Ekspresija gena za biljnu seril-tRNA-sintetazu u uvjetima stresa

Baranašić, Jurica

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:745477

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

JURICA BARANAŠIĆ

Ekspresija gena za biljnu seril-tRNA-sintetazu u uvjetima stresa

DIPLOMSKI RAD

Zagreb
2017.

JURICA BARANAŠIĆ

Ekspresija gena za biljnu seril-tRNA-sintetazu u uvjetima stresa

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog stupnja

magistra kemije

Zagreb
2017.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod neposrednim voditeljstvom dr. sc. Maria Kekeza i mentorstvom doc. dr. sc. Jasmine Rokov Plavec, predan je na ocjenu Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar kemije.

Veliko hvala

… mentorici Jasmini Rokov Plavec na poticanju na razmišljanje, savjetima i svoj pomoći oko izvođenja diplomskog rada…

… Mariu na optimizmu i savjetima oko eksperimenata, i hvala na prvođenju analize enzimske aktivnosti, te hvala na lijepoj atmosferi u labosu..

… svim članovima Zavodu za biokemiju na spremnosti pomoći i savjetima i ugodnoj atmosferi u labosu…

… Nataši Bauer na svim savjetima oko biljčica…

… mojim prijateljima (posebice Kristini i Kaji) na prijateljstvu i vjerovanju u mene i u onim malo manje lijepim situacijama…

… djelatnicima MIOC-a (posebice aktivu kemije, aktivu biologije i Renati) na podršci i suradnji tijekom većine diplomskog studija…

… roditeljima na potpori i pomoći tijekom studija

Sadržaj

1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 2
2.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze 2
2.2. Seril-tRNA-sintetaza iz biljke *Arabidopsis thaliana* 4
2.3. *Arabidopsis thaliana* (uročnjak) 5
2.4. Nekanonske uloge biljnih aaRS u odgovoru na biotički i abiotički stres 6
2.5. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze 9
3. MATERIJALI I METODE 15
3.1. Uzgoj transgeničnih biljaka 15
3.2. Izolacija ukupne RNA 17
3.2.1. Metoda 1 17
3.2.2. Metoda 2 18
3.2.3. Metoda 3 19
3.2.4. Odabrana metoda za izolaciju ukupne RNA iz biljnog materijala 19
3.3. DNazni tretman 20
3.4. Reverzna transkripcija 21
3.5. Izolacija proteina 22
3.6. *Western*-hibridizacija 25
3.7. Provjera enzimske aktivnosti 28
3.8. Uzgoj biljaka izloženih stresu 28
3.9. Kvantitativni PCR (qPCR) 30
4. REZULTATI I DISKUSIJA 33
4.1. Analiza transgeničnih biljaka koje prekomjerno eksprimiraju SerRS 33
4.1.1. Analiza ekspresije na razini mRNA 34
4.1.1.1. Odabir metode za izolaciju ukupne RNA 34
4.1.1.2. Provjera početnica 38
4.1.1.3. Ekspresija fuzijskih konstrukta kod transgeničnih biljaka 40
4.1.2. Ekspresija gena za protein BEN1 u transgeničnim biljkama 46
4.1.3. Provjera prisutnosti GFP-SerRS konstrukta pomoću fluorescentnog mikroskopa 48
4.1.4. Analiza ekspresije i enzimske aktivnosti fuzijskih proteina 49
4.1.5. Fenotipska karakterizacija transgeničnih biljaka 55

4.2. Ekspresija gena za SerRS u biljaka izloženih abiotičkom stresu 57
5. Zaključak 62
6. Literaturna vrela 63
7. Životopis 66

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet **Diplomski rad**

Kemijski odsjek

EKSPRESIJA GENA ZA BILJNU SERIL-tRNA-SINTETAZU U UVJETIMA STRESA

Jurica Baranašić

Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Seril-tRNA-sintetaza (SerRS) kao i ostale aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) kovalentno povezuje aminokiselinu s odgovarajućom tRNA. Uz kanonsku ulogu u biosintezi proteina uočene su i neke nekanonske uloge aaRS, kao npr. sudjelovanje u staničnom odgovoru na stres. Prethodno je uočeno da transgenične biljke *Arabidopsis thaliana* koje prekomjerno eksprimiraju SerRS bolje kliju i brže rastu u odnosu na divlji tip biljke nakon izlaganja stresu. Također je pokazano kako SerRS stupa u interakciju s proteinom BEN1 koji sudjeluje u metabolizmu biljnih hormona brasinosteroida, koji sudjeluju u staničnom odgovoru na stres. U svrhu bolje karakterizacije interakcije SerRS i BEN1 te njihove potencijalne uloge u staničnom odgovoru na stres, analizirane su transgenične biljke koje prekomjerno eksprimiraju SerRS u obliku fuzijskih proteina. RT-qPCR-om, *western*-hibridizacijom, fluorescencijskom mikroskopijom i analizom enzimske aktivnosti pokazano je kako sve ispitane transgenične linije prekomjerno eksprimiraju kinetički aktivne fuzijske SerRS proteine. Fenotipskom analizom nije uočena razlika između transgeničnih biljaka i biljaka divljeg tipa. Prekomjerna ekspresija SerRS ne utječe na ekspresiju gena za BEN1 protein. Ispitana je ekspresija gena za SerRS pri četiri uvjeta abiotičkog stresa izazvanog povećanom koncentracijom kadmijevih iona, te je pokazano kako u većini uvjeta dolazi do povećanja ekspresije gena za SerRS. Podaci upućuju na aktivno sudjelovanje SerRS u staničnim odgovorima na abiotički stres.

(66 + V stranica, 28 slika, 19 tablica, 42 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb

Ključne riječi: seril-tRNA-sintetaza, abiotički stres, RT-qPCR, *Arabidopsis thaliana*, transgenične biljke

Mentor: Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Neposredni voditelj: Dr. sc. Mario Kekez

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Izv. prof. dr. sc.Iva Juranović Cindrić

Izv. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki

Rad prihvaćen 9. veljače, 2017.

University of Zagreb

Faculty of Science **Graduation Thesis**

Department of Chemistry

EXPRESSION OF THE PLANT SERYL-tRNA SYNTHETASE GENE UNDER STRESS CONDITIONS

Jurica Baranašić

Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Seryl-tRNA-synthetase (SerRS) just like all aminoacyl-tRNA synthetase covalently bonds amino acid with the cognate tRNA. Besides their main function in protein biosynthesis, aaRSa also developed some non-canonical functions such as participation in cellular responses to stress. Previously, it was shown that the transgenic *Arabidopsis thaliana* plants, that overexpress SerRS, sprout better and grow faster than wild type plants after the exposure to stress conditions. It was also shown that SerRS interacts with BEN1, a protein that is probably involved in cellular responses to stress. To better characterize the interaction between SerRS and BEN1 and their role in cell response to stress, transgenic lines that contain SerRS fusion constructs were investigated. RT-qPCR, western blot, enzyme activity analysis and fluorescent microscopy show that all transgenic lines overexpress kinetically active SerRS-fusion proteins. Phenotypic analysis didn't show any difference between transgenic plants and wild type plants. Overexpression of SerRS gene doesn't affect the expression of gene coding for BEN1. The expression of SerRS gene was monitored under four different conditions of abiotic stress, caused by high cadmium concentrations. The results show that under most conditions the expression of SerRS gene is enhanced, which indicates that SerRS is actively involved in cellular responses to abiotic stress.

(66 + V pages, 28 figures, 19 tables, 42 references, original in croatian language)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102a, Zagreb

Keywords: seryl-tRNA synthetase, transgenic plants, *Arabidopsis thaliana*, RT-qPCR, abiotic stress

Supervisor: Jasmina Rokov Plavec, PhD, Asst. Prof.

Assistant Supervisor: Mario Kekez, PhD

Reviewers: Jasmina Rokov Plavec, PhD, Asst. Prof.

Iva Juranović Cindrić, PhD, Assoc. Prof.

Biserka Prugovečki, PhD, Assoc. Prof

Thesis accepted on 9th of Ferurary 2017.

1. UVOD

Seril-tRNA-sintetaza (SerRS) je enzim koji pripada obitelji enzima aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS). Kanonska uloga ovih enzima je kovalentno vezanje aminokiseline na pripadajuću molekulu tRNA, čime nastaje aminoacilirana tRNA koja je supstrat u biosintezi proteina na ribosomu. AaRS su uz svoju kanonsku ulogu također razvile razne nekanonske uloge: sudjelovanje u imunološkom odgovoru, apoptozi, staničnom odgovoru na stres i drugo (1). Uočeno je da izlaganje biljke *Arabidopsis thaliana* abiotičkom stresu dovodi do promjene koncentracije nekih proteina, među kojima se nalazi i SerRS (2). Istraživanja na Zavodu za biokemiju su pokazala da transgenične biljke *A. thaliana* koje prekomjerno eksprimiraju SerRS bolje kliju i brže rastu u odnosu na divlji tip biljke nakon izlaganja stresu. Također je pokazano kako SerRS stupa u interakciju s proteinom BEN1 koji sudjeluje u metabolizmu biljnih hormona brasinosteroida, koji sudjeluju u staničnom odgovoru na stres (3).

U svrhu bolje karakterizacije interakcije SerRS i BEN1 te njihove potencijalne uloge u staničnom odgovoru na stres, potrebno je analizirati transgenične biljke koje prekomjerno eksprimiraju SerRS u obliku fuzijskih proteina. Provjerit će se koliko je povećana ekspresija gena za SerRS kod pojedinih transgeničnih linija, te da li povećana ekspresija gena za SerRS utječe na ekspresiju gena za BEN1. Također će se provjeriti aktivnost fuzijskih proteina SerRS-a, te će se odrediti fenotip transgeničnih linija u odnosu na divlji tip. Kako bi se odredio utjecaj abiotičkog stresa na ekspresiju gena za SerRS divlji tip klijanaca biljke *A. thaliana* bit će izložen povećanim koncentracijama kadmijevih iona, te će biti izloženi stresu 8 i 24 sata. Za provjeru ekspresije gena iz klijanaca će se izolirati ukupna RNA, koja će biti analizirana metodom reverzne transkripcije spregnute s kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (RT-qPCR). Fluorescencijskim mikroskopom i *western*-hibridizacijom bit će provjereno postoje li fuzijski proteini kod transgeničnih linija. Fenotip će se odrediti praćenjem rasta transgeničnih linija i biljaka divljeg tipa.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Biosinteza proteina je kompleksni proces koji se može podijeliti u dva stupnja. Prvi stupanj je kovalentno povezivanje aminokiseline s odgovarajućom molekulom tRNA u reakciji aminoacilacije. Reakcija aminoacilacije katalizirana je aminoacil-tRNA-sintetazama (aaRS). Drugi stupanj je komplementarno sparivanje određenog antikodona aminoacilirane tRNA i kodona mRNA, te stvaranje polipeptidnog lanca (proteina) na ribosomu (4).

Za svaku od 20 aminokiselina postoji specifična aaRS. AaRS se razlikuju u strukturi i funkciji, te su podijeljene u dva razreda. Razred I podijeljen na pet podrazreda i uključuje 11 aaRS (MetRS, LeuRS, IleRS, ValRS, CysRS, GlnRS, GluRS, TyrRS, TrpRS, ArgRS i LysRS). Razred II podijeljen ja na tri podrazreda i uključuje 10 aaRS (SerRS, ProRS, ThrRS, GlyRS, HisRS, AspRS, AsnRS, LysRS, PheRS i AlaRS) (4) (5). Lizil-tRNA-sintetaza (LysRS) je jedina aaRS koja je svrstana u oba razreda. Različiti organizmi imaju različite LysRS koje se mogu svrstati u jedan ili drugi razred, a neke metanogene arheje sadrže oba tipa enzima (6).

AaRS su enzimi s više domena. Katalitička domena katalizira reakciju aminoacilacije i očuvana je među enzimima istog razreda. AaRS sadrže i tRNA-veznu domenu, domenu za stabilizaciju aaRS:tRNA kompleksa, a neke od aaRS sadrže domenu za hidrolizu pogrešno aminoacilirane tRNA (4).

Sve aaRS kataliziraju reakciju aminoacilacije u dva koraka. Prvi korak je aktivacija aminokiseline. U ovom koraku α-karboksilatni kisik aminokiseline (aa) napada atom fosfora α-fosfata adenozin- trifosfata (ATP) pri čemu nastaje aminoacil-adenilat (aa-AMP) uz oslobađanje pirofosfata (PP_i):

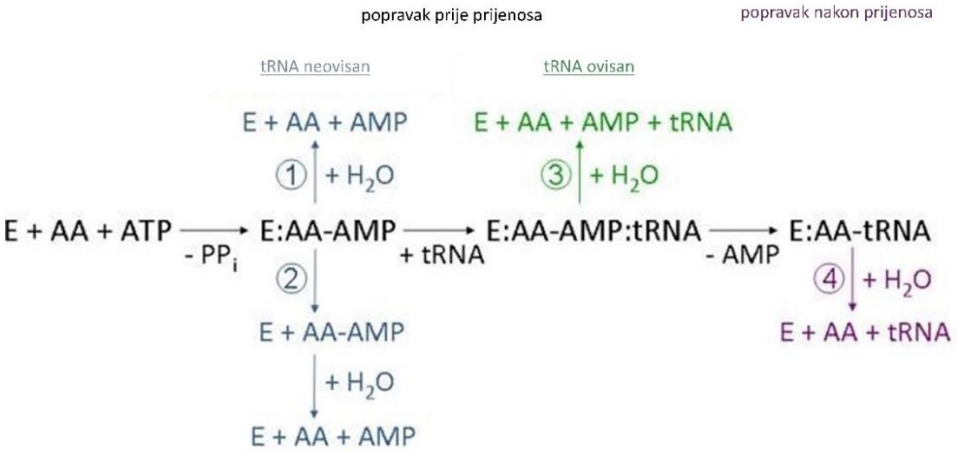
$$ATP + aa \rightarrow aa\text{-}AMP + PP_i$$

U sljedećem koraku 2'- ili 3'-hidroksi grupa *cis*-diola na 3'-kraju tRNA napada karbonilni ugljik adenilata pri čemu nastaje aminoacil-tRNA, te se oslobađa adenozin-monofosfat (AMP):

$$\text{aa-AMP} + \text{tRNA}^{aa} \rightarrow \text{aa-tRNA}^{aa} + \text{AMP}$$

Kod ovih reakcija aaRS stvaraju interakcije s aminokiselinom i molekulom tRNA, kako bi došlo do prijenosa specifične aminokiseline na pripadnu molekulu tRNA (5, 7).

U biosintezi proteina tolerira se pogrešna ugradnja jedne aminokiseline na tisuću do deset tisuća aminokiselina. Da bi se održao visok stupanj točnosti aaRS su razvile mehanizme popravka pogreške. Popravci pogreške podijeljeni su prema tome da li dolazi do popravka prije ili poslije prijenosa aminokiseline na tRNA (Slika 1.). Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline na tRNA moguće je podijeliti u dvije vrste: tRNA ovisan i tRNA neovisan (8).



Slika 1. Shematski prikaz popravaka pogreške aaRS. Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline potpomognut disocijacijom nepripadnog aminoacil-adenilata [2] ili enzimska hidroliza nepripadnog aminoacil-adenilata [1,3]. Hidroliza pogrešno aminoacilirane tRNA nakon prijenosa nepripadne aminokiseline na tRNA [4]. Preuzeto i prilagođeno prema (8)

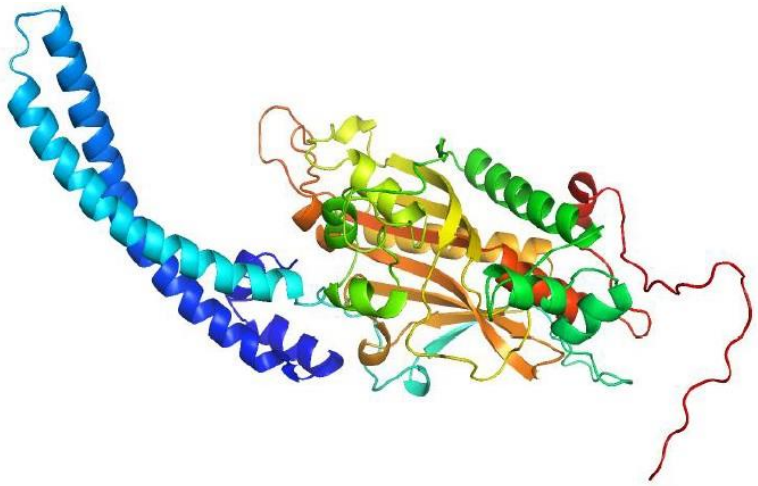
Uz prije navedene kanonske funkcije aaRS kod biosinteze proteine, aaRS imaju neke nekanonske funkcije. Kod bakterija i nižih eukariota, uočeno je da mRNA nekih aaRS sadrže kratke sljedove koji se mogu smotati u oblik djeteline i time oponašaju tRNA. Ako u stanici ima dovoljno te aaRS, ona se veže na dio vlastite mRNA, koja liči napripadni tRNA, pri čemu dolazi do zaustavljanja translacije mRNA za aaRS, te se tako koncentracija aaRS održava optimalnom. Ovo

je primjer uloge aaRS u regulaciji translacije. Sličan mehanizam se događa i na razini transkripcije. AlaRS iz bakterije *Escherichia coli* veže se na DNA-palindrom u promotoru svog gena, te tako smanjuje transkripciju. Kod viših organizama aaRS imaju veći spektar nekanonskih funkcija (9). Neke od ostalih nekanonskih funkcija su signalizacija transdukcije, migracija stanica, angiogeneza, upale i tumorogeneza (10).

2.2. Seril-tRNA-sintetaza iz biljke *Arabidopsis thaliana*

Seril-tRNA-sintetaza (SerRS) je aminoacil-tRNA-sintetaza koja pripada razredu II, što znači da je njena kanonska uloga povezivanje aminokiseline serina s pripadajućom $tRNA^{Ser}$. S obzirom da je serin kodiran sa čak 6 kodona genetičkog koda moguće je vezanje serina na više izoakceptorskih tRNA. Osim povezivanja serina i $tRNA^{Ser}$, SerRS također sudjeluje u ugradnji selenocisteina u proteine (11). Svi SerRS proteini su homodimeri koji na N-kraju sadrže tRNA-veznu domenu iza koje slijedi globularna katalitička domena.

Među biljnim SerRS, dobro je proučena citosolna SerRS iz biljke *Arabidopsis thaliana* (slika 2.) (3, 12). U istraživanju proteinskih interaktora ove SerRS pokazano je kako SerRS stupa u interakciju sa nekoliko različitih proteina: elongacijski faktor EF2, ribosomski protein RPL9-1, protein nepoznate funkcije (PNF) i BEN1 (3). Protein BEN1 je enzim iz skupine oksido-reduktaza koji sudjeluje u metabolizmu brasinosteroida i sterola (3, 13). Ustanovljeno je da središnja katalitička domena SerRS stupa u interakciju s proteinom BEN1 (13). Biološka funkcija kompleksa SerRS:BEN1 nije poznata, ali se smatra da je povezana sa staničnim odgovorom na stres. Uočeno je da transgenične linije koje prekomjerno eksprimiraju SerRS bolje kliju i rastu u uvjetima stresa u odnosu na divlji tip biljke (3).



Slika 2. Predikcija trodimenzionalne strukture monomera SerRS iz biljke *A. thaliana*; svijetlo i tamno plavo prikazane su 2 α-zavojnice koje čine tRNA-veznu domenu, središnji dio proteina sadrži globularnu katalitičku domenu proteina, crveno je označen bazični C-kraj proteina. Preuzeto iz (13).

2.3. *Arabidopsis thaliana* (uročnjak)

Arabidopsis thaliana (uročnjak) je biljka iz porodice *Brassicaceae.* U prirodi se može naći na sjevernoj polutci pri svim visinama, te se obično smatra korovom. Sjemenke *A. thaliana* su malene, veličine 0,5 mm, ovalnog oblika, a iz jedne biljke može se dobiti do 1 000 sjemenki. Klijanci su maleni i građeni od dva kotiledona na suprotnim stranama. Odrasla biljka građena je od rozete koja se nalazi na bazi stabljike, na kojoj se nalaze listići. Cvjetovi su maleni i građeni od 4 latica. Biljke *A. thaliana* su samooprašujuće biljke, a plodovi su mahunice koje sadrže sjemenke (14).

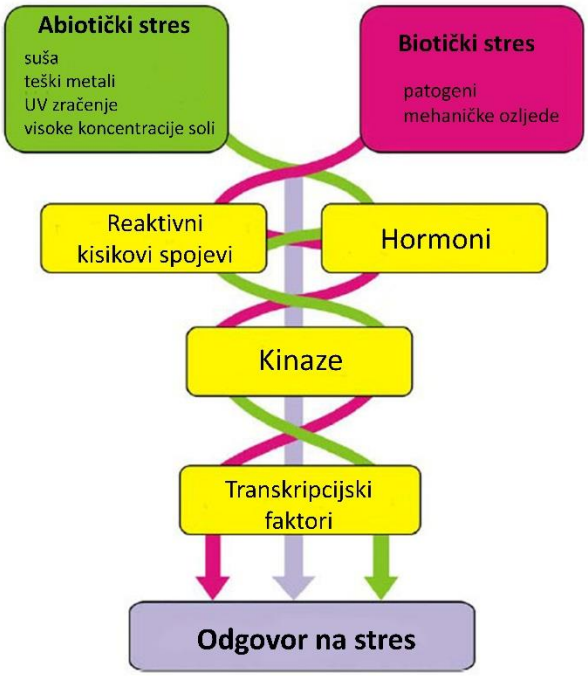
Genom biljke *A. thaliana* sekvenciran je, te je jedan od manjih među višim biljkama, veličine oko 130 megabaza, a sastoji se od 5 kromosoma. Životni ciklus (od klijanja do sjemenki) u staklenicima i klima komorama je 6-8 tjedana. Dobro razvijene metode gentičke manipulacije i gore navedene činjenice su upravo razlozi zašto je *A. thaliana* modelni organizam za proučavanje viših biljaka (15, 14).

Slika 3. Biljka *A. thaliana* stara 4 tjedna. Preuzeto iz (14)

2.4. Nekanonske uloge biljnih aaRS u odgovoru na biotički i abiotički stres

Biljke su kompleksni organizmi, te različiti faktori mogu utjecati na njihov metabolizam. Stres kod biljaka možemo podijeliti na biotički stres, koji uključuje mehanička oštećenja i napad patogena, i na abiotički stres, koji većinom uključuje vanjske nepogodne uvjete kao suša, teški metali (bakar, cink, kadmij), UV zračenje, visoke i niske temperature, itd. (Slika 4.). Kada je biljka u nepogodnim uvjetima rasta, odnosno pod stresom, dolazi do pojave veće koncentracije reaktivnih kisikovih spojeva (eng. *reactive oxygen species*, ROS) te sinteze hormona (brasinosteroidi, jasmonska kiselina, etilen, salicilna kiselina,…). Sintetizirani hormoni i ROS induciraju različite kaskadne reakcije, čime započinje adaptacija biljaka na stresne uvjete. Smatra se da samo 3,5 % biljne površine nije zahvaćeno nekim vanjskim uvjetima, stresorima, stoga je važno istražiti što se

događa s biljnim metabolizmom kad se biljka nađe u uvjetima stresa (16, 17, 18). Zadnjih godina sve je više pokazatelja da i biljne aaRS sudjeluju u staničnim odgovorima na stres.



Slika 4. Opći prikaz signalnih puteva kod odgovora biljaka na stres. Preuzeto i prilagođeno iz (17).

Brasinosteroidi, brasinoidi i kastasteron, kao što je prije spomenuto su biljni hormoni koji se nalaze skoro u svakom dijelu biljke. Ovi hormoni se mogu naći u slobodnom obliku ili konjugirani sa šećerima ili masnim kiselinama. Brasinosteroidi su potrebni za normalan razvoj biljke, te također sudjeluju u odgovoru na abiotički stres. Smatra se da brasinosteroidi zajedno sa ostalim hormonima djeluju na ekspresiju biosintetskih gena i/ili signalnih intermedijera (17). S obzirom da SerRS interagira s proteinom BEN1 koji sudjeluje u metabolizmu brasinosteroida (3), moguća je povezanost SerRS iz biljke *A. thaliana* sa staničnim odgovorima na stres.

Primjer abiotičkog stresa je povećana koncentracija kadmija. Kadmij je neesencijalni teški metal koji je rasprostranjen u okolišu djelovanjem čovjeka. Kadmij ima veliki afinitet prema tiolnim skupinama, te je iz tog razloga veoma toksičan, te kod biljaka izaziva različite morfološke, fiziološke i biokemijske promjene. Najočitiji simptomi su kloroza i inhibicija rasta. Glavni

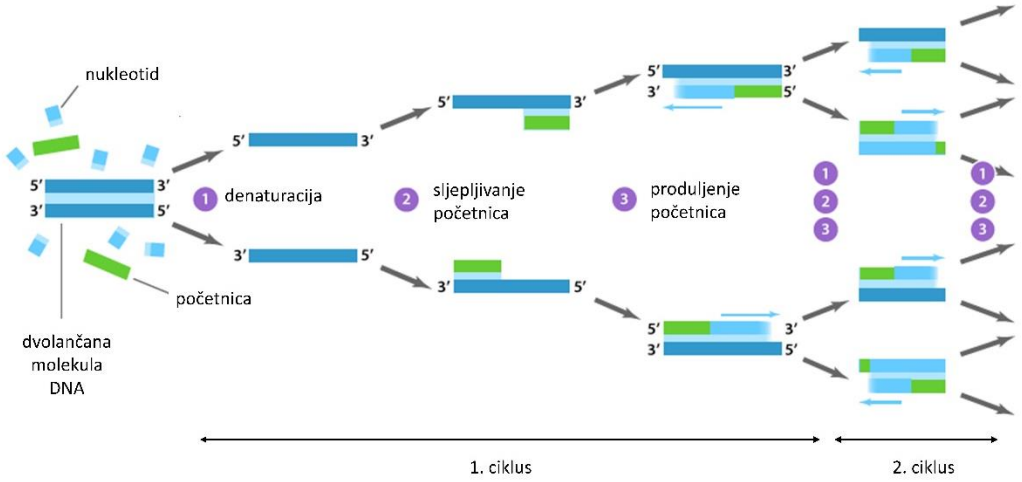
mehanizam detoksikacije kod biljaka je sinteza fitokelata (eng. *phytochelatins*, PC). Fitokelati su mali peptidi opće formule $(\gamma Glu\text{-}Cys)_n\text{-}Gly$, gdje je n = 2–11, te imaju veliki afinitet prema teškim metalima kao što su kadmij i bakar, te s njima stvaraju komplekse koji se zatim transportiraju u vakuolu. U istraživanju utjecaja kadmija na metabolom i proteom biljke *A. thaliana* uočeno je da dolazi do povećanja koncentracije različitih enzima vezanih uz glikolizu, metabolizam, staničnu smrt, smatanje proteina, sintezu proteina i staničnu komunikaciju i organizaciju. Među ovim enzimima čija koncentracija se povećala nakon izlaganja biljke kadmijem bio je i SerRS (2).

Biljke su viši organizmi koji su razvili mnoge obrambene mehanizme protiv raznih patogena. Ti mehanizmi su pod kontrolom biljnog imunološkog sustava. Regulacija biljnog imunološkog sustava je pod kontrolom hormona, malih molekula kao što su salicilna i jasmonska kiselina. Kako bi se biljke optimalno adaptirale na nepovoljne uvjete, one se mogu senzibilizirati na određene alarmne signale, što se naziva „primarni obrambeni mehanizam“. β-aminobutirična kiselina (eng. *β-aminobutyric acid*, BABA) je neproteinska aminokiselina koja štiti biljke od šireg spektra stresnih uvjeta. BABA-inducirana rezistencija se bazira na simultanom uključivanju obrambenog mehanizma ovisnom o salicilnoj kiselini i obrambenog mehanizma neovisnog o salicilnoj kiselini. Kada se biljka nađe u uvjetima stresa BABA se veže na AspRS, te dobiveni kompleks dalje inducira obrambeni mehanizam ovisan o BABA (19, 20).

Fusarium graminearum je gljivica koja patogeno djeluje na žitarice kao što su ječam, pšenica i zob. Žitarice inficirane *F. graminearum* daju puno manje uroda, te je kvaliteta žitarica puno manja zbog prisutnosti mikotoksina. Glavni mikotoksini kod žitarica inficiranim sa gljivicom *F. graminearum* su deoksinivalenol (DON), 3-acetildeoksinivalenol (3-ADON) i 15-acetildeoksinivalenol (15-ADON). DON je potencijalni inhibitor translacije proteina, te djeluje kao faktor virulencije kod biljaka koji širi infekciju gljive biljnim tkivom. DON je vrlo toksičan za ljude i domaće životinje. U istraživanju utjecaja DON na biljku *A. thaliana* pokazano je kako se ekspresija gena metionil-tRNA-sintetaze (MetRS) povećava u vremenskom razdoblju od 4 do 24 sata nakon infekcije, dok se nakon 48 sata ekspresija polagano utišava. Povećana ekspresija gena za MetRS sugerira da MetRS sudjeluje u stvaranju rezistencije na infekciju gljivice *F. graminearum* (21).

2.5. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (eng. *polymerase chain reaction,* PCR) je *in vitro* metoda umnažanja određenog slijeda DNA. PCR je revolucionirao biokemiju i molekularnu biologiju jer je omogućio dobivanje velike količine DNA, zbog čega je pronašao široku primjenu u znanstvene i medicinske svrhe. Sam proces PCR-a može se podijeliti u tri koraka koja se uzastopno ponavljaju nekoliko puta, odnosno ciklusa. U prvom koraku dolazi do denaturacije dvolančane molekule DNA. Kako bi DNA-polimeraza mogla umnožiti DNA potrebni su kratki oligonukleotidi (početnice) na koje se veže sama DNA-polimeraza te nastavlja njihovo produljenje. Tako početnice određuju koji dio DNA će se umnožiti. Drugi korak je komplementarno vezanje početnica na jednolančanu molekulu DNA, dok se u trećem koraku one produljuju u reakciji kataliziranoj termostabilnom DNA-polimerazom. Novonastali produkti dalje služe kao kalup za umnažanje što dovodi do eksponencijalnog umnažanja molekula DNA (22, 23).



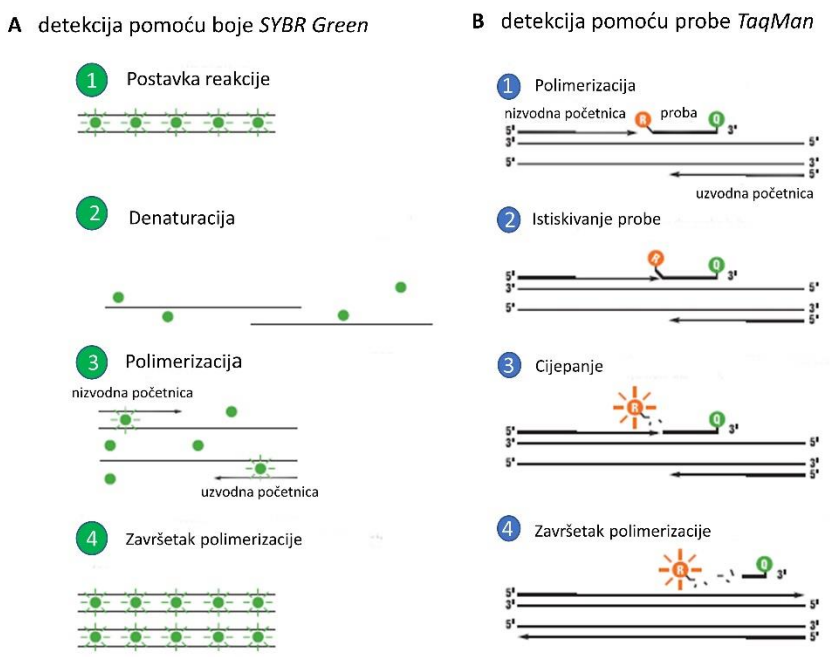
Slika 5. Shematski prikaz PCR reakcije. 1 – početna denaturacija dvloančane molekule DNA, 2 – sljepljivanje početnica na jednolančanu DNA, 3 – produljenje početnica. Preuzeto i prilagođeno iz (24).

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze (eng. quantitative *polymerase chain reaction,* qPCR je metoda koja omogućuje kvantizaciju početne količine DNA u uzorku. Temelji se na prikupljanju

podataka pomoću fluorescencijskih boja tijekom qPCR eksperimenta. Kod qPCR metode amplifikacija i detekcija se događaju u jednom koraku (25). Tijekom PCR ciklusa mjeri se porast fluorescencije koji je proporcionalan količini dobivene DNA tijekom svakog ciklusa (26).

Za praćenje ekspresije gena koristi se PCR spregnut s reverznom transkripcijom (eng. *reverse transcripction PCR,* RT-PCR). RT-PCR možemo podijeliti na RT-PCR u jednom koraku i RT-PCR u dva koraka. Kod RT-PCR u jednom koraku u istoj epruveti se odvijaju reakcije reverzne transkripcije i umnažanja DNA PCR-om. RT-PCR u jednom koraku smanjuje eksperimentalne varijacije, no dobivena cDNA se ne može kasnije ponovno analizirati. Kod RT-PCR-a u dva koraka u zasebnoj epruveti se najprije provede reakcija reverzne transkripcije, te se dobivena cDNA u novoj epruveti analizira PCR-om. RT-PCR-om u dva koraka dobivena cDNA se može više puta analizirati, no ova metoda povećava mogućnost kontaminacije DNA (25).

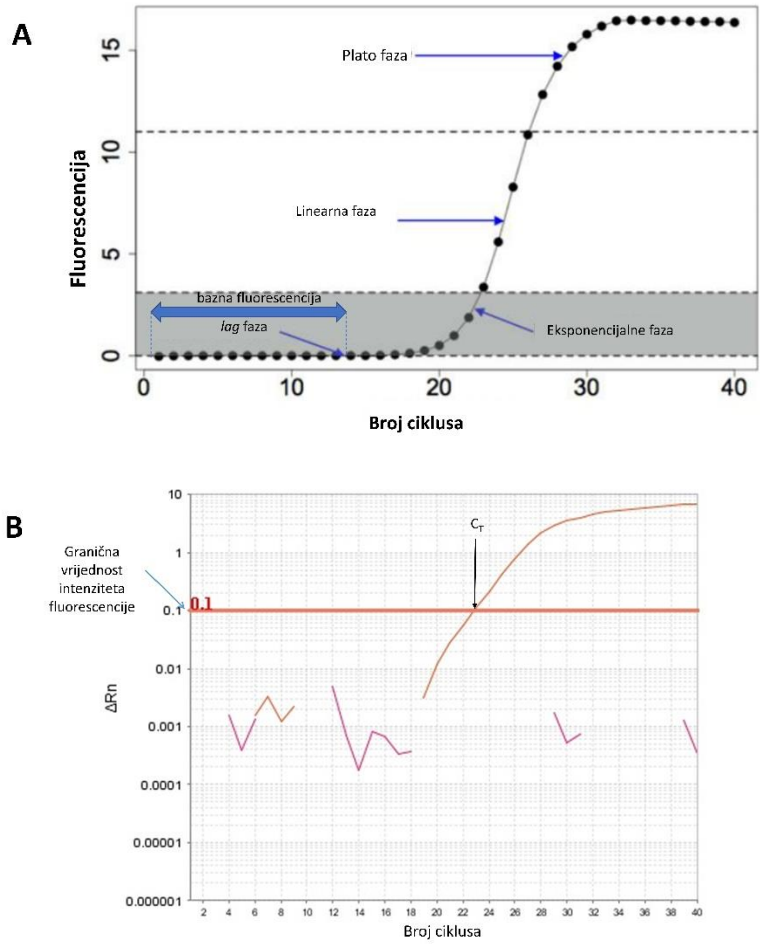
Postoji mnogo metoda za fluorescencijsko praćenje umnažanja DNA kod qPCR-a. Dvije najznačajnije metode su fluorescencijsko označavanje pomoću boje *SYBR Green* I i korištenje probe *TaqMan*. Boja *SYBR Green I* se veže na sve dvolančane DNA. Kako tijekom PCR-a nastaje sve više dvolančanih produkata (amplikona) boja *SYBR Green* se veže na njih te dolazi to povećanja fluorescencije. Proba *TaqMan* je oligonukleotid specifičan za pojedini gen koji na 5'-kraju ima fluorofor a na 3'-kraju utišivač fluorescencije. Kad je proba intaktna zbog blizine utišivača fluorofor ne emitira fluorescencijski signal. Proba se dizajnira tako da se komplementarno veže na ciljni gen između para početnica za taj gen. Kako *Taq*-DNA-polimeraza produljuje početnice tako dolazi do probe. *Taq*-DNA-polimeraza posjeduje 5'-3' nukleaznu aktivnost, te tako odcjepljuje fluorofor s probe. Odvajanjem flurofore dolazi i do odstranjivanja ostatka probe s DNA te se produljenje lanca nastavlja. Fluorofor i utišivač se sve više odvajaju te tako fluorofor daje flurorescencijski signal (27).



Slika 6. Shematski prikaz fluorescentnog praćenja umnažanja DNA tijekom qPCR-a pomoću boje *SYBR Green* (A) i probe *TaqMan* (B); A – detekcija pomoću *SYBR Green* boje: 1 – postavka reakcije: *SYBR Green* boja je vezana na dvolančanu (dl) DNA i fluorescira, 2 – tijekom denaturacije nastaju jednolačane (jl) DNA, te *SYBR Green* nije vezan za jl DNA, pa ne fluorescira, 3 – polimerizacija: dolazi do sljepljivanja početnica i njihova elongacija, kako nastaje dl DNA tako dolazi do vezanja *SYBR Green* boje koja opet fluorescira, 4 – završetak polimerizacije: nastaje dl amplikon na koji se veže *SYBR Green* boja koja emitira fluorescentno zračenje. B – detekcija amplikona pomoću probe *TaqMan*, 1 – polimerizacija: dolazi do sljepljivanja probe (fluorofor (R) i utišivač fluorescnencije (Q) su u blizini te nema emitiranja fluorescencije) i početnica, te započinje elongacija početnica, 2 – istiskivanje probe: *Taq*-DNA-polimeraza dolazi do 5'-kraja probe, 3 – cijepanje probe: *Taq*-DNA-polimeraza cijepa 5'-kraj probe na kojem se nalazi fluorofor, fluorofor se udaljava od utišivača te dolazi do emitiranja fluorescencije, 4 – amplikon je umnožen, fluorofor je i odmaknut od utišavača te fluorescira. Preuzeto i prilagođeno iz (28).

Sam proces qPCR-a se može podijeliti u 3 faze. Prva faza je *lag* faza. Kod *lag* faze fluorescencija umnažanja DNA ne prelazi baznu fluorescenciju (eng. *baseline*). U qPCR reakcijskoj smjesi nalazi se pasivna fluorescencijska boja. Fluorescencija pasivne boje tijekom cijelog procesa qPCR-a je konstantna. Kad fluorescencija umnažanja nadilazi fluorescenciju bazne linije dolazi do eksponencijalnog umnažanja DNA, faza dva. Treću fazu čine linearna i plato faza kada jedan ili više reaktanata bude potrošen (29).

qPCR pretpostavlja da je količina amplikona tijekom eksponencijalne faze proporcionalna početnoj količini kalupa. Tako se određuje proizvoljna vrijednost granične fluorescencije u eksponencijalnoj fazi (eng. *treshold*). Kad fluorescencija prelazi tu graničnu razinu fluorescencije definira se ciklus prijelaza granične vrijednosti fluorescencije (eng. *treshold cycle*, C_T). Što je C_T vrijednost manja to je početna količina kalupa veća jer je prije postignuta granična razina fluorescencije (29).



Slika 7. Krivulje amplifikacije qPCR-a prikazuju ovisnost fluorescencije o broju ciklusa. A – linearan prikaz krivulje amplifikacije sa označenim fazama i baznom fluorescencijom. Preuzeto i prilagođeno iz (30). B – semilogaritamski prikaz krivulje amplifikacije sa označenom graničnom vrijednošću intenziteta fluorescencije i C_T; ΔRn – fluorescencija umnažanja normalizirana u odnosu na pasivnu fluorescencijsku boju

Postoje dvije vrste kvantizacije u qPCR-u, apsolutna i relativna kvantizacija. Kod apsolutne kvantizacije pomoću serijskih razrjeđenja standarda poznatih koncentracija izrađuje se baždarna krivulja koja daje linearni odnos C_T i početne koncentracije DNA ili cDNA. Zatim se pomoću qPCR-a odredi C_T vrijednost uzorka te se iz baždarne krivulje može izračunati početna količina kalupa. Kod relativne kvantizacije promjene u genu od interesa se mjere ili prema vanjskom standardu ili prema referentnom uzorku (kalibrator) (25).

Kako bi se rezultati dobiveni iz dva različita uzorka mogli uspoređivati, dobivene vrijednosti se prethodno trebaju normalizirati. U tu svrhu se koriste endogene kontrole (eng. *endogenous control, reference gene*). Kao endogena kontrola se uzimaju geni čija se ekspresija ne mijenja u uvjetima pri kojima je proveden eksperiment. Često korištene endogene kontrole su „*housekeeping*“ geni i rRNA (25, 31).

Relativna kvantizacija pojasnit će se na primjeru praćenja ekspresije gena za superoksid-dismutazu u biljci topoli u stresnim uvjetima. Iz biljaka izloženim stresu i kontrolnim biljkama koje nisu bile izložene stresu izolirana je ukupna RNA koja je zatim analizirana RT-qPCR-om korištenjem početnica za superoksid-dismutazu i endogenu kontrolu. Najprije su svi dobiveni rezultati normalizirani u odnosu na endogenu kontrolu, a zatim su rezultati dobiveni iz biljaka koje su bile izložene stresu uspoređene sa rezultatima biljaka koje nisu bile izložene stresu kako bi se utvrdilo da li dolazi do promjene ekspresije gena za superoksid-dismutazu kod biljaka izloženih stresu. U ovom primjeru biljke koje nisu bile izlože stresu su bile referentni uzorci (kalibratori) (32).

Komparativna C_T metoda ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\Delta\Delta C_T$) je najčešća metoda analize podataka kod relativne kvantizacije qPCR-a. Ova metoda podrazumijeva da su efikasnosti umnažanja ciljnog gena i endogene kontrole jednake ili barem slične. Najprije se gen od interesa (GOI) normalizira u odnosu na endogenu kontrolu (EK) u tom uzorku (npr. biljke izložene stresu) čime se dobiva ΔC_T vrijednost [1]:

$$\Delta C_T = C_{T,GOI} - C_{T,EK} \qquad [1]$$

Dobivene ΔC_T vrijednosti za uzorak se zatim uspoređuju sa ΔC_T vrijednostima kalibratora (npr. biljke koje nisu izložene stresu) te se tako dobije - $\Delta\Delta C_T$ vrijednost [2]:

$$-\Delta\Delta C_T = -(\Delta C_{T,\,uzorak} - \Delta C_{T,kalibrator}) \qquad [2]$$

Zatim se $-\Delta\Delta C_T$ vrijednost uvrsti u jednadžbu [3] kako bi se dobio omjer normalizirane količine gena od interesa u uzorku u odnosu na normaliziranu količinu gena od interesa u kalibratoru. U jednadžbi [3] broj 2 je zapravo efikasnost umnažanja. Pošto ova metoda podrazumijeva da je umnažanje svih gena jednako ili slično može se uvrstiti vrijednost 2 kao efikasnost umnažanja, što bi značilo da se iz jedne molekule kalupa nakon jednog PCR ciklusa dobiju dvije molekule (33).

$$\text{omjer količine gena od interesa: } 2^{-\Delta\Delta CT} \qquad [3]$$

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzgoj transgeničnih biljaka

Za provjeru nadekspresije konstrukata koji sadrže gen za SerRS korištene su sjemenke transgeničnih linija biljke *A. thaliana*. Linije TAP 5 i TAP 7 koje sadrže TAP privjesak na C-kraju SerRS proteina. Linije GFP 2 i GFP 10 sadrže zeleni fluorescentni protein (eng. *green fluorescent protein*, GFP) privjesak na N-kraju SerRS proteina. GFP u reakciji prijenosa energije proizvodi zelenu svjetlost, te se stoga koristi kao marker ekspresije gena i kod lokalizacije proteina u stanicama (34). Ove transgenične linije korištene u lokalizaciji SerRs iz biljke *A. thaliana* u stanici (12). Također je korišten divlji tip biljke *A. thaliana* (ekotip *Columbia*) kako bi se provjerilo koliko puta transgenične biljke nadeksprimiraju gen za SerRS u odnosu na biljke divljeg tipa.

Sjemenke divljeg tipa i transgeničnih linija su najprije sterilizirane. Sjemenkama je dodan 1 mL 70% etanol, te su stavljene na rotator jednu minutu. Nakon toga su kratko centrifugirane kako bi se etanol lakše odstranio. Zatim je na sjemenke dodano 1 mL vodene otopine izosana (1%) i mukasola (0,1%) kako bi se uništile bakterije i gljivice koje se mogu nalaziti na sjemenkama. Sjemenke s vodenom otopinom izosana i mukasola stavljene su na rotator 10 minuta, nakon čega su kratko centrifugirane te je vodena otopina izosana i mukasola maknuta. Prije vernalizacije sjemenke su isprane 5 puta sa 1 mL redestilirane sterilne vode. Sjemenke su zatim nasađene na ploče koje sadrže Murashige i Skoog (MS) medij za uzgoj biljaka (MS5519, Sigma). Sastav bazalnog medija MS5519 koji sadrži vitamine, makro- i mikronutrijente prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Sastav bazalnog medija za uzgoj biljaka MS5519 koji sadrži vitamine, makro- i mikronutrijente

komponenta	γ/mg L^{-1}
Amonijev nitrat	1650,0
Borna kiselina	6,20
Kalcijev klorid (anhidrid)	332,20
Kobaltov (II) klorid heksahidrat	0,0250
Bakrov(II) sulfat pentahidrat	0,0250
Dinatrijev EDTA dihidrat	37,260
Željezov(II) sulfat heptahidrat	27,80
Glicin	2,0
Magnezijev sulfat (anhidrid)	180,70
Manganov sulfat monohidrat	16,90
Myo-inozitol	100,0
Nikotinska kiselina	0,50
Kalijev jodid	0,830
Kalijev nitrat	1900,0
Kalijev dihidrogenfosfat	170,0
Pirodoksin hidroklorid	0,50
Natrijev molibdat dihidrat	0,250
Tiamin hidroklorid	0,10
Cinkov sulfat heptahidrat	8,60

Za pripravu 1 L krutog MS medija potrebno je otopiti 4,4 g MS5519 medija, 20 g saharoze i 6 g agara u nešto manje od 1 L destilirane vode. Tako pripremljena otopina se zatim titrira s otopinama KOH i HCl do pH 5,8. Otopina se nadopuni do 1 L te se sterilizira u autoklavu, te se kasnije izlije u petrijeve zdjelice.

Sjemenke nasađene na pripremljen MS medij stave se u mrak na +4 °C na vernalizaciju kako bi se pripremile na klijanje. Nakon vernalizacije nasađene sjemenke su stavljene u klima komoru da rastu. Klima komora simulira dugi dan, što znači da je 16 h svjetlo i 8 h mrak, te se održava stalna temperatura od 24 °C.

3.2. Izolacija ukupne RNA

Prije izolacije RNA iz svih uzoraka napravljena je probna izolacija na klijancima linije GFP 2 starim 6 dana s 3 različite metode, da bi se utvrdilo koja metoda je najprikladnija. Sve tri korštene metode se baziraju na izolaciji RNA pomoću TRIzola. TRIzol sadrži fenol i gvanidin izotiocijanat koji istovremeno solubiliziraju biološki materijal i denaturiraju proteine. Nakon solubilizacije dodatak kloroforma dovodi do odvajanja faza pri čemu se proteini ekstrahiraju u organsku fazu, DNA se nalazi u međufazi, a RNA ostaje u vodenoj fazi. Dodatkom etanola RNA se taloži iz vodene faze (35). U prvoj metodi koristi se izopropanol sobne temperature i inkubacija otopine RNA se izvodi na sobnoj temperaturi, dok se u drugoj metodi koristi hladni izopropanol i inkubacija se provodi na ledu. Metoda 3 najsličnija je metodi 2 samo što se uz hladni izopropanol dodaje otopina visoke soli i još dodatno uključuje pretaloživanje.

Ukupno 430 mg biljnog materijala stavljeno je u konusnu epruvetu od 50 mL, te je stavljeno 5 keramičkih kuglica. U epruvetu je dodan tekući dušik. Kada je dušik ispario epruveta sa smrznutim biljnim materijalom i kuglicama je promiješana na vorteksu jednu minutu kako bi se biljni materijal homogenizirao u prah. Kuckanjem konusne epruvete o stol maknut je biljni prah s kuglica te su kuglice odstranjene. Na homogenizirani biljni prah dodano je 2,15 mL TRIzol-a (1 mL TRIzola na 200 mg biljnog materijala). Homogenizirani biljni materijal i TRIzol su vorteksirani i inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi. Dobivena suspenzija je raspipetirana u 3 mikroepruvete od 1,5 mL (otprilike 715 µL suspenzije po mikroepruveti). Po jedna mikroepruveta sa suspenzijom je uzeta za izolaciju RNA jednom metodom.

3.2.1. Metoda 1

U mikroepruvetu sa suspenzijom dodano je 143 µL kloroforma na 715 µL TRIzola (200 µL kloroforma na 1 mL TRIzola). Sadržaj mikroepruvete je ručno dobro promiješan i stavljen na sobnu temperaturu 3 minute, nakon čega je centrifugiran 15 minuta pri 12 000 g i +4 °C kako bi došlo do razdvajanja faza. Gornja vodena faza s RNA zatim je prebačena u novu mikroepruvetu od 1,5 mL, te je dodano 358 µL izopropanola (0,5 mL izopropanola na 1mL TRIzola) sobne

temperature i suspenzija je inkubirana na sobnoj temperaturi 10 minuta. Suspenzija je zatim centrifugirana 10 minuta pri 12 000 g i +4 °C kako bi se dobio talog RNA. Nakon centrifugiranja supernatant je maknut, a na talog je dodano 715 µL 75 % etanola (razrijeđenog sa DEPC vodom) da se talog ispere od nečistoća. Mikroperuveta je kratko vorteksirana, te je zatim centrifugirana 5 minuta pri 7500 g i +4 °C. Etanol je zatim maknut a talog je stavljen na sušenje na sobnoj temperaturi ne dulje od 10 minuta. Nakon što se talog osušio otopljen je u 50 µL DEPC vode. Pošto se talog teško otapao sve je inkubirano 10 minuta na 37 °C. Dobivenoj otopini ukupne RNA izmjerena je masena koncentracija na uređaju NanoDrop.

3.2.2. Metoda 2

U mikroepruvetu sa suspenzijom dodano je 143 µL kloroforma na 715 µL TRIzola (200 µL kloroforma na 1 mL TRIzola). Sadržaj mikroepruvete je ručno dobro promiješan i stavljen na sobnu temperaturu 3 minute, nakon čega je centrifugiran 15 minuta pri 12 000 g i +4 °C kako bi došlo do razdvajanja faza. Gornja vodena faza s RNA je zatim prebačena u novu mikroepruvetu od 1,5 mL, te je dodano 358 µL hladnog izopropanola, te je suspenzija inkubirana na ledu 10 minuta. Nakon čega je centrifugirana 10 minuta pri 12 000 g i +4 °C kako bi se dobio talog RNA. Nakon centrifugiranja supernatant je maknut, a na talog je dodano 715 µL 75 % etanola (razrijeđenog sa DEPC vodom) da se talog ispere od nečistoća. Sadržaj mikroepruvete kratko je vorteksiran, te je zatim centrifugiran 5 minuta pri 7500 g i +4 °C. Etanol je zatim maknut a talog je stavljen na sušenje na sobnoj temperaturi ne dulje od 10 minuta. Nakon što se talog osušio otopljen je u 50 µL DEPC vode. Pošto se talog teško otapao sve je dodatno inkubirano 10 minuta na 37 °C. Dobivenoj otopini ukupne RNA izmjerena je masena koncentracija na uređaju NanoDrop.

3.2.3. Metoda 3

U mikroepruvetu sa suspenzijom dodano je 143 µL kloroforma na 715 µL TRIzola (200 µL kloroforma na 1 mL TRIzola). Sadržaj mikroepruvete je ručno dobro promiješan i stavljen na sobnu temperaturu 3 minute, nakon čega je centrifugiran 15 minuta pri 12 000 g i +4 °C kako bi došlo do razdvajanja faza. Gornja vodena faza s RNA je zatim prebačena u novu mikroepruvetu od 1,5 mL, te je dodano 213 µL hladnog izopropanola i 213 µL otopine visoke soli (1,2 mol/dm^3 natrijev acetat, 0,8 mol/dm^3 natrijev klorid, 0,1 % DEPC). Mikroepruveta je inkubirana 10 minuta na ledu, te je zatim centrifugirana 10 minuta pri 12 000 g na +4 °C. Supernatant je maknut te je na talog dodano 116 µL 75 % etanola (175µL 75 % etanola na 1 mL TRIzola). Suspenzija je zatim centrifugirana 5 minuta pri 7500g na +4 °C, te je nakon centrifugiranja maknut supernatant. Dobiveni talog je otopljen u 67 µL DEPC vode, te je zatim dodano 6,7 µL otopine natrijeva acetata koncentracije 3 mol/dm^3 i 167 µL 100% etanola (na 1 mL TRIzola se dodaje 100µL DEPC vode, 10 µL otopine natrijeva acetata i 250 µL etanola). Tako pripremljeni uzorci stavljeni su na -20 °C minimalno 30 minuta, nakon čega su centrifugirani 30 minuta pri 12 000 g na +4 °C. Supernatant je maknut, a talog je osušen na zraku pri sobnoj temperaturi ne dulje od 10 minuta. Osušen talog je zatim otopljen u 50 µL DEPC vode, te je otopini ukupne RNA izmjerena masena koncentracija na uređaju NanoDrop.

3.2.4. Odabrana metoda za izolaciju ukupne RNA iz biljnog materijala

Nakon analiziranja dobivene ukupne RNA pomoću sve 3 metode, ustanovljeno je da je treća metoda najprikladnija od korištene 3 metode. Nadalje opisana metoda je zapravo općenitija metoda 3.

Biljnog materijal se stavi u konusnu epruvetu od 50 mL, te se doda 5 keramičkih kuglica. U epruvetu se ulije tekući dušik kako bi se biljni materijal smrznuo. Nakon što dušik ispari, biljni materijal se homogenizira tako da se otvorena epruveta vorteksira jednu minutu. Kuckanjem epruvete o stol makne se biljni materijal sa keramičkih kuglica te se one odstrane. Na

homogenizirani biljni materijal doda se 1 mL TRIzola na 100 do 200 mg biljnog materijala. Smjesa se vorteksira i inkubira se 10 minuta na sobnoj temperaturi. Dobivena suspenzija se prebaci u mikroepruvetu od 1,5 mL i doda se 0,2 mL kloroforma na 1 mL TRIzola. Smjesa se 15 sekundi dobro promiješa u ruci te se inkubira 3 minute na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzorak se centrifugira 15 minuta pri 12 000 g i +4 °C kako bi se faze razdvojile. Gornja vodena faza u kojoj se nalazi RNA prebaci se u novu mikroepruvetu i doda se 320 µL hladnog izopropanola i 320 µL otopine visoke soli (1,2 mol/dm^3 natrijev acetat, 0,8 mol/dm^3 natrijev klorid, 0,1 % DEPC) po 1mL TRIzola. Smjesa se inkubira 10 minuta na ledu nakon čega se centrifugira 10 minuta pri 12 000 g i +4 °C. Supernatant se odstrani, a na talog se doda 175 µL 75 % etanola (pripremljenog sa DEPC vodom) po 1 mL TRIzola. Suspenzija se zatim centrifugira 5 minuta pri 7500 g i +4 °C. Supernatant se odstrani a na talog se po 1 mL TRIzola doda 100 µL DEPC vode, 10 µL otopine natrijeva acetata (c= 3 mol/dm^3) i 250 mL 100 % etanola. Suspenzija se inkubira na -20 °C minimalno 30 minuta (može i preko noći) te se zatim centrifugira 30 minuta pri 12 000 g i +4 °C. Supernatant se odstrani, a talog s osuši na zraku ne dulje od 10 minuta nakon čega se otopi u DEPC vodi.

3.3. DNazni tretman

Na dobivenim uzorcima ukupne RNA proveden je DNazni tretman kako bi se uklonila genomska DNA koja se ponekad izolira zajedno za RNA. Za DNazni tretman korišten je *TURBO DNA-free*^{TM} *Kit* (Ambion).

Na temelju masenih koncentracija RNA dobivenih nakon izolacije izračunat je potreban volumen za reakcijsku smjesu tako da u toj smjesi bude 12,5 ili 10 µg RNA (ovisno o najmanjoj masenoj koncentraciji uzorka kod pojedinog uzgoja biljaka). Maksimalan volumen RNA i DEPC vode iznosi 44 µL. U reakcijsku smjesu se zatim doda 5 µL pufera za TURBO DNazu i 1 µL DNaze. Stoga je ukupan volumen reakcijske smjese 50 µL (tablica 2). Reakcijske smjese su inkubirane 30 minuta na 37 °C, zatim je dodano 5 µL inaktivacijskog reagensa. Smjesa je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi. Tijekom inkubacije smjese su 3 puta dobro promiješane. Nakon inaktivacije smjese su centrifugirane 2 minute pri 10 000 g, te je supernatant u kojem se nalazi RNA prebačen

u novu mikroepruvetu od 1,5 mL i otopini RNA je izmjerena masena koncentracija na uređaju NanoDrop.

Tablica 2. Sastav jednične reakcije DNaznog tretmana

5 µL	Pufer za TURBO DNazu
1 µL	DNaza
	12,5 ili 10 µg RNA*
	DEPC voda*
∑= 50 µL	

*Ukupan volumen RNA i DEPC vode mora biti 44 µL

3.4. Reverzna transkripcija

Za pretvorbu RNA u komplementarnu DNA (cDNA) korišten je *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Ambion).

Prema dobivenim masenim koncentracijama RNA nakon DNaznog tretmana uzeto je 1 µg RNA i stavljeno u mikroepruvetu za PCR, te je prema potrebi dodana DEPC voda tako da ukupan volumen bude 10 µL. Pripremljena je 2x smjesa za reverznu transkripciju. Sastav 2x smjese za reverznu transkripciju prikazan je u tablici 2. U 2x smjese za reverznu transkripciju dodano je 10 µL pripremljene otopine RNA te je sve dobro promiješano. Za provjeru da li je zaostalo genomske DNA pripremljeni su uzorci RNA za reverznu transkripciju gdje u 2x smjesu za reverznu transkripciju nije dodana reverzna transkriptaza (-RT). Sastav 2x smjese za -RT uzorke za reverznu transkripciju prikazan je u tablici 3. Uzorci su kratko centrifugirani i stavljeni u uređaj za PCR, te je pokrenut program za reverznu transkripciju. Program reverzne transkripcije prikazan je u tablici 4. Nakon završetka reverzne transkripcije uzorci su pohranjeni na -80 °C. Nakon što je provedena i reakcija reverzne transkripcije, uzorci ukupne RNA prije DNaznog tretmana, kao i poslije DNaznog tretmana, te cDNA provjereni su elektroforezom na 1 %-tnom gelu (za 4 gela je potrebno 300 mL 1x TAE pufera i 3 g agaroze).

Tablica 3. Prikaz sastava 2x smjese za reverznu transkripciju (RT) i sastava 2x smjese za reverznu transkripciju za -RT uzorke

	2x smjesa za RT	**2x smjesa za -RT**
komponenta	**V/µL**	**V/µL**
10x pufer za reverznu transkriptazu	2,0	2,0
25x smjese dNTP-ova (100 mmol/dm^3)	0,8	0,8
10x RT nasumične početnice	2,0	2,0
reverzna transkriptaza	1,0	-
inhibitor RNaza	1,0	1,0
DEPC voda	3,2	4,2
	∑=10 µL	∑=10 µL

Tablica 4. Program reverzne transkripcije

	Korak 1	**Korak 2**	**Korak 3**	**Korak 4**
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Vrijeme	10 min	120 min	5 min	∞

3.5. Izolacija proteina

Za izolaciju proteina uzeti su klijanci divljeg tipa strari 7 dana, te transgenične linije GFP 2, GFP 10-2 (druga generacija biljaka), GFP 10-3 (treća generacija biljaka), GFP 12, TAP 5 i TAP 7. U konusnu epruvetu od 50 mL sa 5 keramičkih kuglica stavljeno je 500 mg biljnog materijala. U još jednu konusnu epruvetu s kuglicama dodatno je stavljeno 100 mg biljnog materijala transgenične linije GFP 12, kako bi se provjerilo da li se i iz manje biljnog materijala koji je prije bio smrznut u tekućem dušiku i stavljen na -80 °C, mogu učinkovito izolirati proteini. Tako je u dvjema konusnim epruvetama bio biljni materijal linije GFP 12, u jednoj 500 mg, a u drugoj 100 mg. U sve konusne epruvete s keramičkim kuglicama i biljnim materijalom dodan je tekući dušik. Kada se biljni materijal smrznuo i kada je tekući dušik ispario, biljni materijal je homogeniziran na vorteksu. Na

homogenizirani biljni materijal se doda nedenaturirajući pufer PEB 100. U konusne epruvete gdje je bilo 500 mg biljnog materijala dodano je 500 µL PEB 100 pufera, a u konusnu epruvetu sa 100 mg biljnog materijala dodano je 200 µL PEB 100 pufera. Sastav pufera PEB 100 prikazan je u tablici 5. Zatim su konusne epruvete promiješane na vorteksu, te je dobivena suspenzija prebačena u mikroepruvetu od 1,5 mL. Suspenzije su centrifugirane 10 minuta pri 12 000 g i +4 °C Supernatant koji sadrži proteine je prebačen u novu mikroepruvetu od 1,5 mL.

Tablica 5. Sastav nedenaturirajućeg pufera PEB 100

1 mmol/dm^3	NaF
50 mmol/dm^3	HEPES pH 7,4
100 mmol/dm^3	KCl
2,5 mmol/dm^3	$MgCl_2$
1 mmol/dm^3	EDTA
0,1%	TRITON X100
5 mmol/dm^3	DTT*
	Tableta sa inhibitorima proteaza*

*DTT i tableta koja sadrži inhibitore proteaza dodani su netom prije korištenja pufera

Također je napravljena probna izolacija proteina pomoću uređaja Silamat. Za ovu metodu izolacije proteina uzeto je 140 mg biljnog materijala transgenične linije GFP 12 i stavljeno je u mikroepruvetu od 1,5 mL. U mikroepruvetu su dodane sitne staklene kuglice, te je sve smrznuto u tekućem dušiku. Smrznuti biljni materijal je zatim homogeniziran 8 sekundi na uređaju Silamat, nakon čega je ponovno stavljen u tekući dušik. Na smrznuti homogenizirani biljni materijal dodano je 200 µL PEB 100 pufera, te je smjesa ponovno homogenizirana 8 sekundi na uređenju Silamat. Nakon homogenizacije suspenzija je centrifugirana 10 minuta pri 12 000 g i +4 °C. Dobiveni supernatant u kojem se nalaze proteini prebačen je u novu mikroeptuvetu od 1,5 mL.

Nakon izolacije proteina određena je njihova koncentracija Bradford metodom. U tu svrhu pomoću ishodišne otopine BSA masene koncentracije 1 mg/mL pripremljene su otopine BSA različitih masenih koncentracija za izradu baždarne krivulje. Ishodišna otopina BSA pomiješana je s odgovarajućim volumenom Bradfordovog reagensa u kiveti, te su pripremljene otopine inkubirane 10 minuta i izmjerena im je absorbancija (A_{595}) pri 595nm na spektrofotometru. U

tablici 6. prikazani su korišteni volumeni ishodišne otopine BSA koncentracije 1 mg/mL i Bradfordovog reagensa za izradu razrijeđenih otopina BSA, te konačna koncentracija BSA. Iz dobivenih podataka napravljen je baždarni dijagram.

Tablica 6. Volumeni ishodišne otopine BSA (γ=1 mg/mL) i Bradfordovog reagensa korišteni za pripravu razrjeđenih otopina BSA.

V(BSA, 1mg/mL/µL)	*V*(Bradfordov reagens)/µL	Konačna masena koncentracija BSA/ µg/mL
0	1000	0
3	997	3
5	995	5
8	992	8
12	988	12
15	985	15
18	982	18

Nakon izrade baždarne krivulje pripremljeni su uzorci izolata proteina. 5 µL izolata proteina pomiješano je sa 995 µL Bradfordovog reagensa u kiveti, te je inkubirano 10 minuta nakon čega im je izmjerena absorbancija, A_{595}. Iz dobivenih absorbancija i baždarne krivulje određena je koncentracija proteina u izolatima.

Zatim su pripremljeni uzorci koji su sadržavali 20 µg proteina za SDS-PAGE elektroforezu. Potrebni volumen proteinskog izolata pomiješan je s vodom, maksimalnog ukupnog volumena 19 µL, te je dodano 6 µL 4x pufera za nanošenje. Uzorci su denaturirani 5 minuta pri 96 °C. 20 µL pripremljenih uzoraka stavljeno je na 9% SDS gel, te je napravljena SDS-PAGE elektroforeza (15 minuta na 120 V (radi sabijanja uzoraka) i potom 45 minuta na 190 V) pomoću PROTEAN TETRA (Bio-Rad) komercijalnog kompleta. Pošto je koncentracija proteinskog izolata dobivena uz pomoć Silamata bila mala, na gel je stavljena manja masa ukupnih proteina. U tablici 7. prikazani su volumeni proteinskih izolata i vode korištenih za pripremu uzoraka za SDS-PAGE elektroforezu.

Tablica 7. Volumeni proteinskih izolata i redestilirane vode korištenih za pripremu uzoraka za SDS-PAGE elektroforezu.

Uzorak	*V*(uzorak)/µL	*V*(ReH_2O)/µL
WT	6,48	12,51
GFP 2	6,02	12,98
GFP 10-2	6,15	12,84
GFP 10-3	9,24	9,75
GFP 12	7,75	11,25
GFP 12 (100µg)	19,00	-
GFP 12 (Silamat)	5,75	13,25
TAP 5	5,41	13,60
TAP 7	6,20	12,80

3.6. *Western*-hibridizacija

Pomoću *blotting* metode *western* provjereno je sadrže li transgenične biljke doista fuzijske konstrukte SerRS-a i određenog privjeska. U tu svrhu je najprije 40 µg proteinskog izolata razdvojeno na 9 % SDS-PAGE gelu (15 minuta na 120 V, radi sabijanja uzoraka) i potom 45 minuta na 190 V). Na jednom gelu odvojeni su proteinski ekstrakti GFP linija i divljeg tipa, te su stavljene dvije pozitivne kontrole, tj. proteinski ekstrakti koje sadrže GFP protein (jedna pozitivna kontrola je sadržavala GFP protein u nedenaturirajućem puferu, a druga u denaturirajućem). Kako je koncentracija uzorka GFP 12 (100 mg) bila premalena da bi se moglo staviti 40 µg, stoga je uzet maksimalan volumen (19 µL) odnosno 19,6 µg. Na zasebnom gelu odvojeni su proteinski ekstrakti TAP uzoraka i divljeg tipa. Tijekom elektroforeze izrezano je po 6 filter papira i po 1 nitrocelulozna membrana (GE Healthcare) za pojedini gel, istih dimenzija kao gel za razdvajanje.

Nakon SDS-PAGE elektroforeze gelovi za sabijanje se odstrane, a gelovi za razdvajanje se namaču u transfer puferu 2-10 minuta. Sastav transfer pufera prikazan je u tablici 8. Po 3 filter papira za pojedini gel namočeni su u transfer puferu te su stavljeni na anodu (+), zatim se na njih stavi nitrocelulozna membrana koja je također bila namočena u transfer puferu. Na membranu se zatim stavi gel za razdvajanje i još 3 filter papira namočena u transfer puferu. Kotrljanjem

staklene pipete po svežnju pažljivo se istisne zrak, te se suvišak pufera obriše s anode. Sve se poklopi katodnom pločom i pusti struja konstantne jakosti. Po 1 cm^2 gela primjenjuje se struja jakosti 1 mA, u ovom slučaju ukupna površna dvaju gelova iznosila je 88,6 cm^2. Iz tog razloga pokrenut je transfer pri 90 mA koji je trajao 1,5 sat.

Tablica 8. Sastav pufera za transfer

14,4 g	Glicin
25 mL	1 mol/dm^3 Tris pH 7,4
200 mL	100 % etanol
	Voda do 1L

Nakon transfera nitrocelulozne membrane se stave u staklene Petrijeve zdjelice te se privremeno oboje inkubacijom u boji Ponceau S. Obojene membrane se skeniraju te se odboje pomoću vode. Da ne bi došlo do nespecifičnog vezanja antitijela na membrane slijedilo je blokiranje. Membrane s proteinima su inkubirane 1,5 sat u TBST puferu u koje je dodano mlijeko u prahu tako da njegov udio bude 5 %. Sastav TBST pufera prikazan je u tablici 9.

Tablica 9. Sastav TBST pufera

150 mmol/dm^3	NaCl
20 mmol/dm^3	Tris/HCl pH 7,4
0,2%	Tween

Nakon blokiranja membrane su kratko isprane s većom količinom TBST pufera + 5 % mlijeko, te su zatim isprane 3 puta istim puferom tako da su inkubirane 5 minuta na tresilici. Zatim su pripremljena antitijela tako da je uzeto 5 µL i razrijeđeno u 5,5 mL TBST puferu s 5 % mlijekom. Za detekciju GFP proteina korištena su anti GFP antitijela, a za detekciju TAP privjeska korištena su PAP antitijela (peroksidaza antiperoksidaza). PAP antitijela su konjugati, sadrže peroksidazu iz hrena (eng. *horseradish* peroxidase, HRP) vezanu na antiperoksidazno mjesto, pa ih iz toga razloga nije potrebno inkubirati sa sekundarnim antitijelima. Membrane su prekonoćno inkubirane na +4 °C uz protresanje, nakon čega su antitijela za GFP protein pohranjena na -20 °C jer se mogu nekoliko puta koristiti, dok su PAP antitijela bačena. Membrana s GFP uzorcima je zatim isprana s TBST puferom 4 puta po 5 minuta uz protresanje, te je zatim inkubirana sa

sekundarnim antitijelima (anti miš-HRP), koja su razrijeđena 3000 puta u TBST puferu s 5 % mlijekom, 1-1,5 sat uz protresanje na sobnoj temperaturi. Obje membrane su isprane s TBST puferom s 5 % mlijekom 2 puta po 5 minuta uz protresanje, te još 2 puta po 10 minuta uz protresanje.

Prije detekcije membrana s TAP uzorcima je podijeljena na dva dijela (oba dijela su sadržavala TAP 5 i TAP 7 uzorke i divlji tip). Signali na jednoj membrani detektirani su pomoću uređaja LiCor, a na ostalim membranama na fotografskom filmu.

Prije detekcije na filmu, pripremljene su otopine za kemiluminiscenciju. Pomiješano je 0,7 mL otopine 1 i 0,7 mL otopine 2 iz kita za kemiluminescentnu detekciju (*GE Healthcare, Amersham ™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent*). Sljedeći dio je rađen u tamnoj komori. Membrane s GFP i TAP uzorcima stavljene su na grafofoliju, te je na njih stavljena otopina za kemiluminiscentnu detekciju, te su membrane inkubirane 3 minute nakon čega je otopina maknuta. Na membrane je zatim stavljena još jedna grafofolija, te je na nju stavljen film. Na film je stavljen papir i teža knjiga kako bi se spriječilo neželjeno osvjetljavanje filma. Film je eksponiran 1 minutu, te je zatim najprije uronjen u razvijač do pojava pruga, zatim je uronjen u redestiliranu vodu i na kraju u fiksir.

Za detekciju signala na membrani sa TAP uzorcima na uređaju LiCor također je pripremljena otopina za kemiluminescentnu detekciju tako da je pomiješano 0,3 mL otopine 1 i 0,3 mL otopine 2 iz kemiluminescentnog kita(*GE Healthcare, Amersham ™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent*). Membrana je stavljena na grafofoliju te je na nju stavljen dio pripremljene otopine za kemiluminescentnu detekciju. Membrana je inkubirana 3 minute u mraku, nakon čega je otopina maknuta. Na uređaj LiCor stavljeno je malo otopine za kemiluminescentnu detekciju, te je na nju stavljena membrana te je pokrenut program za detekciju kemiluminescencije.

Nakon detekcije membrane su isprane s TBST puferom pa redestiliranom vodom, osušene i pohranjene na +4 °C.

3.7. Provjera enzimske aktivnosti

Ispitana je aminoacilacijska aktivnost proteinskih ekstrakta izoliranih iz biljaka divljeg tipa i transgeničnih linija. U pokusu se prati nastanak Ser-$tRNA^{Ser}$ koja je produkt enzimske aktivnosti SerRS. Koristi se radioaktivno obilježeni serin što omogućuje detekciju produkta enzimske reakcije ^{14}C-Ser-tRNASer. Reakcijska smjesa sadrži 125 µmol/dm^3 serina specifične aktivnosti 27,5 µCi/µL, 1 µmol/dm^3 ukupne tRNA iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, 0,225 µg proteinskog ekstrakta, 60 mmol/dm^3 Tris-HCl (pH 7,5), 15 mmol/dm^3 $MgCl_2$, 5 mmol/dm^3 ATP, 4 mmol/dm^3 ditiotreitol (DTT), 0,4 g/dm^3 albumina iz seruma goveda (eng. bovine serum albumin, BSA). Eksperimenti su rađeni na 30 °C pri čemu su reakcijske smjese prije započinjanja reakcije inkubirane na istoj temperaturi 2 – 5 minuta, nakon čega je reakcija započeta dodatkom odgovarajuće količine proteinskog ekstrakta. Alikvoti od 9 µL uzimani su nakon 2, 4, 6 i 8 minuta i nanošeni na filter papir dimenzija 2 x 1 cm (Whatman 3MM) i uranjani u otopinu hladne 10 % (*w/v*) trikloroctene kiseline čime je reakcija zaustavljena. Potom su ispirani 10 minuta u istoj otopini u kojoj je reakcija i zaustavljena (10 % (*w/v*) trikloroctena kiselina), zatim 2 x 5 minuta u 5 % (*w/v*) trikloroctenoj kiselini, 1 x 5 minuta u 96 % (*v/v*) etanolu i na kraju su stavljeni na sušenje na 80 °C pola sata. Nakon toga su uronjeni u 3 mL scintilacijske otopine sastava: 5 g/dm^3 2,5-difenil oksazol (PPO), 0,3 g/dm^3 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen (POPOP), toluen; i stavljeni u scintilacijski brojač. Aminoacilacijske eksperimente izveo je dr. sc. Mario Kekez.

3.8. Uzgoj biljaka izloženih stresu

Za provjeru utjecaja abiotičkog stresa uzrokovanog teškim metalom, kadmijem, uzgajan je divlji tip biljke *A. thalina* u tekućem MS mediju, koji je nakon 7 dana uzgoja zamijenjen svježim MS medijem koji je sadržavao kadmij.

Sjemenke divljeg tipa *A. thaliana* (ekotip Columbia) najprije su sterilizirane istim postupkom kao sjemenke transgeničnih linija (poglavlje 3.1). Nakon ispiranja, sjemenke su stavljene u 1 mL redestilirane vode, te stavljene u mrak na +4 °C na vernalizaciju. U ovom eksperimentu rađene su 2 biološke replike.

Priprema tekućeg MS medija slična je kao i priprema krutog medija samo što se ne dodaje agaroza. Dakle za 1 L MS medija potrebno je otopiti 4,4 g MS5519 medija i 20 g saharoze, te se pripremljena otopina titrira s KOH i HCl do pH 5,7, te na kraju sterilizira u autoklavu.

5mL tekućeg MS medija stavljeno je u sterilne Erlenmayerove tikvice od 50 mL s metalnim poklopcem, te su zatim dodane vernalizirane sjemenke divljeg tipa *A. thaliana*. Nakon sedam dana uzgoja uz potresanje narasli su buseni isprepletenih klijanaca koji su prebačeni u male petrijeve zdjelice. Stari MS medij je bačen te je dodan svježi MS medij koji je sadržavao određenu koncentraciju kadmijevih iona (rađeno je s dvije koncentracije kadmijevih iona 200 µmol/dm^3 $CdCl_2$ i 1000 µmol/dm^3 $CdCl_2$), odnosno u kontrolne uzorke dodan je MS medij bez kadmijevih iona. Klijanci su izloženi stresu 8 i 24 sata. Nakon izlaganja stresu klijanci su isprani destiliranom vodom i osušeni, te smrznuti za daljnju obradu.

Dobiveni biljni materijal je stavljen u konusne epruvete od 50 mL s keramičkim kuglicama, te je dodano 1,5 mL TRIzola, te je tako biljni materijal homogeniziran na vorteksu. Konusne epruvete su kratko centrifugirane te je dobivena suspenzija prebačena u mikroepruvete, te je slijedila izolacija RNA prema metodi 3 (poglavlje 3.2.3.). U ovom slučaju biljni materijal nije izvagan, pa je korišten konstantni volumen TRIzola (1,5 mL).

Izoliranoj RNA izmjerena je koncentracija na uređaju NanoDrop, nakon čega je slijedio DNazni tretman. U reakcijsku smjesu za DNazni tretman stavljeno je 20 µg izolirane RNA, zajedno sa DEPC vodom činilo je 42,75 µL jedinične reakcijske smjese. U jediničnu reakcijsku smjesu dodano je još 5 µL DNaze, 2 µL pufera za DNazu, te 0,25 µL inhibitora RNaza. Reakcijske smjese su inkubirane 30 minuta na 37 °C, nakon čega je dodano 5 µL inaktivacijskog reagensa, te je sve inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje. Zatim su uzorci centrifugirani 1,5 minuta pri 10 000 rpm, te je supernatant u kojem se nalazi RNA prebačen u

nove mikroepruvete. Dobivena RNA nakon DNaznog tretmana je pretaložena tako da je u otopinu dodano 10 µL otopine natrijevog acetata koncentracije 3 mol/dm^3 i 250 µL 100 % etanola. Uzorci su stavljeni na -20 °C preko noći te su sljedeći dan centrifugirani 30 minuta pri 10 000 rpm i +4 °C. Supernatant je bačen, a talog RNA je otopljen u 30 µL DEPC vode, te je uzorcima izmjerena koncentracija pomoću uređaja NanoDrop.

Nakon DNaznog tretmana i pretaloživanja slijedila je reverzna traskripcija. Postupak reverzne transkripcije bio je isti kao i kod uzgoja transgeničnih biljaka (poglavlje 3.4.).

3.9. Kvantitativni PCR (qPCR)

Dobivena cDNA je razrijeđena pet puta, te je zatim analizirana kvantitativnim PCR-om koristeći početnice koje su specifične za transgenične konstrukte GFP-SerRS i SerRS-TAP (GFP_GS i TAP_ST), početnice koje su specifične gen za BEN1 (BEN1MAR), početnice koje su specifične za endogenu SerRS (SerRS3'UTR), početnice koje odgovaraju i endogenom genu za SerRS i SerRS fuzijskim konstruktima (SerRS), te početnice koje su specifične za GFP (GFP) i TAP (TAP). Korištene su početnice za 3 različite endogene kontrole (GAPDH, AKT2 i EXP). Sljedovi svih korištenih parova početnica, veličine njihovih produkata umnažanja i učinkovitost umnažanja prikazani su u tablici 10.

Tablica 10. Sljedovi parova početnica korištenih u qPCR reakcijama i veličine njihovih produkata umnažanja i učinkovitost umnažanja. (Prikazane su i neke početnice koje su korištene tijekom izrade diplomskog rada, ali rezultati tih eksperimenata nisu prikazani u ovom diplomskom radu)

Naziv početnica		Slijed početnica	Veličina amplikona	Efikasnost umnažanja *
SerRS	SerRS_F	5' GAG CAG CCT CTT TGT GCG TA 3'	111 pb	1,87
	SerRS_R	5' TCC ATG TGA ACC GGC TTC TT 3'		
SerRS3'UTR	SerRS_3UTR_F	5' AGC CCG TAG TTG CTG ATA CC 3'	90 pb	1,86
	SerRS_3UTR_R	5' AAT TTC AAG AAA ACA GAA GAG TCG T 3'		
GFP_GS	GFPSer_FGS	5' GGA TCA CTC TCG GCA TGG AC 3'	135 pb	1,85
	GFPSer_R	5' GGC GTT GCG ATT CTC GGA TA 3'		
GFP	GFP_F	5' ACC TAC GGC GTG CAG TG 3'	94 pb	1,97
	GFP_R	5' GCT CCT GGA CGT AGC CTT 3'		
TAP_ST	SerTAP_FST	5' AGC CCG TAG TTG CTG ATA CC 3'	118 pb	1,82
	SerTAP_RST	5' GCT GCT GAG ACG GCT ATG AA 3'		
TAP	TAP_F	5' CAG CCA ACC GCT TTA AGA AA 3'	73 pb	2,01
	TAP_R	5' TTC TCG CTA GCA GTA GTT GGA A 3'		
BEN1MAR	BEN1MAR_F	5' CCT CAG TTT CAG CTA CCT TCA ATA 3'	78 pb	1,84
	BEN1MAR_R	5' CAG CTT CTT CGA TGA AAG ACC 3'		
GAPDH	GAPDH_F	5' TTG GTG ACA ACA GGT CAA GCA 3'	62 pb	1,84
	GAPDH_R	5' AAA CTT GTC GCT CAA TGC AAT C 3'		
AKT2	AKT2_F	5' CTT GCA CCA AGC AGC ATG AA 3'	68 pb	1,89
	AKT2_R	5' CCG ATC CAG ACA CTG TAC TTC CTT 3'		
EXP	EXP_F	5' GAG CTG AAG TGG CTT CCA TGA C 3'	81 pb	1,89
	EXP_R	5' GGT CCG ACA TAC CCA TGA TCC 3'		
TIP41	TIP41_F	5' GTG AAA ACT GTT GGA GAG AAG CAA 3'	61 pb	1,88
	TIP41_R	5' TCA ACT GGA TAC CCT TTC GCA 3'		

*Efikasnosti umnažanja amplikona odnosi se na eksperimente sa transgeničnim biljkama.

Na mikrotitarskoj pločici za qPCR eksperimente pripremljene su reakcijske smjese s uzorcima cDNA, te su ujedno i postavljene negativne kontrole (NTC) gdje se umjesto uzorka cDNA u reakcijsku smjesu doda redestilirana voda. Sastav jedinične reakcije i negativne kontrole prikazan je u tablici 11. Na mikrotitarsku pločicu stavljena je folija za qPCR, te je pločica kratko centrifugirana i stavljena u uređaj za qPCR (*Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR System*). Pokrenut je program za kvantitativni PCR koji ujedno nakon provedenog PCR-a mjeri temperaturu mekšanja umnoženih DNA produkata. Nakon završetka programa, mikrotitarska pločica je

pohranjena na +4 °C, a dobiveni podaci su analizirani u programu *Excel*. Za svaki par početnica izračunata je efikasnost umnažanja amlplikona pomoću programa *LinRegPCR* (36).

Tablica 11. Sastav jedinične qPCR reakcije i negativne kontrole.

komponenta	**jedinična reakcija**	**negativna kontrola (NTC)**
	*V(komponente)/*µL	*V(komponente)/*µL
Power SYBR Green Master Mix (Termo Fischer)	10,0	10,0
Uzvodna početnica (F)*	2,0	2,0
Nizvodna početnica (R)*	2,0	2,0
cDNA	2,0	-
ReH_2O	4,0	6,0
	∑=20µL	∑=20µL

* Početne koncentracije početnica su bile 3 µmol/dm^3, a u konačnoj reakcijskoj smjesi 0,3 µmol/dm^3.

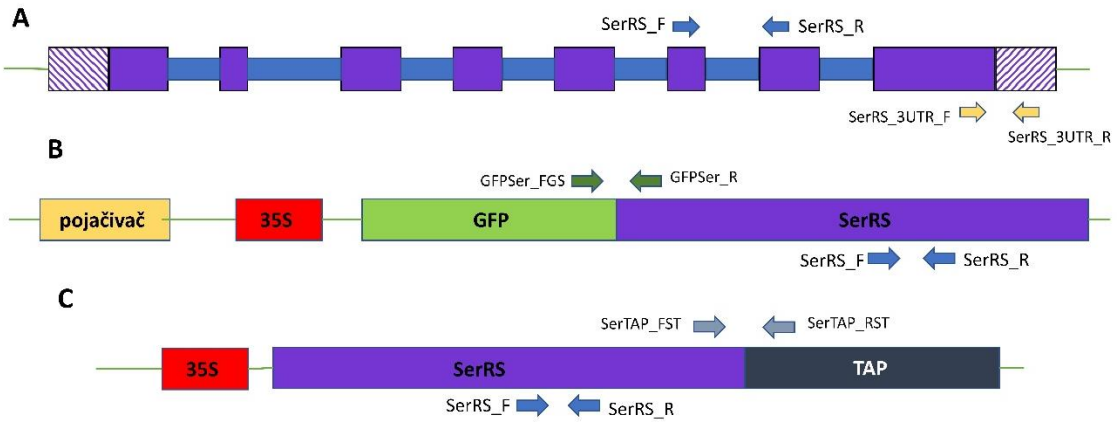
4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Analiza transgeničnih biljaka koje prekomjerno eksprimiraju SerRS

U prethodnim istraživanjima pripremljene su transgenične linije biljke *A. thaliana* koje prekomjerno eksprimiraju seril-tRNA-sintetazu u obliku fuzijskih proteina (3). Transgenične linije dobivene su transfekcijom pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens.* Bakterije *A. tumefaciens* sadrže Ti plazmid koji sadrži dio zvan T-DNA. Prilikom infekcije biljke bakterijom *A. tumefaciens* T-DNA se prenosi u biljnu stanicu i ugrađuje se u biljni genom. Genetičkim inženjerstvom se T-DNA u Ti plazmidu može izmijeniti tako da sadrži gen koji se želi ugraditi u genom biljke (37).

U jedan tip transgeničnih biljaka ugrađen je konstrukt za fuzijski protein koji se sastoji od SerRS-a i zelenog fluorescentnog proteina (eng. *green fluorescent protein*, GFP) na N-terminalnom kraju SerRS. GFP-SerRS konstrukt nalazi se pod kontrolom jakog biljnog konstitutivnog promotora CaMV 35S, ispred kojeg se nalazi pojačivač (eng. *enhancer*) koji dodatno pojačava transkripciju (Slika 8.B). Ove transgenične linije su prethodno bile korištene za određivanje staničnog smještaja SerRS (12), jer GFP pobuđen UV svjetlošću emitira zelenu fluorescenciju koja se može detektirati pomoću fluorescencijskog mikroskopa (34).

U drugi tip transgeničnih biljaka ugrađen je konstrukt za fuzijski protein SerRS-a sa TAP privjeskom na C-terminalnom kraju SerRS. SerRS-TAP konstrukt je stavljen pod kontrolu jakog biljnog konstitutivnog promotora CaMV 35S (Slika 8.C) TAP privjesak služi za afinitetno supročišćavanje proteina spregnuto sa spektrometrijom masa (eng. *tandem affinity purification-mass spectrometry*, TAP-MS) i sastoji se od kalmodulin-vezujućeg peptida, veznog mjesta za proteazu TeV (eng. *tobacco etch virus*) i proteina A koji ima veliki afinitet vezanja na imunoglobuline G (IgG). TAP privjesak često se koristi za pročišćavanje ciljnih proteina u kompleksu s proteinskim interaktorima (38). Ove biljke su korištene u identifikaciji proteinskih interaktora SerRS (3).



Slika 8. Shematski prikaz gena za endogeni SerRS i fuzijskih SerRS konstrukata kod transgeničnih linija *A. thaliana*, te položaj pojedinih parova početnica korištenih u qPCR-u. A – gen za endogeni SerRS, sastoji se od 8 eksona i 7 introna; ljubičasto je označen otvoreni okvir čitanja za SerRS, dijagonalnim linijama su označeni 5'-UTR i 3'-UTR, veći pravokutnici odgovaraju eksonima, plavom bojom označeni su introni, B – GFP-SerRS konstrukt ugrađen u GFP linije, sastoji se od kodirajućeg slijeda za fuzijski protein GFP-SerRS (zeleno – otvoreni okvir čitanja za GFP, ljubičasto – otvoreni okvir čitanja za SerRS), promotora CaMV 35S (crveno) i pojačivača (žuto), C - SerRS-TAP konstrukt ugrađen u TAP linije sastoji se od kodirajućeg slijeda za fuzijski protein SerRS-TAP (ljubičasto – otvoreni okvir čitanja za SerRS, crno – otvoreni okvir čitanja za TAP privjesak) i CaMV 35S promotora (crveno)

U ovom diplomskom radu detaljno su okarakterizirane dvije transgenične linije koje eksprimiraju GFP-SerRS (linije GFP 2 i GFP 10) i dvije linije koje eksprimiraju SerRS-TAP (linije TAP 5 i TAP 7).

4.1.1. Analiza ekspresije na razini mRNA

4.1.1.1. Odabir metode za izolaciju ukupne RNA

Na početku je bilo potrebno odabrati metodu izolacije ukupne RNA iz biljaka koja će dati RNA dovoljne količine i visoke čistoće kako bi se mogla analizirati RT-qPCR-om. U tu svrhu iz klijanaca transgenične linije GFP 2 starih 6 dana paralelno je izolirana ukupna RNA korištenjem tri različite metode. Sve tri metode se baziraju na izolaciji RNA pomoću TRIzola. Metoda 1 i 2 razlikuju u tome što je u metodi 1 korišten izopropanol sobne temperature i inkubacija sa izopropanolom se odvijala na sobnoj temperaturi, dok se u metodi 2 koristio hladni izopropanol i inkubacija s njim

se odvijala na ledu. Metoda 3 je najsličnija metodi 2. U metodi 3 uz hladni izopropanol dodaje se još otopina visoke soli (1,2 mol/dm^3 natrijev acetat, 0,8 mol/dm^3 natrijev klorid, 0,1 % DEPC), te na kraju izolacije slijedi dodatno pretaloživanje.

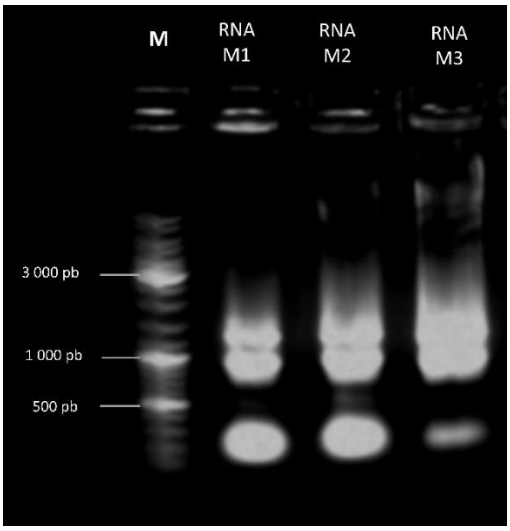
Nakon izolacije određena je koncentracija ukupne RNA pomoću uređaja NanoDrop, te su uzorci podvrgnuti DNaznom tretmanu kako bi se odstranila genomska DNA, koja se ponekad izolirata uz RNA. Ponovno je izmjerena koncentracija ukupne RNA pomoću uređaja NanoDrop. Čistoća uzoraka procijenjena je pomoću omjera absorbancija A_{260} i A_{280}, te omjera A_{260} i A_{230} dobivenih tijekom mjerenja koncentracije ukupne RNA pomoću uređaja NanoDrop.

Općenito omjer A_{260}/A_{280} govori o čistoći nukleinskih kiselina kod njihove izolacije. Nukleinske kiseline apsorbiraju zračenje valne duljine 260 nm, dok proteini apsorbiraju zračenje valne duljine 280 nm. Kod izolacije DNA omjer $A_{260}/A_{280} \sim 1{,}8$ se obično uzima kao čista DNA, dok kod izolacije RNA omjer $A_{260}/A_{280} \sim 2{,}0$ se uzima kao čista RNA. Kao sekundarni indikator čistoće nukleinskih kiselina uzima se omjer A_{260}/A_{230}, za čiste uzorke nukleinskih kiselina taj omjer je obično veći od omjera A_{260}/A_{280} i obično iznosi 2,0-2,2. Soli i neki spojevi iz TRIzola mogu apsorbirati pri 230 nm, te se tako iz omjera A_{260}/A_{280} može uočiti da li su neki od tih spojeva zaostali tokom izolacije (39).

Prema podacima iz tablice 12. treća metoda izolacije RNA daje najčišću RNA. Metoda 3 ima jedno pretaloživanje RNA više nego metode 1 i 2, te iako se često tijekom pretaloživanja dio uzorka izgubi, taj korak daje čišći uzorak RNA, a dobivena količina RNA je dovoljno velika da se s njom može napraviti DNazni tretman. Uzorci ukupne RNA dodatno su provjereni elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu (slika 9.). Može se zamijetiti kako kod uzorka RNA dobivenog trećom metodom pruga koja odgovara molekulama RNA malih molekulskih masa ima manji intenzitet u odnosu na uzorke RNA dobivenih metodom 1 i metodom 2, dok su kod tog trećeg uzorka vrpce s većim molekulskim masama intenzivnije. Razlog tome bi bio da nukleinske kiseline većih molekulskih masa bolje talože od manjih u otopini s više soli.

Tablica 12. Masene koncentracije uzoraka RNA dobivenih različitim metodama izolacije (M1 – metoda 1, M2 – metoda 2, M3 – metoda 3)

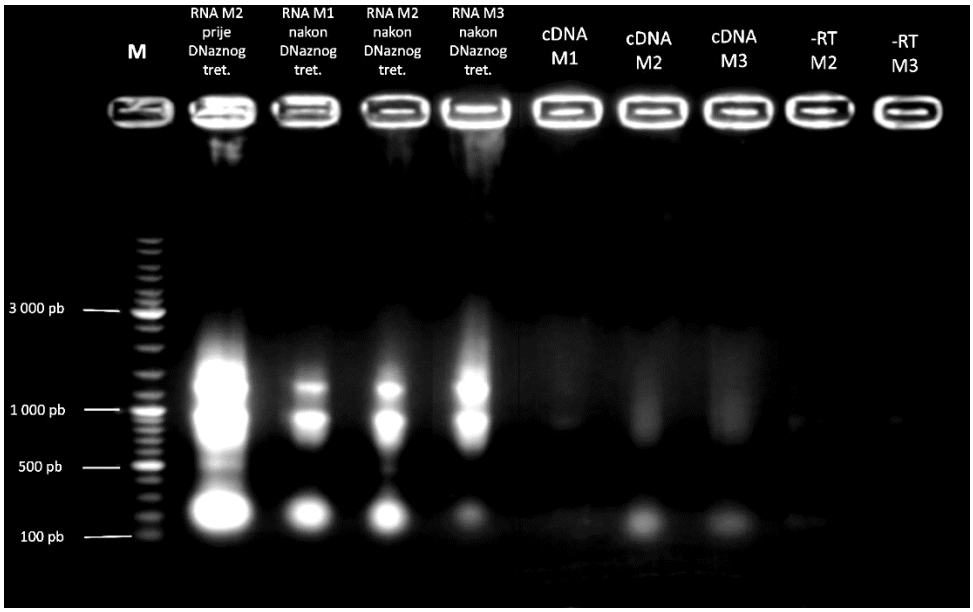
	Masena koncentracija RNA prije DNaznog tretmana			**Masena koncentracija RNA nakon DNaznog tretmana**		
UZORAK	γ/ng µL^{-1}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	γ/ng µL^{-1}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
M1	712,13	1,99	0,71	205,61	1,95	0,68
M2	1251,55	1,97	0,84	201,57	1,98	0,74
M3	898,68	2,16	2,14	213,15	2,03	1,83



Slika 9. Elektroforeza (30 min, 120 V, 1 % agarozni gel) izolata ukupne RNA dobivenih korištenjem tri različite metode izolacije. M – marker (GeneRuler Mix, Thermo Scientific), RNA M1 – izolat ukupne RNA dobiven metodom 1, RNA M2 – izolat ukupne RNA dobiven metodom 2, RNA M3 – izolat ukupne RNA dobiven metodom 3

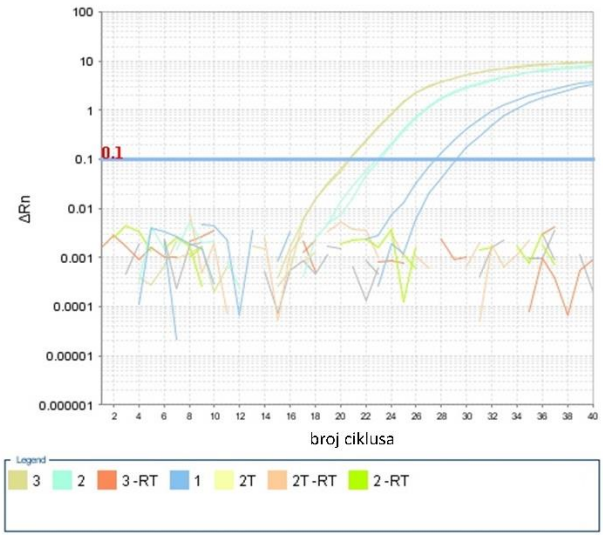
Nakon izolacije, 12,5 µg ukupne RNA podvrgnuto je DNaznom tretmanu u ukupnom volumenu od 50 µL. Nakon DNaznog tretmana masena koncentracija sva tri uzorka je relativno slična što je i očekivano jer se jednaka masa RNA uzela za DNazni tretman, a volumen reakcijske smjese je bio jednak. Teorijska masena koncentracija nakon DNaznog tretmana je 250 ng/µL. Dobivene masene koncentracije su nešto manje, jer je moguće da se dio uzorka izgubio tijekom centrifugiranja nakon inaktivacije DNaze. Čistoća uzoraka nakon DNaznog tretmana se nešto smanjila što nam govori da je u otopini zaostalo nekih spojeva iz DNazne reakcije.

Nakon DNaznog tretmana po 1 µg svakog uzorka ukupne RNA podvrgnut je reverznoj transkripciji. Uz te uzorke pripremljene su i dvije negativne kontrole, uzorci ukupne RNA ali bez dodane reverzne transkriptaze (-RT M2 i -RT M3), kako bi se provjerilo jesu li uzorci kontaminirani genomskom DNA. Nakon reverzne transkripcije svi uzorci su naneseni na gel (slika 10.) i uočena je sinteza cDNA u uzorcima M2 i M3, nešto manje u M1 dok u -RT uzorcima nije bilo cDNA što je i očekivano. Zanimljivo je da se intenzitet pruge RNA malih molekulskih masa smanjio u uzorku M3 čime je taj uzorak obogaćen molekulama RNA veće molekulske mase što je dobro za sljedeće korake u RT-qPCR-u.



Slika 10. Elektroforeza(50 min, 120 V, 1 % agarozni gel) izolata RNA prije DNaznog tretmana, nakon DNaznog tretmana, uzoraka cDNA nakon reverzne transkripcije, te -RT uzoraka. M – marker (GeneRuler Mix, Thermo Scientific)

Dobivene cDNA, kao i -RT uzorci nakon reverzne transkripcije analizirani su u tehničkim duplikatima qPCR-om sa SerRS3'UTR početnicama (Slika 11.). Dobivene su sljedeće srednje vrijednosti za tehničke duplikate: C_T(M1) = 28,37, C_T(M2) = 23,02, C_T(M3) = 20,76. Kod uzorka M1 postoji veća razlika među tehničkim duplikatima, što bi moglo značiti da u reakcije nije stavljena jednaka količina cDNA. Kod -RT uzoraka nema umnažanja što je dodatna potvrda da u uzorcima nema genomske DNA.



Slika 11. Krivulja amplifikacije dobivena qPCR analizom tehničkih duplikata tri uzorka cDNA, -RT uzoraka i negativnih kontrola (uzorci bez dodane cDNA). Korištene su početnice SerRS3'UTR.

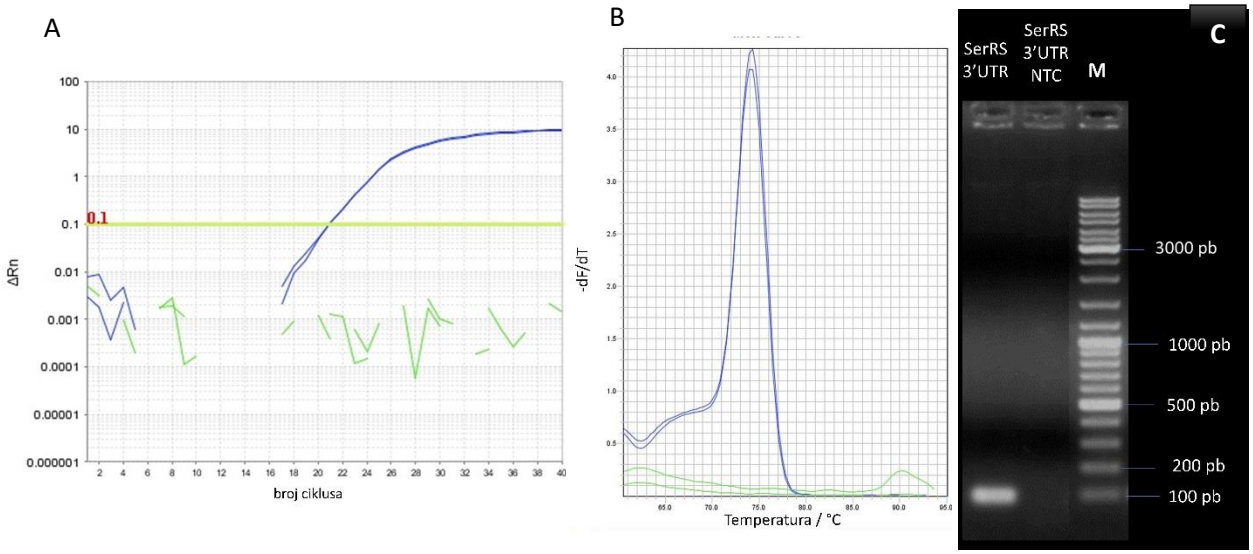
Rezultati qPCR-a također upućuju na to da metodom izolacije 3 se dobiva veći udio RNA većih molekulskih masa. Metoda izolacije 3 daje najmanju C_T vrijednost, što znači da je kod tog uzorka prije postignuta granična razina fluorescencije, odnosno da u uzorku u početku ima više mRNA za GFP-SerRS konstrukt u odnosu na ostala dva uzorka.

Na temelju ovih rezultata utvrđeno da je metoda 3, od isprobane 3 metode, najbolja metoda za izolaciju RNA za potrebe analize RT-qPCR-a, te je tako ovom metodom izolirana RNA kod ostalih eksperimenata.

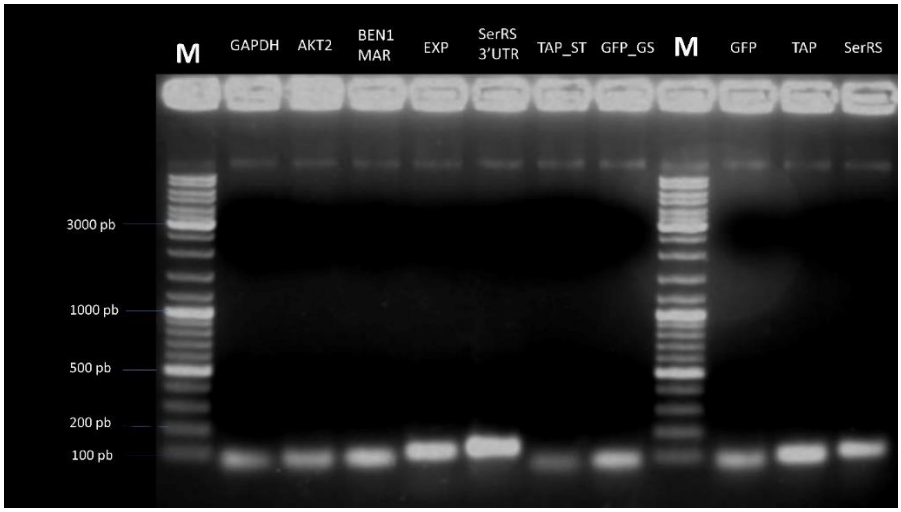
4.1.1.2. Provjera početnica

Kako bi se kasnije mogli analizirati uzorci cDNA napravljen je probni qPCR u kojem su upotrjebljeni svi parovi početnica, koji su se kasnije koristili u analizi, na uzorku cDNA M3 iz probne izolacije metodom 3. Probnim qPCR-om parovi početnica su ispitani da li umnažaju cDNA, da li je taj amplikon očekivane veličine i da li možda daju neki dodatni neželjeni produkt (npr. dimer početnica).

Na slici 12 prikazan je primjer provjere para početnica SerRS3'UTR. U qPCR eksperimentu za svaku reakciju rađena su dva mjerenja (tehnički duplikati). Krivulje amplifikacije pokazuju da je došlo do umnažanja u oba tehnička duplikata (slika 12.A). Na temelju krivulja mekšanja može se zaključiti da početnice daju samo jedan produkt jer se na krivulji pojavljuje samo jedan pik (slika 12B). Veličina amplikona provjerena je elektroforezom na 1,4 % agaroznom gelu (Slika 12.C) i poklapa se sa teorijskom veličinom. U negativnoj kontroli (eng. *non-template control*, NTC) koja u reakcijskoj smjesi sadrži početnice, ali ne i cDNA nema umnažanja. Ovaj rezultat pokazuje da početnice ne stvaraju dimere početnica te da nisu kontaminirane s DNA. I kod ostalih parova početnica uočeno je da dolazi do umnažanja amplikona te nisu primijećeni dodatni neželjeni produkti (slika 13.).



Slika 12. A - Krivulja amplifikacije dobivena qPCR-om korištenjem SerRS3'UTR para početnica početnica (plavo - uzorci s cDNA, zeleno - negativna kontrola), B – Krivulja mekšanja dobivena qPCR-om korištenjem SerRS3'UTR para početnica(plavo - uzorci s cDNA, zeleno - negativna kontrola) , C - Elektroforeza (60minuta, 120V na 1,4 % agarozni gelu) SerRS3'UTR amplikona i uzorka negativne kontrole (NTC)

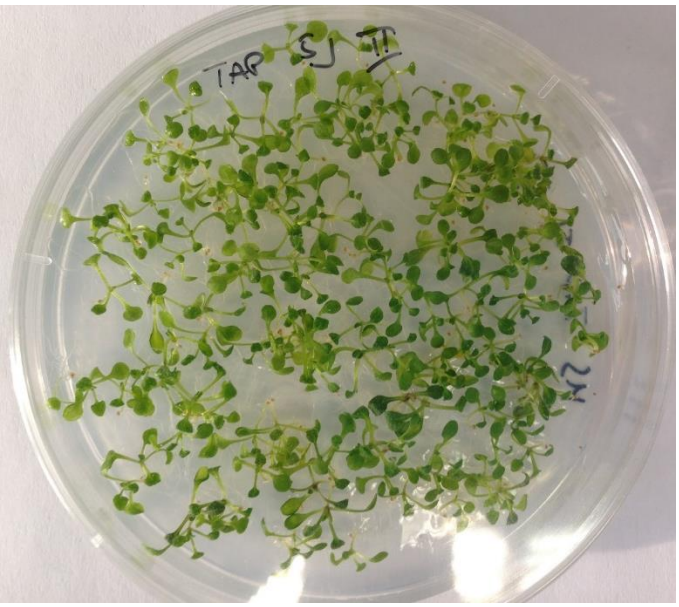


Slika 26. Elektroforeza (45 minuta, 120 V) amplikona svih početnica na 1,4 % agaroznom gelu; M – marker (GeneRuler Mix, Thermo Scientific)

4.1.1.3. Ekspresija fuzijskih konstrukta kod transgeničnih biljaka

Kako bi se okarakterizirale pojedine transgenične linije potrebno je odrediti razinu prekomjerne ekspresije SerRS, tj. odrediti omjer ekspresije fuzijskog SerRS konstrukta u odnosu na ekspresiju gena za endogeni SerRS unutar svake od transgeničnih linija. Razina prekomjerne ekspresije može se odrediti RT-qPCR metodom.

U tu svrhu uzgajani su biološki duplikati klijanaca transgeničnih linija (GFP 2, GFP 10, TAP 5 i TAP 7) i divljeg tipa 8 dana na krutoj hranjivoj podlozi uz simulaciju dugog dana (Slika 13.). Nakon 8 dana rasta iz klijanaca izolirana je ukupna RNA prema odabranoj metodi (poglavlje 3.2.4.). Nakon izolacije RNA odvojen je alikvot od 10 µL koji se koristio za elektroforezu i mjerenje masene koncentracije na uređaju NanoDrop.

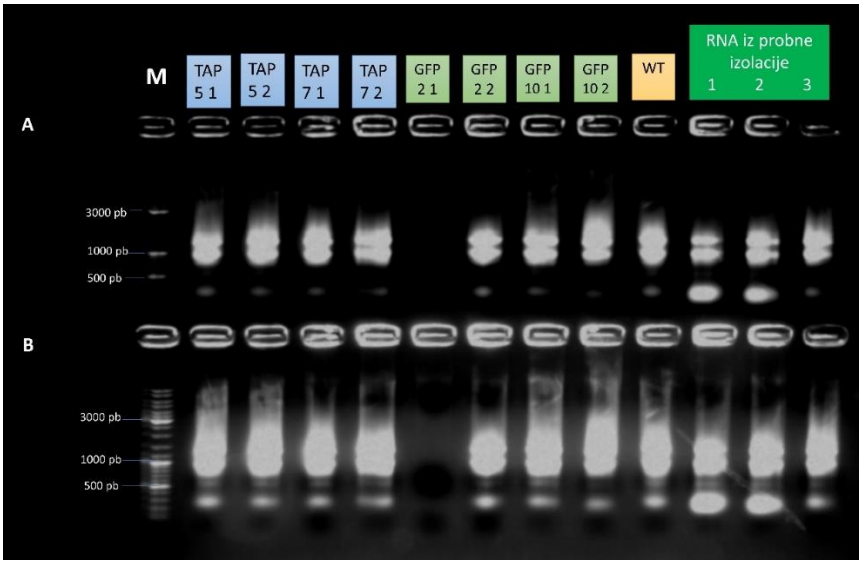


Slika 13. Osam dana stari klijanci transgenične linije TAP 5 (drugi biološki replikat) uzgajani na krutoj MS podlozi.

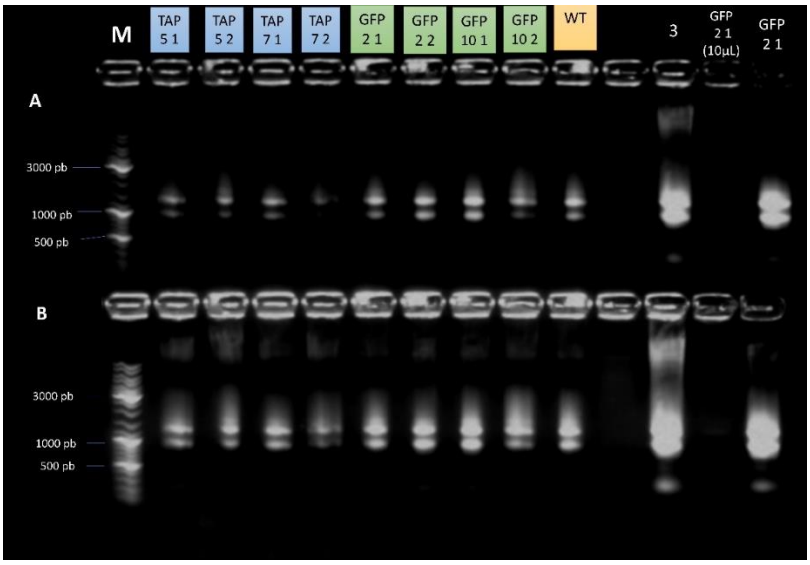
Prema omjerima absorbancija A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} iz tablice 13. može se vidjeti kako su izolati ukupne RNA prilično čisti. Nakon elektroforeze ukupne RNA (slika 14.) izgledalo je da se u uzorku GFP 2 1 nije izolirala RNA, dok je NanoDrop pokazivao određenu masenu koncentraciju. Svi uzorci su podvrgnuti DNaznom tretmanu, te je izmjerena masena koncentracija ukupne RNA. Nakon DNaznog tretmana RNA je provjerena elektroforezom, te je dodatno provjerena ukupna RNA prije DNaznog tretmana uzoraka GFP 2 1 (radna otopina ukupne RNA i radni alikvot od 10 µL)(Slika 15.). Uočeno da se RNA u radnom alikvotu od 10 µL degradirala, dok se RNA u radnoj otopini ukupne RNA nije.

Tablica 13. Masene koncentracije RNA prije i poslije DNaznog tretmana izoliranih iz bioloških duplikata 8 dana starih klijanaca transgeničnih linija i biljaka divljeg tipa

	Masena koncentracija RNA prije DNaznog tretmana				**Masena koncentracija RNA nakon DNaznog tretmana**		
uzorak	γ/ng µL^{-1}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}		γ/ng µL^{-1}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
TAP 5 1	1239,6	2,15	2,29		220,0	2,03	1,93
TAP 5 2	1438,94	2,16	2,33		219,87	2,02	1,98
TAP 7 1	623,43	2,18	2,16		237,38	2,03	1,87
TAP 7 2	1893,71	2,04	2,23		102,1	1,99	1,61
GFP 2 1	1908,95	2,11	2,28		143,75	2,02	1,81
GFP 2 2	894,13	2,17	2,18		198,26	2,02	1,81
GFP 10 1	1849,74	2,14	2,36		221,81	2,02	1,96
GFP 10 2	504,05	2,18	2,09		287,38	2,02	1,9
WT	1038,37	2,17	2,23		220,32	2,01	1,85

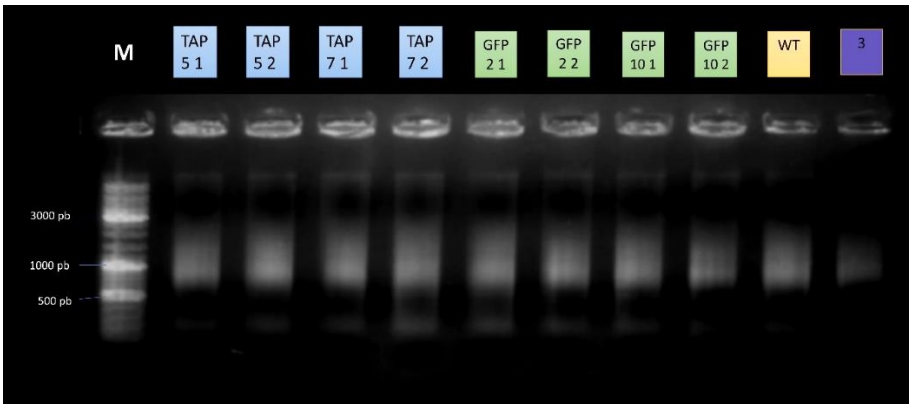


Slika 14. Elektroforeza (30 min, 120 V, 1 % agarozni gel) 2 µg RNA prije DNaznog tretmana dobivenih izolacijom iz klijanaca transgeničnih linija i biljaka divljeg tipa (WT), te RNA iz probnih izolacija metodama 1, 2 i 3 (pozitivne kontrole) ; A – gel snimljen pod manjom ekspozicijom, B – gel snimljen pod većom ekspozicijom, M – marker (GeneRuler Mix, Thermo Scientific).



Slika 15. Elektroforeza (30 min, 120 V, 1 % agarozni gel) 300 ng RNA nakon DNaznog tretmana dobivenih izolacijom iz klijanaca transgeničnih linija i biljaka divljeg tipa (WT), te 2 µg RNA iz probne izolacija metodom 3 (pozitivna kontrola) i RNA prije DNaznog tretmana za uzorak GFP 2 1 ; A – gel snimljen pod manjom ekspozicijom, B – gel snimljen pod većom ekspozicijom; M – marker (GeneRuler Mix, Thermo Scientific)

Po 1 µg ukupne RNA nakon DNaznog tretmana svih uzoraka podvrgnut je reverznoj transkripciji, nakon čega su uzorci podvrgnuti elektroforezi da bi se provjerilo je li došlo do sinteze cDNA (Slika 16.).



Slika 16. Elektroforeza (30 min, 120 V, 1 % agarozni gel) 2 µL svakog uzorka cDNA dobivenie iz klijanaca transgeničnih linija i biljaka divljeg tipa (WT) i 2 µL cDNA iz probne izolacije metodom 3 (pozitivna kontrola), M – marker (GeneRuler Mix, Thermo Scientific)

Nakon što je utvrđeno elektroforezom da je reverznom transkripcijom dobivena cDNA, provedena je qPCR analiza. Za praćenje ekspresije gena za endogeni SerRS korištene su SerRS3'UTR početnice. Ovaj par početnica odgovara 3'-kraju okvira čitanja gena za SerRS i netranslatiranom dijelu na 3'-kraju. Kako ove početnice zahvaćaju netraslatirani dio gena za SerRS koji se nalazi samo u endogenom genu, a ne i u fuzijskim konstruktima tako se pomoću ovog para početnica može pratiti samo ekspresija gena za endogeni SerRS. Za praćenje ekspresije GFP-SerRS konstrukta korištene su GFP_GS početinice. Ove početnice odgovaraju 5'-kraju kodirajućeg slijeda za SerRS i 3'-kraju kodirajućeg slijeda za GFP te su specifične za GFP-SerRS konstrukt. Za praćenje ekspresije SerRS-TAP konstrukta korištene su TAP_ST početnice. TAP_ST početnice odgovaraju 3'-kraju kodirajućeg slijeda za SerRS i 5'-kraju kodirajućeg slijed za TAP privjesak, te su specifične samo za SerRS-TAP konstrukt. U ovim eksperimentima pratila se ekspresija fuzijskog konstrukta u odnosu na endogeni SerRS u istom uzorku, pa nije potrebno rezultate normalizirati u odnosu na endogenu kontrolu.

Svi uzorci cDNA najprije su razrjeđeni pet puta, te su zatim analizirani qPCR-om. cDNA GFP i TAP linija analizirana je sa SerRS3'UTR početnicama. cDNA iz GFP transgeničnih linija dodatno je analizirana korištenjem GFP_GS početnica, a cDNA iz TAP transgeničnih linija analizirana je dodatno sa TAP_ST početnicama. Za sve početnice napravljene su negativne kontrole (eng. *non-template control*, NTC), gdje je reakcijsku smjesu umjesto cDNA dodana voda. Za sve reakcije napravljeni su tehnički duplikati. Rezultati dobiveni qPCR-om zatim su statistički obrađeni u *Excel* programu, efikasnost početnica određena je *LinReg*PCR programom.

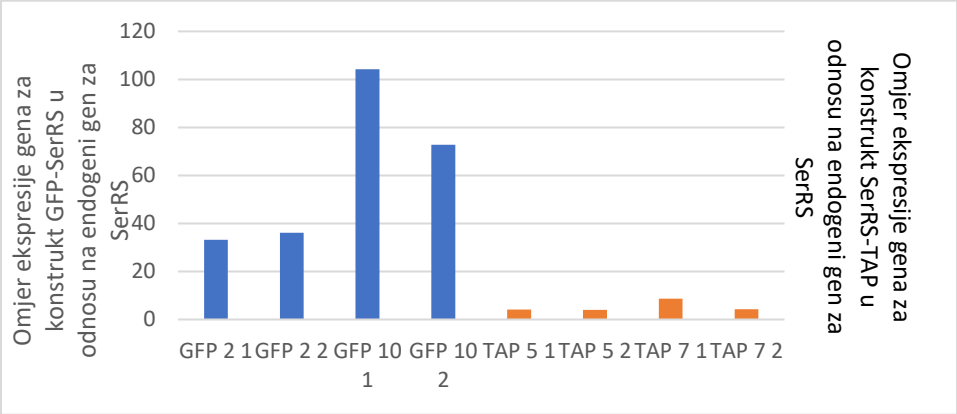
Rezultati prikazani u tablici 14. i na slici 17. ukazuju na prekomjernu ekspresiju fuzijskih SerRS konstrukta u odnosu na endogeni SerRS. Prekomjerna ekspresija najveća je u liniji GFP 10, a najmanja u liniji TAP 5. Uočava se da je kod GFP linija prekomjerna ekspresija puno veća (30-100 x) nego kod TAP linija (4-8 x) . Ova razlika je vjerojatno posljedica toga što je konstrukt GFP-SerRS kod GFP linija stavljen pod regulaciju jakog biljnog konstitutivnog promotora CaMV 35S ispred kojeg se nalazi pojačivač, dok je kod TAP linija konstrukt SerRS-TAP stavljen samo pod kontrolu CaMV 35S promotora bez pojačivača (slika 8). Između GFP linije 2 i 10 također postoji

razlika. Moguće da je konstrukt GFP-SerRS u liniji GFP 10 ugrađen u dio genoma koji je transkripcijski više aktivan pa je iz tog razloga njegova ekspresija veća nego u liniji GFP 2.

Tablica 14. Omjer ekspresije gena za fuzijske SerRS konstrukte u odnosu na endogeni gen za SerRS dobiven qPCR analizom cDNA iz 8 dana starih klijanaca transgeničnih linija

uzorak	srednja vrijednost Cт tehničkih duplikata (SerRS3'UTR)	srednja vrijednost Cт tehničkih duplikata (GFP_GS)	srednja vrijednost Cт tehničkih duplikata (TAP_ST)	$2^{-\Delta C_T}$*
GFP 2 1	19,72	14,67		33,17
GFP 2 2	20,36	15,18		36,16
GFP 10 1	20,27	13,56		104,18
GFP 10 2	20,09	13,91		72,82
TAP 5 1	19,83		17,80	4,08
TAP 5 2	19,63		17,61	4,03
TAP 7 1	19,75		16,64	8,68
TAP 7 2	19,91		17,80	4,32

*$2^{-\Delta C_T}=2^{-\Delta C_T\ (C_T GFP_GS - C_T SerRS3UTR)}$ odnosno $2^{-\Delta C_T\ (C_T TAP_ST - C_T SerRS3UTR)}$



Slika 17. Prikaz omjera ekspresije fuzijskih SerRS konstrukata u odnosu na endogeni gen za SerRS dobiven qPCR analizom cDNA

4.1.2. Ekspresija gena za protein BEN1 u transgeničnim biljkama

U prethodnim istraživanjima uočeno je da SerRS i BEN1 tvore proteinski kompleks čija funkcija nije još poznata (3). Poznato je da BEN1 sudjeluje u metabolizmu brasinosteroida. S obzirom da je pokazano da klijanci transgeničnih linija TAP 5 i TAP 7 bolje kliju i rastu u uvjetima stresa (3), te da bi BEN1 mogao preko regulacije metabolizma brasinosteroida sudjelovati u staničnom odgovoru na stres, postoji mogućnost da SerRS utječe na regulaciju ekspresije gena za BEN1.

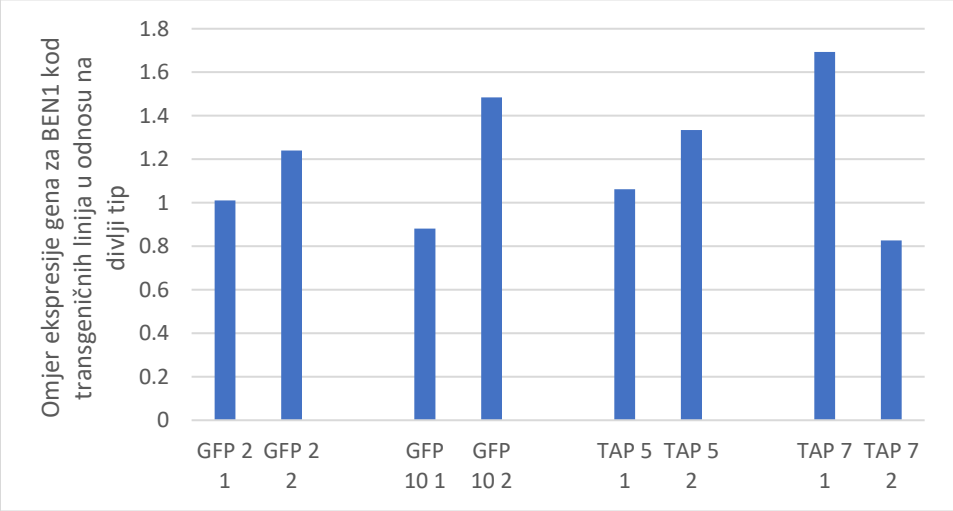
Analiza je napravljena na istim klijancima koji su korišteni za procjenu razine prekomjerne ekspresije SerRS u transgeničnim GFP i TAP linijama (poglavlje 4.1.1.3.). RT-qPCR-om pomoću BEN1MAR početnica određena je ekspresija gena za BEN1 kod transgeničnih biljaka i kod divljeg tipa biljke *A. thaliana*. Kako bi se ekspresija gena za BEN1 iz transgeničnih linija mogla uspoređivati sa ekspresijom gena za BEN1 iz divljeg tipa rezultati su najprije normalizirani u odnosu na endogenu kontrolu. Kao endogena kontrola korišten je gen za aktin 2 (AKT2).

Prema podacima iz tablice 15. i slike 18. omjer ekspresije gena za BEN1 kod transgeničnih linija i ekspresije gena za BEN1 u divljem tipu iznosi oko 1 kod svih transgeničnih linija. Omjer 1 znači da je ekspresija u transgeničnim linijama jednaka kao i u divljem tipu. Pošto RT-qPCR rezultati pokazuju da transgenične linije prekomjerno eksprimiraju gen za SerRS (poglavlje 4.1.1.3.), ovi rezultati dobiveni RT-qPCR-om zapravo upućuju da prekomjerna ekspresija gena za SerRS ne utječe na ekspresiju gena za BEN1.

Tablica 15. Omjer ekspresije gena za BEN1 kod transgeničnih linija u odnosu na divlji tip dobiven qPCR analizom cDNA

uzorak	srednja vrijednost Cт tehničkih duplikata (BEN1MAR)	srednja vrijednost Cт tehničkih duplikata (AKT2)	$2^{-\Delta\Delta C_T}$*
GFP 2 1	22,12	18,19	1,01
GFP 2 2	22,88	19,24	1,24
GFP 10 1	22,57	18,44	0,88
GFP 10 2	22,66	19,28	1,48
WT (GFP qPCR)	22,39	18,45	
TAP 5 1	22,54	18,85	1,06
TAP 5 2	21,68	18,32	1,33
TAP 7 1	21,63	18,61	1,69
TAP 7 2	22,38	18,33	0,82
WT (TAP qPCR)	22,27	18,49	

*$2^{-\Delta\Delta C_T}=2^{-\Delta C_T}$ (CтBEN1MAR-CтAKT2) transgen bilj /$2^{-\Delta C_T}$ (CтBEN1MAR-CтAKT2) WT

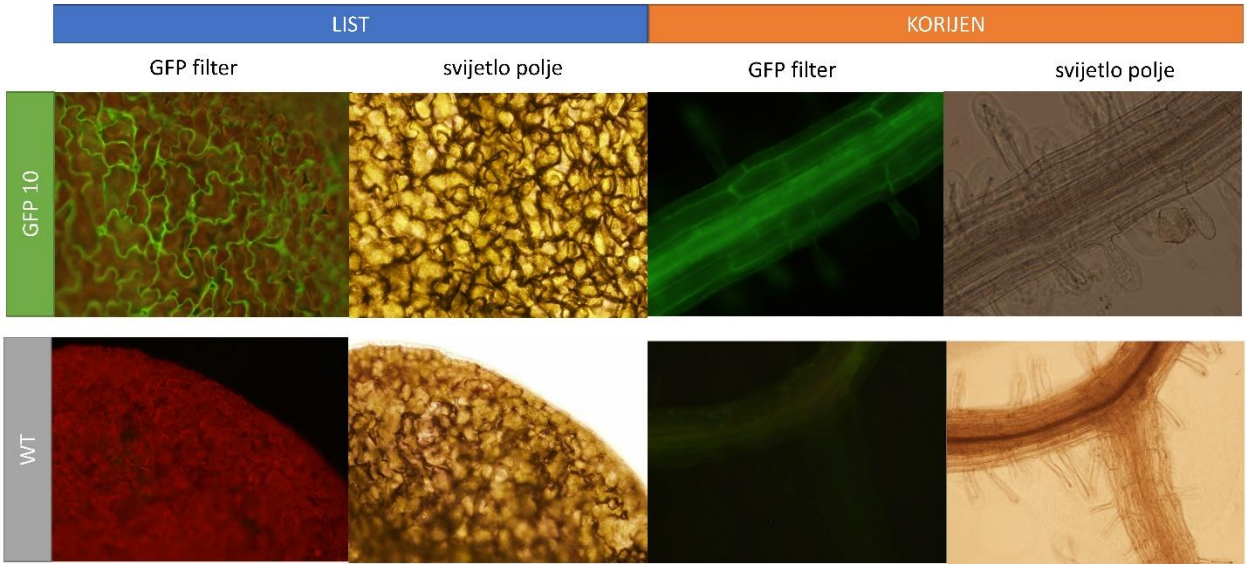


Slika 18. Prikaz omjera ekspresije gena za BEN1 kod transgeničnih linija u odnosu na divlji tip dobiven qPCR analizom cDNA

4.1.3. Provjera prisutnosti GFP-SerRS konstrukta pomoću fluorescentnog mikroskopa

RT-qPCR analize su pokazale da transgenične linije GFP 2 i GFP 10 eksprimiraju fuzijski konstrukt GFP-SerRS. Kako bi se provjerilo da li dolazi do biosinteze fuzijskog proteina GFP-SerRS, klijanci transgeničnih linija GFP 2 i GFP 10 stari 8 dana promatrani su pod fluorescencijskim mikroskopom. S obzirom da GFP transgenične linije sadrže GFP u fuzijskom proteinu, a GFP fluorescira zelenom bojom, ove linije moguće je analizirati fluorescencijskim mikroskopom. TAP transgenične linije ne sadrže GFP stoga kod ovih linija nije moguća provjera biosinteze fuzijskog proteina SerRS-TAP fluorescencijskim mikroskopom. Kao negativne kontrole promatrani su klijanci divljeg tipa biljke *A. thaliana*.

Na slici 19. primjećuje se zeleni fluorescencijski signal GFP-a u epidermalnim stanicama lista transgenične linije GFP 10. Epidermalne stanice mozaičkog su oblika, veći dio stanica ispunjen je vakuolom, dok se citosol nalazi uz staničnu membranu gdje se vidi zeleni fluorescentni signal GFP-a. U korijenu se također primjećuje snažan zeleni fluorescentni signal na rubovima stanica, iz čega se može zaključiti da je SerRS citosolni protein. Crvena boja dolazi zbog autofluorescencije klorofila u kloroplastima. Isto je i primijećeno kod klijanaca transgenične linije GFP 2.



Slika 19. Prikaz klijanaca divljeg tipa (WT) i transgenične linije GFP 10 promatrani pod fluorescencijskim mikroskopom

U listovima klijanaca divljeg tipa nije uočena zelena fluorescencija GFP-a što je i očekivano jer ni nisu transgenični. U korijenu klijanaca divljeg tipa pojavljuje se blijedo zeleni fluorescentni signal pod GFP filterom. Kako je intenzitet vrlo slab on se pojavljuje tek pri puno većoj ekspoziciji od 4 do 8 sekundi, dok se zeleni fluorescentni signal GFP-a pojavljuje već pri manjoj ekspoziciji (manje od 1 s). Slabi zeleni fluorescentni signal potječe od sekundarnih biljnih metabolita, a ne od GFP proteina.

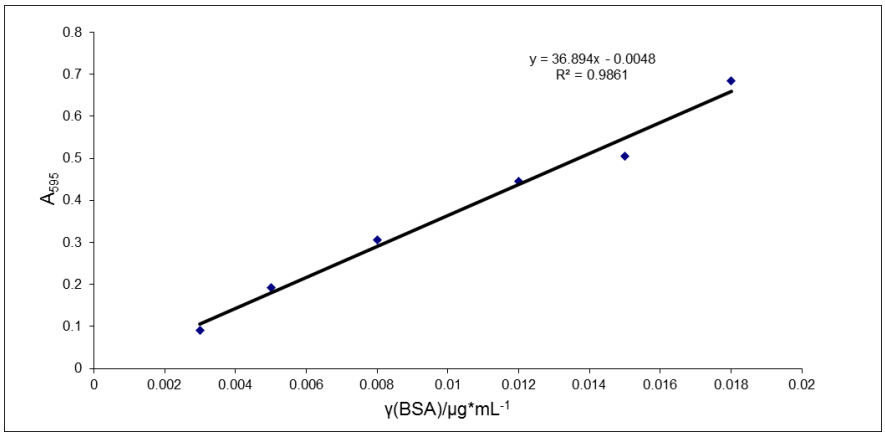
4.1.4. Analiza ekspresije i enzimske aktivnosti fuzijskih proteina

Da bi se provjerilo dolazi li do biosinteze svih fuzijskih SerRS konstrukata izolirani su ukupni proteini iz klijanaca svih transgeničnih linija i divljeg tipa starih 7 dana. Prisutnost fuzijskih proteina provjerena je *western*-hibridizacijim, te je još naknadno provjereno da li su fuzijski proteini enzimski aktivni. *Western*-hibridizacijom analizirani su i klijanci transgenične linije GFP 12. Ova linija nije korištena u drugim eksperimentima.

Prije detekcije *western*-hibridizacijom SDS-PAGE elektroforezom provjereno je da li su proteini uspješno izolirani. Za izolaciju proteina uzeti su klijanci divljeg tipa, te transgenične linije GFP 2, GFP 10-2 (druga generacija biljaka), GFP 10-3 (treća generacija biljaka), GFP 12, TAP 5 i TAP 7. Izolati ukupnih proteina iz klijanaca GFP 12 pripremljeni su pomoću tri metoda (poglavlje 3.5.) . U prvoj metodi 500 mg biljnog materijala je homogenizirano i ukupni proteini izolirani su korištenjem 500 µL PEB 100 pufera. Druga metoda je slična prvoj. U drugoj metodi 100 mg biljnog materijala je najprije smrznuto na -80 °C te je zatim slijedila izolacija korištenjem 200 µL PEB 100 pufera. Kod treće metode ukupni proteini izolirani su pomoću uređaja Silamat. Dobivenim izolatima ukupnih proteina izmjerena je masena koncentracija pomoću Bradford metode. Baždarna krivulja dobivena mjerenjem absorbancije otopinama BSA (slika 20.). Tablica 16 prikazuje određene masene koncentracije ukupnih proteina. Dobivene masene koncentracije za skoro sve uzorke nisu točne jer su izvan raspona masenih koncentracija BSA korištenih za izradu baždarne krivulje. Da bi se dobile točnije masene koncentracije mjerenje bi se moglo ponoviti tako da se uzorci proteinskih izolata razrijede 3 puta ili se može ponovno napraviti baždarna krivulja koristeći veće masene koncentracije otopina BSA. No u svrhu kvalitativne analize ovih uzoraka nije bilo potrebno odrediti točnu masenu koncentraciju ukupnih proteina. Absorbancija GFP 12 (100mg) je jedina u rasponu apsorbancija korištenih otopina BSA, te je jedino tako ona pouzdana.

Tablica 16. Iznosi absorbancije (A_{595}) uzoraka izolata ukupnih proteina te masene koncentracije dobivene metodom po Bradfordu

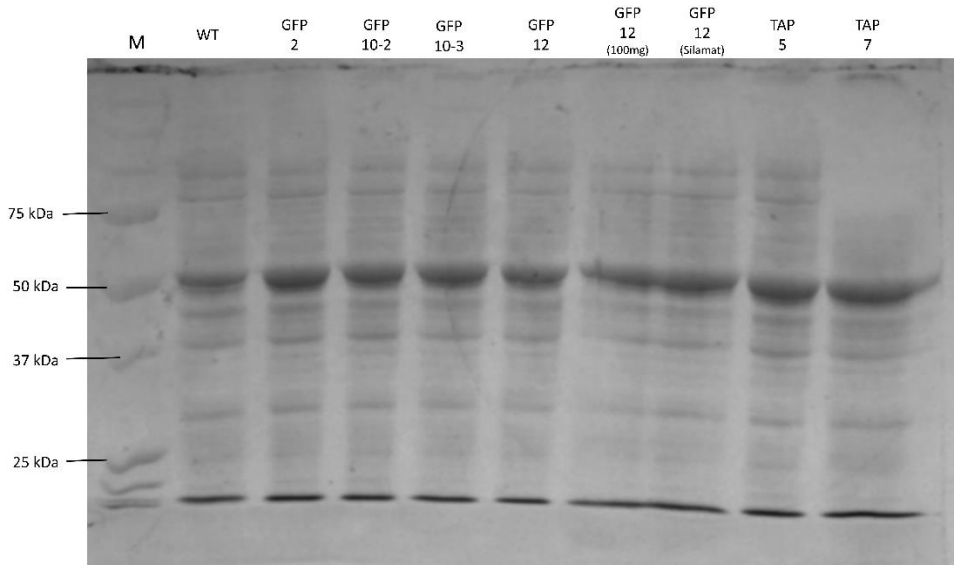
uzorak	A_{595}	γ/ µg µL^{-1}
WT	0,706	3,85
GFP 2	0,718	4,15
GFP 10-2	0,701	4,06
GFP 10-3	0,494	2,70
GFP 12	0,59	3,22
GFP 12 iz 100mg	0,186	1,03
GFP 12 SILAMAT	0,797	4,34
TAP 5	0,847	4,61
TAP 7	0,739	4,03



Slika 20. Baždarna krivulja dobivena mjerenjem apsorbancije A_{595} otopina BSA različitih masenih koncentracija

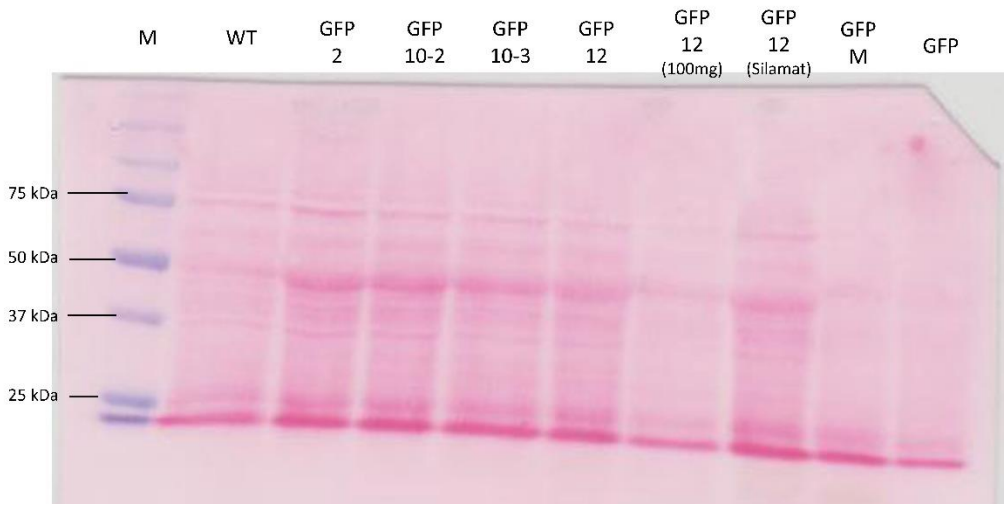
Uzorci proteinskih izolata (20µg) su razdvojeni pomoću SDS-PAGE gel elektroforeze na 9 % SDS-PAGE gelu, čime je potvrđeno da su uspješno izolirani proteini iz svih uzoraka (slika 21.)

.

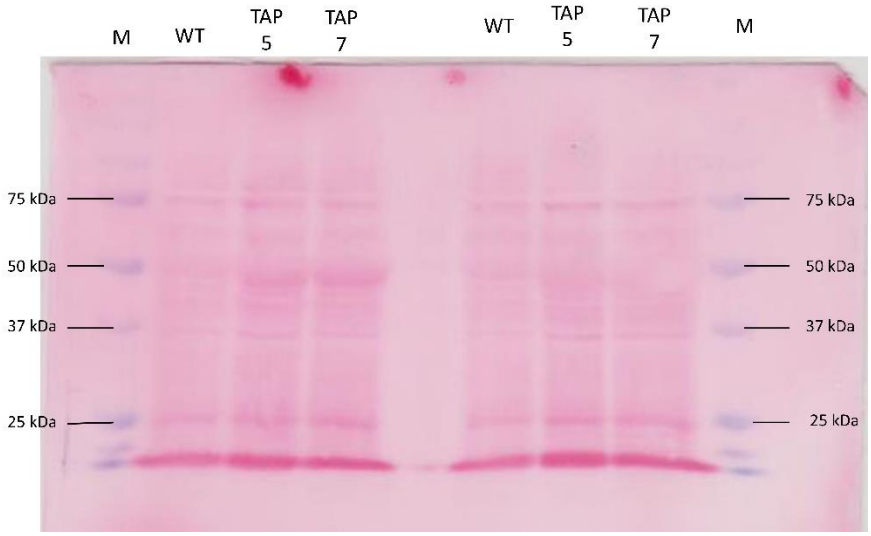


Slika 21. Slika 9 % SDS gela nakon SDS-PAGE gel elektroforeze. (M – DNA marker; Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, *Strep*-tagged recombinant, proizvođač Bio-Rad)

Nakon provjere izolacije proteina napravljena je *western blotting* tehnika da bi se provjerilo eksprimiraju li se fuzijski proteini. Nakon prijenosa proteina sa SDS gela na membrane, membrane su obojene bojom Ponceau S, te je tako potvrđeno da je došlo do prijenosa proteina sa SDS gela na membranu (Slika 22., slika 23.).



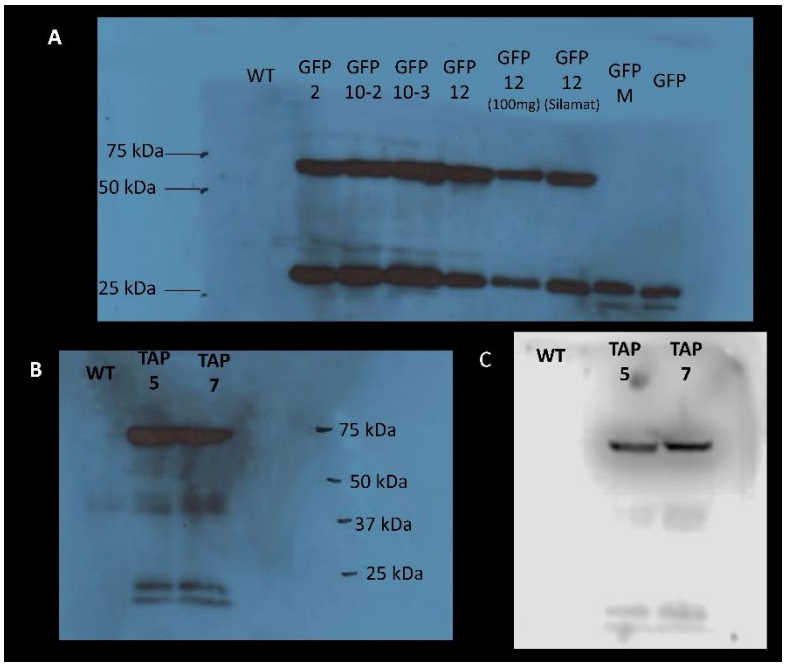
Slika 22. Prikaz membrane za *western* sa GFP uzorcima nakon bojanja s bojom Ponseau S (M - Prestained Protein Ladders, WT – divlji tip)



Slika 23. Prikaz membrane za *western* sa TAP uzorcima nakon bojanja s bojom Ponseau S (M - Prestained Protein Ladders, WT – divlji tip)

Nakon uspješnog prijenosa proteina na membranu, blokiranja slijedi označavanje proteina pomoću antitijelia. Na GFP-SerRS fuzijski protein najprije su vezana primarna antitijela na GFP, te su zatim na primarna antitijela vezana sekundarna antitijela koja sadrže vezanu peroksidazu iz hrena (anti miš-HRP antitijela). SerRS-TAP fuzijski protein označen je pomoću PAP antitijela koja se vežu na protein A iz TAP privjeska. PAP antitijela već sadrže vezan HRP na antiperoksidazno mjesto, pa za njihovu detekciju nisu potrebna sekundarna antitijela. Peroksidaza katalizira reakciju oksidacije luminola pri čemu se emitira zračenje valne duljine

425 nm koje se detektira pomoću fotoosjetljivog filma (40). Na slici 24. prikazan je filma nakon 1 minute ekspozicije. Jedna membrana s TAP uzorcima je kemiluminescencijski detektirana pomoću uređaja LiCor (Slika 24).



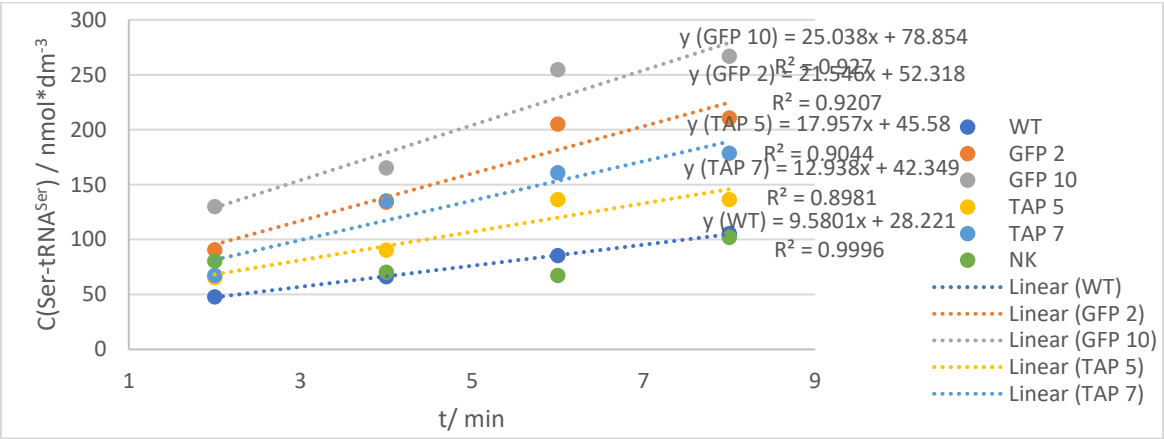
Slika 24. *Western*-hibridizacijska analiza proteinskih izolata transgeničnih linija; A – detekcija GFP proteina kod transgeničnih GFP linija sa antitijelima za GFP, B – detekcija proteina A iz TAP privjeska kod transgeničnih TAP linija sa PAP antitijelima C - detekcija proteina A iz TAP privjeska kod transgeničnih TAP linija sa PAP antitijelima pomoću uređaja LiCor

Molekulska masa SerRS proteina (At5g27470) iznosi 51,8 kDa, molekulska masa GFP proteina 27 kDa (41). Molekulska masa fuzijskog proteina GFP-SerRS iznosi 78 kDa što odgovara gornjoj pruzi koja se vidi kod uzoraka GFP 2, GFP 10-2, GFP 10-3, GFP 12. GFP 12 (100 mg) i GFP 12 (Silamat). U tim uzorcima uočena je i pruga kod manjih molekulskih masa kod 25 kDa koja odgovara pruzi uzoraka koje sadrže samo GFP (GFP i GFP M). Dakle, u transgeničnim GFP linijama pojavljuje se i GFP protein za koji je moguće da je nastao proteolitičkim cijepanjem GFP-a s fuzijskog proteina GFP-SerRS. Kako divlji tip ne sadrži gen za GFP ne primjećujemo nikakve vrpce koje bi ukazivale na GFP protein. Tako možemo zaključiti da dolazi do biosinteze fuzijskog proteina GFP-SerRS kod transgeničnih GFP linija.

Molekulska masa TAP privjeska iznosi 21 kDa (42), dok molekulska masa fuzijskog proteina SerRS-TAP iznosi 75 kDa. Kod TAP 5 i TAP 7 linija vidljiva je pruga oko 75 kDa koja odgovara upravo fuzijskom proteinu SerRS-TAP, kod ovih uzoraka također je uočena pruga kod manjih molekulskih masa (manje od 25 kDa) koja odgovara TAP privjesku. Moguće da je došlo do proteolitičkog cijepanja SerRS-TAP fuzijskog proteina zbog čega se pojavljuje dodatna pruga kod manjih molekulskih masa. Kako divlji tip ne sadrži gen za TAP privjesak ne uočava se nikakva vrpca. Iz toga možemo zaključiti kako transgenične TAP linije eksprimiraju fuzijski protein SerRS-TAP.

Kod detekcije pomoću LiCor uređaja također se mogu vidjeti jasne pruge koje ukazuju na SerRS-TAP konstrukt i nešto slabije pruge koja ukazuju na TAP privjesak. Može se uočiti da je detekcija na filmu (ekspozicija 1 minuta) osjetljivija od detekcije na LiCor uređaju (ekspozicija 12 minuta) jer su signali na filmu snažniji iako je ekspozicija kraća.

S obzirom da je western-hibridizacijom potvrđeno da dolazi do ekspresije fuzijskih proteina kod transgeničnih biljaka, reakcijom aminoaciliranja provjereno je da li su ti enzimi aktivni. Kod reakcije aminoaciliranja radioaktivno se prati nastajanje Ser-tRNA^{Ser} u vremenskom tijeku (slika 25).



Slika 25. Graf prikazuje nastajanje Ser-tRNA^{Ser} u vremenu za pojedini proteinski uzorak (GFP 2, GFP 10, TAP 5, TAP 7 i divlji tip (WT), kao i negativna kontrola (NK))

Linearnom regresijom dobivenih rezultata za pojedinu liniju dobije se jednadžba koja govori o koncentraciji nastajanja Ser-tRNA^{Ser} u vremenskom tijeku reakcije. Prema tome nagib pojedinog pravca je brzina nastajanja Ser-tRNA^{Ser} za pojedini uzorak (tablica 17.).

Tablica 17. Prikaz brzina aminoaciliranja tRNA^{Ser} transgeničnih linija, te divljeg tipa

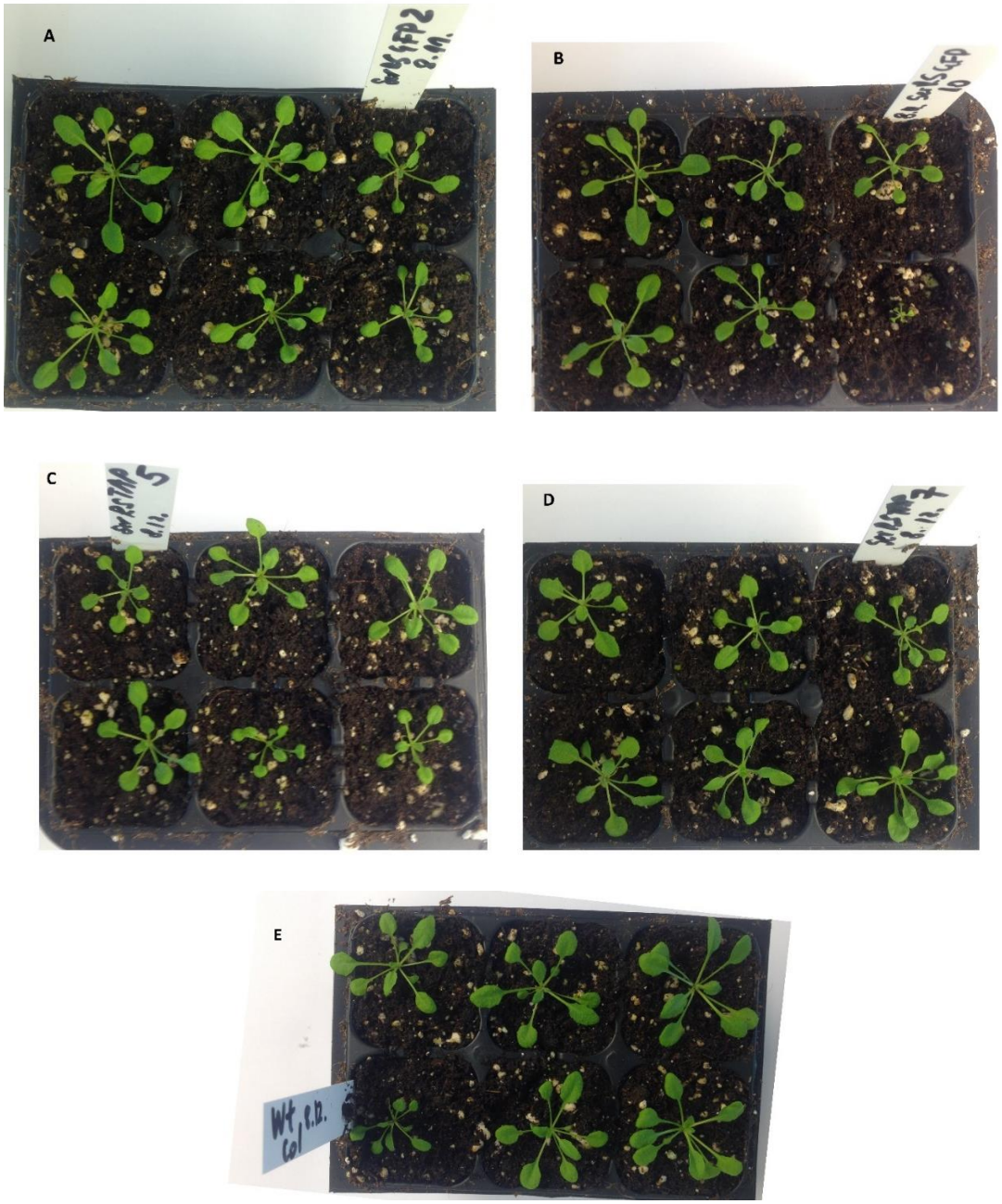
uzorak	v_{aa}(uzorak) / nmol dm^{-3}min^{-1}	v_{aa}(uzorak)/v_{aa}(WT)
GFP 10	25,03	2,61
GFP 2	21,54	2,24
TAP 5	17,95	1,87
TAP 7	12,93	1,35
WT	9,58	1

Najveća brzina aminoaciliranja tRNA^{Ser} je u liniji GFP 10, dok je najmanja u divljem tipu. Što znači da je u liniji GFP 10 najviše aktivnog proteina SerRS, dok je u divljem tipu njegova količina najmanja. Kad se stave u omjer brzine aminoaciliranja kod transgeničnih linija u odnosu na divlji tip može se uočiti kako je taj omjer kod GFP 10 linije najveći, dok je najmanji kod TAP 7 linije. Ovim putem ustanovljeno je da su fuzijski proteini enzimski aktivni.

4.1.5. Fenotipska karakterizacija transgeničnih biljaka

Kako bi se provjerilo postoji li fenotipska razlika u rastu transgeničnih biljaka u odnosu na divlji tip biljke *A. thaliana*, sjemenke transgeničnih linija (GFP 2, GFP 10, TAP 5 i TAP 7) kao i sjemenke divljeg tipa najprije su stereilizirane i vernalizirane te su posađene na kruti MS medij. Biljke su uzgajane najprije 6 dana u klima komori u simulaciji dugog dana. Nakon 6 dana po 6 klijanaca svake transgenične linije kao i divljeg tipa presađeno je u zemlju, te je praćen njihov rast u uvjetima kratkog dana (Slika 26).

Uspoređujući rast biljaka mogu se uočiti male individualne razlike među biljkama iste linije, ali značajnih razlika između biljaka različitih linija nema. Prema tome može se zaključiti kako prekomjerna ekspresija SerRS bitno ne utječe na rast biljke *A. thaliana*.



Slika 26. Biljke *A. thaliana* 14. dan nakon presađivanja klijanaca u zemlju; A – GFP 2 linija, B – GFP 2 linija, C – TAP 5 linija, D – TAP 7 linija, E – divlji tip (WT)

Praćenje fenotipa rađeno je na malom broju uzoraka, te se stoga definitivno ne može zaključiti da ne postoji neka razlika. Iz tog razloga bi trebalo eksperiment ponoviti a većim brojem uzoraka, odnosno biljaka.

4.2. Ekspresija gena za SerRS u biljaka izloženih abiotičkom stresu

Prethodna istraživanja upućuju na mogućnost da SerRS sudjeluje u staničnom odgovoru na stres. Uočeno je da količina SerRS proteina povećana tijekom abiotičkog stresa, uzrokovanim povećanom koncentracijom kadmija (2).

Kako bi provjerio utjecaj abiotičkog stresa na ekspresiju gena za SerRS sjemenke divljeg tipa biljke *A. thaliana* najprije su sterilizirane i vernalizirane, te su posađene u tekući MS medij. Nakon sedam dana rasta u tekućem mediju bez stresora (Slika 27.), tekući MS medij je zamijenjen sa svježim tekućim medijem u kojem je dodan $CdCl_2$ kao stresor. Dva biološka replikata izložena su manjoj koncentraciji kadmijevih iona (200 µmol/dm^3), a druga dva biološka replikata su izložena većoj koncentraciji kadmijevih iona (1000 µmol/dm^3). U dva biološka replikata stari tekući MS medij zamijenjen je svježim u kojem nije bio dodan kadmij, te su ove biljke služile kao referentni (kontrolni) uzorci koji nisu bili izloženi stresu. Uz varijacije u koncentracijama kadmija, pratio se i vremenski utjecaj stresa na ekspresiju gena za SerRS. Stoga je uz prethodno navedenih 6 uzorka koji su bili izloženi 8 satnom stresu, napravljen eksperiment sa još 6 uzoraka (2 biološka replikata izložena su kadmiju koncentracije 200 µmol/dm^3, 2 biološka replikata izložena su kadmiju koncentracije 1000 µmol/dm^3 i 2 biološka replikata su služila kao referentni uzorci) koji su izloženi 24 satnom stresu.

Slika 27. Klijanci divljeg tipa biljke *A. thaliana* uzgajan u tekućem MS mediju 7 dana (prije dodatka kadmija). Klijanci su se tijekom rasta međusobno isprepleli te rastu u obliku busena.

Nakon izlaganja stresu, svim je uzorcima izolirana ukupna RNA (poglavlje 3.2.4.) , koja je zatim podvrgnuta DNaznom tretmanu (poglavlje 3.3.). S obzirom da se u DNazni tretman išlo s 20 µg ukupne RNA ukupnog reakcijskog volumena 50 µL, dobivena masena koncentracija ukupne RNA trebala bi iznositi 400 ng/µL. Prema podacima iz tablice 18. dobivene masene koncentracije RNA poslije DNaznog tretmana variraju od uzorka do uzorka. Uzrok tome bi mogle biti nečistoće koje su zaostale tijekom izolacije što se vidi iz omjera absorbancija A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} koji kod većine uzoraka nisu oko 2. Razlike u nečistoći mogu potjecati zbog toga što tijekom izolacije ukupne RNA nije korišten jednak omjer TRIzola i biljnog materijala, pa je udio TRIzola u uzorcima bio različit što je moglo utjecati na učinkovitost pročišćavanja.

Tablica 18. Masene koncentracije RNA prije i polije DNaznog tretmana bioloških replikata uzoraka izloženih stresu, te kontrolnih uzoraka

	Masena koncentracija RNA prije DNaznog tretmana				**Masena koncentracija RNA nakon DNaznog tretmana**		
uzorak	γ/ng µL^{-1}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}		γ/ng µL^{-1}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
8 K1	1150,00	2,06	1,71		430,88	1,83	1,79
8 K2	212,25	1,91	1,25		144,58	2	1,69
8 200-1	821,12	2,09	1,72		892,83	2,1	2,12
8 200-2	1424,93	2,1	2,06		29,32	1,58	0,81
8 1000-1	1462,82	1,99	1,33		68,02	1,67	1,24
8 1000-2	998.,8	2,13	2,04		78,22	1,98	1,41
24 K1	4859,28	1,66	1,84		248,96	2,01	1,94
24 K2	2352,23	2,1	2,22		467,46	1,9	2,05
24 200-1	4546,83	1,78	1,65		212,08	1,96	1,7
24 200-2	4129,66	1,24	1,47		313,19	1,86	1,91
24 1000-1	2096,99	2,09	1,95		175,9	1,87	1,59
24 1000-2	4029,96	1,41	1,64		213,35	1,84	1,79

Nakon DNaznog tretmana 1 µg ukupne RNA podvrgnut je reverznoj transkripciji. Svi uzorci ukupne RNA prije i nakon DNaznog tretmana, te cDNA provjereni su elektroforezom (nije prikazano) prije analize qPCR-om. Prije analize qPCR-om cDNA je razrijeđena pet puta.

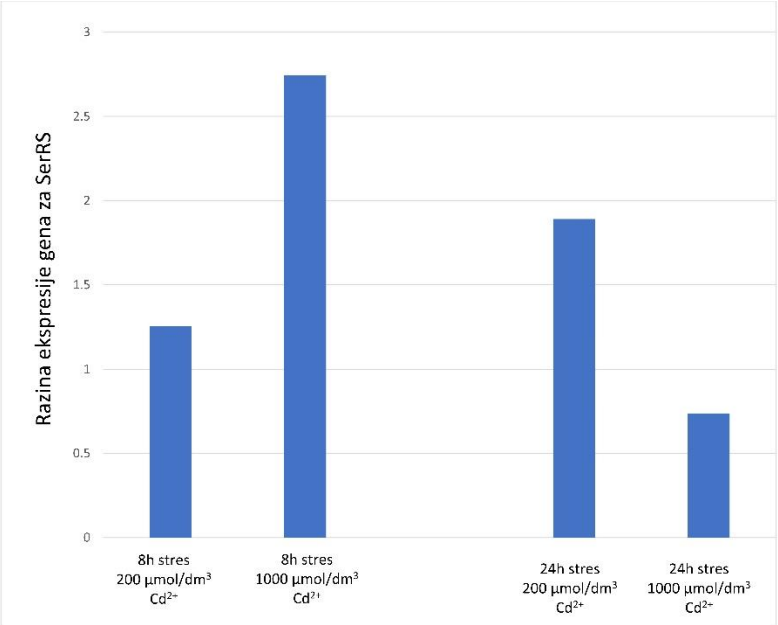
Ekspresija gena za endogeni SerRS analizirana je qPCR-om korištenjem SerRS3'UTR početnica. Kako bi se rezultati mogli međusobno uspoređivati, iste cDNA analizirane su qPCR-om korištenjem početnica za aktin (AKT2) kao endogena kontrola. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 19.

Tablica 19. Prikaz rezultata dobivenih qPCR-om analizom cDNA biljaka izloženih stresu i kontrolnih uzoraka

uzorak	srednja vrijednost tehničkih duplikata Cт (SerRS3'UTR)	srednja vrijednost tehničkih duplikata Cт (AKT2)	2^-ΔCт	2^-ΔΔCт	srednja vrijednost bioloških replikata 2^-ΔΔCт
8h stres					
K1	19,87	18,77	0,46		
K2	21,49	20,12	0,38		
200-1	19,88	19,06	0,56	1,20	1,25 ± 0,04
200-2	24,54	23,56	0,50	1,29	
1000-1	23,91	24,25	1,27	2,71	2,74 ± 0,03
1000-2	25,02	25,13	1,07	2,77	
24h stres					
K1	22,43	21,08	0,39		
K2	20,69	19,13	0,33		
200-1	22,53	22,33	0,87	2,22	1,89 ± 0,33
200-2	22,59	21,67	0,52	1,55	
1000-1	25,29	23,75	0,34	0,87	0,73 ± 0,13
1000-2	26,55	24,25	0,20	0,60	

$*2^{-\Delta C_T\ (C_T SerRS-C_T AKT2)}$, $** 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-\Delta C_T\ (C_T SerRS-C_T AKT2)stres} / 2^{-\Delta C_T\ (C_T SerRS-C_T AKT2)kontrola}$

Prema omjeru ekspresije gena za SerRS kod biljaka izloženih abiotičkom stresu u odnosu na ekspresiju gena za SerRS kod referentnih uzoraka (biljke koje nisu izložene stresu) može se uočiti da dolazi do porasta ekspresije gena za SerRS u uvjetima: 8 h stres i 200 µmol/dm^3 Cd^{2+}, 8 h stres i 1000 µmol/dm^3 Cd^{2+}, te 24 h stres i 200 µmol/dm^3 Cd^{2+}. Jedino u uvjetu 24 h stresa i 1000 µmol/dm^3 Cd^{2+} dolazi do smanjenja ekspresije. Najveća ekspresija primijećena je u uvjetima 8 h stres i 1000 µmol/dm^3 Cd^{2+} (Slika 28.).



Slika 28. Razina ekspresije gena za SerRS pri različitim uvjetima abiotičkog stresa u odnosu na referentne uzorke

Podaci upućuju da dolazi do povećanja ekspresije gena za SerRS tijekom abiotičkog stresa izazvanog povećanom koncentracijom kadmija, te da SerRS može sudjelovati u staničnom odgovoru na stres. Pri uvjetu 24 h stres i 1000 µmol/dm^3 Cd^{2+} dolazi do smanjenja ekspresije što može upućivati da su pri tim uvjetima koncentracija kadmija i izloženost stresu toksični za stanicu, te da dolazi do inhibicije raznih staničnih procesa. Da bi se dobio bolji uvid u ekspresiju gena za SerRS trebao bi se ponoviti eksperiment tako da se prate biološki triplikati u više vremenskih točaka, te dodatni eksperiment u kojem se više varira koncentracija kadmijevih iona.

Eksperiment je postavljen tako da biljke imaju dovoljno hrane (saharoze), te dovoljno minerala i vitamina (korišten 1x MS medij), pa klijanci nisu bili zapravo pod velikim stresom. Stoga bi bilo dobro ponoviti eksperiment tako da utjecaj stresa bude više izražen, npr. eksperiment bi se mogao ponoviti tako da se u MS medij doda manja količina saharoze.

5. Zaključak

- Metodama RT-qPCR-a, *western*-hibridizacijom, analizom enzimske aktivnosti i fluorescencijskom mikroskopijom potvrđena je prekomjerna ekspresija SerRS na razini mRNA i proteina u transgeničnim linijama koje sadrže fuzijske SerRS konstrukte.

- Linije koje sadrže GFP-SerRS konstrukt više eksprimiraju SerRS u odnosu na transgenične linije koje sadrže SerRS-TAP.

- RT-qPCR metodom utvrđeno je da prekomjerna ekspresija gena za SerRS ne utječe na ekspresiju gena za protein BEN1.

- Fenotipskom analizom nije uočena neka razlika između transgeničnih biljaka u odnosu na biljke divljeg tipa.

- U većini ispitanih uvjeta abiotičkog stresa, izazvanog povećanom koncentracijom kadmija, uočena je povećana ekspresija gena za SerRS u odnosu na kontrolne uzorke koji nisu bili izloženi stresu.

6. Literaturna vrela

1. M. Guo, X. Yang i P. Schimmel, New functions of tRNA synthetases beyond translation, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2010**, *11*, 668–674

2. J. Sarry, L. Kuhn, C. Ducruix, A. Lafaye, C. Junot, V. Hugouvieux, A. Jourdain, O. Bastien, J. B. Fievet, D. Vailhen, B. Amekraz, C. Moulin, E. Ezan, J. Garin i J. Bourguignon, The early responses of Arabidopsis thaliana cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses, *Proteomics* **2000**, *6*, 2180–2198

3. M. Kekez, Funkcionalna karakterizacija citosolne seril-tRNA-sintetaze iz biljke Arabidopsis thaliana, **2016.** (doktorski rad)

4. Z. Luthey-Schulteni P. O'Donoghue, On the Evolution of Structure in Aminoacyl-tRNA Synthetases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **2003**, *67*, 550-573

5. I. Gruić-Sovulj, J. J. Perona i I. Top, Synthetic and editing mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases, *Curr. Chem.* **2014**, *344*, 1-41

6. M. Ibba, S. Morgan, A. W. Curnow, D. R. Pridmore, U. C. Vothknecht, W. Gardner, W. Lin, C. R. Woese i D. Söll, A euryarchaeal lysyl-tRNA synthetase: resemblance to class I synthetases, *Science* **1997**, *278*, 1119-1122

7. D. Söll i M. Ibba, Aminoacyl-tRNA synthesis, *Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 617-650

8. M. Dulić, N. Cvetešić, J. J. Perona i I. Gruić-Sovulj, Partitioning of tRNA-dependent editing between pre- and post-transfer pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23799-23809

9. P. Schimmel i M. Guo, Essential nontranslational functions of tRNA synthetases, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 145-153

10. P. Yao i P. L. Fox, Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease, *EMBO Mol Med* **2013**, *5*, 332–343

11. S. Bilokapić, N. Ban i I. Weygand-Đurašević, Seryl-tRNA Synthetases: Enzymes with Multiple Personalities, *Croat. Chem. Acta* **2009**, *82*, 493–501

12. M. Kekez, N. Bauer, E. Saric i J. Rokov-Plavec, Exclusive Cytosolic Localization and Broad tRNASer Specificity of Arabidopsis thaliana Seryl-tRNA Synthetase, *J. Plant Biol.* **2016**, *59*, 44-54

13.V. Zanki, Analiza proteinskih interakcija citosolne seril-tRNA-sintetaze iz biljke Arabidopsis thaliana, **2016.** (diplomski rad)

14. M. Koornneef i B. Scheres, Arabidopsis thaliana as an Experimental Organism, *Encylopedia of life sciences* **2001**, 1-6

15. M. Koornneef i D. Meinke, The development of Arabidopsis as a model plant, *The Plant Journal* **2010**, *61*, 909–921

16. G. R Cramer, K. Urano, S. Delrot, M. Pezzotti i K. Shinozaki, Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective, *BMC Plant Biology* **2011**, *11*, 1-14

17. A. Bajguz i S. Hayat, Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses, *Plant Physiology and Biochemistry* **2009**, *47*, 1–8

18. T. Obata i A. R. Fernie, The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stress, *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 3225–3243

19. E. Luna, M. van Hulten, Y. Zhang, O. Berkowitz, A. López, P. Pétriacq, M. A. Sellwood, B. Chen, M. Burrell, A. van de Meene, C. M. J. Pieterse, V. Flors i J. Ton, Plant perception of β-aminobutyric acid is mediated by an aspartyl-tRNA synthetase, *Nature chemical biology* **2014**, *10*, 450-456

20. R. E. Schwarzenbacher, E. Luna i J. Ton, The discovery of the BABA receptor: scientific implications and application potential, *Frontiers in plant science* **2014**, *5*, 1-3

21. D. Zuo, S. Yi, R. Liu, B. Qu, T. Huang, W. He, C. Li, H. Li, i Y. Liao, A Deoxynivalenol-Activated Methionyl-tRNA Synthetase Gene from Wheat Encodes a Nuclear Localized Protein and Protects Plants Against Fusarium Pathogens and Mycotoxins, *The American Phytopathological Society* **2016**, *106*, 1-10

22. S.B. Twyman i R.M. Primrose; Principles of Gene Manipulation, 7. izdanje., Blackwell Publishing, **2006**, str. 26-28

23. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/(27.01.2017.)

24. https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php. (27.01.2017.)

25. M. L. Wong i J. F. Medrano, Real-time PCR for mRNA quantitation, *BioTechniques* **2005**, *39*, 75-85

26. T. Nolan, R. E. Hands i S. A. Bustin, Quantification of mRNA using real-time RT-PCR, *Nature protocols* **2006**, *1*, 1559-1582

27. Real-Time PCR Systems Chemistry Guide. Applied Biosystems. **2006** (uputstva za rad)

28. http://www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx. (18.01.2017.)

29. Y. Karlen, A. McNair, S. Perseguers, C. Mazza i N. Mermod, Statistical significance of quantitative PCR, *BMC Bioinformatics* **2007**, *8,* 1-16

30. https://www.researchgate.net/figure/51521501_fig1_FIGURE-1-An-example-of-a-RT-qPCR-amplification-plot-showing-the-four-phases-of-a-PCR. (28.01.2017.)

31. H. Wang, J. Wang, J. Jiang, S. Chen, Z. Guan, Y. Liao i F. Chen, Reference genes for normalizing transcription in diploid and tetraploid Arabidopsis, *Scientific reports* **2014**, *4*, 1-8

32. N. Regier i B. Frey, Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar, *BMC Molecular Biology* **2010**, *11*, 1-8

33. K. J. Livak i T. D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^ΔΔCT Method, *Methods* **2001**, *25*, 402–408

34. M. Chalfi,; Green fluorescent protein, *Photochemistry and photobiology* **1995**, *2*, 651–656

35. D.C. Rio, M. Jr. Ares,G. J. Hannon i T.W. Nilsen, Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent), *Cold Spring Harb Protoc* **2010**, *6*, 1-4

36.http://www.hartfaalcentrum.nl/index.php?main=files&sub=LinRegPCR. (28.01.2017.)

37. S. B. Gelvin, Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool, *Microbilogy and Molecular Biology Reviews* **2003**, *67*, 16–37

38. O. Puig, F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, M. Wilm i B. Séraphin, The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification, *Methods* **2001**, *24*, 218-229

39. Thermo Fisher Scientific T009-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop 1000 & 8000. (uputstva za rad s uređajem)

40. https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescent-western-blotting.html. (30.01.2017.)

41. M. A. Hink, R. A. Griep, J. W. Borst, A. van Hoek, M. H. M. Eppink, A. Schots i A. J. W. G. Visser, Structural Dynamics of Green Fluorescent Protein Alone and Fused with a Single Chain Fv Protein, *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 17556-17560

42. C. J. Gloeckner, K. Boldt, A. Schumacher, R. Roepman i M. Ueffing, A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes, *Proteomics* **2007**, *23*, 4228-3443

7. Životopis

Osobni podaci:
Ime i prezime: Jurica Baranašić
Adresa stanovanja: T. Masarika 18, Čakovec, 40000 Čakovec
Datum rođenja: 18.11.1988.

ŠKOLOVANJE:
2007. završena Gimnazija Čakovec (smjer: jezična gimnazija)
2014. završen preddiplomski studij kemije na Sveučilištu J.J. Strossmayera u Osijeku
2014.- diplomski studij kemije (smjer: biokemija i analitička kemija) na Prirodoslovno- matematičkom fakultetu u Zagrebu

DODATNO OBRAZOVANJE: 1997.-2005. – pohađao Pučko Otvoreno Veleučilište u Čakovcu (Engleski jezik)

RADNO ISKUSTVO:
- radno iskustvo u trgovini (maloprodaja, povremeni samostalni rad u obiteljskom dućanu za kućne ljubimce)
- 08.2014. – 09.2014. – pomoćni poslovi u proizvodnji (tiskara Zrinski d.d. Čakovec)
- 07.2015. – 09.2015. – pomoćni poslovi u proizvodnji (tiskara Zrinski d.d. Čakovec)
- 09.2015. – - laborant za kemiju i biologiju u XV. gimnaziji (MIOC) u Zagrebu

ZNANJA I VJEŠTINE:
- vozačka dozvola B kategorije
- poznavanje rada na računalu (MS Office, internet)
- poznavanje engleskog (aktivno u govoru i pismu) i njemačkog jezika u govoru i pismu
- 3. godine pohađao Školu animiranog filma u Čakovcu