# Utjecaj hladnog stresa i bakterijskih infekcija na ekspresiju satelitskih DNA u kukcima Tribolium castaneum i Drosophila melanogaster

**Pulitika, Anamarija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*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:217:470397

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-23**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Anamarija Pulitika

# Utjecaj hladnog stresa i bakterijskih infekcija na ekspresiju satelitskih DNA u kukcima *Tribolium castaneum* i *Drosophila melanogaster*

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za evolucijsku genetiku Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Đurđice Ugarković i neposrednim voditeljstvom Antonia Sermeka, mag. chem. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec.

# Zahvale

*Iskreno zahvaljujem dragoj mentorici prof. dr. sc. Đurđici Ugarković na pruženoj prilici i iskazanom povjerenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem neposrednom voditelju Antoniu Sermeku na prenesenom znanju, velikoj pomoći i strpljenju prilikom izrade ovog rada, kao i ostalim zaposlenicima Laboratorija za evolucijsku genetiku na ugodnoj atmosferi i prijateljskom odnosu.*

*Zahvaljujem doc. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec na podršci i uloženom vremenu i trudu.*

*Hvala svim mojim prijateljima na mnoštvu lijepih trenutaka tijekom svih ovih godina.*

*Najviše želim zahvaliti mojim roditeljima koji su mi sve ovo omogućili i braći koji su moj uzor i podrška tijekom cijeloga života.*

# Sadržaj

SAŽETAK ..... IX
ABSTRACT ..... XI
1. UVOD ..... 1
1.1. Cilj rada ..... 2
2. LITERATURNI PREGLED ..... 3
2.1. Mušica *Drosophila melanogaster* i brašnar *Tribolium castaneum* kao modelni organizmi ... 3
2.2. Satelitska DNA (satDNA) ..... 4
*2.2.1. Satelitska DNA u brašnaru Tribolium castaneum* ..... 6
*2.2.2. Satelitska DNA u vinskoj mušici Drosophila melanogaster* ..... 7
2.3. Transkripcija satelitske DNA ..... 7
2.4. Male interferirajuće molekule RNA (siRNA) ..... 8
2.5. Biotički i abiotički stres ..... 10
3. EKSPERIMENTALNI DIO ..... 12
3.1. Materijali ..... 12
*3.1.1. Reagensi* ..... 12
*3.1.2. Instrumenti* ..... 12
*3.1.3. Komercijalni kompleti* ..... 13
*3.1.4. Crveni brašnari Tribolium castaneum* ..... 13
*3.1.5. Početnice* ..... 13
*3.1.6. Početnice i probe za reverznu transkripciju i umnažanje malih interferirajućih molekula RNA* 13
*3.1.7. Sekvencirane cDNA knjižnice* ..... 14
3.2. Metode ..... 16
*3.2.1. Uzgoj brašnara T. castaneum i hladni stres* ..... 16
*3.2.2. Izolacija DNA* ..... 16
*3.2.3. Izolacija RNA* ..... 17
*3.2.4. Izolacija malih RNA* ..... 17
*3.2.5. Elektroforeza u agaroznom gelu* ..... 18
*3.2.6. Reverzna transkripcija* ..... 18
*3.2.7. PCR (lančana reakcija polimerazom)* ..... 19
*3.2.8. qPCR (kvantitativna lančan reakcija polimerazom)* ..... 19
*3.2.9. RT-qPCR malih molekula RNA* ..... 22
*3.2.10. Analiza sekvenciranih cDNA knjižnica (RNA-seq)* ..... 24

**4. REZULTATI ..... 29**

**4.1. Satelitska DNA u brašnaru *Tribolium castaneum* ..... 29**

**4.2. Utjecaj hladnog stresa na ekspresiju satelitske DNA ..... 29**

*4.2.1. Ekspresija satelitske DNA u brašnaru Tribolium castaneum nakon hladnog stresa ..... 29*

*4.2.2. Ekspresija molekula siRNA u brašnaru Tribolium castaneum nakon hladnog stresa ..... 33*

*4.2.3. Ekspresije satDNA 1.688 u vinskoj mušici D. melanogaster ..... 33*

**4.3. Utjecaj baterijske infekcije na ekspresiju satelitske DNA ..... 34**

*4.3.1. Ekspresija satelitskih DNA u brašnaru Tribolium castaneum nakon infekcije ..... 34*

*4.3.2. Ekspresija satDNA 1.688 u vinskoj mušici Drosophila melanogaster nakon infekcije ..... 37*

**5. RASPRAVA ..... 40**

**6. ZAKLJUČAK ..... 44**

**7. LITERATURNI IZVORI ..... 45**

**8. ŽIVOTOPIS ..... LI**

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

# SAŽETAK

Utjecaj hladnog stresa i bakterijskih infekcija na ekspresiju satelitskih DNA u kukcima *Tribolium castaneum* i *Drosophila melanogaster*

Anamarija Pulitika

Satelitsku DNA čine uzastopno ponavljajući sljedovi DNA koji se uglavnom nalaze u centromernom, pericentromernom i telomernom dijelu heterokromatina i zauzimaju značajan dio genoma u eukariotskom organizmu. U brašnaru *Tribolium castaneum*, okarakterizirane su glavna (TCAST1) i sporedna satelitska DNA (TCAST2) čiji su elementi pronađeni raspršeni unutar eukromatina u blizini jedinstvenih gena. U vinskoj mušici *Drosophila melanogster*, okarakterizirana je glavna satelitska DNA (1.688) čiji su elementi također raspršeni unutar eukromatina. Transkripti satelitskih DNA procesiraju se u male interferirajuće molekule RNA (siRNA) koje mogu imati utjecaj na epigenetsko stanje heterokromatina. Dokazano je da je ekspresija satelitskih elemenata TCAST osjetljiva na temperaturu, što upućuje na to da je moguća njihova uloga u regulaciji ekspresije gena pod utjecajem stresa. Hladni stres, za razliku od toplinskog, nije pokazao utjecaj na ekspresiju satelitskih DNA. Bakterijske infekcije mogu dovesti do smanjenja ekspresije satelitskih DNA, ovisno o načinu infekcije, prethodnoj imunizaciji i vrsti bakterije.

(49 stranica, 18 slika, 13 tablica, 63 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: bakterijska infekcija, hladni stres, satelitska DNA

Mentor: prof. dr. sc. Đurđica Ugarković
Neposredni voditelj: Antonio Sermek, mag. chem.
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Ocjenitelji:
1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
2. izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
3. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zamjena: doc. dr. sc. Morana Dulić

Datum diplomskog ispita: 30. rujna 2019.

University of Zagreb
Faculty of Science
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

# ABSTRACT

Influence of cold stress and bacterial infection on satellite DNA expression in insects *Tribolium castaneum* and *Drosophila melanogaster*

Anamarija Pulitika

Satellite DNA are tandemly repeated DNA sequences that constitute a considerable part of eukaryotic genome and are mostly present in centromeric, pericentromeric and subtelomeric regions of heterochromatin. In the beetle *Tribolium castaneum*, major (TCAST1) and minor (TCAST2) satellite DNA whose elements are found dispersed in the vicinity of unique genes within euchromatin are characterized. In the fruit fly *Drosophila melanogaster*, elements of major satellite DNA (1.688) are also found dispersed within euchromatin. Transcripts of satellite DNA are processed into small interfering RNA (siRNA) that might affect the epigenetic state of heterochromatin. Expression of elements of satellite DNA seems to be highly sensitive to temperature and might play a role in the regulation of gene expression under stress condition. Unlike heat shock, cold stress did not show effect on satellite expression. Bacterial infection may lead to decreased expression of satellite DNA, but it depends on many factors, such as infection routes, priming or bacterial species.

(49 pages, 18 figures, 13 tables, 63 references, original in Croatian)

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

Keywords: bacterial infection, cold stress, satellite DNA

Mentor: Dr. Đurđica Ugarković, Adjunct Professor
Assistant mentor: Antonio Sermek., mag. chem.
Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
2. Dr. Branimir Bertoša, Associate Professor
3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor

Substitute: Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Date of exam: 30th September 2019.

# 1. UVOD

Veliki dio eukariotskog genoma zauzima nekodirajuća DNA koja može biti raspršena po genomu ili organizirana u obliku uzastopno ponavljajućih sljedova DNA. Satelitsku DNA čine dugi nizovi uzastopno ponovljenih kratkih nukleotidnih sljedova koji se uglavnom nalaze u centromernim, pericentromernim i telomernim dijelovima heterokromatina.[1] Iako je dugo vremena smatrana beskorisnom jer se nalazi unutar inertnog heterokromatina, pronalazak promotorskih elemenata i mjesta vezanja transkripcijskih faktora unutar satelitskih sljedova, kao i pronalazak transkripata satelitskih DNA, ukazali su na njenu moguću regulacijsku ulogu.[2]

U brašnaru *Tribolium castaneum*, okarakterizirana je glavna satelitska DNA, TCAST1, koja čini 35 % genoma i sporedna satelitska DNA, TCAST2, koja čini 1 % genoma. Elementi obje satelitske DNA pronađeni su raspršeni unutar eukromatina, u blizini jedinstvenih gena gdje mogu utjecati na njihovu ekspresiju.[3] Ekspresija satelitskih DNA razvojno je regulirana i ovisna o uvjetima u okolišu. Iz transkripata satelitskih DNA nastaju male interferirajuće molekule RNA (siRNA). U brašnaru *T. castaneum*, toplinski stres rezultira prolaznim povećanjem ekspresije satelitskih DNA TCAST i povećanjem količine molekula siRNA, duljine 21 – 30 nukleotida, koje potječu od transkripata satelitskih DNA. Prolazno povećanje molekula siRNA prati i povećanje represivnih epigenetskih markera na satelitskim sljedovima. Pretpostavlja se da molekule siRNA mogu imati utjecaj na epigenetsko stanje heterokromatina i da se mogu ponašati kao posrednici reorganizacije heterokromatina kada je organizam izložen temperaturnom stresu.[4] Nakon duljeg toplinskog stresa, elementi TCAST1, koji se nalaze raspršeni u blizini kodirajućih gena, sudjeluju u regulaciji ekspresije tih gena tijekom oporavka od stresa. Pretpostavlja se da na taj način sudjeluju u oporavku organizma od štetnog utjecaja toplinskog stresa.[5]

U vinskoj mušici *Drosophila melanogaster*, okarakterizirana je kompleksna satelitska DNA, 1.688, koja čini 20 % genoma. Elementi satelitske DNA 1.688 također su pronađeni raspršeni unutar eukromatina u blizini jedinstvenih gena pa je pretpostavljena njihova uloga u regulaciji ekspresije tih gena u stresnim uvjetima.[6]

## 1.1. Cilj rada

U ovom radu ispitan je utjecaj hladnog stresa na ekspresiju satelitskih DNA. Eksperimentalno je analizirana promjena ekspresije satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2 u brašnaru *T. castaneum* nakon hladnog stresa. Hladni stres proveden je pri različitim temperaturama i u različitim vremenima trajanja. Osim promjene ekspresije tijekom hladnog stresa, praćena je i promjena ekspresije satelitske DNA tijekom oporavka od stresa. Također je provjerena promjena ekspresije molekula siRNA koje potječu od TCAST1 u uvjetima hladnog stresa. Bioinformatičkom analizom javno dostupnih podataka sekvenciranja RNA, provjeren je i utjecaj hladnog stresa na ekspresiju satelitske DNA 1.688 u mušici *D. melanogaster*.

Osim hladnog stresa, ispitan je i utjecaj bakterijskih infekcija na ekspresiju satelitskih DNA. Bioinformatičkom analizom javno dostupnih podataka sekvenciranja RNA, provjerena je promjena ekspresije satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2 u brašnaru *T. castaneum* nakon oralne i sistemske infekcije bakterijom *Bacillus thuringiensis* i promjena ekspresije satelitske DNA 1.688 u mušici *D. melanogaster* nakon oralne infekcije različitim sojevima bakterija.

# 2. LITERATURNI PREGLED

## 2.1. Mušica *Drosophila melanogaster* i brašnar *Tribolium castaneum* kao modelni organizmi

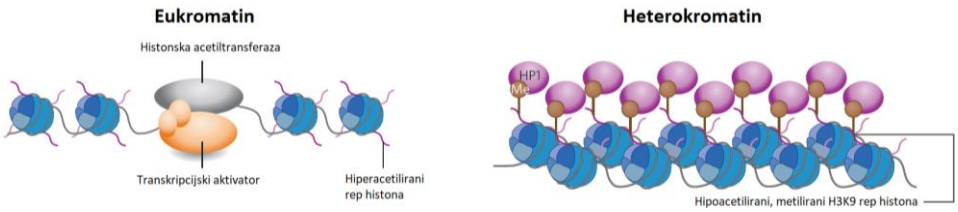
Modelni organizmi koriste se u raznim biomedicinskim istraživanjima i istraživanjima okoliša. Osnovne karakteristike svakog modelnog organizma su jednostavan i jeftin uzgoj u laboratoriju, kratki životni vijek, veliki broj potomaka i mogućnost genske manipulacije. Prvi i najviše istraživan eukariotski modelni organizam je vinska mušica *Drosophila melanogaster*.[7] Mušica *D. melanogaster* počela se koristiti u genetičkim istraživanjima još početkom 20. stoljeća kako bi se istražili stanični i razvojni procesi uobičajeni za više eukariote, uključujući i ljude. Njezin životni ciklus podijeljen je u 4 faze, od jaja, ličinke, kukuljice do mušice. Odrasla ženka dnevno može položiti oko 100 oplođenih jajašaca. Samo je 10 dana potrebno da se od oplođenog jajašca pri temperaturi od 25 °C razvije odrasla jedinka vinske mušice koja može preživjeti do nekoliko tjedana.[8] Istraživanja mušice *D. melanogaster* uvelike su doprinijela razvoju moderne genetike i razumijevanju raznih bioloških fenomena poput mutacija, križanja i genskog nasljeđivanja. Današnje genske analize oslanjaju se na poznavanje genomskog slijeda, što olakšava identifikaciju i karakterizaciju pojedinih gena, predviđanje uloge i aminokiselinskog slijeda proteina kao i pronalazak ortologa u drugim vrstama. Zbog relativno malog genoma, mušica *D. melanogaster* izabrana je kao prvi model za istraživanje i unaprjeđenje metoda sekvenciranja eukariotskih genoma kako bi se one mogle primijeniti i na organizme s većim i složenijim genomom.[9] Eukariotski genom sadrži visoko ponavljajuće sljedove u heterokromatinu koje nije moguće uspješno klonirati i sekvencirati.[10] Genom mušice *D. melanogaster* veličine je oko 180 milijuna parova baza (pb). Dvije trećine genoma čini eukromatin, a ostatak heterokromatin. Preko 95 % eukromatina mušice *D. melanogaster*, koji sadrži većinu gena, uspješno je sekvencirano, dok je sekvencirano samo 2 % heterokromatina. Sekvenciranje je pokazalo da jasna granica između heterokromatina i eukromatina ne postoji i da heterokromatin, osim ponavljajućih sljedova poput satelita, telomera i transpozonskih elemenata, sadrži i gene za ribosomsku RNA.

Osim mušice *D. melanogaster*, vrlo čest modelni organizam viših eukariota je crveni brašnar *Tribolium castaneum*. Brašnar *T. castaneum* pripada najbrojnijem i najraznovrsnijem

redu eukariota, kornjašima (Coleoptera).[11] U laboratoriju se uzgaja u malim posudama s brašnom s 5% kvasca.[11] Kao i mušica *D. melanogaster* iz reda Diptera, brašnar *T. castaneum* prolazi 4 faze životnog ciklusa od jaja, ličinke, kukuljice do odrasle jedinke. Trajanje pojedine faze životnog ciklusa ovisno je o temperaturi. Pri temperaturi od 30 °C potrebna su 4 tjedna kako bi se iz jaja razvila odrasla jedinka brašnara *T. castaneum* koja može poživjeti do tri godine.[12] Istraživanja su pokazala da su neki od razvojnih procesa brašnara *T. castaneum* sličniji procesima viših eukariota, nego procesi mušice *D. melanogaster*.[12] Brašnar *T. castaneum* prvi je kornjaš sa sekvenciranim genomom.[13,14] Genomske analize pokazale su velike sličnosti gena za imunitet između brašnara i kralježnjaka, ali ne i vinske mušice.[15] Poznavanje genoma, lakoća uzgoja i genske manipulacije kao i kontrole ekspresije gena kroz RNA interferencije kroz sve životne faze, čine brašnara *T. castaneum* sve istraživanijim i vrjednijim modelnim organizmom viših eukariota.

## 2.2. Satelitska DNA (satDNA)

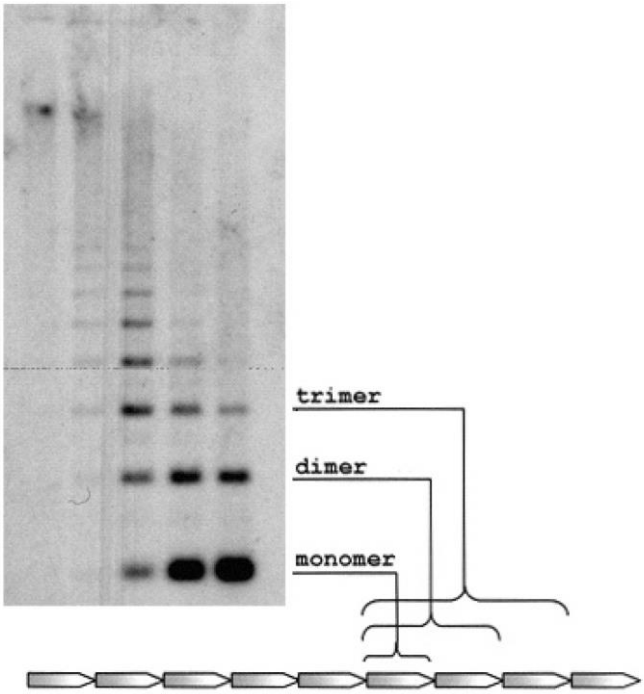
U eukariotskim organizmima definirana su dva kromatinska stanja na temelju različite kompaktnosti tijekom interfaze: eukromatin i heterokromatin (slika 1).[16] Eukromatin je manje kondenziran, pristupačniji, bogat genima i transkripcijski aktivan, dok je heterokromatin kondenziraniji, manje pristupačan i transkripcijski manje aktivan.[16,17] Heterokromatin može zauzimati značajan udio u eukariotskom genomu, a najviše je koncentriran u području centromera i subtelomera. Sadrži uzastopno ponavljajuće kratke nukleotidne sljedove (satelitske DNA), srednje ponavljajuće nukleotidne sljedove (na primjer, transpozonske elemente) i neke neponavljajuće nukleotidne sljedove.[10]




Slika 1. Prikaz dva kromatinska stanja. Eukromatin je manje kondenziran i transkripcijski aktivan (lijevo), a heterokromatin je kondenziraniji i transkripcijski inertniji (desno).[17]

Satelitsku DNA (satDNA) čine dugi, neprekinuti nizovi uzastopno ponovljenih kratkih nukleotidnih sljedova (monomera) u orijentaciji glava–rep.[1] Naziv je dobila zbog toga što se centrifugiranjem genomske DNA u gradijentu gustoće cezijevog klorida izdvaja kao dodatna

"satelitska" vrpca koja je manje gustoće od ostatka DNA, zbog većeg udjela A i T nukleotidnih parova.[18] U genomu se može detektirati elektroforezom u gelu tako da se na gel stave produkti cijepanja genomske DNA restrikcijskim enzimima koji prepoznaju mjesto cijepanja unutar monomera.[19] Monomeri se obično neznatno razlikuju u nukleotidnom slijedu zbog pojave točkastih mutacija. Ako se točkasta mutacija dogodi na mjestu prepoznavanja restrikcijskog enzima, on više neće moći rezati DNA na tom mjestu. U tom se slučaju, kao rezultat elektroforeze u gelu, dobije karakteristična ljestvica čije linije odgovaraju monomeru, dimeru, trimeru i ostalim višekratnicima (slika 2). Susjedni monomeri mogu formirati nove jedinice ponavljanja u orijentaciji glava–rep koje se nazivaju jedinice organizacije višeg reda (engl. *Higher order repeats*, HOR). HOR-ovi su karakteristični za genome primata, a najbolje su opisani u ljudskom genomu. Novija istraživanja genoma brašnara *T. castaneum* prvi put su dokazala prisutnost HOR-ova i u kukcima.[20]




Slika 2. Rezultat elektroforeze u gelu nakon cijepanja genomske DNA restrikcijskim enzimima koji prepoznaju mjesto cijepanja unutar monomera satelitske DNA. Karakteristična ljestvica dobije se zbog pojave točkastih mutacija unutar mjesta prepoznavanja restrikcijskih enzima. [21]

Satelitske DNA razlikuju se po sastavu i kompleksnosti slijeda nukleotida, duljini i broju ponavljanja monomera.[19] U genomu jedne vrste obično su prisutne različite satelitske DNA,

no samo je jedna ili nekolicina njih dominantna pa tako ljudska α satelitska DNA čini preko 50% ukupne satelitske DNA u genomu čovjeka, a preko 35% genoma brašnara *T. castaneum* čini satelitska DNA TCAST1.[22,23] Satelitske DNA čine dio eukariotskog genoma koji se najbrže izmjenjuje te imaju vrlo različite sljedove i/ili broj kopija čak i u blisko srodnim vrstama. Unatoč tome, sljedovi nekih satelitskih DNA su visoko očuvani kroz duži evolucijski period, kao na primjer, ljudska α satelitska DNA koja je otkrivena u evolucijski vrlo udaljenim vrstama poput kokoši i zebrice.[2] Zbog pronalaska visoko očuvanih sljedova, promotorskih elemenata i veznih mjesta transkripcijskih faktora kao i pronalaska transkripata satelitske DNA, pretpostavlja se da one mogu utjecati na regulaciju genske ekspresije u stresnim uvjetim.[1] Osim u području heterokromatina, elementi satelitske DNA pronađeni su raspršeni unutar eukromatina u blizini ili u intronima jedinstvenih gena gdje mogu utjecati na njihovu ekspresiju.[3] Istraživanja ekspresije satelitske DNA TCAST1 u brašnaru *T. castaneum* i ekspresije gena u čijoj se blizini nalaze elementi TCAST1 nakon toplinskog stresa, pokazala su da je ekspresija elemenata TCAST1 povećana, a gena smanjena nakon toplinskog stresa i to ovisno o broju elemenata TCAST1 u blizini gena. Ovo istraživanje potvrđuje moguću ulogu satelitskih DNA u regulaciji genske ekspresije nakon temperaturnog stresa.[5]

### *2.2.1. Satelitska DNA u brašnaru Tribolium castaneum*

U rodu *Tribolium*, satelitske DNA čine veliki dio pericentromernog heterokromatina. Brza izmjena satelitskih DNA dovodi do toga da različite vrste roda *Tribolium* imaju vrlo specifične satelitske profile. U svakoj su vrsti detektirane najzastupljenije, glavne satelitske DNA koje ne pokazuju značajne sličnosti u slijedu nukleotida, ali pokazuju strukturne sličnosti poput blokova bogatih AT parovima. U brašnaru *T. castaneum,* glavna satelitska DNA TCAST1 nalazi se u centromernom i pericentromernom području heterokromatina svih kromosoma i čini 35% ukupne genomske DNA. Analiza nukleotidnih sljedova pokazala je da se TCAST1 sastoji od dviju podobitelji koje dijele 79% sličnosti: TCAST1A i TCAST1B.[24] TCAST1A ima nukleotidni slijed duljine 377 pb i čini 20% genoma, a TCAST1B ima nukleotidni slijed duljine 362 pb i čini 15% genoma. Ono što ih dijeli u dvije podobitelji i po čemu se značajno razlikuju je dio u središnjem dijelu monomera prosječne duljine 100 pb. Analiza satelita TCAST1, u različitim sojevima brašnara, nije pokazala značajne razlike u veličini, organizaciji i broju kopija monomera među sojevima. Osim u području heterokromatina, pronađeni su raspršeni elementi TCAST1 unutar eukromatina u blizini gena i u samim intronima gena.[3]

Sporedna satelitska DNA u brašnaru *T. castaneum*, TCAST2, čini svega 1% genoma. Ona se sastoji od triju podobitelji koje se razlikuju prema duljini monomera i položaju u genomu: TCAST2A, TCAST2B i TCAST2C.[23] TCAST2A duljine je 359 pb, TCAST2B 179 pb, a TCAST2C 300 pb. Dok su TCAST2A i TCAST2B većinom smještene u pericentromernom dijelu heterokromatina, TCAST2C se uglavnom nalazi u obliku raspršenih elemenata unutar eukromatina. Istraživanja podobitelji TCAST2 su pokazala značajne razlike u satelitskim profilima među različitim sojevima brašnara pa se pretpostavlja da satelitska DNA može dovesti do genomske raznolikosti na populacijskom nivou. Okarakterizirane su i ostale obitelji TCAST, od TCAST3 do TCAST10, koje su također pronađene raspršene unutar eukromatina. Istraživanja su pokazala da su elementi TCAST transkripcijski aktivni te da im se aktivnost povećava nakon izlaganja toplinskom stresu. [25]

### *2.2.2. Satelitska DNA u vinskoj mušici Drosophila melanogaster*

U vinskoj mušici *D. melanogaster*, otprilike 21% genoma čini satelitska DNA. Glavna satelitska DNA, 1.688, dijeli se na više podobitelji koje imaju različite duljine ponavljajućih nukleotidnih sljedova. Ponavljanja duljine 260 pb nalaze se na 2. kromosomu, ponavljanja duljine 353 i 356 pb na 3. kromosomu te ponavljanja duljine 390 pb na X kromosomu.[26] Prijašnja istraživanja pokazala su oko 80% sličnosti između podobitelji. Razlike unutar nizova su otprilike 6% na 2. kromosomu, 5% na 3. i 11% na X kromosomu. Osim u vinskoj mušici, sljedovi satelitske DNA 1.688 pronađeni su i u drugim srodnim vrstama poput *D. simulans*, *D. mauritania* i *D. teissieri*. Između srodnih vrsta, pokazana je velika razlika u količini i slijedu pojedinačnih ponavljanja. Pretpostavlja se da ovako brza izmjena satelitskih DNA može imati važnu ulogu kod specijacije tako što onemogućuje reprodukciju blisko srodnih vrsta.[27] Većina satelitske DNA 1.688 nalazi se unutar heterokromatina u obliku dugih, ponavljajućih nizova. Kraći nizovi pronađeni su raspršeni unutar eukromatina u blizini i unutar introna gena pa je pretpostavljena njena regulacijska uloga.[6]

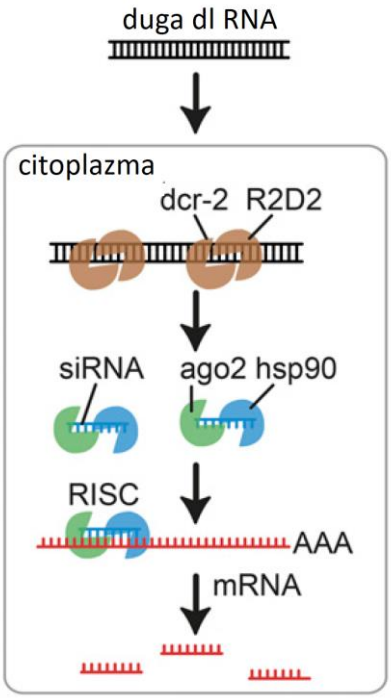
## 2.3. Transkripcija satelitske DNA

Transkripcija satelitske DNA dokazana je u raznim vrstama, uključujući kralježnjake, beskralježnjake i biljke.[1] Iako se nalaze u transkripcijski inertnom heterokromatinu, sljedovi nekih satelitskih DNA sadržavaju promotorske elemente i mjesta vezanja transkripcijskih faktora. Transkripti satelitskih DNA većinom su poliadenilirane molekule RNA prisutne u citoplazmi, no pronađeni su i transkripti koji su prisutni isključivo u jezgri kao i transkripti

koji nisu poliadenilirani. Transkripti mogu biti različitih veličina. Neki su specifični samo za jedan lanac, dok drugi nastaju s oba lanca DNA. Umnažanjem transkripata reakcijom RT-PCR specifičnim početnicama koje odgovaraju satelitskoj DNA PSUB u kukcu *Palorus subdepressus*, dobivena je karakteristična ljestvica veličina fragmenata iz čega se može zaključiti da transkripti ne završavaju unutar monomera, već su sastavljeni od ponavljajućih sljedova, baš poput satelitske DNA.[28] Transkripcija satelitskih DNA može biti specifična za spol i fazu razvoja organizma, kao i za vrstu stanica, tkiva ili organa. Na transkripciju može utjecati i stres, pogotovo toplinski stres. Povišena temperatura dovodi do nastanka transkripata ljudske satelitske DNA III specifične za 9. kromosom, koji nisu opaženi pri standardnim uvjetima.[29] Pretpostavlja se da transkripti satelitske DNA imaju ulogu u regulaciji genske ekspresije pod utjecajem stresa. U kvascu *Schizosaccharomyces pombe* prvi je put pokazano da transkripti centromerne satelitske DNA postoje u obliku molekula siRNA, duljine 20-25 parova baza, koje sudjeluju u formaciji heterokromatina.[30] U vinskoj mušici *D. melanogaster*, dokazano je da transkripti satelitske DNA III imaju važnu ulogu u formaciji kinetohora i u pravilnoj funkciji centromera, čime utječu na normalnu podjelu kromosoma.[31]

## 2.4. Male interferirajuće molekule RNA (siRNA)

Interferencija RNA (RNAi) je prirodni mehanizam kojim se utišava genska ekspresija pomoću dvolančanih molekula RNA (dlRNA).[32] Mehanizam postrankripcijskog utišavanja gena možemo podijeliti u dva koraka. U prvom koraku, iz duge, dvolančane molekule RNA, djelovanjem ribonukleaze dicer i kofaktora, nastaju molekule siRNA, prosječne duljine 21 nukleotida. U drugom koraku, nastala molekula siRNA, enzim iz obitelji argonaut koji ima nukleaznu aktivnost i drugi pomoćni enzimi sastavljaju kompleks za utišavanje RISC (engl. *RNA-induced silencing complex*). Jednolančana molekula siRNA, unutar kompleksa RISC, pronalazi i veže se za komplementarni slijed mRNA, koju zatim reže argonaut (slika 3). Iako postoje male razlike u redoslijedu događaja, ovaj je mehanizam očuvan u većini eukariotskih organizama, uključujući biljke, gljive, kukce i ljude.




Slika 3. Interferencija RNAi u mušici *D. melanogaster*. Mehanizam postrankripcijskog utišavanja gena pomoću siRNA. Dvolančana RNA (dlRNA) procesira se u jednolančanu siRNA pomoću ribonukleaze dcr-2 i kofaktora R2D2. Molekula siRNA zajedno s nukleazom ago2 i pomoćnim proteinima poput hsp90 čini kompleks za utišavanje RISC koji veže i degradira mRNA sa slijedom koji je komplementaran jednolančanoj molekuli siRNA.[33]

Komponente RNAi sudjeluju u još dva važna mehanizma utišavanja: u mehanizmu postranskripcijskog utišavanja genske ekspresije pomoću mikro RNA (miRNA) i mehanizmu utišavanja transkripcije gena modifikacijom kromatina. U kvascu *S. pombe*, molekule siRNA koje sudjeluju u formaciji heterokromatina mehanizmom RNAi, nastaju iz transkripata visoko očuvanih sljedova satelitske DNA.[30] Molekule siRNA nastaju iz dugih, dvolančanih RNA transkripata pomoću ribonukleaze dicer. Zatim, proteini iz obitelji argonaut, zajedno s nastalom molekulom siRNA tvore kompleks za utišavanje transkripcije RITS (engl. *RNA-induced transcriptional silencing complex*). Kompleks RITS je u interakciji s RNA polimeraznim kompleksom RDRC (engl. *RNA-directed RNA polymerase complex*) koji je potreban za nastanak sekundarne dvolančane RNA i za pojačavanje signala za utišavanje. Kompleksi RITS i RDRC su povezani s početnim RNA transkriptom. Vezanje kompleksa RITS vjerojatno se postiže sparivanjem molekula siRNA s početnim RNA transkriptom koji je u direktnom kontaktu s RNA Pol II elongacijskim kompleksom. Za povezivanje kompleksa

RITS s kromatinom, potrebna je i histonska metiltransferaza Clr4. Metilacija histona 3 na lizinu (H3K9) dodatno povezuje komplekse RITS i RDRC s kromatinom i omogućuje vezanje heterokromatinskih proteina 1 (HS1) ili Swi6 proteina u *S. pombe* potrebnih za nastanak i širenje heterokromatina.[2]

Pokazalo se da je RNAi mehanizam evolucijski očuvan i smatra se odgovornim za formiranje pericentromernog heterokromatina u raznim vrstama. U vinskoj mušici *D. melanogaster*, dokazana je prisutnost molekula siRNA duljine 19-21 nukleotida koje su nastale transkripcijom satelitske DNA 1.688. Istraživanja su pokazala da mehanizam RNAi sudjeluje u formaciji heterokromatina i u utišavanju transkripcije satelitske DNA 1.688.[34] U brašnaru *T. castaneum*, ekspresijom satelitske DNA nastaju molekule siRNA duljine 21-30 nukleotida. Ekspresija satelitske DNA je razvojno regulirana i osjetljiva na uvjete u okolišu. Povećanje količine molekula siRNA koje nastaju od satelitske DNA prati i povećanje represivnih epigenetskih markera na ponavljajućim satelitskim regijama. Pretpostavlja se da te molekule siRNA imaju utjecaj na epigenetsko stanje heterokromatina i da su posrednici reorganizacije heterokromatina prilikom temperaturnog stresa.[4] Ekspresija satelitskih elemenata TCAST ovisna je o temperaturi, što upućuje na njihovu moguću ulogu u regulaciji genske ekspresije pri stresnim uvjetima.[5]

## 2.5. Biotički i abiotički stres

Organizmi u prirodi su pod utjecajem brojnih stresnih uvjeta poput temperature, suše (abiotički stresovi), bakterijskih i virusnih infekcija (biotički stresovi). Temperatura je jedan od najvažnijih abiotičkih stresova koji određuje stupanj aktivnosti i zemljopisnu raspodijeljenost organizma. Povišenje temperature prati povećana ekspresija HSP (engl. *heat shock proteins*). HSP djeluju kao šaperoni tako što stabiliziraju proteine, štite ih od denaturacije i omogućuju njihovo ponovno smatanje, čime sprječavaju nastanak štetnih agregata.[35] HSP su visoko očuvani proteini prisutni u mnogim vrstama i zato su vrlo proučavani. Najproučavaniji članovi HSP obitelji su HSP70. Geni za HSP70 aktiviraju se u uvjetima visoke temperature, a ekspresija je regulirana faktorom HSF1 (engl. *heat shock transcription factor 1*). Temperatura pri kojoj se HSP eksprimiraju može varirati ovisno o vrsti i njenom prirodnom staništu, pa tako temperatura pri kojoj započinje ekspresija i temperatura pri kojoj je ekspresija maksimalna, mogu biti korisni pokazatelji tolerancije organizma na povišenu temperaturu. Odgovor HSP na povišenu temperaturu je najviše proučavan, no pokazalo se da je u nekim organizmima ekspresija HSP aktivirana i kao

odgovor na druge stresne uvjete, poput hladnog stresa, isušivanja, izgladnjivanja i anoksije.[35] Hladan stres i isušivanje su vrlo usko povezani. Voda manje isparava pri nižim temperaturama, što dovodi do isušivanja okoliša i dehidratacije organizama. Pri vrlo niskim temperaturama, insekti ne mogu održati mišićni potencijal u stanju mirovanja i padaju u hladnu komu (engl. *chill coma*). Temperatura pri kojoj padaju u hladnu komu specifična je za pojedinu vrstu. Mušica *D. melanogaster* pada u hladnu komu pri temperaturi nižoj od 7 °C.[36] Pokazalo se da se osjetljivost organizma na hladnoću može smanjiti prethodnim kratkim izlaganjem organizma blažim temperaturama. Isto tako, ako se organizam kratki period nalazi u okolišu relativno visoke vlažnosti, smanjuje mu se osjetljivost na isušivanje. U nekim nižim insektima, smanjenje osjetljivost na isušivanje, može se postići i izlaganjem relativno niskoj vlažnosti. Osim vremena trajanja stresa, bitno je i vrijeme oporavka od stresa. U mušici *D. melanogaster*, pokazalo se da ekspresija proteina frost, koji sudjeluje u mehanizmu preživljavanja hladnog stresa, nije promijenjena tijekom trajanja hladnoga stresa, ali je značajno povećana u vremenu oporavka od stresa.[37,38] Vrijeme oporavka od stresa bitno je za sintezu proteina koji moguće štite od budućeg, jačeg stresa.[37] Istraživanja su pokazala da, tijekom stresa i tijekom oporavka od stresa, dolazi do modifikacija histona i metilacije DNA, što dovodi do kromatinskih promjena čime se utišava ili pojačava ekspresija gena.[39] Sve je više dokaza kako satelitska DNA utječe na reorganizaciju heterokromatina nakon temperaturnog stresa, što ukazuje na moguću ulogu satelitske DNA u obrani organizma od štetnih uvjeta.[2]

# 3. EKSPERIMENTALNI DIO

## 3.1. Materijali

### *3.1.1. Reagensi*

- Destilirana voda (AccuGENE, Lonza)
- Etanol (Gram-Mol)
- 2X Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific)
- Početnice (metabion international AG)
- Power SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems)
- Pufer TAE (50X): 2 mol $dm^{-3}$ Tris (Promega), 1 mmol $dm^{-3}$ octene kiseline (Kemika) i 50 mmol $dm^{-3}$ EDTA, pH 8,0 (Promega)
- LE agaroza (Roche)
- Etidijev bromid (Promega)
- Marker za elektroforezu u gelu (O'GeneRuler Ladder Mix, Fermentas)
- Boja za nanošenje uzoraka za elektroforezu u gelu (6X Orange Loading Dye, Thermo Scientific)
- Custom TaqMan Small RNA Assays (Applied Biosystems)
- TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems)

### *3.1.2. Instrumenti*

- Rotor-stator homogenizator (TissueRuptor, Qiagen)
- Centrifuga (Centrifuge 5417R, Eppendorf)
- PCR uređaj (termoblok Biometra)
- Qubit 1.0 fluorometar (Invitrogen)
- Uređaj za elektroforezu u gelu (PowerPac™ Basic Power Supply, Bio-Rad)
- UV-transiluminator (G:BOX, Syngene)
- qPCR uređaj (7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems)

### *3.1.3. Komercijalni kompleti*

- DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)
- Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen)
- PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa)
- mirVana™ miRNA Isolation Kit (Invitrogen)
- TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

### *3.1.4. Crveni brašnari Tribolium castaneum*

U radu su korištena 3 soja brašnara *T. castaneum* koji su uzgojeni u Laboratoriju za evolucijsku genetiku Instituta Ruđer Bošković:

- GA2: laboratorijski soj koji potječe iz soja divljeg tipa prikupljenog u SAD-u u Georgiji 1982. (soj koji je originalno korišten u projektu sekvenciranja genoma)
- GA1: soj divljeg tipa prikupljen 1980. u SAD-u u Georgiji
- 55: soj divljeg tipa prikupljen 1991. u Španjolskoj u Jerezu

### *3.1.5. Početnice*

Za analizu ekspresije satelitskih DNA kvantitativnim PCR-om, korištene su početnice koje specifično umnažaju satelitske DNA TCAST1 i TCAST2. Za endogenu kontrolu, korištene su početnice koje specifično umnažaju gene za ribosomski protein S18 (RPS18) i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) koji imaju jednaku ekspresiju u normalnim uvjetima i uvjetima stresa. Nukleotidni sljedovi i svojstva korištenih početnica navedeni su u tablici 2 i tablici 3. Specifičnost vezanja početnica provjerena je u bazi NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*) pomoću *Primer Blast* alata (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/).

### *3.1.6. Početnice i probe za reverznu transkripciju i umnažanje malih interferirajućih molekula RNA*

Nukleotidni sljedovi malih RNA, koje su analizirane kvantitativnim PCR-om, navedene su u tablici 1. Specifične *steam-loop* početnice za reverznu transkripciju, TaqMan probe, uzvodne i nizvodne početnice za umnažanje specifičnih sljedova molekula siRNA qPCR-om, dizajnirane su online na ThermoFischer-ovoj stranici pod karticom *Custom TaqMan® Small RNA Assay Design Tool* (https://www.thermofisher.com/order/custom-genomic-products/tools/small-rna/).

Tablica 1. Nukleotidni sljedovi molekula siRNA koje su analizirane kvantitativnim PCR-om.

| RNA | Nukleotidni slijed 5' prema 3' |
|---|---|
| $tRNA^{Lys}$ | GCCCGGGUAGCUCAGUCGGUAGAGCAUUGGACUUUUA AUCCAAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGCUCGGGCG |
| siRNA2 | CUUGUAGGACCAACCAUAAGC |
| siRNA5 | CAUAAGCGAGUUAUAGAGUUG |

### *3.1.7. Sekvencirane cDNA knjižnice*

Za analizu ekspresije satelitskih DNA, kao odgovor na različite vrste stresnih uvjeta, korišteni su javno dostupni rezultati sekvenciranja RNA (engl. *RNA-Seq*) preuzeti iz baze *NCBI Sequence Read Archive (SRA)* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra). Pristupni kodovi navedeni su u tablici 4.

Tablica 2. Početnice korištene za analizu ekspresije satelitskih DNA.

| Satelitska DNA | Nukleotidni slijed početnice | Duljina početnice / nt | $T_m$ / °C | Duljina produkta / pb |
|---|---|---|---|---|
| TCAST1 | F: CCATAAGCGAGTTATAGAGTTGG | 23 | 56,59 | 148 |
| | R: CTTTAGTGACTTTTATGTCTTCTCC | 25 | 55,68 | |
| TCAST2 | F: TGAGTTTGAGTGTAAATCGGACGC | 24 | 61,61 | 99 |
| | R: GTTTGATTTATTGCGCCTCGTGG | 23 | 61,27 | |

Tablica 3. Početnice korištene za analizu ekspresije gena RPS18 i GAPDH koji su korišteni kao endogena kontrola.

| Gen | Ime gena | Pristupni kod (GenBank) | Nukleotidni slijed početnice | Duljina početnice / nt | $T_m$ / °C | Duljina produkta / pb |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RPS18 | Ribosomski protein S18 | 662445 | F: CGAAGAGGTCGAGAAAATCG | 20 | 55,98 | 235 |
| | | | R: CGTGGTCTTGGTGTGTTGAC | 20 | 59,34 | |
| GAPDH | Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza | 663815 | F: CGTATCTCTCAGCCGACCAC | 20 | 59,97 | 654 |
| | | | R: CGGGAGTGTCAATGACTACGG | 21 | 60,47 | |

Tablica 4. Pristupni kodovi sekvenciranih cDNA knjižnica korištenih za analizu ekspresije satelitskih DNA nakon stresa.

| Pristupni kod | Organizam | Vrsta stresa | Instrument | Tip sekvenciranja | Broj pokusa | Broj replikata |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SRP069083 | *Drosophila melanogaster* | Hladni stres | Illumina HiSeq 2000 | SE – *single-end* | 64 | 2 |
| SRP127794 | *Drosophila melanogaster* | Infekcija bakterijama | Illumina NextSeq 500 | SE – *single-end* | 117 | 3 |
| SRP033773 | *Tribolium castaneum* | Infekcija bakterijama | Illumina HiSeq 2000 | PE – *paired-end* | 48 | 3 |
| SRP067120 | *Tribolium castaneum* | Infekcija bakterijama | Illumina HiSeq 2000 | PE – *paired-end* | 18 | 3 |

## 3.2. Metode

### *3.2.1. Uzgoj brašnara T. castaneum i hladni stres*

Brašnari su uzgajani u mračnom inkubatoru pri temperaturi od 25 °C i relativnoj vlažnosti 70%. Populacije različitih sojeva brašnara uzgajane su odvojeno na standardnom mediju brašno:kvasac (20:1).

Hladni stres je proveden pri temperaturi od 15 °C u trajanjima od 3 h, 24 h i 72 h i pri temperaturi od 6 °C u trajanjima od 1h i 24 h. Vremena oporavka od hladnog stresa bila su 0 minuta (bez oporavka), 30 minuta i 60 minuta. Kontrola predstavlja brašnare koji nisu bili podvrgnuti hladnom stresu. U svim su eksperimentima korištena 2 biološka i 2 tehnička replikata.

### *3.2.2. Izolacija DNA*

Za izolaciju DNA iz brašnara *T. castaneum*, korišten je komercijalni komplet DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. U Eppendorf epruvetu od 2 ml sakupi se oko 25 mg odraslih brašnara (5 brašnara) koji se zatim homogeniziraju rotor-stator homogenizatorom (TissueRuptor, Qiagen) u 180 µl pufera ATL. Nakon homogeniziranja doda se 20 µl proteinaze K, vorteksira i inkubira barem 1 sat pri temperaturi od 56 °C kako bi se stanice lizirale. Nakon inkubacije, smjesa se vorteksira, doda se 200 µl pufera AL i 200 µl etanola, nakon čega se vorteksira sve dok otopina ne postane homogena. Smjesa se zatim otpipetira u DNeasy Mini Spin kolonu s tubicom za sakupljanje od 2 ml i centrifugira 1 minutu pri 6000 g kako bi se DNA vezala za membranu. Odbaci se nevezana frakcija. Zaostale nečistoće na membrani isperu se s 500 µl pufera AW1, centrifugira se 1 min pri 6000 g i odbaci se nevezana frakcija. Doda se 500 ml pufera AW2 i centrifugira 3 minute pri maksimalnoj brzini kako bi se uklonio sav etanol s membrane. Nakon ispiranja, DNA Mini Spin kolona se prebaci u Eppendorf epruvetu od 2 ml. DNA se eluira s kolone s 200 µl pufera AE koji se doda direktno na membranu, inkubira se kraće vrijeme na sobnoj temperaturi kako bi se cijela membrana natopila puferom (1 min) i centrifugira 1 min pri 6000 g. Sačuva se nevezana frakcija koja sadrži izoliranu i pročišćenu DNA. Ovim se postupkom izolira prosječno 2 µg DNA iz 25 mg brašnara.

### *3.2.3. Izolacija RNA*

RNA iz brašnara *T. castaneum* je izolirana pomoću Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen) kompleta za izolaciju i pročišćavanje RNA molekula dužih od 200 nukleotida. U Eppendorf epruvetu se sakupi oko 10 odraslih jedinki brašnara *T. castaneum*, koji se zatim smrznu u tekućem dušiku kako bi se zaustavile sve metaboličke aktivnosti. Brašnari se homogeniziraju rotor-stator homogenizatorom (TissueRuptor, Qiagen) u 600 ml pufera RLT koji sadrži visoko koncentrirani gvanidin izotiocijanat koji inaktivira RNaze i β-merkaptoetanol koji reducira disulfidne veze. Centrifugira se 3 minute pri maksimalnoj brzini. Supernatant se otpipetira i prebaci na gDNA Eliminator Spin kolonu s tubicom za sakupljanje od 2 ml i centrifugira 30 s pri 8000 g kako bi se uklonila genomska DNA. Kolona se odbaci, a sačuva se nevezana frakcija kojoj se doda se jednak volumen 70% etanola koji služi za vezanje RNA na kolonu. Smjesa se izmiješa pipetiranjem i prebaci na RNeasy Mini Spin kolonu s tubicom za sakupljanje od 2 ml, nakon čega se centrifugira 15 s pri 8000 g. Odbaci se nevezana frakcija. Kolona se ispere sa 700 µl pufera RW1, centrifugira 15 s pri 8000 g. Nevezana frakcija se odbaci. Kolona se još dva puta ispere s 500 µl pufera RPE. Prvi put se centrifugira 15 s pri 8000 g, a drugi put 2 min pri 8000 g. Nevezana frakcija se odbaci, a kolona prebaci u čistu tubicu za sakupljanje od 1,5 ml. 40 µl vode bez RNaza se doda na kolonu i centrifugira 1 min pri 8000 g kako bi se eluirala RNA. Prosječna masa izolirane RNA iz 10 jedinki brašnara iznosi 20 µg.

### *3.2.4. Izolacija malih RNA*

Za izolaciju ukupne RNA, što uključuje i male molekule RNA, iz brašnara *T. castaneum*, korišten je mirVana™ miRNA Isolation Kit (Invitrogen) prema uputama proizvođača. 10 odraslih jedinki brašnara zaledi se u tekućem dušiku i homogenizira u 300 µl pufera za lizu i vezanje RNA na membranu (Lysis/Binding Buffer). Smjesa se vorteksira dok otopina ne postane homogena. Doda se 1/10 volumena miRNA homogenat aditiva (30 µl), vorteksira i ostavi na ledu 10 min. Doda se 300 µl kisele otopine fenol:kloroform, vorteksira 60 s i centrifugira 5 min na maksimalnoj brzini kako bi se odvojile vodena i organska faza. Vodena faza (gornja faza) se otpipetira u novu Eppendorf epruvetu od 2 ml te joj se doda 100% etanola. Volumen dodanog etanola je 1,25 puta veći od volumena odvojene vodene faze. Smjesa se vorteksira nakon čega se prebaci maksimalno 700 µl te smjese na Filter Catridge kolonu i centrifugira 15 s pri 10000 g. Odbaci se nevezana frakcija. Kolona se ispere sa 700

μl miRNA otopine za ispiranje 1 i centrifugiranjem 10 s pri 10000 g. Ispere se još dva puta s po 500 μl miRNA otopine za ispiranje 2/3 i centrifugiranjem 10 s pri 10000 g. Kako bi se kolona osušila, centrifugira se još 2 min pri maksimalnoj brzini. Kolona se prebaci u čistu tubicu za sakupljanje i doda joj se 100 μl otopine za eluiranje koja je prethodno zagrijana na 95 °C. Centrifugira se 30 s pri maksimalnoj brzini čime se RNA eluira s kolone. Prosječna masa izolirane RNA iz 10 jedinki brašnara iznosi 20 μg.

### *3.2.5. Elektroforeza u agaroznom gelu*

Za provjeru kvalitete izolirane RNA i rezultata umnažanja DNA PCR-om, koristi se elektroforeza u agaroznom gelu. Pripremi se 1% agarozni gel otapanjem agaroze u puferu TAE (1X) koji se dobije razrjeđivanjem pufera TAE (50X). Gelu se doda 0,5 μl $mg^{-1}$ otopine etidijevog bromida. Etidijev bromid se interkalira među baze nukleinskih kiselina i omogućuje njihovu detekciju pod UV svjetlom. Otopljeni agarozni gel prelije se u kadicu za elektroforezu s češljem za jažice kako bi polimerizirao. Uzorcima za elektroforezu doda se agarozna boja (6X Orange Loading Dye, Thermo Scientific) kako bi se elektroforeza mogla pratiti te se uzorci nanesu u jažice. U jednu se jažicu doda molekulski marker poznatih molekulskih masa (O'GeneRuler Ladder Mix, Fermentas) kako bi se mogle odrediti veličine produkata. Elektroforeza se provodi približno 45 min pri naponu od 10 V $cm^{-1}$ za uzorke DNA i 5 V $cm^{-1}$ za uzorke RNA. Nakon elektroforeze, uzorci su detektirani UV-transiluminatorom pri valnoj duljini od 320 nm i fotografirani programom Gene Snap (Syngene; verzija 7.05).

### *3.2.6. Reverzna transkripcija*

Za reverznu transkripciju ukupne RNA koristi se PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) koji uključuje enzim za razgradnju genomske DNA koja je zaostala u uzorcima izoliranih RNA. Sve reakcijske smjese se pripremaju na ledu kako bi se usporila moguća degradacija RNA. U prvom se koraku pomiješa 2 μl pufera 5X gDNA Eraser, 1 μl enzima gDNA Eraser i 7 μl ukupne RNA i destilirane vode. Korišteno je približno 1μg ukupne RNA iz brašnara *T. castaneum*. U prvom koraku, reakcijska smjesa se zagrijava u termobloku 2 min pri temperaturi od 42 °C kako bi se razgradila genomska DNA. Drugi korak je reverzna transkripcija. Otopini iz prvog koraka se doda 4 μl 5X PrimeScript pufera 2, 1 μl PrimeScript RT enzima, 1 μl RT primera, oligo dT i nasumičnih heksamera. Ostatak od 4 μl nadopuni se destiliranom vodom bez RNaza kako bi ukupni volumen reakcije bio 20 μl.

Kako bi došlo do reverzne transkripcije, smjesa se ostavi u termobloku 15 minuta pri temperaturi od 37 °C te 5 sekundi pri temperaturi od 85 °C da bi se enzimi inaktivirali . Negativna kontrola reverzne transkripcije uključuje sve komponente osim enzima. Koncentracija dobivene komplementarne DNA (cDNA) određena je Qubit 1.0 fluorimetrom (Invitrogen) i prosječno iznosi 60 ng $\mu l^{-1}$. cDNA se čuva pri temperaturi od 4 °C ili pri -20 °C ako se čuva dulje vrijeme.

### *3.2.7. PCR (lančana reakcija polimerazom)*

Metoda PCR-a korištena je za dokazivanje satelitskih DNA TCAST u brašnaru *T. castaneum*. Masa ukupne DNA koja se koristi kao kalup približno je jednaka 2 ng. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 20 µl sadrži 10 µl 2X Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific), 2 µl specifičnih početnica koncentracije 2 mmol $dm^{-3}$ i 8 µl destilirane vode i kalupa (DNA). 2X Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) sadrži 0,05 U $ml^{-1}$ DreamTaq DNA polimerazu, reakcijski pufer, 4 mmol $dm^{-3}$ $MgCl_2$ i 0,4 mmol $dm^{-3}$ svih dNTP (dATP, dTTP, dGTP i dCTP). Reakcije PCR-a su provedene pri uvjetima prikazanim u tablici 5. Produkti reakcija PCR-a provjereni su elektroforezom u agaroznom gelu.

Tablica 5. Uvjeti pri kojima su provedene reakcije PCR-a.

| | *T*/ °C | trajanje ciklusa | broj ciklusa |
|---|---|---|---|
| početna denaturacija | 95 | 5 min | 1 |
| denaturacija | 95 | 20 s | 40 |
| sparivanje početnica | 50 | 20 s | |
| produljenje | 72 | 20 s | |
| završno produljenje | 72 | 7 min | 1 |

### *3.2.8. qPCR (kvantitativna lančan reakcija polimerazom)*

Metoda qPCR-a je korištena za analizu promjene ekspresije satelitskih DNA brašnara *T. castaneum* nakon hladnog stresa. Uzorci cDNA umnažani su na standardnoj ploči s 96 mjesta (Applied Biosystems) u uređaju za qPCR (7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems). Korištena masa cDNA pripremljene iz uzoraka izolirane RNA približno je jednaka 20 ng. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 20 µl sadrži 10 µl otopine Power SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems), 2 µl specifičnih početnica koncentracije 2 mmol $dm^{-3}$ i 8 µl destilirane vode i cDNA. Negativne kontrole sadržavaju sve komponente

osim cDNA. Kao endogena kontrola, umnoženi su geni za ribosomski protein S18 (RPS) i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH). Reakcije qPCR-a su provedene pri uvjetima prikazanima u tablici 6.

Faza disocijacije provede se na kraju eksperimenta qPCR-a kako bi se konstruirala disocijacijska krivulja koja se koristi za određivanje nastanka nekih nespecifičnih produkata, poput dimera početnica.[40]

Tablica 6. Uvjeti pri kojima su provedene reakcije qPCR-a.

| | *T*/ °C | trajanje ciklusa | broj ciklusa |
|---|---|---|---|
| **qPCR** | 50 | 2 min | 1 |
| | 95 | 7 min | 1 |
| | 95 | 15 s | 40 |
| | 60 | 1 min | |
| **Faza disocijacije** | 95 | 15 s | 1 |
| | 60 | 1 min | 1 |
| | 95 | 15 s | 1 |

Nakon eksperimenta, podatci su eksportirani kao Excel dokument i analizirani programom *LinRegPCR*.[41]

Analiza podataka dobivenih kvantitativnim PCR-om uključuje procjenu bazne linije i praga fluorescencije, određivanje *Ct* vrijednosti i učinkovitosti umnažanja PCR-om. Bazna linija ili granica detekcije predstavlja granicu ispod koje nije moguće razlučiti fluorescenciju specifičnu za umnoženi produkt od fluorescencije dimera početnica, nespecifičnih produkata i slobodne fluorescirajuće boje. Prag fluorescencije (engl. *treshold*) predstavlja fiksiranu vrijednost fluorescencije koja se koristi za određivanje *Ct* vrijednosti. *Ct* vrijednost predstavlja broj ciklusa potrebnih da fluorescencija dosegne postavljeni prag fluorescencije i koristi se za procjenu početne količine ciljnog slijeda u uzorku. Osnovna jednadžba za kinetiku PCR umnažanja glasi:

$$N_C = N_0 \times E^C \tag{1}$$

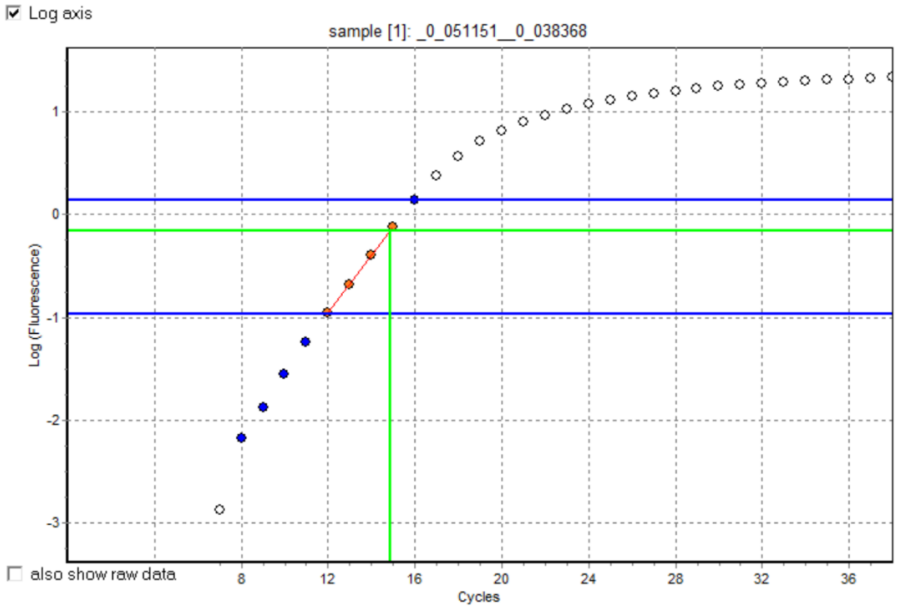
$$N_0 = \frac{N_{Ct}}{E^{Ct}} \tag{2}$$

$N_C$ predstavlja količinu ciljnog slijeda u ciklusu *C*, $N_0$ količinu početnog ciljnog slijeda, a *E* efikasnost ili učinkovitost umnažanja PCR-om.[42] Efikasnost se definira kao povećanje broja kopija ciljnog slijeda po ciklusu. Maksimalna vrijednost efikasnosti je 2, kada je umnažanje

dvostruko, a minimalna 1, kada nema umnažanja. Metode za analizu podataka qPCR-a pretpostavljaju konstantnu vrijednost efikasnosti umnažanja za grupu produkata, odnosno skupinu uzoraka za koji se koristi isti par početnica za umnažanje ciljnog slijeda. Program *LinRegPCR* određuje efikasnost umnažanja PCR-om iz nagiba pravca u linearnom dijelu logaritamske jednadžbe (eksponencijalnom dijelu amplifikacijske krivulje):

$$\log(N_C) = \log(N_0) + C\log(E) \tag{3}$$

Program koristi algoritam koji pretražuje točke unutar „prozora linearnosti“, W-o-L (engl. *Window of Linearity*) između kojih je najmanja varijacija u efikasnosti PCR umnažanja. Srednja vrijednost efikasnosti se određuje iz nagiba pravca provučenog kroz 4-6 točaka. Prag fluorescencije (engl. *treshold*) postavlja se 1 ciklus ispod gornje granice W-o-L-a i odredi se *Ct* vrijednost za svaki uzorak (slika 4).

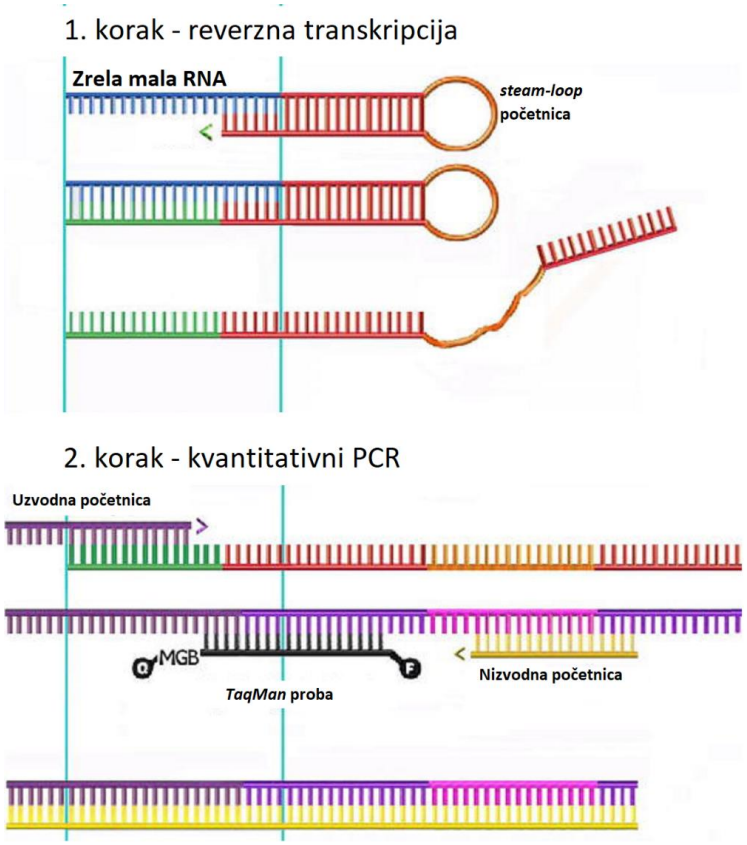



Slika 4. Amplifikacijska krivulja uzorka prikazana programom LinRegPCR. Plave linije predstavljaju granice „prozora linearnosti“ (engl. *Window of Linearity*), a zelena linija prag fluorescencije (engl. *treshold*).

Dobivene vrijednosti potrebno je usporediti s vrijednostima endogene kontrole koja se koristi kako bi se smanjio doprinos eksperimentalnih varijabilnosti na rezultate analize, kao što su razlike u kvaliteti RNA, pogreške prilikom pipetiranja, razlike u učinkovitosti reverzne transkripcije i PCR umnažanja. Endogene kontrole čine geni koji imaju jednaku ekspresiju u tretiranom i netretiranom uzorku kao što su gen za ribosomski protein S18 i gen za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu.

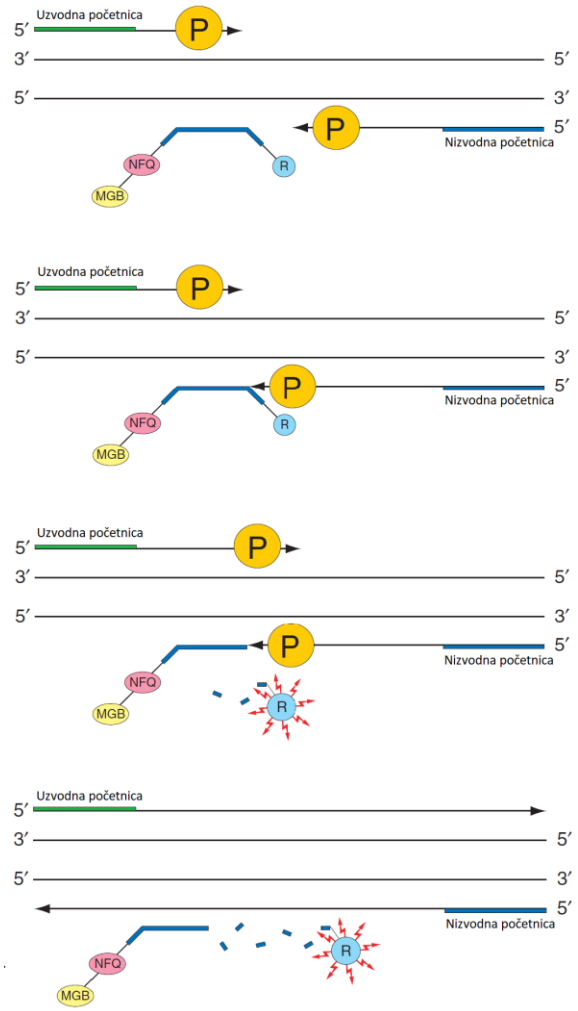
### *3.2.9. RT-qPCR malih molekula RNA*

Za reverznu transkripciju i kvantitativni PCR malih molekula RNA koristi se TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem) prema uputama proizvođača. Standardne qPCR metode umnažaju kalupe koji su dulji od 40 nukleotida.[43] Male RNA molekule prosječne su duljine 20-25 nukleotida, što znači da ne mogu biti umnožene standardnim qPCR metodama. Kako bi se male RNA kvantitativno umnožile, koriste se posebne, vrlo stabilne *steam-loop* početnice koje se sljepljuju na jednolančane male RNA, nakon čega se sintetizira cDNA pomoću MultiScribe reverzne trankriptaze. Nastala cDNA dulja je od 60 nukleotida, što je dovoljno za kvantitativni PCR. Za umnažanje cDNA koristi se uzvodna početnica koja ima dodatne nukleotide na 5'-kraju kako bi se optimizirala temperatura mekšanja, nizvodna početnica koja je komplementarna sekvenci RT *steam-loop* početnice i TaqMan proba (slika 5).




Slika 5. Shematski prikaz metode za reverznu transkripciju i kvantitativni PCR malih molekula RNA. Svijetlo plava linija označava granice nukleotidnog slijeda koja pripada maloj RNA. Slovom F označena je fluorescirajuća boja na TaqMan probi, slovom Q nefluorescirajući prigušivač (engl. *quencher*), MGB (engl. *minor groove binding*) označava molekulu koja se veže na manji utor DNA na 3'-kraju probe.[43]

TaqMan proba sadrži fluorescirajuću boju FAM na svom 5' kraju, MGB (engl. *minor groove binder*) molekulu koja se veže na 3'-kraju i nefluorescirajući prigušivač (engl. *quencher*). Između fluorescirajuće boje i prigušivača dolazi do prijenosa energije FRET-om (engl. *Forster-type Energy Transfer*) pa se fluorescencija ne detektira kada je proba netaknuta. Prilikom umnažanja PCR-om, TaqMan proba se specifično sljepljuje na komplementarni nukleotidni slijed između para početnica. DNA polimeraza, dolaskom do TaqMan probe, odjeljuje fluorescirajuću boju od ostatka probe na kojem se nalazi prigušivač pa tako dolazi do fluorescencije. Polimerizacija se nastavlja, no kako je 3'- kraj probe blokiran MGB-om, ne dolazi do produljenja probe (slika 6).




Slika 6. Shematski prikaz TaqMan sustava za mjerenje količine umnožene DNA qPCR-om. P označava polimerazu, R fluorescirajuću boju (engl. *reporter*), NFQ nefluorescirajuću boju (engl. *nonfluorescent quencher*) i MGB molekulu koja se veže na manji utor DNA (engl. *minor groove binder*).[44]

Najprije se pripremi reakcijska smjesa za reverznu transkripciju koja sadrži 0,15 µl 100 mmol $dm^{-3}$ otopine dNTP; 1,00 µl 50 U $µl^{-1}$ MultiScribe reverzne transkriptaze; 1,50 µl 10X pufera za reverznu transkripciju; 0,19 µl 20 U $µl^{-1}$ inhibitora RNaze i 4,16 µl vode bez nukleaza po uzorku. RT reakcijskoj smjesi ukupnog volumena 7 µl u epici za PCR se doda 5 µl ukupne RNA. Masa ukupne RNA približno je jednaka 10 ng. Smjesa se vorteksira i kratko centrifugira, nakon čega joj se doda 3 µl RT početnica specifičnih slijedu koji se želi umnožiti (Custom TaqMan Small RNA Assays, Applied Biosystem). Smjesa se u termobloku drži 30 minuta pri temperaturi od 16 °C kako bi došlo do slijepljivanja početnica, 30 minuta pri 42 °C kako bi došlo do transkripcije i 5 minuta pri 85 °C kako bi se inaktivirali enzimi. Koncentracija dobivene komplementarne DNA (cDNA) određena je Qubit 1.0 fluorimetrom (Invitrogen) i u prosjeku iznosi 1,5 ng $µl^{-1}$. Takva cDNA se može čuvati pri temperaturama od –25 °C do –15 °C najdulje tjedan dana.

Uzorci cDNA, iz prethodnog koraka, umnoženi su na standardoj ploči s 96 mjesta (Applied Biosystems) u uređaju za qPCR (7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems). Reakcijska smjesa ukupnog volumena 20 µl sadrži 10,00 µl otopine 2X TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystem), 7,67 µl destilirane vode bez nukleaza, 1,00 µl 20X TaqMan microRNA Assay (Custom TaqMan Small RNA Assay, Applied Biosystem) koji sadrži TaqMan probu i početnice i 1,33 µl cDNA iz prethodne reverzne transkripcije. Kao endogena kontrola, umnožena je $tRNA^{Lys}$. Uvjeti za qPCR reakcije prikazani su u tablici 7. Dobiveni podatci analizirani su programom LinRegPCR.

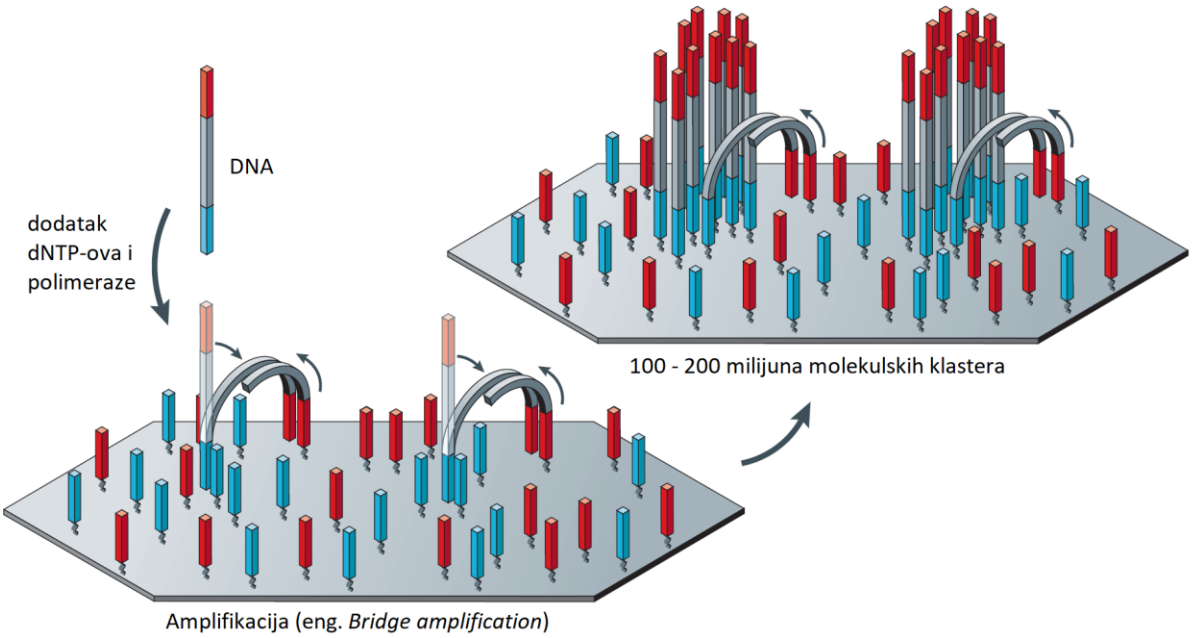
Tablica 7. Uvjeti pri kojima su provedene qPCR reakcije za male RNA.

| | *T*/ °C | trajanje ciklusa | broj ciklusa |
|---|---|---|---|
| **qPCR** | 50 | 2 min | 1 |
| | 95 | 10 min | 1 |
| | 95 | 15 s | 40 |
| | 60 | 1 min | |

*3.2.10. Analiza sekvenciranih cDNA knjižnica (RNA-seq)*

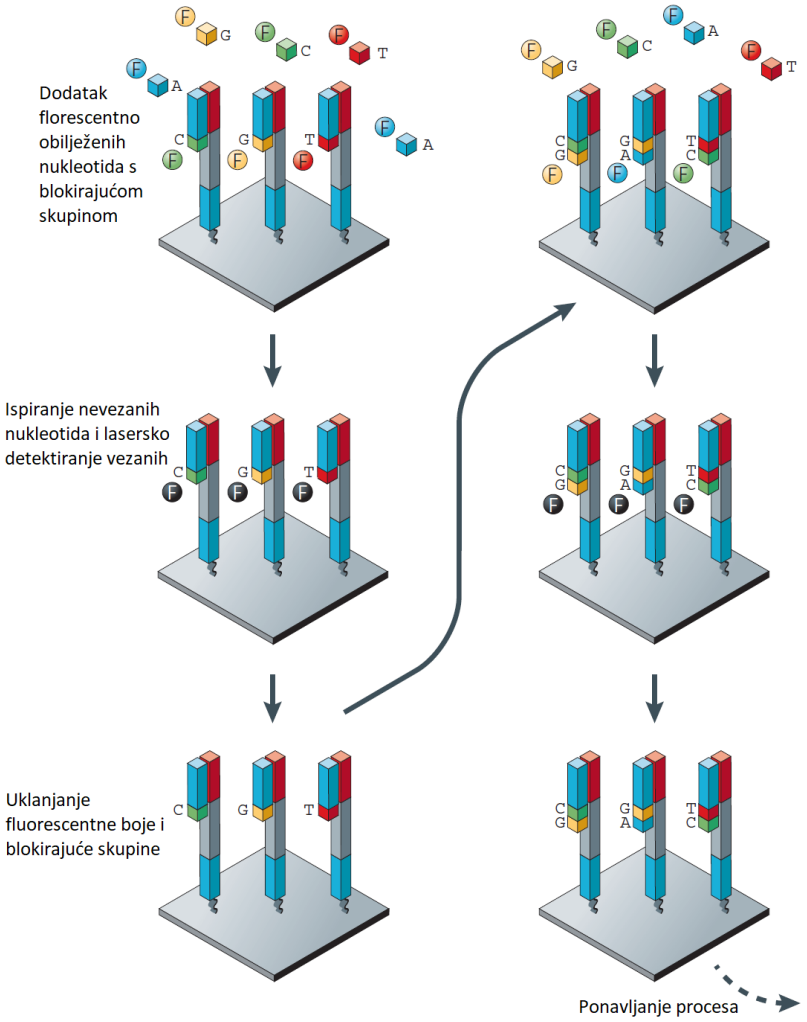
Metode nove generacije (engl. *Next Generation Sequencing*, NGS) koriste se za sekvenciranje RNA (*RNA-Seq*) i određivanje količine transkriptoma u uzorku, čime omogućuju precizniju i osjetljiviju analizu genske ekspresije.[45] Trenutno najraširenija metoda sekvenciranja je

Illumina metoda koja se temelji na umnažanju DNA fragmenata na staklenoj ploči (engl. *Bridge amplification*) i reverzibilnom zaustavljanju sinteze.[46] Prvi korak sekvenciranja RNA je izolacija ukupne RNA. RNA se fragmentira jer većina platformi za sekvenciranje zahtijeva relativno kratke molekule od 200 do 500 nukleotida. Reverznom transkripcijom molekula RNA sintetiziraju se jednolančane cDNA s ukosnicom na 3'-kraju koja služi kao početnica za sintezu dvolančanih cDNA. Na oba kraja molekula cDNA ligiraju se adapteri i produkti se umnože PCR-om. Nakon pripreme cDNA knjižnice, slijedi sekvenciranje sintezom (engl. *Sequencing-by-synthesis*) na staklenoj ploči. Fragmenti mogu biti sekvencirani s jednog (engl. *Single End Sequencing*, SE) ili oba kraja (engl. *Paired End Sequencing*, PE). Staklena ploča sadrži imobilizirane oligonukleotide komplementarne adapterima na cDNA. Nakon vezanja, cDNA na ploči se umnaža i stvaraju se klasteri identičnih molekula (slika 7).[47]




Slika 7. Illumina pločica za amplifikaciju DNA i stvaranje klastera identičnih molekula.[48]

Sekvenciranje započinje dodatkom početnica za sekvenciranje na koje se veže polimeraza. Dodaju se nukleotidi koji su obilježeni fluorescentnom bojom koja je različita za svaki tip nukleotida i s blokirajućom skupinom na 3'-kraju koja onemogućuje daljnju sintezu. U svakom koraku sinteze, samo se jedan nukleotid veže na rastući komplementarni lanac, nakon čega se ostatak nukleotida ispere kako bi se vezani nukleotid mogao identificirati laserom. Fluorescentna boja i blokirajuća skupina se zatim uklanjaju s nukleotida, nakon čega se ponovno dodaju obilježeni nukleotidi i proces se ponavlja (slika8).




Slika 8. Metoda sekvenciranja sintezom (engl. *Sequencing-by-sythesis*) koja koristi nukleotide obilježene različitim fluorescentnim bojama i s blokirajućim skupinama.[48]

Rezultat ove metode je serija slika na kojima osvijetljene točke označavaju položaj klastera, a boja klastera tip nukleotida (slika 9). Analiziranjem rezultata dobiva se slijed nukleotida za svaki klaster, očitanje (engl. *read*).

Slika 9. Serija slika koja je rezultat sekvenciranja RNA. Analizom ovih slika dobije se nukleotidni slijed i položaj klastera. [48]

Sekvencirane cDNA knjižnice preuzete su iz baze NCBI SRA i korištene su za analizu ekspresije satelitskih DNA nakon stresa. Preuzeti podatci učitani su na *UseGalaxy* server (https://usegalaxy.org/) koji objedinjuje većinu programa koji se najčešće koriste u bioinformatičkim analizama. U ovom su radu korištene dvije metode za normalizaciju podataka sekvenciranja, *RPKM* (engl. *Reads Per Kilobase per Million*) za SE sekvencirane knjižnice ili *FPKM* (engl. *Fragments Per Kilobase per Million*) za PE sekvencirane knjižnice i metoda za testiranje diferencijalne ekspresije koja koristi negativnu binomnu raspodjelu.

Program *Bowtie2*[49,50] korišten je za mapiranje očitanja u FASTQ formatu na satelitske DNA organizma iz kojeg su sekvencirane knjižnice. Naznačeno je radi li se o podatcima sekvenciranja s oba kraja ili jednog kraja cDNA. Dozvoljen broj neslaganja (engl. *mismatch*) prilikom mapiranja sekvenci na genom postavio se na 1 kako bi se povećala osjetljivost mapiranja. Izabrana je opcija izvještavanja -a u kojoj program mapira očitanja na sva moguća mjesta na nukleotidni slijed. Ostali parametri bili su zadani. Program, kao rezultat, daje podatke u SAM (engl. *Sequence Alignment/Map*) ili BAM (engl. *Binary Alignment/Map*) formatu u kojima su opisana sva očitanja mapirana na satelitsku DNA. SAM datoteka komprimira se u BAM kako bi se smanjila veličina datoteke i olakšao pristup podatcima. Programom *Stats* iz *SAMTools* alata određena je veličina knjižnice i broj mapiranih očitanja. Kod analize PE sekvenciranih knjižnica, koristila se opcija f2 (engl. *Read is mapped in a proper pair*) kako bi se prebrojala očitanja koja su mapirana na satelitsku DNA i pravilno sparena. Kod analize SE sekvenciranih knjižnica koristila se opcija F4 (engl. *Read is unmapped*) koja isključuje očitanja koja nisu mapirana. Ostale postavke bile su zadane. *RPKM* i *FPKM* vrijednosti izračunate su prema formulama za svaki uzorak:

$$RPKM = \frac{R \times 10^6}{L \times N} \tag{4}$$

$$FPKM = \frac{RPKM}{2} \tag{5}$$

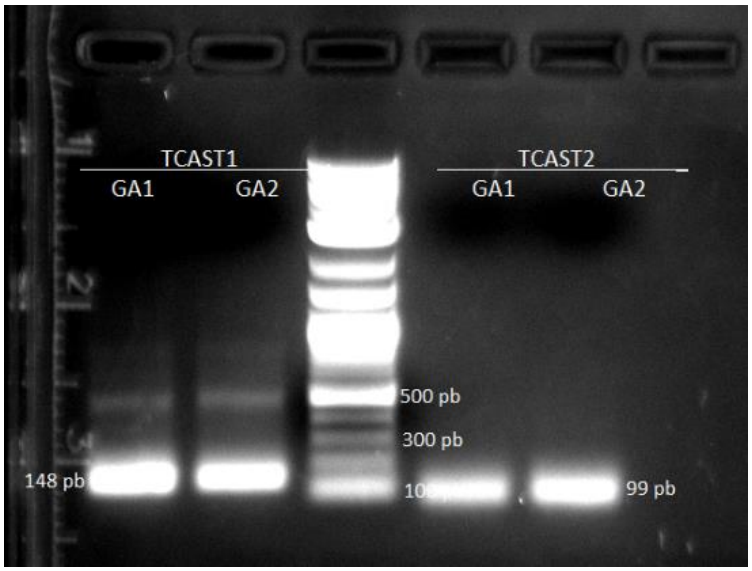
*R* predstavlja broj mapiranih očitanja, *L* veličinu knjižnice, a *N* veličinu dijela DNA na koji se očitanja mapiraju u kilobazama. Uspoređene su vrijednosti *RPKM* i *FPKM* uzoraka koji su bili pod stresom i uzoraka kontrole kako bi se izračunala promjena ekspresije satelitske DNA u uvjetima stresa.

Program *Kallisto quant*[51] korišten je za pseudoporavnavanje očitanja na transkriptom organizma iz kojeg su očitanja. Pseudoporavnavanje povezuje očitanja s transkriptomom puno brže od klasičnog poravnavanja, a zadržava informacije ključne za usporedbu genske ekspresije. U program se učitaju podatci sekvenciranih knjižnica u FASTQ formatu i transkriptom organizma s dodanim nukleotidnim sljedovima satelitskih DNA na koji se poravnavaju očitanja. Naznači se radi li se o SE ili PE sekvenciranju. Ostali parametri bili su zadani. Za određivanje genske ekspresije, rezultati pseudoporavnavanja učitani su u program *DESeq2*[52]. Odabrano je da su ulazni podatci TPM (engl. *Transcripts Per Million*) iz programa *Kallisto,* a format mapiranih gena bio je Transcript-ID. Ostali parametri su zadani. Kao rezultat dobije se tablica s promjenama ekspresije svih transkripata u organizmu.

# 4. REZULTATI

## 4.1. Satelitska DNA u brašnaru *Tribolium castaneum*

Postojanje satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2 u sojevima brašnara GA1 i GA2 dokazano je umnažanjem tih satelitskih DNA PCR-om, korištenjem specifičnih početnica. Rezultat elektroforeze u gelu prikazan je na slici 10.



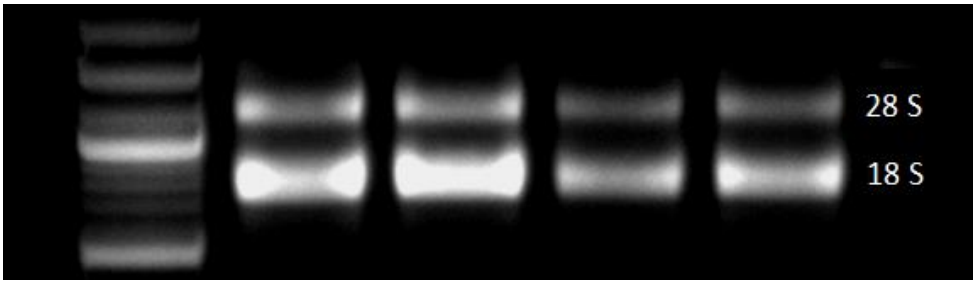

Slika 10. Satelitske DNA TCAST1 i TCAST2 u sojevima brašnara GA1 i GA2.

Na gelu su vidljive intenzivne linije koje odgovaraju monomerima satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2 u oba soja. Osim monomera, vidljivi su i trimeri TCAST1 satelitskih DNA.

## 4.2. Utjecaj hladnog stresa na ekspresiju satelitske DNA

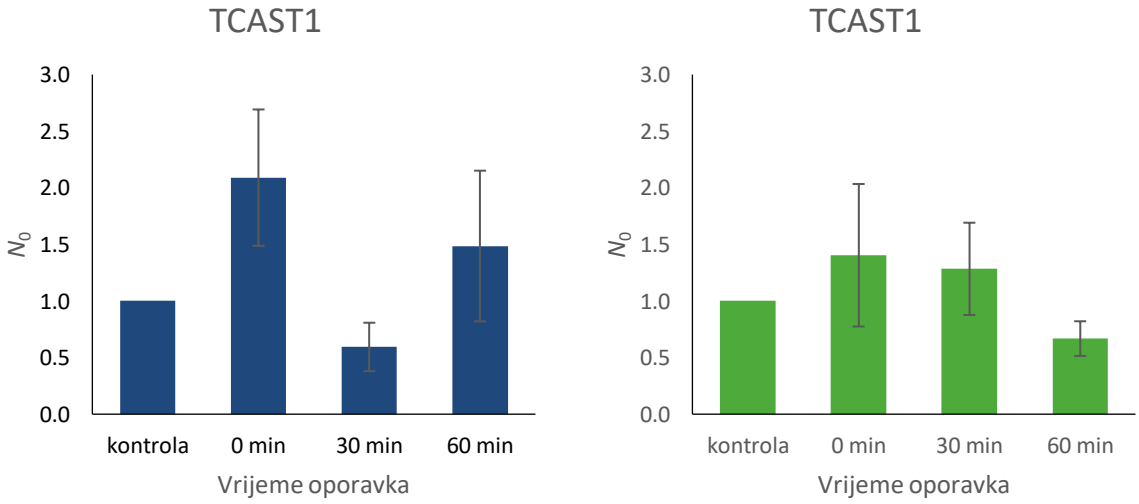
### *4.2.1. Ekspresija satelitske DNA u brašnaru Tribolium castaneum nakon hladnog stresa*

RNA molekule su vrlo osjetljive na prisutnost RNaza koje ih degradiraju. Za reverznu transkripciju i qPCR koristi se očuvana, nedegradirana RNA. Očuvanost RNA provjeravala se elektroforezom u gelu. Djelomično degradirana RNA ne pokazuje jasne linije, dok nedegradirana RNA pokazuje 2 linije koje odgovaraju 28 S i 18 S rRNA (slika 11).



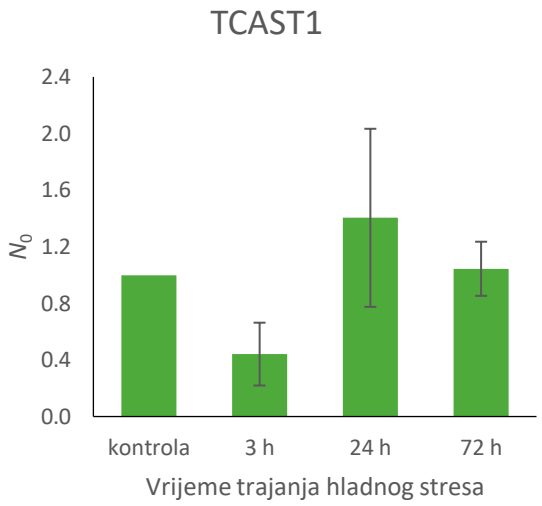

Slika 11. Agarozni gel nakon elektroforeze nedegradirane ukupne RNA. Na gelu su jasno vidljive linije koje odgovaraju 28 S i 18 S rRNA.

U sojevima GA1 i 55 analizirana je promjena ekspresije satelitske DNA TCAST1 odmah nakon izlaganja hladnome stresu u trajanju od 24 h, te nakon oporavka od stresa od 30 i 60 minuta pri sobnoj temperaturi (slika 12). Soj GA1 bio je izložen temperaturi od 6 °C. Pri toj temperaturi, brašnari usporavaju svoje kretanje i metabolizam i padaju u hladnu komu (engl. *chill coma*).[53] Vrijeme oporavka od hladnog stresa mjerilo se nakon što su se svi brašnari probudili iz kome, za što je bilo potrebno otprilike 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Soj 55 bio je izložen hladnom stresu pri temperaturi od 15 °C pri kojoj nije dolazilo do kome. U oba slučaja, ekspresija TCAST1 nakon hladnog stresa u usporedbi s kontrolom nije se statistički značajno mijenjala. Ekspresija je bila najviša odmah nakon hladnog stresa, bez vremena oporavka. U soju GA1 povećana je za oko 2 puta, a u soju 55 1,5 puta u usporedbi s kontrolom.



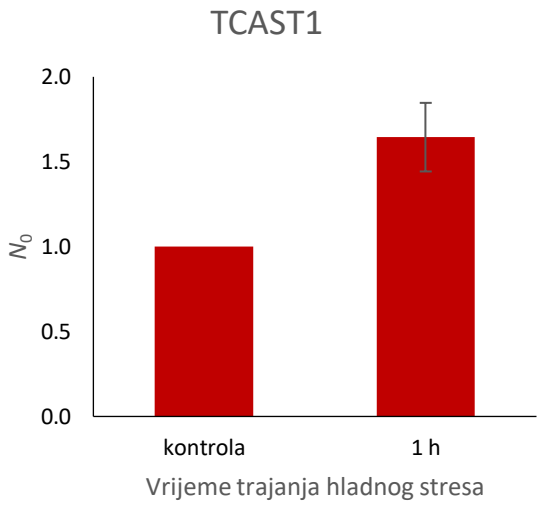

Slika 12. Ekspresija satelitske DNA nakon izlaganja hladnom stresu u trajanju od 24 h pri temperaturama od 6 °C u soju GA1 (plavo) i 15 °C u soju 55 (zeleno). Ekspresija je mjerena odmah nakon izlaganja stresu i nakon 30 i 60 minuta oporavka na sobnoj temperaturi. Kontrola predstavlja brašnare koji nisu bili izloženi hladnom stresu.

U soju 55 provjerena je ovisnost ekspresije satelitske DNA o trajanju hladnoga stresa pri temperaturi od 15 °C, bez vremena oporavka (slika 13). Nakon kratkog hladnog stresa od 3 h, ekspresija se neznatno smanjila u usporedbi s kontrolom. Dulji hladni stresovi od 24 h i 72 h nisu doveli do značajnog povećanja ekspresije TCAST1.



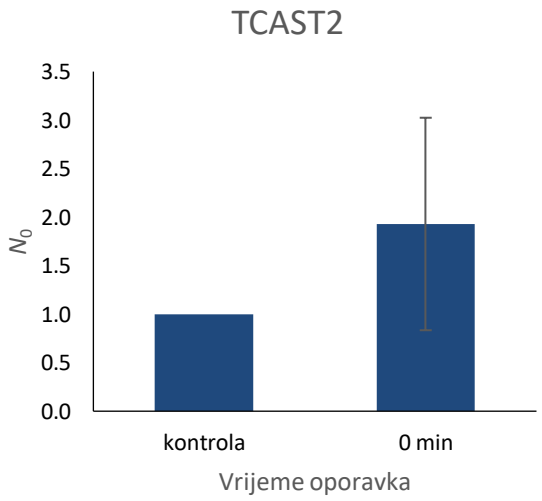

Slika 13. Ekspresija satelitske DNA TCAST1 u soju 55 nakon izlaganja hladnome stresu na temperaturi od 15 °C u trajanjima od 3 h, 24 h i 72 h. Kontrola predstavlja brašnare koji nisu bili izloženi hladnom stresu.

Analiziran je utjecaj kratkog hladnog stresa od 1 h na temperaturi od 6 °C u soju GA2 na ekspresiju TCAST1 nakon buđenja brašnara iz hladne kome (slika 14). Ekspresija TCAST1 nakon hladnog stresa nije značajno porasla.




Slika 14. Ekspresija satelitske DNA TCAST1 u soju GA2 nakon izlaganja hladnom stresu u trajanju od 1 h na temperaturi od 6 °C. Kontrola predstavlja brašnare koji nisu bili izloženi hladnom stresu.

Promjena ekspresije satelitske DNA TCAST2 nakon hladnog stresa analizirana je u soju GA1. Hladni stres se provodio u trajanju od 24 h na temperaturi od 6 °C, a ekspresija se mjerila nakon što su se brašnari probudili iz kome. Ekspresija TCAST2 nakon hladnog stresa nije se statistički značajno promijenila u usporedbi s kontrolom (slika 15).

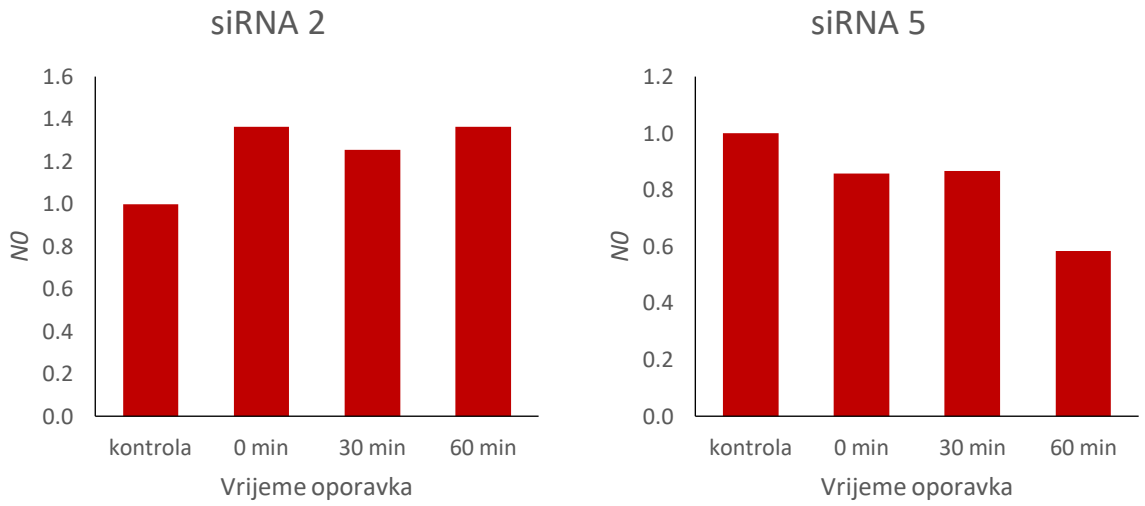



Slika 15. Ekspresija satelitske DNA TCAST2 u soju GA1 nakon što su brašnari bili izloženi hladnom stresu u trajanju od 24 h na temperaturi od 6 °C. Kontrola predstavlja brašnare koji nisu bili izloženi hladnom stresu.

*4.2.2. Ekspresija molekula siRNA u brašnaru Tribolium castaneum nakon hladnog stresa*

Ekspresijom satelitske DNA u brašnaru *T. castaneum*, dolazi do nastanka molekula siRNA duljine 21-30 nukleotida za koje se pokazalo da utječu na epigenetsko stanje heterokromatina brašnaru i mogu se ponašati kao posrednici reorganizacije heterokromatina kada je organizam izložen temperaturnom stresu.[4]

Analizirana je ekspresija molekula siRNA2 i siRNA5 koje potječu od satelitske DNA TCAST1 nakon hladnog stresa u soju GA2. Hladni stres se provodio u trajanju od 24 h na temperaturi od 15 °C, a ekspresija je mjerena odmah nakon stresa i nakon oporavka od stresa od 30 i 60 minuta (slika 16). Ekspresija molekula siRNA2 i siRNA5 nakon hladnog stresa nije se značajno promijenila u usporedbi s kontrolom.




Slika 16. Ekspresija molekula siRNA koje potječu od satelitske DNA TCAST1 u soju GA2 nakon izlaganja hladnom stresu u trajanju od 24 h na temperaturi od 15 °C. Kontrola predstavlja brašnare koji nisu bili izloženi hladnom stresu.

*4.2.3. Ekspresije satDNA 1.688 u vinskoj mušici D. melanogaster*

Bioinformatičkom analizom rezultata sekvenciranja RNA koji su javno dostupni, analizirana je ekspresija ponavljajućeg nukleotidnog slijeda duljine 353 pb satelitske DNA 1.688 u vinskoj mušici *D. melanogaster* nakon hladnog stresa na temperaturi od 0 °C. Korišteno je 8 sojeva mušica od kojih 4 potječu iz Europe i 4 iz Afrike. Kratki hladni stres trajao je u vremenu od 3,5 h bez vremena oporavka, a dulji hladni stres 7 h s vremenima oporavka od 3,5 h i 7 h.[54] Rezultati analize prikazani su u tablici 8 . Niti u jednom soju mušice nije opažena značajnija promjena ekspresije satelitske DNA, neovisno o trajanju hladnog stresa i o vremenima oporavka.

Tablica 8. Promjena ekspresije ponavljajućeg nukleotidnog slijeda duljine 353 pb satelitske DNA 1.688 u vinskoj mušici *D. melanogaster* u ovisnosti o vremenu oporavka (0, 15 i 90 minuta) nakon hladnog stresa (3,5 i 7 sati u ledenoj kupelji na temperaturi od 0 °C). Eksperiment je proveden na 8 sojeva vinske mušice *D. melanogaster*. Kontrola predstavlja mušice koje su bile na sobnoj temperaturi.

| | Soj | $t_{\text{hladni stres}}$ / h | $t_{\text{oporavak}}$ / min | Promjena (*DESeq2*) | p-vrijednost |
|---|---|---|---|---|---|
| Afrika | A157 | 3,5 | 0 | 0,99 | 5,96E-01 |
| | | 7 | 15 | 1,03 | 6,36E-01 |
| | | 7 | 90 | 0,93 | 7,57E-01 |
| | ZI197 | 3,5 | 0 | 1,03 | 4,76E-01 |
| | | 7 | 15 | 1,06 | 4,18E-01 |
| | | 7 | 90 | 1,11 | 6,32E-01 |
| | ZI216 | 3,5 | 0 | 1,01 | 7,69E-01 |
| | | 7 | 15 | 1,05 | 4,01E-01 |
| | | 7 | 90 | 1,15 | 4,92E-01 |
| | ZI418 | 3,5 | 0 | 1,02 | 5,81E-01 |
| | | 7 | 15 | 1,10 | 2,64E-01 |
| | | 7 | 90 | 1,39 | 1,25E-01 |
| Europa | E14 | 3,5 | 0 | 1,03 | 7,19E-01 |
| | | 7 | 15 | 1,01 | 9,61E-01 |
| | | 7 | 90 | 1,10 | 6,39E-01 |
| | SU07 | 3,5 | 0 | 0,92 | 3,14E-01 |
| | | 7 | 15 | 0,92 | 4,89E-01 |
| | | 7 | 90 | 0,86 | 4,69E-01 |
| | SU08 | 3,5 | 0 | 0,98 | 6,41E-01 |
| | | 7 | 15 | 1,01 | 8,91E-01 |
| | | 7 | 90 | 0,89 | 5,73E-01 |
| | SU58 | 3,5 | 0 | 1,02 | 3,23E-01 |
| | | 7 | 15 | 1,13 | 1,72E-01 |
| | | 7 | 90 | 1,05 | 7,89E-01 |

## 4.3. Utjecaj baterijske infekcije na ekspresiju satelitske DNA

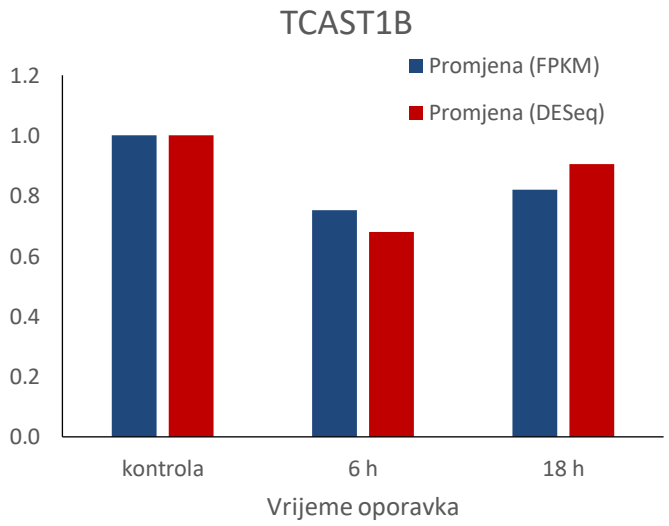
### *4.3.1. Ekspresija satelitskih DNA u brašnaru Tribolium castaneum nakon infekcije*

Analizirana je promjena ekspresije satelitskih DNA TCAST1B i TCAST2A u soju Cro1 nakon infekcije bakterijom *Bacillus thuringiensis* (*Btt*) iz javno dostupnih podataka sekvenciranja RNA.[55] Korištene su dvije metode normalizacije podataka sekvenciranja: FPKM i metoda koja koristi negativnu binomnu raspodjelu (program *DESeq2*). Objema metodama dobiveni su slični rezultati.

Brašnari su inficirani hranjenjem (oralno) na inficiranoj podlozi i ubodom iglom. Promjena se mjerila 6 h i 18 h nakon infekcije. Rezultati su prikazani u tablici 9. Ekspresija TCAST2A u svim eksperimentima ostala je približno jednaka kao ekspresija u kontroli. Najveća promjena ekspresije TCAST1B bila je 6 h nakon oralne infekcije kada se smanjila za otprilike 1,5 puta u usporedbi s kontrolom (slika 17).

Tablica 9. Promjena ekspresije satelitskih DNA TCAST1B i TCAST2A u soju Cro1 6 sati i 18 sati nakon infekcije bakterijom *B. thuringiensis* (*Btt*). Kontrola predstavlja brašnare koji su se hranili na podlozi koja nije inficirana i brašnare koji su ubodeni sterilnom iglom.

| SatDNA | Infekcija | $t_{\text{nakon infekcije}}$ | Promjena (*DESeq2*) | p-vrijednost | Promjena (FPKM) |
|---|---|---|---|---|---|
| TCAST1B | Oralna | 6 h | **0,6800** | 4,47E-02 | 0,7527 |
| | | 18 h | 0,9059 | 5,41E-01 | 0,8205 |
| | Ubod iglom | 6 h | 1,1370 | 3,59E-01 | 1,1067 |
| | | 18 h | 1,0436 | 7,34E-01 | 1,1355 |
| TCAST2A | Oralna | 6 h | 0,9596 | 7,31E-01 | 0,9666 |
| | | 18 h | 0,8473 | 3,16E-01 | 0,7273 |
| | Ubod iglom | 6 h | 1,0839 | 4,04E-01 | 0,8784 |
| | | 18 h | 1,1582 | 9,19E-02 | 1,1808 |

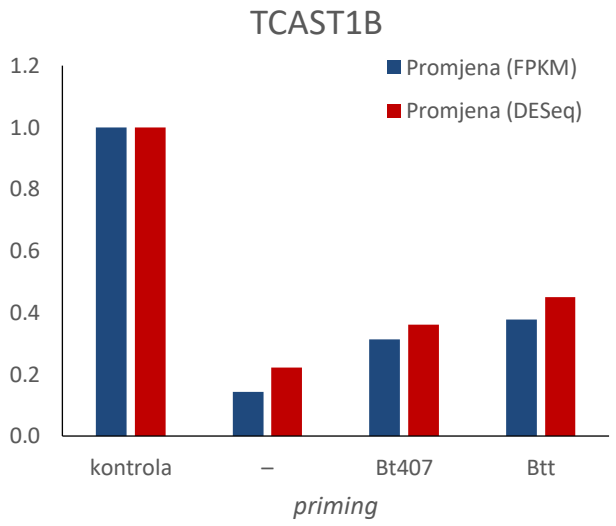



Slika 17. Promjena ekspresije satelitske DNA TCAST1B u soju Cro1 6 h i 18 h nakon oralne infekcije bakterijom *B. thuringiensis* (*Btt*). Kontrola predstavlja brašnare koji nisu inficirani.

Analizirana je i promjena ekspresije satelitskih DNA nakon infekcije bakterijom *B. thuringiensis* (*Btt*) u ovisnosti o prethodnoj izloženosti infekciji (engl. *priming*).[56] Korištena su dva soja bakterije *B. thuringiensis*: patogeni soj *Btt* i nepatogeni soj *Bt407*. Rezultati analize prikazani su u tablici 10. Ekspresija satelitske DNA TCAST1B nakon infekcije bakterijom *Btt* smanjena je u usporedbi s kontrolom. U slučaju kada nije bilo prethodne infekcije, ekspresija se smanjila oko 5 puta. U slučaju prethodne infekcije nepatogenim sojem *Bt407* smanjila se nešto manje, otprilike 3 puta, a u slučaju prethodne infekcije patogenim sojem *Btt* smanjila se najmanje, za otprilike 2 puta (slika 18). Ekspresija satelitske DNA TCAST2A nije se mijenjala u usporedbi s kontrolom u svim eksperimentima.

Tablica 10. Promjena ekspresije satelitskih DNA TCAST1B i TCAST2A u soju Cro1 6h nakon oralne infekcije bakterijom *B. thuringiensis* (*Btt*) u ovisnosti o prethodnoj izloženosti brašnara infekciji (*priming*). Brašnari su prethodno inficirani patogenim sojem *Btt* ili nepatogenim sojem *Bt407*. – označava uzorke koji nisu prethodno inficirani. Kontrola predstavlja brašnare koji se nisu hranili na podlozi inficiranoj bakterijom *Btt*.

| SatDNA | *Priming* | Infekcija | Promjena (*DESeq2*) | p-vrijednost | Promjena (FPKM) |
|---|---|---|---|---|---|
| TCAST1B | – | *Btt* | **0,22** | 1,01E-10 | 0,14 |
| | *Bt407* | *Btt* | **0,36** | 7,60E-10 | 0,31 |
| | *Btt* | *Btt* | **0,45** | 2,79E-07 | 0,38 |
| TCAST2A | – | *Btt* | 0,80 | 1,47E-01 | 0,90 |
| | *Bt407* | *Btt* | 0,93 | 7,49E-01 | 1,00 |
| | *Btt* | *Btt* | 0,92 | 8,58E-01 | 1,01 |




Slika 18. Promjena ekspresije satelitske DNA TCAST1B u soju Cro1 6 h nakon oralne infekcije bakterijom *B. thuringiensis* (*Btt*) u ovisnosti o prethodnoj infekciji (*priming*). Brašnari su prethodno inficirani patogenim sojem *Btt* ili nepatogenim sojem *Bt407*. – označava uzorke koji nisu prethodno inficirani. Kontrola predstavlja brašnare koji nisu inficirani.

*4.3.2. Ekspresija satDNA 1.688 u vinskoj mušici Drosophila melanogaster nakon infekcije*

Pomoću javno dostupnih podataka sekvenciranje RNA, analizirana je promjena ekspresije satelitske DNA 1.688 u vinskoj mušici *D. melanogaster* nakon bakterijske infekcije.[57] Mušice su inficirane raznim bakterijskim sojevima, od kojih su najmanje patogene *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* i *Micrococcus luteus* koje ubijaju oko 10 % mušica. Srednje patogene bakterije su *Pectinobacterium carotovora 15*, *Providencia rettgeri* i *Enterococcus faecalis* koje uzrokuju smrtnost u 15–55 % slučajeva. Najpatogenije bakterije su *Staphylococcus aureus*, *Providencia sneebia*, soj Db11 *Serratia marcescens* i *Pseudomonas entomophila* koje uzrokuju smrtnost u 100 % slučajeva u manje od 96 h. Kontrole predstavljaju mušice koje nisu bile inficirane, mušice koje su bile ubodene sterilnom iglom i mušice kojima su injektirane ubijene bakterije *E. faecalis* i *P. rettgeri*. Kontrole su različite kako bi se razlikovao utjecaj infekcije, od utjecaja ranjavanja iglom ili utjecaja nekih inertnih bakterijskih komponenti. Analizirana je promjena ekspresije ponavljajućih sljedova duljine 353, 359 i 260 pb satelitske DNA 1.688. Za sve ponavljajuće sljedove rezultati su bili jednaki. Rezultati su prikazani u tablicama 11, 12 i 13. Vidljivo je da se ekspresija satelitske DNA

1.688 u nekim slučajevima smanjuje, ali ne značajno, a u većini slučajeva ostaje nepromijenjena u usporedbi s kontrolama.

Tablica 11. Promjena ekspresije satelitske DNA 1.688 vinske mušice *D. melanogaster* 12, 36 i 132 sata nakon infekcije različitim vrstama bakterija. Kontrola predstavlja mušice koje nisu inficirane.

| Kontrola | Infekcija | $t_{\text{nakon infekcije}}$ / h | Promjena (RPKM) | p-vrijednost |
|---|---|---|---|---|
| Neinficirani | *E. coli* | 12 | 0.66 | 1.00E-01 |
| | | 36 | 0.60 | 1.90E-01 |
| | | 132 | 1.03 | 7.88E-03 |
| | *S. marcescens* | 12 | 0.80 | 2.32E-01 |
| | | 36 | 0.94 | 2.11E-01 |
| | | 132 | 1.10 | 2.05E-01 |
| | *M. luteus* | 12 | 0.83 | 2.66E-01 |
| | | 36 | 0.57 | 2.01E-01 |
| | | 132 | 1.00 | 2.68E-01 |
| | *P. carotovora Ecc15* | 12 | 1.11 | 4.49E-01 |
| | | 36 | 0.79 | 4.53E-01 |
| | | 132 | 1.28 | 4.64E-01 |
| | *P. rettgeri* | 12 | 0.87 | 2.18E-01 |
| | | 36 | 1.27 | 8.36E-02 |
| | | 132 | 0.97 | 1.43E-01 |
| | *E. faecalis* | 12 | 0.76 | 2.02E-01 |
| | | 36 | 0.73 | 1.44E-01 |
| | | 132 | 0.64 | 7.79E-02 |
| | *S. aureus* | 12 | 0.65 | 1.20E-01 |
| | *P. sneebia* | 12 | 0.95 | 1.93E-01 |
| | *S. marcescens Db11* | 12 | 1.09 | 3.72E-01 |
| | *P. entomophilia* | 12 | 0.64 | 1.25E-01 |

Tablica 12. Promjena ekspresije satelitske DNA 1.688 vinske mušice *D. melanogaster* 12, 36 i 132 sata nakon infekcije različitim vrstama bakterija. Kontrola predstavlja mušice koje su ubodene sterilnom iglom.

| Kontrola | Infekcija | $t_{\text{nakon infekcije}}$ / h | Promjena (RPKM) | p-vrijednost |
|---|---|---|---|---|
| Sterilna igla | *E. coli* | 12 | **0,73** | 2.51E-02 |
| | | 36 | 0,44 | 6.15E-02 |
| | | 132 | 0,93 | 3.94E-01 |
| | *S. marcescens* | 12 | 0,90 | 4.21E-01 |
| | | 36 | **0,69** | 1.48E-02 |
| | | 132 | 1,00 | 4.99E-01 |
| | *M. luteus* | 12 | 0,92 | 3.85E-01 |
| | | 36 | 0,42 | 6.59E-02 |
| | | 132 | 0,91 | 4.07E-01 |
| | *P. carotovora Ecc15* | 12 | 1,24 | 2.10E-01 |
| | | 36 | 0,58 | 1.72E-01 |
| | | 132 | 1,16 | 3.40E-01 |
| | *P. rettgeri* | 12 | 0,97 | 4.22E-01 |
| | | 36 | 0,93 | 4.13E-01 |
| | | 132 | 0,88 | 3.01E-01 |
| | *E. faecalis* | 12 | 0,84 | 3.27E-01 |
| | | 36 | **0,53** | 3.96E-02 |
| | | 132 | 0,58 | 7.22E-02 |
| | *S. aureus* | 12 | 0,72 | 2.95E-01 |
| | *P. sneebia* | 12 | 0,70 | 2.35E-01 |
| | *S. marcescens Db11* | 12 | 0,98 | 2.20E-01 |
| | *P. entomophilia* | 12 | 0,71 | 1.38E-01 |

Tablica 13. Promjena ekspresije satelitske DNA 1.688 vinske mušice *D. melanogaster* 12, 36 i 132 sata nakon infekcije različitim vrstama bakterija. Kontrola predstavlja mušice koje su cijepljene prethodno ubijenim bakterijama *E. faecalis* i *P. rettgeri*.

| Kontrola | Infekcija | $t_{\text{nakon infekcije}}$ / h | Promjena (RPKM) | p-vrijednost |
|---|---|---|---|---|
| *E. faecalis* heat-killed | *E. faecalis* | 12 | 0.67 | 4.87E-01 |
| | | 36 | 1.37 | 2.62E-01 |
| | | 132 | 0.50 | 3.84E-01 |
| *P. rettgeri* heat-killed | *P. rettgeri* | 12 | 1.02 | 6.17E-02 |
| | | 36 | 1.12 | 2.25E-01 |
| | | 132 | 0.93 | 4.44E-02 |

# 5. RASPRAVA

Heterokromatin je transkripcijski manje pristupačan i inertniji oblik kromatina koji ima vrlo važnu ulogu u čuvanju epigenetskih informacija, utišavanju uzastopno ponavljajućih sljedova DNA, ali i u drugim staničnim procesima, poput organizacije centromera i telomera.[16] Glavno svojstvo heterokromatina je njegova sposobnost da se širi i na taj način utišava ekspresiju gena, neovisno o nukleotidnom slijedu DNA. Sastavni dio heterokromatina je satelitska DNA koja se nalazi u centromernom i pericentromernom području kromatina, u obliku dugih, uzastopno ponavljajućih nukleotidnih sljedova. Vanjski uvjeti, a ponajviše temperaturni stres, mogu značajno utjecati na strukturu heterokromatina, kao i na ekspresiju DNA unutar heterokromatina. Transkripcija satelitske DNA, u biljci *Arabidopsis thaliana*, značajno se poveća nakon izlaganja duljem toplinskom stresu. Povećanje transkripcije je privremeno. Nakon nekoliko dana oporavka od stresa, količina transkripata jednaka je početnoj količini.[58] Aktivaciju transkripcije prati dekondenzacija heterokromatina i gubitak nukleosoma, ali ne dolazi do gubitka epigenetskih biljega poput metilacije histona.[59] Transkripti ljudske satelitske DNA III nisu uočeni u standardnim uvjetima, već samo nakon toplinskog stresa. Transkripcija je bila najviša nakon otprilike 10 sati oporavka od stresa, a nakon 30 sati oporavka, transkripti više nisu bili uočeni.[29] Pretpostavlja se da satelitska DNA ima utjecaj na reorganizaciju heterokromatina i u drugim stresnim uvjetima. U biljci *A. thaliana*, kromatinske promjene koje dovode do promjene ekspresije gena opažene su i nakon hladnog stresa, isušivanja i promjene saliniteta.[39]

U brašnaru *T. castaneum*, glavna satelitska DNA, TCAST1, čini 35% genoma, a sporedna, TCAST2, čini 1% genoma. Prijašnja istraživanja su pokazala da je ekspresija satelitske DNA TCAST1 povećana nakon duljeg izlaganja toplinskom stresu i maksimalna je nakon 1 sata oporavka od stresa. Transkripti satelitske DNA u brašnaru *T. castaneum* prisutni su u jezgri u obliku malih interferirajućih molekula RNA (siRNA) duljine 21-30 nukleotida. Toplinski stres dovodi do značajnog povećanja količine molekula siRNA nastalih od transkripata TCAST, kao i povećanja represivnih epigenetskih biljega na ponavljajućim satelitskih regijama. Pretpostavlja se da molekule siRNA koje potječu od transkripata TCAST sudjeluju u formaciji heterokromatina, slično kao molekule siRNA u kvascu *S. pombe* i mušici *D. melanogaster*.[4]

Za razliku od toplinskog stresa, hladan stres je slabije proučavan i vrlo se malo zna o mehanizmima preživljavanja i oporavka od hladnoga stresa. U ovom je radu eksperimentalno ispitan utjecaj hladnoga stresa na ekspresiju satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2 u brašnaru *T. castaneum*. Pri vrlo niskim temperaturama, insekti ne mogu zadržati mišićni potencijal u stanju mirovanja i padaju u stanje koje se naziva hladna koma (engl. *chill coma*) u kojem živčani i mišićni sustav više nije funkcionalan. Temperatura ispod koje padaju u hladnu komu specifična je za vrstu.[36] Brašnar *T. castaneum* zaustavlja svoje kretanje pri temperaturi nižoj od 8 °C, a pada u hladnu komu pri temperaturi od 6 °C.[60] Ekspresija satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2, nakon hladnog stresa pri temperaturi od 6 °C, pri kojoj brašnari padaju u komu, nije se značajno promijenila. Pri toj temperaturi, brašnari padaju u hladnu komu vrlo brzo i moguće je da dolazi do ukupnog smanjenja transkripcije. Kako bi se isključio utjecaj hladne kome na ekspresiju, ispitan je utjecaj hladnog stresa pri temperaturi od 15 °C, pri kojoj brašnari ne padaju u komu, no ni tada nije došlo do značajne promjene ekspresije. Količina molekula siRNA koje potječu od satelitske DNA TCAST1, također se nije promijenila nakon hladnog stresa, što je i bilo očekivano.

Kod vinske mušice *D. melanogaster*, primijećeno je da osjetljivost na hladnoću ovisi o njenom podrijetlu. Afričkim sojevima mušica potrebno je više vremena kako bi se probudili i oporavili od hladne kome, nego europskim sojevima koji su se prilagodili hladnijim uvjetima. Kako bi se bolje razumjele razlike u osjetljivosti na hladnoću i procesi prilagodbe na različite klimatske uvjete, analizirana je promjena ekspresije različitih gena nakon hladnog stresa pri temperaturi od 0 °C pri kojoj mušice padaju u hladnu komu.[36] Tijekom hladne kome, nisu zabilježene značajne promjene ekspresije gena, vjerojatno zbog velikog smanjenja ukupne transkripcije. Najveća promjena ekspresije gena zabilježena je 90 minuta nakon oporavka od hladnoga stresa i u afričkim i u europskim sojevima. Odgovori afričkih i europskih sojeva na hladni stres vrlo su slični. Nije pronađen niti jedan gen kojemu se ekspresija u jednom soju poveća, a u drugome smanji, no promjena ekspresije većine tih gena je uglavnom veća u afričkim sojevima.[54] Bioinformatičkom analizom ispitan je mogući utjecaj glavne satelitske DNA 1.688 u mušici *D. melanogaster* na oporavak od hladnoga stresa. Ispitana je promjena ekspresije ponavljajućeg slijeda duljine 353 parova baza nakon hladnog stresa. Ekspresija se nije značajno promijenila niti u jednom soju mušice, od Afrike do Europe. Može se zaključiti da satelitska DNA 1.688 nema ulogu u oporavku mušice od hladnoga stresa, niti u prilagodbi europskih sojeva na hladnoću.

Osim abiotičkih stresora, organizmi u prirodi izloženi su virusima, bakterijama i ostalim patogenima koji pokreću obrambene mehanizme i različitu ekspresiju gena. Patogeni mikroorganizmi su razvili brojne strategije koje im omogućuju preživljavanje u stanicama domaćina, unatoč njihovom imunološkom sustavu. Istraživanja su pokazala da strategije koje bakterija koristi kako bi preživjela unutar stanica domaćina uključuju i epigenetske promjene kromatina, odnosno utječu na proteine koji reguliraju acetilaciju i deacetilaciju histona.[61]

Brašnar *T. castaneum* i bakterija *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) često se koriste za proučavanje interakcija domaćina i patogena, odnosno proučavanje mehanizama kojim bakterija napada domaćina i mehanizama na koji se domaćin brani od bakterijske infekcije.[62] Bakterija *B. thuringiensis* je gram pozitivna bakterija koja proizvodi Cry toksine koji su glavni uzročnici smrtnosti insekata nakon infekcije, najčešće oralne.[63] Bakterija *B. thuringiensis* bv. *Tenebrionis* (*Btt*) uzrokuje visoku stopu smrtnosti brašnara *T. castaneum* nakon oralne infekcije.[62] No, bakterije *Btt* mogu zaraziti i usmrtiti brašnara i putem uboda, preko rane.[55] Različiti načini infekcije dovode do različitog odgovora domaćina na infekciju, odnosno do različite ekspresije gena koji sudjeluju u obrani domaćina od infekcije. U brašnaru *T. castaneum* uspoređena je ekspresija gena nakon oralne infekcije bakterijom *Btt* i nakon infekcije ubodom. Rezultati su pokazali iznenađujuće veliku razliku između ekspresijskih profila, koji ovise o načinu infekcije.[55] Različiti sojevi brašnara pokazuju veće fenotipske i genotipske razlike u odgovorima na oralnu infekciju, nego na sistemsku infekciju, što upućuje na to da su se evolucijski brže prilagođavaju oralnim, nego sistemskim infekcijama.[55] Ranije se smatralo da samo kralježnjaci mogu imati stečenu imunost, dok beskralježnjaci imaju samo prirođenu imunost. No, sve je više dokaza kako različite vrste beskralježnjaka brže i bolje odgovaraju na patogene ako su nekad prije toga bili njima izloženi.[56] U brašnaru *T. castaneum* odgovori na infekciju bakterijom *B. thuringiensis* (*Btt*) ovisni su o prethodnoj infekciji i mnogo se razlikuju u slučajevima kada je brašnar prethodno izložen patogenom soju *Btt*, nepatogenom soju *Bt407* i kada nije prethodno izložen infekciji.[56] Bioinformatičkom analizom ispitan je utjecaj infekcije bakterijom *B. thuringiensis* (*Btt*) na ekspresiju satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2 u soju Cro1 brašnara *T. castaneum*. Ekspresija je analizirana 6 sati nakon infekcije, kada je zabilježena vrlo visoka promjena ekspresije gena i 18 sati nakon infekcije. Ekspresija TCAST2 ne mijenja se u usporedbi s kontrolom niti nakon oralne, niti nakon sistemske infekcije. Ekspresija TCAST1 različita je ovisno o načinu infekcije. Poslije sistemske infekcije nije zabilježena promjena ni nakon 6

sati, ni nakon 18 sati oporavka. 6 sati nakon oralne infekcije, ekspresija TCAST1 smanjila se u usporedbi s kontrolom, a 18 sati nakon infekcije, ponovno je bila jednaka kontroli. Nakon toga, analiziran je utjecaj prethodne infekcije na ekspresiju TCAST1 i TCAST2 6 sati nakon oralne infekcije bakterijom *B. thuringiensis* (*Btt*). Ekspresija TCAST2 ne mijenja se nakon infekcije bakterijom. Ekspresija TCAST1 6 sati nakon infekcije bakterijom *B. thuringiensis* (*Btt*) bila je smanjena i to ovisno o prethodnoj izloženosti infekciji. Najveće smanjenje je u slučaju kada nema prethodne izloženosti infekciji, a najmanje kada je prethodno izložena patogenom soju *Btt*.

U mušici *D. melanogaster*, ispitan je utjecaj infekcije različitim bakterijama na gensku ekspresiju i pokazalo se da je odgovor mušice na infekciju visoko specifičan i ovisan o vrsti bakterije koja ga napada.[57] Ispitan je utjecaj 10 bakterija od kojih su najmanje patogene *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* i *Micrococcus luteus* koje ubijaju oko 10 % mušica. Srednje patogene bakterije su *Pectinobacterium carotovora 15*, *Providencia rettgeri* i *Enterococcus faecalis* koje uzrokuju smrtnost u 15–55 % slučajeva. Najpatogenije bakterije su *Staphylococcus aureus*, *Providencia sneebia*, soj Db11 *Serratia marcescens* i *Pseudomonas entomophila* koje uzrokuju smrtnost u 100 % slučajeva u manje od 96 h. Kontrole predstavljaju mušice koje nisu bile inficirane, mušice koje su bile ubodene sterilnom iglom i mušice kojima su injektirane ubijene bakterije *E. faecalis* i *P. rettgeri*. Kontrole su različite kako bi se razlikovao utjecaj infekcije, od utjecaja ranjavanja iglom ili utjecaja nekih inertnih bakterijskih komponenti. Bioinformatičkom analizom ispitan je utjecaj infekcije na ekspresiju satelitske DNA 1.688. Ekspresija satelitske DNA 1.688 u svim je slučajevima ostala približno jednaka u usporedbi s kontrolom ili se neznatno smanjila. Promjene satelitske DNA 1.688 ne mogu objasniti različitu ekspresiju gena u mušici nakon infekcije različitim patogenima.

# 6. ZAKLJUČAK

U ovom je radu ispitan utjecaj hladnog stresa na ekspresiju satelitskih DNA. Hladni stres nije imao utjecaj na ekspresiju satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2 u brašnaru *T. castaneum* ni na ekspresiju satelitske DNA 1.688 u mušici *D. melanogaster*.

Osim hladnog stresa, ispitan je i utjecaj bakterijske infekcije na ekspresiju satelitskih DNA. Nakon infekcije bakterijom *B. thuringiensis*, ekspresija satelitske DNA TCAST2 nije se promijenila. Ekspresija satelitske DNA TCAST1 6 sati nakon oralne infekcije prolazno se smanjila, da bi 18 sati nakon infekcije bila jednaka kontroli. Sistemska infekcija bakterijom nije imala utjecaj na ekspresiju satelitskih DNA.

Promjena ekspresije satelitske DNA TCAST1 koja je opažena nakon 6 sati oporavka od infekcije bakterijom *B. thuringiensis* ovisi o prethodnoj izloženosti brašnara bakterijskoj infekciji. Smanjenje ekspresije bilo je najveće u slučaju u kojem brašnar nije prethodno izložen infekciji, nešto manje u slučaja kada je prethodno izložen nepatogenom soju bakterije *Bt407*, a najmanje kada je prethodno izložen patogenom soju bakterije *Btt*.

Nakon infekcije mušice *D. melanogaster* različitim sojevima bakterija, ekspresija satelitske DNA 1.688 u nekim je slučajevima smanjena, no u većini slučajeva je približno jednaka kontroli.

# 7. LITERATURNI IZVORI


1. D. Ugarkovic, *EMBO Rep.* **6** (2005) 1035–1039.
2. Ž. Pezer, J. Brajković, I. Feliciello, Đ. Ugarković, *Genome Dyn. Basel, Karger.* **7** (2012) 153–169.
3. J. Brajković, I. Feliciello, B. Bruvo-Mađarić, Đ. Ugarković, *G3 Genes, Genomes, Genet.* **2** (2012) 931–941.
4. Ž. Pezer, Đ. Ugarković, *RNA Biol.* **9** (2012) 587–595.
5. I. Feliciello, I. Akrap, Đ. Ugarković, *PLoS Genet.* **11** (2015) 1–18.
6. G. C. S. Kuhn, H. Küttler, O. Moreira-Filho, J. S. Heslop-Harrison, *Mol. Biol. Evol.* **29** (2012) 7–11.
7. D. B. Roberts, *Entomol. Exp. Appl.* **121** (2006) 93–103.
8. B. H. Jennings, *Mater. Today* **14** (2011) 190–195.
9. M. D. Adams, S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S. E. Scherer, P. W. Li, R. A. Hoskins, R. F. Galle, R. A. George, S. E. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S. N. Henderson, G. G. Sutton, J. R. Wortman, M. D. Yandell, Q. Zhang, L. X. Chen, R. C. Brandon, Y.-H. C. Rogers, R. G. Blazej, M. Champe, B. D. Pfeiffer, K. H. Wan, C. Doyle, E. G. Baxter, G. Helt, C. Nelson, L. Bayraktaroglu, E. M. Beasley, K. Y. Beeson, P. V. Benos, B. P. Berman, D. Bhandari, S. Bolshakov, D. Borkova, M. R. Botchan, J. Bouck, P. Brokstein, P. Brottier, K. C. Burtis, L. E. Doup, M. Downes, S. Dugan-Rocha, B. C. Dunkov, P. Dunn, K. J. Durbin, C. C. Evangelista, C. Ferraz, S. Ferriera, W. Fleischmann, C. Fosler, A. E. Gabrielian, N. S. Gar, J. H. Gorrell, Z. Gu, P. Guan, M. Harris, N. L. Harris, D. Harvey, T. J. Heiman, J. R. Hernandez, J. Houck, D. Hostin, K. A. Houston, T. J. Howland, M.-H. Wei, C. Ibegwam, Z. Lai, P. Lasko, Y. Lei, A. A. Levitsky, J. Li, Z. Li, Y. Liang, X. Lin, X. Liu, B. Mattei, T. C. McIntosh, M. P. McLeod, D. McPherson, G. Merkulov, N. V. Mil, V. Puri, M. G. Reese, K. Reinert, K. Remington, R. D. C. Saunders, F. Scheeler, H. Shen, B. C. Shue, I. Siden-Kiamos, M. Simpson, M. P. Skupski, T. Smith, S. Spier, A. C. Spradling, G. M. Weinstock, J. Weissenbach, S. M. Williams, T. Woodage, K. C. Worley, D. Wu, S. Yang, Q. A. Yao, J. Ye, R.-F. Yeh, J. S. Zaveri, M. Zhan, G. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, J. C. Venter, *Science.* **287** (2000)

2196–2204.

10. R. A. Hoskins, C. D. Smith, J. W. Carlson, A. B. Carvalho, A. Halpern, J. S. Kaminker, C. Kennedy, C. J. Mungall, B. A. Sullivan, G. G. Sutton, J. C. Yasuhara, B. T. Wakimoto, E. W. Myers, S. E. Celniker, G. M. Rubin, G. H. Karpen, *Genome Biol.* **3** (2002) 1–16.
11. S. J. Brown, R. E. Denell, R. W. Beeman, *Genet. Res.* **82** (2003) 155–161.
12. R. Schröder, A. Beermann, N. Wittkopp, R. Lutz, *Dev. Genes Evol.* **218** (2008) 119–126.
13. D. D. McKenna, *Curr. Opin. Insect Sci.* **25** (2018) 76–82.
14. S. Richards, R. A. Gibbs, G. M. Weinstock, S. Brown, R. Denell, R. W. Beeman, R. Gibbs, G. Bucher, M. Friedrich, C. J. P. Grimmelikhuijzen, M. Klingler, M. Lorenzen, S. Roth, R. Schröder, D. Tautz, E. M. Zdobnov, D. Muzny, T. Attaway, S. Bell, C. J. Buhay, M. N. Chandrabose, D. Chavez, K. P. Clerk-Blankenburg, A. Cree, M. Dao, C. Davis, J. Chacko, H. Dinh, S. Dugan-Rocha, G. Fowler, T. T. Garner, J. Garnes, A. Gnirke, A. Hawes, J. Hernandez, S. Hines, M. Holder, J. Hume, S. N. Jhangiani, V. Joshi, Z. M. Khan, L. Jackson, C. Kovar, A. Kowis, S. Lee, L. R. Lewis, J. Margolis, M. Morgan, L. V. Nazareth, N. Nguyen, G. Okwuonu, D. Parker, S. J. Ruiz, J. Santibanez, J. Savard, S. E. Scherer, B. Schneider, E. Sodergren, S. Vattahil, D. Villasana, C. S. White, R. Wright, Y. Park, J. Lord, B. Oppert, L. Wang, G. Weinstock, Y. Liu, K. Worley, C. G. Elsik, J. T. Reese, E. Elhaik, G. Landan, D. Graur, P. Arensburger, P. Atkinson, J. Beidler, J. P. Demuth, D. W. Drury, Y. Z. Du, H. Fujiwara, V. Maselli, M. Osanai, H. M. Robertson, Z. Tu, J. J. Wang, S. Wang, H. Song, L. Zhang, D. Werner, M. Stanke, B. Morgenstern, V. Solovyev, P. Kosarev, G. Brown, H. C. Chen, O. Ermolaeva, W. Hlavina, Y. Kapustin, B. Kiryutin, P. Kitts, D. Maglott, K. Pruitt, V. Sapojnikov, A. Souvorov, A. J. Mackey, R. M. Waterhouse, S. Wyder, E. V. Kriventseva, T. Kadowaki, P. Bork, M. Aranda, R. Bao, A. Beermann, N. Berns, R. Bolognesi, F. Bonneton, D. Bopp, T. Butts, A. Chaumot, R. E. Denell, D. E. K. Ferrier, C. M. Gordon, M. Jindra, Q. Lan, H. M. G. Lattorff, V. Laudet, C. Von Levetsow, Z. Liu, R. Lutz, J. A. Lynch, R. N. Da Fonseca, N. Posnien, R. Reuter, J. B. Schinko, C. Schmitt, M. Schoppmeier, T. D. Shippy, F. Simonnet, H. Marques-Souza, Y. Tomoyasu, J. Trauner, M. Van Der Zee, M. Vervoort, N. Wittkopp, E. A. Wimmer, X. Yang, A. K. Jones, D. B. Sattelle, P. R. Ebert, D. Nelson, J. G. Scott, S.

Muthukrishnan, K. J. Kramer, Y. Arakane, Q. Zhu, D. Hogenkamp, R. Dixit, H. Jiang, Z. Zou, Z. Lu, P. Zhao, N. Sumathipala, E. Elpidina, K. Vinokurov, J. Evans, B. Altincicek, A. Vilcinskas, M. Williams, D. Hultmark, C. Hetru, F. Hauser, G. Cazzamali, M. Williamson, B. Li, Y. Tanaka, R. Predel, S. Neupert, J. Schachtner, P. Verleyen, F. Raible, K. K. O. Walden, S. Angeli, S. Forêt, S. Schuetz, R. Maleszka, S. C. Miller, D. Grossmann, *Nature* **452** (2008) 949–955.

15. Z. Adamski, S. A. Bufo, S. Chowański, P. Falabella, J. Lubawy, P. Marciniak, J. Pacholska-Bogalska, R. Salvia, L. Scrano, M. Słocińska, M. Spochacz, M. Szymczak, A. Urbański, K. Walkowiak-Nowicka, G. Rosiński, *Front. Physiol.* **10** (2019) 1–22.
16. S. I. S. Grewal, S. Jia, *Nat. Rev. Genet.* **8** (2007) 35–46.
17. S. I. S. Grewal, S. C. R. Elgin, *Nature* **447** (2007) 399–406.
18. M. Jagannathan, Y. M. Yamashita, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **82** (2017) 319–327.
19. M. Plohl, N. Meštrović, B. Mravinac, *Genome Dyn.* **7** (2012) 126–152.
20. I. Vlahović, M. Gluncić, M. Rosandić, D. I. Ugarković, V. Paar, *Genome Biol. Evol.* **9** (2017) 2668–2680.
21. M. Plohl, **9** (2005) 85–96.
22. M. A. Garrido-Ramos, *Genes (Basel).* **8** (2017) 1–41.
23. I. Feliciello, I. Akrap, J. Brajkovi, I. Zlatar, D. Ugarkovic, *Genome Biol. Evol.* **7** (2014) 228–239.
24. I. Feliciello, G. Chinali, D. Ugarković, *Genetica* **139** (2011) 999–1008.
25. J. Brajković, Ž. Pezer, B. Bruvo-Mađarić, A. Sermek, I. Feliciello, Đ. Ugarković, *G3 Genes, Genomes, Genet.* **8** (2018) 875–886.
26. D. E. Khost, D. G. Eickbush, A. M. Larracuente, *Genome Res.* **27** (2017) 709–721.
27. M. Jagannathan, N. Warsinger-Pepe, G. J. Watase, Y. M. Yamashita, *G3 Genes, Genomes, Genet.* **7** (2017) 693–704.
28. Z. Pezer, D. Ugarković, *Cytogenet. Genome Res.* **124** (2009) 268–276.
29. N. Rizzi, M. Denegri, I. Chiodi, M. Corioni, V. Rut, F. Cobianchi, S. Riva, B. Biamonti, *Mol. Biol. Cell* **15** (2004) 543–551.
30. T. A. Volpe, C. Kidner, I. M. Hall, G. Teng, S. I. S. Grewal, R. A. Martienssen, *Science (80-. ).* **297** (2002) 1833–1837.
31. S. Rošić, F. Köhler, S. Erhardt, *J. Cell Biol.* **207** (2014) 335–349.

32. S. M. Hammond, *FEBS Lett.* **579** (2005) 5822–5829.
33. F. Heigwer, F. Port, M. Boutros, *Genetics* **208** (2017) 853–874.
34. L. Usakin, J. Abad, V. V. Vagin, B. De Pablos, A. Villasante, V. A. Gvozdev, *Genetics* **176** (2007) 1343–1349.
35. M. S. Clark, M. R. Worland, *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **178** (2008) 917–933.
36. J. S. Hosler, J. E. Burns, H. E. Esch, *J. Insect Physiol.* **46** (2000) 621–627.
37. B. J. Sinclair, A. G. Gibbs, S. P. Roberts, *Insect Mol. Biol.* **16** (2007) 435–443.
38. H. Colinet, S. F. Lee, A. Hoffmann, *PLoS One* **5** (2010) 1–7.
39. J.-M. Kim, T. Sasaki, M. Ueda, K. Sako, M. Seki, *Front. Plant Sci.* **6** (2015) 1–12.
40. T. Nolan, J. Huggett, E. Sanchez, *Good Practice Guide for the Application of Quantitative PCR (qPCR) Natl. Meas. Syst.* ,2013, str. 50.
41. K. Wojciechowska-Durczyńska, K. Krawczyk-Rusiecka, A. Cyniak-Magierska, A. Zygmunt, E. Gałecka, A. Lewiński, *Thyroid Res.* **3** (2010) 63–82.
42. J. M. Ruijter, C. Ramakers, W. M. H. Hoogaars, Y. Karlen, O. Bakker, M. J. B. van den hoff, A. F. M. Moorman, *Nucleic Acids Res.* **37** (2009) 1–12.
43. K. M. Ririe, R. P. Rasmussen, C. T. Wittwer, M. F. Kramer, *Anal. Biochem.* **245** (2012) 1–22.
44. A. Biosystems, *TaqMan ® MicroRNA Assays Protocol* ,2005, str. 24.
45. A. Teresa, F. Gon, *PhD Thesis* (2012) 193.
46. J. Shendure, S. Balasubramanian, G. M. Church, W. Gilbert, J. Rogers, J. A. Schloss, R. H. Waterston, *Nature* **550** (2017) 345–353.
47. F. Dündar, L. Skrabanek, P. Zumbo, *Appl. Bioinforma. Core* **408** (2018) 377–381.
48. M. L. Metzker, *Nat. Rev. Genet.* **11** (2010) 31–46.
49. B. Langmead, S. L. Salzberg, *Nat. Methods* **9** (2012) 357–359.
50. B. Langmead, C. Wilks, V. Antonescu, R. Charles, *Bioinformatics* **35** (2019) 421–432.
51. N. L. Bray, H. Pimentel, P. Melsted, L. Pachter, *Nat. Biotechnol.* **34** (2016) 525–527.
52. M. I. Love, W. Huber, S. Anders, *Genome Biol.* **15** (2014) 1–21.
53. I. Scharf, K. O. Wertheimer, J. L. Xin, T. Gilad, I. Goldenberg, A. Subach, *Insect Sci.* **26** (2019) 142–153.
54. K. Von Heckel, W. Stephan, S. Hutter, *BMC Genomics* (2016) 1–14. doi:10.1186/s12864-016-2866-0

55. S. Behrens, R. Peuß, B. Milutinovi, H. Eggert, D. Esser, *BMC Genomics* (2014) 1–17.
56. J. M. Greenwood, B. Milutinovi, R. Peuß, S. Behrens, D. Esser, P. Rosenstiel, H. Schulenburg, J. Kurtz, *BMC Genomics* (2017) 1–14. doi:10.1186/s12864-017-3705-7
57. K. Troha, J. H. Im, J. Revah, B. P. Lazzaro, N. Buchon, *PLoS Pathog.* (2018) 1–34.
58. M. Tittel-Elmer, E. Bucher, L. Broger, O. Mathieu, J. Paszkowski, I. Vaillant, *PLoS Genet.* **6** (2010) 1–11.
59. O. M. Scheid, A. Pecinka, H. Q. Dinh, T. Baubec, M. Rosa, N. Lettner, *Plant Cell* **22** (2010) 3118–3129.
60. F. Jian, P. G. Fields, K. Hargreaves, D. S. Jayas, N. D. G. White, *J. Econ. Entomol.* **108** (2015) 2471–2478.
61. A. M. Grabiec, J. Potempa, *Crit. Rev. Microbiol.* **44** (2018) 336–350.
62. B. Milutinović, C. Stolpe, R. Peuß, S. A. O. Armitage, J. Kurtz, *PLoS One* **8** (2013) 1–11.
63. C. Höfling, M. Futo, J. P. Scharsack, J. Kurtz, **81** (2015) 8135–8144.

# 8. ŽIVOTOPIS

## Osobni podatci

Ime i prezime: Anamarija Pulitika

Datum rođenja: 11. svibnja 1996.

Mjesto rođenja: Dubrovnik

## Obrazovanje

2002.–2010. Osnovna škola Župa dubrovačka, Župa dubrovačka

2010.–2014. Gimnazija Dubrovnik, Dubrovnik

2014.–2017. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2017.–2019. Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Smjer: istraživački
Grane: biokemija i fizikalna kemija

## Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2017. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2018. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2019. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu