine i skupina izloženih temperaturnim tretmanima provedena je testom Kruskal-Wallis i Dunnovim *post hoc* testom. Značajne razlike ($p \leq 0,05$) obilježene su različitim slovima.

4.5.4. Kvantifikacija ekspresije grupe varijanti *BPM2.3*, *BPM2.4*, *BPM2.7* i *BPM2.14*

Korištenjem početnica dizajniranih za umnažanje varijante *BPM2.5* prema bazi TAIR10 analizirala sam relativnu ekspresiju grupe varijanti *BPM2.3*, *BPM2.4*, *BPM2.7* i *BPM2.14* opisanih u Keresteš (2024). Varijanta *BPM2.5* iz baze TAIR10 ekvivalentna je varijanti *BPM2.4* ili *BPM2.14* iz baze AtRTD3. Varijante *BPM2.2* i *BPM2.15* kodiraju svaka zaseban protein. Dakle, uz ciljanu varijantu umnožila sam još dvije dodatne varijante. Umnažanjem ovim početnicama očekuje se fragment veličine 114 pb (Slika 22).

Razina ekspresije grupe varijanti *BPM2.3*, *BPM2.4*, *BPM2.7* i *BPM2.14* bila je značajno veća u klijancima izloženim hladnom i toplinskom stresu nego u kontrolnim klijancima (Slika 22). Primijećen je trend porasta razine ovih varijanti pri povišenoj temperaturi u odnosu na nisku temperaturu, ali on nije bio statistički značajan.

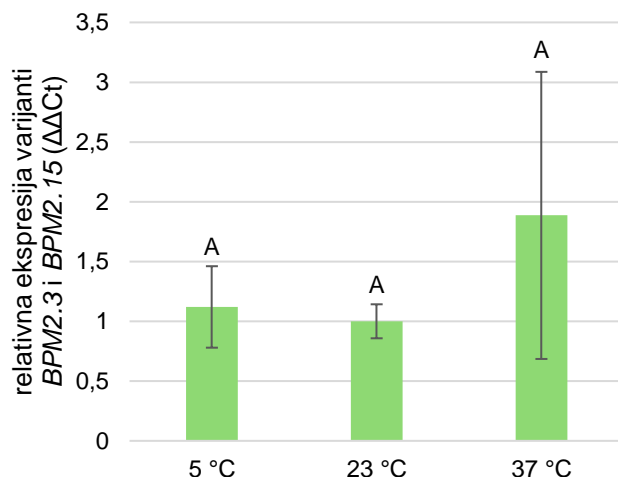


Slika 22. Relativna ekspresija grupe varijanti alternativnog prekrivanja *BPM2.3*, *BPM2.4*, *BPM2.7* i *BPM2.14* u klijancima kontrolne skupine (23 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C), izražena kao vrijednost $\Delta\Delta Ct$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri biološke replike \pm standardna pogreška. Usporedba relativnih ekspresija kontrolne skupine i skupina izloženih temperaturnim tretmanima provedena je testom Kruskal-Wallis i Dunnovim *post hoc* testom. Značajne razlike ($p \leq 0,05$) obilježene su različitim slovima.

4.5.5. Kvantifikacija ekspresije varijanti *BPM2.3* i *BPM2.15*

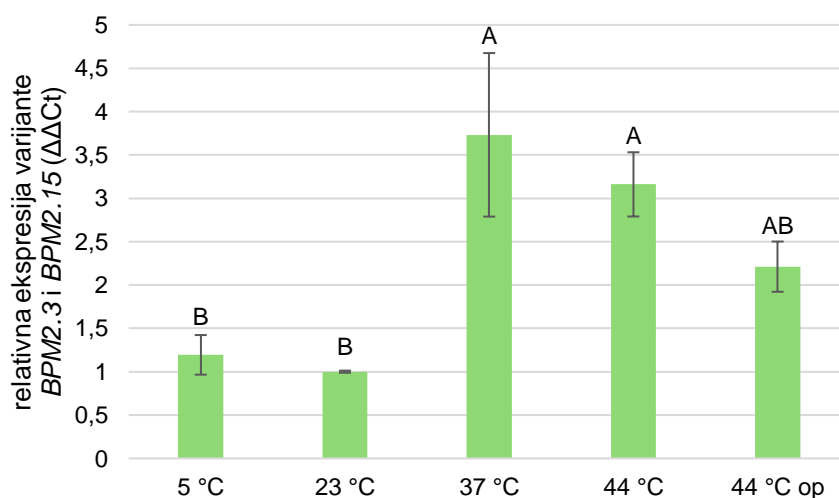
Korištenjem početnica dizajniranih za umnažanje varijante *BPM2.6* prema Pali (2020) analizirala sam relativnu ekspresiju varijanti *BPM2.3* i *BPM2.15* iz baze AtRTD3, budući da se radi o varijantama koje kodiraju istu proteinsku sekvencu (Keresteš, 2024). Ovim početnicama umnaža se fragment veličine 107 pb (Slike 23, 24, 25).

U klijancima izloženim toplinskom stresu bio je vidljiv trend porasta razine ekspresije varijanti *BPM2.3* i *BPM2.15* u odnosu na kontrolne klijance (Slika 23), no statistički testovi nisu pokazali značajnost.



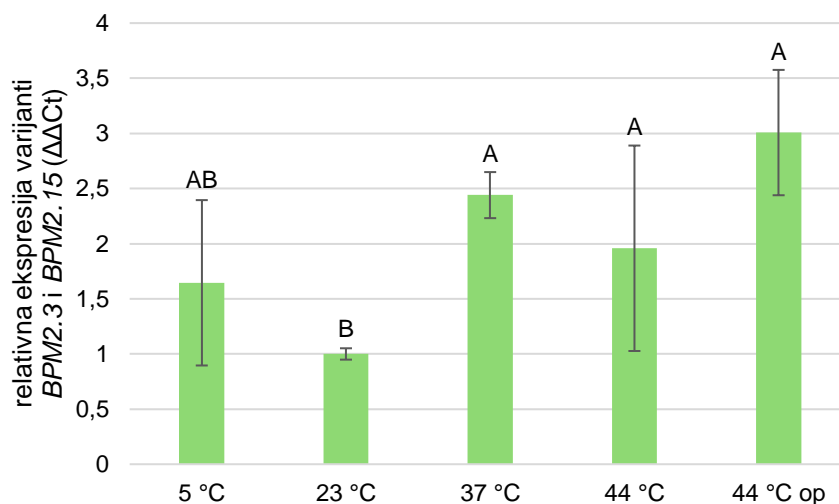
Slika 23. Relativna ekspresija varijanti alternativnog prekraranja *BPM2.3* i *BPM2.15* u klijancima kontrolne skupine (23 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C), izražena kao vrijednost $\Delta\Delta Ct$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri biološke replike \pm standardna pogreška. Usporedba relativnih ekspresija kontrolne skupine i skupina izloženih temperaturnim tretmanima provedena je testom Kruskal-Wallis i Dunnovim *post hoc* testom. Statističkom analizom nisu dobivene značajne razlike ($p \leq 0,05$).

U cvjetnim pupovima biljaka izloženih hladnom stresu nije bila uočena promjena razine ekspresije varijanti *BPM2.3* i *BPM2.15* u odnosu na kontrolno tkivo (Slika 24). S druge strane, primijećen je značajan porast razine ekspresije ovih varijanti u pupovima biljaka izloženih toplinskim tretmanima u odnosu na kontrolno tkivo. Oporavak nakon tretmana temperaturom od 44 °C doveo je do pada razine ekspresije ovih varijanti, međutim razina ekspresije ostala je povišena u odnosu na kontrolno tkivo.



Slika 24. Relativna ekspresija varijanti alternativnog prekraranja *BPM2.3* i *BPM2.15* u cvjetnim pupovima biljaka kontrolne skupine (21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C) uzorkovanih odmah nakon tretmana ili nakon 11 h i 15 min oporavka (op), izražena kao vrijednost $\Delta\Delta Ct$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije biološke replike \pm standardna pogreška. Usporedba relativnih ekspresija kontrolne skupine i skupina izloženih temperaturnim tretmanima provedena je testom Kruskal-Wallis i Dunnovim *post hoc* testom. Značajne razlike ($p \leq 0,05$) obilježene su različitim slovima.

U oplođenim cvjetovima biljaka izloženih hladnom tretmanu primijećen je trend porasta razine ekspresije varijanti *BPM2.3* i *BPM2.15* u odnosu na kontrolno tkivo, ali on nije bio statistički značajan (Slika 25). S druge strane, cvjetovi biljaka izloženih povišenim temperaturama imali su značajno višu razinu ekspresije ovih varijanti od kontrolnog tkiva. Razina ekspresije ovih varijanti ostala je povišena čak i nakon oporavka.



Slika 25. Relativna ekspresija varijanti alternativnog prekraranja *BPM2.3* i *BPM2.15* u oplođenim cvjetovima biljaka kontrolne skupine (21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C) uzorkovanih odmah nakon tretmana ili nakon 11 h i 15 min oporavka (op), izražena kao vrijednost $\Delta\Delta Ct$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije biološke replike \pm standardna pogreška. Usporedba relativnih ekspresija kontrolne skupine i skupina izloženih temperaturnim tretmanima provedena je testom Kruskal-Wallis i Dunnovim *post hoc* testom. Značajne razlike ($p \leq 0,05$) obilježene su različitim slovima.

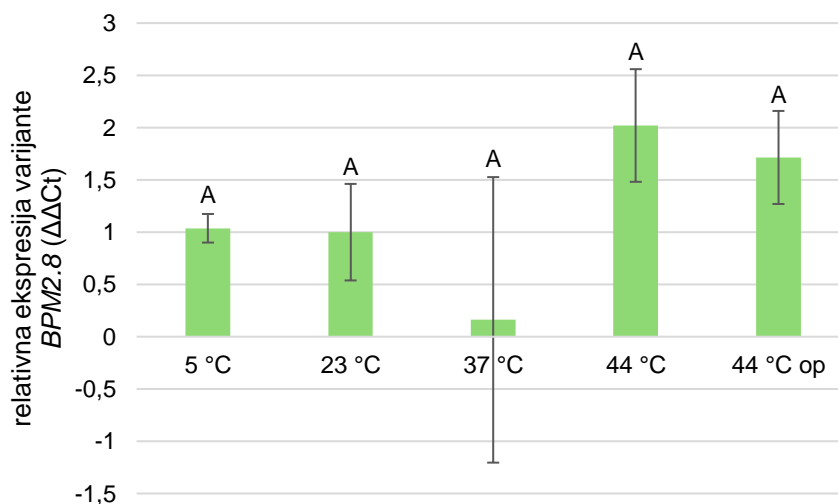
4.5.6. Kvantifikacija ekspresije varijante *BPM2.8*

Za kvantifikaciju ekspresije varijante alternativnog prekraranja *BPM2.8* koristila sam iste početnice koje sam koristila za standardnu reakciju PCR. Umnažanjem ovim početnicama na kalupu cDNA očekuje se fragment veličine 310 pb (Slika 26), koji nije bio detektiran u reakcijama standardnog PCR-a, te je oko tri puta duži u odnosu na ostale ciljane fragmente za reakcije qRT-PCR u ovom radu.

U klijancima svih skupina nije detektirano umnažanje varijante *BPM2.8* ili je ono bilo vrlo slabo. Vrijednosti Ct za uzorke u kojima je detektirano umnažanje kretale su se oko 32. ciklusa (ne uzimajući u obzir 8 ciklusa u koraku Pre-Cyclinga). Razina ekspresije varijante *BPM2.8* u klijancima bila je vrlo niska i zbog toga nije bilo moguće kvantificirati rezultate.

U cvjetnim pupovima svih skupina dobiveni su rezultati slični onima za klijance. Umnažanje varijante *BPM2.8* nije detektirano ili je bilo vrlo slabo. Vrijednosti Ct za uzorke u kojima je detektirano umnažanje kretale su se oko 29. ciklusa (ne uzimajući u obzir 8 ciklusa u koraku Pre-Cyclinga). I ovdje je razina ekspresije varijante *BPM2.8* bila vrlo niska i zbog toga nije bilo moguće kvantificirati rezultate.

Prilikom umnažanja varijante *BPM2.8* u oplodjenim cvjetovima dobivene vrijednosti Ct kretale su se oko 27. ciklusa (ne uzimajući u obzir 8 ciklusa u koraku Pre-Cyclinga). Uočen je trend porasta razine ekspresije ove varijante pri tretmanu temperaturom od 44 °C, međutim, zbog niske ekspresije i velikih odstupanja između bioloških replika ove razlike nisu bile statistički značajne (Slika 26).

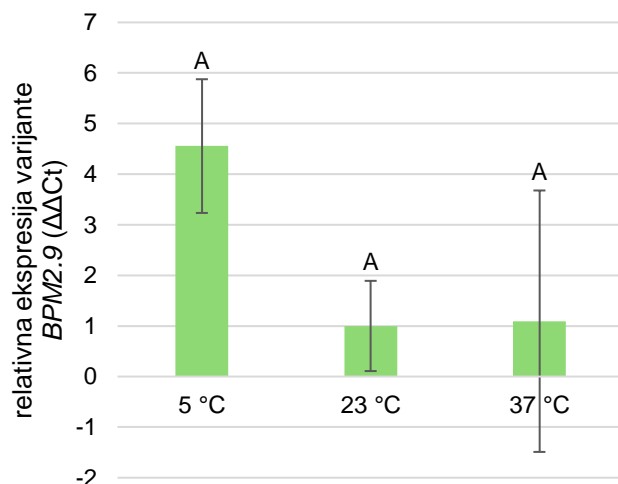


Slika 26. Relativna ekspresija varijante alternativnog prekrajanja *BPM2.8* u oplodjenim cvjetovima biljaka kontrolne skupine (21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C) uzorkovanih odmah nakon tretmana ili nakon 11 h i 15 min oporavka (op), izražena kao vrijednost $\Delta\Delta Ct$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije biološke replike \pm standardna pogreška. Usporedba relativnih ekspresija kontrolne skupine i skupina izloženih temperaturnim tretmanima provedena je testom Kruskal-Wallis i Dunnovim *post hoc* testom. Statističkom analizom nisu dobivene značajne razlike ($p \leq 0,05$).

4.5.7. Kvantifikacija ekspresije varijante *BPM2.9*

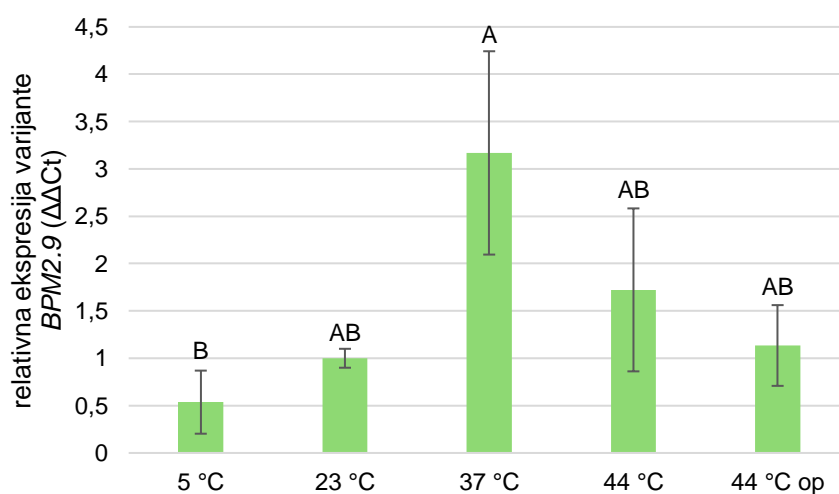
U svrhu kvantifikacije ekspresije varijante alternativnog prekrajanja *BPM2.9* koristila sam početnice čijim se korištenjem umnaža fragment od 115 pb (Slike 27, 28, 29).

Vrijednosti Ct umnažanja varijante *BPM2.9* u klijancima kretale su se oko 30. ciklusa (ne uzimajući u obzir 8 ciklusa u koraku Pre-Cyclinga) što ukazuje na nisku razinu ekspresije. Primijećen je trend porasta razine ekspresije u klijancima izloženim hladnom stresu, ali on nije bio statistički značajan (Slika 27).



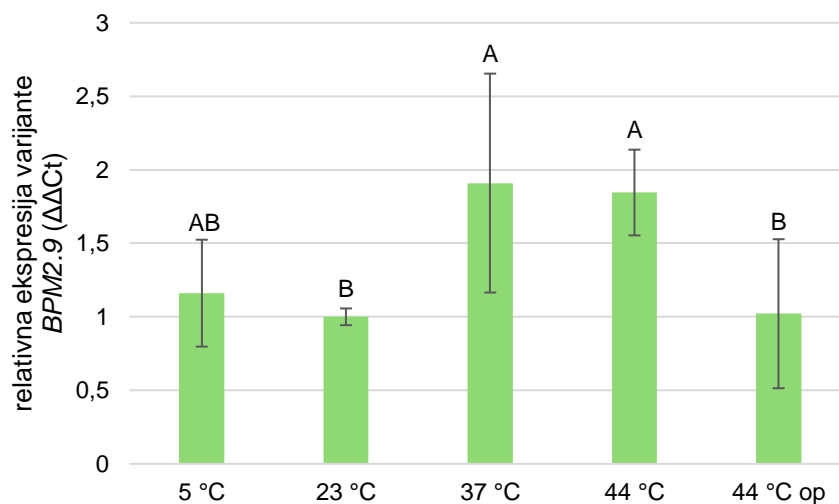
Slika 27. Relativna ekspresija varijante alternativnog prekraranja *BPM2.9* u klijancima kontrolne skupine (23 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C), izražena kao vrijednost $\Delta\Delta Ct$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije biološke replike \pm standardna pogreška. Usporedba relativnih ekspresija kontrolne skupine i skupina izloženih temperaturnim tretmanima provedena je testom Kruskal-Wallis i Dunnovim *post hoc* testom. Statističkom analizom nisu dobivene značajne razlike ($p \leq 0,05$).

Razina ekspresije varijante *BPM2.9* u cvjetnim pupovima također je bila niska, a vrijednosti Ct kretale su se oko 23. ciklusa (ne uzimajući u obzir 8 ciklusa u koraku Pre-Cyclinga). U pupovima izloženim niskoj temperaturi nije uočena promjena razine ekspresije varijante *BPM2.9* u odnosu na kontrolno tkivo (Slika 28). U pupovima izloženim povišenim temperaturama primijećen je trend porasta razine ekspresije ove varijante u odnosu na kontrolno tkivo, ali on nije bio statistički značajan.



Slika 28. Relativna ekspresija varijante alternativnog prekraranja *BPM2.9* u cvjetnim pupovima biljaka kontrolne skupine (21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C) uzorkovanih odmah nakon tretmana ili nakon 11 h i 15 min oporavka (op), izražena kao vrijednost $\Delta\Delta Ct$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije biološke replike \pm standardna pogreška. Usporedba relativnih ekspresija kontrolne skupine i skupina izloženih temperaturnim tretmanima provedena je testom Kruskal-Wallis i Dunnovim *post hoc* testom. Značajne razlike ($p \leq 0,05$) obilježene su različitim slovima.

U oplodjenim cvjetovima biljaka izloženih hladnom stresu nije uočena promjena razine ekspresije varijante *BPM2.9* u odnosu na kontrolno tkivo (Slika 29). S druge strane, razina ekspresije ove varijante u cvjetovima biljaka izloženim povišenim temperaturama bila je značajno veća nego u kontrolnom tkivu. Razina ekspresije varijante *BPM2.9* u cvjetovima biljaka izloženim temperaturi od 44 °C bila je značajno manja nakon oporavka te se vratila na razinu kontrolnog tkiva.



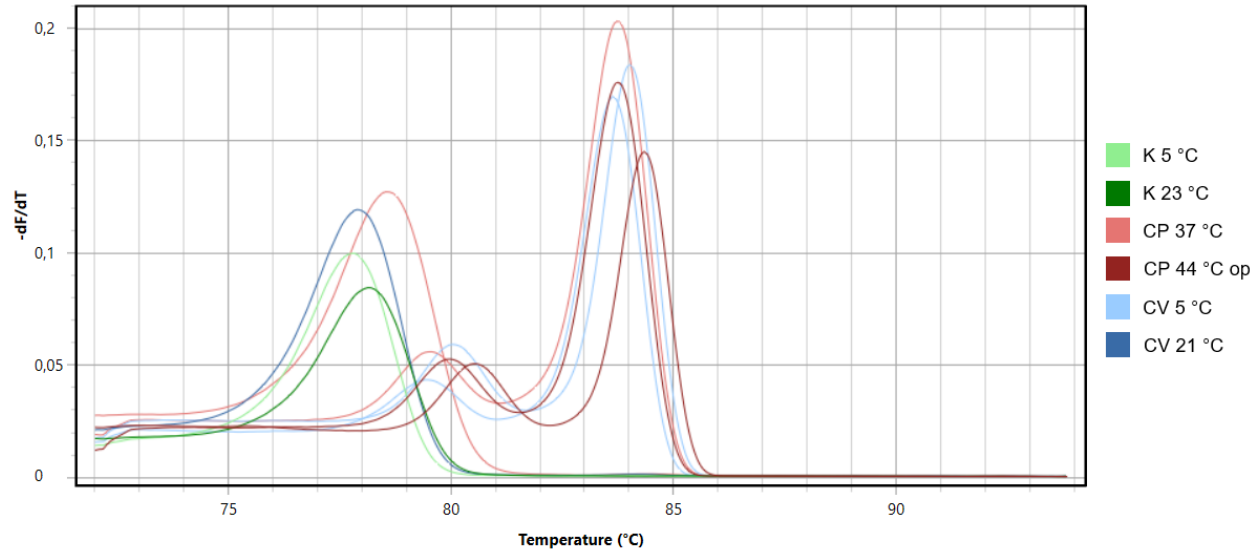
Slika 29. Relativna ekspresija varijante alternativnog prekrajanja *BPM2.9* u oplodjenim cvjetovima biljaka kontrolne skupine (21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C) uzorkovanih odmah nakon tretmana ili nakon 11 h i 15 min oporavka (op), izražena kao vrijednost $\Delta\Delta Ct$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije biološke replike \pm standardna pogreška. Usporedba relativnih ekspresija kontrolne skupine i skupina izloženih temperaturnim tretmanima provedena je testom Kruskal-Wallis i Dunnovim *post hoc* testom. Značajne razlike ($p \leq 0,05$) obilježene su različitim slovima.

4.6. Analiza produkata reakcije qRT-PCR

Produkte dobivene umnažanjem u reakciji qRT-PCR analizirala sam na temelju krivulje taljenja i agaroznom gel elektroforezom. Krivulja taljenja dobivena je povećavanjem temperature s 72 °C na 95 °C na kraju svake reakcije qRT-PCR.

4.6.1. Analiza krivulje taljenja produkta reakcije qRT-PCR za varijantu *BPM2.8*

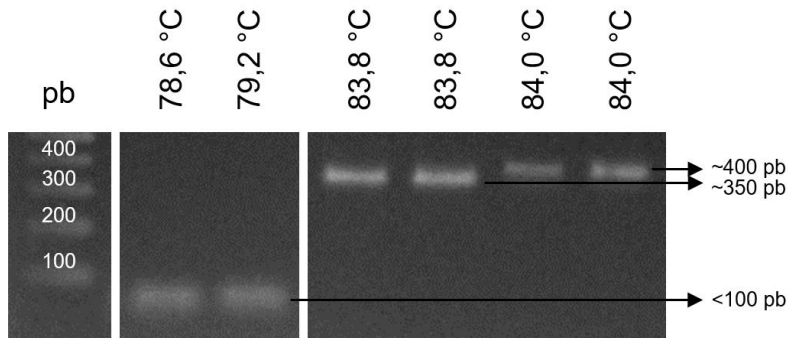
Produkte dobivene umnažanjem u reakciji qRT-PCR korištenjem početnica *BPM2.8* analizirala sam na temelju krivulje taljenja (Slika 30). Na krivulji taljenja razlikovala su se dva tipa krivulje. Prvi tip krivulje imao je samo jedan maksimum (engl. *peak*) na temperaturi između 78 i 79 °C. Drugi tip krivulje imao je dva maksimuma, od kojih je prvi bio značajno niži i imao maksimum na temperaturi između 79,5 i 80,5 °C, dok se maksimum drugog nalazio na temperaturi između 83,5 i 84,5 °C. Krivulja čiji se maksimum nalazi oko 78/79 °C vjerojatno potječe od međusobnog sparivanja početnica (engl. *primer dimer*). Međutim, postojanje dvaju maksimuma na drugoj krivulji ukazuje na moguće postojanje dviju varijanti koje su umnožene ovim parom početnica.



Slika 30. Krivulja taljenja produkata reakcije qRT-PCR za reprezentativne uzorke klijanaca (K), cvjetnih pupova (CP) i oplođenih cvjetova (CV) umnožene početnicama *BPM2.8*. 5 °C, 21 °C, 23 °C, 37 °C, 44 °C – temperaturni tretmani; op – oporavak 11 h i 15 min nakon tretmana

4.6.2. Gel elektroforeza produkta reakcije qRT-PCR za varijantu *BPM2.8*

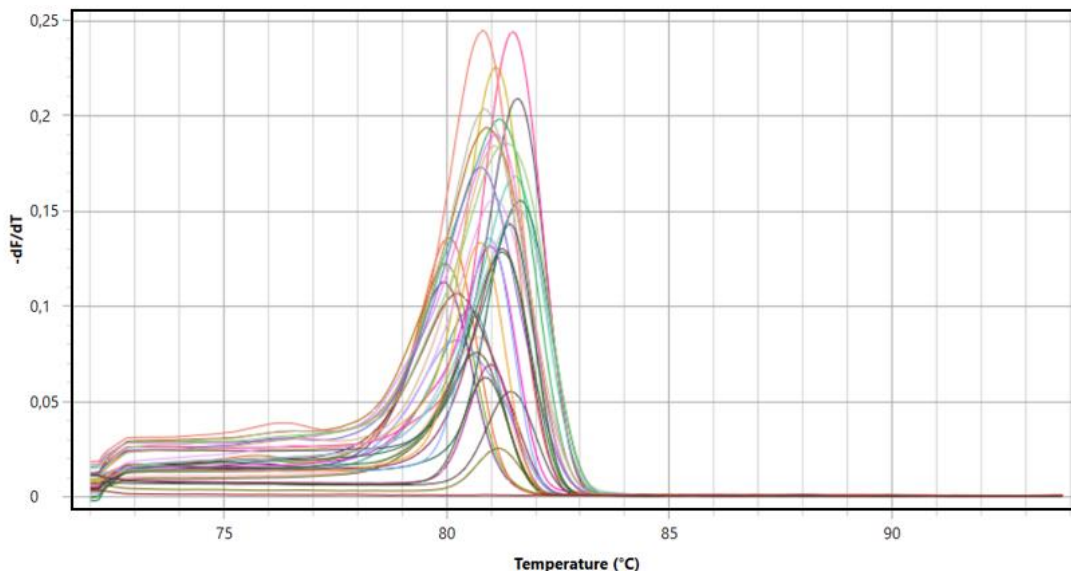
Produkte reakcije qRT-PCR korištenjem početnica *BPM2.8* analizirala sam i agaroznom gel elektroforezom (Slika 31). U uzorcima u kojima je na krivulji taljenja bio prisutan samo jedan maksimum na temperaturi između 78 °C i 79 °C na gelu je detektirana samo jedna vrpca manja od 100 pb. To se slaže s pretpostavkom da dobivena krivulja potječe od međusobnog sparivanja početnica. U uzorcima u kojima su na krivulji taljenja bila prisutna dva maksimuma na gelu je detektirana samo jedna vrpca veličine između 300 i 400 pb. Međutim, veličina vrpce se razlikovala između uzoraka. Uzorci čiji se maksimum na krivulji taljenja nalazio na temperaturi nižoj od 84 °C na gelu su imali manji fragment veličine oko 350 pb, a uzorci s maksimumom na temperaturi višoj od 84 °C na gelu su imali veći fragment veličine oko 400 pb. Ovi rezultati se slažu s rezultatima analize ekspresije varijante *BPM2.8* metodom PCR i agaroznom gel elektroforezom produkta u kojima su također na gelu detektirana dva fragmenta vrlo slične veličine i ukazuju na postojanje dodatnih varijanti alternativnog prekrajanja gena *BPM2* koje su prisutne u uzorcima.



Slika 31. Analiza produkata reakcije qRT-PCR za varijantu *BPM2.8*. Redoslijed uzoraka je: i) cvjetni pupovi, kontrolna skupina, 21 °C, treća replika; ii) cvjetovi, tretman temperaturom od 37 °C, prva replika; iii) cvjetni pupovi, tretman temperaturom od 44 °C, oporavak 11 h i 15 min, prva replika; iv) cvjetovi, kontrolna skupina, 21 °C, prva replika; v) klijanci, tretman temperaturom od 37 °C, prva replika; vi) cvjetovi, tretman temperaturom od 5 °C, druga replika. pb – molekularni standard GeneRuler 100 bp DNA Ladder; 78,6 °C, 79,2 °C, 83,8 °C, 84,0 °C – maksimumi na krivulji taljenja.

4.6.3. Analiza krivulje taljenja produkta reakcije qRT-PCR za varijantu *BPM2.9*

Produkte dobiveni umnažanjem u reakciji qRT-PCR korištenjem početnica *BPM2.9* analizirala sam na temelju krivulje taljenja (Slika 32). Sve dobivene krivulje taljenja imale su samo jedan maksimum, ali on se nalazio na temperaturi između 80,0 °C i 81,6 °C. Raznolikost maksimuma na krivulji taljenja može ukazivati na veći broj različitih produkata koji nastaju u reakciji. Ovi rezultati slažu se s rezultatima analize ekspresije varijante *BPM2.9* metodom PCR i agaroznom gel elektroforezom produkta u kojima su također na gelu jasno detektirana dva fragmenta vrlo slične veličine.



Slika 32. Raznolikost maksimuma na krivulji taljenja produkata reakcije qRT-PCR prve replike klijanca, cvjetnih pupova i oplođenih cvjetova umnoženih početnicama *BPM2.9*.

5. Rasprava

U prvom dijelu ovog rada odredila sam koji su *cis*-regulatorni motivi prisutni u promotorskoj regiji uročnjakova gena *BPM2*. Analizirala sam prisutnost nekih elemenata temeljnih promotora, motiva osjetljivih na ABA-u, elemenata HSE i mjesta vezanja odabranih TF-a povezanih s temperaturnim stresom.

Iako je u promotorima uročnjaka vrlo čest (48%), motiv TATA-box nije pronađen u promotorskoj regiji gena *BPM2*. Element Inr općenito okružuje TSS pri čemu se A nalazi na poziciji +1, a C prije njega te su okruženi s nekoliko pirimidina. Iako je to najčešći element temeljnih promotora kod uročnjaka (52%; Brázda i sur., 2021), ovaj element nije visoko očuvan, a njegova funkcija slabo je istražena (Molina i Grotewold, 2005). S obzirom da su motivi Inr u promotoru gena *BPM2* pronađeni na mjestima udaljenim od TSS-a vjerojatno je da nisu funkcionalni. I u promotorima drugih gena zabilježeni su promotori bez motiva TATA-box i Inr. U tom slučaju, transkripcija često započinje na više mjesta (Biłas i sur., 2016). Motiv GC-box bogat je bazama G i C. Broj i raspored ovog motiva u promotorima varira, a najčešće se nalazi nekoliko stotina parova baza uzvodno od TSS-a (Imataka i sur., 1992). Samo 6,9% promotora u uročnjaku sadrži ovaj element (Brázda i sur., 2021). U promotoru gena *BPM2* nađene su dvije kopije ovog motiva oko 850 pb uzvodno od TSS-a. Zanimljivo je da postotak motiva TATA-box i GC-box u promotorima eukariota inverzno korelira (Brázda i sur., 2021), što se podudara s rezultatima dobivenim za promotor gena *BPM2*. Motiv CCAAT-box najčešće se nalazi u regiji 60-100 pb uzvodno od TSS-a (Calvenzani i sur., 2012), a prisutan je u 25,4% promotora uročnjaka (Brázda i sur., 2021). U promotoru gena *BPM2* ovaj motiv nađen je na tri pozicije oko 1500 pb uzvodno od TSS-a. Kako je ova udaljenost puno veća od uobičajene, postoji mogućnost da ni ovi elementi nisu funkcionalni. Dobiveni rezultati upućuju da je vjerojatno motiv GC-box preferentni promotorski element gena *BPM2*.

Elementi osjetljivi na ABA-u zanimljivi su u ovom kontekstu jer ABA regulira biljni odgovor na stres izazvan povišenim salinitetom, sušom, ali i niskom i visokom temperaturom (Suzuki i sur., 2016). Od elemenata osjetljivih na ABA-u, u promotoru gena *BPM2* pronađen je samo element CE1. Činjenica da nije pronađen nijedan element CE3 slaže se s istraživanjem Gómez-Porras i sur. (2007) koje ukazuje da ovaj element gotovo da nije prisutan u promotorima uročnjaka. Pokazano je da su u riži elementi ABRE i CE3 funkcionalno ekvivalentni i da par CE3 elemenata može omogućiti osjetljivost promotora na ABA-u (Hobo i sur., 1999). Uzevši u obzir sličnost funkcije elemenata CE3 i CE1, postoji mogućnost da su parovi motiva CE1 nađeni u promotoru gena *BPM2* funkcionalni. Ipak, u promotoru gena *BPM2* nije pronađen nijedan element ABRE koji se najčešće povezuje uz osjetljivost na ABA-u (Lee i sur., 2010) što se slaže s istraživanjem Škiljaica i sur. (2020) u kojem je pokazano da ABA nije utjecala na razinu ekspresije gena *BPM2*. Nadalje, u okviru ovog istraživanja zanimljivi su i elementi HSE, palindromski motivi očuvani

u eukariotskim promotorima gena aktiviranih toplinskim stresom (Nover i sur., 2001). Iako u promotoru gena *BPM2* nisu pronađeni motivi HSE, rezultati prijašnjih istraživanja upućuju na povezanost ovog gena s toplinskim stresom (Morimoto i sur., 2019).

Nekoliko porodica TF-a sudjeluje u odgovoru biljaka na temperaturni stres, uključujući porodice bZIP, AP2/ERF, MYB i WRKY (Zhao i sur., 2018; Wang i sur., 2023). Sve ove porodice povezane su i s hladnim i toplinskim stresom kod biljaka, a funkcija pojedinih članova opisana je za specifični stres. Tako su s hladnim stresom povezani CBF1 i 2 (Zarka i sur., 2003), MYB15 (Agarwal i sur., 2006), WRKY6, 18, 22, 32, 40 i 46 (Lee i sur., 2005), a s toplinskim stresom bZIP52 (Wiese i sur., 2021), DREB2A i DREB2C (Wang i sur., 2023), MYB30 (Liao i sur., 2017), WRKY26 i 39 (Li i sur., 2010, 2011). Transkripcijski faktori WRKY25 i 33 povezani su s oba tipa stresa (Lee i sur., 2005; Li i sur., 2011). U promotoru gena *BPM2* pronađena su višestruka mjesta vezanja svih nabrojanih TF-a. U promotorskoj regiji gena *BPM2* pronađena su i mjesta vezanja TF-a koji su opisani kao supstrati kompleksa kulin 3-ovisnih E3 ligaza kroz interakciju s proteinima BPM: ATHB6 i ATHB16 (Lechner i sur., 2011), DREB2A (Morimoto i sur., 2017), ERF4, RAV1 (Chen i sur., 2013), MYB56 (Chen i sur., 2015), MYC2 i MYC3 (Chico i sur., 2020). Pronađeno je jedno mjesto vezanja proteina MYB56 i nekoliko veznih mjesta ostalih TF-a koji stupaju u interakciju s proteinima BPM. Nađena mjesta prepoznavanja TF-a nalaze se u rasponu od -1993 do +71 u odnosu na TSS što se podudara s rezultatima da se u uročnjaku 96% veznih mjesta TF-a nalazi u regiji od -2000 do +200 pb u odnosu na TSS. Uz to, vezna mjesta prepoznavanja TF-a CBF1 i 2 te DREB2 pronađena su i nizvodno od TSS što se slaže s njihovim maksimumom pojavnosti u promotorima uročnjaka (Yu i sur., 2016). S obzirom da su u promotoru gena *BPM2* pronađena mjesta vezanja TF-a koji ostvaruju interakcije s proteinima BPM zanimljiva je mogućnost postojanja pozitivnih i negativnih povratnih sprega. Transkripcijski faktori koji djeluju kao aktivatori transkripcije mogli bi se vezati na promotor gena *BPM2* i potaknuti njegovu transkripciju. Nastali protein BPM2 zatim bi mogao stupiti u interakciju s istim TF-ima i usmjeriti ih na degradaciju u proteasomu 26 S, čime bi se uspostavila negativna povratna sprega. S druge strane, vezanje TF-a koji djeluje kao represor transkripcije na promotor gena *BPM2* dovelo bi do smanjenja njegove ekspresije zbog čega bi i stopa degradacije navedenog TF-a bila manja. Ovakvi mehanizmi vodili bi preciznoj regulaciji količine proteina BPM2 i odgovarajućih TF-a, a samim time i procesa u koje su uključeni. Kao transkripcijski aktivatori identificirani su proteini DREB2A (Sakuma i sur., 2006), MYC2 i MYC3 (Chico i sur., 2020), a kao represori MYB56 (Chen i sur., 2015) i RAV1 (Feng i sur., 2014). Proteini ATHB6 (Lechner i sur., 2011; Himmelbach i sur., 2002) i ERF4 (Riester i sur., 2019) mogu djelovati i kao aktivatori i kao represori transkripcije. U sklopu ovog istraživanja posebno je zanimljiv protein DREB2A za koji je pokazana uloga u toplinskom stresu, ali i interakcija s proteinima porodice BPM (Morimoto i sur., 2017). Iz istog razloga važan bi mogao biti i protein ATHB6 koji je uključen u odgovor na ABA-u (Himmelbach i sur., 2002).

Iako se smatra da se promotorska regija može provlačiti kroz nekoliko kb uzvodno od TSS-a, u istraživanjima se uglavnom analizira 0,5-2 kb (Pandiarajan i Grover, 2018). Tako su i Mudge i sur. (2002) prilikom analize porodice transportera fosfata uročnjaka u analizu uključili promotorske regije od 2987 do 1672 pb uzvodno od TSS-a. S druge strane, vezna mjesta TF-a mogu se naći i do oko 200 pb nizvodno od TSS-a pa se u analize promotorske regije uglavnom uključuje i ova regija (Yu i sur., 2016). S obzirom da su promotorski elementi i mjesta vezanja TF-a u genu *BPM2* nađeni sve od pozicije -1993 do +71 pb u odnosu na TSS vjerojatno cijela istraživana regija djeluje kao promotorska. U tom kontekstu, zanimljivo je da promotori gena uključenih u odgovor na okolišne čimbenike u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* imaju dulje promotore u odnosu na ostale gene (Kristiansson i sur., 2009).

U drugom dijelu rada pokazala sam da je djelovanje hladnih i toplinskih tretmana na različite razvojne stadije, tkiva i organe uročnjaka povezano s mehanizmima alternativnog prekrajanja na način da se neke varijante specifično pojavljuju nakon određenog temperaturnog tretmana.

Hipoteza o potencijalnoj ulozi alternativnog prekrajanja produkata gena porodice BPM temeljena je na fenomenu vrsno-specifične ekspanzije (engl. *lineage-specific expansion*, LSE; Lespinet i sur., 2002) koja se dogodila u porodici MATH-BTB u genomima biljaka porodice *Poaceae* (Gingerich i sur., 2007; Juranić i Dresselhaus, 2014; Škiljaica, 2022) te u obliku *C. elegans* (Stogios i sur., 2005). LSE se najčešće povezuje s ekspanzijama porodica gena uključenih u reakcije na biotičke i abiotičke stresove (Lespinet i sur., 2002). Zanimljivo je da brojnost gena porodice MATH-BTB nije povećana u vrste *A. thaliana* (Gingerich i sur., 2007), kao ni u većine drugih vrsta, uključujući i jednosupnicu *Musa accuminata* (banana) i dvosupnicu *Vitis vinifera*, koje obje u genomima sadrže tek nekoliko gena (Juranić i Dresselhaus, 2014). Juranić i Dresselhaus (2014) na temelju toga sugeriraju da je svrha ekspanzije porodice MATH-BTB u trava povezana s njihovim vrsno-specifičnim funkcijama. Međutim, funkcionalne karakterizacije nekih proteina MATH-BTB u travama pokazale su da imaju esencijalne uloge, od regulacije citoskeleta u reproduktivnom razvoju kukuruza (Juranić i sur., 2012) i pšenice (Bauer i sur., 2019), preko regulacije translacije u pšenici (Bauer i sur., 2019). Stoga se nužno nameće pitanje o mehanizmima kojim druge vrste, uključujući i uročnjak, kompenziraju brojnost proteina MATH-BTB i njihovih specifičnih funkcija. Odgovor na ovo pitanje djelomično je dan rezultatima mogeg istraživanja te paralelnog istraživanja budući da je u njima pokazano da je broj proteinskih izoformi koje kodira samo šest gena *MATH-BTB* uročnjaka (*BPM1-6*) značajno veći (Keresteš, 2024) te da se u različitim uzgojnim uvjetima pojavljuju i dodatne varijante alternativnog prekrajanja koje nisu opisane u nijednoj od postojećih baza podataka, uključujući i AtRTD3 (Zhang i sur., 2022). Ovaj podatak sugerira da bi alternativno prekrajanje mogao biti mehanizam ostvarivanja istih razvojnih i evolucijskih dosega kao i LSE.

Važno je istaknuti da je, paralelno s provedbom ovog istraživanja, napravljena detaljna analiza baze transkriptoma uročnjaka AtRTD3 (Zhang i sur., 2022), koja predstavlja trenutno najopsežniju bazu cjelovitih sekvenci transkripata. AtRTD3 sadrži više od 169 000 transkripata, što je dvostuko više od ranije objavljenih baza transkriptoma uročnjaka, i uključuje preko 1500 novih gena. Osim toga, AtRTD3 obuhvaća transkripte povezane s odgovorom na hladni i toplinski stres u vrste *Arabidopsis thaliana* (Zhang i sur., 2022). Na temelju analize baze AtRTD3, Keresteš (2024) identificira 16 varijanata alternativnog prekrajanja gena *BPM2*, što je više nego trostruko više u odnosu na pet anotiranih u bazi TAIR10, odnosno šest varijanata ako se u obzir uzme i ona opisana u Pali (2020). Kako se nazivlje varijanti ne podudara u bazama TAIR10 i AtRTD3, Tablica 9 prikazuje njihovu podudarnost.

Tablica 9. Imena odgovarajućih varijanti alternativnog prekrajanja gena *BPM2* u bazama TAIR10 i AtRTD3. Djelomična sekvenca varijante *BPM2.6* opisana je u Pali (2020) i nije anotirana u bazi TAIR10. Preuzeto iz Keresteš (2024).

Oznaka u bazi TAIR10	Oznaka u bazi AtRTD3
BPM2.1	BPM2.12
BPM2.2	BPM2.8
BPM2.3	BPM2.13
BPM2.4	BPM2.5 / BPM2.10
BPM2.5	BPM2.4 / BPM2.14
BPM2.6*	BPM2.3 / BPM2.15

Varijante baze AtRTD3, *BPM2.1*, *BPM2.2*, *BPM2.3*, *BPM2.6*, *BPM2.7*, *BPM2.9*, *BPM2.11*, *BPM2.15* i *BPM2.16* nisu prethodno opisane. Djelomična sekvenca koju je identificirala Pali (2020) prisutna je u varijantama *BPM2.3* i *BPM2.15*.

U nastavku ovog teksta, kao i u ostatku rada korišteno je nazivlje iz baze AtRTD3.

Općenito, 16 varijanata alternativnog prekrajanja gena *BPM2* razlikuje se u regijama nizvodno od domene MATH, a ponajviše u C-terminalnom dijelu domene BTB, te u domeni BACK (Prilog VII). Ove razlike utvrđene su već i na temelju ranije poznatih varijanti (Pali, 2020). Jedino varijanta *BPM2.12* ima cjelovite sve tri domene. Varijante *BPM2.2* i *BPM2.11* sadrže samo domenu MATH, što bi njihovu funkciju ograničavalo na funkcije proteina MATH (Marín, 2015; Oelmüller i sur., 2005). Ostale varijante uz domenu MATH imaju bilo cjelovitu ili krnju domenu BTB. Domenu BACK posjeduju samo varijante *BPM2.4*, *BPM2.12* i *BPM2.14*, no, kako je prethodno istaknuto, samo u varijanti *BPM2.12* je cjelovita domena

BACK-AtBPM-like. Specifične razvojne funkcije varijanti i proteina MATH-BTB određene su upravo kombinacijama domena, ali i prisutnošću funkcionalnih sljedova kao što je NLS (Leljak-Levanić i sur., 2012).

Već ranije je utvrđeno da su proteini BPM bitni u regulaciji temperaturnog stresa kroz interakciju s transkripcijskim faktorom DREB2A iz obitelji AP2/ERF (Morimoto i sur., 2017). Ekspresija DREB2A inducirana je u stresnim uvjetima (Sakuma i sur., 2006; Morimoto i sur., 2017), a DREB2A vezanjem na promotorske elemente DRE/CRT (DRE/C Repeat) kontrolira ekspresiju gena koji sudjeluju u odgovoru na temperaturne i sušne stresove (Nakashima i sur., 2009). Analiza domena proteina DREB2A u uročnjaku otkrila je da u središnjoj regiji DREB2A postoji negativna regulatorna domena (NRD) te da njena delecija dovodi do nastanka stabilne i konstitutivno aktivne forme DREB2A. Ovakav stabilan oblik DREB2A u transgeničnim biljkama inducira ekspresiju ciljanih gena i potiče otpornost biljaka na sušne uvjete, ali istovremeno negativno utječe na biljke uzrokujući patuljasti rast i smanjenu reprodukciju (Sakuma i sur., 2006). S druge strane, degradacija faktora DREB2A pomoću proteasoma 26S posredovana je proteinima DRIP1/2 (DREB2A-INTERACTING PROTEINS 1/2) te proteinima BPM koji vežu DREB2A u jezgri. Vezanje se ostvaruje prepoznavanjem N-terminalnog dijela domene NRD faktora DREB2A koji sadrži motiv SBC (SPOP-Binding Consensus) od strane domene MATH (Morimoto i sur., 2017). Motiv SBC prisutan je u svim supstratima koje prepoznaje domena MATH, a njegovo postojanje u skladu je s visokom sličnosti između sekvenci domena MATH u proteinima BPM uročnjaka (84 – 100%; Škiljaica i sur., 2019). U uvjetima temperaturnog stresa DREB2A se aktivira i djeluje na ekspresiju nizvodnih gena. Prekomjerno nakupljanje faktora sprječava se kroz negativnu regulaciju stabilnosti proteina DREB2A proteinima BPM, koji time moduliraju odgovor biljke na temperaturni stres (Morimoto i sur., 2017). Dokazano je da proteini BPM posreduju u degradaciji proteina DREB2A i u normalnim uvjetima, što dodatno potvrđuje kontinuirani i brzi katalitički obrt ovih proteina, čija se razina u stanici mora precizno modulirati ovisno o okolišnim uvjetima (Morimoto i sur., 2017). Slično tome, pokazano je da proteini BPM sudjeluju i u regulaciji biljnog odgovora na hladni stres preko proteasomalne razgradnje proteina DREB1A (Chen i sur., 2013).

Opisani mehanizam proteasomalne razgradnje osim što zahtijeva specifičnost domene MATH prema motivu SBC u proteinu DREB2A, odnosno proteinu DREB1A, zahtijeva i interakciju proteina BPM2 s kulinom 3. Interakcija s kulinom ostvaruje se preko osam aminokiselinskih ostataka: Asp-12, His-25, Ile-52, Ile-54, Asp-56, Asp-101, Tyr-103 i Leu-105 (Geyer i sur., 2003; Xu i sur., 2003). Analizom sekvenci varijanata alternativnog prekrajanja gena *BPM2* i proteina koje kodiraju utvrđeno je da sve varijante kodiraju protein koji sadrži prve dvije aminokiseline važne za interakciju (Asp-12 i His-25). Slijedeće tri aminokiseline (Ile-52, Ile-54 i Asp-56) prisutne su u proteinima kodiranim većinom varijanti, dok ih proteini

kodirani varijantama *BPM2.2*, *BPM2.8* i *BPM2.11* ne sadrže. Samo varijante *BPM2.4*, *BPM2.12* i *BPM2.14* kodiraju protein koji sadrži zadnje tri aminokiseline važne za ostvarivanje interakcije s kulinom (Asp-101, Tyr-103 i Leu-105), koje se nalaze na samom kraju domene BTB. Upravo ove varijante imaju puni kapacitet posredovanja u kontroli stabilnosti proteina DREB2A i DREB1A. Ostale varijante mogu s manjim afinitetom sudjelovati u proteasomalnoj degradaciji proteina DREB2A i DREB1A, ali imaju potencijal sudjelovanja u drugim kulin-ovisnima, ali i mehanizmima neovisnim o kulinu.

Ranije objavljene analize ekspresije gena porodice BPM u uvjetima temperaturnog stresa ukazale su na pojačanu ekspresiju gena *BPM1*, *BPM2* i *BPM3*, s najvećim povećanjem ekspresije gena *BPM2* (Škiljaica, 2022). Uvjeti povišene temperature ne samo da induciraju ekspresiju gena *BPM2*, već utječu i na alternativno prekrajanje primarnog transkripta ovog gena. Činjenica da transkripti *BPM2.4* i *BPM2.14* postaju vrlo obilni u uvjetima hladnog stresa i povišene temperature ukazuje na to da protein kodiran ovim varijantama ima dominantnu ulogu u odgovoru na promjenjivu temperaturu (Škiljaica, 2022).

U svojem sam radu analizirala ekspresiju odabranih varijanti alternativnog prekrajanja gena *BPM2* u klijancima, cvjetnim pupovima i oplodjenim cvjetovima biljaka uročnjaka kontrolne skupine te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C) s ciljem utvrđivanja povezanosti temperaturnog stresa i preferencijalnog nakupljanja pojedinih varijanti. Ekspresiju varijanti *BPM2.8*, *BPM2.9* te koekspresiju varijanti *BPM2.3* i *BPM2.15* analizirala umnažanjem metodom PCR i agaroznom gel elektroforezom produkata. Dodatno, ekspresiju/koekspresiju spomenutih varijanti kvantificirala sam metodom qRT-PCR. Uz njih, metodom qRT-PCR kvantificirala sam zajedničku ekspresiju triju grupa varijanti: i) *BPM2.3* i *BPM2.15*; *BPM2.3*, *BPM2.13* i *BPM2.16*; ii) *BPM2.1*, *BPM2.2*, *BPM2.5*, *BPM2.6*, *BPM2.7*, *BPM2.10* i *BPM2.15* te iii) *BPM2.3*, *BPM2.4*, *BPM2.7* i *BPM2.14*. Osim toga, istraživanja su bila usmjerena na mogućnost detekcije novih varijanata povezanih s temperaturnim stresom i procjene njihova okvirnog broja.

Razina ukupne ekspresije gena *BPM2* u klijancima povećala se uslijed izlaganja toplinskom stresu, što se slaže s istraživanjem Škiljaica (2022) u kojem je isto tako zabilježen porast ekspresije u klijancima uročnjaka uslijed izlaganja temperaturi od 37 °C tijekom 3 h. U ovom radu uočila sam porast ukupne ekspresije gena *BPM2* pri izlaganju povišenim temperaturama i u cvjetnim pupovima i oplodjenim cvjetovima. Međutim, nakon oporavka u trajanju 11 h i 15 min razina ekspresije vratila se na razinu kontrolne. Porast razine ukupne ekspresije gena *BPM2* primijećen je i u klijancima izloženim hladnom stresu. Tri grupe transkripata analizirane u mom radu, i) *BPM2.3*, *BPM2.13* i *BPM2.16*; ii) *BPM2.1*, *BPM2.2*, *BPM2.5*, *BPM2.6*, *BPM2.7*, *BPM2.10* i *BPM2.15* te iii) *BPM2.3*, *BPM2.4*, *BPM2.7* i *BPM2.14* također podliježu grupno-specifičnom porastu ekspresije nakon temperaturnih tretmana. Primijećen je porast ekspresije grupe varijanti *BPM2.3*, *BPM2.13* i *BPM2.16* u klijancima izloženim temperaturi od 37 °C

što se podudara s rezultatima Škiljaica (2022) na klijancima izloženim temperaturi od 37 °C tijekom 3 h. Međutim u mom radu zabilježila sam porast razine ekspresije grupe varijanti *BPM2.3*, *BPM2.4*, *BPM2.7* i *BPM2.14* u klijancima izloženim sniženoj i povišenoj temperaturi, dok u istraživanju Škiljaica (2022) nije zabilježena promjena uslijed izlaganja toplinskom stresu. Kako su se ove analize odnosile na grupe transkripata koji dodatno i ne rezultiraju istim proteinom uloga pojedinačnih varijanata ostaje nepoznata te predmetom budućih istraživanja.

Protein kodiran varijantama *BPM2.3* i *BPM2.15* sadrži pet aminokiselina uključenih u interakciju s kulinom (Asp-12, His-25, Ile-52, Ile-54 i Asp-56) zbog čega je moguće da sudjeluje u degradaciji proteina DREB2A tijekom biljnog odgovora na toplinski stres, odnosno DREB1A tijekom odgovora na hladni stres. Varijanta *BPM2.3* detektirana je u svim tkivima na svim temperaturama, dok je varijanta *BPM2.15* detektirana u samo jednoj replici klijanaca izloženih temperaturi od 37 °C te pupovima i cvjetovima pri svim temperaturama. Zajednička ekspresija ovih dviju varijanti zabilježena je u klijancima uročnjaka u kontrolnim uvjetima i pri izlaganju temperaturi od 37 °C tijekom 3 h (Pali, 2020). Kvantifikacijom zajedničke ekspresije ovih dviju varijanti primijećen je porast ekspresije u svim tkivima prilikom izlaganja povišenim temperaturama. Analizom baze AtRTD3 varijanta *BPM2.15* povezana je s hladnim stresom u listovima rozete izloženim temperaturi od 4 °C tijekom 12, odnosno 66 h (Keresteš, 2024).

Protein kodiran varijantom *BPM2.8* od osam aminokiselina važnih za interakciju s kulinom sadrži samo dvije (Asp-12 i His-25). U mom radu je umjesto očekivane vrpce od 310 pb koja bi predstavljala varijantu *BPM2.8* dominantno bila zastupljena vrpca okvirne veličine 350 pb. Njena se ekspresija može povezati s toplinskim stresom budući da je u klijancima bila eksprimirana samo pri tretmanu temperaturom od 37 °C. Zanimljivo je da je ova varijanta zastupljena u cvjetnim pupovima i cvjetovima neovisno o temperaturnom tretmanu. Postoje brojni dokazi o povezanosti reproduktivnog razvoja sa stresom. Tako se npr. brojni transkripcijski faktori iz porodica AP2/EREBP (APETALA 2/ethylene-responsive element binding proteins), WRKY i NAC aktiviraju tijekom embriogeneze kod uročnjaka (Gliwicka i sur., 2013), ali i u različitim reakcijama na stres (Singh i sur., 2002), što nedvojbeno pokazuje ulogu stresa tijekom reproduktivnog razvoja biljaka općenito. U pamuku procesi embriogeneze, kao što je regulacija embrionalne sudbine, uspostava embionalne osi i formiranje uzorka rasta, metilacija DNA i odgovor na hormone (Jin i sur., 2014) dijele više od 50% visoko eksprimiranih gena uključenih u odgovor na stres. Slično preklapanje postoji i u uročnjaku, gdje su najzastupljeniji transkripcijski faktori tijekom embriogeneze oni uključeni u razvojne procese, odgovor na fitohormone i stres (Gliwicka i sur., 2013). Stoga bi alternativna varijanta koju sam detektirala na temelju neočekivane vrpce mogla biti nova, do sada neopisana varijanta, s preklapajućom ulogom tijekom biljnog odgovora na stres i reproduktivnog razvoja i embriogeneze.

Protein kodiran varijantom *BPM2.9* sadrži iste aminokiseline važne za interakciju s kulinom kao i protein kodiran varijantama *BPM2.3* i *BPM2.15*, što povećava vjerojatnost njegove uloge tijekom biljnog odgovora na stres posredovane degradacijom proteina DREB2A i DREB1A. Ova varijanta također se pojavljuje u klijancima samo pri temperaturi od 37 °C, a u cvjetnim pupovima i oplodjenim cvjetovima neovisno o temperaturnom tretmanu. Kvantifikacijom ekspresije metodom qRT-PCR u oplodjenim cvjetovima uočen je porast ekspresije na povišenim temperaturama, dok se ekspresija nakon oporavka vratila na razinu kontrolne. Analizom baze AtRTD3 varijanta *BPM2.9* povezana je s toplinskim stresom u klijancima izloženim temperaturi od 37 °C tijekom 12 h i listovima rozete izloženim temperaturi od 27 °C tijekom tjedan dana (Keresteš, 2024). Uz varijantu *BPM2.9* se konstitutivno umnažao i fragment okvirne veličine 620 pb čija je ekspresija bila dominantna. Uz to, na krivulji taljenja produkata umnoženih metodom qRT-PCR primijećen je veliki raspon temperatura maksimuma krivulje (između 80,0 °C i 81,6 °C), čije su razlike unutar i između različitih uzoraka potvrdile postojanje dodatnih varijanti. S ciljem utvrđivanja umnaža li se veći fragment (~620 pb) specifično te pripada li porodici BPM provedeno je sekvenciranje neočekivanog fragmenta koje je pokazalo da se zaista radi o fragmentu koji pripada varijantama alternativnog prekrajanja gena *BPM2*. U odnosu na očekivani fragment, ovaj sadrži dodatnu sekvencu veličine 60 pb te je stvarna veličina fragmenta 625 pb (Leljak-Levanić, osobna komunikacija). Na temelju sekvence dodatnog slijeda trebalo bi u budućim istraživanjima dizajnirati specifične početnice te umnažanjem u 5' i 3' smjeru pomoću univerzalnih početnica dizajniranih u dosadašnjim istraživanjima provesti sekvenciranje cijele varijante. Ideničan pristup trebalo bi provesti i za druge fragmente koje sam reproducibilno dobivala u provedenim eksperimentima.

Stoga bi nastavak ovog istraživanja trebao biti usmjeren na detekciju što većeg broja novih varijanti alternativnog prekrajanja povezanih sa različitim stresnim stanjima. Ta bi nam znanja dala odgovor na pitanje postoje li varijante koje se razlikuju i u području domene MATH te je li alternativno prekrajanje zaista način kojim većina biljnih vrsta nadoknađuje broj i funkcije velike porodice MATH-BTB iz trava. Nadalje, kako je u usporednoj analizi alternativnog prekrajanja u životinja i biljaka pokazano da se u uročnjaku alternativno prekrajanje dominantno događa kao posljedica djelovanja abiotičkog stresa (Martin i sur., 2021), detaljnije analize omogućile bi potvrdu ovog rezultata na modelu proteinske porodice MATH-BTB kao i spoznaju o tome koliko je ova proteinska porodica značajna za mehanizme kojima se biljni organizmi prilagođavaju na različite stresne uvjete.

6. Zaključak

U promotoru gena *BPM2* nije pronađen motiv TATA-box, ali je pronađeno nekoliko kopija inicijatorskog elementa, motiva GC-box i CCAAT-box te elementa CE1 osjetljivog na ABA-u. U promotorskoj regiji ovog gena nađena su vezna mjesta svih analiziranih transkripcijskih faktora povezanih s odgovorom na temperaturni stres i proteina koji ostvaruju interakcije s proteinima BPM. Nađeni motivi provlače se kroz cijelu istraživanu regiju (−2000 pb do +100 pb u odnosu na TSS) što ukazuje na njezinu promotorsku ulogu.

Razina ekspresije sveukupnih varijanti alternativnog prekrajanja gena *BPM2* bila je povećana u klijancima izloženim hladnom i toplinskom stresu, dok je u cvjetnim pupovima i cvjetovima bila povećana samo prilikom izlaganja povišenim temperaturama.

Temperaturni tretman utjecao je na zajedničku ekspresiju grupe varijanti *BPM2.3*, *BPM2.13* i *BPM2.16* koja je u klijancima bila povećana pri toplinskom stresu, dok je ekspresija grupe varijanti *BPM2.3*, *BPM2.4*, *BPM2.7* i *BPM2.14* bila povećana u klijancima izloženim i hladnom i toplinskom stresu.

Izlaganje biljaka toplinskom stresu dovelo je do porasta ekspresije varijanti *BPM2.3* i *BPM2.15* u svim analiziranim tkivima. Varijanta *BPM2.15* bila je pod snažnijom kontrolom temperaturnog stresa. Njezina je ekspresija u klijancima uočena samo prilikom izlaganja temperaturi od 37 °C, dok je zabilježen pad razine ekspresije ove varijante u cvjetnim pupovima i cvjetovima biljaka izloženih temperaturi od 44 °C.

Tretman klijanaca povišenom temperaturom potaknuo je ekspresiju varijanata sličnih opisanoj varijanti *BPM2.8*. Ekspresija ovih varijanti u cvjetnim pupovima i cvjetovima detektirana je pri svim temperaturnim tretmanima. Zbog vrlo niskih razina ekspresije, rezultate nije bilo moguće kvantificirati u klijancima i cvjetnim pupovima, a rezultati dobiveni za cvjetove nisu bili statistički značajni.

Ekspresija varijante *BPM2.9* je u klijancima i cvjetovima bila povezana s toplinskim stresom, dok je u cvjetnim pupovima ova varijanta detektirana pri svim temperaturama. Ekspresija nove varijante (625 pb) je detektirana pri svim temperaturama u svim tkivima.

Postojanje dodatnih, neopisanih varijanti alternativnog prekrajanja potkrijepljeno je umnažanjem neočekivanih fragmenata standardnim PCR reakcijama te krivuljama taljenja dobivenim u reakcijama qRT-PCR. Daljnje istraživanje ovih varijanti, posebno onih povezanih s temperaturnim stresom podržalo bi ulogu alternativnog prekrajanja kao potencijalnog mehanizma regulacije biljnog odgovora na stres. Stoga je potrebno utvrditi porijeklo fragmenta od ~1100 pb iz reakcije umnažanja varijanata *BPM2.3* i *BPM2.15*, fragmenta od ~350 pb iz reakcije umnažanja varijante *BPM2.8* te onog od 625 pb iz reakcije umnažanja varijante *BPM2.9*.

7. Literatura

Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C. H., Fujii, H., Zheng, X., & Zhu, J. K. (2006). A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(49), 37636-37645.

Al-Whaibi, M. H. (2011). Plant heat-shock proteins: a mini review. *Journal of King Saud University-Science*, *23*(2), 139-150.

Andersson, R., & Sandelin, A. (2020). Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. *Nature Reviews Genetics*, *21*(2), 71-87.

Bauer, N., Škiljaica, A., Malenica, N., Razdorov, G., Klasić, M., Juranić, M., Močibob, M., Sprunck, S., Dresselhaus, T., & Leljak Levanić, D. (2019). The MATH-BTB protein TaMAB2 accumulates in ubiquitin-containing foci and interacts with the translation initiation machinery in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1469.

Benarroch, E. E. (2011). Heat shock proteins: multiple neuroprotective functions and implications for neurologic disease. *Neurology*, *76*(7), 660-667.

Biłas, R., Szafran, K., Hnatuszko-Konka, K., & Kononowicz, A. K. (2016). Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *127*, 269-287.

Brázda, V., Bartas, M., & Bowater, R. P. (2021). Evolution of diverse strategies for promoter regulation. *Trends in Genetics*, *37*(8), 730-744.

Calvenzani, V., Testoni, B., Gusmaroli, G., Lorenzo, M., Gnesutta, N., Petroni, K., Mantovani, R., & Tonelli, C. (2012). Interactions and CCAAT-binding of *Arabidopsis thaliana* NF-Y subunits. *PLoS One*, *7*(8), e42902.

Chen, L., Bernhardt, A., Lee, J., & Hellmann, H. (2015). Identification of *Arabidopsis* MYB56 as a novel substrate for CRL3^{BPM} E3 ligases. *Molecular Plant*, *8*(2), 242-250.

Chen, L., Lee, J. H., Weber, H., Tohge, T., Witt, S., Roje, S., Fernie, A. R., & Hellmann, H. (2013). *Arabidopsis* BPM proteins function as substrate adaptors to a cullin3-based E3 ligase to affect fatty acid metabolism in plants. *The Plant Cell*, *25*(6), 2253-2264.

Chen, Z., Galli, M., & Gallavotti, A. (2022). Mechanisms of temperature-regulated growth and thermotolerance in crop species. *Current Opinion in Plant Biology*, *65*, 102134.

Chico, J. M., Lechner, E., Fernandez-Barbero, G., Canibano, E., García-Casado, G., Franco-Zorrilla, J. M., Hammann, P., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M., Rubio, V., Genschik, P., & Solano, R. (2020). CUL3^{BPM} E3 ubiquitin ligases regulate MYC2, MYC3, and MYC4 stability and JA responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(11), 6205-6215.

Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, *12*(10), 444-451.

Claiborn, K. C., Sachdeva, M. M., Cannon, C. E., Groff, D. N., Singer, J. D., & Stoffers, D. A. (2010). Pcif1 modulates Pdx1 protein stability and pancreatic β cell function and survival in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(10), 3713-3721.

Dai, X., Gan, W., Li, X., Wang, S., Zhang, W., Huang, L., Liu, S., Zhong, Q., Guo, J., Zhang, J., Chen, T., Shimizu, K., Beca, F., Blattner, M., Vasudevan, D., Buckley, D. L., Qi, J., Buser, L., Liu, P., Inuzuka, H., Beck, A. H., Wang, L., Wild, P. J., Garraway, L. A., Rubin, M. A., Barbieri, C. E., Wong, K. K., Muthuswamy, S. K., Huang, J., Chen, Y., Bradner, J. E., & Wei, W. (2017). Prostate cancer-associated SPOP mutations confer resistance to BET inhibitors through stabilization of BRD4. *Nature Medicine*, *23*(9), 1063-1071.

Edwards, D., Murray, J. A., & Smith, A. G. (1998). Multiple genes encoding the conserved CCAAT-box transcription factor complex are expressed in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *117*(3), 1015-1022.

Feng, C. Z., Chen, Y., Wang, C., Kong, Y. H., Wu, W. H., & Chen, Y. F. (2014). Arabidopsis RAV1 transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expression of *ABI3*, *ABI4*, and *ABI5* during seed germination and early seedling development. *The Plant Journal*, *80*(4), 654-668.

Geyer, R., Wee, S., Anderson, S., Yates, J., & Wolf, D. A. (2003). BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. *Molecular Cell*, *12*(3), 783-790.

Gingerich, D. J., Hanada, K., Shiu, S. H., & Vierstra, R. D. (2007). Large-scale, lineage-specific expansion of a bric-a-brac/tramtrack/broad complex ubiquitin-ligase gene family in rice. *The Plant Cell*, *19*(8), 2329-2348.

Gliwicka, M., Nowak, K., Balazadeh, S., Mueller-Roeber, B., & Gaj, M. D. (2013). Extensive modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, *8*(7), e69261.

Gómez-Porras, J. L., Riaño-Pachón, D. M., Dreyer, I., Mayer, J. E., & Mueller-Roeber, B. (2007). Genome-wide analysis of ABA-responsive elements ABRE and CE3 reveals divergent patterns in Arabidopsis and rice. *BMC Genomics*, 8, 1-13.

Goodall, G. J., & Filipowicz, W. (1990). The minimum functional length of pre-mRNA introns in monocots and dicots. *Plant Molecular Biology*, 14, 727-733.

Grau-Bové, X., Ruiz-Trillo, I., & Irimia, M. (2018). Origin of exon skipping-rich transcriptomes in animals driven by evolution of gene architecture. *Genome Biology*, 19, 1-21.

Haider, S., Raza, A., Iqbal, J., Shaukat, M., & Mahmood, T. (2022). Analyzing the regulatory role of heat shock transcription factors in plant heat stress tolerance: a brief appraisal. *Molecular Biology Reports*, 49(6), 5771-5785.

Hernández-Muñoz, I., Lund, A. H., Van Der Stoop, P., Boutsma, E., Muijers, I., Verhoeven, E., Dmitri, A., Nusinow, B. P., York, M., & Van Lohuizen, M. (2005). Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MACROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7635-7640.

Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Höhener, B., & Grill, E. (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, 21(12), 3029-3038.

Hobo, T., Asada, M., Kowyama, Y., & Hattori, T. (1999). ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *The Plant Journal*, 19(6), 679-689.

Howarth, C. J. (2005). Genetic improvements of tolerance to high temperature. U: Ashraf, M., & Harris, P. J. C. (ur.) *Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches*. Howarth Press Inc., New York, 277-300.

Imataka, H., Sogawa, K., Yasumoto, K. I., Kikuchi, Y., Sasano, K., Kobayashi, A., Hayami, M., & Fujii-Kuriyama, Y. (1992). Two regulatory proteins that bind to the basic transcription element (BTE), a GC box sequence in the promoter region of the rat P-4501A1 gene. *The EMBO Journal*, 11(10), 3663-3671.

Ingham, P. W., & McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development*, 15(23), 3059-3087.

Jagić, M. (2023). Domain-specific interactions of BPM1 with DMS3 and RDM1 in RNA-directed DNA methylation. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.

- Jagić, M., Vuk, T., Škiljaica, A., Markulin, L., Vičić Bočkor, V., Tokić, M., Miškec, K., Razdorov, G., Habazin, S., Šoštar, M., Weber, I., Bauer, N., & Leljak Levanić, D. (2022). BPM1 regulates RdDM-mediated DNA methylation via a cullin 3 independent mechanism. *Plant Cell Reports*, *41*(11), 2139-2157.
- Jin, F., Hu, L., Yuan, D., Xu, J., Gao, W., He, L., Yang, X., & Zhang, X. (2014). Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. *Plant Biotechnology Journal*, *12*(2), 161-173.
- Juranić, M., & Dresselhaus, T. (2014). Phylogenetic analysis of the expansion of the *MATH-BTB* gene family in the grasses. *Plant Signaling & Behavior*, *9*(4), e28242.
- Juranić, M., Srilunchang, K. O., Krohn, N. G., Leljak-Levanić, D., Sprunck, S., & Dresselhaus, T. (2012). Germline-specific MATH-BTB substrate adaptor MAB1 regulates spindle length and nuclei identity in maize. *The Plant Cell*, *24*(12), 4974-4991.
- Keresteš, G. (2024). Identification and characterization of *BPM2* splice variants in *Arabidopsis thaliana*. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.
- Kim, B., Nam, H. J., Pyo, K. E., Jang, M. J., Kim, I. S., Kim, D., Boo, K., Lee, S. H., Yoon, J. B., Baek, S. H., & Kim, J. H. (2011). Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is destabilized by the Cul3–SPOP E3 ubiquitin ligase complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *415*(4), 720-726.
- Kristiansson, E., Thorsen, M., Tamás, M. J., & Nerman, O. (2009). Evolutionary forces act on promoter length: identification of enriched cis-regulatory elements. *Molecular Biology and Evolution*, *26*(6), 1299-1307.
- Lechner, E., Leonhardt, N., Eisler, H., Parmentier, Y., Alioua, M., Jacquet, H., Leung, J., & Genschik, P. (2011). MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling. *Developmental Cell*, *21*(6), 1116-1128.
- Lee, B. H., Henderson, D. A., & Zhu, J. K. (2005). The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *The Plant Cell*, *17*(11), 3155-3175.
- Lee, S. J., Park, J. H., Lee, M. H., Yu, J. H., & Kim, S. Y. (2010). Isolation and functional characterization of CE1 binding proteins. *BMC Plant Biology*, *10*, 1-13.
- Leljak-Levanić, D., Juranić, M., & Sprunck, S. (2013). De novo zygotic transcription in wheat (*Triticum aestivum* L.) includes genes encoding small putative secreted peptides and a protein involved in proteasomal degradation. *Plant Reproduction*, *26*, 267-285.

- Lejnak Levanić, D., Horvat, T., Martinčić, J., & Bauer, N. (2012). A novel bipartite nuclear localization signal guides BPM1 protein to nucleolus suggesting its Cullin3 independent function. *PLoS One*, 7(12), e51184.
- Lespinet, O., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2002). The role of lineage-specific gene family expansion in the evolution of eukaryotes. *Genome Research*, 12(7), 1048-1059.
- Li, S., Zhou, X., Chen, L., Huang, W., & Yu, D. (2010). Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* WRKY39 in heat stress. *Molecules and Cells*, 29, 475-483.
- Li, S., Fu, Q., Chen, L., Huang, W., & Yu, D. (2011). *Arabidopsis thaliana* WRKY25, WRKY26, and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance. *Planta*, 233, 1237-1252.
- Liao, C., Zheng, Y., & Guo, Y. (2017). MYB30 transcription factor regulates oxidative and heat stress responses through ANNEXIN-mediated cytosolic calcium signaling in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 216(1), 163-177.
- Lorković, Z. J., Kirk, D. A. W., Lambermon, M. H., & Filipowicz, W. (2000). Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends in Plant Science*, 5(4), 160-167.
- Ludwig, M. Z., Bergman, C., Patel, N. H., & Kreitman, M. (2000). Evidence for stabilizing selection in a eukaryotic enhancer element. *Nature*, 403(6769), 564-567.
- Luke-Glaser, S., Pintard, L., Lu, C., Mains, P. E., & Peter, M. (2005). The BTB protein MEL-26 promotes cytokinesis in *C. elegans* by a CUL-3-independent mechanism. *Current Biology*, 15(18), 1605-1615.
- Mani, R. S. (2014). The emerging role of speckle-type POZ protein (SPOP) in cancer development. *Drug Discovery Today*, 19(9), 1498-1502.
- Mareri, L., Parrotta, L., & Cai, G. (2022). Environmental stress and plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5416.
- Marín, I. (2015). Origin and diversification of meprin proteases. *PLoS One*, 10(8), e0135924.
- Marquez, Y., Brown, J. W., Simpson, C., Barta, A., & Kalyna, M. (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome Research*, 22(6), 1184-1195.
- Martín, G., Márquez, Y., Mantica, F., Duque, P., & Irimia, M. (2021). Alternative splicing landscapes in *Arabidopsis thaliana* across tissues and stress conditions highlight major functional differences with animals. *Genome Biology*, 22, 1-26.

- Matlin, A. J., Clark, F., & Smith, C. W. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(5), 386-398.
- Molina, C., & Grotewold, E. (2005). Genome wide analysis of *Arabidopsis* core promoters. *BMC Genomics*, 6, 1-12.
- Morimoto, K., Ohama, N., Kidokoro, S., Mizoi, J., Takahashi, F., Todaka, D., Mogami, J., Sato, H., Qin, F., Kim, J. S., Fukao, Y., Fujiwara, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). BPM-CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), E8528-E8536.
- Mudge, S. R., Rae, A. L., Diatloff, E., & Smith, F. W. (2002). Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 31(3), 341-353.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nakashima, K., Ito, Y., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiology*, 149(1), 88-95.
- Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S. K., Ganguli, A., & Scharf, K. D. (2001). *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need?. *Cell Stress & Chaperones*, 6(3), 177.
- Oelmüller, R., Peškan-Berghöfer, T., Shahollari, B., Trebicka, A., Sherameti, I., & Varma, A. (2005). MATH domain proteins represent a novel protein family in *Arabidopsis thaliana*, and at least one member is modified in roots during the course of a plant–microbe interaction. *Physiologia Plantarum*, 124(2), 152-166.
- Pali, D. (2020). Alternativno prekrajanje gena *BPM1*, *BPM2* i *BPM3* u uvjetima temperaturnog stresa. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.
- Pandiarajan, R., & Grover, A. (2018). In vivo promoter engineering in plants: are we ready?. *Plant Science*, 277, 132-138.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26, 509-515.

Pintard, L., Willis, J. H., Willems, A., Johnson, J. L. F., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P. E., Tyers, M., Bowerman, B., & Peter, M. (2003). The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature*, *425*(6955), 311-316.

Reddy, A. S., Marquez, Y., Kalyna, M., & Barta, A. (2013). Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *The Plant Cell*, *25*(10), 3657-3683.

Reddy, A. S., Rogers, M. F., Richardson, D. N., Hamilton, M., & Ben-Hur, A. (2012). Deciphering the plant splicing code: experimental and computational approaches for predicting alternative splicing and splicing regulatory elements. *Frontiers in Plant Science*, *3*, 18.

Riester, L., Köster-Hofmann, S., Doll, J., Berendzen, K. W., & Zentgraf, U. (2019). Impact of alternatively Polyadenylated Isoforms of ETHYLENE RESPONSE FACTOR4 with Activator and Repressor Function on Senescence in *Arabidopsis thaliana* L. *Genes*, *10*(2), 91.

Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell*, *18*(5), 1292-1309.

Shang, X., Cao, Y., & Ma, L. (2017). Alternative splicing in plant genes: a means of regulating the environmental fitness of plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(2), 432.

Singh, K. B., Foley, R. C., & Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, *5*(5), 430-436.

Srayko, M., Buster, D. W., Bazirgan, O. A., McNally, F. J., & Mains, P. E. (2000). MEI-1/MEI-2 katanin-like microtubule severing activity is required for *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Genes & Development*, *14*(9), 1072-1084.

Staiger, D., & Brown, J. W. (2013). Alternative splicing at the intersection of biological timing, development, and stress responses. *The Plant Cell*, *25*(10), 3640-3656.

Stogios, P. J., Downs, G. S., Jauhal, J. J., Nandra, S. K., & Privé, G. G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biology*, *6*, 1-18.

Suzuki, N., Bassil, E., Hamilton, J. S., Inupakutika, M. A., Zandalinas, S. I., Tripathy, D., Luo, Y., Dion, E., Fukui, G., Kumazaki, A., Nakano, R., Rivero, R. M., Verbeck, G. F., Azad, R. K., Blumwald, E., & Mittler, R. (2016). ABA is required for plant acclimation to a combination of salt and heat stress. *PloS One*, *11*(1), e0147625.

Szakonyi, D., & Duque, P. (2018). Alternative splicing as a regulator of early plant development. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1174.

Škiljaica, A. (2022). The role of MATH-BTB family proteins TaMAB2 and AtBPM1 in plant development and stress response. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.

Škiljaica, A., Jagić, M., Vuk, T., Leljak Levanić, D., Bauer, N., & Markulin, L. (2022). Evaluation of reference genes for RT-qPCR gene expression analysis in *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated temperatures. *Plant Biology*, 24(2), 367-379.

Škiljaica, A., Lechner, E., Jagić, M., Majsec, K., Malenica, N., Genschik, P., & Bauer, N. (2020). The protein turnover of Arabidopsis BPM1 is involved in regulation of flowering time and abiotic stress response. *Plant Molecular Biology*, 102, 359-372.

Tokić, M. (2024). The role of *de novo* DNA methylation in plant response to elevated temperature. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.

Ul Haq, S., Khan, A., Ali, M., Khattak, A. M., Gai, W. X., Zhang, H. X., Wei, A. M., & Gong, Z. H. (2019). Heat shock proteins: dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5321.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 1-12.

von Koskull-Döring, P., Scharf, K. D., & Nover, L. (2007). The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends in Plant Science*, 12(10), 452-457.

Vuk, T. (2022). Uloga proteina BPM1 u mehanizmu metilacije DNA *de novo* tijekom razvoja uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.). Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.

Wang, F., Chen, S., Liang, D., Qu, G. Z., Chen, S., & Zhao, X. (2020). Transcriptomic analyses of *Pinus koraiensis* under different cold stresses. *BMC Genomics*, 21, 1-14.

Wang, X., Tan, N. W. K., Chung, F. Y., Yamaguchi, N., Gan, E. S., & Ito, T. (2023). Transcriptional regulators of plant adaptation to heat stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13297.

- Wang, Y., Henriksson, E., Söderman, E., Henriksson, K. N., Sundberg, E., & Engström, P. (2003). The Arabidopsis homeobox gene, *ATHB16*, regulates leaf development and the sensitivity to photoperiod in Arabidopsis. *Developmental Biology*, 264(1), 228-239.
- Weber, H., Bernhardt, A., Dieterle, M., Hano, P., Mutlu, A., Estelle, M., Genschik, P., & Hellmann, H. (2005). Arabidopsis AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiology*, 137(1), 83-93.
- Wiese, A. J., Steinbachová, L., Timofejeva, L., Čermák, V., Klodová, B., Ganji, R. S., Limones-Mendez, M., Bokvaj, P., Hafidh, S., Potěšil, D., & Honys, D. (2021). Arabidopsis bZIP18 and bZIP52 accumulate in nuclei following heat stress where they regulate the expression of a similar set of genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 530.
- Xu, L., Wei, Y., Reboul, J., Vaglio, P., Shin, T. H., Vidal, M., Elledge, S. J., & Harper, J. W. (2003). BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature*, 425(6955), 316-321.
- Yadav, S. K. (2010). Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30(3), 515-527.
- Yeh, C. H., Kaplinsky, N. J., Hu, C., & Charng, Y. Y. (2012). Some like it hot, some like it warm: phenotyping to explore thermotolerance diversity. *Plant Science*, 195, 10-23.
- Yu, C. P., Lin, J. J., & Li, W. H. (2016). Positional distribution of transcription factor binding sites in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 6(1), 25164.
- Zarka, D. G., Vogel, J. T., Cook, D., & Thomashow, M. F. (2003). Cold induction of Arabidopsis *CBF* genes involves multiple ICE (inducer of *CBF* expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiology*, 133(2), 910-918.
- Zhang, Q., Zhang, L., Wang, B., Ou, C. Y., Chien, C. T., & Jiang, J. (2006). A hedgehog-induced BTB protein modulates hedgehog signaling by degrading Ci/Gli transcription factor. *Developmental Cell*, 10(6), 719-729.

Zhang, R., Kuo, R., Coulter, M., Calixto, C. P. G., Entizne, J. C., Guo, W., Marquez, Y., Milne, L., Riegler, S., Matsui, A., Tanaka, M., Harvey, S., Gao, Y., Wießner-Kroh, T., Paniagua, A., Crespi, M., Denby, K., Hur, A. B., Huq, E., Jantsch, M., Jarmolowski, A., Koester, T., Laubinger, S., Li, Q. Q., Gu, L., Seki, M., Staiger, D., Sunkar, R., Szweykowska-Kulinska, Z., Tu, S. L., Wachter, A., Waugh, R., Xiong, L., Zhang, X. N., Conesa, A., Reddy, A. S. N., Barta, A., Kalyna, M., & Brown, J. W. S. (2022). A high-resolution single-molecule sequencing-based Arabidopsis transcriptome using novel methods of Iso-seq analysis. *Genome Biology*, 23(1), 149.

Zhao, Q., Xiang, X., Liu, D., Yang, A., & Wang, Y. (2018). Tobacco transcription factor NtbHLH123 confers tolerance to cold stress by regulating the NtCBF pathway and reactive oxygen species homeostasis. *Frontiers in Plant Science*, 9, 381.

Zhuang, M., Calabrese, M. F., Liu, J., Waddell, M. B., Nourse, A., Hammel, M., Miller, D. J., Walden, H., Duda, D. M., Seyedin, S. N., Hoggard, T., Harper, J. W., White, K. P., & Schulman, B. A. (2009). Structures of SPOP-substrate complexes: insights into molecular architectures of BTB-Cul3 ubiquitin ligases. *Molecular Cell*, 36(1), 39-50.

8. Prilozi

Prilog I. Poravnanje sekvenci varijanti alternativnog prekrivanja gena *BPM2.1-6* opisanih u bazi TAIR10 i Pali (2020). Poravnanje je provedeno u programu Clustal Omega. Zvezdicom su označeni nukleotidi koji su identični u svih šest sekvenci.

BPM2.3	TCGCAACCTACCAAACCTGTTGTGTTTAAACCTTAAACCGATCTATCAAGCAAGTGGTTCC	60
BPM2.1	TCGCAACCTACCAAACCTGTTGTGTTTAAACCTTAAACCGATCTATCAAGCAAGTGGTTCC	60
BPM2.4	-----AAAACCTTAAACCGATCTATCAAGCAAGTGGTTCC	34
BPM2.6	-----AAACCGATCTATCAAGCAAGTGGTTCC	27
BPM2.2	-----AAACCGATCTATCAAGCAAGTGGTTCC	27
BPM2.5	-----AAACCGATCTATCAAGCAAGTGGTTCC	27

BPM2.3	TCTCTCTCTACCTCTCGTTTTTGGCCAACGTCGTCGTCTTCACGATCCACGACGATTC	120
BPM2.1	TCTCTCTCTACCTCTCGTTTTTGGCCAACGTCGTCGTCTTCACGATCCACGACGATTC	120
BPM2.4	TCTCTCTCTACCTCTCGTTTTTGGCCAACGTCGTCGTCTTCACGATCCACGACGATTC	94
BPM2.6	TCTCTCTCTACCTCTCGTTTTTGGCCAACGTCGTCGTCTTCACGATCCACGACGATTC	87
BPM2.2	TCTCTCTCTACCTCTCGTTTTTGGCCAACGTCGTCGTCTTCACGATCCACGACGATTC	87
BPM2.5	TCTCTCTCTACCTCTCGTTTTTGGCCAACGTCGTCGTCTTCACGATCCACGACGATTC	87

BPM2.3	AGTTCTTGAGTTCCGGCGATTATCGGTCTCTCACTTCTGGTTCCGTTGAACCCCTCATT	180
BPM2.1	AGTTCTTGAGTTCCGGCGATTATCGGTCTCTCACTTCTGGTTCCGTTGAACCCCTCATT	180
BPM2.4	AGTTCTTGAGTTCCGGCGATTATCGGTCTCTCACTTCTGGTTCCGTTGAACCCCTCATT	154
BPM2.6	AGTTCTTGAGTTCCGGCGATTATCGGTCTCTCACTTCTGGTTCCGTTGAACCCCTCATT	147
BPM2.2	AGTTCTTGAGTTCCGGCGATTATCGGTCTCTCACTTCTGGTTCCGTTGAACCCCTCATT	147
BPM2.5	AGTTCTTGAGTTCCGGCGATTATCGGTCTCTCACTTCTGGTTCCGTTGAACCCCTCATT	147

BPM2.3	CTCTTCTCGCCCGTGCTCTCAAATTCGATATTTGCCCTGTGATTCGAAACCCTAATTT	240
BPM2.1	CTCTTCTCGCCCGTGCTCTCAAATTCGATATTTGCCCTGTGATTCGAAACCCTAATTT	240
BPM2.4	CTCTTCTCGCCCGTGCTCTCAAATTCGATATTTGCCCTGTGATTCGAAACCCTAATTT	214
BPM2.6	CTCTTCTCGCCCGTGCTCTCAAATTCGATATTTGCCCTGTGATTCGAAACCCTAATTT	207
BPM2.2	CTCTTCTCGCCCGTGCTCTCAAATTCGATATTTGCCCTGTGATTCGAAACCCTAATTT	207
BPM2.5	CTCTTCTCGCCCGTGCTCTCAAATTCGATATTTGCCCTGTGATTCGAAACCCTAATTT	207

BPM2.3	CGCCTATCAATCTGGAAAATCTCTCAATTCGAAGACTTTAGCAGCGCAAAGATACTCTAT	300
BPM2.1	CGCCTATCAATCTGGAAAATCTCTCAATTCGAAGACTTTAGCAGCGCAAAGATACTCTAT	300
BPM2.4	CGCCTATCAATCTGGAAAATCTCTCAATTCGAAGACTTTAGCAGCGCAAAGATACTCTAT	274
BPM2.6	CGCCTATCAATCTGGAAAATCTCTCAATTCGAAGACTTTAGCAGCGCAAAGATACTCTAT	267
BPM2.2	CGCCTATCAATCTGGAAAATCTCTCAATTCGAAGACTTTAGCAGCGCAAAGATACTCTAT	267
BPM2.5	CGCCTATCAATCTGGAAAATCTCTCAATTCGAAGACTTTAGCAGCGCAAAGATACTCTAT	267

BPM2.3	CCGGGTAATAAGATCGAAGAAACCATCAATTTCTTACCAAAGTCGTGATTCTTGGATCTC	360
BPM2.1	CCGGGTAATAAGATCGAAGAAACCATCAATTTCTTACCAAAGTCGTGATTCTTGGATCTC	360
BPM2.4	CCGGGTAATAAGATCGAAGAAACCATCAATTTCTTACCAAAGTCGTGATTCTTGGATCTC	334
BPM2.6	CCGGGTAATAAGATCGAAGAAACCATCAATTTCTTACCAAAGTCGTGATTCTTGGATCTC	327
BPM2.2	CCGGGTAATAAGATCGAAGAAACCATCAATTTCTTACCAAAGTCGTGATTCTTGGATCTC	327
BPM2.5	CCGGGTAATAAGATCGAAGAAACCATCAATTTCTTACCAAAGTCGTGATTCTTGGATCTC	327

BPM2.3	GTCTTTGTTTTGATGGACACAATTAGGGTTTTCCAAGGAGGTTCTGGATCTTCGAAATCGA	420
BPM2.1	GTCTTTGTTTTGATGGACACAATTAGGGTTTTCCAAGGAGGTTCTGGATCTTCGAAATCGA	420
BPM2.4	GTCTTTGTTTTGATGGACACAATTAGGGTTTTCCAAGGAGGTTCTGGATCTTCGAAATCGA	394
BPM2.6	GTCTTTGTTTTGATGGACACAATTAGGGTTTTCCAAGGAGGTTCTGGATCTTCGAAATCGA	387
BPM2.2	GTCTTTGTTTTGATGGACACAATTAGGGTTTTCCAAGGAGGTTCTGGATCTTCGAAATCGA	387
BPM2.5	GTCTTTGTTTTGATGGACACAATTAGGGTTTTCCAAGGAGGTTCTGGATCTTCGAAATCGA	387

BPM2.3	CCGCACAGTCGCTCACGGAGTCGACCTCTCGCACGGAACCATCAATGGCTCCCACGAAT	480
BPM2.1	CCGCACAGTCGCTCACGGAGTCGACCTCTCGCACGGAACCATCAATGGCTCCCACGAAT	480
BPM2.4	CCGCACAGTCGCTCACGGAGTCGACCTCTCGCACGGAACCATCAATGGCTCCCACGAAT	454
BPM2.6	CCGCACAGTCGCTCACGGAGTCGACCTCTCGCACGGAACCATCAATGGCTCCCACGAAT	447
BPM2.2	CCGCACAGTCGCTCACGGAGTCGACCTCTCGCACGGAACCATCAATGGCTCCCACGAAT	447
BPM2.5	CCGCACAGTCGCTCACGGAGTCGACCTCTCGCACGGAACCATCAATGGCTCCCACGAAT	447

BPM2.3	TCAAGATCAGCGGCTACTCTTTGGTCAAAGGCATGGGGATTGGCAAATACGTTGCCTCGG	540
BPM2.1	TCAAGATCAGCGGCTACTCTTTGGTCAAAGGCATGGGGATTGGCAAATACGTTGCCTCGG	540
BPM2.4	TCAAGATCAGCGGCTACTCTTTGGTCAAAGGCATGGGGATTGGCAAATACGTTGCCTCGG	514
BPM2.6	TCAAGATCAGCGGCTACTCTTTGGTCAAAGGCATGGGGATTGGCAAATACGTTGCCTCGG	507
BPM2.2	TCAAGATCAGCGGCTACTCTTTGGTCAAAGGCATGGGGATTGGCAAATACGTTGCCTCGG	507
BPM2.5	TCAAGATCAGCGGCTACTCTTTGGTCAAAGGCATGGGGATTGGCAAATACGTTGCCTCGG	507

BPM2.3	ATACTTTCATGGTCGGTGGATACTCCTGGGCCATCTACTTCTACCCAGATGGAAAGAGTC	600
BPM2.1	ATACTTTCATGGTCGGTGGATACTCCTGGGCCATCTACTTCTACCCAGATGGAAAGAGTC	600
BPM2.4	ATACTTTCATGGTCGGTGGATACTCCTGGGCCATCTACTTCTACCCAGATGGAAAGAGTC	574
BPM2.6	ATACTTTCATGGTCGGTGGATACTCCTGGGCCATCTACTTCTACCCAGATGGAAAGAGTC	567
BPM2.2	ATACTTTCATGGTCGGTGGATACTCCTGGGCCATCTACTTCTACCCAGATGGAAAGAGTC	567
BPM2.5	ATACTTTCATGGTCGGTGGATACTCCTGGGCCATCTACTTCTACCCAGATGGAAAGAGTC	567

BPM2.3	CAGAGGATAAATCTGTCTACGTGTCTCTCTTCATAGCCCTTGCGAGTGAAGGAGCCGATG	660
BPM2.1	CAGAGGATAAATCTGTCTACGTGTCTCTCTTCATAGCCCTTGCGAGTGAAGGAGCCGATG	660
BPM2.4	CAGAGGATAAATCTGTCTACGTGTCTCTCTTCATAGCCCTTGCGAGTGAAGGAGCCGATG	634
BPM2.6	CAGAGGATAAATCTGTCTACGTGTCTCTCTTCATAGCCCTTGCGAGTGAAGGAGCCGATG	627
BPM2.2	CAGAGGATAAATCTGTCTACGTGTCTCTCTTCATAGCCCTTGCGAGTGAAGGAGCCGATG	627
BPM2.5	CAGAGGATAAATCTGTCTACGTGTCTCTCTTCATAGCCCTTGCGAGTGAAGGAGCCGATG	627

BPM2.3	TTAGGGCTTTGTTTGAGCTTACCCTCGTGGATCAGAGCGGTAACGAAAGGCACAAAGTTC	720
BPM2.1	TTAGGGCTTTGTTTGAGCTTACCCTCGTGGATCAGAGCGGTAACGAAAGGCACAAAGTTC	720
BPM2.4	TTAGGGCTTTGTTTGAGCTTACCCTCGTGGATCAGAGCGGTAACGAAAGGCACAAAGTTC	694
BPM2.6	TTAGGGCTTTGTTTGAGCTTACCCTCGTGGATCAGAGCGGTAACGAAAGGCACAAAGTTC	687
BPM2.2	TTAGGGCTTTGTTTGAGCTTACCCTCGTGGATCAGAGCGGTAACGAAAGGCACAAAGTTC	687
BPM2.5	TTAGGGCTTTGTTTGAGCTTACCCTCGTGGATCAGAGCGGTAACGAAAGGCACAAAGTTC	687

BPM2.3	ATAGCCATTTTGGTAGAACTCTCGAAAGCGGACCCTATACTCTTAAATATCGAGGGAGTA	780
BPM2.1	ATAGCCATTTTGGTAGAACTCTCGAAAGCGGACCCTATACTCTTAAATATCGAGGGAGTA	780
BPM2.4	ATAGCCATTTTGGTAGAACTCTCGAAAGCGGACCCTATACTCTTAAATATCGAGGGAGTA	754
BPM2.6	ATAGCCATTTTGGTAGAACTCTCGAAAGCGGACCCTATACTCTTAAATATCGAGGGAGTA	747
BPM2.2	ATAGCCATTTTGGTAGAACTCTCGAAAGCGGACCCTATACTCTTAAATATCGAGGGAGTA	747
BPM2.5	ATAGCCATTTTGGTAGAACTCTCGAAAGCGGACCCTATACTCTTAAATATCGAGGGAGTA	747

BPM2.3	TGTGGGGATACAAACGATTTTTCAAGAGGTCCTTTTGGAGTCATCGGACTATCTGAAGG	840
BPM2.1	TGTGGGGATACAAACGATTTTTCAAGAGGTCCTTTTGGAGTCATCGGACTATCTGAAGG	840
BPM2.4	TGTGGGGATACAAACGATTTTTCAAGAGGTCCTTTTGGAGTCATCGGACTATCTGAAGG	814
BPM2.6	TGTGGGGATACAAACGATTTTTCAAGAGGTCCTTTTGGAGTCATCGGACTATCTGAAGG	807
BPM2.2	TGTGGGGATACAAACGATTTTTCAAGAGGTCCTTTTGGAGTCATCGGACTATCTGAAGG	807
BPM2.5	TGTGGGGATACAAACGATTTTTCAAGAGGTCCTTTTGGAGTCATCGGACTATCTGAAGG	807

BPM2.3	ACAATGGTCTCTTGGTCCGGTGTGTGTTGGAGTGGTGAAGTCACGCACAGAAGGACCGA	900
BPM2.1	ACAATGGTCTCTTGGTCCGGTGTGTGTTGGAGTGGTGAAGTCACGCACAGAAGGACCGA	900
BPM2.4	ACAATGGTCTCTTGGTCCGGTGTGTGTTGGAGTGGTGAAGTCACGCACAGAAGGACCGA	874
BPM2.6	ACAATGGTCTCTTGGTCCGGTGTGTGTTGGAGTGGTGAAGTCACGCACAGAAGGACCGA	867
BPM2.2	ACAATGGTCTCTTGGTCCGGTGTGTGTTGGAGTGGTGAAGTCACGCACAGAAGGACCGA	867
BPM2.5	ACAATGGTCTCTTGGTCCGGTGTGTGTTGGAGTGGTGAAGTCACGCACAGAAGGACCGA *****	867
BPM2.3	GGTGTTACAATATCCCAGGTGCCGGTTTCTGGCTTGGGTGTCAGCAGTTTGGAAAGCTTTTGG	960
BPM2.1	GGTGTTACAATATCCCAGGTGCCGGTTTCTGGCTTGGGTGTCAGCAGTTTGGAAAGCTTTTGG	960
BPM2.4	GGTGTTACAATATCCCAGGTGCCGGTTTCTGGCTTGGGTGTCAGCAGTTTGGAAAGCTTTTGG	934
BPM2.6	GGTGTTACAATATCCCAGGTGCCGGTTTCTGGCTTGGGTGTCAGCAGTTTGGAAAGCTTTTGG	927
BPM2.2	GGTGTTACAATATCCCAGGTGCCGGTTTCTGGCTTGGGTGTCAGCAGTTTGGAAAGCTTTTGG	927
BPM2.5	GGTGTTACAATATCCCAGGTGCCGGTTTCTGGCTTGGGTGTCAGCAGTTTGGAAAGCTTTTGG *****	927
BPM2.3	AAAGTGGGAAAGGAGCTGACGTTACTTTTCGAAGTTGATGGAGAAACATTTCTGCTCACA	1020
BPM2.1	AAAGTGGGAAAGGAGCTGACGTTACTTTTCGAAGTTGATGGAGAAACATTTCTGCTCACA	1020
BPM2.4	AAAGTGGGAAAGGAGCTGACGTTACTTTTCGAAGTTGATGGAGAAACATTTCTGCTCACA	994
BPM2.6	AAAGTGGGAAAGGAGCTGACGTTACTTTTCGAAGTTGATGGAGAAACATTTCTGCTCACA	987
BPM2.2	AAAGTGGGAAAGGAGCTGACGTTACTTTTCGAAGTTGATGGAGAAACATTTCTGCTCACA	987
BPM2.5	AAAGTGGGAAAGGAGCTGACGTTACTTTTCGAAGTTGATGGAGAAACATTTCTGCTCACA *****	987
BPM2.3	AATTGGTTCCTTGCAGCACGTTCTGCAGTTTTTCAGGGCACAGCTTTTTGGCCCGTTGAGAA	1080
BPM2.1	AATTGGTTCCTTGCAGCACGTTCTGCAGTTTTTCAGGGCACAGCTTTTTGGCCCGTTGAGAA	1080
BPM2.4	AATTGGTTCCTTGCAGCACGTTCTGCAGTTTTTCAGGGCACAGCTTTTTGGCCCGTTGAGAA	1054
BPM2.6	AATTGGTTCCTTGCAGCACGTTCTGCAGTTTTTCAGGGCACAGCTTTTTGGCCCGTTGAGAA	1047
BPM2.2	AATTGGTTCCTTGCAGCACGTTCTGCAGTTTTTCAGGGCACAGCTTTTTGGCCCGTTGAGAA	1047
BPM2.5	AATTGGTTCCTTGCAGCACGTTCTGCAGTTTTTCAGGGCACAGCTTTTTGGCCCGTTGAGAA *****	1047
BPM2.3	GTGAAAATACCAATTGTATAATCATAGAAGACGTACAAGCCCCTATTTTCAAGGATTTTC	1140
BPM2.1	GTGAAAATACCAATTGTATAATCATAGAAGACGTACAAGCCCCTATTTTCAAG-----	1133
BPM2.4	GTGAAAATACCAATTGTATAATCATAGAAGACGTACAAGCCCCTATTTTCAAGGATTTTC	1114
BPM2.6	GTGAAAATACCAATTGTATAATCATAGAAGACGTACAAGCCCCTATTTTCAAGGTTCTCC	1107
BPM2.2	GTGAAAATACCAATTCTTTTGAAGTTGAGGCT-----	1079
BPM2.5	GTGAAAATACCAATTGTATAATCATAGAAGACGTACAAGCCCCTATTTTCAAG----- ***** * : **	1100
BPM2.3	TGTTTACGAGTGTAACAATCCGGGACCTTCTCCTGGGGTGCTGCTCCCGTTCTCAAATATT	1200
BPM2.1	-----	1133
BPM2.4	TGTTTACGAGTGTAACAATCCGGGACCTTCTCCTGGGGTGCTGCTCCCGTTCTCAAATATT	1174
BPM2.6	CTTTAACTCTTCTTCTGGACTAAAACCTGTTTTCTCCTTGGCATGACTTTGTAGAATTTTA	1167
BPM2.2	-----	1079
BPM2.5	-----	1100
BPM2.3	ACTCACCCGGGATAAGGTTTAATCTTTCTACTTTTCTTTTGGATTGCATGATTGTCTCGA	1260
BPM2.1	-----	1133
BPM2.4	ACTCACCCGGGATAAG-----	1190
BPM2.6	TATTTGTAGCTTTAGAAGTTGAGGCTGTTAGTTTGTAGTCCTAAGTGATAAGGCCTTATA	1227
BPM2.2	-----	1079
BPM2.5	-----	1100
BPM2.3	TTTCCCGCATGCAGTAAATACATAGAGAAATTATGTTATAGATCATCATGTTTATGTCAA	1320
BPM2.1	-----	1133
BPM2.4	-----	1190
BPM2.6	AGAAGAGATAGCTTTCTTGGTTCCTTGCCTTTTCTCGGGTGAGTGATTGTGGTGTGATAC	1287
BPM2.2	-----	1079
BPM2.5	-----	1100

BPM2.3	ATTTTCTGCTTTTCAGCTTTGCTTTTTTTTTGTTAAGATTGGTCTTTAGTCGATGTGCGAG	1380
BPM2.1	-----	1133
BPM2.4	-----	1190
BPM2.6	AGGATTTTCTGTTTACGAGTGTTACAATCCGGGACCTTCTCCTGGGGTGCTGCTCCCGTTC	1347
BPM2.2	-----	1079
BPM2.5	-----	1100
BPM2.3	TTTTAGATCATGGCTCCTGTAAATTTAAGGTTGATACAAATTCCTTCTTTTGGTTTAT	1440
BPM2.1	-----	1133
BPM2.4	-----	1190
BPM2.6	TCAAATATTACTCACCCGGGATAAGGTTTAACTTTCTACTTTTCTTTTGGATTGCATGA	1407
BPM2.2	-----	1079
BPM2.5	-----	1100
BPM2.3	TGTACTTTTTTGTGTTGTTGTCAGATGTTGCTTCATTTTATCTACTGGGATGAAATGCCT	1500
BPM2.1	-----ATGTTGCTTCATTTTATCTACTGGGATGAAATGCCT	1169
BPM2.4	-----ATGTTGCTTCATTTTATCTACTGGGATGAAATGCCT	1226
BPM2.6	TTGTCTCGATTTC-----	1420
BPM2.2	-----	1079
BPM2.5	-----ATGTTGCTTCATTTTATCTACTGGGATGAAATGCCT	1136
BPM2.3	GATATGCAAGACTTAATCGGCACAGACTTGAATGGGCATCAACTCTTGTGGCTCAGCAT	1560
BPM2.1	GATATGCAAGACTTAATCGGCACAGACTTGAATGGGCATCAACTCTTGTGGCTCAGCAT	1229
BPM2.4	GATATGCAAGACTTAATCGGCACAGACTTGAATGGGCATCAACTCTTGTGGCTCAGCAT	1286
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	-----	1079
BPM2.5	GATATGCAAGACTTAATCGGCACAGACTTGAATGGGCATCAACTCTTGTGGCTCAGCAT	1196
BPM2.3	CTGCTTGCAGCTGCAGACCGTTATGCTCTTGAGCGGCTTAGAACAATATGCGAGTCAAAA	1620
BPM2.1	CTGCTTGCAGCTGCAGACCGTTATGCTCTTGAGCGGCTTAGAACAATATGCGAGTCAAAA	1289
BPM2.4	CTGCTTGCAGCTGCAGACCGTTATGCTCTTGAGCGGCTTAGAACAATATGCGAGTCAAAA	1346
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	-----	1079
BPM2.5	CTGCTTGCAGCTGCAGACCGTTATGCTCTTGAGCGGCTTAGAACAATATGCGAGTCAAAA	1256
BPM2.3	CTCTGTGAAGGAATCAGCATAAATACGGTAGCAACCACCTTGGCTCTTGCAGAGCAGCAT	1680
BPM2.1	CTCTGTGAAGGAATCAGCATAAATACGGTAGCAACCACCTTGGCTCTTGCAGAGCAGCAT	1349
BPM2.4	CTCTGTGAAGGAATCAGCATAAATACGGTAGCAACCACCTTGGCTCTTGCAGAGCAGCAT	1406
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	-----	1079
BPM2.5	CTCTGTGAAGGAATCAGCATAAATACGGTAGCAACCACCTTGGCTCTTGCAGAGCAGCAT	1316
BPM2.3	CATTGTTTCCAGCTGAAAGCCGCCTGCCTCAAATTTATAGCTTTGCCAGAAAACCTGAAA	1740
BPM2.1	CATTGTTTCCAGCTGAAAGCCGCCTGCCTCAAATTTATAGCTTTGCCAGAAAACCTGAAA	1409
BPM2.4	CATTGTTTCCAGCTGAAAGCCGCCTGCCTCAAATTTATAGCTTTGCCAGAAAACCTGAAA	1466
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	-----	1079
BPM2.5	CATTGTTTCCAGCTGAAAGCCGCCTGCCTCAAATTTATAGCTTTGCCAGAAAACCTGAAA	1376
BPM2.3	G-----	1741
BPM2.1	G-----	1410
BPM2.4	G-----	1467
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	-----	1079
BPM2.5	GGTACAGAAGATCACTCCTTGCTTGTTTGAATCGCTTTGATCATGTCTGAAATCTGAAGG	1436

BPM2.3	-----CTGTGATGGAAACGGATGGGTT	1763
BPM2.1	-----CTGTGATGGAAACGGATGGGTT	1432
BPM2.4	-----CTGTGATGGAAACGGATGGGTT	1489
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	-----	1079
BPM2.5	CCGCCCTTGTAACAAAAGTTGTCTGTAATTTCTTTAGCTGTGATGGAAACGGATGGGTT	1496
BPM2.3	TGATTATCTGAAGGAAAGCTGCCCGTCCCTACTAAGTGAGCTATTGGAGTATGTGGCTAG	1823
BPM2.1	TGATTATCTGAAGGAAAGCTGCCCGTCCCTACTAAGTGAGCTATTGGAGTATGTGGCTAG	1492
BPM2.4	TGATTATCTGAAGGAAAGCTGCCCGTCCCTACTAAGTGAGCTATTGGAGTATGTGGCTAG	1549
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	-----GAAAGCTGCCCGTCCCTACTAAGTGAGCTATTGGAGTATGTGGCTAG	1126
BPM2.5	TGATTATCTGAAGGAAAGCTGCCCGTCCCTACTAAGTGAGCTATTGGAGTATGTGGCTAG	1556
BPM2.3	GCTGAGTGAGCACTCTTTAACATCATCAGGGCATCGAAAGGAGTTATTTGCTGATGGTTG	1883
BPM2.1	GCTGAGTGAGCACTCTTTAACATCATCAGGGCATCGAAAGGAGTTATTTGCTGATGGTTG	1552
BPM2.4	GCTGAGTGAGCACTCTTTAACATCATCAGGGCATCGAAAGGAGTTATTTGCTGATGGTTG	1609
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	GCTGAGTGAGCACTCTTTAACATCATCAGGGCATCGAAAGGAGTTATTTGCTGATGGTTG	1186
BPM2.5	GCTGAGTGAGCACTCTTTAACATCATCAGGGCATCGAAAGGAGTTATTTGCTGATGGTTG	1616
BPM2.3	TGACTTAAATGGGAGACGTGTGAAGCAACGGTTACATTAGCAACTAATTGAGAGAGAGAG	1943
BPM2.1	TGACTTAAATGGGAGACGTGTGAAGCAACGGTTACATTAGCAACTAATTGAGAGAGAGAG	1612
BPM2.4	TGACTTAAATGGGAGACGTGTGAAGCAACGGTTACATTAGCAACTAATTGAGAGAGAGAG	1669
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	TGACTTAAATGGGAGACGTGTGAAGCAACGGTTACATTAGCAACTAATTGAGAGAGAGAG	1246
BPM2.5	TGACTTAAATGGGAGACGTGTGAAGCAACGGTTACATTAGCAACTAATTGAGAGAGAGAG	1676
BPM2.3	AGAGAGAGAGGTCACTTCGAGAGCCTGAGAAGATGATGGTGAAGTAAACAGAATTTTAGA	2003
BPM2.1	AGAGAGAGAGGTCACTTCGAGAGCCTGAGAAGATGATGGTGAAGTAAACAGAATTTTAGA	1672
BPM2.4	AGAGAGAGAGGTCACTTCGAGAGCCTGAGAAGATGATGGTGAAGTAAACAGAATTTTAGA	1729
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	AGAGAGAGAGGTCACTTCGAGAGCCTGAGAAGATGATGGTGAAGTAAACAGAATTTTAGA	1306
BPM2.5	AGAGAGAGAGGTCACTTCGAGAGCCTGAGAAGATGATGGTGAAGTAAACAGAATTTTAGA	1736
BPM2.3	AGAGTAAAGATTTGTGTATTTGTCATTGTAAAAGGATTAGTGGTTGATCTGTGTTGTTCA	2063
BPM2.1	AGAGTAAAGATTTGTGTATTTGTCATTGTAAAAGGATTAGTGGTTGATCTGTGTTGTTCA	1732
BPM2.4	AGAGTAAAGATTTGTGTATTTGTCATTGTAAAAGGATTAGTGGTTGATCTGTGTTGTTCA	1789
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	AGAGTAAAGATTTGTGTATTTGTCATTGTAAAAGGATTAGTGGTTGATCTGTGTTGTTCA	1366
BPM2.5	AGAGTAAAGATTTGTGTATTTGTCATTGTAAAAGGATTAGTGGTTGATCTGTGTTGTTCA	1796
BPM2.3	GCTAGCTAATAGAGTGAAATGTTGGGTTTTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTTTTCCCAG	2123
BPM2.1	GCTAGCTAATAGAGTGAAATGTTGGGTTTTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTTTTCCCAG	1792
BPM2.4	GCTAGCTAATAGAGTGAAATGTTGGGTTTTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTTTTCCCAG	1849
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	GCTAGCTAATAGAGTGAAATGTTGGGTTTTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTTTTCCCAG	1426
BPM2.5	GCTAGCTAATAGAGTGAAATGTTGGGTTTTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTTTTCCCAG	1856
BPM2.3	GATTTTATGACCAGAACCGGTTCTCTCAAGGAAAAAGTTTCATGTGACTTCATTGATAAA	2183
BPM2.1	GATTTTATGACCAGAACCGGTTCTCTCAAGGAAAAAGTTTCATGTGACTTCATTGATAAA	1852
BPM2.4	GATTTTATGACCAGAACCGGTTCTCTCAAGGAAAAAGTTTCATGTGACTTCATTGATAAA	1909
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	GATTTTATGACCAGAACCGGTTCTCTCAAGGAAAAAGTTTCATGTGACTTCATTGATAAA	1486
BPM2.5	GATTTTATGACCAGAACCGGTTCTCTCAAGGAAAAAGTTTCATGTGACTTCATTGATAAA	1916

BPM2.3	TTTGGACTTGCCAAAAATCATTGCAGAACTGGTTCTAATATGTTTGAACAAAAAGTTC	2243
BPM2.1	TTTGGACTTGCCAAAAATCATTGCAGAACTGGTTCTAATATGTTTGAACAAAAAGTTC	1912
BPM2.4	TTTGGACTTGCCAAAAATCATTGCAGAACTGGTTCTAATATGTTTGAACAAAAAGTTC	1969
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	TTTGGACTTGCCAAAAATCATTGCAG-----	1512
BPM2.5	TTTGGACTTGCCAAAAATCATTGCAG-----	1942

BPM2.3	ACTAAGCTTTCTTATTTGAGGTCCAGACAATAACCTTTTGATATGTCCAATAGGACAAC	2303
BPM2.1	ACTAAGCTTTCTTATTTGAGGTCCAGACAATAACCTTTTGATATGTCCAATAGGACAAC	1972
BPM2.4	ACTAAGCTTTCTTATTTGAGGTCCCA-----	1995
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	-----	1512
BPM2.5	-----	1942

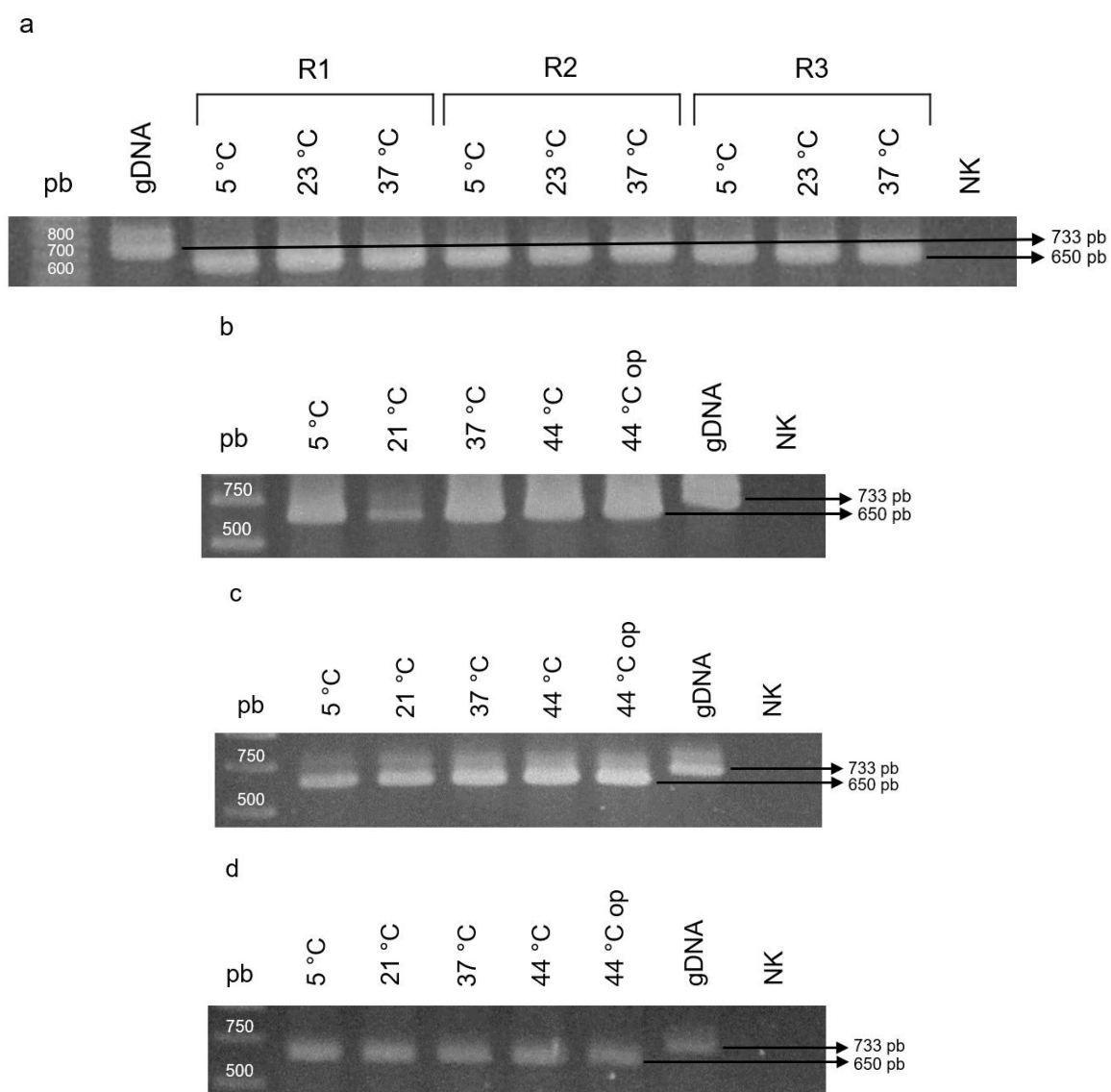
BPM2.3	TATTTAAGTCTCAACCACACAACAAAGT	2331
BPM2.1	TATTTAAGTCTCAACCACACAACAAAGT	2000
BPM2.4	-----	1995
BPM2.6	-----	1420
BPM2.2	-----	1512
BPM2.5	-----	1942

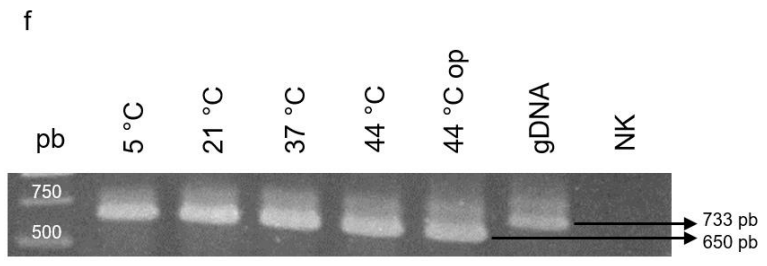
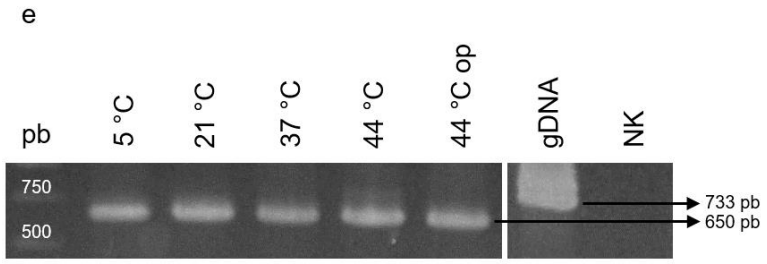
Prilog II. Specifične sekvence promotorskih motiva. n – bilo koji nukleotid.

Element	Sekvenca 5' → 3'	Referenca
ABRE	ACACGTGTC	Gómez-Porras i sur., 2007
	ATACGTGTC	
	CCACGTGTC	
	CTACGTGTC	
	ACACGTGTA	
	ATACGTGTA	
	CCACGTGTA	
	CTACGTGTA	
	TCACGTGTC	
	TTACGTGTC	
	GCACGTGTC	
	GTACGTGTC	
	ACACGTGGC	
	ACACGTGTT	
	ATACGTGGC	
	ATACGTGTT	
	CCACGTGGC	
	CCACGTGTT	
	CTACGTGGC	
	CTACGTGTT	
	TCACGTGTA	
	TTACGTGTA	
	ACACGTGTG	
	ATACGTGTG	
	CCACGTGTG	

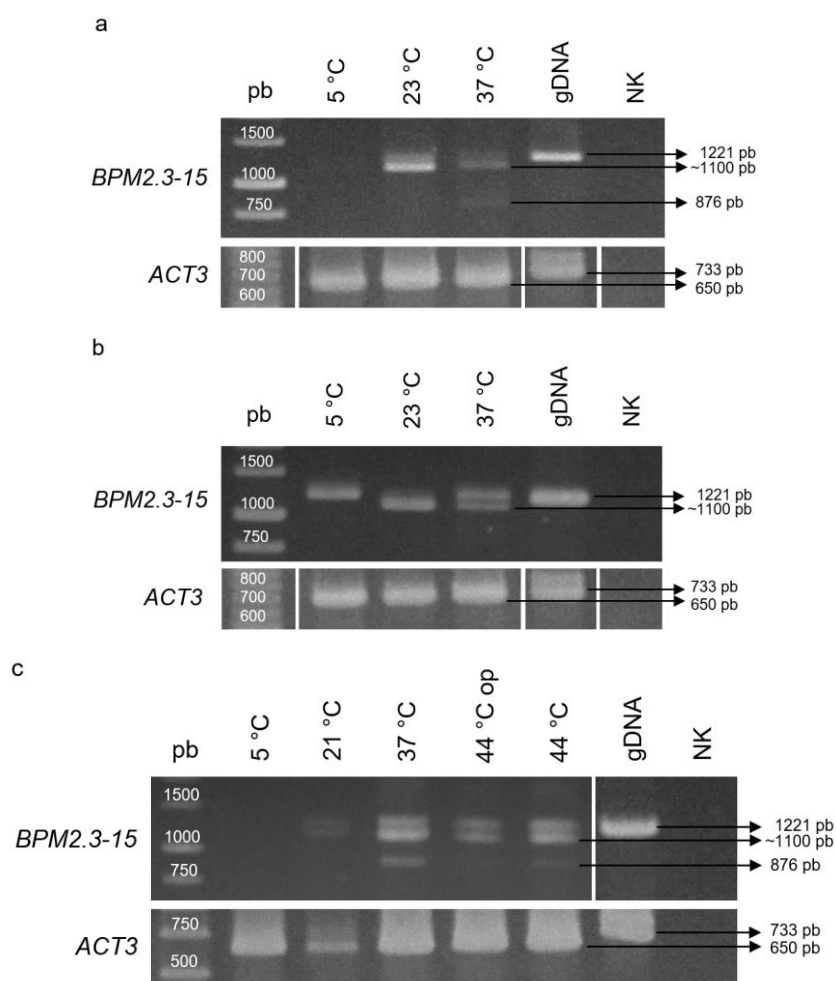
	CTACGTGTG	
	GCACGTGTA	
	GTACGTGTA	
CE1	CCACC	Lee i sur., 2010
DRE	ACCGAC	
CE3	CCGCCGCGCC	Gómez-Porras i sur., 2007
	ACGCCGCGCC	
	CCGCGGCGCT	
	ACGCGGCGCT	
	CCGCCGCTCT	
	CCGCCGGGCT	
	CCGCCTCGCT	
HSE	AGAAnnTTCT	Nover i sur., 2001

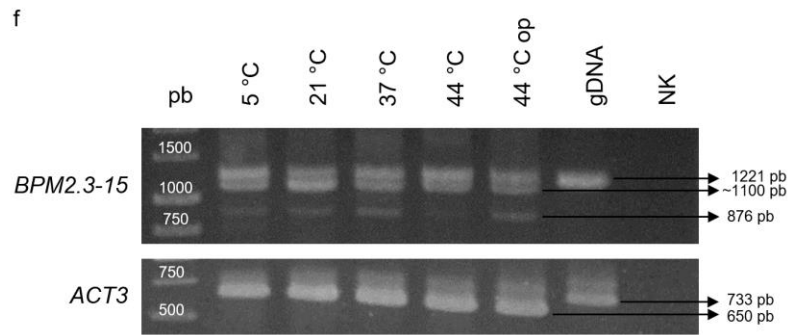
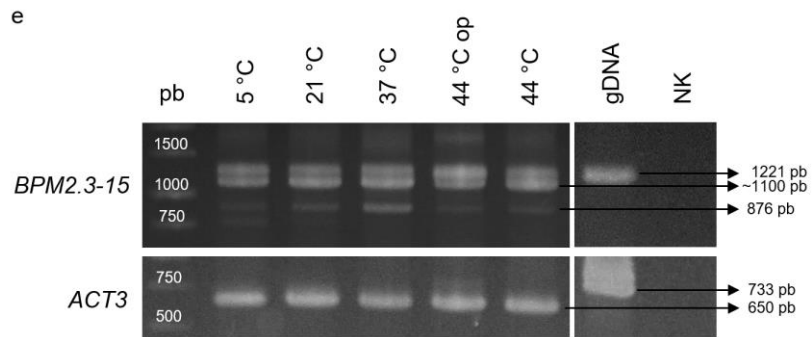
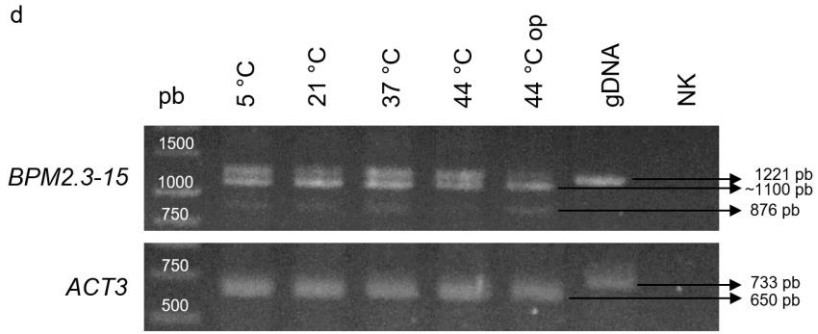
Prilog III. Provjera uspješnosti reverzne transkripcije i čistoće dobivene cDNA u klijancima, cvjetnim pupovima i oplodjenim cvjetovima biljaka kontrolne skupine (23 °C, odnosno 21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C). Donji fragment veličine 650 pb odgovara produktu umnažanja gena *ACT3* na kalupu cDNA, a fragment od 733 pb produktu umnažanja na kalupu gDNA. a) tri replike uzorka klijanaca, b) prva replika uzorka cvjetnih pupova, c) druga replika uzorka cvjetnih pupova, d) treća replika uzorka cvjetnih pupova, e) prva replika uzorka oplodjenih cvjetova, f) druga replika uzorka oplodjenih cvjetova. pb – molekularni standardi GeneRuler 100 bp DNA Ladder i GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 5 °C, 21 °C, 23 °C, 37 °C, 44 °C – temperaturni tretmani; op – oporavak 11 h i 15 min nakon tretmana; NK – negativna kontrola; R1 – prva replika; R2 – druga replika; R3 – treća replika.



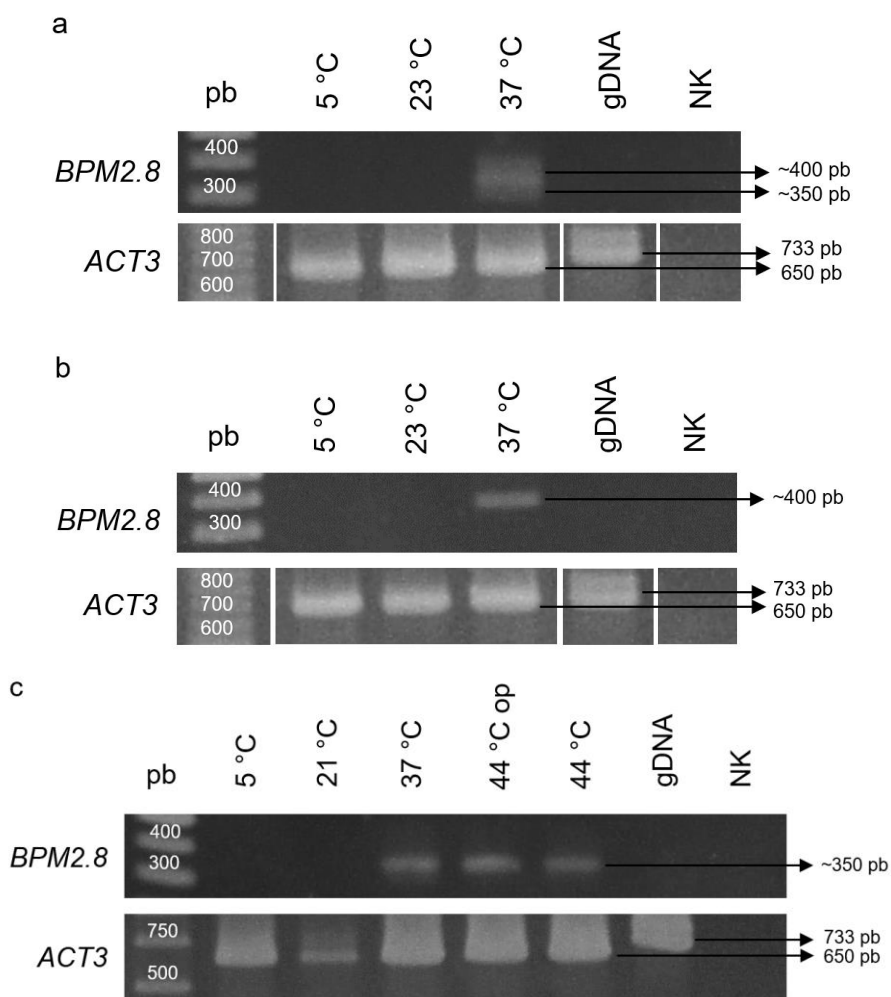


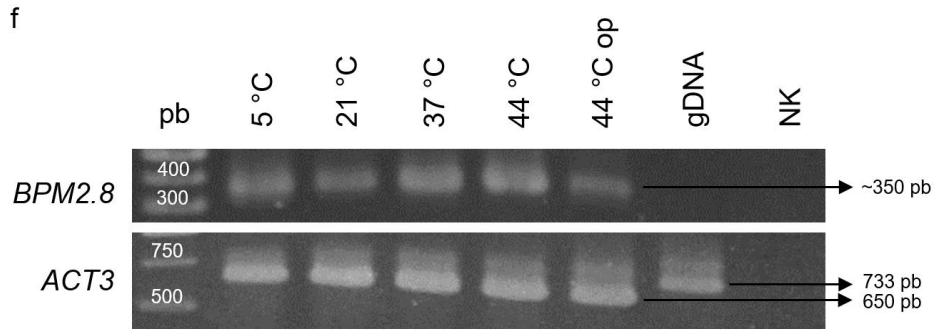
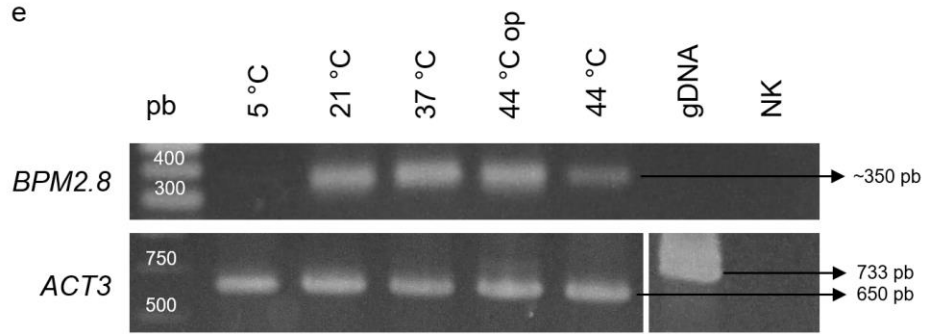
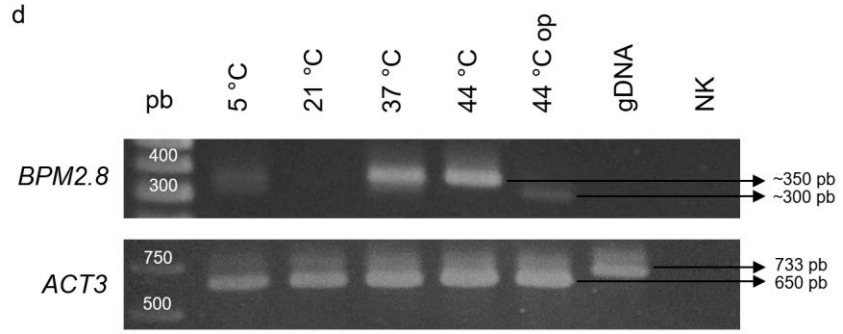
Prilog IV. Analiza ekspresije varijanti alternativnog prekrajanja *BPM2.3* i *BPM2.15* u uzorcima klijanaca, cvjetnih pupova i oplodjenih cvjetova biljaka kontrolne skupine (23 °C, odnosno 21 °C) te onih izlozenih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C). Gornji fragment velicine 1221 pb predstavlja ocekivanu varijantu *BPM2.3*, a fragment velicine 876 pb varijantu *BPM2.15*. Fragment velicine oko 1100 pb najvjerojatnije pripada novoj varijanti. Donji gel prikazuje produkte umnazanja gena *ACT3* pri čemu fragment od 650 pb odgovara produktu umnazanja na kalupu cDNA, a fragment od 733 pb produktu umnazanja na kalupu gDNA. a) prva replika uzorka klijanaca, b) druga replika uzorka klijanaca, c) prva replika uzorka cvjetnih pupova, d) treća replika uzorka cvjetnih pupova, e) prva replika uzorka oplodjenih cvjetova, f) druga replika uzorka oplodjenih cvjetova. pb – molekularni standardi GeneRuler 100 bp DNA Ladder i GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 5 °C, 21 °C, 23 °C, 37 °C, 44 °C – temperaturni tretmani; op – oporavak 11 h i 15 min nakon tretmana; NK – negativna kontrola.



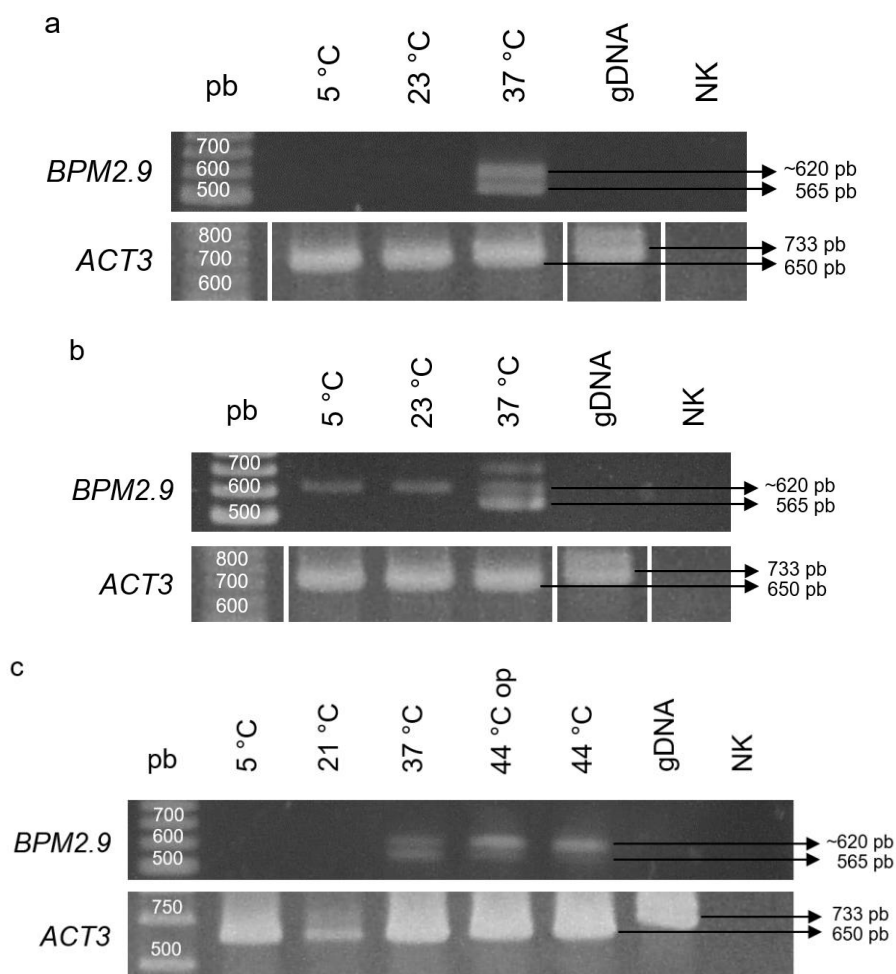


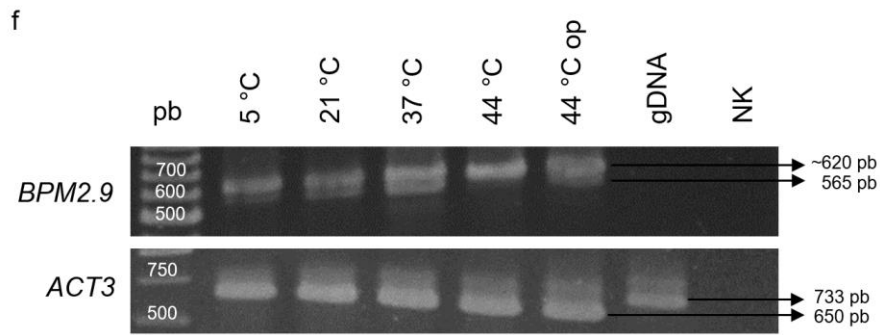
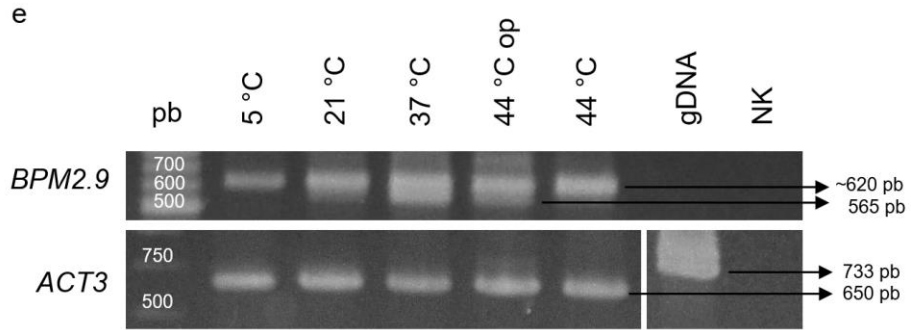
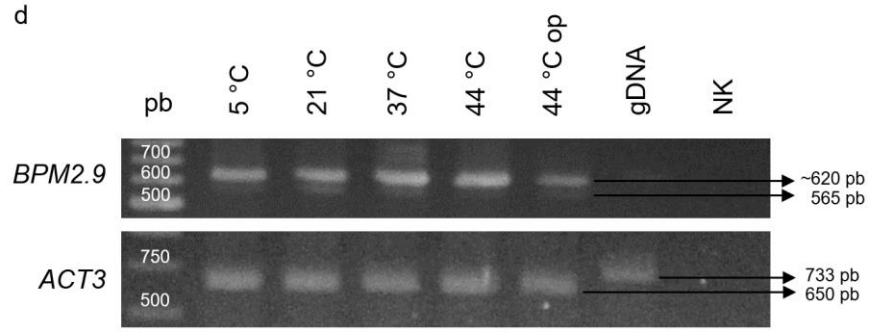
Prilog V. Analiza ekspresije varijante alternativnog prekrajanja *BPM2.8* u uzorcima klijanaca, cvjetnih pupova i oplodjenih cvjetova biljaka kontrolne skupine (23 °C, odnosno 21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C). Donji fragment veličine 310 pb predstavlja očekivanu varijantu *BPM2.8*. Fragment veličine oko 350 pb najvjerojatnije pripada novoj varijanti. Donji gel prikazuje produkte umnažanja gena *ACT3* pri čemu fragment od 650 pb odgovara produktu umnažanja na kalupu cDNA, a fragment od 733 pb produktu umnažanja na kalupu gDNA. a) prva replika uzorka klijanaca, b) druga replika uzorka klijanaca, c) prva replika uzorka cvjetnih pupova, d) druga replika uzorka cvjetnih pupova, e) prva replika uzorka oplodjenih cvjetova, f) druga replika uzorka oplodjenih cvjetova. pb – molekularni standardi GeneRuler 100 bp DNA Ladder i GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 5 °C, 21 °C, 23 °C, 37 °C, 44 °C – temperaturni tretmani; op – oporavak 11 h i 15 min nakon tretmana; NK – negativna kontrola.



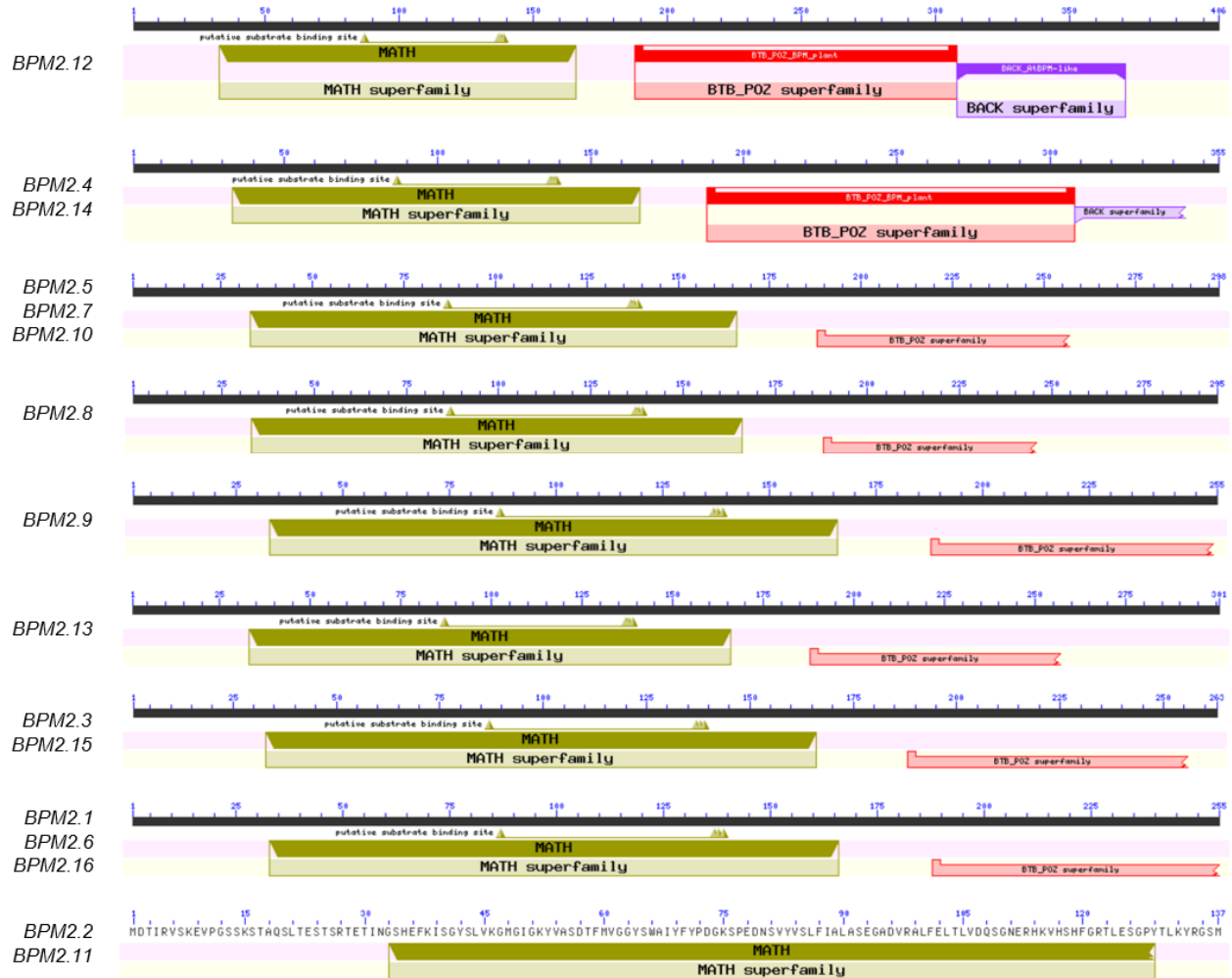


Prilog VI. Analiza ekspresije varijante alternativnog prekrajanja BPM2.9 u uzorcima klijanaca, cvjetnih pupova i oplodjenih cvjetova biljaka kontrolne skupine (23 °C, odnosno 21 °C) te onih izloženih hladnom (5 °C) i toplinskom stresu (37 °C i 44 °C). Donji fragment veličine 565 pb predstavlja očekivanu varijantu BPM2.9. Fragment veličine oko 620 pb najvjerojatnije pripada novoj varijanti. Donji gel prikazuje produkte umnažanja gena ACT3 pri čemu fragment od 650 pb odgovara produktu umnažanja na kalupu cDNA, a fragment od 733 pb produktu umnažanja na kalupu gDNA. a) druga replika uzorka klijanaca, b) treća replika uzorka klijanaca, c) prva replika uzorka cvjetnih pupova, d) treća replika uzorka cvjetnih pupova, e) prva replika uzorka oplodjenih cvjetova, f) druga replika uzorka oplodjenih cvjetova. pb – molekularni standardi GeneRuler 100 bp DNA Ladder i GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 5 °C, 21 °C, 23 °C, 37 °C, 44 °C – temperaturni tretmani; op – oporavak 11 h i 15 min nakon tretmana; NK – negativna kontrola.





Prilog VII. Prikaz konzerviranih domena proteina BPM2 kodiranih varijantama alternativnog prekrajanja *BPM2.1-16*. Zelenom bojom je prikazana domena MATH, crvenom domena BTB, a ljubičastom domena BACK.



9. Životopis

Rođena sam 30. srpnja 2000. godine u Čakovcu. U Varaždinu sam završila Prvu osnovnu školu Varaždin i Prvu gimnaziju Varaždin. 2019. godine upisala sam preddiplomski studij Molekularne biologije, a 2022. godine diplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija sam sudjelovala u popularizaciji znanosti kroz radionicu u udruzi Bioteka i predavanje u sklopu seminara BioStudoLogije. Akademske godine 2023./2024. sudjelovala sam u demonstraturama iz kolegija Kultura animalnih i biljnih stanica. Laboratorijsku stručnu praksu odradila sam u herbariju Botaničkog zavoda i Laboratoriju za kemijsku biologiju Instituta Ruđer Bošković. Od 2022. godine sudjelujem u radu Centra izvrsnosti za biologiju Varaždinske županije kao mentorica.