

# Alternativno prekrajanje gena BPM1, BPM2 i BPM3 u uvjetima temperaturnog stresa

---

**Pali, Dorotea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:585363>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-03**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

Dorotea Pali

Alternativno prekrajanje gena *BPM1*, *BPM2* i *BPM3* u uvjetima  
temperaturnog stresa

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za kulturu biljnog tkiva na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nataše Bauer. Rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekta „MATH-BTB proteini kao regulatori transkripcije i RNA posredovane metilacije DNA u biljnom razvitku“ IP 2016-06-6229. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

## ZAHVALE

*Iskreno zahvaljujem svim članovima Laboratorija za kulturu biljnog tkiva na Zavodu za molekularnu biologiju na nezaboravnoj atmosferi te svom laboratorijskom iskustvu i praktičnom znanju koje sam stekla u protekloj godini.*

*Posebno zahvaljujem mag. biol. mol. Andreji Škiljaici na podršci kada eksperiment nije funkcionirao kako je planirano i na malim savjetima koji čine razliku.*

*Velika zahvala mag. biol. mol. Mateji Jagić koja je uvijek bila spremna pomoći.*

*Željela bih zahvaliti svojim roditeljima i bratu na razumijevanju i podršci koju su mi pružili tijekom cijelog studiranja. Veliko hvala teti Katarini koja me naučila da trebam vjerovati u sebe i bila uz mene do samoga kraja.*

*Hvala svim prijateljima koji su učinili ovih pet godina nezaboravnim iskustvom, a posebno hvala Marku što je bio tu kada je bilo najteže.*

*I iznad svega, najviše zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Nataši Bauer, koja je prihvaćanjem mentorstva za izradu mog diplomskog rada, omogućila da budem dio ovog istraživačkog tima. Hvala na strpljenju, pruženoj podršci i svim savjetima koji su mi pomogli učvrstiti kritičko razmišljanje u znanstvenom radu. Najviše hvala za pomoć u onim situacijama kada su se stvari činile nerješivima.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Alternativno prekrajanje gena *BPM1*, *BPM2* i *BPM3* u uvjetima temperaturnog stresa

Dorotea Pali

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Članovi proteinske porodice MATH-BTB/POZ, koji sudjeluju u degradaciji proteina ovisnoj o ubikvitinu, utječu na odgovor biljke u stresnim uvjetima kroz interakciju s različitim transkripcijskim faktorima. Šest gena (*BPM1-6*) u uročnjaku (*Arabidopsis thaliana* L.) kodira za najmanje 16 različitih proteina BPM koji nastaju u procesu alternativnog prekrajanja gena. Novo istraživanje je pokazalo induciranu ekspresiju gena *BPM1-3* te različiti intenzitet umnažanja varijanti gena *BPM1* tijekom izlaganja biljke povišenoj temperaturi. U ovom radu je istražen učinak temperature na ekspresiju varijanti gena *BPM1-3* pomoću lančane reakcije polimerazom. Osim toga nastojalo se ispitati postojanje novih ekspresijskih varijanti koje nastaju pod utjecajem temperaturnih varijacija. U tu svrhu dizajnirane su i optimizirane specifične početnice za umnažanje varijanti gena *BPM1-3*. Iz klijanaca uročnjaka izloženih različitim temperaturama izolirana je cDNA koja je korištena kao kalup u umnažanju, a fragmenti koji su se umnožili ugrađeni su u vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy tehnikom TA kloniranja. Kako bi se usporedila sličnost s postojećim varijantama gena *BPM1-3*, nova varijanta gena je sekvencirana. Potvrđeno je da su genska ekspresija i alternativno prekrajanje gena *BPM1-3* inducirani temperaturom. Otkrivena je nova varijanta gena *BPM2.6* koja se sintetizira u normalnim uvjetima rasta i u uvjetima povišene temperature. S obzirom na izostanak domene BTB/POZ koja je neophodna za interakciju s kulinom, otkriće ove varijante predstavlja osnovu za daljnja istraživanja u okviru uloga proteina BPM neovisnih o kulinu.

(73 stranice, 23 slike, 5 tablica, 4 slike u prilogu, 72 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: alternativno izrezivanje, ekspresija gena, temperaturni stres, *Arabidopsis thaliana*, geni *BPM*

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

Neposredni voditelj: dr. sc. Lucija Markulin

Ocjenitelji: dr. sc. Nataša Bauer, izv. prof.

dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv. prof.

dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izv. prof.

Zamjena: dr. sc. Dunja Leļjak-Levanić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 28. 11. 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation thesis

Alternative splicing of *BPM1*, *BPM2* and *BPM3* genes under temperature stress conditions

Dorotea Pali

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Members of MATH-BTB/POZ protein family, which participate in the ubiquitin-dependent protein degradation, affect plant response under stress conditions through the interaction with various transcription factors. Six genes (*BPM1-6*) in *Arabidopsis thaliana* L. encode for at least 16 different BPM proteins in the process of alternative gene splicing. A new research has shown an induced expression of *BPM1-3* genes and a differential expression of *BPM1* gene variants during plant exposure to elevated temperature. Here, effects of temperature on the expression of *BPM1-3* gene variants were analyzed by using PCR method. Furthermore, the existence of new splicing variants that could be generated due to temperature variations was examined in this work. For this purpose, gene-specific primers for amplification of *BPM1-3* gene variants were designed and optimized. cDNA was generated from *A. thaliana* seedlings which had been exposed to different temperatures and used in amplification. During this analysis, fragments which have been nonspecifically amplified, were subsequently cloned into a vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy using TA cloning. New variant was sequenced to compare its similarity with known *BPM1-3* variants. Temperature-dependent regulation of gene expression and alternative splicing of *BPM1-3* genes was confirmed. A new splicing variant *BPM2.6* was discovered under normal conditions and conditions of elevated temperature. Due to the absence of BTB/POZ domain which is crucial for interaction with cullin, the discovery of new splicing variant provides the basis for further research regarding cullin-independent roles of BPM proteins.

(73 pages, 23 figures, 5 tables, 4 supplemental figures, 72 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: alternative gene splicing, gene expression, temperature stress, *Arabidopsis thaliana*, *BPM* genes

Supervisor: Dr. Nataša Bauer, Assoc. Prof.

Assistant Supervisor: Dr. Lucija Markulin, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Nataša Bauer, Assoc. Prof.

Dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.

Replacement reviewer: Dr. Dunja Leljak-Levanić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: November 28<sup>th</sup>, 2019

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Posttranskripcijska regulacija genske ekspresije .....	1
1.2 Alternativno prekrajanje gena.....	4
1.2.1 Mehanizam i regulacija alternativnog prekrajanja.....	5
1.2.2 Uloga alternativnog prekrajanja kod biljaka.....	7
1.3 Učinak sekundarnih struktura mRNA na translaciju proteina .....	8
1.4 Proteini MATH-BTB .....	10
1.4.1 Struktura proteina MATH-BTB .....	11
1.4.2 Uloga proteina BPM u degradaciji proteina ovisnoj o ubikvitinu .....	12
1.4.3 Proteini BPM kao adaptori supstrata ligaze CUL3 u uročnjaku .....	13
1.5 Uloga proteina BPM u odgovoru na temperaturni stres u uročnjaku.....	15
1.6 Cilj rada.....	17
2. MATERIJALI I METODE.....	18
2.1 Materijali.....	18
2.1.1 Biljni materijal .....	18
2.1.2 Bakterijski soj .....	18
2.1.3 Mediji za rast.....	18
2.1.4 Puferi.....	19
2.1.4.1 TAE.....	19
2.1.4.2 TBE.....	19
2.1.5 Početnice za PCR.....	20
2.1.6 Plazmid .....	22
2.1.7 DNA molekularni standard .....	23
2.2 Metode .....	24
2.2.1 Sterilizacija sjemenki i uzgoj klijanaca.....	24
2.2.2 Tretman klijanaca temperaturnim stresom.....	24
2.2.3 Izolacija ukupne RNA iz klijanaca .....	24
2.2.4 Reverzna transkripcija.....	25
2.2.5 Izolacija ukupne genomske DNA .....	26
2.2.6 Standardna PCR reakcija .....	26
2.2.7 Agarozna gel elektroforeza .....	27
2.2.8 TA kloniranje .....	28

2.2.8.1 Izrezivanje PCR produkata iz agaroznog gela i njihovo pročišćavanje .....	28
2.2.8.2 Kloniranje fragmenata umnoženih reakcijom PCR .....	28
2.2.9 Transformacija kompetentnih bakterijskih stanica .....	29
2.2.10 Izrada prečnoćne bakterijske kulture .....	30
2.2.11 Izolacija plazmidne DNA.....	30
2.2.12 Restriksijska analiza plazmidne DNA .....	31
3. REZULTATI.....	32
3.1 Izolacija nukleinskih kiselina.....	32
3.2 Umnažanje gena <i>Akt3</i> za potvrdu identiteta izolirane molekule .....	32
3.3 Dizajn i optimizacija početnica za umnažanje varijanti gena <i>BPM1-3</i> .....	34
3.3.1 Dizajn početnica za umnažanje varijanti gena <i>BPM1-3</i> .....	34
3.3.2 Provjera efikasnosti početnica za varijante gena <i>BPM1-3</i> .....	37
3.4 Analiza ekspresije varijanti gena <i>BPM1-3</i> upotrebom lanćane reakcije polimerazom (PCR).....	39
3.4.1 Analiza ekspresije varijanti gena <i>BPM1</i> .....	39
3.4.1.1 Umnažanje ekspresijske varijante gena <i>BPM1.1</i> .....	40
3.4.1.2 Umnažanje ekspresijskih varijanti gena <i>BPM1.2</i> i <i>BPM1.3</i> .....	41
3.4.2 Analiza ekspresije varijanti gena <i>BPM2</i> .....	42
3.4.2.1 Umnažanje ekspresijskih varijanti gena <i>BPM2.1</i> i <i>BPM2.2</i> .....	43
3.4.2.2 Umnažanje ekspresijskih varijanti gena <i>BPM2.3</i> i <i>BPM2.5</i> .....	45
3.4.2.3 Umnažanje ekspresijske varijante gena <i>BPM2.4</i> .....	46
3.4.3 Analiza ekspresije varijanti gena <i>BPM3</i> .....	48
3.4.3.1 Umnažanje ekspresijskih varijanti gena <i>BPM3.1</i> i <i>BPM3.3</i> .....	48
3.4.3.2 Umnažanje ekspresijskih varijanti gena <i>BPM3.2</i> i <i>BPM3.4</i> .....	50
3.5 Kloniranje i identifikacija nove varijante gena <i>BPM2</i> .....	52
3.5.1 Izrada plazmidnog konstrukta.....	52
3.5.2 Analiza rezultata sekvenciranja i otkriće varijante gena <i>BPM2</i> .....	54
4. RASPRAVA .....	58
4.1 Ovisnost alternativnog prekrajanja gena <i>BPM1-3</i> u uroćnjaku o dnevnom ritmu biljke.....	58
4.2 Alternativno prekrajanje gena <i>BPM1-3</i> u uroćnjaku je inducirano temperaturom .....	59
4.3 Gen <i>BPM2</i> ima novu ekspresijsku varijantu koja potvrđuje dodatne funkcije BPM.....	62
5. ZAKLJUĆAK.....	67
6. LITERATURA: .....	68
PRILOZI: .....	i
ŽIVOTOPIS.....	xix



# 1. UVOD

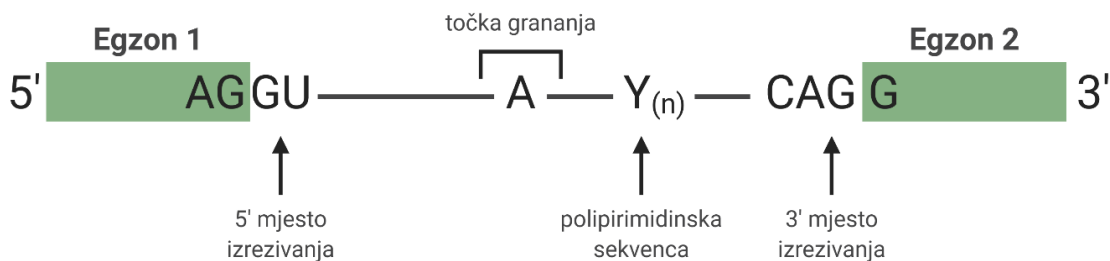
Regulacija genske ekspresije od presudne je važnosti za rast i razvoj višestaničnih eukariota te za uspješan odgovor organizma na promjenjive okolišne uvjete. Biljni organizmi uspijevaju preživjeti u uvjetima različitih abiotičkih stresova kao što su visoki salinitet, suša i ekstremne temperature zahvaljujući preciznoj kontroli specifičnih transkripcijskih faktora koji reguliraju ekspresiju stresom induciranih gena. Brojni takvi transkripcijski faktori negativno utječu na rast i reprodukcije biljke, stoga je biljkama potreban dobro regulirani sustav koji će osigurati postizanje optimalnog kompromisa između preživljavanja i rasta u stalno promjenjivom okolišu. U tu svrhu biljke koriste različite razine regulacije koje uključuju regulaciju transkripcije gena, posttranskripcijsku regulaciju procesiranja mRNA (*eng.* messenger RNA) te posttranslacijsku regulaciju stabilnosti proteina (Haak i sur., 2017).

## 1.1 Posttranskripcijska regulacija genske ekspresije

Posttranskripcijska regulacija ekspresije gena od iznimne je važnosti kod biljnih organizama koji su sesilni, a samim time i podložniji okolišnim promjenama. Posttranskripcijsko (ko-transkripcijsko) procesiranje pre-mRNA (*eng.* precursor mRNA) je proces kojim se iz molekule pre-mRNA izrezuju introni te dodaje 7-metilgvanozin na 5' kraj i poli (A) rep na 3' kraj molekula mRNA (Szakonyi i Duque, 2018). Skoro 90% protein-kodirajućih gena u biljkama sadrži introne koji se moraju izrezati iz transkripata pre-mRNA kako bi se osigurala točna translacija proteina (Shang i sur., 2017). Mehanizam izrezivanja introna sličan je kod svih eukariota (Lorković i sur., 2000). Izrezivanje se vrši pomoću kompleksa za prekrajanje građenog od pet RNA-proteinskih kompleksa snRNP (*eng.* small nuclear ribonucleoprotein) bogatih uridinom (U1, U2, U4, U5 i U6 snRNP) i velikog broja ostalih faktora prekrajanja kao što su proteini SR (*eng.* Serine/Arginine-rich proteins) (Shang i sur., 2017). Ribonukleoproteinski kompleks prepoznaje specifične signale u pre-mRNA, sastavlja se blizu mjesta izrezivanja (Shang i sur., 2017; Szakonyi i Duque, 2018) te kroz dvije transesterifikacijske reakcije uklanja intron i spaja susjedne egzone (Shang i sur., 2017). Signali izrezivanja kod animalnih organizama uključuju 5' mjesto izrezivanja na početku introna (nukleotidi GU), 3' mjesto izrezivanja na kraju introna (slijed AG), točku grananja

(konsenzus sekvencu s adenozinom) uzvodno od 3' mjesta izrezivanja i polipirimidinski slijed bogat citidinom i uridinom (Meyer i sur., 2015; Shang i sur., 2017; Szakonyi i Duque, 2018) (**Slika 1**).

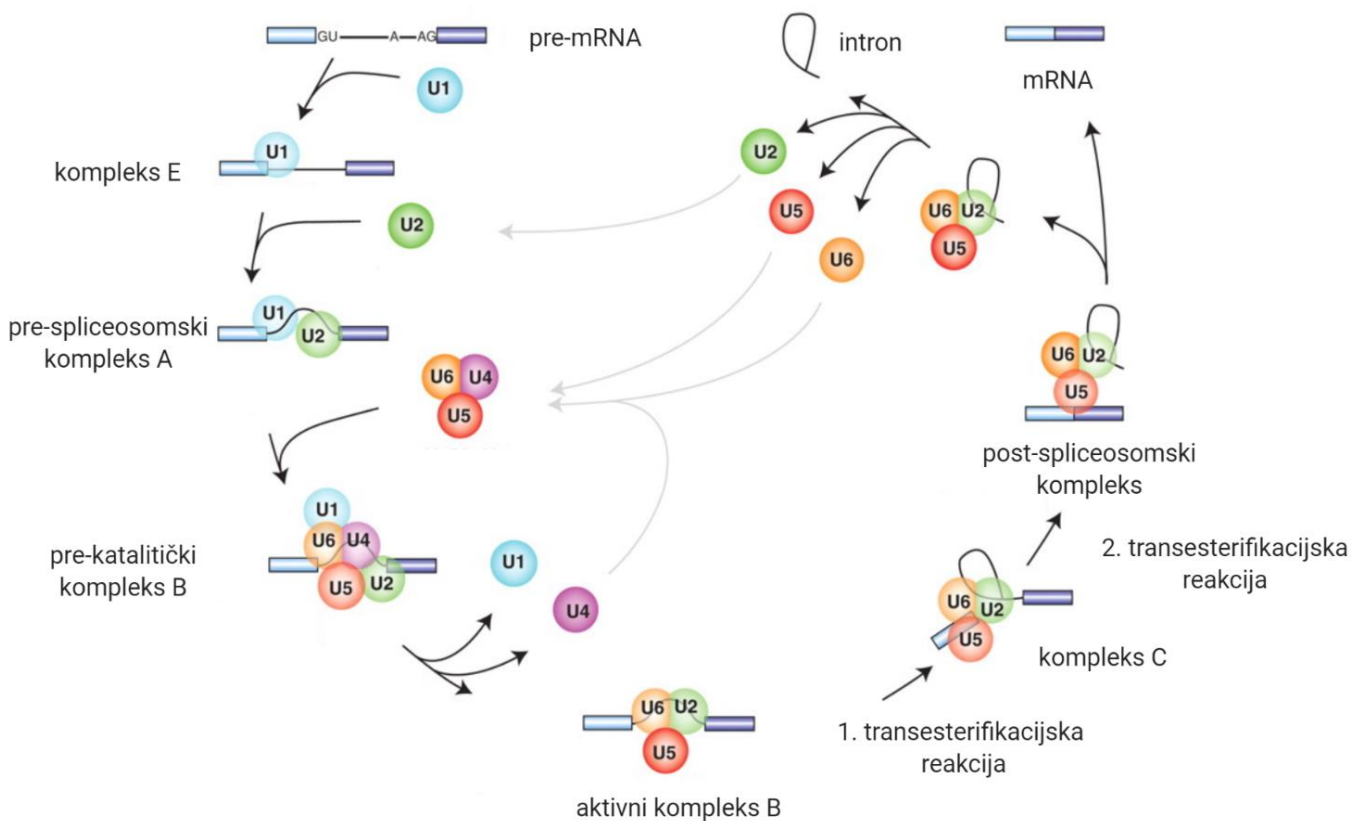
Visoko konzervirani signali za izrezivanje introna prisutni su i kod biljaka (**Slika 1**), s time da su introni biljaka relativno mali u odnosu na animalne introne (~ 160 pb) (Reddy i sur., 2013), a njihov polipirimidinski slijed bogat je uridinom (Brown i Simpson, 1998). Efikasnost prekrajanja kod biljaka određena je i faktorima poput minimalne veličine introna (70 - 73 nt) (Goodall i Filipowich, 1990) i minimalnog postotka obogaćenja nukleotidima AU u intronskim sekvencama (~ 60%) (Brown i Simpson, 1998). Specifičnost biljaka u odnosu na animalne organizme je da introni biljaka pokazuju obogaćenje nukleotidima AU i U, a egzoni obogaćenje nukleotidima GC/AG (Brown i Simpson, 1998; Reddy, 2007). Lokalni AU/GC prijelazi na mjestima izrezivanja važni su za efikasno prekrajanje i definiciju granice introna (Lorković i sur., 2000; Reddy, 2007), a moguće je da djeluju kao vezna mjesta biljnih ekvivalenata hnRNP-a (*eng.* heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) koji asistiraju u izrezivanju introna (Brown i Simpson, 1998).



**Slika 1.** Konzervirani signali za prekrajanje molekule pre-mRNA u biljnim i životinjskim organizmima. Intron započinje s nukleotidima GU (mjesto izrezivanja na 5' kraju), a završava sa slijedom AG (mjesto izrezivanja na 3' kraju). Točka grananja sadrži konzervirani adenzin (A), a polipirimidinski slijed (Y<sub>(n)</sub>) sadrži pirimidine (citidin, uridin). Slika je izrađena u programu Biorender (<https://biorender.com/>).

Slaganje kompleksa za prekrajanje i njegovo djelovanje dobro je proučeno kod animalnih organizama (**Slika 2**), a započinje djelovanjem regulatora prekrajanja koji regrutiraju U1 snRNP na 5' mjesto izrezivanja u intronu (Reddy, 2007). Heterodimerni faktor U2AF (*eng.* U2 auxiliary factor) potom stupa u interakciju s 3' mjestom izrezivanja, na način da jednom podjedinicom veže granicu egzon - intron, a drugom polipirimidinski slijed, te dolazi do stvaranja kompleksa E

(Meyer i sur., 2015). Vezanjem U2 snRNP-a na točku grananja dolazi do ispupčenja i aktivacije specifičnog adenzina u točki grananja (Will i Lührman, 2011; Nelson i Cox, 2013) te nastaje pre-spliceosomski kompleks A (Meyer i sur., 2015). Potom U4, U5 i U6 snRNP-ovi stupaju u interakciju s kompleksom A i nastaje inaktivni pre-katalitički kompleks B, a nakon unutarnjih promjena, otpuštanja U1 i U4 snRNP-a i sparivanja U6 snRNP-a s 5' mjestom izrezivanja i U2 snRNP-om vezanim na točku grananja, nastaje aktivni kompleks B (Will i Lührman, 2011; Nelson i Cox, 2013; Meyer i sur., 2015). Aktivni kompleks B katalizira prvu transesterifikacijsku reakciju, u kojoj dolazi do cijepanja 5' mjesta izrezivanja te formiranja 2'-5'-fosfodieterske veze između 5' kraja introna i adenzina u točki grananja i nastanka strukture omče (Will i Lührman, 2011; Nelson i Cox, 2013). To dovodi do stvaranja kompleksa C koji katalizira drugi korak reakcije prekrajanja, u kojoj dolazi do cijepanja 3' mjesta izrezivanja, spajanja dvaju egzona i oslobađanja introna između njih u obliku omče. Struktura omče se potom razgrađuje, a U2, U5 i U6 snRNP-ovi se recikliraju u novoj reakciji prekrajanja (Meyer i sur., 2015).



**Slika 2.** Ciklus prekrajanja molekule pre-mRNA kod animalnih organizama. Vezanjem U1 na 5' mjesto izrezivanja nastaje kompleks E, a vezanjem U2 na točku grananja dolazi do ispupčenja i aktivacije

adenozina te nastaje pre-spliceosomski kompleks A. Potom se vežu U4, U5 i U6 i nastaje pre-katalitički kompleks B, koji nakon otpuštanja U1 i U4 te sparivanja U6 s 5' mjestom izrezivanja i U2, prelazi u aktivni kompleks B. U prvoj transesterifikacijskoj reakciji, 5' mjesto izrezivanja se cijepa i na intronu se formira struktura omče te nastaje kompleks C koji katalizira drugu reakciju, u kojoj se cijepa 3' mjesto izrezivanja i nastaje post-spliceosomski kompleks. Oslobađa se prekrojena mRNA i intron u obliku omče koji se razgrađuje, a U2, U5 i U6 se recikliraju. U1, U2, U4, U5 i U6 – snRNP-ovi. Preuzeto i prilagođeno prema: Will i Lührman, 2011.

Ovakav način izrezivanja putem definicije introna karakterističan je za animalne introne manje od 200 – 250 nt (Will i Lührman, 2011) te za biljne introne koji su generalno kraći i posjeduju obogaćenja uridinom (Lorković i sur., 2000; Reddy, 2007). Animalni introni dulji od 250 nt izrezuju se u procesu definicije egzona, gdje se faktori prekrajanja vežu na 5' mjesto prekrajanja nizvodno od egzona i 3' mjesto prekrajanja uzvodno od egzona (Will i Lührman, 2011; Lorković i sur., 2000). Bioinformatičke analize potvrdile su postojanje homologa komponenti kompleksa za prekrajanje kod biljnih organizama, uključujući konzervirane strukture snRNA i njihovih elemenata potrebnih za sastavljanje i aktivnost kompleksa, te konzervirane strukture i funkcije snRNP-ova, faktora U2AF i ostalih proteina koji sudjeluju u prekrajanju (Lorković i sur., 2000). Pretpostavlja se da je sastav biljnog kompleksa sličan onome u animalnim organizmima, s time da je kod biljaka zabilježena veća brojnost i kompleksnost regulatora prekrajanja (Reddy i sur., 2013).

## 1.2 Alternativno prekrajanje gena

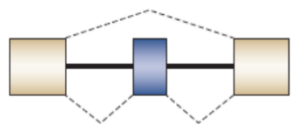
Alternativno prekrajanje gena važan je posttranskripcijski proces koji omogućuje sintezu više različitih varijanti mRNA iz istog gena, čime se značajno povećava kapacitet kodiranja genoma te raznovrsnost transkriptoma i proteoma u viših eukariota (Shang i sur., 2017). Alternativno prekrajanje prvi je puta opisano 1977. g u okviru rearanžmana mRNA adenovirusa tipa 2 (Marquez i sur., 2012). U biljaka, proces alternativnog prekrajanja uključen je u regulaciju razvojnih procesa te sudjeluje u odgovoru na promijenjene okolišne faktore, uključujući biotičke i abiotičke stresove (Szakonyi i Duque, 2018). Koristeći alternativna mjesta izrezivanja, omogućuje se sinteza različitih izoformi proteina koji se mogu razlikovati s obzirom na sastav, stabilnost,

fiziološke i kemijske karakteristike, funkciju i lokaciju unutar stanice (Shang i sur., 2017). Procesom alternativnog prekrajanja može se regulirati količina transkripata u stanici tako da se uvode preuranjeni stop kodoni u kodirajuće sekvence i osigurava degradacija takvih nestabilnih mRNA pomoću signalnog puta NMD (*eng.* Nonsense-mediated mRNA decay) (Szakonyi i Duque, 2018; Shang i sur., 2017), ali i modificirati genska ekspresija kroz modulaciju transkripcijske elongacije i efikasnosti translacije proteina, ili utjecati na stabilnost mRNA djelovanjem molekula miRNA (*eng.* microRNA) (Reddy i sur., 2013),

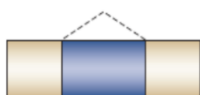
### 1.2.1 Mehanizam i regulacija alternativnog prekrajanja

Dosad je poznato nekoliko osnovnih mehanizama alternativnog prekrajanja koji uključuju preskakanje egzona (kazete egzoni), zadržavanje introna, međusobno isključivanje egzona i odabir alternativnih 5' ili 3' mjesta izrezivanja (Matlin i sur., 2005; Szakonyi i Duque, 2018) (Slika 3). Preskakanje egzona je najčešći mehanizam alternativnog prekrajanja kod animalnih organizama (Reddy i sur., 2012), u kojem kazete egzoni mogu biti uključeni ili isključeni iz konačnog transkripta, što dovodi do sinteze produljenih ili skraćenih proteina. Kod biljaka, najčešće korišteni mehanizam je zadržavanje introna (Reddy i sur., 2012), gdje aminokiseline kodirane intronom moraju biti u okviru čitanja susjednih egzona, inače će doći do sinteze nefunkcionalnog proteina. Međusobno isključivanje egzona se odnosi na one egzone koji ne mogu biti na istom transkriptu i rezultira zadržavanjem samo jednog od njih. Ostali mehanizmi alternativnog prekrajanja uključuju korištenje alternativnih promotora i alternativnih mjesta poliadenilacije, koji nisu nužno regulirani na razini procesiranja pre-mRNA (Matlin i sur., 2005), a moguće su i kombinacije više navedenih mehanizama.

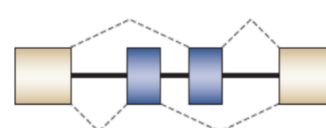
a Preskakanje egzona



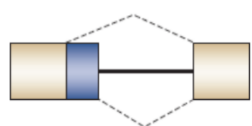
b Zadržavanje introna



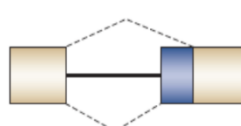
c Međusobno isključivanje egzona



d Alternativna 5' mjesta izrezivanja



e Alternativna 3' mjesta izrezivanja



**Slika 3.** Tipovi mehanizama alternativnog prekrajanja. Osnovni mehanizmi prekrajanja uključuju: a) preskakanje egzona (kazete egzoni), b) zadržavanje introna, c) međusobno isključivanje egzona, d) i e) korištenje alternativnih 5' ili 3' mjesta izrezivanja (modifikacije egzona). Preuzeto i prilagođeno prema: Matlin i sur., 2005.

Regulacija alternativnog prekrajanja i odabir specifičnih mjesta izrezivanja kod animalnih organizama odvija se paralelno sa sastavljanjem kompleksa za prekrajanje i procesiranjem pre-mRNA (Meyer i sur., 2015), a ovisi o cis-djelujućim regulatornim elementima u molekuli pre-mRNA (pojačivačima i utišavačima) i odgovarajućim trans-djelujućim regulatornim proteinima (aktivatorima i represorima) (Matlin i sur., 2005). Utišavači su elementi za koje se vežu represori prekrajanja i na taj način umanjuju mogućnost prekrajanja na mjestu izrezivanja u blizini, a mogu se nalaziti u intronu (*eng.* Intronic Splicing Silencers, ISS) ili u samom egzonu (*eng.* Exonic Splicing Silencers, ESS) (Matlin i sur., 2015). Većina represora prekrajanja pripada skupini ribonukleoproteina hnRNP, čiji proteini sadrže N-terminalni RNA-prepoznajući motiv RRM (*eng.* RNA recognition motif) i često C-terminalnu domenu inhibicije prekrajanja s motivom bogatim glicinom (Meyer i sur., 2015; Wang i Burge, 2008). Proteini hnRNP mogu djelovati i kao represori i aktivatori prekrajanja (Meyer i sur., 2015) te su originalno identificirani kao faktori potrebni za efikasno prekrajanje i stabilnost mRNA, a njihovo prisustvo potvrđeno je i u biljnim organizmima (Lorković i sur., 2000). Pojačivači se mogu nalaziti u intronu (*eng.* Intronic Splicing Enhancers, ISE) ili egzonu (*eng.* Exonic Splicing Enhancers, ESE) (Matlin i sur., 2005), a djeluju kao mjesta vezanja aktivatora prekrajanja koji povećavaju mogućnost prekrajanja (Will i Lührman, 2011). Aktivatori prekrajanja većinom pripadaju obitelji proteina SR koji sadrže N-terminalnu domenu s motivom RRM i C-terminalnu domenu RS (*eng.* Arginine/Serine-rich domain) koja ostvaruje protein-protein interakcije (Meyer i sur., 2015; Wang i Burge, 2008), a njihovo vezanje za elemente pojačivača regrutira faktore prekrajanja na odgovarajuće mjesto izrezivanja (Reddy, 2007). Svi ti elementi zajedno čine kod koji određuje na koji način će se prekrajanje odvijati u pojedinim staničnim uvjetima (Wang i Burge, 2008; Barash i sur., 2010; Matlin i sur., 2015). Djelovanje pojedinog regulatora često je aditivno i ovisi o poziciji cis-djelujućih elemenata u molekuli pre-mRNA, tj. aktivator koji se veže na pojačivač u intronu može djelovati kao represor kad se veže na isti taj element u egzonu (Wang i Burge, 2008). Odluka o alternativnom izrezivanju ne ovisi isključivo o prisustvu cis- i trans-djelujućih elemenata, već i o kontekstu (Barash i sur.,

2010), odnosno o prisutnosti ostalih elemenata u sekvenci pre-mRNA te o trenutnim uvjetima u stanici koji diktiraju sastav proteina. U biljaka, regulacija alternativnog prekrajanja generalno ovisi o sekundarnoj strukturi pre-mRNA, staničnoj lokalizaciji i dinamici trans-djelujućih proteina te epigenetičkoj informaciji, dok se malo zna o cis-djelujućim elementima i njihovim sekvencama (Reddy i sur., 2013). Biljke pokazuju ekspanziju u broju homologa proteina SR i faktora hnRNP u odnosu na animalne organizme, a neki od tih proteina (atRSp31, atRSp35, atRSp41 kod roda *Arabidopsis*, RZ-1 kod duhana, UBP1 kod *Nicotiana plumbaginifolia*) su karakteristični samo za biljne organizme i sadrže domene koje nisu uočene u animalnim proteinima, što sugerira da biljke posjeduju specifične mehanizme prepoznavanja mjesta izrezivanja i regulacije alternativnog prekrajanja (Lorković i sur., 2000; Reddy, 2007).

### 1.2.2 Uloga alternativnog prekrajanja kod biljaka

Procjenjuje se da oko 61% gena s multiplim egzonima kod biljke *Arabidopsis thaliana* prolazi kroz proces alternativnog prekrajanja u normalnim uvjetima rasta, iako se pretpostavlja da je stvarna brojka još i veća, uzevši u obzir promjene u ekspresiji specifične za pojedine organe biljke, razvojne stadije i okolišne stresove. Općenito, 42% svih alternativnih prekrajanja u biljkama nastaje kao posljedica kombinacije različitih mehanizama, dok mehanizam zadržavanja introna prednjači nad ostalim zasebnim mehanizmima s 40% učestalosti (Marquez i sur., 2012). Proces alternativnog prekrajanja i kod biljaka je povezan s transkripcijom, što je potvrđeno utjecajem svjetlosti na prekrajanje proteina AtRS31 (proteina SR) potrebnog za pravilan rast biljke *A. thaliana* kroz kontrolu transkripcijske elongacije (Petrillo i sur., 2014). Svjetlost regulira oko 20% transkriptoma uročnjaka (Petrillo i sur., 2014), što ukazuje na važnu biološku funkciju alternativnog prekrajanja kod biljaka, osobito u slučaju odgovora na promijenjene biotičke i abiotičke stresove (Meyer i sur., 2015). Alternativno prekrajanje regulira stresni odgovor biljke na abiotičke stimulanse poput promjene temperature, izlaganja solnom stresu i UV zračenju, sušnih uvjeta te odgovora na apscizinsku kiselinu (ABA) (Shang i sur., 2017). Primjer jedne takve regulacije je alternativna ekspresija varijanti transkripcijskog faktora toplinskog šoka HsfA2 (*eng.* Heat stress transcription factor A-2) u vrsti *A. thaliana* koja je inducirana temperaturom. Na temperaturi od 22 °C nastaje potpuni transkript *HsfA2*, na umjerenj temperaturi (37 °C) se sintetizira varijanta *HsfA2-II* s preuranjenim stop kodonom koja se degradira preko puta NMD, a na povišenoj temperaturi (42 °C) nastaje varijanta *HsfA2-III* iz koje se sintetizira krnji protein koji

veže elemente HS u promotoru gena *HsfA2*, stvarajući pritom pozitivnu povratnu spregu kojom se kontrolira vlastita ekspresija kroz alternativno prekrajanje (Shang i sur., 2017). Također je važno napomenuti da kod proteina DREB2B (*eng.* Dehydration-Responsive Element-Binding protein 2B) koji se sintetizira u uvjetima povišene temperature i suše u riži *Oryza sativa*, pri normalnim uvjetima nastaje transkript koji sadrži dodatni egzon 2, što dovodi do pomaka okvira čitanja i pojave preuranjenog stop kodona te stvaranja nefunkcionalne izoforme proteina (Staiger i Brown, 2013). Alternativno izrezivanje bitno je i u regulaciji odgovora biljke na biotičke stresove, odnosno, u obrambenim mehanizmima biljaka protiv patogena, koji su regulirani djelovanjem proteina R (*eng.* Resistance), čiji se transkripti alternativno prekrajaju. Osim toga, gen *N* u duhanu *Nicotiana tabacum* omogućuje rezistenciju biljke na virus mozaika duhana (TMV), ali je za uspješnu borbu protiv infekcije bitna i sinteza alternativnog dugog transkripta *N<sub>L</sub>*, koji sadrži alternativni egzon unutar regije trećeg introna i kodira za krnji protein (Shang i sur., 2017). Važnost alternativnog prekrajanja vidljiva je i u točnoj realizaciji genetičke informacije tijekom razvoja biljke te je potvrđena diferencijalnom ekspresijom faktora prekrajanja SR u različitim organima tijekom razvoja, što ukazuje na organ-specifičnu regulaciju alternativnog prekrajanja kod biljaka (Reddy i sur., 2013). Mutanti *A. thaliana* s defektivnim proteinom AtSR45 pokazuju različite razvojne i morfološke abnormalnosti, poput uskih listova i latica, promijenjenog broja latica i prašnika te kratkog korijena (Staiger i Brown, 2013). Alternativno prekrajanje utječe i na duljinu cirkadijanog sata kod vrste *A. thaliana*, jer mutacije u proteinu AtPRMT5 (*eng.* Protein arginine methyltransferase 5) koji metilira različite komponente kompleksa za prekrajanje uzrokuju defekte prilikom alternativnog prekrajanja gena koji sudjeluju u regulaciji cirkadijanog sata, što uzrokuje njegovo produljenje (Shang i sur., 2017). Alternativno prekrajanje gena utječe na veliki broj ostalih molekularnih mehanizama koji ovdje nisu navedeni, a reguliraju već spomenute, ali i brojne druge procese u biljkama (Staiger i Brown, 2013; Meyer i sur., 2015; Shang i sur., 2017).

### **1.3 Učinak sekundarnih struktura mRNA na translaciju proteina**

Posttranskripcijska regulacija genske ekspresije u višim eukariotima ne ovisi samo o procesiranju pre-mRNA i alternativnom prekrajanju, već i o sekundarnim strukturama molekula mRNA. Tijekom procesiranja pre-mRNA i njenog sazrijevanja, molekule mRNA se smataju i stvaraju sekundarne strukture poput ukosnica i pseudočvorova, koje blokiraju translaciju proteina



u slučaju da ribosom ne može razriješiti te strukture (Merchante i sur., 2017). To objašnjava zašto u nekim slučajevima u stanici istovremeno postoji mala količina određenog proteina, a velika količina njegovog mRNA transkripta. Sekundarne strukture mRNA kod biljaka omogućuju regulaciju homeostaze proteina u odgovoru na promjenjive okolišne uvjete (Remy i sur., 2014).

Utjecaj sekundarne strukture na translaciju kod eukariota ovisi o njejoj stabilnosti i položaju. Sekundarne strukture u području između 7-metilgvanozina na 5' kraju i start kodona AUG suprimiraju translaciju, na način da sprječavaju vezanje ribosoma, skeniranje mRNA ili migraciju ribosoma, dok sekundarne strukture nizvodno od kodona AUG mogu pojačati vjernost translacije tako da reguliraju brzinu skeniranja 40S ribosoma, omogućujući više vremena za prepoznavanje kodona AUG (Kozak, 1991). Sekundarne strukture mRNA mogu se stvarati unutar 5' i 3' UTR regija te utjecati na djelovanje molekula miRNA koje reguliraju ekspresiju gena, ili na vezanje proteina RBP (*eng.* RNA-Binding Proteins) koji moduliraju posttranskripcijsku gensku ekspresiju i translaciju (Steri i sur., 2018). Zabilježeni su i slučajevi u kojima je alternativno prekrajanje povezano sa stvaranjem sekundarnih struktura koje promiču translaciju, kao što je to slučaj sa cinkom induciranim zadržavanjem introna u 5' UTR regiji gena *ZIF2* (*eng.* Zinc-Induced Facilitator 2) u biljci *A. thaliana*, što dovodi do stvaranja sekundarne strukture koja pojačava translaciju i omogućuje rezistenciju biljke na cink (Remy i sur., 2014). Razrješenje sekundarnih struktura mRNA odvija se u početnom dijelu translacije, kada biljni kompleks eIF4F (*eng.* eukaryotic initiation factor 4F) prepoznaje 7-metilgvanozinsku kapu na 5' kraju, te uz pomoć ostalih faktora inicijacije translacije cirkularizira mRNA. Jedan od tih faktora je i helikaza eIF4A, koja pomoću ko-faktora eIF4B, odmata sekundarne strukture mRNA i omogućuje regrutaciju kompleksa 43S PIC (*eng.* 43S pre-initiation complex), čime započinje skeniranje 5' UTR regije u potrazi za kodonom AUG. Istraživanja na uročnjaku su pokazala da UTR regije generalno stvaraju manje sekundarnih struktura od kodirajućih regija te da su visoko translatirajuće mRNA manje strukturirane u području kodona AUG, što dokazuje očitu povezanost strukture mRNA i uspješnosti translacije kod biljaka (Merchante i sur., 2017).

## 1.4 Proteini MATH-BTB

Funkcionalna analiza domena članova proteinske porodice MATH-BTB pokazala je da one sudjeluju u brojnim staničnim procesima ostvarujući protein-protein interakcije s raznim faktorima (Stogois i sur., 2005; Zapata i sur., 2007). Ova proteinska porodica široko je rasprostranjena u eukariotima, uključujući niže eukariote poput skupina Alveolata i Euglenozoa te više eukariote poput monokotiledona (Liliopsida) i dikotiledona (Magnoliopsida) u biljaka te životinja (Metazoa). Proteini MATH-BTB sadrže N-terminalnu domenu MATH i C-terminalnu domenu BTB/POZ, iako su kod nekih proteina pozicije ovih dvaju domena zamijenjene ili se domene uzastopno ponavljaju (Zapata i sur., 2007). U rodu *Arabidopsis*, zabilježeno je ukupno 80 proteina koji sadrže domenu BTB/POZ, dok je samo dio njih poznat kao proteini BTB/POZ-MATH (BPM) (Gingerich i sur., 2007). Šest gena *AtBPM1-6* u vrsti *A. thaliana* kodira za najmanje 16 različitih proteina AtBPM (Škiljaica i sur., 2019) koji nastaju u procesu alternativnog prekrajanja gena. Molekularne mase proteina AtBPM kreću se između 40 i 50 kDa, a interakcijske studije pokazale su da domena BTB/POZ omogućuje formiranje homo- i heterodimera svih proteina AtBPM u *in vitro* uvjetima (Weber i sur., 2005). Svi članovi porodice BPM u uročnjaku su strukturno konzervirani (Weber i sur., 2005), a u riži se ta porodica značajno proširila na 74 člana, vjerojatno kao posljedica djelovanja pozitivne selekcije tijekom evolucije (Gingerich i sur., 2007). Proteini MATH-BTB detektirani su i u drugim biljnim i životinjskim vrstama s različitom zastupljenošću, uključujući 31 član kod kukuruza *Zea mays* (Juranić i sur., 2012; Škiljaica, 2016), 46 člana kod *Caenorhabditis elegans* (Stogois i sur., 2005) i 2 člana kod čovjeka (Juranić i sur., 2012). Ekspresija svih gena *AtBPM* detektirana je u korijenu, stabljici, cvjetovima te listovima rozete i stabljike (*eng. cauline leaves*) uročnjaka (Weber i Hellmann, 2009). Svi geni pokazuju sličan organ-specifični uzorak ekspresije, a najjača ekspresija detektirana je u cvjetnim pupovima i otvorenim cvjetovima, dok geni *AtBPM1-3* pokazuju i znatnu ekspresiju u peludnim zrcima (Lechner i sur., 2011). Proteini AtBPM1 i AtBPM2 primarno su lokalizirani u jezgri, dok su svi ostali proteini osim AtBPM4 koji je lokaliziran isključivo u citoplazmi, detektirani u citoplazmi i u jezgri (Weber i Hellmann, 2009).

### 1.4.1 Struktura proteina MATH-BTB

Domena BTB/POZ nalazi se na C-terminalnom kraju proteina MATH-BTB, a naziv je dobila po konzerviranom motivu BTB (*eng.* Bric-à-brac, Tramtrack and Broad Complex) u transkripcijskim faktorima kod vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) (Zollman i sur., 1994) te u mnogim proteinima poxvirusa koji sadrže cinkove prste (*eng.* Pox Virus, and Zinc finger, POZ) (Koonin i sur., 1992). Proteini s domenom BTB/POZ imaju različite funkcije, uključujući transkripcijsku represiju, regulaciju citoskeleta, tetramerizaciju, zatvaranje ionskih kanala i sudjelovanje u degradaciji proteina (Stogois i sur., 2005; Weber i sur., 2005). Domena BTB/POZ građena je od oko 100 aminokiselina, a osnovna struktura uključuje pet  $\alpha$ -zavojnica i trolančanu  $\beta$ -naboranu ploču. Obično je prisutna u jednoj ili dvije kopije na N-terminalnom dijelu proteina BTB/POZ u kombinaciji s ostalim domenama, stvarajući proteinske porodice: BTB/POZ-ZF (*eng.* Zinc Finger), BBK (BTB/POZ-BACK-Kelch), BPM (MATH-BTB/POZ), Rho-BTB/POZ (*eng.* Ras homology), BTB/POZ-ANK (*eng.* Ankirin). Domena BTB/POZ izrazito je konzervirana na razini tercijarne strukture, ali pokazuje malu sličnost unutar sekvenci domena iz različitih proteinskih obitelji, što znači da proteini s domenom BTB/POZ ostvaruju razne tipove protein-protein interakcija s brojnim proteinima u stanici, a često djeluju i kao transkripcijski regulatori. Evolucijski se domena BTB/POZ javlja u poxvirusima i eukariotima, a nema je u bakterijama i arheobakterijama, osim u endosimbiontu povezanim s rodом *Parachlamydia* (Stogois i sur., 2005).

Domena MATH je konzervirana domena koja se nalazi na N-terminalnom kraju proteina MATH-BTB, a ime je dobila na osnovi homologije s domenom TRAF-C faktora TRAF (*eng.* TNF-Receptor Associated Factor) i C-terminalnom domenom meprina A i B. Meprini pripadaju ekstracelularnim metaloproteazama koji sudjeluju u hidrolizi proteina, a proteini TRAF stupaju u interakciju s članovima obitelji TNFR (*eng.* Tumor Necrosis Factor Receptor; TNF Receptor) i reguliraju signalizaciju staničnog rasta. Stoga, s obzirom na njihovu visoku homologiju, domena TRAF-C naziva se još i domena MATH (*eng.* Maprin and TRAF Homology). Domena MATH sastoji se od oko 180 aminokiselina, a građena je od 7 - 8 antiparalelnih  $\beta$ -naboranih ploča. Proteini s domenom MATH asociraju s drugim proteinskim domenama, uključujući peptidaze, filamin, domenu RluA i domenu BTB/POZ, motiv TRIM (*eng.* Tripartite Motif), domenu astacin i domenu RING (*eng.* Cullin-Really Interesting New Gene) i ZF (Zapata i sur., 2007). Svi proteini s domenom MATH sudjeluju u regulaciji procesiranja proteina (Zapata i sur., 2007), uključujući i

proteine MATH-BTB/POZ koji funkcioniraju kao ubikvitin ligaze E3 i sudjeluju u degradaciji proteina putem ubikvitin proteasom sustava (Xu i sur., 2003; Pintard i sur., 2003; Zapata i sur., 2007.). Proteini s domenom MATH identificirani su u eukariotima, uključujući niže eukariote poput praživotinja i jednostaničnih gljiva, te virusima iz skupine Iridoviridae, a nisu pronađeni kod bakterija i arheobakterija, što sugerira da se domena pojavila rano u evoluciji eukariota (Zapata i sur., 2007).

#### **1.4.2 Uloga proteina BPM u degradaciji proteina ovisnoj o ubikvitinu**

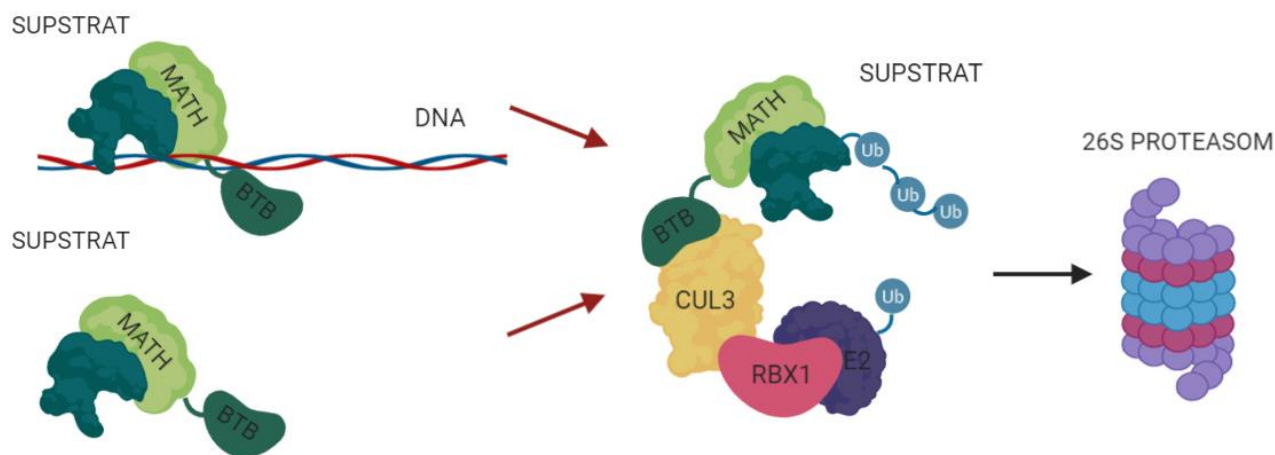
Proteinska degradacija od posebne je važnosti kod biljaka zbog njihovog sesilnog načina života, jer omogućuje regulaciju različitih razvojnih i fizioloških procesa u stanicama kao odgovor na promijenjene okolišne uvjete. Oštećeni ili krivo smotani proteini moraju se ukloniti iz stanice, a to se najčešće odvija putem degradacije proteina ovisne o ubikvitinu u 26S proteasomima. Ovaj put degradacije je visoko konzerviran u eukariotima (Hua i Vierstra, 2011), a uključuje označavanje ciljanog proteina pomoću signala poliubukvitina (Pintard i sur., 2004; Willems i sur., 2004). Tri enzima sudjeluju u ovom procesu. Aktivirajući enzim E1 i ubikvitin konjugirajući enzim E2 sudjeluju u aktivaciji i konsektivnom prijenosu ubikvitina kroz stvaranje tioesterske veze, a ubikvitin ligaze E3 imaju ulogu u prepoznavanju supstrata i omogućuju degradaciju (Pintard i sur., 2004; Willems i sur., 2004). Potom 26S proteasom prepoznaje poliubikvitinirani signal na supstratu, linearizira protein i uvodi ga u katalitičko mjesto, unutar kojega se događa proteoliza ovisna o ATP-u (Willems i sur., 2004; Smalle i Vierstra, 2004). Postoje dva osnovna tipa ubikvitin E3 ligaza: ligaze s domenom HECT (*eng.* Homologous to E6-AP C-terminus) koje posjeduju unutrašnju katalitičku aktivnost te ligaze s domenom RING (*eng.* Cullin-RING ligases, CRLs), koje djeluju na način da usmjeravaju enzim E2 prema specifičnom supstratu kojeg često prepoznaju adaptorski proteini, i omogućuju degradaciju (Willems i sur., 2004; Pintard i sur., 2004). Ligaze s domenom RING uključuju APC/C (*eng.* Anaphase promoting Complex/Cyclosome), SCF (*eng.* Skp1/Cullin/F-box) i CUL3-ligaze povezane s proteinima koji sadrže domenu BTB/POZ (CUL3-BTB) (Pintard i sur., 2004). Sva tri tipa ligaza pokazuju sličnost u građi: središnji protein kulin povezuje katalitički dio kompleksa (protein s RING domenom i enzim E2) s adaptorskim dijelom koji prepoznaje supstrat. U slučaju ligaza CUL3-BTB, protein CUL3 s C-terminalnom regijom veže protein RBX1 (*eng.* RING-Box protein 1) vezan na enzim E2 (Chen i Hellmann, 2013), a s N-terminalnom regijom prepoznaje proteine s domenom

BTB/POZ (Pintard i sur., 2003; Chen i Hellmann, 2013). Dok domena BTB/POZ omogućuje interakciju s CUL3, sekundarne domene ovih proteina omogućuju vezanje specifičnog supstrata te njegovo pozicioniranje u blizinu enzima E2 za ubikvitinaciju (Chen i Hellmann, 2013). Interakcijska studija provedena na biljci *A. thaliana* u *in vitro* uvjetima potvrdila je da proteini AtBPM1 i AtBPM3 uspostavljaju interakciju s AtCUL3a i AtCUL3b pomoću C-terminalne domene BTB/POZ (Weber i sur., 2005), dok N-terminalna domena MATH vjerojatno obavlja funkciju prepoznavanja i pozicioniranja supstrata (Weber i sur., 2005; Weber i Hellmann, 2009; Lechner i sur., 2011; Morimoto i sur., 2017). Ovakav tip interakcija dokazan je u slučaju BTP/POZ-MATH proteina CeMeI-26 kod vrste *C. elegans*, koji u kompleksu s CUL3 sudjeluje u degradaciji proteina CeMEI-1 u ranim embrijima, kako bi se omogućilo formiranje diobenog vretena na prijelazu iz mejotičke u mitotičku diobu (Xu i sur., 2003; Pintard i sur., 2003). U prilog činjenici da proteini AtBPM djeluju kao adaptor supstrata ligaze E3 u uročnjaku ide i potvrda postojanja preklapajućih ekspresijskih uzoraka proteina AtCUL3, AtBPM1 i AtBPM3 u većini organa biljke (Weber i sur., 2005). Iako su prvotna istraživanja pokazala da AtCUL3 može interagirati s proteinima AtBPM u jezgri i citoplazmi (Weber i Hellmann, 2009), novija istraživanja pokazuju da postoji razlika u sub-celularnoj lokalizaciji tih dvaju proteina, tj. dokazano je da kulin 3 i protein AtBPM1 ne kolokaliziraju u jezgri (Leljak Levanić i sur., 2012). Zajednička lokalizacija tih dvaju proteina u citoplazmi vjerojatno omogućuje degradaciju proteina ovisnu o ubikvitinu putem 26S proteasoma, dok nedostatak proteina CUL3 u jezgri upućuje da protein AtBPM1 ima funkcije neovisne o kulinu 3 (Leljak Levanić i sur., 2012).

### **1.4.3 Proteini BPM kao adaptor supstrata ligaze CUL3 u uročnjaku**

Funkcionalne analize proteina BPM u uročnjaku pokazale su da oni djeluju kao supstrat-specifični adaptor ligaza CUL3<sup>BPM</sup>, čiji su supstrati transkripcijski faktori iz minimalno triju proteinskih obitelji: ERF/AP2 (*eng.* Ethylene Response Factor/Apetala 2), klase I transkripcijskih faktora HD-ZIP i R2R3-MYB, zbog čega proteini BPM imaju važnu ulogu u regulaciji razvoja sjemena i odrasle biljke, cvjetanju te odgovorima biljke na abiotičke stresove (Weber i Hellmann, 2009; Lechner i sur., 2011; Chen i sur., 2013; 2015; Morimoto i sur., 2017; Julian i sur., 2019). Proteini BPM mogu vezati specifične faktore na razini DNA (Chen i sur., 2013; 2015) ili dok su faktori slobodni u jezgri (Morimoto i sur., 2017), što dovodi do nastanka CUL3<sup>BPM</sup> kompleksa te posljedično omogućuje degradaciju faktora u 26S proteasomu i negativno utječe na njihovu

transkripcijsku aktivnost. Važno je napomenuti da novi dokazi ukazuju kako interakcija proteina BPM s transkripcijskim faktorima u jezgri ne mora nužno voditi njihovoj proteasomalnoj degradaciji, već može interferirati s afinitetom vezanja DNA i na taj način regulirati transkripciju nizvodnih gena tih faktora (Weber i Hellmann, 2009; Leljak Levanić i sur., 2012). Pojednostavljen prikaz sastavljanja i funkcionalne važnosti CUL3<sup>BPM</sup> kompleksa u degradaciji transkripcijskih faktora prikazan je na **Slici 4**.



**Slika 4.** Funkcionalna važnost kompleksa CUL3<sup>BPM</sup> u degradaciji specifičnih transkripcijskih faktora (TF). Preko N-terminalne domene MATH, proteini BPM vežu ciljane TF-ove dok su oni vezani na DNA ili slobodni u jezgri te interferiraju s njihovim djelovanjem. Proteini BPM djeluju kao adaptori supstrata CUL3<sup>BPM</sup> ligaza: CUL3a ili CUL3b ostvaruje interakciju s C-terminalnom domenom BTB/POZ proteina BPM koji je vezan na supstrat, a s druge strane veže protein RBX1 koji usmjerava enzim E2 prema supstratu te omogućuje ubikvitinaciju i posljedično degradaciju supstrata. Slika je izrađena u programu Biorender (<https://biorender.com/>).

Transkripcijski faktori iz skupine ERF/AP2 vezani uz odgovor na razinu etilena u stanicama prvi su otkriveni interakcijski partneri proteina BPM u uročnjaku (Weber i Hellmann, 2009; Chen i sur., 2013). Članovi porodice ERF/AP2 važni su u regulaciji ključnih razvojnih procesa u biljci (Lin i sur., 2008), ali i kao medijatori odgovora na promijenjene abiotičke i biotičke stresove (Lin i sur., 2008; Chen i sur., 2013). Tako primjerice faktor RAP2.4 iz ove skupine biljci omogućuje toleranciju na sušne uvjete, povećani salinitet (Lin i sur., 2008) i osmotski stres (Weber i Hellman, 2009). Predloženi mehanizam djelovanja proteina BPM pretpostavlja da oni vežu faktore

ERF/AP2 pomoću domene MATH te interferiraju s njihovim afinitetom vezanja DNA, da bi ih u konačnici usmjerili u proteasomalnu degradaciju (Weber i Hellmann, 2009). Proteini BPM važni su i u regulaciji odgovora biljke na apscizinsku kiselinu, čime sudjeluju u odgovoru biljke na biotičke i abiotičke stresove, ali i utječu na rast i razvoj biljke te njenu reprodukciju (Lechner i sur., 2011). Stresni uvjeti poput hladnoće, suše i saliniteta potiču sintezu ABA-e u biljci, što utječe na klijanje sjemena i dormanciju, dovodi do zatvaranja puči i sprječava transpiraciju te omogućuje prilagodbu genske ekspresije u tim uvjetima (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006). Transkripcijski faktor HB6 (*eng.* Homeobox protein 6) iz klase I transkripcijskih faktora HD-ZIP djeluje kao negativni regulator odgovora biljke na ABA-u, što dovodi do smanjene osjetljivosti na hormon tijekom klijanja sjemena i zatvaranja puči. Dokazano je da domena MATH proteina BPM direktno interagira s domenom leucinskog zatvarača faktora HB6, čime se faktor označava za degradaciju i na taj način se kontrolira njegova stabilnost u stanici te utječe na odgovor biljke na hormon ABA-u (Lechner i sur., 2011). Proteini BPM imaju i direktnu pozitivnu ulogu u regulaciji sušnog i osmotskog stresa. Weber i Hellman (2009) utvrdili su da se ekspresija gena *BPM1* i *BPM4* inducira prilikom izlaganja sušnom i osmotskom stresu, dok je istraživanje Škiljaica i sur. (2019) pokazalo da overekspresija *BPM1* omogućuje povećanu rezistenciju na apscizinsku kiselinu i toleranciju osmotskog stresa.

## **1.5 Uloga proteina BPM u odgovoru na temperaturni stres u uročnjaku**

Nova istraživanja pokazala su da temperaturni stres kod uročnjaka ima ulogu u regulaciji stabilnosti proteina *BPM1* (Škiljaica i sur., 2018), što je potvrđeno i induciranom ekspresijom gena *BPM1-3* u uvjetima povišene temperature (Škiljaica i sur., 2019). To je posebno bitno u okviru otkrića da su proteini BPM bitni u regulaciji temperaturnog stresa kroz interakciju s transkripcijskim faktorom DREB2A (Dehydration-Responsive Element-Binding protein 2A) iz obitelji ERF/AP2 (Morimoto i sur., 2017). Ekspresija DREB2A inducirana je u stresnim uvjetima (Sakuma i sur., 2006; Morimoto i sur., 2017). DREB2A je glavni faktor koji, vezanjem na promotorske cis-djelujuće elemente DRE/CRT (*eng.* DRE/C Repeat), kontrolira ekspresiju gena koji sudjeluju u odgovoru na temperaturne i sušne stresove (Nakashima i sur., 2009). Analiza domena DREB2A korištenjem protoplasta biljke *A. thaliana* otkrila je da u središnjoj regiji

DREB2A postoji 30-aminokiselina duga negativna regulatorna domena (NRD) te da delecija ove regije dovodi do nastanka stabilne i konstitutivno aktivne forme DREB2A CA. Overekspresija DREB2A CA u transgeničnim biljkama dovodi do inducirane ekspresije ciljanih gena i potiče otpornost biljaka na sušne uvjete, ali istovremeno negativno utječe na biljke uzrokujući patuljasti rast i smanjenu reprodukciju (Sakuma i sur., 2006). Degradacija faktora DREB2A pomoću 26S proteasoma posredovana je proteinima DRIP1/2 (*eng.* DREB2A-Interacting proteins 1/2) te proteinima BPM koji vežu DREB2A u jezgri, na način da domena MATH proteina BPM prepoznaje N-terminalni dio domene NRD faktora DREB2A s motivom SBC (*eng.* SPOP-Binding Consensus) (Morimoto i sur., 2017). Motiv SBC prisutan je u svim supstratima koje prepoznaje domena MATH, a njegovo postojanje u skladu je s visokom sličnosti između sekvenci domena MATH u BPM proteinima uročnjaka (84 – 100%) (Škiljaica i sur., 2019). U uvjetima temperaturnog stresa, *DREB2A* se aktivira te djeluje na ekspresiju nizvodnih gena, a prekomjerno nakupljanje faktora sprječava se kroz negativnu regulaciju stabilnosti DREB2A s proteinima BPM, koji time moduliraju odgovor biljke na temperaturni stres i sprječavaju štetan utjecaj akumulacije DREB2A na biljni rast (Morimoto i sur., 2017). DREB2A pozitivno utječe i na toleranciju sušnog stresa, što je u suprotnosti s djelovanjem faktora HB6 koji je isto pod kontrolom proteina BPM (Lechner i sur., 2011). Stabilizacija proteina BPM u uvjetima povišene temperature (Škiljaica i sur., 2018) vjerojatno objašnjava značajan pad razine DREB2A unutar nekoliko sati od izlaganja stresu (Morimoto i sur., 2017), što znači da se DREB2A kontinuirano degradira tijekom stresnog odgovora. Dokazano je da proteini BPM posreduju u degradaciji DREB2A i u normalnim uvjetima, što dodatno potvrđuje kontinuirani i brzi katalitički obrt ovih proteina, čija se razina u stanici mora precizno modulirati ovisno o okolišnim uvjetima (Morimoto i sur., 2017).



## 1.6 Cilj rada

Prema novom istraživanju Škiljaica i sur. (2019), u uvjetima temperaturnog stresa u uročnjaku je uočeno diferencijalno umnažanje varijanti gena *BPM1*, s time da se varijanta gena *BPM1.2* preferencijalno umnaža u odnosu na varijantu *BPM1.1*. Ovi rezultati ukazuju da je regulacija ekspresije, ili čak alternativnog prekrajanja gena *BPM1*, ovisna o temperaturi (Škiljaica i sur., 2019). S obzirom na važnu ulogu posttranskripcijske regulacije u uspješnoj prilagodbi biljaka na promjenjivi okoliš, važno je istražiti da li promjene okolišne temperature utječu na alternativno prekrajanje ostalih gena *BPM*, čija je ekspresija inducirana temperaturom (*BPM1-3*). Shodno tome, cilj ovog rada bio je pokazati učinak temperature na prisutnost ekspresijskih varijanti gena *BPM1-3* u klijancima uročnjaka divljeg tipa te istražiti postojanje novih varijanti koje nastaju pod utjecajem temperaturnih varijacija.

U tu svrhu koristile su se molekule cDNA (*eng.* complementary DNA) dobivene iz klijanaca uročnjaka izloženih različitim temperaturama, koje su poslužile kao kalup za umnažanje pojedinih ekspresijskih varijanti gena *BPM1-3* u lančanoj reakciji polimerazom s gen specifičnim početnicama. S obzirom na to da se ekspresija pojedinih varijanti gena *BPM1-3* dosad nije proučavala u uvjetima temperaturnog stresa, dio eksperimenta je uključivao dizajn i optimizaciju gen specifičnih početnica za umnažanje. Glavni cilj ovog rada bio je ispitati postoje li u korištenim testnim uvjetima varijante gena *BPM1-3* koje dosada još nisu otkrivene. S time u vezi, drugi dio ovog eksperimenta uključivao je TA kloniranje i sekvenciranje nepoznatih fragmenata koji su se umnožili na pojedinim temperaturama, kako bi se ispitala njihova sličnost s postojećim varijantama gena *BPM1-3*.

# 2. MATERIJALI I METODE

## 2.1 Materijali

### 2.1.1 Biljni materijal

U svrhu istraživanja alternativnog prekrajanja gena *BPM1*, *BPM2* i *BPM3* u uvjetima temperaturnog stresa korišteni su klijanci divljeg tipa uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*), ekotip Columbia (Col-0).

### 2.1.2 Bakterijski soj

Za kloniranje PCR fragmenata korištene su kompetentne bakterije *Escherichia coli* soj XL-10 Gold. Bakterije su uzgajane na 37 °C u krutom ili tekućem mediju Luria Bertani (LB) s dodatkom antibiotika ampicilina (Amp).

### 2.1.3 Mediji za rast

Za uzgoj klijanaca *A. thaliana* korišten je kruti hranjivi medij MS0 (pH 5,7 – 5,8), čiji je sastav prikazan u **Tablici 1**.

Za uzgoj bakterija *E. coli* korišteni su kruti i tekući mediji LB (pH 7) koji sadrže 10 g/l bakto triptona, 5 g/l ekstrakta kvasca i 10 g/l NaCl (s dodatkom 15 g/l agara za kruti medij LB). Nakon transformacije bakterija toplinskim šokom, medij SOC je korišten za oporavak bakterija te s ciljem postizanja maksimalne učinkovitosti transformacije. Medij SOC (*eng.* Super Optimal broth with Catabolite repression) sadrži 20 g/l bakto triptona, 5 g/l ekstrakta kvasca, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub> i 20 mM glukoze.

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

Sastojci medija	Koncentracija (mg/l)
<b>Makronutrijenti</b>	
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O	755
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	370
<b>Mikronutrijenti</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,025
KI	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0,025
MnSO <sub>4</sub> × 4H <sub>2</sub> O	16,9
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	8,6
FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
<b>Vitamini i organski dodaci</b>	
Saharoza	20000
m-inozitol	100
nikotinska kiselina	0,5
piridoksin-HCl	0,5
tiamin-HCl	0,1
glicin	2
agar	8000

## 2.1.4 Pufferi

### 2.1.4.1 TAE

Za elektroforezu i pripremu agaroznih gelova korišten je puffer 1 × TAE (*eng.* Tris-HCl Acetate Ethylenediaminetetraacetic acid) (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0).

### 2.1.4.2 TBE

Za razliku od uobičajeno korištenog puffera TAE, puffer TBE (*eng.* Tris Borate Ethylenediaminetetraacetic acid) omogućuje bolju razlučivost i bržu migraciju manjih fragmenata DNA na agaroznom gelu (Miura i sur., 1999). S ciljem boljeg razdvajanja kraćih fragmenata na

gelu s većim postotkom agaroze (2%) korišten je  $0,5 \times$  TBE pufer (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8,0).

### 2.1.5 Početnice za PCR

Početnice koje su korištene u istraživanju i njihove temperature taljenja  $T_m$  (*eng.* melting temperature) navedene su u **Tablici 2**. Početnice Akt3 fw i Akt3 rev korištene su za potvrdu uspješnosti reverzne transkripcije molekula RNA izoliranih iz klijanaca te za provjeru kvalitete izolirane genomske DNA. Ostale početnice navedene u **Tablici 2** korištene su za analizu ekspresije varijanti gena *BPM1-3* te u svrhu pronalaska novih varijanti tih gena. U **Tablici 3** navedene su kombinacije početnica koje sam koristila za umnažanje varijanti gena *BPM1-3*. Matične otopine početnica pripremljene su u redestiliranoj vodi (Mili-Q®) u koncentraciji od 100  $\mu$ M te su prema potrebi razrijeđene na koncentraciju od 10  $\mu$ M prije korištenja. Radne i matične otopine početnica skladištene su na -20 °C. Postupak dizajniranja početnica opisan je u poglavlju 3.2.1.

**Tablica 2.** Sekvence i temperature taljenja početnica korištenih u reakcijama PCR.

Naziv gena	Naziv početnice	Nukleotidna sekvenca 5' – 3'	$T_m$ (°C)
<i>Aktin 3</i>	<b>Akt3 fw</b>	GGCATCATACTTTCTACAATG	66,1
	<b>Akt3 rev</b>	CACCACTGAGCACAAT	65,6
<i>BPM1</i>	<b>FW BPM1.2</b>	GCCCAAACCTCTGTTTTACAAAATC	60,1
	<b>FW BPM1.123</b>	GATCGCTTTTCGTTATATTCATTCTC	60,9
	<b>REV BPM1.123</b>	GCACAAATCTTTCTTCTTTCTCTC	60,1
	<b>REV BPM1.3</b>	ACGTGAAGACATGACTGTCTAC	60,3
	<b>REV BPM1.1</b>	CTTACAGATCCTGTCATGTAATTTG	60,9
	<b>FW BPM2.12345</b>	AAACCGATCTATCAAGCAAGTGG	61,1
<i>BPM2</i>	<b>FWm BPM2.1345</b>	ATAATCATAGAAGACGTACAAGCC	60,1
	<b>REV BPM2.3</b>	GAAATCGAGACAATCATGCAATCC	61,8
	<b>REV BPM2.5</b>	GCAAGGAGTGATCTTCTGTACC	62,1
	<b>REV BPM2.13</b>	GACTTAAATAGTTGTCCTATTGGAC	60,9
	<b>REV BPM2.2</b>	AGCTTTCAGCCTCAACTTCTAAAG	61,8
	<b>REV BPM2.134</b>	GGGACCTCAAATAAGAAAGCTTAG	61,8
<i>BPM3</i>	<b>FW BPM3.1234</b>	ACAAACAACCTCTCGTCTTCTAG	61,1
	<b>FW BPM3.34</b>	AGACTCGATGCTTGATTAGACG	60,3
	<b>FWm BPM3.1234</b>	CATCTCCAGCAAACCTTGGGAG	61,3
	<b>REV BPM3.2</b>	CTGAAACTATATGCAACCCGTAC	61,1
	<b>REV BPM3.4</b>	CAAAACAACCTAATTATCGCACCTAG	60,9
	<b>REV BPM3.13</b>	TCAATTCTCACAGCTCTTTGTGG	61,1

**Tablica 3.** Kombinacije početnica za umnažanje varijanti gena *BPM1-3* i očekivane veličine fragmenata nakon reakcija PCR, u kojima su kao kalup korištene molekule cDNA i genomska DNA. Za pojedine ekspresijske varijante nije bilo moguće napraviti specifične početnice, pa su osmišljeni setovi početnica koji umnažaju više varijanti, ali daju produkte različitih veličina.

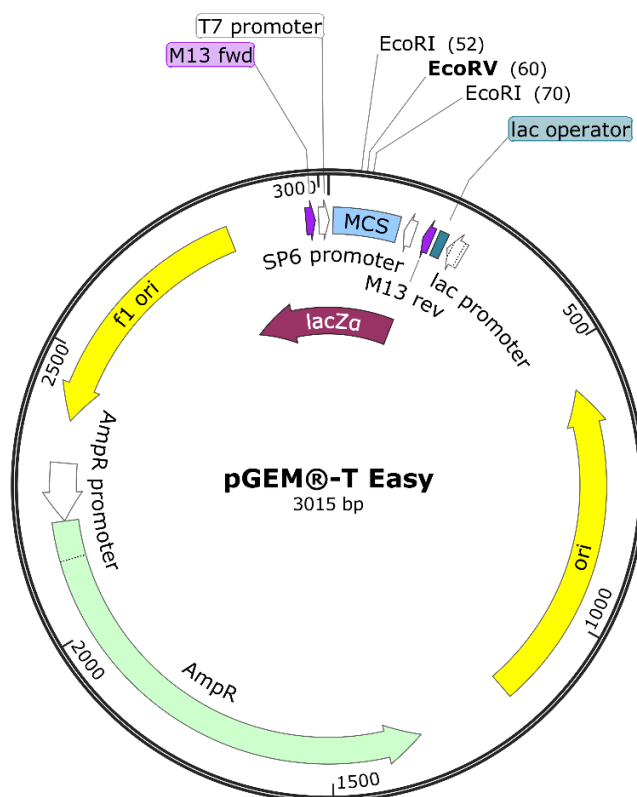
Naziv gena	Naziv varijante	Set početnica	Veličina fragmenta na kalupu cDNA (pb)	Veličina fragmenta na kalupu gDNA (pb)
<i>BPM1</i> (AT5G19000)	<i>BPM1.1</i> (AT5G19000.1)	FW BPM1.123 REV BPM1.1	1810	2665
	<i>BPM1.2</i> (AT5G19000.2)	FW BPM1.2 REV BPM1.123	1700	2450
	<i>BPM1.3</i> (AT5G19000.3)	FW BPM1.123 REV BPM1.3	1741	-
<i>BPM2</i> (AT3G06190)	<i>BPM2.1</i> (AT3G06190.1)	FW BPM2.12345 REV BPM2.13	1949	2727
	<i>BPM2.2</i> (AT3G06190.2)	FW <sub>m</sub> BPM2.1345 REV BPM2.134	840	1457
	<i>BPM2.2</i> (AT3G06190.2)	FW BPM2.12345 REV BPM2.2	1086	1355*
	<i>BPM2.2</i> (AT3G06190.2)	FW BPM2.12345 REV BPM2.3	1231	1581
	<i>BPM2.3</i> (AT3G06190.3)	FW BPM2.12345 REV BPM2.13	2280	2727
	<i>BPM2.3</i> (AT3G06190.3)	FW <sub>m</sub> BPM2.1345 REV BPM2.134	1171	1457
	<i>BPM2.4</i> (AT3G06190.4)	FW <sub>m</sub> BPM2.1345 REV BPM2.134	923	1457
	<i>BPM2.5</i> (AT3G06190.5)	FW BPM2.12345 REV BPM2.5	1398	2079
<i>BPM3</i> (AT2G39760)	<i>BPM3.1</i> (AT2G39760.1)	FW <sub>m</sub> BPM3.1234 REV BPM3.13	433	1406
	<i>BPM3.2</i> (AT2G39760.2)	FW BPM3.1234 REV BPM3.2	1139	1710
	<i>BPM3.3</i> (AT2G39760.3)	FW BPM3.34 REV BPM3.13	460	825
	<i>BPM3.3</i> (AT2G39760.3)	FW <sub>m</sub> BPM3.1234 REV BPM3.13	482	1406
	<i>BPM3.4</i> (AT2G39760.4)	FW BPM3.1234 REV BPM3.4	1186	2316

\* Početnica REV BPM2.2 veže se na način da je 18 (od 24) pb na njenom 3' kraju komplementarno sekvenci u genomskoj DNA, što bi moglo umanjiti mogućnost umnažanja genomske DNA ovim setom početnica.

## 2.1.6 Plazmid

Plazmid pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems (Promega) korišten je za ugradnju fragmenata dobivenih u reakciji PCR tehnikom TA kloniranja. Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy je u lineariziranom obliku, pocijepan restrikcijским enzimom EcoRV koji stvara tupe krajeve. Pomoću enzima terminalne transferaze, dideoksitimidin trifosfat (ddTTP) dodan je na 3' krajeve prilikom proizvodnje lineariziranog plazmida kako bi se osigurala ugradnja jednog terminalnog timidina na oba 3' tupa kraja (Holton i Graham, 1991). PCR produkti korišteni u ovom istraživanju umnoženi su termostabilnom Taq DNA polimerazom koja dodaje jedan adenin na 3' kraj umnoženog fragmenta. Na taj način povećava se učinkovitost ligacije fragmenata sprječavajući ponovnu cirkularizaciju vektora.

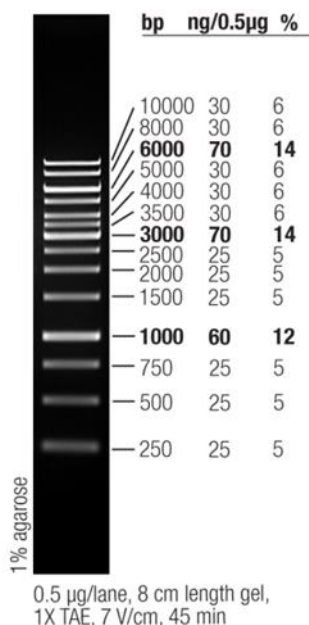
Vektorska mapa plazmida pGEM<sup>®</sup>-T Easy prikazana je na **Slici 5**. Odabrani fragmenti ugrađeni su u MCS (*eng.* Multiple Cloning Site), unutar restrikcijskog mjesta enzima EcoRV. Mjesto MCS nalazi se unutar regije gena *lacZα* koji kodira za  $\alpha$ -peptid enzima  $\beta$ -galaktozidaza. Insercijskom inaktivacijom gena *lacZα* omogućuje se identifikacija rekombinanata pomoću plavo-bijele selekcije.



**Slika 5.** Prikaz vektorske mape plazmida pGEM<sup>®</sup>-T Easy (3015 pb) s restrikcijskim mjestima enzima EcoRV i EcoRI napravljen u programu SnapGene Viewer. Mjesto MCS omeđeno je promotorima T7 i SP6 RNA polimeraze. M13 fw i M13 rev su uzvodne i nizvodne početnice korištene za sekvenciranje. Plazmid sadrži i dva ishodišta replikacije (ori i fl ori) te gen AmpR za rezistenciju na ampicilin radi selekcije transformanata. Sekvenca je preuzeta s: [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic\\_cloning\\_vectors&plasmid=pGEM-T\\_Easy](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pGEM-T_Easy).

### 2.1.7 DNA molekularni standard

Za analizu fragmenata DNA u agaroznoj gel elektroforezi korišten je molekularni biljeg GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific) prikazan na **Slici 6**.



**Slika 6.** Molekularni biljeg GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific) za provjeru veličine molekula DNA. Veličine fragmenata molekule DNA označene su brojevima (pb). Preuzeto s: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013004\\_GeneRuler\\_1kb\\_DNALadder\\_250ug\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013004_GeneRuler_1kb_DNALadder_250ug_UG.pdf).

## 2.2 Metode

### 2.2.1 Sterilizacija sjemenki i uzgoj klijanaca

Sterilizacija sjemenki podrazumijeva postupak uklanjanja kontaminacija uzrokovanih mikroorganizmima kako one kasnije ne bi utjecale na vjerodostojnost rezultata i daljnji tijek istraživanja. Sterilizaciju sam provodila koristeći sterilizacijsku otopinu Izosana G (Pliva®) i mukazola na sljedeći način. Sjemenke biljke *A. thaliana* prebacila sam u mikroepruvetu od 1,5 ml te dodala 1 ml 70% etanola. Nakon inkubacije u trajanju od 1 min, pažljivo sam odstranila etanol i dodala 1 ml vodene otopine 1% Izosana G (100% natrij dikloroizocijanurat dihidrat) i 0,1% mukazola. Sjemenke sam inkubirala 10 min na sobnoj temperaturi (*eng.* Room Temperature, RT), uz miješanje na rotoru (DYNAL Sample mixer, model MXICI, Bidspotter). Potom sam odstranila sterilizacijsku otopinu i isprala sjemenke pet puta sa 1 ml sterilne H<sub>2</sub>O u sterilnim uvjetima laminara. Sjemenke sam ostavila u 500 µl sterilne H<sub>2</sub>O te pomoću mikropipete nasadila na krute hranjive podloge MS0. Na jednu petrijevu zdjelicu promjera 6 cm nasadila sam oko 15 sjemenki. Ploče sam potom zatvorila parafilmom te pohranila 48 h na temperaturi 4 °C radi vernalizacije. Nakon toga ploče sam vertikalno inkubirala u klima komori s uvjetima dugog dana (16 h svijetlo/8 h mrak) na 24 °C i intenzitetom svjetla od 3993 lx, u trajanju od 12 dana.

### 2.2.2 Tretman klijanaca temperaturnim stresom

U svrhu analize utjecaja temperaturnih varijacija na ekspresiju varijanti gena *BPM1-3* i pronalaska novih varijanti, klijance *A. thaliana* izložila sam uvjetima temperaturnog stresa. Tretman sam provela nakon 12 dana, kada su klijanci dovoljno narasli. Klijanci su uzorkovani neposredno prije izlaganja različitim temperaturama te 3 sata nakon izlaganja temperaturama od 4 °C (inkubacija petrijevki s klijancima na površini leda), 24 °C i 37 °C. Prilikom temperaturnih tretmana klijanci su bili osvjetljeni fluorescentnim svjetlom intenziteta 3000 - 4000 lx.

### 2.2.3 Izolacija ukupne RNA iz klijanaca

Ukupnu RNA izolirala sam iz klijanaca pomoću Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus Kit (Zymo Research). Uzorak za RNA izolaciju sadržavao je 5 klijanaca koje sam pomoću pincete oprezno, pazeći da im pritom ne oštetim korijen, prenijela na filter papir te je uzorku nakon



uklanjanja vodenih kapljica izmjerena masa. Klijance sam prebacila u mikroepruvete od 1,5 ml u koje sam prethodno dodala staklene kuglice i lizirala tkivo tako što sam ga dva puta izmjenično smrznula u tekućem dušiku i samljela 8 s u silamatu (Silver Mix, C.M.F. Srl.). Na tkiva sam potom dodala 600 µl TRI Reagenta® (Ambion) koji inhibira aktivnost RNaza, a smjese sam centrifugirala 10 min na 16 100 g pri 4 °C (Eppendorf 5145 R). Iako ovaj korak nije naveden u protokolu proizvođača, po 450 µl supernatanta sam prebacila u nove mikroepruvete i ponovno centrifugirala 2 min pri istim uvjetima, jer su nakon prethodnog centrifugiranja supernatanti ostali mutni. Postupak izolacije provela sam prema protokolu, uz izmjenu u opcionalnom koraku digestije DNazom na koloni, gdje sam koristila reagens drugog proizvođača. Uzorke na kolonama sam tretirala prethodno priređenom otopinom: 0,5 µl DNase I Amplification Grade (Invitrogen), 7,5 µl 10 × DNase I Reaction Buffer (Invitrogen) i 67 µl DEPC H<sub>2</sub>O. U svrhu eliminacije genomske DNA, tretman DNazom je u nekim uzorcima rađen nakon elucije s kolone.

Izoliranu ukupnu RNA sam pročistila pomoću OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research) kako bih uklonila kontaminacije u obliku polifenola i ostalih sekundarnih metabolita, koje mogu inhibirati reverznu transkripciju i reakciju PCR. Pročišćavanje sam provela prema protokolu, uz iznimku kod centrifugiranja, koje sam provela na 4 °C. Izoliranu RNA spremila sam na -20 °C do korištenja.

## 2.2.4 Reverzna transkripcija

U svrhu dobivanja molekule cDNA iz uzoraka izolirane RNA, koristila sam reverznu transkripciju. Koncentraciju i čistoću izolirane RNA izmjerila sam spektrofotometrijski na uređaju NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) kako bih koristila odgovarajući volumen RNA za reverznu transkripciju. Reverznu transkripciju sam provela pomoću enzima RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) po protokolu za dobivanje jednolančane cDNA i s odgovarajućim kemikalijama, uključujući i opcionalnu inkubaciju na povišenoj temperaturi. Protokol je dostupan na: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012886\\_RevertAid\\_H\\_Minus\\_Reverse\\_Transcript\\_ep0451\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012886_RevertAid_H_Minus_Reverse_Transcript_ep0451_UG.pdf). U reakciji sam koristila početnicu Oligo(dT)18 Primer (Thermo Scientific) koja je omogućila specifično umnažanje mRNA iz uzoraka. Dobivenu cDNA spremila sam na -20 °C do korištenja u reakciji PCR sa specifičnim početnicama za varijante gena *BPM1-3*.

## 2.2.5 Izolacija ukupne genomske DNA

Izolaciju genomske DNA iz klijanaca uročnjaka provela sam koristeći DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). Po pet klijanaca sam osušila na papirnatom ručniku, prebacila ih u mikroeprovete od 1,5 ml sa staklenim kuglicama, smrznula u tekućem dušiku te spremila na -80 °C do izolacije. Tkiva sa staklenim kuglicama sam samljela u silamatu na način koji je opisan u poglavlju 2.2.3. Postupak izolacije provela sam prema protokolu, uključujući i opcionalan korak centrifugiranja lizata, međutim, eluciju nisam izvršila dodajući  $2 \times 100 \mu\text{l}$  pufera AE, nego  $2 \times 50 \mu\text{l}$  kako bih dobila koncentriraniju otopinu. Izoliranu DNA spremila sam na -20 °C.

## 2.2.6 Standardna PCR reakcija

Lančana reakcija polimerazom (*eng.* Polymerase Chain Reaction, PCR) je metoda koja omogućuje *in vitro* eksponencijalno umnažanje fragmenata od interesa. Metodu PCR sam koristila za umnažanje gena *Aktin 3* u molekuli cDNA kako bih potvrdila uspješnost reverzne transkripcije te za provjeru kvalitete izolirane genomske DNA. Ovu metodu koristila sam i u svrhu provjere efikasnosti početnica za umnažanje varijanti *BPM1-3*, a većinu reakcija PCR provodila sam s ciljem umnažanja pojedinih varijanti gena *BPM1-3* te pronalaska novih varijanti, koristeći cDNA dobivenu reverznom transkripcijom.

Uspješnost transformacije plazmidnom DNA također sam provjeravala pomoću metode PCR, u kojoj sam kao kalup koristila prekonoćne bakterijske kulture. Kalup sam pripremila na način da sam  $100 \mu\text{l}$  prekonoćne suspenzije centrifugirala 2 min na 16 000 g pri RT (Eppendorf 5415 C), uklonila tekući medij LB, resuspendirala bakterije u  $100 \mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O i denaturirala 5 min na 95 °C. Volumen od  $2 \mu\text{l}$  te otopine sam koristila kao kalup u reakciji PCR.

Sastav reakcija PCR ovisio je o vrsti korištene DNA polimeraze i volumenu kalupa koji sam koristila. Program reakcija je ovisio o temperaturi prijanjanja početnica *T<sub>a</sub>* (*eng.* annealing temperature) koja ovisi o sastavu i temperaturi taljenja korištenih početnica *T<sub>m</sub>* (**Tablica 2**), te o vremenu elongacije koje ovisi o duljini umnoženog produkta. Enzim GoTaq® DNA Polymerase (Promega) koristila sam za umnažanje gena *Aktin 3* kod provjere kvalitete izolirane genomske DNA i provjere cDNA dobivene reverznom transkripcijom (**Tablica 4**), dok sam EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (Takara Bio Inc.) koristila u svim ostalim reakcijama PCR (**Tablica 5**). Sve

reakcije PCR sam provodila na uređaju GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems). PCR uzorke spremala sam na -20 °C.

**Tablica 4.** Sastav jedne reakcijske smjese PCR (25 µl) i program pripremljene reakcije za GoTaq® DNA Polymerase (Promega).

Reagensi	Volumen reagensa po uzorku (µl)	Program reakcije
sterilna H <sub>2</sub> O	13,9	
5 × Green GoTaq® Reaction Buffer	5	95°C 2 min
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5	95°C 30 s
10 mM dNTP mix	0,5	58°C 30 s
uzvodna početnica (10 µM)	0,5	72°C 1 min
nizvodna početnica (10 µM)	0,5	72°C 5 min
GoTaq® polimeraza (5U/µL)	0,1	4°C ∞
kalup	2	
	<b>25</b>	

**Tablica 5.** Sastav jedne reakcijske smjese PCR (25 µl) i program pripremljene reakcije za EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (Takara Bio Inc.).

Reagensi	Sastav jedne reakcijske smjese	Program reakcije
EmeraldAmp GT PCR Master Mix (2 × Premix)	12,5 µl	98°C 2 min
kalup	100 – 400 ng	98°C 10 s
uzvodna početnica (10 µM)	0,5 µl	56°C 30 s
nizvodna početnica (10 µM)	0,5 µl	72°C 2-3 min
sterilna dH <sub>2</sub> O	do 25 µl	72°C 5 min
	<b>25 µl</b>	4°C ∞

## 2.2.7 Agarozna gel elektroforeza

Agaroznu gel elektroforezu koristila sam za analizu uzoraka DNA te za izrezivanje željenog fragmenta iz gela prilikom kloniranja. Sve elektroforeze sam provodila u kadici RunOne™ Electrophoresis Unit (Embi Tec), napunjenoj 1 × TAE ili 0,5 × TBE puferom, u kojima sam pripremala i agarozne gelove korištene u ovom istraživanju (1%, 1,5% i 2%). PCR uzorke, kao i restriksijske smjese, nisam trebala miješati s bojom za nanošenje jer se ona već nalazi u puferu. Uz uzorke sam na svaki gel nanosila i 3 µl molekularnog biljega GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific). Sve elektroforeze sam provodila pri početnom naponu od 25 V u

trajanju 5 - 10 min, a potom na naponu 50 - 100 V u trajanju 20 – 40 min. Za detekciju vrpce sam koristila otopinu etidij bromida (EtBr) koncentracije 10 ng/l, a gel sam vizualizirala pomoću UV svjetla (Kodak EDAS 290, ekspozicija 1 s, 100% UV). Slike sam fotografirala digitalnom kamerom koristeći program Kodak 1D.

## **2.2.8 TA kloniranje**

### **2.2.8.1 Izrezivanje PCR produkata iz agaroznog gela i njihovo pročišćavanje**

S ciljem ugradnje fragmenta od interesa u plazmid pGEM<sup>®</sup>-T Easy, trebala sam izdvojiti taj fragment od ukupnog PCR produkta. U tu svrhu fragmente sam razdvojila na tankom 1,5% agaroznom gelu. Kako bih umanjila mogućnost nastanka kontaminacija željenog fragmenta, pripremila sam svježi 1 × TAE pufer i svježu otopinu etidij bromida. Za izrezivanje željenog fragmenta iz gela, gel sam prvo izložila kratkom djelovanju UV svjetla (Kodak EDAS 290, ekspozicija 1 s, 70% UV) kako bih utvrdila točan položaj fragmenta. Fragment sam izrezala koristeći čisti skalpel i pincetu, a izrezani komad gela sam ubacila u prethodno izvaganu mikroeprevetu od 1,5 ml. Izrezani DNA fragment sam pročistila pomoću NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Odredila sam masu gela s fragmentom te na svakih 100 mg agaroznog gela dodala 200 µl pufera NTI. Postupak pročišćavanja provela sam prema protokolu, uključujući i opcionalne korake navedene u njemu. U svrhu dobivanja što veće koncentracije fragmenata od interesa duljih od 1000 pb, eluciju sa kolone sam radila dva puta, izmjenično dodajući 15 µl pufera NE na kolonu i inkubirajući kolonu 5 min na 70 °C. Koncentraciju i čistoću pročišćenog fragmenta izmjerila sam spektrofotometrijski na uređaju NanoDrop<sup>™</sup> 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) kako bih odredila koji volumen fragmenta trebam koristiti u ligacijskoj reakciji. Pročišćene fragmente iz gela spremala sam na -20 °C do korištenja.

### **2.2.8.2 Kloniranje fragmenata umnoženih reakcijom PCR**

Enzim T4 DNA ligazu koristila sam za ligaciju produkata PCR pročišćenih iz gela i plazmida pGEM<sup>®</sup>-T Easy. TA kloniranje pomoću T4 DNA ligaze olakšava ugradnju produkta reakcije PCR, omogućujući ligaciju komplementarnog timidina i adenina na samom 3' kraju vektora, odnosno fragmenta od interesa. Ligacijsku reakciju sam pripremila prema protokolu za ligaciju plazmida pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems (Promega), dostupnom na:

<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>. Omjer vektora i inserta u reakciji bio je 1:4, a masu pročišćenog PCR fragmenta koju sam koristila u ligaciji sam izračunala prema formuli dostupnoj u protokolu:

$$\frac{\text{masa vektora(ng)} * \text{veličina inserta(kb)}}{\text{veličina vektora (kb)}} * \text{omjer insert: vektor} = \text{masa inserta (ng)}$$

Znajući potrebnu masu inserta i koncentraciju koju sam prethodno izmjerila spektrofotometrijski, mogla sam izračunati volumen fragmenta potreban za ligaciju. Reakcijsku smjesu sam pripremila u mikroepreveti za PCR miješanjem: 5  $\mu$ l 2  $\times$  Rapid Ligation Buffer, 0,5  $\mu$ l plazmida pGEM<sup>®</sup>-T Easy (50 ng), 1  $\mu$ l T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ $\mu$ l), odgovarajućeg volumena fragmenta i Nuclease-free Water (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) do ukupnog volumena 10  $\mu$ l. Sadržaj sam promiješala mikropipetom, a reakciju sam inkubirala u uređaju GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700 (Applied Biosystems) na 4 °C, ili u hladnjaku na 8 °C, preko noći. Nakon inkubacije, ligazu sam denaturirala inkubacijom ligacijske reakcije na 70 °C u trajanju od 10 min u istom uređaju. Ligacijsku reakciju (3  $\mu$ l) sam koristila za transformaciju kompetentnih bakterija i umnažanje plazmida od interesa. Ostatak ligacijske reakcije čuvala sam na -20 °C.

## 2.2.9 Transformacija kompetentnih bakterijskih stanica

Kemijsku transformaciju kompetentnog soja *E. coli* XL-10 Gold koji je bio dostupan u laboratoriju radila sam pomoću toplinskog šoka. Kompetentne stanice koje su skladištene na -80 °C sam otopila na ledu neposredno prije upotrebe. U 14-ml Falcon epruvetu prebacila sam 50  $\mu$ l kompetentnih stanica i 3  $\mu$ l ligacijske smjese. Stanice sam inkubirala na ledu 30 min, nakon čega je uslijedio toplinski šok u vodenoj kupelji na 42 °C u trajanju od 30 s, čime je omogućen unos DNA u bakterijske stanice. Uzorak sam inkubirala na ledu 2 min prije dodavanja 500  $\mu$ l SOC medija ugrijanog na 37 °C, a potom sam bakterije inkubirala 1 h na 37 °C uz trešnju kako bi se bakterijske stanice oporavile od toplinskog šoka. Za selekciju transformanata sam koristila dvije ploče s krutim medijem LB promjera 9 cm, u koji sam prethodno dodala antibiotik ampicilin u konačnoj koncentraciji od 0,1 mg/ml, IPTG (*eng.* Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) u koncentraciji 0,5 mM i X-gal (*eng.* 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) u

koncentraciji od 80 µg/ml u sterilnim uvjetima laminara. Odgovarajuću količinu transformiranih bakterijskih stanica nanijela sam na obje ploče te ih inkubirala na 37 °C, naopačke, preko noći, ne dulje od 18 h, da ne dođe do raspada termolabilnog ampicilina i rasta netransformiranih bakterija. Ploče sam čuvala na 4 °C.

### **2.2.10 Izrada prekonoćne bakterijske kulture**

Prekonoćne bakterijske kulture pripremila sam nakon selekcije transformanata na krutom mediju LB, s ciljem umnažanja plazmida od interesa. Zbog insercijske inaktivacije gena *lacZa* u plazmidu, na krutom mediju LB razlikuju se bijele bakterijske kolonije koje su transformirane plazmidom s odgovarajućim fragmentom te plave kolonije koje su transformirane plazmidom bez inserta. S krutog medija sam pojedinačne bijele kolonije sterilnom čačkalicom prebacila u staklene epruvete s 3 ml tekućeg sterilnog medija LB, u koji sam prethodno dodala ampicilin u konačnoj koncentraciji od 0,1 mg/ml. Bakterijske stanice sam inkubirala preko noći na 37 °C uz trešnju, pazeći na termolabilnost ampicilina. Dio prekonoćne bakterijske suspenzije sam iskoristila za provjeru uspješnosti transformacije plazmidom DNA koristeći metodu PCR na bakterijskim kulturama koju sam opisala u poglavlju 2.2.6, dok sam ostatak iskoristila za izolaciju plazmidne DNA.

### **2.2.11 Izolacija plazmidne DNA**

Centrifugirala sam 2 ml prekonoćne bakterijske kulture 2 min na 16 000 g pri RT (Eppendorf 5415 C) u mikroepreveti od 2 ml. Plazmidnu DNA izolirala sam iz bakterijskih taloga pomoću Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) prateći protokol, uz jednu izmjenu. Prilikom elucije, kolone sam inkubirala 15 min na 37 °C, a zatim centrifugirala na zadanim uvjetima. Koncentraciju i čistoću izoliranih plazmida izmjerila sam spektrofotometrijski na uređaju NanoDrop<sup>™</sup> 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) kako bih znala koji volumen plazmida trebam koristiti u restriksijskoj digestiji. Plazmidnu DNA spremila sam na -20 °C. U svrhu provjere izoliranih plazmida koristila sam restriksijsku analizu i sekvenciranje (Macrogen Europa, Amsterdam, Nizozemska).

### **2.2.12 Restriksijska analiza plazmidne DNA**

Restriksijsku digestiju koristila sam s ciljem provjere uspješnosti ugradnje fragmenata od interesa u plazmid prilikom ligacije. Restriksijski enzim EcoRI (Fast Digest EcoRI, Thermo Scientific) koristila sam kako bih jednostrukom restrikcijom oslobodila fragment koji je ugrađen u mjesto MCS. U mikroepruветama za PCR sam pripremila reakcijsku smjesu koja je sadržavala: 2  $\mu$ l 10  $\times$  FastDigest Green Buffer (Thermo Scientific), 1  $\mu$ l enzima, >300 ng plazmidne DNA i Nuclease-free Water (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) do ukupnog volumena 20  $\mu$ l. Sadržaj sam promiješala mikropipetom, a reakciju sam inkubirala u uređaju GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700 (Applied Biosystems) 30 min na 37 °C. Dobivene fragmente analizirala sam na 1% agaroznom gelu i obojala s otopinom etidij bromida. Odgovarajući volumen restriksijske smjese poslala sam na sekvenciranje (Macrogen Europa, Amsterdam, Nizozemska).

# 3. REZULTATI

## 3.1 Izolacija nukleinskih kiselina

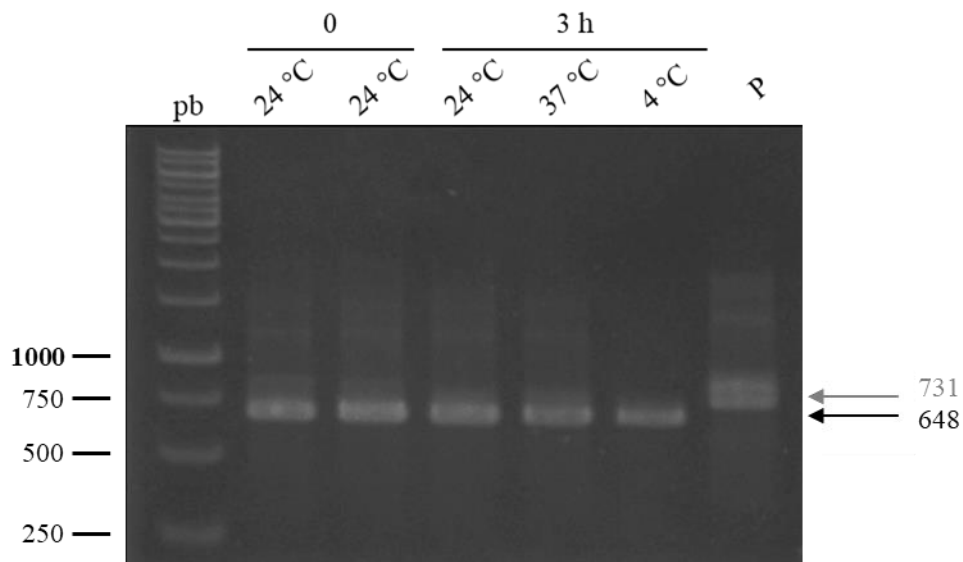
S ciljem utvrđivanja ekspresije pojedinih varijanti gena *BPM1-3* na povišenoj i sniženoj temperaturi, klijance uročnjaka sam tri sata inkubirala na temperaturama od 24 °C, 37 °C i 4 °C te sam nakon smrzavanja u tekućem dušiku izolirala ukupnu RNA. Potom je u nekoliko navrata provedena reverzna transkripcija molekula mRNA te je prilikom svakog prevođenja mRNA u cDNA kvaliteta kalupa cDNA utvrđena umnažanjem dijela gena *Aktin 3 (Akt3)*. Tako dobivenu cDNA koristila sam za umnažanje s početnicama specifičnim za pojedine varijante gena *BPM1-3*. U svrhu proučavanja ekspresije varijanti gena *BPM*, za pojedini uzorak u reverznoj transkripciji je korišteno 894 ng RNA, dok uzorci cDNA koji su korišteni za proučavanje ekspresije varijanti gena *BPM1* i *BPM3* nisu bili usklađeni po masi RNA (masa je varirala od 884 ng do 2,23 µg), što znači da se produkti umnoženi na kalupu takvih, prema masi neujednačenih molekula cDNA, ne mogu međusobno uspoređivati prema intenzitetu vrpca.

Genomska DNA izolirana je kako bi poslužila kao pozitivna kontrola u PCR reakcijama u kojima će se proučavati ekspresija postojećih i potencijalnih novih varijanti gena *BPM* na pojedinim temperaturama te za provjeru nespecifičnog vezanja početnica i detekciju zaostataka genomske DNA u uzorcima cDNA.

## 3.2 Umnažanje gena *Akt3* za potvrdu identiteta izolirane molekule

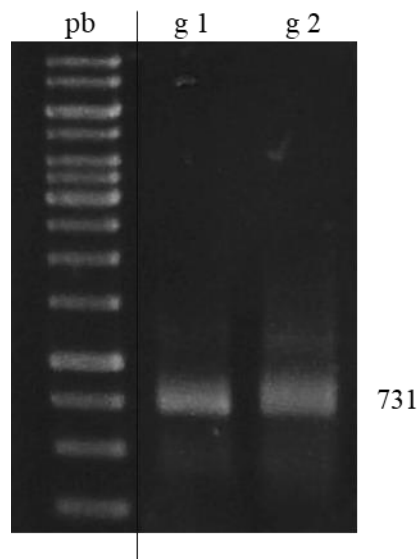
U svrhu potvrde uspješnosti izolacije RNA i reverzne transkripcije, provedeno je umnažanje gena *Akt3* u uzorcima cDNA koristeći uvjete navedene u **Tablici 4**. Početnice *Akt3* fw i *Akt3* rev (**Tablica 2**) omogućuju umnažanje produkta duljine 648 pb prema kalupu cDNA i produkta duljine 731 pb prema kalupu genomske DNA. Kao što je vidljivo na **Slici 7**, u nekim uzorcima cDNA postoji mala količina genomske DNA, budući da su u PCR reakciji umnožena oba fragmenta (648 pb i 731 pb). To ukazuje na činjenicu da je usprkos DNaznom tretmanu, dio genomske DNA zaostao nakon izolacije RNA i reverzne transkripcije.





**Slika 7.** Umnažanje gena *Aktin 3* u uzorcima cDNA dobivenim reverznom transkripcijom. Fragment označen crnom bojom (648 pb) predstavlja produkt umnožen na kalupu cDNA, a fragment označen sivom bojom (731 pb) produkt umnožen na kalupu genomske DNA. pb - GeneRuler 1 kb DNA ladder, 24 °C, 37 °C i 4 °C - temperaturni tretman klijanaca, P - pozitivna kontrola (gDNA), 0, 3 h - duljina tretmana.

PCR početnice za umnažanje gena *Akt3* korištene su s ciljem provjere kvalitete izolirane genomske DNA, budući da će gDNA u reakcijama umnažanja s gen specifičnim početnicama poslužiti kao pozitivna kontrola i indikator prisutnosti gDNA u uzorcima cDNA. Umnažanje fragmenta gena *Akt3* od 731 pb u oba uzorka gDNA (**Slika 8**) potvrdilo je kako su navedeni uzorci dovoljne kvalitete da posluže kao pozitivne kontrole u reakcijama PCR.



**Slika 8.** Detekcija gena *Aktin 3* u uzorcima izolirane genomske DNA. Označeni fragment (731 pb) predstavlja produkt umnožen na kalupu genomske DNA. pb - GeneRuler 1 kb DNA ladder, g 1, g 2 – biološke replike izolirane gDNA.

### **3.3 Dizajn i optimizacija početnica za umnažanje varijanti gena *BPM1-3***

S obzirom na veliku sličnost u sekvencama pojedinih varijanti gena *BPM1*, *BPM2* i *BPM3*, početnice za njihovo umnažanje dizajnirane su na temelju analize sekvence i bez korištenja posebnih bioinformatičkih alata. Za izradu početnica korištene su sekvence molekula cDNA koje su preuzete iz baze TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) i poravnate u programu Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Dizajn početnica je proveden uzimajući u obzir čimbenike koji će omogućiti specifično umnažanje fragmenata s visokim prinosom, a koji uključuju optimalnu duljinu početnica (18 - 25 pb), sadržaj G/C parova baza (35 - 55%), temperaturu taljenja  $T_m$  (55 °C - 65 °C) koja se ne razlikuje više od 3 °C između početnica istog seta te prisustvo nukleotida G ili C na 3' kraju početnice kako bi se osiguralo čvršće vezanje i olakšala elongacija. Prilikom dizajna vodilo se računa da početnice u setu nemaju komplementarne regije i da ne stvaraju sekundarne strukture. Početnice su naručene preko stranice Macrogen na kojoj su usklađene i temperature taljenja svih početnica, koje su, zajedno s njihovim sekvencama navedene u **Tablici 2**. Odabir sekvenci početnica i njihova optimizacija opisana je u sljedećim poglavljima.

#### **3.3.1 Dizajn početnica za umnažanje varijanti gena *BPM1-3***

Gen *BPM1* se prepisuje u tri varijante: *BPM1.1*, *BPM1.2* i *BPM1.3*. Za svaku varijantu dizajnirane su specifične početnice. Za specifično umnažanje varijante *BPM1.1* odabrane su: uzvodna početnica FW *BPM1.123* koja se veže blizu 5' kraja svih varijanti gena i nizvodna početnica REV *BPM1.1* koja se veže 37 pb prije 3' kraja varijante te ne pokazuje homologiju s ostalim varijantama (**Prilog I**). Zbog svoje sekvence, početnica REV *BPM1.1* može stvarati sekundarne strukture, stoga je kod umnažanja bilo potrebno pripaziti na temperaturu prijanjanja. Uzvodna početnica FW *BPM1.123* koristila se i za specifično umnažanje varijante *BPM1.3*, u

kombinaciji s nizvodnom početnicom REV BPM1.3 koja se veže na sami 3' kraj varijante i pokazuje djelomičnu homologiju od 9 pb na svom 3' kraju s varijantom *BPM1.1*. Početnica REV BPM1.3 veže se na granici egzon - intron unutar 3' UTR regije (*eng.* Untranslated Region) genomske DNA, što znači da ovaj set početnica ne bi trebao umnažati genomsku DNA. Za specifično umnažanje varijante *BPM1.2* odabrana je uzvodna početnica FW BPM1.2 koja se veže na sami 5' kraj varijante i pokazuje djelomičnu homologiju od 9 pb na svom 3' kraju s varijantom *BPM1.1* te nizvodna početnica REV BPM1.123 koja se veže 29 pb prije 3' kraja varijante i pokazuje homologiju s ostalim varijantama gena. Djelomične homologije početnica s drugim varijantama neće utjecati na sposobnost njihova vezanja jer su homologni dijelovi prekratki da bi omogućili vezanje na neku drugu varijantu.

Gen *BPM2* ima poznatih pet ekspresijskih varijanti: *BPM2.1*, *BPM2.2*, *BPM2.3*, *BPM2.4* i *BPM2.5* (**Prilog II**). S obzirom na činjenicu da varijante *BPM2.1* i *BPM2.4* nemaju specifične razlike u sekvencama u odnosu na sve ostale varijante gena, za njihovo umnažanje osmišljeni su setovi početnica koji umnažaju više varijanti gena, ali daju produkte različitih duljina. Uzvodna početnica FW BPM2.12345 koristila se za umnažanje svih varijanti osim varijante *BPM2.4* te se veže blizu ili na sami 5' kraj svih varijanti gena. Za specifično umnažanje varijante *BPM2.3* koristila se uzvodna početnica FW BPM2.12345 u kombinaciji s nizvodnom početnicom REV BPM2.3 koja prepoznaje srednji dio sekvence koji je specifičan za tu varijantu. S obzirom na činjenicu da su 3' krajevi varijanti *BPM2.3* i *BPM2.1* identični, sekvenca nizvodne početnice nije se mogla osmisliti na način da umnaža varijantu *BPM2.3* cijelom duljinom. Uzvodna početnica FW BPM2.12345 koristila se i za specifično umnažanje varijante *BPM2.5*, u kombinaciji s nizvodnom početnicom REV BPM2.5 koja se veže oko 550 pb prije 3' kraja varijante, u dijelu sekvence specifičnom za tu varijantu. Početnica REV BPM2.5 ne može se vezati na 3' kraj varijante jer je on identičan 3' kraju varijante *BPM2.2*, a pokazuje i homologiju sa sekvencama svih ostalih varijanti gena. Varijanta *BPM2.2* specifično se umnaža pomoću uzvodne početnice FW BPM2.12345 te nizvodne početnice REV BPM2.2 koja se veže oko 450 pb prije 3' kraja varijante i pokazuje djelomičnu homologiju od 7 – 9 pb na svom 5' kraju s ostalim varijantama gena. Početnica se nije mogla drugačije dizajnirati jer je to jedini dio sekvence koji je specifičan za ovu varijantu, međutim, djelomična homologija neće utjecati na sposobnost vezanja početnice. Početnica REV BPM2.2 veže se na granici egzon - intron unutar genomske DNA na način da je samo 18 pb na njenom 3' kraju komplementarno sekvenci u genomskoj DNA, što bi moglo

umanjiti mogućnost umnažanja genomske DNA ovim setom početnica. Također, 8 pb na 3' kraju ove početnice homologno je s 3' - 5' lancem genomske DNA gena *BPM3*, pa je kod umnažanja ovim setom početnica važno voditi računa o temperaturi prijanjanja. Varijante *BPM2.1* i *BPM2.4* se ne mogu specifično umnožiti. Za detekciju varijante *BPM2.1* koristila se uzvodna početnica FW BPM2.12345 u kombinaciji s nizvodnom početnicom REV BPM2.13 koja se veže 43 pb prije 3' kraja varijanti *BPM2.1* i *BPM2.3*. Taj set početnica trebao bi omogućiti umnažanje produkta duljine 1949 pb u varijanti *BPM2.1* i produkta duljine 2280 pb u varijanti *BPM2.3*. Za detekciju varijante *BPM2.4* koristila se uzvodna početnica FWm BPM2.1345 koja se veže u središnji dio sekvenci svih varijanti gena izuzev varijante *BPM2.2* te nizvodna početnica REV BPM2.134 koja se veže na 3' kraj varijante *BPM2.4* i 87 pb prije 3' kraja varijanti *BPM2.1* i *BPM2.3*. Ovaj set početnica trebao bi umnožiti produkt od 923 pb u varijanti *BPM2.4*, produkt od 840 pb u varijanti *BPM2.1* te produkt od 1171 pb u varijanti *BPM2.3*. Umnažanjem fragmenata kraće duljine trebala se detektirati razlika u sekvenci u odnosu na ostale dvije varijante gena.

Gen *BPM3* kodira četiri varijante: *BPM3.1*, *BPM3.2*, *BPM3.3* i *BPM3.4*. Za sve varijante, osim za varijantu *BPM3.1*, dizajnirane su specifične početnice za umnažanje. Uzvodna početnica FW BPM3.1234 koristila se za umnažanje varijanti *BPM3.2* i *BPM3.4*, a veže se blizu 5' kraja svih varijanti gena (**Prilog III**). Početnica se nije mogla dizajnirati tako da se veže na sami 5' kraj sekvenci tih dviju varijanti jer tu postoje ponavljajući nizovi nukleotida T, C i A koji bi smanjivali uspješnost njenog vezanja. Varijante *BPM3.2* i *BPM3.4* je bilo teško poravnati u odnosu na ostale varijante jer im se sekvence zadnjih 500-tinjak pb razlikuju od ostalih, pa nizvodne početnice osmišljene za njihovo umnažanje ne prepoznaju sekvence na njihovim 3' krajevima kako ne bi došlo do nespecifičnog umnažanja ostalih varijanti. Za specifično umnažanje varijante *BPM3.2* koristila se uzvodna početnica FW BPM3.1234 i nizvodna početnica REV BPM3.2 koja se veže oko 500 pb od 3' kraja varijante i specifična je za nju. Uzvodna početnica FW BPM3.1234 koristila se i za specifično umnažanje varijante *BPM3.4*, u kombinaciji s nizvodnom početnicom REV BPM3.4 koja se veže oko 400 pb od 3' kraja varijante, u dijelu sekvence specifičnom za nju. Za specifično umnažanje varijante *BPM3.3* koristila se uzvodna početnica FW BPM3.34 koja se veže oko 550 pb od 3' kraja varijante *BPM3.3* i oko 450 pb od 3' kraja varijante *BPM3.4* te nizvodna početnica REV BPM3.13 koja se veže oko 100 pb od 3' kraja varijanti *BPM3.3* i *BPM3.1*. Sekvence varijanti *BPM3.1* i *BPM3.3* razlikuju se samo u dijelu dugom 49 pb koji je karakterističan za varijantu *BPM3.3*, a unutar kojega se veže početnica FW BPM3.34. Upravo

zbog tog razloga varijanta *BPM3.1* ne može se specifično umnožiti. Za detekciju varijante *BPM3.1* koristila se uzvodna početnica FWm BPM3.1234 koja se veže oko 500 pb od 3' kraja varijante i pokazuje homologiju s ostalim varijantama gena te nizvodna početnica REV BPM3.13. Ova kombinacija početnica trebala je umnožiti produkt duljine 433 pb u varijanti *BPM3.1* i produkt duljine 482 pb u varijanti *BPM3.3* te omogućiti detekciju razlika u sekvencama dviju varijanti.

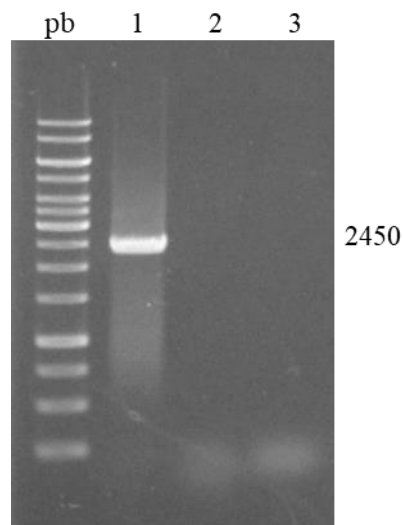
### 3.3.2 Provjera efikasnosti početnica za varijante gena *BPM1-3*

Prvotna analiza ekspresije varijanti gena *BPM1.2* i *BPM1.3* s temperaturom prijanjanja od 58 °C pokazala se neuspješnom, što može upućivati ili na previsoku temperaturu prijanjanja ili na odsutnost tih ekspresijskih varijanti u izoliranoj cDNA. Postoji mogućnost da varijante gena nisu eksprimirane u danim uvjetima, stoga je genomska DNA korištena za provjeru efikasnosti početnica za umnažanje varijanti gena *BPM1-3* (**Tablica 2**). Reakcije PCR uspješno su provedene korištenjem temperature prijanjanja od 56 °C i vremena elongacije od 3 min (**Tablica 5**). Umnažanje genomske DNA s početnicama za varijante gena *BPM1* prikazano je na **Slici 9**. Početnice FW BPM1.2 i REV BPM1.123 omogućile su umnažanje produkta duljine 2450 pb u gDNA, dok početnice FW BPM1.123 i REV BPM1.3 nisu umnožile gDNA, što je i u skladu s očekivanim (**Tablica 3**). Očekivani produkt duljine 2665 pb nije vidljiv kod umnažanja s početnicama FW BPM1.123 i REV BPM1.1. Ove početnice mogu se koristiti za daljnja umnažanja varijanti gena *BPM1* na kalupu cDNA.

a)

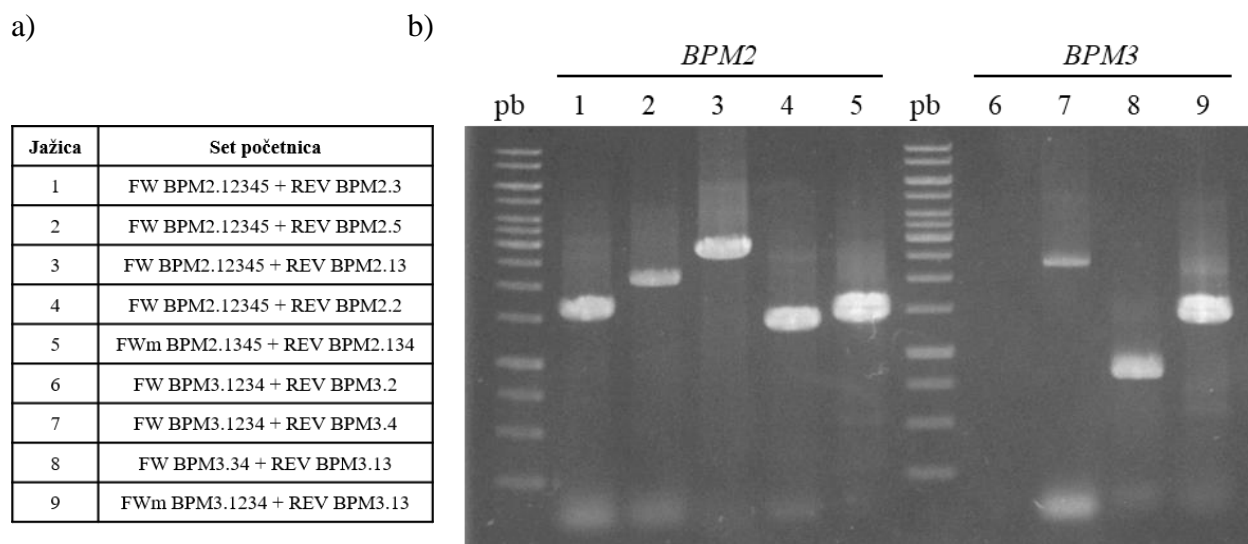
Jažica	Set početnica
1	FW BPM1.2 + REV BPM1.123
2	FW BPM1.123 + REV BPM1.3
3	FW BPM1.123 + REV BPM1.1

b)



**Slika 9.** Umnažanje gena *BPM1* na kalupu genomske DNA metodom PCR. a) Parovi početnica korišteni u reakcijama PCR. b) Detekcija fragmenata dobivenih u reakcijama PCR na 1% agaroznom gelu. Veličina fragmenta umnoženog na kalupu gDNA iznosi 2450 pb za set početnica 1. pb - GeneRuler 1 kb DNA ladder.

Produkti dobiveni umnažanjem genomske DNA s početnicama za varijante gena *BPM2* i *BPM3* prikazani su na **Slici 10**. Svi parovi početnica omogućili su umnažanje produkata odgovarajućih duljina (**Tablica 3**) osim početnica FW *BPM3.1234* i REV3.2. Produkti umnoženi u gDNA s pojedinim parovima početnica iznosili su redom: 1581 pb (FW *BPM2.12345* i REV 2.3), 2079 pb (FW *BPM2.12345* i REV *BPM2.5*), 2727 pb (FW *BPM2.12345* i REV *BPM2.13*), 1355 pb (FW *BPM2.12345* i REV *BPM2.2*), 1457 pb (FWm *BPM2.1345* i REV *BPM2.134*) te 2316 pb (FW *BPM3.1234* i REV *BPM3.4*), 825 pb (FW *BPM3.34* i REV *BPM3.13*) i 1406 pb (FWm *BPM3.1234* i REV *BPM3.13*). Rezultati ovog eksperimenta upućuju na to da se dizajnirani parovi početnica mogu koristiti dalje u analizi ekspresije navedenih gena.



**Slika 10.** Umnažanje gena *BPM2* i *BPM3* na kalupu genomske DNA metodom PCR. a) Parovi početnica korišteni u reakcijama PCR. Set početnica 1-5 namijenjen je umnažanju varijanti gena *BPM2*, a set 6-9 umnažanju varijanti gena *BPM3*. b) Detekcija fragmenata dobivenih u reakcijama PCR na 1% agaroznom gelu. Veličine fragmenata umnoženih na kalupu gDNA iznose redom: (1) 1581 pb, (2) 2079 pb, (3) 2727 pb, (4) 1355 pb, (5) 1457 pb, (7) 2316 pb, (8) 825 pb i (9) 1406 pb. pb - GeneRuler 1 kb DNA ladder.

### 3.4 Analiza ekspresije varijanti gena *BPM1-3* upotrebom lančane reakcije polimerazom (PCR)

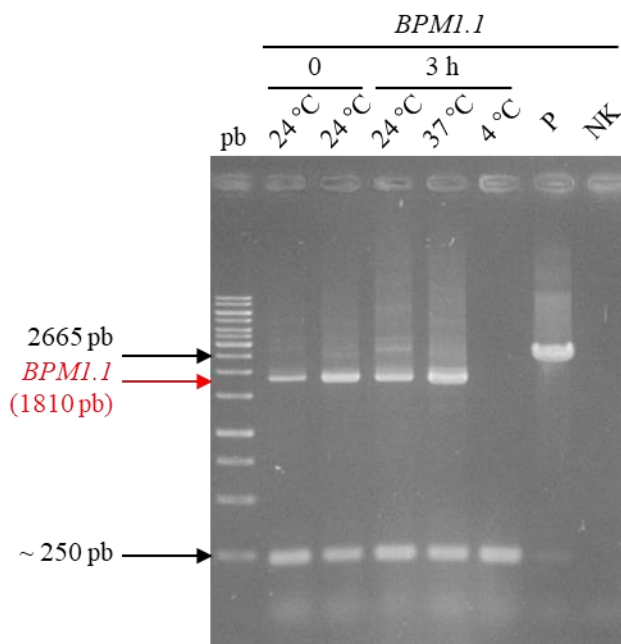
U svrhu proučavanja učinka temperature na ekspresiju postojećih, ali i potencijalnih novih varijanti gena *BPM1-3* u klijancima uročnjaka koji su bili izloženi temperaturnom stresu, pripremljeno je nekoliko reakcija PCR u kojima je kao kalup korištena molekula cDNA koja se umnažala s početnicama specifičnim za pojedine varijante gena. Za svaki par početnica reakcija PCR je provedena na pet različitih uzoraka cDNA koji su dobiveni iz klijanaca izloženih različitim tretmanima: dva kontrolna (24 °C) i tri uzorka iz klijanaca koji su nakon rasta na 24 °C bili izloženi različitim temperaturama u trajanju od 3 h (24 °C, 37 °C i 4 °C). Uzorak iz klijanaca izloženih trosatnom tretmanu na 24 °C poslužio je kao dodatna kontrola (on nije bio izložen promjeni temperature, već je bio 3 h dulje inkubiran na temperaturi od 24 °C u odnosu na kontrolne uzorke). Osim uzoraka cDNA, u reakcijama PCR korištene su i pozitivna kontrola (izolirana genomska DNA) te negativna kontrola (sterilna H<sub>2</sub>O). Sve reakcije umnažanja varijanti gena *BPM1-3* provedene su na temperaturi prijanjanja od 56 °C, koja se pokazala optimalnom za rad svih parova početnica.

#### 3.4.1 Analiza ekspresije varijanti gena *BPM1*

U svrhu analize ekspresije triju varijanti gena *BPM1* u uzorcima cDNA korištena su tri para početnica koja su dizajnirana za specifično umnažanje pojedinih ekspresijskih varijanti (**Tablica 3**). Tijekom analize ovih rezultata umnoženi produkti ne mogu se uspoređivati prema intenzitetu vrpca, jer masa cDNA nije bila jednaka u svim uzorcima i ne može se točno zaključiti ovisi li debljina vrpce o pojačanoj ekspresiji neke varijante gena ili o većoj koncentraciji cDNA u reakcijskoj smjesi. Sekvence korištenih početnica navedene su u **Tablici 2**. U **Tablici 5** se nalaze uvjeti reakcije i protokol koji je korišten za pripremu PCR reakcijskih smjesa, a vrijeme elongacije za umnažanje svih varijanti gena *BPM1* je iznosilo 3 min. Rezultati umnažanja varijanti gena *BPM1* prikazani su u poglavljima koja slijede.

### 3.4.1.1 Umnažanje ekspresijske varijante gena *BPM1.1*

Za umnažanje ekspresijske varijante *BPM1.1* u uzorcima cDNA korištene su početnice FW BPM1.123 i REV BPM1.1 (**Tablica 2**). Varijanta gena *BPM1.1* uspješno je umnožena u oba kontrolna uzorka klijanaca bez temperaturnog tretmana te u uzorcima klijanaca koji su bili izloženi tretmanima od 24 °C (3 h) i 37 °C (3 h), što je potvrđeno umnažanjem fragmenta od 1810 pb (**Slika 11**). U uzorku klijanaca tretiranih 3 h na 4 °C nije vidljivo umnažanje varijante gena *BPM1.1*, što navodi na zaključak da se radi o ekspresijskoj varijanti koja se ne sintetizira u uvjetima snižene temperature. U svim uzorcima cDNA (oba kontrolna uzorka i uzorci klijanaca izloženih tretmanima od 24 °C (3 h), 37 °C (3 h) i 4 °C (3 h)) prisutan je fragment od ~ 250 pb. Ovaj fragment umnožen je i na kalupu genomske DNA, što znači da tu vjerojatno nije riječ o umnažanju nove varijante gena *BPM1*, već o nespecifičnom umnažanju s ovim parom početnica.

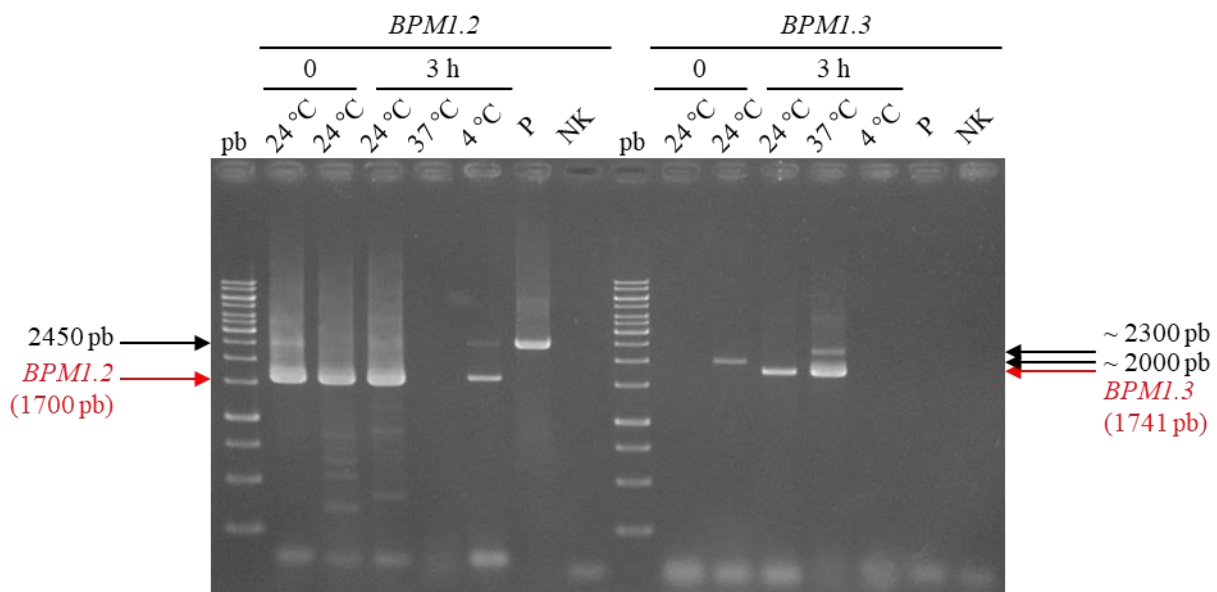


**Slika 11.** Umnažanje ekspresijske varijante gena *BPM1.1* na kalupu cDNA iz klijanaca izloženih različitim temperaturama. Fragment označen crvenom bojom (1810 pb) odgovara očekivanoj varijanti gena *BPM1.1*. Fragment označen crnom bojom (2665 pb) predstavlja produkt umnožen na kalupu genomske DNA, dok je drugi fragment označen crnom bojom (~ 250 pb) nepoznatog identiteta. pb - GeneRuler 1 kb DNA ladder, 24 °C, 37 °C i 4 °C - temperaturni tretman klijanaca, P - pozitivna kontrola (gDNA), NK – negativna kontrola (sterilna H<sub>2</sub>O), 0, 3 h - duljina tretmana.



### 3.4.1.2 Umnažanje ekspresijskih varijanti gena *BPM1.2* i *BPM1.3*

Za umnažanje ekspresijske varijante *BPM1.2* u uzorcima cDNA korištene su početnice FW *BPM1.2* i REV *BPM1.123*, a za umnažanje varijante gena *BPM1.3* početnice FW *BPM1.123* i REV *BPM1.3* (**Tablica 2**). Varijanta gena *BPM1.2* uspješno je umnožena u oba kontrolna uzorka klijanaca bez temperaturnog tretmana te u uzorcima klijanaca izloženih temperaturama od 24 °C i 4 °C u trajanju od 3 h, što je potvrđeno prisustvom fragmenta od 1700 pb (**Slika 12**). Varijanta gena *BPM1.2* nije umnožena u uzorku klijanaca tretiranih 3 h na 37 °C, što navodi na zaključak da je riječ o ekspresijskoj varijanti koja se ne ekspirira u uvjetima povišene temperature. U uzorku klijanaca izloženih temperaturi od 4 °C i u prvom kontrolnom uzorku vidljiva je i prisutnost genomske DNA u uzorcima cDNA, koja je zaostala nakon izolacije RNA i reverzne transkripcije. Korišteni set početnica omogućio je i umnažanje neočekivanih fragmenata duljine ~ 850 pb, ~ 650 pb, ~ 550 pb i ~ 370 pb u drugom kontrolnom uzorku te fragmenata duljine ~1200 pb, ~ 900 pb i ~ 400 pb u uzorku koji je bio izložen trosatnom tretmanu na 24 °C.



**Slika 12.** Umnažanje ekspresijskih varijanti gena *BPM1.2* i *BPM1.3* na kalupu cDNA iz klijanaca izloženih različitim temperaturama. Fragmenti označeni crvenom bojom odgovaraju očekivanim varijantama gena *BPM1.2* (1700 pb) i *BPM1.3* (1741 pb). Fragment veličine 2450 pb za *BPM1.2* označen crnom bojom predstavlja produkt umnožen na kalupu genomske DNA, dok ostali fragmenti (~ 2000, ~ 2300 pb) označeni crnom bojom predstavljaju fragmente nepoznatog identiteta. Duljine neoznačenih fragmenata nepoznatog identiteta: uzorak 24 °C (0 h) = ~ 850, ~ 650, ~ 550, ~ 370 pb, uzorak 24 °C (3 h) = ~ 1200, ~ 900, ~ 400

pb. pb - GeneRuler 1 kb DNA ladder, 24 °C, 37 °C i 4 °C - temperaturni tretman klijanaca, P - pozitivna kontrola (gDNA), NK – negativna kontrola (sterilna H<sub>2</sub>O), 0, 3 h - duljina tretmana.

Varijanta gena *BPM1.3* uspješno je umnožena u uzorcima cDNA iz klijanaca izloženih trosatnim tretmanima na 37 °C i 24 °C, što je vidljivo po prisustvu fragmenta od 1741 pb (**Slika 12**). Umnažanje ekspresijske varijante u uzorku klijanaca izloženih tretmanu od 24 °C te nedostatak umnažanja u kontrolnim uzorcima klijanaca (koji su 3 h kraće inkubirani na 24 °C) ukazuje na činjenicu da ekspresija varijante gena *BPM1.3* ovisi o dnevnom ritmu biljke. U uzorku klijanaca tretiranih 3 h na 4 °C nije vidljivo umnažanje te varijante, što upućuje na zaključak da varijanta gena *BPM1.3* nije eksprimirana u uvjetima snižene temperature. U drugom kontrolnom uzorku vidljivo je umnažanje neočekivanog fragmenta od ~ 2000 pb. Taj fragment bi, s obzirom na duljinu, mogao biti varijanta gena *BPM1.2* s 3' UTR regijom varijante *BPM1.3*, koja je u procesu alternativnog prekrajanja zadržala intron prisutan u 3' UTR regiji varijante gena *BPM1.3*. Dodatna naznaka da gen *BPM1* posjeduje dulju ekspresijsku varijantu koja još nije otkrivena je umnažanje fragmenta duljine ~ 2300 pb u uzorku cDNA klijanaca izloženih temperaturi od 37 °C. Kako bi se moglo potvrditi da je riječ o novim varijantama gena, a ne o nespecifičnom umnažanju, biti će potrebno klonirati i sekvencirati neočekivane fragmente.

### 3.4.2 Analiza ekspresije varijanti gena *BPM2*

Gen *BPM2* ima pet ekspresijskih varijanti, pa je njihovo umnažanje u uzorcima cDNA provedeno korištenjem pet različitih parova početnica. Sekvence korištenih početnica navedene su u **Tablici 2**. Kao što sam očekivala (poglavlje 3.2.1), varijante gena *BPM2.1* i *BPM2.4* ne mogu se specifično umnožiti, već se njihovo prisustvo na određenoj temperaturi detektiralo pomoću početnica koje su umnažale više varijanti istog gena, stvarajući pritom produkte različitih duljina (**Tablica 3**) koji su se lako mogli razlučiti na gelu s većim postotkom agaroze. PCR reakcijske smjese pripremljene su po protokolu navedenom u **Tablici 5**, a odabrano je vrijeme elongacije od 2 min za umnažanje varijanti gena *BPM2.3* i *BPM2.5* te 3 min za umnažanje ostalih varijanti gena *BPM2*. Analiza umnažanja varijanti gena *BPM2* opisana je u idućim poglavljima.

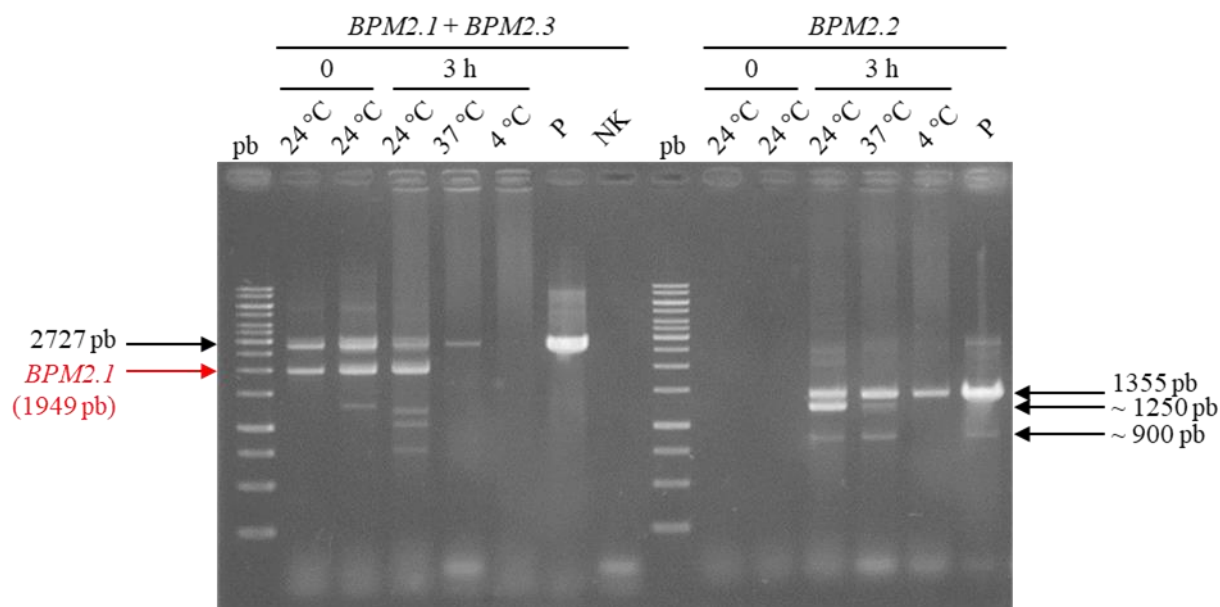
### 3.4.2.1 Umnažanje ekspresijskih varijanti gena *BPM2.1* i *BPM2.2*

Za analizu ekspresije varijante gena *BPM2.1* u uzorcima cDNA korištene su početnice FW BPM2.12345 i REV BPM2.13 (**Tablica 2**). Ovaj par početnica ne umnaža tu ekspresijsku varijantu specifično, već omogućuje i umnažanje varijante gena *BPM2.3*, stvarajući pritom produkte različitih duljina. U ovom slučaju postoji velika vjerojatnost da će se manji fragment umnažati s većom efikasnosti i prevladavati u konačnom PCR produktu. Za umnažanje varijante gena *BPM2.2* korištene su početnice FW BPM2.12345 i REV BPM2.2 (**Tablica 2**) koje umnažaju produkt od 1086 pb na kalupu cDNA, a potencijalno ne umnažaju genomsku DNA. Razlog tomu je što nizvodna početnica pokazuje homologiju od 18 (od 24) pb na svom 3' kraju s gDNA, jer se veže na granici egzon – intron. Analiza ovih umnažanja provedena je na 1,5% agaroznom gelu radi boljeg razdvajanja fragmenata umnoženih istim setom početnica.

Varijanta gena *BPM2.1* umnožena je sa sličnim intenzitetom u oba kontrolna uzorka te u uzorku klijanaca izloženih trosatnom tretmanu na 24 °C, na što ukazuje prisustvo fragmenta od 1949 pb (**Slika 13**). Važno je napomenuti da se varijanta gena *BPM2.1* nije ekspimirala na povišenoj temperaturi, a ni na sniženoj temperaturi od 4 °C, što navodi na zaključak da se ta ekspresijska varijanta ne sintetizira u stresnim uvjetima koji su korišteni u ovom eksperimentu. S druge strane, nedostatak fragmenta od 2280 pb upućuje na činjenicu da varijanta gena *BPM2.3* nije umnožena u niti jednom uzorku cDNA, što je vjerojatno posljedica preferencijalnog umnažanja kraćih fragmenata u metodi PCR, a ne nedostatka te varijante u svim testnim uvjetima. U svim uzorcima cDNA, osim u uzorku klijanaca tretiranih 3 h na 4 °C, vidljiva je prisutnost genomске DNA koja je zaostala nakon izolacije RNA i reverzne transkripcije. U drugom kontrolnom uzorku vidljivo je i umnažanje fragmenta duljine ~ 1350 pb, dok su u uzorku klijanaca tretiranih 3 h na 24 °C vidljivi fragmenti od ~ 1250 pb, ~ 1100 pb i ~ 780 pb, koji su također umnoženi s korištenim početnicama. Budući da se radi o fragmentima nepoznatog identiteta, koje prema ekspresijskim podacima za gen *BPM2* nisam očekivala, bilo bi poželjno utvrditi da li su oni nove ekspresijske varijante ili posljedica neočekivanog/nеспецифичног vezanja početnica.

Varijanta gena *BPM2.2* nije umnožena u nijednom uzorku cDNA, što je vidljivo po nedostatku fragmenta od 1086 pb na **Slici 13** i upućuje na zaključak da se radi o ekspresijskoj varijanti koja se ne sintetizira u uvjetima kojima su klijaneci izloženi u ovom eksperimentu. Umnažanje fragmenta duljine 1355 pb upućuje na prisustvo genomске DNA u uzorcima cDNA

kod klijanaca izloženih trosatnim tretmanima na 24 °C, 37 °C i 4 °C, dok u kontrolnim uzorcima genomska DNA nije prisutna i korišteni set početnica ne umnaža nikakav fragment. U uzorcima klijanaca tretiranih 3 h na 24 °C i 37 °C vidljivo je i umnažanje fragmenta duljine ~ 1250 pb, s time da je manji intenzitet vrpce vidljiv kod klijanaca izloženih većoj temperaturi, dok isti taj fragment nedostaje kod klijanaca izloženih temperaturi od 4 °C. S obzirom da fragment nije umnožen na kalupu genomske DNA, potrebno ga je klonirati i sekvencirati kako bi se moglo zaključiti je li riječ o novoj varijanti gena *BPM2*. Uz pomoć korištenog seta početnica umnožen je i fragment veličine 900 pb koji najvjerojatnije nije nova ekspresijska varijanta gena *BPM2*, jer se isti fragment umnožio i na kalupu gDNA (koja sadrži introne).

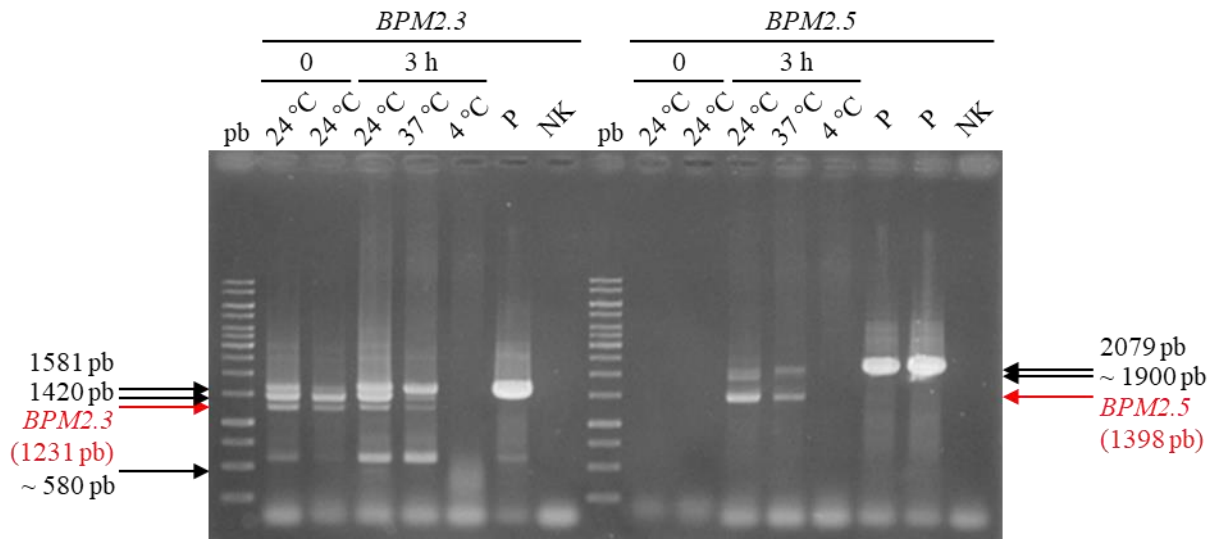


**Slika 13.** Umnažanje ekspresijskih varijanti gena *BPM2.1* i *BPM2.2* na kalupu cDNA iz klijanaca izloženih različitim temperaturama. Fragment označen crvenom bojom (1949 pb) odgovara očekivanoj varijanti gena *BPM2.1*. Fragmenti veličine 2727 pb za *BPM2.1* i veličine 1355 pb za *BPM2.2* označeni crnom bojom predstavljaju produkte umnožene na kalupu genomske DNA, dok ostali fragmenti (~ 900, ~ 1250 pb) označeni crnom bojom predstavljaju fragmente nepoznatog identiteta. Duljine neoznačenih fragmenata nepoznatog identiteta: uzorak 24 °C (0 h) = ~ 1350 pb, uzorak 24 °C (3 h) = ~ 1250, ~ 1100, ~ 780 pb. pb - GeneRuler 1 kb DNA ladder, 24 °C, 37 °C i 4 °C - temperaturni tretman klijanaca, P - pozitivna kontrola (gDNA), NK – negativna kontrola (sterilna H<sub>2</sub>O), 0, 3 h - duljina tretmana.

### 3.4.2.2 Umnažanje ekspresijskih varijanti gena *BPM2.3* i *BPM2.5*

Za analizu ekspresije varijante gena *BPM2.3* u uzorcima cDNA korištene su početnice FW *BPM2.12345* i REV *BPM2.3*, dok su za analizu ekspresije varijante gena *BPM2.5* korištene početnice FW *BPM2.12345* i REV *BPM2.5* (**Tablica 2**). Varijanta gena *BPM2.3* uspješno je umnožena u oba kontrolna uzorka klijanaca bez temperaturnog tretmana te u uzorcima klijanaca izloženih tretmanima od 24 °C (3 h) i 37 °C (3 h), što je vidljivo po prisustvu fragmenta od 1231 pb (**Slika 14**). U uzorku klijanaca tretiranih 3 h na 4 °C nije došlo do umnažanja varijanti gena *BPM2.3* i *BPM2.5*, što navodi na zaključak da te ekspresijske varijante nisu prisutne u uvjetima snižene temperature. Uzorak klijanaca izloženih trosatnom tretmanu na 37 °C pokazuje najmanji intenzitet umnažanja produkta od 1231 pb, što ukazuje na smanjenu ekspresiju varijante gena *BPM2.3* kod povišene temperature. U svim uzorcima cDNA u kojima je došlo do uspješnog umnažanja varijante gena *BPM2.3* vidljiva je i prisutnost genomske DNA koja je zaostala nakon izolacije RNA i reverzne transkripcije. U istim uzorcima vidljivo je i umnažanje neočekivanih fragmenata, s time da je fragment duljine ~ 580 pb umnožen i na kalupu genomske DNA, dok fragment od 1420 pb nije vidljiv u gDNA te je prisutan u manjoj količini u uzorku klijanaca izloženih povišenoj temperaturi od 37 °C, a nedostaje u uzorku klijanaca izloženih temperaturi od 4 °C. Budući da je fragment od 1420 pb neočekivani, u daljnjim eksperimentima ću klonirati taj fragment kako bih sekvenciranjem utvrdila radi li se o novoj varijanti gena *BPM2* (poglavlje 3.5).

Ekspresijska varijanta *BPM2.5* uspješno je umnožena samo u uzorcima cDNA iz klijanaca izloženih trosatnom tretmanu na 24 °C i 37 °C, što je vidljivo po prisustvu produkta duljine 1398 pb, s time da je manji intenzitet vrpce vidljiv kod klijanaca koji su bili izloženi višoj temperaturi (**Slika 14**), ukazujući na smanjenje ekspresije te varijante pri 37 °C. Oba ta uzorka pokazuju i prisutnost genomske DNA u uzorku cDNA, na što upućuje prisustvo fragmenta od 2079 pb. Početnice za analizu ekspresije varijante gena *BPM2.5* omogućile su i umnažanje neočekivanog fragmenta duljine ~ 1900 pb u uzorku klijanaca izloženih tretmanu od 24 °C (3 h) i, s puno manjim intenzitetom kod klijanaca izloženih tretmanu od 37 °C (3 h).

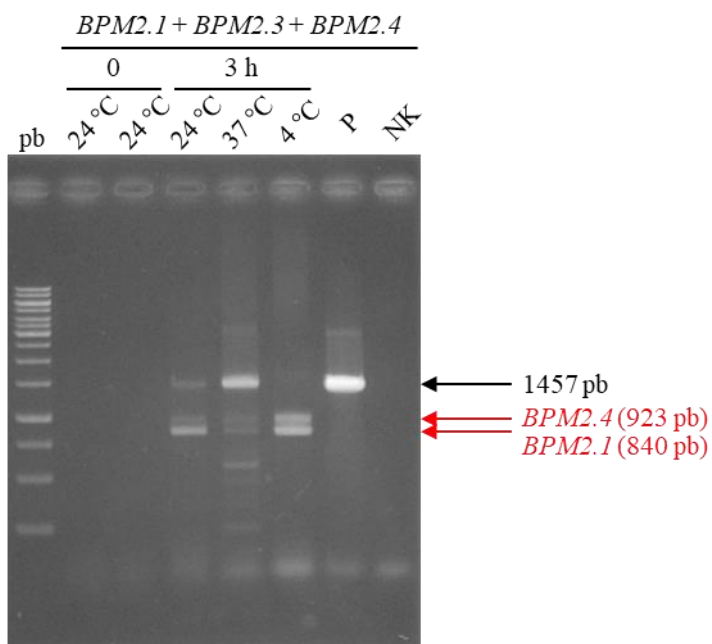


**Slika 14.** Umnažanje ekspresijskih varijanti gena *BPM2.3* i *BPM2.5* na kalupu cDNA iz klijanaca izloženih različitim temperaturama. Fragmenti označeni crvenom bojom odgovaraju očekivanim varijantama gena *BPM2.3* (1231 pb) i *BPM2.5* (1398 pb). Fragmenti veličine 1581 pb za *BPM2.3* i veličine 2079 pb za *BPM2.5* označeni crnom bojom predstavljaju produkte umnožene na kalupu genomske DNA, dok ostali fragmenti (1420, ~ 580, ~ 1900 pb) označeni crnom bojom predstavljaju fragmente nepoznatog identiteta. pb - GeneRuler 1 kb DNA ladder, 24 °C, 37 °C i 4 °C - temperaturni tretman klijanaca, P - pozitivna kontrola (gDNA), NK – negativna kontrola (sterilna H<sub>2</sub>O), 0, 3 h - duljina tretmana.

### 3.4.2.3 Umnažanje ekspresijske varijante gena *BPM2.4*

Za analizu ekspresije varijante gena *BPM2.4* u uzorcima cDNA korištene su početnice FWm BPM2.1345 i REV BPM2.134 (**Tablica 2**). Osim varijante gena *BPM2.4*, ovaj par početnica umnaža i ekspresijske varijante *BPM2.1* i *BPM2.3*, te pritom stvara produkte različitih duljina. Umnažanje varijanti gena *BPM2.1* i *BPM2.4* u uzorcima klijanaca izloženih tretmanima od 24 °C (3 h), 37 °C (3 h) i 4 °C (3 h) potvrđeno je prisustvom fragmenata duljine 840 pb i 923 pb (**Slika 15**). Uzorak klijanaca izloženih trosatnom tretmanu na 4 °C pokazuje najveći intenzitet umnažanja oba fragmenta, što ukazuje na važnost ekspresijskih varijanti gena *BPM2.1* i *BPM2.4* tijekom izlaganja klijanaca hladnom tretmanu. Ovi rezultati nisu u skladu s rezultatima prikazanim na **Slici 13**, koji ukazuju na nedostatak umnažanja varijante gena *BPM2.1* u uvjetima povišene i snižene temperature kada su korištene početnice koje ju umnažaju cijelom duljinom, pa je moguće da se tu (**Slika 15**) umnožio fragment nove *BPM2* varijante koja ima homologiju s *BPM2.1*, ali je kraća od nje. S druge strane, varijanta gena *BPM2.3* nije detektirana u nijednom uzorku cDNA, što je

potvrđeno nedostatkom fragmenta od 1171 pb. Umnažanje fragmenta od 1457 pb u uzorcima klijanaca izloženih trosatnim tretmanima na 24 °C i 37 °C upućuje na prisutnost genomske DNA koja je zaostala u uzorcima cDNA nakon reverzne transkripcije. Početnice namijenjene analizi ekspresije varijante gena *BPM2.4* omogućile su i umnažanje neočekivanih fragmenata duljine ~ 600 pb, ~ 480 pb i ~ 250 pb u uzorku klijanaca izloženih trosatnom tretmanu na 37 °C.



**Slika 15.** Umnažanje ekspresijskih varijanti gena *BPM2.4* i *BPM 2.1* na kalupu cDNA iz klijanaca izloženih različitim temperaturama. Fragmenti označeni crvenom bojom odgovaraju očekivanim varijantama gena *BPM2.1* (840 pb) i *BPM2.4* (923 pb). Fragment označen crnom bojom (1457 pb) predstavlja produkt umnožen na kalupu genomske DNA. Duljine neoznačenih fragmenata nepoznatog identiteta: uzorak 37 °C (3 h) = ~ 600, ~ 480, ~ 250 pb. pb - GeneRuler 1 kb DNA ladder, 24 °C, 37 °C i 4 °C - temperaturni tretman klijanaca, P - pozitivna kontrola (gDNA), NK – negativna kontrola (sterilna H<sub>2</sub>O), 0, 3 h - duljina tretmana.

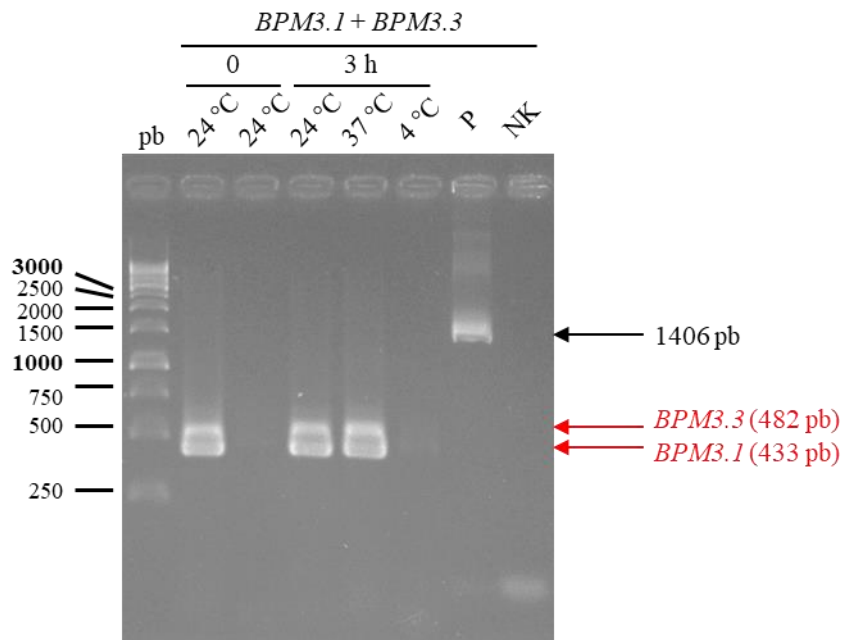
### 3.4.3 Analiza ekspresije varijanti gena *BPM3*

Analiza ekspresije četiriju varijanti gena *BPM3* provedena je korištenjem četiri para početnica dizajniranih za njihovo umnažanje. Kao što je već spomenuto (poglavlje 3.2.1), početnice dizajnirane za umnažanje varijante gena *BPM3.1* ne djeluju specifično, već umnažaju i varijantu *BPM3.3*, a nastali produkti mogu se razlikovati po veličini (**Tablica 3**). Sekvence tih početnica navedene su u **Tablici 2**. Uzorci cDNA koji su korišteni u ovim eksperimentima nisu imali jednake mase, što znači da se tijekom ovih analiza umnoženi produkti ne mogu uspoređivati po intenzitetu vrpca. Reakcije PCR provedene su koristeći uvjete i slijedeći protokol za pripremu reakcijske smjese naveden u **Tablici 5**, dok je odabrano vrijeme elongacije iznosilo 3 min za umnažanje varijante gena *BPM3.4* i 2 min za umnažanje ostalih varijanti gena *BPM3*. Analiza ekspresije gena *BPM3* opisana je u idućim poglavljima.

#### 3.4.3.1 Umnažanje ekspresijskih varijanti gena *BPM3.1* i *BPM3.3*

Za umnažanje varijante gena *BPM3.1* u uzorcima cDNA korištene su početnice FWm *BPM3.1234* i REV *BPM3.13* (**Tablica 2**). Izuzev varijante gena *BPM3.1*, ovaj par početnica umnaža i varijantu gena *BPM3.3*, te pritom stvara produkte koji se razlikuju u duljini za 49 pb. S ciljem boljeg razlučivanja očekivanih fragmenata u ovom eksperimentu, korištena je elektroforeza na 2% agaroznom gelu pri nižoj voltaži (50 V). Usprkos tome, na gelu prikazanom na **Slici 16** i dalje je vidljiva prisutnost razmaza između dvaju fragmenata umnoženih na kalupu cDNA, kao i pojava dvostrukih vrpca u molekularnom bilježu, što oboje ukazuje na manjak razlučivosti. U prvom kontrolnom uzorku klijanaca bez tretmana te u uzorcima klijanaca izloženih tretmanima od 24 °C (3 h) i 37 °C (3 h), vidljivo je umnažanje fragmenta od 433 pb koji odgovara varijanti gena *BPM3.1* te fragmenta od 482 pb koji odgovara varijanti gena *BPM3.3* (**Slika 16**). Varijante gena *BPM3.1* i *BPM3.3* nisu detektirane u uzorku klijanaca izloženih trosatnom tretmanu na 4 °C, što navodi na zaključak da je riječ o ekspresijskim varijantama koje se ne sintetiziraju u uvjetima snižene temperature. S druge strane, nedostatak varijanti u drugom kontrolnom uzorku vjerojatno je posljedica pogreške tijekom izvedbe eksperimenta, jer je u prvom kontrolnom uzorku vidljivo njihovo uspješno umnažanje.

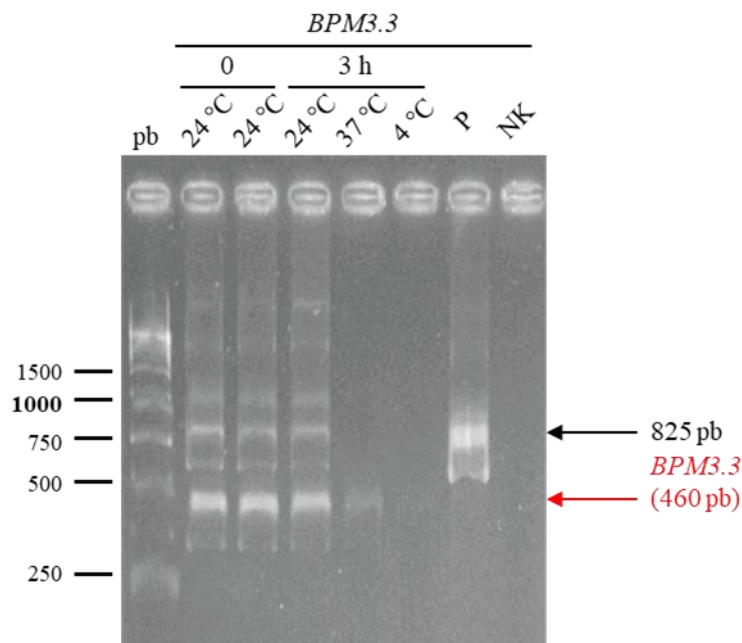




**Slika 16.** Umnažanje ekspresijskih varijanti gena *BPM3.1* i *BPM3.3* na kalupu cDNA iz klijanaca izloženih različitim temperaturama i detekcija na 2% agaroznom gelu. Fragmenti označeni crvenom bojom odgovaraju očekivanim varijantama gena *BPM3.1* (433 pb) i *BPM3.3* (482 pb). Fragment označen crnom bojom (1406 pb) predstavlja produkt umnožen na kalupu genomske DNA. Oznake sa strane odgovaraju veličinama fragmenata DNA u korištenom molekularnom biljegu. pb - GeneRuler 1 kb DNA ladder, 24 °C, 37 °C i 4 °C - temperaturni tretman klijanaca, P - pozitivna kontrola (gDNA), NK – negativna kontrola (sterilna H<sub>2</sub>O), 0, 3 h - duljina tretmana.

Za analizu ekspresije varijante gena *BPM3.3* u uzorcima cDNA korištene su početnice FW *BPM3.34* i REV *BPM3.13* (**Tablica 2**) koje omogućuju umnažanje produkta duljine 460 pb prema kalupu cDNA. S ciljem boljeg razlučivanja fragmenata na 2% agaroznom gelu u ovom eksperimentu, elektroforeza je pripremljena u 0,5 × TBE puferu, što je smanjilo pojavu dvostrukih vrpca, ali ne i razmaza fragmenata na gelu (**Slika 17**). Uzevši u obzir loše razdvajanje fragmenata DNA u molekularnom biljegu, svejedno se može očitati prisutnost varijante gena *BPM3.3* u oba kontrolna uzorka klijanaca bez temperaturnog tretmana te u uzorcima klijanaca izloženih tretmanima od 24 °C (3 h) i 37 °C (3 h), što je potvrđeno umnažanjem fragmenta duljine 460 pb (**Slika 17**). Važno je istaknuti da varijanta gena *BPM3.3* nije umnožena u uzorku klijanaca tretiranih 3 h na 4 °C, što upućuje na odsutnost te ekspresijske varijante u uvjetima snižene temperature i potvrđuje rezultate dobivene s početnicama za analizu ekspresije varijanti gena

*BPM3.3* i *BPM3.1* (Slika 16). U svim uzorcima cDNA u kojima je došlo do uspješnog umnažanja varijante gena *BPM3.3* vidljiva je prisutnost genomske DNA koja je zaostala nakon izolacije RNA i reverzne transkripcije.



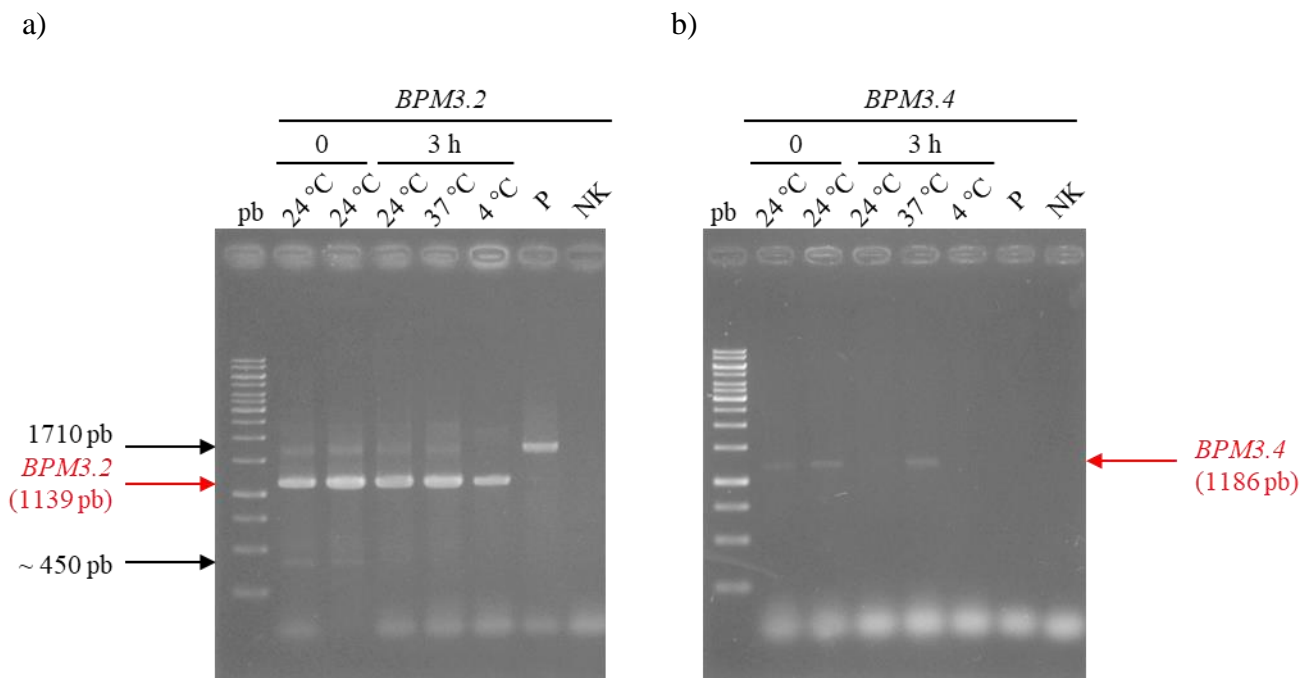
**Slika 17.** Umnažanje ekspresijske varijante gena *BPM3.3* na kalupu cDNA iz klijanaca izloženih različitim temperaturama i detekcija na 2% agaroznom gelu u  $0,5 \times$  TBE puferu. Fragment označen crvenom bojom (460 pb) odgovara očekivanoj varijanti gena *BPM3.3*. Fragment označen crnom bojom (825 pb) predstavlja produkt umnožen na kalupu genomske DNA. Oznake sa strane odgovaraju veličinama fragmenata DNA u korištenom molekularnom bilježu. pb - GeneRuler 1 kb DNA ladder, 24 °C, 37 °C i 4 °C - temperaturni tretman klijanaca, P - pozitivna kontrola (gDNA), NK – negativna kontrola (sterilna H<sub>2</sub>O), 0, 3 h - duljina tretmana.

### 3.4.3.2 Umnažanje ekspresijskih varijanti gena *BPM3.2* i *BPM3.4*

Za analizu ekspresije varijante gena *BPM3.2* u uzorcima cDNA korištene su početnice FW *BPM3.1234* i REV *BPM3.2*, dok su za analizu ekspresije varijante *BPM3.4* korištene početnice FW *BPM3.1234* i REV *BPM3.4* (Tablica 2). Varijanta gena *BPM3.2* uspješno je umnožena u svim uzorcima: oba kontrolna uzorka te uzorcima klijanaca izloženih trosatnim tretmanima na 24 °C, 37 °C i 4 °C (Slika 18a), što je vidljivo po prisustvu fragmenta od 1139 pb i ukazuje na zaključak da je riječ o ekspresijskoj varijanti čija ekspresija nije temperaturno uvjetovana. U svim

uzorcima, osim u uzorku klijanaca izloženih trosatnom tretmanu na 4 °C, vidljivo je umnažanje fragmenta od 1710 pb koji upućuje na prisutnost genomske DNA u uzorcima cDNA. Set početnica namijenjen umnažanju varijante gena *BPM3.2* omogućio je i umnažanje neočekivanog fragmenta duljine ~ 450 pb u oba kontrolna uzorka klijanaca koja nisu bila izložena temperaturnom tretmanu.

S obzirom na činjenicu da prvotno umnažanje varijante gena *BPM3.4* s odgovarajućim početnicama nije bilo uspješno, reakcijska smjesa za PCR pripremljena je s volumenom kalupa cDNA od 4 µl kako bi se omogućila bolja vizualizacija te ekspresijske varijante u svim uzorcima cDNA. Varijanta gena *BPM3.4* uspješno je umnožena u oba kontrolna uzorka klijanaca bez tretmana i u uzorku klijanaca izloženih trosatnom tretmanu na 37 °C, što je potvrđeno prisustvom fragmenta duljine 1186 pb (**Slika 18b**). U uzorku klijanaca izloženih 3 h temperaturi od 4 °C nije vidljivo umnažanje varijante gena *BPM3.4*, iz čega se može zaključiti da ta varijanta nije prisutna u uvjetima snižene temperature. Nedostatak umnažanja varijante gena *BPM3.4* vidljiv je i u uzorku klijanaca izloženih 3 h temperaturi od 24 °C, što bi moglo značiti da ekspresija te varijante ovisi o dnevnom ritmu biljke, jer je u kontrolnim uzorcima koji su bili 3 h kraće inkubirani na 24 °C došlo do umnažanja varijante *BPM3.4*. Isto tako, ovaj rezultat je možda posljedica smanjene količine kalupa u uzorcima cDNA (u prilog tome ide i nedostatak umnažanja na kalupu genomske DNA u pozitivnoj kontroli). Stoga, čak i nakon upotrebe većeg volumena kalupa, ekspresiju varijante gena *BPM3.4* je teško detektirati s dizajniranim setom početnica.



**Slika 18.** Umnažanje ekspresijskih varijanti gena (a) *BPM3.2* i (b) *BPM3.4* na kalupu cDNA iz klijanaca izloženih različitim temperaturama. Fragmenti označeni crvenom bojom odgovaraju očekivanim varijantama gena *BPM3.2* (1139 pb) i *BPM3.4* (1186 pb). Fragment veličine 1710 pb za *BPM3.2* označen crnom bojom predstavlja produkt umnožen na kalupu genomske DNA, dok je drugi fragment označen crnom bojom (~ 450 pb) nepoznatog identiteta. pb - GeneRuler 1 kb DNA ladder, 24 °C, 37 °C i 4 °C - temperaturni tretman klijanaca, P - pozitivna kontrola (gDNA), NK – negativna kontrola (sterilna H<sub>2</sub>O), 0, 3 h - duljina tretmana.

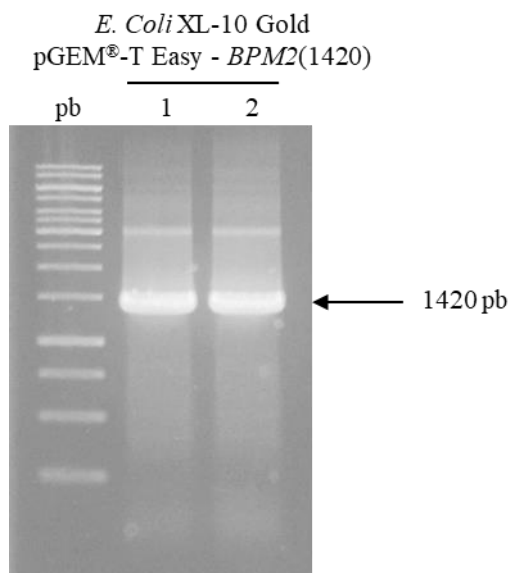
### 3.5 Kloniranje i identifikacija nove varijante gena *BPM2*

S obzirom na činjenicu da je tijekom analize ekspresije varijanti gena *BPM1-3* došlo do umnažanja neočekivanih produkata, dio njih je ugrađen u vektor i sekvenciran s ciljem pronalaska novih varijanti gena *BPM1-3*. Produkti koji su se klonirali odabrani su jer su pokazali visoku stopu umnažanja na različitim temperaturama, dali su se lako izrezati iz gela, imali su optimalnu duljinu za kloniranje te nisu bili umnoženi na kalupu genomske DNA. Provedeno je kloniranje nekoliko fragmenata, međutim, samo produkt duljine 1420 pb umnožen početnicama za analizu ekspresije varijante gena *BPM2.3* (**Slika 14**) je uspješno ugrađen u ciljani vektor te mu je određen primarni slijed nukleotida. Relativno jaka ekspresija ovog produkta vidljiva na temperaturama od 24 °C i 37 °C činila ga je glavnim kandidatom koji bi mogao potvrditi postojanje nove varijante gena *BPM2*. Produkt duljine oko 1250 pb umnožen početnicama za analizu ekspresije varijante gena *BPM2.2* (**Slika 13**) i produkt duljine oko 2000 pb umnožen početnicama za analizu ekspresije varijante gena *BPM1.3* (**Slika 12**) nisu se mogli uspješno klonirati, čak ni nakon ponovnog pokušaja njihovog umnažanja i modifikacije postavki ligacijske reakcije.

#### 3.5.1 Izrada plazmidnog konstrukta

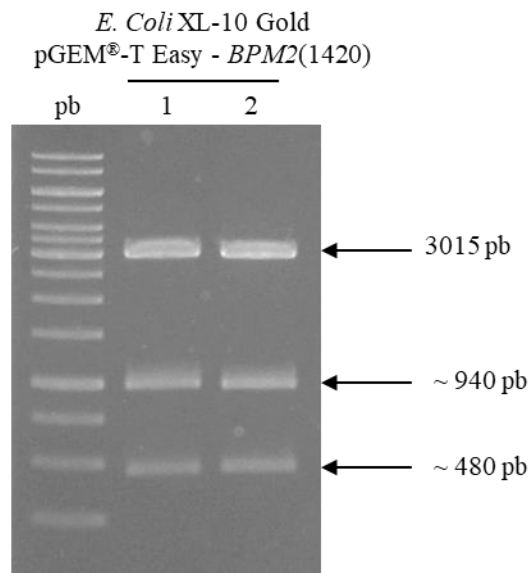
U svrhu dobivanja što većeg volumena željenog fragmenta (1420 pb) za kloniranje, produkti reakcije PCR provedene s početnicama za umnažanje varijante gena *BPM2.3* (FW *BPM2.12345* i REV *BPM2.3*) detektirani su elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu (nije prikazano). Samo PCR uzorci u kojima se u prvotnoj analizi fragment umnožio s jakim intenzitetom nanoseni su na gel, a to uključuje oba kontrolna uzorka te uzorak klijanaca izloženih trosatnom tretmanu na 24 °C. Željeni fragment sam pročistila iz agaroznog gela. Koncentracija

pročišćenog fragmenta iznosila je 63,5 ng/ $\mu$ l. PCR fragment pročišćen iz gela ugrađen je u komercijalni plazmid pGEM<sup>®</sup>-T Easy pomoću tehnike TA kloniranja. Cirkularizirani plazmidi transformirani su u bakterijski soj *E. coli* XL-10 Gold uz selekciju na pločama s dodatkom Amp, IPTG-a i X-gala. Odabrane bijele kolonije su uzgojene u prekončnoj kulturi, a uspješnost transformacije plazmidnom DNA provjerena je metodom PCR na bakterijskim kulturama s početnicama FW BPM2.12345 i REV BPM2.3 (poglavlje 2.2.6). Umnoženi produkt duljine 1420 pb upućuje na uspješnu ugradnju željenog fragmenta u plazmid pGEM<sup>®</sup>-T Easy (**Slika 19**).



**Slika 19.** Fragment duljine 1420 pb umnožen iz prekončnih bakterijskih suspenzija (1, 2) *E. coli* XL-10 Gold transformiranih s plazmidom pGEM<sup>®</sup>-T Easy - BPM2(1420). pb - GeneRuler 1 kb DNA ladder.

Prekončne bakterijske kulture iskorištene su za izolaciju plazmidne DNA, a izolirani plazmidi podvrgnuti su jednostrukoj restrikciji s enzimom EcoRI kako bi se oslobodio fragment ugrađen u mjesto MCS. Detekcija fragmenata duljine ~ 480 pb i ~ 940 pb je u skladu s očekivanim (**Slika 20**), jer genomska DNA gena *BPM2* sadrži restrikcijsko mjesto EcoRI na položaju 477/481 (NEBcutter V2.0, <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). Fragment od 3015 pb odgovara duljini korištenog plazmida pGEM<sup>®</sup>-T Easy. Restrikcijska analiza potvrdila je uspješnost ugradnje produkta od 1420 pb u vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy, što je dodatno potvrđeno i sekvenciranjem (Macrogen Europa, Amsterdam, Nizozemska) s početnicama M13 fw i M13 rev koje omeđuju mjesto MCS (**Slika 5**) i umnažaju ugrađeni fragment od interesa.



**Slika 20.** Restriksijska analiza plazmida pGEM<sup>®</sup>-T Easy - *BPM2*(1420) s enzimom EcoRI. Fragment od 3015 pb je linearizirani plazmid pGEM<sup>®</sup>-T Easy, a fragmenti od ~ 940 i ~ 480 pb su dijelovi PCR fragmenta od 1420 pb pocijepani enzimom EcoRI. pb - GeneRuler 1 kb DNA ladder, 1,2 – replike izoliranog plazmida.

### 3.5.2 Analiza rezultata sekvenciranja i otkriće varijante gena *BPM2*

Sekvenciranjem fragmenta gena *BPM2* (od 1420 pb) dobivenog umnažanjem s početnicama za analizu ekspresije varijante gena *BPM2.3* (FW *BPM2.12345* i REV *BPM2.3*) dobivena je sekvenca prikazana na **Slici 21** i u **Prilogu IV**. Sekvenca fragmenta od 1420 pb je analizirana poravnanjem u programu Clustal Omega s nukleotidnim sekvencama varijante gena *BPM2.3* (cDNA) i genomske DNA gena *BPM2* preuzetima iz baze TAIR. Analiza poravnanja ukazala je na postojanje dodatnog slijeda nukleotida (189 pb) koji nije prisutan u varijanti gena *BPM2.3*, ali se nalazi u sekvenci genomske DNA (**Prilog IV**). Sekvenca fragmenta od 1420 pb sadrži veći dio 5' UTR regije i egzon 1 koji je jednak za sve *BPM2* varijante, egzon 2 koji je produžen s obzirom na sve poznate varijante gena *BPM2* te sadrži intron 2 i egzon 3 varijante gena *BPM2.4* (**Slika 22**). Sekvenca fragmenta od 1420 pb strukturom najviše odgovara ekspresijskim varijantama *BPM2.3* i *BPM2.4*, što je potvrđeno i poravnanjem sekvenci ovih varijanti gena (**Prilog IV**), a specifičan slijed nukleotida (189 pb) koji je karakterističan za navedeni fragment nije detektiran u dosad poznatim varijantama gena *BPM2*. Dobiveni podaci ukazuju na to da uz dosad poznatih pet varijanti gena *BPM2* postoji i ova, do sada ne opisana varijanta gena *BPM2.6*

koja čini se, ne procesira intron 2, već ga zadržava i djelomično translatira u protein. Premda se iz dobivene nukleotidne sekvence može iščitati kompletna proteinska sekvenca varijante BPM2.6, potpuna cDNA sekvenca novootkrivene varijante gena *BPM2.6* još nije poznata i potrebno ju je razotkriti. Početnice FW BPM2.12345 i REV BPM2.3 pomoću kojih je umnožen proučavani fragment od 1420 pb dizajnirane su na način da ne umnažaju varijantu gena *BPM2.3* cijelom duljinom (**Prilog II**). Upravo zbog toga sekvenca nove varijante gena *BPM2.6* nije potpuna i ne može se sa sigurnošću ustanoviti gdje završava 3' UTR regija, a gdje počinje 5' UTR regija nove ekspresijske varijante. Poznati dio nukleotidne sekvence nove varijante gena *BPM2.6* (1420 nt) koji je umnožen s navedenim početnicama u klijancima izloženim temperaturama od 24 °C i 37 °C, prikazan je na **Slici 22**, uključujući i specifičan slijed od 189 nt koji je karakterističan za tu ekspresijsku varijantu.

Otkriće nove varijante gena *BPM2.6* u klijancima *A. thaliana* upućuje na postojanje nove izoforme proteina BPM2, čija se aminokiselinska sekvenca razlikuje od sekvenci proteina koji nastaju translacijom mRNA već poznatih varijanti gena *BPM2*. Aminokiselinska sekvenca nove izoforme proteina BPM2 (263 aminokiseline) uključuje devet aminokiselina koje nisu prisutne u izoformi proteina nastaloj translacijom varijante gena *BPM2.3* (**Slika 21**), što ukazuje na moguće razlike u strukturi, ali i funkciji, novootkrivene varijante proteina BPM2. Aminokiseline specifične za novu proteinsku izoformu BPM2 nastale su translacijom dijela slijeda od 189 nt specifičnog za varijantu gena *BPM2.6* i nisu prisutne u ostalim izoformama proteina BPM2.

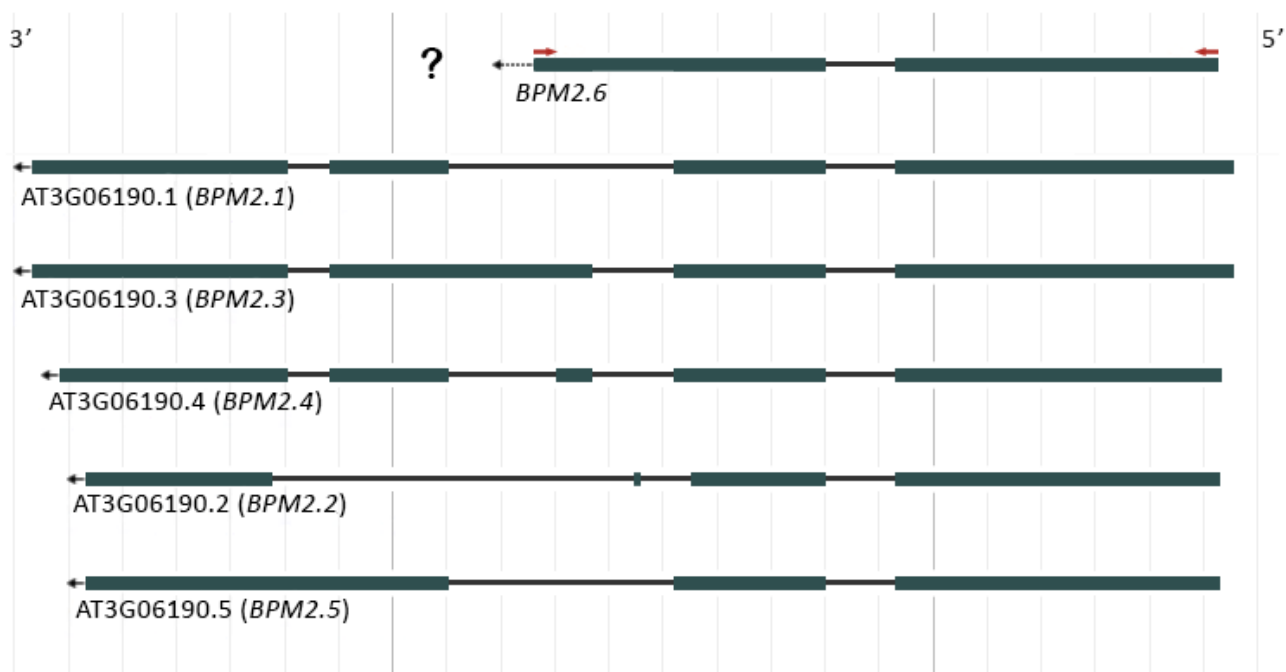
5'...

aa acc gat cta tca agc aag tgg ttc ctc tct ctc tct acc tct cgt ttt tgg cca acg  
tcg tcg tct tca cga tcc acg acg att cag ttc ttg agt tcc ggc gat tat cgg tct ctc  
act tct ggt tcc gtt gaa ccc ctc att tct ctt ctc gcc cgt gct ctc aaa ttc cga tat  
ttg ccc ctg tga ttc gaa acc cta att tcg cct atc aat ctg gaa aat ctc tca att cga  
aga ctt tag cag cgc aaa gat act cta tcc ggg taa taa gat cga aga aac cat caa ttt  
ctt acc aaa gtc gtg att ctt gga tct cgt ctt tgt ttg atg gac aca att agg gtt tcc  
M D T I R V S  
aag gag gtt cct gga tct tcg aaa tcg acc gca cag tcg ctc acg gag tcg acc tct cgc  
K E V P G S S K S T A Q S L T E S T S R  
acg gaa acc atc aat ggc tcc cac gaa ttc aag atc agc ggc tac tct ttg gtc aaa ggc  
T E T I N G S H E F K I S G Y S L V K G  
atg ggg att ggc aaa tac gtt gcc tcg gat act ttc atg gtc ggt gga tac tcc tgg gcc  
M G I G K Y V A S D T F M V G G Y S W A  
atc tac ttc tac cca gat gga aag agt cca gag gat aat tct gtc tac gtg tct ctc ttc  
I Y F Y P D G K S P E D N S V Y V S L F  
ata gcc ctt gcg agt gaa gga gcc gat gtt agg gct ttg ttt gag ctt acc ctc gtg gat  
I A L A S E G A D V R A L F E L T L V D  
cag agc ggt aac gaa agg cac aaa gtt cat agc cat ttt ggt aga act ctc gaa agc gga  
Q S G N E R H K V H S H F G R T L E S G  
ccc tat act ctt aaa tat cga ggg agt atg tgg gga tac aaa cga ttt ttc aag agg tct  
P Y T L K Y R G S M W G Y K R F F K R S  
ctt ttg gag tca tcg gac tat ctg aag gac aat ggt ctc ttg gtc cgg tgt tgt gtt gga  
L L E S S D Y L K D N G L L V R C C V G  
gtg gtg aag tca cgc aca gaa gga ccg agg tgt tac aat atc ccg gtg ccg gtt tct ggc  
V V K S R T E G P R C Y N I P V P V S G  
ttg ggt cag cag ttt gga aag ctt ttg gaa agt ggg aaa gga gct gac gtt act ttc gaa  
L G Q Q F G K L L E S G K G A D V T F E  
gtt gat gga gaa aca ttt cct gct cac aaa ttg gtt ctt gca gca cgt tct gca gtt ttc  
V D G E T F P A H K L V L A A R S A V F  
agg gca cag ctt ttt ggc ccg ttg aga agt gaa aat acc aat tgt ata atc ata gaa gac  
R A Q L F G P L R S E N T N C I I I E D  
gta caa gcc cct att ttc aag gtt ctc cct tta act ctc ttt ctg gac taa aac ctg ttt  
V Q A P I F K V L P L T L F L D -  
ttc ctt ggc atg act ttg tag aat ttt ata ttt gta gct tta gaa gtt gag gct gtt agt  
ttt agt cct aag tgt ata agg cct tat aag aag aga tag ctt tct tgg ttc ctt gcc ttt  
tct cgg gtg agt gat tgt ggt gtg ata cag gat ttt ctg ttt acg agt gta caa tcc ggg  
acc ttc tcc tgg ggt gct gct ccc gtt ctc aaa tat tac tca ccc ggg ata agg ttt aat  
ctt tct act ttt ctt ttg gat tgc atg att gtc tcg att tc

...3'



**Slika 21.** Poznati dio nukleotidne sekvence (1420 nt) nove varijante gena *BPM2.6* umnožen s početnicama za analizu ekspresije varijante gena *BPM2.3* u klijancima izloženim temperaturama od 24 °C i 37 °C i aminokiselinska sekvenca nove izoforme proteina (263 aminokiseline) koja nastaje translacijom varijante gena *BPM2.6*. Aminokiselinska sekvenca određena je pomoću alata Translate tool na portalu ExpASy (<https://web.expasy.org/translate/>). Žutom bojom su obilježena mjesta vezanja početnica FW *BPM2.12345* i REV *BPM2.3*, ljubičastom bojom mjesto inicijacije translacije (ATG), sivom bojom specifičan slijed od 189 nt koji ne pokazuje homologiju s ostalim varijantama gena *BPM2*, a svijetloplavom bojom aminokiseline specifične za novi protein *BPM2*.



**Slika 22.** Usporedba struktura postojećih varijanti gena *BPM2* preuzetih iz baze TAIR i fragmenta od 1420 pb koji predstavlja poznati dio sekvence nove varijante gena *BPM2.6*. Sekvenca tog dijela varijante *BPM2.6* sadrži veći dio 5' UTR regije i egzon 1 koji je jednak za sve *BPM2* varijante, egzon 2 koji je produžen s obzirom na sve poznate varijante *BPM2* te sadrži intron 2 i egzon 3 varijante gena *BPM2.4*. Zelena boja označava dijelove sekvence gena *BPM2* koji se zadržavaju u pojedinoj varijanti gena, a crna boja označava dijelove sekvence koji se izrezuju prilikom alternativnog prekrajanja gena. Iscrtkana strelica na 3' kraju varijante gena *BPM2.6* i upitnik označavaju da potpuna sekvenca 3' UTR regije te varijante još nije poznata, a vjerojatno ni sekvenca 5' UTR regije, jer početnice FW *BPM2.12345* i REV *BPM2.3* (crvene strelice) ne umnažaju varijantu gena *BPM2.6* cijelom duljinom.

## 4. RASPRAVA

Za analizu složenosti transkriptoma i određivanje alternativnih varijanti gena na razini čitavog genoma potrebno je poznavati alternativne događaje u svim tkivima, razvojnim stadijima i/ili uvjetima kojima je organizam izložen. U tu svrhu se koriste visokoprotočne metode sekvenciranja RNA (*eng.* RNA-seq) i analize ekspresije pomoću metode *eng.* „cDNA microarray“. Za analizu novih izoformi transkripata kod malog broja proučavanih gena u određenim uvjetima upotrebljava se metoda q-RT-PCR (*eng.* Quantitative-Real Time-PCR) (Reddy i sur., 2013). Cilj ovog rada nije bio samo analizirati ekspresiju varijanti gena *BPM1-3*, već i istražiti postojanje novih varijanti gena *BPM1-3* na proučavanim temperaturama, pa je za takvu analizu korištena metoda PCR s gen specifičnim početnicama. Klijanci biljke *A. thaliana* stari 12 dana uzorkovani su prije početka eksperimenta te nakon tri sata izloženosti temperaturama od 24 °C, 37 °C i 4 °C pri osvjetljenju od 3000 - 4000 lx. Neposredno nakon uzorkovanja izolirana je mRNA koja je nakon reverzne transkripcije poslužila kao kalup u umnažanju. Metoda PCR iskorištena je za umnažanje fragmenata gena *BPM*, a dodatna analiza fragmenata neočekivanih duljina pokazala je da jedan od fragmenata predstavlja novu ekspresijsku varijantu gena *BPM2*.

### 4.1 Ovisnost alternativnog prekrajanja gena *BPM1-3* u uročnjaku o dnevnom ritmu biljke

S obzirom da su klijanci uzorkovani na početku izloženosti dnevnom svjetlu i tri sata nakon, tijekom izlaganja biljke normalnoj temperaturi rasta od 24 °C uočene su razlike u ekspresiji gena *BPM* u ovisnosti o dnevnom ritmu biljke. U skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu, čini se da ekspresija varijante gena *BPM1.3* raste tijekom dana, dok se ekspresija varijante gena *BPM3.4* smanjuje. Škiljaica i sur. (2019) predlažu da intenzitet ekspresije varijanti gena *BPM1.1* i *BPM1.2* ovisi o dnevnom ritmu biljke, što je potvrđeno s rezultatima kvantitativne PCR analize u tom radu. Sukladno tome, moguće je da i intenzitet ekspresije drugih varijanti gena *BPM1-3* i/ili općenito njihova sinteza ovisi o dnevnom ritmu biljke. Dosadašnja istraživanja dokazala su kako alternativno prekrajanje gena utječe na cirkadijani ritam biljke, što je primjerice vidljivo kod gena *CCA1* u biljci *A. thaliana*, čije alternativno prekrajanje doprinosi aritmičnosti u cirkadijanom

ritmu, tako da sinteza duljeg transkripta negativno regulira aktivnost gena *CCA1* te uzrokuje skraćenje dnevnog ritma biljke (Seo i sur., 2012). U uvjetima niskih okolišnih temperatura, proizvodnja alternativnog dugog transkripta gena *CCA1* je reducirana, što omogućuje povećanu toleranciju smrzavanja u tim uvjetima i upućuje na povezanost okolišne temperature i regulacije cirkadijanog ritma biljke *A. thaliana* (Seo i sur., 2012). U ovom radu se predlaže da alternativno prekrajanje gena *BPM1-3* u biljci *A. thaliana* ovisi o fotoperiodu biljke. Porast ekspresije varijante gena *BPM1.3* uočen u ovom radu u korelaciji je s padom razine transkripcijskog faktora MYB56 tijekom dana, koji djeluje kao negativni regulator cvjetanja, a pod kontrolom je degradacije posredovane proteinima BPM (Chen i sur., 2015). Smanjenje ekspresije varijante gena *BPM3.4* tijekom dana može upućivati na neku drugu ulogu proteina BPM ovisnu o fotoperiodu, koja nije u vezi s regulacijom cvjetanja biljke, ili na pogrešku tijekom provedbe eksperimenta, jer rezultati dobiveni u ovom radu upućuju na slabo umnažanje varijante gena *BPM3.4* u svim testnim uvjetima.

## 4.2 Alternativno prekrajanje gena *BPM1-3* u uročnjaku je inducirano temperaturom

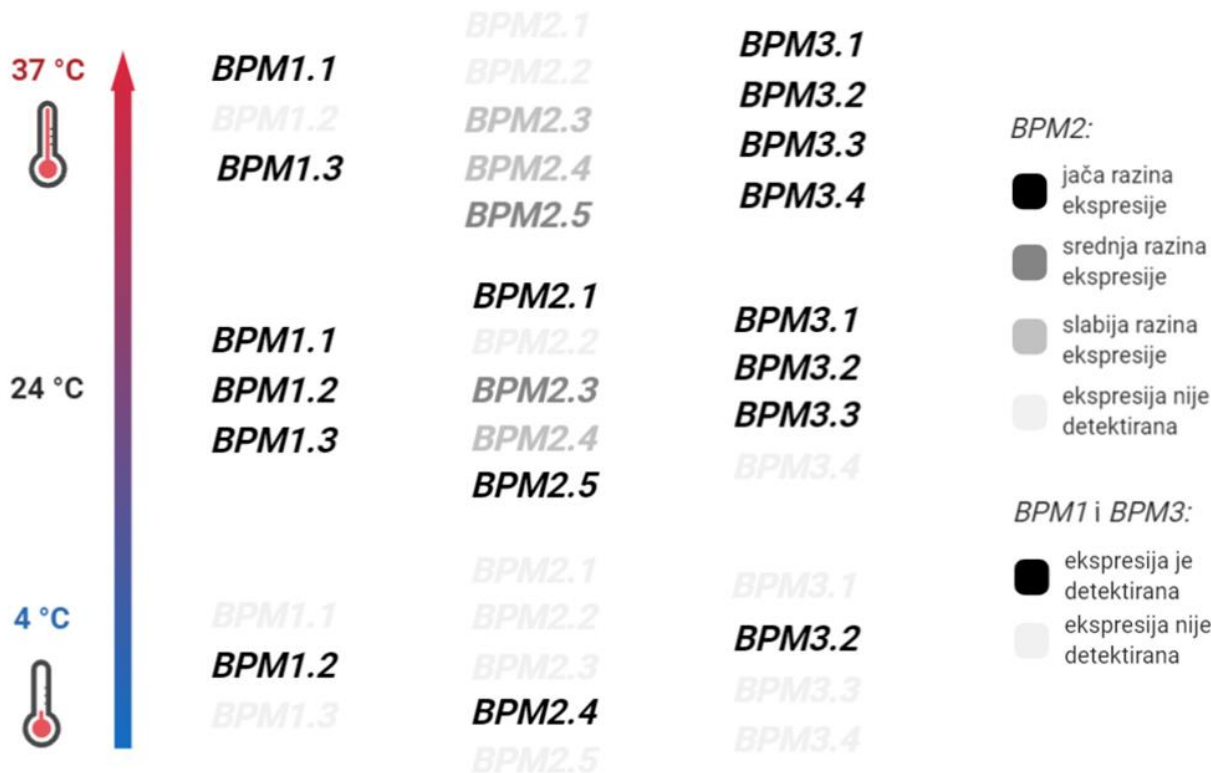
Dosadašnja istraživanja ekspresije gena *BPM* u biljci *Arabidopsis thaliana* većinom su bazirana na proučavanju relativnih razina ekspresije i tkivno-specifičnih ekspresijskih uzoraka na razini gena (Weber i Hellman, 2009; Lechner i sur., 2011) te potvrđuju da su geni *BPM1-6* eksprimirani u većini organa biljke (Lechner i sur., 2011). Uz to, istraživanje (Škiljaica i sur., 2019) predlaže da je ekspresija gena *BPM1-3* inducirana temperaturom i da postoji različiti intenzitet umnažanja varijanti gena *BPM1* tijekom izlaganja uročnjaka povišenoj temperaturi. Stoga se u ovom radu nastojalo istražiti da li promjene temperature utječu na alternativno prekrajanje gena *BPM1-3*. Ovo je prvi rad u kojem se diferencijalna ekspresija varijanti gena *BPM1-3* kod biljke *A. thaliana* istraživala u ovisnosti o temperaturi i ne postoje objavljeni radovi s kojima bi se dobiveni rezultati usporedili. Rezultati umnažanja varijanti gena *BPM1-3* u ovom radu potvrđuju da je regulacija ekspresije i alternativnog prekrajanja gena *BPM1-3* u klijancima biljke *A. thaliana* ovisna o temperaturi (**Slika 23**). Na temelju dobivenih rezultata čini se da u uvjetima povišene temperature od 37 °C postoje razlike u obrascu ekspresije pojedinih varijanti gena *BPM1-3* u odnosu na temperaturu rasta od 24 °C (**Slika 23**). U radu Škiljaica i sur. (2019) se

pri povišenoj temperaturi uočava značajan porast ekspresije gena *BPM2* u odnosu na temperaturu od 24 °C. U ovom radu dobiveno je upravo suprotno. Osim toga, varijante gena *BPM2.1*, *BPM2.2* i *BPM1.2* nisu se eksprimirale na povišenoj temperaturi (**Slika 23**).

Od svih proučavanih ekspresijskih varijanti, samo se varijanta gena *BPM2.2* nije eksprimirala u testnim uvjetima kojima su klijanci izloženi u ovom eksperimentu (**Slika 23**), što ukazuje na važnost te varijante u nekim drugim stresnim uvjetima ili razvojnim stadijima biljke. Dostupni ekspresijski podaci za varijantu *BPM2.2* dobiveni metodom *eng.* „RNA-seq“ u bazi ThaleMine (<https://apps.araport.org/thalemine/begin.do>) potvrđuju rezultate ovog rada i generalno upućuju na znatno nižu razinu ekspresije u odnosu na ostale varijante gena *BPM2* u svim tkivima uročnjaka. U uvjetima snižene temperature od 4 °C varijanta gena *BPM2.1* nije se umnožila s početnicama koje ju umnažaju cijelom duljinom (**Slika 13**), ali se umnožila s početnicama koje umnažaju središnji dio i 3' UTR regiju varijante gena *BPM2.1* (**Slika 15**). Stoga je moguće da je na **Slici 15** vidljivo umnažanje fragmenta nove varijante gena *BPM2* koja je homologna s varijantom *BPM2.1*, ali je kraća od nje. Rezultati dobiveni u ovom radu indiciraju da postoji i barem još jedna dulja ekspresijska varijanta gena *BPM1*. Čini se da je kod klijanaca bez temperaturnog tretmana ekspresijska varijanta *BPM1.2* u alternativnom prekranju zadržala intron prisutan u 3' UTR regiji varijante gena *BPM1.3*, što je rezultiralo umnažanjem neočekivanog fragmenta (~ 2000 pb), čije kloniranje nije uspješno provedeno u ovom radu. Prema Amin i sur. (2016), 3' UTR regije u molekuli mRNA važne su u regulaciji genske ekspresije kod biljaka jer sadrže vezna mjesta molekula *eng.* „microRNA“ i regulatornih proteina, koja pomažu u stabilizaciji i lokalizaciji mRNA. Ovakav rezultat stoga upućuje na moguću važnost regulatorne uloge 3' UTR regije u ekspresiji varijante gena *BPM1.2*, što dosad nije razmatrano u okviru gena *BPM* u uročnjaku.

Diferencijalna ekspresija potvrđena je kod svih proučavanih varijanti osim kod ekspresijske varijante *BPM3.2* koja se umnožila u svim korištenim uvjetima u ovom eksperimentu (**Slika 23**), što znači da ekspresija ove varijante nije uvjetovana temperaturom ni fotoperiodom. U uvjetima snižene temperature od 4 °C eksprimirale su se samo varijante gena *BPM3.2*, *BPM1.2* i *BPM2.4*, s time da je varijanta gena *BPM2.4* eksprimirana s pojačanim intenzitetom u odnosu na temperaturu od 24 °C (**Slika 23**). To ukazuje na važnu regulatornu ulogu ovih ekspresijskih varijanti, a posebice varijante gena *BPM2.4*, u prilagodbi biljke na snižene temperature. Kod

paprike *Capsicum annuum*, gen *CaBPM4* regulira razvojne procese biljke u uvjetima abiotičkih stresova, a njegova ekspresija raste tek nakon 12 h od izlaganja biljke hladnom tretmanu na 4 °C (He i sur., 2019). Stoga je moguće da je u uvjetima snižene temperature potrebno više vremena za aktivaciju ekspresije gena *BPM* kod uročnjaka te da se tijekom produljenog izlaganja sniženoj temperaturi ekspimiraju i neke druge varijante gena *BPM1-3*.



**Slika 23.** Shematski prikaz rezultata dobivenih u analizi ekspresije poznatih varijanti gena *BPM1-3* u klijancima *A. thaliana* izloženim normalnoj temperaturi rasta (24 °C), povišenoj (37 °C) i sniženoj (4 °C) temperaturi u trajanju od tri sata. U uvjetima povišene temperature postoje razlike u obrascu ekspresije varijanti gena *BPM1-3* u odnosu na temperaturu rasta od 24 °C. U uvjetima snižene temperature su ekspimirane samo varijante gena *BPM3.2*, *BPM1.2* i *BPM2.4*, s time da je varijanta gena *BPM2.4* ekspimirana s pojačanim intenzitetom u odnosu na normalnu temperaturu rasta. Legenda s oznakama za intenzitet ekspresije varijanti gena *BPM2*, odnosno s oznakama za prisustvo/odsustvo ekspresije varijanti gena *BPM1* i *BPM3*, prikazana je sa desne strane. Slika je izrađena u programu Biorender: (<https://biorender.com/>).

Pojedine PCR analize koje su provedene u ovom radu nisu dale zadovoljavajući rezultat te se kod tih eksperimenata ne može raspravljati o nedostatku proučavanih ekspresijskih varijanti. Primjerice, nije jasno zašto se tijekom analize ekspresije varijanti gena *BPM2.2*, *BPM2.4* i *BPM2.5* u kontrolnim uzorcima klijanaca nije ništa umnožilo. S obzirom da je ekspresija varijanti gena *BPM2.5* i *BPM2.3* analizirana paralelno, a u kontrolnim uzorcima se umnožila samo varijanta *BPM2.3*, negativan rezultat u ovim uzorcima vjerojatno nije posljedica odsustva ekspresijske varijante *BPM2.5*, već je posljedica pogreške tijekom provedbe eksperimenta. Stoga je u kontrolnim uzorcima bez tretmana potrebno ponoviti umnažanje varijanti gena *BPM2* s dizajniranim početnicama. Kao što sam već ranije napomenula (poglavlje 4.1), rezultati dobiveni u ovom radu upućuju na slabo umnažanje varijante gena *BPM3.4* u svim testnim uvjetima, što može biti posljedica smanjene količine kalupa u reakciji PCR, ili korištenja početnica koje stvaraju sekundarne strukture ili su međusobno komplementarne. U budućim istraživanjima trebalo bi dizajnirati novi par početnica kako bi se mogla potvrditi niska razina ekspresije, ali i fluktuacija u ekspresiji varijante *BPM3.4* ovisna o fotoperiodu, koja je dobivena u ovom istraživanju. Predlažem da se u budućim istraživanjima provede i hibridizacija po Northernu s odgovarajućim probama za gene *BPM1-3*. Ova tehnika omogućuje razdvajanje RNA produkta različitih veličina te će dati detaljniji uvid u ekspresiju varijanti gena *BPM1-3*. U kombinaciji sa sekvenciranjem, hibridizacija po Northernu omogućit će detekciju novih ekspresijskih varijanti koje se sintetiziraju u klijanacima *A. thaliana* pod utjecajem temperaturnih varijacija.

### **4.3 Gen *BPM2* ima novu ekspresijsku varijantu koja potvrđuje dodatne funkcije BPM**

Uloga proteina MATH-BTB/POZ u degradaciji proteina ovisnoj o ubikvitinu kod biljke *Arabidopsis thaliana* potvrđena je u brojnim istraživanjima u kojima je dokazana interakcija BPM s raznim transkripcijskim faktorima (Weber i Hellmann, 2009; Lechner i sur., 2011; Chen i sur., 2013; 2015; Morimoto i sur., 2017). Osim te uloge, moguće je da proteini BPM u stanici djeluju neovisno o ubikvitin E3 ligazama. Ovu teoriju potvrđuje činjenica da se protein BPM1 osim u citoplazmi nakuplja i u jezgri, a predominantno je nakupljen u jezgri, gdje je uočen izostanak kolokalizacije kulina 3 i proteina BPM1 (Leljak Levanić i sur., 2012). U istraživanju (Bauer i sur., 2014) i diplomskim radovima (Rendulić, 2018; Tokić, 2019; Miškec, 2019) predlaže se da BPM1

stupa u interakciju s proteinima DMS3 i RDM1 koji sudjeluju u RNA-usmjerenom putu DNA metilacije u biljci *A. thaliana*, a takva interakcija u jezgri ne vodi isključivo k proteasomalnoj degradaciji faktora RDM1 i DMS3, već proteinu BPM1 omogućuje i druge funkcije, kao što je sudjelovanje u pozicioniranju metilacijskog kompleksa na genomu (Miškec, 2019). Istraživanja ukazuju da postoji još jedna uloga proteina BPM1 u jezgri koja je neovisna o degradaciji, a to je vezanje ciljanih transkripcijskih faktora i modulacija njihove aktivnosti i lokalizacije u stanici (Weber i Hellmann, 2009; Leljak Levanić i sur., 2012). S obzirom da je domena BTB/POZ nužna za interakciju s kulinom 3 te osigurava degradaciju supstrata, proteini BPM s krnjom BTB domenom mogli bi imati dodatne modulacijske uloge. U ovom radu utvrđeno je prisustvo upravo takve varijante gena *BPM2*. Protein BPM2.6 sastoji se od domene MATH i od krnje BTB domene, a nema C-terminalni dio domene BTB niti nuklearni lokalizacijski signal (NLS) važan za lokalizaciju proteina u jezgri.

Otkriće nove varijante gena *BPM2* u ovom radu dodatno upućuje na mogućnost da proteini BPM u biljci *A. thaliana* obavljaju funkcije neovisne o proteinskoj degradaciji. Varijanta gena *BPM2.6* nespecifično se umnožila s početnicama za analizu ekspresije varijante gena *BPM2.3* u obliku fragmenta dugog 1420 pb. Taj fragment je uspješno ugrađen u vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy i sekvenciran. Sinteza varijante gena *BPM2.6* je, kao i sinteza većine varijanti gena *BPM1-3* uvjetovana temperaturom, što je potvrđeno u analizi PCR u ovom radu. Ekspresijska varijanta *BPM2.6* sintetizira se u klijancima izloženim normalnoj temperaturi rasta (24 °C) i povišenoj temperaturi od 37 °C, s time da je pri povišenoj temperaturi eksprimirana s manjim intenzitetom. Varijanta gena *BPM2.6* ne procesira intron 2, već ga zadržava i djelomično translatira u protein, čime nastaje protein bez BTB domene. Iako nukleotidna sekvenca ekspresijske varijante *BPM2.6* nije u potpunosti otkrivena te joj nedostaju 5' i 3' krajevi, aminokiselinska sekvenca proteina BPM2 koji nastaje translacijom ove nove varijante sadrži ukupno 263 aminokiseline, od kojih je zadnjih devet aminokiselina specifično za tu proteinsku izoformu. U usporedbi sa sekvencama ostalih izoformi proteina BPM2 dostupnim u bazi TAIR, čije duljine variraju od 295 – 406 aminokiselina, ova proteinska izoforma je najkraća, što ukazuje na mogućnost velikih razlika u strukturi, sastavu domena, fiziološkim svojstvima, ali i funkciji alternativnog proteina (Shang i sur., 2017). U usporedbi s dostupnim podacima u bazi NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), otkriveno je da nova proteinska izoforma BPM2.6 ima očuvanu konzerviranu domenu MATH i N-terminalni dio konzervirane domene BTB/POZ, a nedostaje joj C-terminalna domena BACK (*eng.* BTB and C-

terminal Kelch) duga 64 aminokiseline. Domena BACK se u literaturnim podacima gleda kao dio domene BTB/POZ, dok je u radu Leljak Levanić i sur. (neobjavljeno) po prvi puta definirana kao zasebna domena SPOP, zbog komplementarnosti s domenom 3-box u ljudskom proteinu SPOP koji djeluje kao supstrat-specifični adaptor kulina 3 (Zhuang i sur., 2009). Domena 3-box ima ulogu u pojačavanju interakcija između proteina SPOP i CUL3 kod čovjeka (Zhuang i sur., 2009), što bi značilo da nova proteinska izoforma (bez domene SPOP i s djelomičnom domenom BTB/POZ) ne može ostvariti adekvatne interakcije s kulinom 3 i posljedično usmjeravati proteine u degradaciju, kao što je prikazano na **Slici 4**. Osim toga, otkrivena proteinska izoforma nema signal NLS koji je kod BPM2 pozicioniran na C-terminalnom kraju i dovoljan je za usmjeravanje i lokalizaciju proteina GFP u jezgru (Leljak Levanić i sur., 2012). Takva pozicija signala inače povećava vjerojatnost da se u alternativnom prekrajanju gena sintetiziraju ekspresijske varijante bez NLS-a (Leljak Levanić i sur., 2012), što dodatno upućuje na dodatne uloge i mogućnost širokog spektra bioloških funkcija proteina BPM. Budući da izoforma proteina BPM2.6 ima cjelovitu domenu MATH na svom N-terminalnom dijelu koja omogućuje različite protein-protein interakcije, moguće je da ova izoforma ima ulogu u ometanju proteinskih interakcija, tako da veže ciljane supstrate u citoplazmi, interferira s afinitetom vezanja transkripcijskih faktora na DNA i regulira njihovu transkripcijsku aktivnost, sprječavajući pritom degradaciju. U radu Julian i sur. (2019), opisano je da tijekom signalizacije abscizinskom kiselinom, proteini BPM3 i BPM5 u jezgri interagiraju s negativnim regulatorom signalizacije ABA-om, fosfatazom PP2CA (*eng.* Protein Phosphatase 2CA) i označavaju PP2CA za degradaciju. Međutim, fosfataza PP2CA je lokalizirana u jezgri i u citoplazmi (<https://www.arabidopsis.org/>), pa postoji mogućnost da u citoplazmi može doći do interakcije s krnjim proteinom BPM2.6. S obzirom da izoforma proteina BPM2.6 nema signal NLS, moguće je da predložena funkcija proteina BPM u okviru modulacije aktivnosti i lokalizacije ciljanih supstrata nije rezervirana isključivo za jezgru kako se pretpostavlja u prijašnjim istraživanjima (Weber i Hellmann, 2009; Leljak Levanić i sur., 2012).

Važno je napomenuti da je predloženi mehanizam u kontekstu blokade transkripcijske aktivnosti samo pretpostavka na temelju dobivene sekvence proteina BPM2.6. Ova funkcija ne može se sa sigurnošću potvrditi dok se protein ne izolira, odredi mu se konformacija i njegovi interakcijski partneri, što će se svakako trebati istražiti u budućim istraživanjima. Jedno od glavnih pitanja na koje je potrebno odgovoriti jest kako nedostatak domene SPOP i dijela domene BTB/POZ utječe na stabilnost novog proteina. Delecijska varijanta proteina BPM1<sup>L189Stop</sup> kojoj



nedostaju domene BTB/POZ i SPOP može ostvariti interakciju s transkripcijskim faktorom RAP2.4, jer je za takav tip interakcije dovoljna samo N-terminalna domena MATH (Weber i sur., 2005). Čini se da gubitak domena BTB/POZ i SPOP djeluje manje destabilizirajuće u odnosu na gubitak domene BTB/POZ, jer se domena BTB/POZ nalazi u središnjem dijelu proteina BPM1, a njen gubitak rezultira destabilizacijom i krivim smatanjem proteina (Miškec, 2019). Osim što je bitna u interakciji s kulinom 3, domena BTB/POZ omogućuje formiranje homo- i heterodimera proteina BPM u biljci *A. thaliana* (Weber i sur., 2005), što je dokazano i za MATH-BTB protein MAB1 kod kukuruza *Zea mays* (Juranić i sur., 2012). Po Weber i sur. (2005), nova proteinska izoforma BPM2.6 ne bi trebala interagirati s kulinom 3 i vjerojatno ne može stvarati dimere. Visoko konzervirani Asp na položaju 204 u proteinu BPM1 neophodan je za dimerizaciju proteina BPM u uročnjaku (Weber i sur., 2005), a prema dostupnim podacima u bazi NCBI vidljivo je da se u sekvenci svih varijanti proteina BPM2 nalazi na položaju 203. Analiza je pokazala da aminokiselinska sekvenca nove proteinske izoforme sadrži Asp-203, ali ne sadrži ostale konzervirane aminokiseline potrebne za dimerizaciju, kao što su Phe-328, Tyr-330 i Leu-332 (Weber i sur., 2005). Zbog nedostatka ovih aminokiselina vjerojatno je promijenjena 3D struktura proteina BPM2.6 te novi protein nema mogućnost dimerizacije. Ostaje za istražiti koja je uloga takvih proteina kao što je BPM2.6 i gdje su lokalizirani u stanici. Ova proteinska izoforma mogla bi objasniti ideju predloženu u radu Miškec (2019), gdje se pretpostavlja da transkripcijski faktori sudjeluju u navođenju kompleksa BPM1-DMS3-RDM1 na određene lokuse na genomu i posreduju u njihovoj metilaciji. Dokazano je da BPM2 interagira s proteinom DMS3 preko domene MATH, a s proteinom RDM1 preko domene MATH i N-terminalnog dijela domene BTB/POZ (Jagić i sur., 2018), što znači da bi metilacijski kompleks s proteinom BPM2.6 mogao vezati ciljane transkripcijske faktore preko BPM2.6 i sudjelovati u metilaciji ciljanih gena.

Sekvenca ekspresijske varijante *BPM2.6* nije u cijelosti otkrivena te bi u budućim istraživanjima trebalo umnožiti njen ostatak i ustanoviti sekvence 5' i 3' UTR regija. Predlažem da se u tu svrhu provede metoda 5' i 3' RACE (*eng.* Rapid Amplification of cDNA Ends) na početnom i krajnjem dijelu sekvence varijante *BPM2.6*. Tehnikom RACE umnožit će se cjelokupan transkript varijante *BPM2.6* pomoću početnica koje su specifične za mali poznati dio sekvence, a dobivena cDNA će se sekvencirati kako bi se otkrila cjelovita sekvenca RNA transkripta. Otkriće cjelokupne sekvence bitno je i u kontekstu istraživanja sekundarnih struktura mRNA. Sekundarne strukture u 5' UTR regiji mogu utjecati na vezanje proteina RBP koji moduliraju translaciju

proteina (Steri i sur., 2018), ili mogu utjecati na vezanje ribosoma i njihovu migraciju po molekuli mRNA tijekom translacije (Kozak, 1991). U slučaju da ekspresijska varijanta *BPM2.6* sadrži takve sekundarne strukture, dovodi se u pitanje uspješnost translacije proteina koji je njome kodiran te količina translatiranog proteina u stanici.

Bitno je naglasiti da rezultati dobiveni u ovom radu ukazuju na postojanje dodatnih varijanti gena *BPM1-3* i predlažem da se u budućim istraživanjima utvrdi njihova sekvenca. Također, u svrhu provjere temperaturno ovisne ekspresije, predlažem da se provede kvantitativna analiza ekspresije (qPCR) varijanti gena *BPM1-3* u klijancima izloženim temperaturnom stresu. Kvantitativnom PCR analizom moći će se odrediti intenzitet ekspresije varijanti gena *BPM1-3* te ekspresijske varijante *BPM2.6*. Brojne varijante gena *BPM* koje se sintetiziraju samo u određenim stresnim uvjetima, tkivima ili razvojnim stadijima biljke *A. thaliana* još nisu otkrivene. S time u vezi, predlažem da se kloniraju i sekvenciraju ostali nespecifično umnoženi fragmenti u ovom radu, kao i da se neuspjela kloniranja (fragmenti ~ 1250 pb, ~ 2000 pb) ponove u drugom vektoru, jer u plazmidu pGEM<sup>®</sup>-T Easy ugradnja nije bila moguća čak ni nakon ponovnog umnažanja fragmenata i modifikacije ligacijske reakcije. U budućnosti bi trebalo provesti hibridizaciju po Westernu koristeći antitijelo izrađeno na temelju proteinske sekvence egzona 1 koji je jednak u svim *BPM2* varijantama. Ta tehnika omogućit će detekciju različitih veličina proteina *BPM2*, čime će se potvrditi prisutnost različitih proteinskih formi *BPM2* koje vjerojatno doprinose i razlikama u funkciji, a služit će i kao svojevrsna potvrda otkrića izoforme *BPM2.6*. Osim analize novih alternativnih varijanti, potrebno je istražiti i kojim mehanizmom promjene temperature utječu na alternativno prekrajanje gena *BPM1-3*, budući da je ovakav način kontrole genske ekspresije od velike važnosti kod biljaka koje su sesilne i izrazito izložene temperaturnim varijacijama. Postoje naznake da promjene okolišnih uvjeta utječu na razine sekundarnih glasnika (npr.  $\text{Ca}^{2+}$ , reaktivnih kisikovih vrsta) koji moduliraju aktivnost kinaza i fosfataza te na taj način reguliraju fosforilaciju faktora koji sudjeluju u prekrajanju pre-mRNA (Reddy i sur., 2013). Okolišni stresovi mogu utjecati na koncentraciju iona i ostalih staničnih molekula, a zabilježeno je da takvi događaji utječu na strukturu mRNA, što može dovesti do promjena u alternativnom prekrajanju gena (Reddy i sur., 2013). U kojoj mjeri je koji od tih dvaju mehanizama zastupljen u regulaciji genske ekspresije ovisnoj o temperaturi kod *A. thaliana* još nije poznato. Moguće je da postoji niz različitih molekularnih mehanizama koji sudjeluju u tim procesima, a u budućnosti će trebati identificirati te mehanizme kako bi se saznalo nešto više o ovakvom tipu regulacije genske ekspresije.

## 5. ZAKLJUČAK

Temperaturom inducirana regulacija genske ekspresije i alternativnog prekrajanja gena *BPM1-3* uspješno je dokazana u biljci *Arabidopsis thaliana* pomoću lančane reakcije polimerazom. Tijekom izlaganja klijanaca uročnjaka povišenoj temperaturi od 37 °C postojale su razlike u obrascu ekspresije pojedinih varijanti gena *BPM1-3* u odnosu na temperaturu rasta od 24 °C. Tijekom izlaganja klijanaca sniženoj temperaturi od 4 °C eksprimirale su se samo varijante *BPM3.2*, *BPM1.2* i *BPM2.4*. U analizi ekspresije gena *BPM2* umnožen je fragment, čije je kloniranje uspješno provedeno u bakterijskom soju *E. coli* XL-10 Gold. Rezultati sekvenciranja tog fragmenta potvrdili su otkriće nove ekspresijske varijante *BPM2.6* koja se u klijancima *A. thaliana* sintetizira u normalnim uvjetima rasta i u uvjetima povišene temperature. Varijanta gena *BPM2.6* nastaje mehanizmom zadržavanja introna, jer se intron 2 ne procesira, nego se djelomično translacija u protein. Novootkrivenoj varijanti *BPM2* nedostaje C-terminalni dio konzervirane domene BTB/POZ i cjelokupna domena BACK. Zbog postojanja domene MATH, predložen je mehanizam u kojem nova proteinska izoforma i dalje može vezati transkripcijske faktore u citoplazmi, čime interferira s njihovim afinitetom vezanja DNA i tako regulira transkripcijsku aktivnost tih faktora bez da pritom utječe na njihovu degradaciju. Dobiveni rezultati potvrđuju mogućnost postojanja drugih biološki važnih funkcija proteina *BPM*, koje su neovisne o interakciji s kulinom, a buduća istraživanja će pokazati kojim mehanizmom promjene temperature utječu na alternativno prekrajanje gena *BPM1-3* te u kojoj mjeri temperaturom inducirana posttranslacijska regulacija ekspresije gena *BPM1-3* utječe na uspješnu prilagodbu biljaka na promjenjive okolišne uvjete.

## 6. LITERATURA:

- Amin, U. S. M., Biswas, S., Elias, S. M., Razzaque, S., Haque, T., Malo, R., Seraj, Z. I. (2016). Enhanced salt tolerance conferred by the complete 2.3 kb cDNA of the rice vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene compared to 1.9 kb coding region with 5' UTR in transgenic lines of rice. *Frontiers in Plant Science*, **7**:14.
- Barash, Y., Calarco, J. A., Gao, W., Pan, Q., Wang, X., Shai, O., Blencowe, B. J., Frey, B. J. (2010). Deciphering the splicing code. *Nature*, **465**, 53-59.
- Bauer, N., Leljak-Levanić, D., Vuković, R., Razdorov, G. (2014). MATH-BTB domain protein AtBPM1 directly interact with DMS3, important component of RNA-directed DNA methylation in plants. FEBS-EMBO. Paris, Francuska, 30.8.-4.9, 306-306.
- Brown, J. W. S., Simpson, C. G. (1998). Splice site selection in plant pre-mRNA splicing. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**, 77-95.
- Chen, L., Bernhardt, A., Lee, J. H., Hellmann, H. (2015). Identification of Arabidopsis MYB56 as a novel substrate for CRL3 (BPM) E3 ligases. *Molecular Plant*, **8**, 242-250.
- Chen, L., Hellmann, H. (2013). Plant E3 ligases: flexible enzymes in a sessile world. *Molecular Plant*, **6**, 1388-1404.
- Chen, L., Lee, J. H., Weber, H., Tohge, T., Witt, S., Roje, S., Fernie, A. R., Hellmann, H. (2013). Arabidopsis BPM proteins function as substrate adaptors to a CULLIN3-based E3 ligase to affect fatty acid metabolism in plants. *The Plant Cell*, **25**, 2253-2264.
- Gingerich, D. J., Hanada, K., Shiu, S., Vierstra, R. D. (2007). Large-scale, lineage-specific expansion of a bric-a-brac/tramtrack/broad complex ubiquitin-ligase gene family in rice. *The Plant Cell*, **19**, 2329-2348.
- Goodall, G. J., Filipowicz, W. (1990). The minimum functional length of pre-mRNA introns in monocots and dicots. *Plant Molecular Biology*, **14**, 727-733.
- Haak, D. C., Fukao, T., Grene, R., Hua, Z., Ivanov, R., Perrella, G., Li, S. (2017). Multilevel regulation of abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science*, **8**:1564.
- He, Y.-M., Liu, K.-K., Zhang, H.-X., Cheng, G.-X., Ali, M., Ul Haq, S., Wei, A.-M., Gong, Z.-H. (2019). Contribution of CaBPM4, a BTB domain-containing gene, to the response of pepper to *Phytophthora capsici* infection and abiotic stresses. *Agronomy*, **9**:417.

- Holton, T. A., Graham, M. W. (1991). A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Research*, **19**, 1156-1156.
- Hua, Z., Vierstra, R. D. (2011). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annual Review of Plant Biology*, **62**, 299–334.
- Jagić, M., Škiljaica, A., Bauer, N., Leljak-Levanić, D. (2018). AtBPM1 protein interacts with components of RNA- directed DNA methylation. FEBS3+ From molecules to living systems. Siófok, Mađarska, 2-5.9., 124-124.
- Julian, J., Coego, A., Lozano-Juste, J., Lechner, E., Wu, Q., Zhang, X., Merilo, E., Belda-Palazon, B., Park, S.-Y., Cutler, S. R., An, C., Genschik, P., Rodriguez, P. L. (2019). The MATH-BTB BPM3 and BPM5 subunits of cullin3-RING E3 ubiquitin ligases target PP2CA and other clade A PP2Cs for degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **116**, 15725-15734.
- Juranić, M., Srilunchang, K., Krohn, N. G., Leljak-Levanić, D., Sprunck, S., Dresselhaus, T. (2012). Germline-specific MATH-BTB substrate adaptor MAB1 regulates spindle length and nuclei identity in maize. *The Plant Cell*, **24**, 4974-4991.
- Koonin, E. V., Senkevich, T. G., Chernos, V. I. (1992). A family of DNA virus genes that consists of fused portions of unrelated cellular genes. *Trends in Biochemical Sciences*, **17**, 213-214.
- Kozak, M. (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, 19867-19870.
- Lechner, E., Leonhardt, N., Eisler, H., Parmentier, Y., Alioua, M., Jacquet, H., Leung, J., Genschik, P. (2011). MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling. *Developmental Cell*, **21**, 1116-1128.
- Leljak Levanić, D., Horvat, T., Martinčić, J., Bauer, N. (2012). A novel bipartite nuclear localization signal guides BPM1 protein to nucleolus suggesting its cullin3 independent function. *PLoS ONE*, **7**:e51184.
- Lin, R.-C., Park, H.-J., Wang, H.-Y. (2008). Role of Arabidopsis RAP2.4 in regulating light- and ethylene-mediated developmental processes and drought stress tolerance. *Molecular Plant*, **1**, 42-57.
- Lorković, Z. J., Wieczorek Kirk, D. A., Lambermon, M. H. L., Filipowicz, W. (2000). Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends in Plant Science*, **5**, 160-167.

- Marquez, Y., Brown, J. W. S., Simpson, C., Barta, A., Kalyna, M. (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome Research*, **22**, 1184-1195.
- Matlin, A. J., Clark, F., Smith, C. W. J. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **6**, 386-398.
- Merchante, C., Stepanova, A. N., Alonso, J. M. (2017). Translation regulation in plants: an interesting past, an exciting present and a promising future. *The Plant Journal*, **90**, 628-653.
- Meyer, K., Koester, T., Staiger, D. (2015). Pre-mRNA splicing in plants: in vivo functions of RNA-binding proteins implicated in the splicing process. *Biomolecules*, **5**, 1717-1740.
- Miškec, K. (2019). Uloga konzerviranih domena MATH, BTB i SPOP proteina BPM1 u interakciji s proteinima DMS3, RDM1 i HB6. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.
- Miura, Y., Wake, H., Kato, T. (1999). TBE, or not TBE; that is the question: beneficial usage of tris-borate for obtaining a higher resolution of small DNA fragments by agarose gel electrophoresis. *Nagoya Medical Journal*, **43**, 1-6.
- Morimoto, K., Ohama, N., Kidokoro, S., Mizoi, J., Takahashi, F., Todaka, D., Mogami, J., Sato, H., Qin, F., Kim, J.-S., Fukao, Y., Fujiwara, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). BPM-CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**, E8528-E8536.
- Nakashima, K., Ito, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant Physiology*, **149**, 88-95.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2013). *Lehninger principles of Biochemistry*. Sixth edition. W.H. Freeman, New York.
- Petrillo, E., Godoy Herz, M. A., Fuchs, A., Reifer, D., Fuller, J., Yanovsky, M. J., Simpson, C., Brown, J. W. S., Barta, A., Kalyna, M., Kornblihtt, A. R. (2014). A chloroplast retrograde signal regulates nuclear alternative splicing, *Science*, **344**, 427-430.
- Pintard, L., Willems, A., Peter, M. (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3–BTB complexes join the family. *The EMBO Journal*, **23**, 1681-1687.

- Pintard, L., Willis, J. H., Willems, A., Johnson, J. L., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P. E., Tyers, M., Bowerman, B., Peter, M. (2003). The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature*, **425**, 311-316.
- Reddy, A. S. N. (2007). Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annual Review of Plant Biology*, **58**, 267-294.
- Reddy, A. S. N., Marquez, Y., Kalyna, M., Barta, A. (2013). Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *The Plant Cell*, **25**, 3657-3683.
- Reddy, A. S. N., Rogers, M. F., Richardson, D. N., Hamilton, M., Ben-Hur, A. (2012). Deciphering the plant splicing code: experimental and computational approaches for predicting alternative splicing and splicing regulatory elements. *Frontiers in Plant Science*, **3**:18.
- Remy, E., Cabrito, T. R., Batista, R. A., Hussein, M. A. M., Teixeira, M. C., Athanasiadis, A., Sá-Correia, I., Duque, P. (2014). Intron retention in the 5'UTR of the novel ZIF2 transporter enhances translation to promote zinc tolerance in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, **10**:e1004375.
- Rendulić, T. (2018). Protein interaction analysis of BPM1, DMS3 and RDM1 in tobacco cells using bimolecular fluorescent complementation. Graduation Thesis, University of Zagreb, Faculty of Science.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell*, **18**, 1292-1309.
- Seo, P. J., Park, M.-J., Lim, M.-H., Kim, S.-G., Lee, M., Baldwin, I. T., Park, C.-M. (2012). A self-regulatory circuit of CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 underlies the circadian clock regulation of temperature responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **24**, 2427-2442.
- Shang, X., Cao, Y., Ma, L. (2017). Alternative Splicing in Plant Genes: A means of regulating the environmental fitness of plants. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**:432.
- Smalle, J., Vierstra, R. D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology*, **55**, 555-590.
- Staiger, D., Brown, J. W. S. (2013). Alternative splicing at the intersection of biological timing, development, and stress responses. *The Plant Cell*, **25**, 3640-3656.
- Steri, M., Idda, M. L., Whalen, M. B., Orrù, V. (2018). Genetic variants in mRNA untranslated regions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, **9**:e1474.

- Stogios, P. J., Downs, G. S., Jauhal, J. J. S., Nandra, S. K., Privé, G. G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biology*, **6**:R82.
- Szakonyi, D., Duque, P. (2018). Alternative splicing as a regulator of early plant development. *Frontiers in Plant Science*, **9**:1174.
- Škiljaica, A. (2016). Wheat MATH-BTB proteins and their role in early embryogenesis. Graduation Thesis, University of Zagreb, Faculty of Science.
- Škiljaica, A., Jagić, M., Bauer, N. (2018). BPM1 protein stability in *Arabidopsis thaliana* is dependent on environmental temperature. 13th CROATIAN BIOLOGICAL CONGRESS. Poreč, Hrvatska, 19-23.9., 212-213.
- Škiljaica, A., Lechner, E., Jagić, M., Majsec, K., Malenica, N., Genschik, P., Bauer, N. (2019). The protein turnover of *Arabidopsis* BPM1 is involved in regulation of flowering time and abiotic stress response. *Plant molecular biology*. (u procesu objavljivanja)  
DOI :10.1007/s11103-019-00947-2
- Tokić, M. (2019). Preferential protein-protein binding of HB6, RDM1 and DMS3 to BPM1. Graduation Thesis, University of Zagreb, Faculty of Science.
- Wang, Z., Burge, C. B. (2008). Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*, **14**, 802-813.
- Weber, H., Bernhardt, A., Dieterle, M., Hano, P., Mutlu, A., Estelle, M., Genschik, P., Hellmann, H. (2005). *Arabidopsis* AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiology*, **137**, 83-93.
- Weber, H., Hellmann, H. (2009). *Arabidopsis thaliana* BTB/POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family. *FEBS Journal*, **276**, 6624-6635.
- Will, C. L., Luhrmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **3**:a003707.
- Willems, A. R., Schwab, M., Tyers, M. (2004). A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1695**, 133-170.
- Xu, L., Wei, Y., Reboul, J., Vaglio, P., Shin, T.-H., Vidal, M., Elledge, S. J., Harper, J. W. (2003). BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature*, **425**, 316-321.



Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 781–803.

Zapata, J. M., Martinez-Garcia, V., Lefebvre, S. (2007). Phytoeny of the TRAF/MATH domain. U: Wu, H. (ur.) TNF receptor associated factors (TRAFs). New York, Springer, str.1-24.

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

Zollman, S., Godt, D., Prive, G. G., Couderc, J. L., Laski, F. A. (1994). The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 10717-10721.

<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/> - rujan 2019.

<https://apps.araport.org/thalemine/begin.do> - listopad 2019

[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012886\\_RevertAid\\_H\\_Minus\\_Reverse\\_Transcript\\_ep0451\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012886_RevertAid_H_Minus_Reverse_Transcript_ep0451_UG.pdf) - kolovoz 2019.

[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013004\\_GeneRuler\\_1kb\\_DNALadder\\_250ug\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013004_GeneRuler_1kb_DNALadder_250ug_UG.pdf) - kolovoz 2019

<https://biorender.com/> - listopad 2019.

<https://web.expasy.org/translate/>) - rujan 2019.

<https://www.arabidopsis.org/> - listopad 2019

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> - listopad 2019

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> - studeni 2019

<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf> - kolovoz 2019

[https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic\\_cloning\\_vectors&plasmid=pGEM-T\\_Easy](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pGEM-T_Easy) - kolovoz 2019

# PRILOZI:

**Prilog I.** Poravnanje sekvenci triju varijanti gena *BPM1* kod biljke *A. thaliana* i odabir početnica za njihovo umnažanje. Sekvence molekula cDNA preuzete su iz baze TAIR i poravnate u programu Clustal Omega. Zvjezdicom su označeni nukleotidi koji su identični u sve tri sekvence. Mjesta vezanja početnica obilježena su različitim bojama: crvenom (FW BPM1.2), žutom (FW BPM1.123), ljubičastom (REV BPM1.123), zelenom (REV BPM1.3) i svijetloplavom (REV BPM1.1).

BPM1 .2	gccccaaactctgttttacaaaaatccccaaaccaacaagttatcattcatgatcgctttcg	60
BPM1 .1	-----tacaaaatcccaaccaacaagttatcattcatgatcgctttcg	45
BPM1 .3	-----atgatcgctttcg	13
	*****	
BPM1 .2	ttatattcattctctcttttctctttccattttgggtcccaccgacgtcatcaatctcta	120
BPM1 .1	ttatattcattctctcttttctctttccattttgggtcccaccgacgtcatcaatctcta	105
BPM1 .3	ttatattcattctctcttttctctttccattttgggtcccaccgacgtcatcaatctcta	73
	*****	
BPM1 .2	ccggagacttccgcgattctcacaccgttcttctctctccttccgattccggattcca	180
BPM1 .1	ccggagacttccgcgattctcacaccgttcttctctctccttccgattccggattcca	165
BPM1 .3	ccggagacttccgcgattctcacaccgttcttctctctccttccgattccggattcca	133
	*****	
BPM1 .2	atttcgttccttttttgttttctctcaaaaaccocctaaatcttctcctttcttcgatctg	240
BPM1 .1	atttcgttccttttttgttttctctcaaaaaccocctaaatcttctcctttcttcgatctg	225
BPM1 .3	atttcgttccttttttgttttctctcaaaaaccocctaaatcttctcctttcttcgatctg	193
	*****	
BPM1 .2	gattttttgtgttccccaaatattcaagactttgatctgattccttctaagatttctccaa	300
BPM1 .1	gattttttgtgttccccaaatattcaagactttgatctgattccttctaagatttctccaa	285
BPM1 .3	gattttttgtgttccccaaatattcaagactttgatctgattccttctaagatttctccaa	253
	*****	
BPM1 .2	agcaaagatctttttttgttttttgggatctctgtattggtgatgggcacaactagggt	360
BPM1 .1	agcaaagatctttttttgttttttgggatctctgtattggtgatgggcacaactagggt	345
BPM1 .3	agcaaagatctttttttgttttttgggatctctgtattggtgatgggcacaactagggt	313
	*****	
BPM1 .2	ctgctcggaggtttcttctggatcttcgaaatcgcttagccaatctctcacgggatcgac	420
BPM1 .1	ctgctcggaggtttcttctggatcttcgaaatcgcttagccaatctctcacgggatcgac	405
BPM1 .3	ctgctcggaggtttcttctggatcttcgaaatcgcttagccaatctctcacgggatcgac	373
	*****	
BPM1 .2	ctctaccacagaaacagtcfaatgggtttccatgaattcaagatctgtgggtactctctcgc	480
BPM1 .1	ctctaccacagaaacagtcfaatgggtttccatgaattcaagatctgtgggtactctctcgc	465
BPM1 .3	ctctaccacagaaacagtcfaatgggtttccatgaattcaagatctgtgggtactctctcgc	433
	*****	
BPM1 .2	taaagggtgttggtgtcggcaaatcgcgcttccgatacgtttatgggtcgggtgggtactc	540
BPM1 .1	taaagggtgttggtgtcggcaaatcgcgcttccgatacgtttatgggtcgggtgggtactc	525
BPM1 .3	taaagggtgttggtgtcggcaaatcgcgcttccgatacgtttatgggtcgggtgggtactc	493
	*****	

BPM1.2	gtgggcaatctacttttatccagatgggaagagtccggaggataactcgtcttacgtttc	600
BPM1.1	gtgggcaatctacttttatccagatgggaagagtccggaggataactcgtcttacgtttc	585
BPM1.3	gtgggcaatctacttttatccagatgggaagagtccggaggataactcgtcttacgtttc *****	553
BPM1.2	tttgttcatagctcttgctagcgaaggagctgatgttaggccttggttgagctcacgct	660
BPM1.1	tttgttcatagctcttgctagcgaaggagctgatgttaggccttggttgagctcacgct	645
BPM1.3	tttgttcatagctcttgctagcgaaggagctgatgttaggccttggttgagctcacgct *****	613
BPM1.2	tgtggatcagagtggtaatgggaagcataaaggttcatagccatttggtagagctctcga	720
BPM1.1	tgtggatcagagtggtaatgggaagcataaaggttcatagccatttggtagagctctcga	705
BPM1.3	tgtggatcagagtggtaatgggaagcataaaggttcatagccatttggtagagctctcga *****	673
BPM1.2	tagcggctccctatactctcaagatcgtggaagcatgtggggatacaagcgggtttttcag	780
BPM1.1	tagcggctccctatactctcaagatcgtggaagcatgtggggatacaagcgggtttttcag	765
BPM1.3	tagcggctccctatactctcaagatcgtggaagcatgtggggatacaagcgggtttttcag *****	733
BPM1.2	gaggtccagctctagaatcgtcggattatttgaaggagaatagtctcttggttaggtgccg	840
BPM1.1	gaggtccagctctagaatcgtcggattatttgaaggagaatagtctcttggttaggtgccg	825
BPM1.3	gaggtccagctctagaatcgtcggattatttgaaggagaatagtctcttggttaggtgccg *****	793
BPM1.2	tgtgggtgtggtgaagtcagttacggagggaaccgaggtattacaatatccctgtgccagt	900
BPM1.1	tgtgggtgtggtgaagtcagttacggagggaaccgaggtattacaatatccctgtgccagt	885
BPM1.3	tgtgggtgtggtgaagtcagttacggagggaaccgaggtattacaatatccctgtgccagt *****	853
BPM1.2	ttctaacttgggacaacagttgggaaatttattggagagtgggaaaggctgtgatgtgt	960
BPM1.1	ttctaacttgggacaacagttgggaaatttattggagagtgggaaaggctgtgatgtgt	945
BPM1.3	ttctaacttgggacaacagttgggaaatttattggagagtgggaaaggctgtgatgtgt *****	913
BPM1.2	ttccaagttgatggagaaaccttcaacgcacacaaattggttcttgcaacgcggttcccc	1020
BPM1.1	ttccaagttgatggagaaaccttcaacgcacacaaattggttcttgcaacgcggttcccc	1005
BPM1.3	ttccaagttgatggagaaaccttcaacgcacacaaattggttcttgcaacgcggttcccc *****	973
BPM1.2	ggttttcaacgcacagctttttggccctttaggagaccgaaataccaaatgcataacgat	1080
BPM1.1	ggttttcaacgcacagctttttggccctttaggagaccgaaataccaaatgcataacgat	1065
BPM1.3	ggttttcaacgcacagctttttggccctttaggagaccgaaataccaaatgcataacgat *****	1033
BPM1.2	agaagacatggaagcaccattttcaaggctcctcccttaactctcttgctgattgtcta	1140
BPM1.1	agaagacatggaagcaccattttcaag-----	1093
BPM1.3	agaagacatggaagcaccattttcaag----- *****	1061
BPM1.2	ttcacggatgtaccatccgggatcttctcctggggcgctactcctattctcgagtttact	1200
BPM1.1	-----	1093
BPM1.3	-----	1061
BPM1.2	cacccgggataaggtattgctccattttatctactgggacgaattgctgatatgcaaga	1260
BPM1.1	-----gtattgctccattttatctactgggacgaattgctgatatgcaaga	1140
BPM1.3	-----gtattgctccattttatctactgggacgaattgctgatatgcaaga *****	1108

BPM1.2	gttaataggaacagactctacattggcgtctactcttgtggctcagcatctactagcagc	1320
BPM1.1	gttaataggaacagactctacattggcgtctactcttgtggctcagcatctactagcagc	1200
BPM1.3	gttaataggaacagactctacattggcgtctactcttgtggctcagcatctactagcagc *****	1168
BPM1.2	ggcagaccgttatgctcttgagcggcttaagcaatctgtgagtcaaaactctgtgaagg	1380
BPM1.1	ggcagaccgttatgctcttgagcggcttaagcaatctgtgagtcaaaactctgtgaagg	1260
BPM1.3	ggcagaccgttatgctcttgagcggcttaagcaatctgtgagtcaaaactctgtgaagg *****	1228
BPM1.2	ggttgccataaacacggttgcaactactttggccctagcagagcagcatcattgtttgca	1440
BPM1.1	ggttgccataaacacggttgcaactactttggccctagcagagcagcatcattgtttgca	1320
BPM1.3	ggttgccataaacacggttgcaactactttggccctagcagagcagcatcattgtttgca *****	1288
BPM1.2	gctaaaagcagtggtctcaaattcgtggcactgccagagaacctgaaagctgtgatgca	1500
BPM1.1	gctaaaagcagtggtctcaaattcgtggcactgccagagaacctgaaagctgtgatgca	1380
BPM1.3	gctaaaagcagtggtctcaaattcgtggcactgccagagaacctgaaagctgtgatgca *****	1348
BPM1.2	aacagatgggtttgattatctgaaagagagttgcccatcttactaacggagctattgca	1560
BPM1.1	aacagatgggtttgattatctgaaagagagttgcccatcttactaacggagctattgca	1440
BPM1.3	aacagatgggtttgattatctgaaagagagttgcccatcttactaacggagctattgca *****	1408
BPM1.2	gtatgtggcgaggctaagtgaacactctggtatagtatctggacatcgaaaagaaatatt	1620
BPM1.1	gtatgtggcgaggctaagtgaacactctggtatagtatctggacatcgaaaagaaatatt	1500
BPM1.3	gtatgtggcgaggctaagtgaacactctggtatagtatctggacatcgaaaagaaatatt *****	1468
BPM1.2	tgccgatggttgtagcgcgagtggaagacgagtggaagccccggttgactgaatgggaga	1680
BPM1.1	tgccgatggttgtagcgcgagtggaagacgagtggaagccccggttgactgaatgggaga	1560
BPM1.3	tgccgatggttgtagcgcgagtggaagacgagtggaagccccggttgactgaatgggaga *****	1528
BPM1.2	gaaagaagaaagatttgtgcattgt-----	1705
BPM1.1	gaaagaagaaagatttgtgcattgtataatctctggtatggataatggctgatctaactg	1620
BPM1.3	gaaagaagaaagatttgtgcattgtataatctctggtatggataatggctgatctaactg *****	1588
BPM1.2	-----	1705
BPM1.1	gatctagcaagtacaatgaatcgttttcaacgcggttttctcataaatcaaagatccaatg	1680
BPM1.3	gatctagcaagtacaatgaatcgttttcaacgcggttttctcataaatcaaagatccaatg	1648
BPM1.2	-----	1705
BPM1.1	aaatttggggtttattgttgggtgcataatcagattattaggtgaaacagattgagttcatg	1740
BPM1.3	aaatttggggtttattgttgggtgcataatcagattattaggtgaaacagattgagttcatg	1708
BPM1.2	-----	1705
BPM1.1	ggatataagaatcgtagacagtgtaagtggtacaacgtagataaaacaaaggttgttttaa	1800
BPM1.3	ggatataagaatcgtagacagtgtaagtggtacaacgtagataaaacaaaggttgttttaa *****	1743
BPM1.2	-----	1705
BPM1.1	gaatacaaaactatgaaga caaattacatgacaggatctgtaag aacttcttttat	1856
BPM1.3	-----	1743

**Prilog II.** Poravnanje sekvenci pet varijanti gena *BPM2* kod biljke *A. thaliana* i odabir početnica za njihovo umnažanje. Sekvence molekula cDNA preuzete su iz baze TAIR i poravnate u programu Clustal Omega. Zvezdicom su označeni nukleotidi koji su identični u svih pet sekvenci. Mjesta vezanja početnica obilježena su različitim bojama: žutom (FW BPM2.12345), tamnoplavom (FWm BPM2.1345), svijetloplavom (REV BPM2.2), crvenom (REV BPM2.3), ljubičastom (REV BPM2.5), sivom (REV BPM2.134) i zelenom (REV BPM2.13).

BPM2 . 4	-----aaaacttaaacccgatctatcaagcaagtggttcc	34
BPM2 . 3	tgcgaacctaccaaaactggttggtttaaaactt <b>aaaccgatctatcaagcaagtggttcc</b>	60
BPM2 . 1	tgcgaacctaccaaaactggttggtttaaaacttaaacccgatctatcaagcaagtggttcc	60
BPM2 . 2	-----aaaccgatctatcaagcaagtggttcc	27
BPM2 . 5	-----aaaccgatctatcaagcaagtggttcc	27
	*****	
BPM2 . 4	tctctctctctacctctcggtttttggccaacgctcgctcgtcttcacgatccacgacgattc	94
BPM2 . 3	tctctctctctacctctcggtttttggccaacgctcgctcgtcttcacgatccacgacgattc	120
BPM2 . 1	tctctctctctacctctcggtttttggccaacgctcgctcgtcttcacgatccacgacgattc	120
BPM2 . 2	tctctctctctacctctcggtttttggccaacgctcgctcgtcttcacgatccacgacgattc	87
BPM2 . 5	tctctctctctacctctcggtttttggccaacgctcgctcgtcttcacgatccacgacgattc	87
	*****	
BPM2 . 4	agttcttgagttccggcgattatcggctctctcaattctggttccggttgaaccctcattt	154
BPM2 . 3	agttcttgagttccggcgattatcggctctctcaattctggttccggttgaaccctcattt	180
BPM2 . 1	agttcttgagttccggcgattatcggctctctcaattctggttccggttgaaccctcattt	180
BPM2 . 2	agttcttgagttccggcgattatcggctctctcaattctggttccggttgaaccctcattt	147
BPM2 . 5	agttcttgagttccggcgattatcggctctctcaattctggttccggttgaaccctcattt	147
	*****	
BPM2 . 4	ctcttctcgcccgctgctctcaaattccgatatttgcccctgtgattcgaaaccctaattt	214
BPM2 . 3	ctcttctcgcccgctgctctcaaattccgatatttgcccctgtgattcgaaaccctaattt	240
BPM2 . 1	ctcttctcgcccgctgctctcaaattccgatatttgcccctgtgattcgaaaccctaattt	240
BPM2 . 2	ctcttctcgcccgctgctctcaaattccgatatttgcccctgtgattcgaaaccctaattt	207
BPM2 . 5	ctcttctcgcccgctgctctcaaattccgatatttgcccctgtgattcgaaaccctaattt	207
	*****	
BPM2 . 4	cgctatcaatctggaaaatctctcaattcgaagactttagcagcgcaaagatactctat	274
BPM2 . 3	cgctatcaatctggaaaatctctcaattcgaagactttagcagcgcaaagatactctat	300
BPM2 . 1	cgctatcaatctggaaaatctctcaattcgaagactttagcagcgcaaagatactctat	300
BPM2 . 2	cgctatcaatctggaaaatctctcaattcgaagactttagcagcgcaaagatactctat	267
BPM2 . 5	cgctatcaatctggaaaatctctcaattcgaagactttagcagcgcaaagatactctat	267
	*****	
BPM2 . 4	ccgggtaataagatcgaagaaaccatcaatttcttaccaaagtcgtgattccttggatctc	334
BPM2 . 3	ccgggtaataagatcgaagaaaccatcaatttcttaccaaagtcgtgattccttggatctc	360
BPM2 . 1	ccgggtaataagatcgaagaaaccatcaatttcttaccaaagtcgtgattccttggatctc	360
BPM2 . 2	ccgggtaataagatcgaagaaaccatcaatttcttaccaaagtcgtgattccttggatctc	327
BPM2 . 5	ccgggtaataagatcgaagaaaccatcaatttcttaccaaagtcgtgattccttggatctc	327
	*****	

BPM2 . 4	gtctttgtttgatggacacaattagggtttccaaggagggttcctggatcttcgaaatcga	394
BPM2 . 3	gtctttgtttgatggacacaattagggtttccaaggagggttcctggatcttcgaaatcga	420
BPM2 . 1	gtctttgtttgatggacacaattagggtttccaaggagggttcctggatcttcgaaatcga	420
BPM2 . 2	gtctttgtttgatggacacaattagggtttccaaggagggttcctggatcttcgaaatcga	387
BPM2 . 5	gtctttgtttgatggacacaattagggtttccaaggagggttcctggatcttcgaaatcga *****	387
BPM2 . 4	ccgcacagtcgctcacggagtcgacctctcgacggaaacctcaatggctcccacgaat	454
BPM2 . 3	ccgcacagtcgctcacggagtcgacctctcgacggaaacctcaatggctcccacgaat	480
BPM2 . 1	ccgcacagtcgctcacggagtcgacctctcgacggaaacctcaatggctcccacgaat	480
BPM2 . 2	ccgcacagtcgctcacggagtcgacctctcgacggaaacctcaatggctcccacgaat	447
BPM2 . 5	ccgcacagtcgctcacggagtcgacctctcgacggaaacctcaatggctcccacgaat *****	447
BPM2 . 4	tcaagatcagcggctactccttgggtcaaaggcatggggattggcaaatacgttgctcgg	514
BPM2 . 3	tcaagatcagcggctactccttgggtcaaaggcatggggattggcaaatacgttgctcgg	540
BPM2 . 1	tcaagatcagcggctactccttgggtcaaaggcatggggattggcaaatacgttgctcgg	540
BPM2 . 2	tcaagatcagcggctactccttgggtcaaaggcatggggattggcaaatacgttgctcgg	507
BPM2 . 5	tcaagatcagcggctactccttgggtcaaaggcatggggattggcaaatacgttgctcgg *****	507
BPM2 . 4	atactttcatggtcgggtgatactcctgggccatctacttctaccagatggaaagagtc	574
BPM2 . 3	atactttcatggtcgggtgatactcctgggccatctacttctaccagatggaaagagtc	600
BPM2 . 1	atactttcatggtcgggtgatactcctgggccatctacttctaccagatggaaagagtc	600
BPM2 . 2	atactttcatggtcgggtgatactcctgggccatctacttctaccagatggaaagagtc	567
BPM2 . 5	atactttcatggtcgggtgatactcctgggccatctacttctaccagatggaaagagtc *****	567
BPM2 . 4	cagaggataattctgtctacgtgtctctcttcatagcccttgcgagtgaaggagccgatg	634
BPM2 . 3	cagaggataattctgtctacgtgtctctcttcatagcccttgcgagtgaaggagccgatg	660
BPM2 . 1	cagaggataattctgtctacgtgtctctcttcatagcccttgcgagtgaaggagccgatg	660
BPM2 . 2	cagaggataattctgtctacgtgtctctcttcatagcccttgcgagtgaaggagccgatg	627
BPM2 . 5	cagaggataattctgtctacgtgtctctcttcatagcccttgcgagtgaaggagccgatg *****	627
BPM2 . 4	ttagggctttgtttgagcttaccctcgtggatcagagcggtaacgaaaggcacaagttc	694
BPM2 . 3	ttagggctttgtttgagcttaccctcgtggatcagagcggtaacgaaaggcacaagttc	720
BPM2 . 1	ttagggctttgtttgagcttaccctcgtggatcagagcggtaacgaaaggcacaagttc	720
BPM2 . 2	ttagggctttgtttgagcttaccctcgtggatcagagcggtaacgaaaggcacaagttc	687
BPM2 . 5	ttagggctttgtttgagcttaccctcgtggatcagagcggtaacgaaaggcacaagttc *****	687
BPM2 . 4	atagccatthttggtagaactctcgaaagcggaccctataactcttaaataatcgagggagta	754
BPM2 . 3	atagccatthttggtagaactctcgaaagcggaccctataactcttaaataatcgagggagta	780
BPM2 . 1	atagccatthttggtagaactctcgaaagcggaccctataactcttaaataatcgagggagta	780
BPM2 . 2	atagccatthttggtagaactctcgaaagcggaccctataactcttaaataatcgagggagta	747
BPM2 . 5	atagccatthttggtagaactctcgaaagcggaccctataactcttaaataatcgagggagta *****	747
BPM2 . 4	tgtggggatacaaacgatttttcaagaggctcttttggagtcatcggactatctgaagg	814
BPM2 . 3	tgtggggatacaaacgatttttcaagaggctcttttggagtcatcggactatctgaagg	840
BPM2 . 1	tgtggggatacaaacgatttttcaagaggctcttttggagtcatcggactatctgaagg	840
BPM2 . 2	tgtggggatacaaacgatttttcaagaggctcttttggagtcatcggactatctgaagg	807
BPM2 . 5	tgtggggatacaaacgatttttcaagaggctcttttggagtcatcggactatctgaagg *****	807

BPM2 .4	acaatggctctcttggccgggtgttgtgttggagtggtgaagtcacgcacagaaggaccga	874
BPM2 .3	acaatggctctcttggccgggtgttgtgttggagtggtgaagtcacgcacagaaggaccga	900
BPM2 .1	acaatggctctcttggccgggtgttgtgttggagtggtgaagtcacgcacagaaggaccga	900
BPM2 .2	acaatggctctcttggccgggtgttgtgttggagtggtgaagtcacgcacagaaggaccga	867
BPM2 .5	acaatggctctcttggccgggtgttgtgttggagtggtgaagtcacgcacagaaggaccga *****	867
BPM2 .4	ggtgttacaatatcccgggtgccggtttctggcttgggtcagcagtttggaaagcttttgg	934
BPM2 .3	ggtgttacaatatcccgggtgccggtttctggcttgggtcagcagtttggaaagcttttgg	960
BPM2 .1	ggtgttacaatatcccgggtgccggtttctggcttgggtcagcagtttggaaagcttttgg	960
BPM2 .2	ggtgttacaatatcccgggtgccggtttctggcttgggtcagcagtttggaaagcttttgg	927
BPM2 .5	ggtgttacaatatcccgggtgccggtttctggcttgggtcagcagtttggaaagcttttgg *****	927
BPM2 .4	aaagtgggaaaggagctgacgttactttcgaagttgatggagaaacatttcctgctcaca	994
BPM2 .3	aaagtgggaaaggagctgacgttactttcgaagttgatggagaaacatttcctgctcaca	1020
BPM2 .1	aaagtgggaaaggagctgacgttactttcgaagttgatggagaaacatttcctgctcaca	1020
BPM2 .2	aaagtgggaaaggagctgacgttactttcgaagttgatggagaaacatttcctgctcaca	987
BPM2 .5	aaagtgggaaaggagctgacgttactttcgaagttgatggagaaacatttcctgctcaca *****	987
BPM2 .4	aattggttcttgcagcacgttctgcagttttcagggcacagctttttggcccgttgagaa	1054
BPM2 .3	aattggttcttgcagcacgttctgcagttttcagggcacagctttttggcccgttgagaa	1080
BPM2 .1	aattggttcttgcagcacgttctgcagttttcagggcacagctttttggcccgttgagaa	1080
BPM2 .2	aattggttcttgcagcacgttctgcagttttcagggcacagctttttggcccgttgagaa	1047
BPM2 .5	aattggttcttgcagcacgttctgcagttttcagggcacagctttttggcccgttgagaa *****	1047
BPM2 .4	gtgaaaataccaattgtgtaataatcatagaagacgtacaagccctattttcaaggattttc	1114
BPM2 .3	gtgaaaataccaattgtgtaataatcatagaagacgtacaagccctattttcaaggattttc	1140
BPM2 .1	gtgaaaataccaattgtgtaataatcatagaagacgtacaagccctattttcaag-----	1133
BPM2 .2	gtgaaaataccaattgtgtaataatcatagaagacgtacaagccctattttcaag-----	1067
BPM2 .5	gtgaaaataccaattgtgtaataatcatagaagacgtacaagccctattttcaag----- ***** * : **	1100
BPM2 .4	tgtttacgagtgtaacaatccgggaccttctcctgggggtgctgctcccgttctcaaatatt	1174
BPM2 .3	tgtttacgagtgtaacaatccgggaccttctcctgggggtgctgctcccgttctcaaatatt	1200
BPM2 .1	-----	1133
BPM2 .2	-----	1067
BPM2 .5	-----	1100
BPM2 .4	actcaccgggataaga-----	1191
BPM2 .3	actcaccgggataaggtttaatctttctacttttcttttggattgcatgattgtctcga	1260
BPM2 .1	-----	1133
BPM2 .2	-----	1067
BPM2 .5	-----	1100
BPM2 .4	-----	1191
BPM2 .3	tttc ccgcatgcagtaaatatagagaaattatggttatagatcatcatgttcatgtcaa	1320
BPM2 .1	-----	1133
BPM2 .2	-----	1067
BPM2 .5	-----	1100

BPM2 .4	-----	1191
BPM2 .3	at t t t c t g c t t t t c a g c t t t g c t t t t t t t g t t a a g a t t g g t c t t t a g t c g a t g t g c g a g	1380
BPM2 .1	-----	1133
BPM2 .2	-----	1067
BPM2 .5	-----	1100
BPM2 .4	-----	1191
BPM2 .3	t t t t a g a t c a t g g c t c c t g t a a a t t t a a g g t t g a t a c a a a t t c c c t t c c t t t t t g g t t t a t	1440
BPM2 .1	-----	1133
BPM2 .2	-----	1067
BPM2 .5	-----	1100
BPM2 .4	-----t g t t g c t t c a t t t t a t c t a c t g g g a t g a a a t g c c t	1226
BPM2 .3	t g t a c t t t t t t g t t g t t g t t g c a g a t g t t g c t t c a t t t t a t c t a c t g g g a t g a a a t g c c t	1500
BPM2 .1	-----a t g t t g c t t c a t t t t a t c t a c t g g g a t g a a a t g c c t	1169
BPM2 .2	-----	1067
BPM2 .5	-----a t g t t g c t t c a t t t t a t c t a c t g g g a t g a a a t g c c t	1136
BPM2 .4	g a t a t g c a a g a c t t a a t c g g c a c a g a c t t g a a a t g g g c a t c a a c t c t t g t g g c t c a g c a t	1286
BPM2 .3	g a t a t g c a a g a c t t a a t c g g c a c a g a c t t g a a a t g g g c a t c a a c t c t t g t g g c t c a g c a t	1560
BPM2 .1	g a t a t g c a a g a c t t a a t c g g c a c a g a c t t g a a a t g g g c a t c a a c t c t t g t g g c t c a g c a t	1229
BPM2 .2	-----	1067
BPM2 .5	g a t a t g c a a g a c t t a a t c g g c a c a g a c t t g a a a t g g g c a t c a a c t c t t g t g g c t c a g c a t	1196
BPM2 .4	c t g c t t g c a g c t g c a g a c c g t t a t g c t c t t g a g c g g c t t a g a a c a a t a t g c g a g t c a a a a	1346
BPM2 .3	c t g c t t g c a g c t g c a g a c c g t t a t g c t c t t g a g c g g c t t a g a a c a a t a t g c g a g t c a a a a	1620
BPM2 .1	c t g c t t g c a g c t g c a g a c c g t t a t g c t c t t g a g c g g c t t a g a a c a a t a t g c g a g t c a a a a	1289
BPM2 .2	-----	1067
BPM2 .5	c t g c t t g c a g c t g c a g a c c g t t a t g c t c t t g a g c g g c t t a g a a c a a t a t g c g a g t c a a a a	1256
BPM2 .4	c t c t g t g a a g g a a t c a g c a t a a a t a c g g t a g c a a c c a c c t t g g c t c t t g c a g a g c a g c a t	1406
BPM2 .3	c t c t g t g a a g g a a t c a g c a t a a a t a c g g t a g c a a c c a c c t t g g c t c t t g c a g a g c a g c a t	1680
BPM2 .1	c t c t g t g a a g g a a t c a g c a t a a a t a c g g t a g c a a c c a c c t t g g c t c t t g c a g a g c a g c a t	1349
BPM2 .2	-----	1067
BPM2 .5	c t c t g t g a a g g a a t c a g c a t a a a t a c g g t a g c a a c c a c c t t g g c t c t t g c a g a g c a g c a t	1316
BPM2 .4	c a t t g t t t c c a g c t g a a a g c c g c c t g c c t c a a a t t t a t a g c t t t g c c a g a a a c c t g a a -	1465
BPM2 .3	c a t t g t t t c c a g c t g a a a g c c g c c t g c c t c a a a t t t a t a g c t t t g c c a g a a a c c t g a a -	1739
BPM2 .1	c a t t g t t t c c a g c t g a a a g c c g c c t g c c t c a a a t t t a t a g c t t t g c c a g a a a c c t g a a -	1408
BPM2 .2	-----	1067
BPM2 .5	c a t t g t t t c c a g c t g a a a g c c g c c t g c c t c a a a t t t a t a g c t t t g c c a g a a a c c t g a a a	1376
BPM2 .4	-----	1465
BPM2 .3	-----	1739
BPM2 .1	-----	1408
BPM2 .2	-----g a a	1070
BPM2 .5	g g t a c a g a a g a t c a c t c c t t g c t t g t t t g a a t c g c t t t g a t c a t g t c t g a a a t c t g a a g	1436



BPM2 . 4	-----agctgtgatggaaacggatgggtt	1489
BPM2 . 3	-----agctgtgatggaaacggatgggtt	1763
BPM2 . 1	-----agctgtgatggaaacggatgggtt	1432
BPM2 . 2	-----g-----	1071
BPM2 . 5	ccgcccttgtaacaaaagttgtctgtaatttcttttagctgtgatggaaacggatgggtt	1496
BPM2 . 4	tgattatctgaaggaaagctgcccgctccctactaagtgtgctattggagtatgtggctag	1549
BPM2 . 3	tgattatctgaaggaaagctgcccgctccctactaagtgtgctattggagtatgtggctag	1823
BPM2 . 1	tgattatctgaaggaaagctgcccgctccctactaagtgtgctattggagtatgtggctag	1492
BPM2 . 2	----ttgaggctgaaagctgcccgctccctactaagtgtgctattggagtatgtggctag	1126
BPM2 . 5	tgattatctgaaggaaagctgcccgctccctactaagtgtgctattggagtatgtggctag : * : * . . *****	1556
BPM2 . 4	gctgagtgtgactcctttaacatcatcagggcatcgaaaggagtattttgctgatggttg	1609
BPM2 . 3	gctgagtgtgactcctttaacatcatcagggcatcgaaaggagtattttgctgatggttg	1883
BPM2 . 1	gctgagtgtgactcctttaacatcatcagggcatcgaaaggagtattttgctgatggttg	1552
BPM2 . 2	gctgagtgtgactcctttaacatcatcagggcatcgaaaggagtattttgctgatggttg	1186
BPM2 . 5	gctgagtgtgactcctttaacatcatcagggcatcgaaaggagtattttgctgatggttg *****	1616
BPM2 . 4	tgactttaatgggagacgtgtgaagcaacggttacattagcaactaattgagagagagag	1669
BPM2 . 3	tgactttaatgggagacgtgtgaagcaacggttacattagcaactaattgagagagagag	1943
BPM2 . 1	tgactttaatgggagacgtgtgaagcaacggttacattagcaactaattgagagagagag	1612
BPM2 . 2	tgactttaatgggagacgtgtgaagcaacggttacattagcaactaattgagagagagag	1246
BPM2 . 5	tgactttaatgggagacgtgtgaagcaacggttacattagcaactaattgagagagagag *****	1676
BPM2 . 4	agagagagaggtcacttcgagagcctgagaagatgatggtgaagtaaacagaatthttaga	1729
BPM2 . 3	agagagagaggtcacttcgagagcctgagaagatgatggtgaagtaaacagaatthttaga	2003
BPM2 . 1	agagagagaggtcacttcgagagcctgagaagatgatggtgaagtaaacagaatthttaga	1672
BPM2 . 2	agagagagaggtcacttcgagagcctgagaagatgatggtgaagtaaacagaatthttaga	1306
BPM2 . 5	agagagagaggtcacttcgagagcctgagaagatgatggtgaagtaaacagaatthttaga *****	1736
BPM2 . 4	agagtaaagatttgtgtatthtgtcattgtaaaaggattagtggtgatctgtgthttaga	1789
BPM2 . 3	agagtaaagatttgtgtatthtgtcattgtaaaaggattagtggtgatctgtgthttaga	2063
BPM2 . 1	agagtaaagatttgtgtatthtgtcattgtaaaaggattagtggtgatctgtgthttaga	1732
BPM2 . 2	agagtaaagatttgtgtatthtgtcattgtaaaaggattagtggtgatctgtgthttaga	1366
BPM2 . 5	agagtaaagatttgtgtatthtgtcattgtaaaaggattagtggtgatctgtgthttaga *****	1796
BPM2 . 4	gctagctaataagagtgaaatgthtgggtthtthtctthtctthtctthtctthtctthtccag	1849
BPM2 . 3	gctagctaataagagtgaaatgthtgggtthtthtctthtctthtctthtctthtctthtccag	2123
BPM2 . 1	gctagctaataagagtgaaatgthtgggtthtthtctthtctthtctthtctthtctthtccag	1792
BPM2 . 2	gctagctaataagagtgaaatgthtgggtthtthtctthtctthtctthtctthtctthtccag	1426
BPM2 . 5	gctagctaataagagtgaaatgthtgggtthtthtctthtctthtctthtctthtctthtccag *****	1856
BPM2 . 4	gattthttagaccagaaccggttctctcaaggaaaaagthtcatgtgacttcatthttagataaa	1909
BPM2 . 3	gattthttagaccagaaccggttctctcaaggaaaaagthtcatgtgacttcatthttagataaa	2183
BPM2 . 1	gattthttagaccagaaccggttctctcaaggaaaaagthtcatgtgacttcatthttagataaa	1852
BPM2 . 2	gattthttagaccagaaccggttctctcaaggaaaaagthtcatgtgacttcatthttagataaa	1486
BPM2 . 5	gattthttagaccagaaccggttctctcaaggaaaaagthtcatgtgacttcatthttagataaa *****	1916

BPM2.4	tttggacttgccaaaaatcattgcagaaactggttctaatatgtttgaacaaaaaagttc	1969
BPM2.3	tttggacttgccaaaaatcattgcagaaactggttctaatatgtttgaacaaaaaagttc	2243
BPM2.1	tttggacttgccaaaaatcattgcagaaactggttctaatatgtttgaacaaaaaagttc	1912
BPM2.2	tttggacttgccaaaaatcattgcag-----	1512
BPM2.5	tttggacttgccaaaaatcattgcag----- *****	1942
BPM2.4	a <del>ctaagctttcttatttgagggtcca</del> -----	1995
BPM2.3	actaagctttcttatttgagggtcccagacaataaccttttgatatgtccaataggacaac	2303
BPM2.1	actaagctttcttatttgagggtcccagacaataaccttttgatatgtccaataggacaac	1972
BPM2.2	-----	1512
BPM2.5	-----	1942
BPM2.4	-----	1995
BPM2.3	tatttaagtctcaaccacacaacaaagt	2331
BPM2.1	tatttaagtc <del>tcaaccacacaacaaagt</del>	2000
BPM2.2	-----	1512
BPM2.5	-----	1942

**Prilog III.** Poravnanje sekvenci četiriju varijanti gena *BPM3* kod biljke *A. thaliana* i odabir početnica za njihovo umnažanje. Sekvence molekula cDNA preuzete su iz baze TAIR i poravnate u programu Clustal Omega. Zvezdicom su označeni nukleotidi koji su identični u sve četiri sekvence. Mjesta vezanja početnica obilježena su različitim bojama: žutom (FW BPM3.1234), crvenom (REV BPM3.2), sivom (FWm BPM3.1234), zelenom (FW BPM3.34), svijetloplavom (REV BPM3.4) i tamnoplavom (REV BPM3.13).

BPM3 .2	g ttggc t t a t g g t c g t t g g a c a c t a c t t t c g a g c c c a t t a c a t t t a a t a t c c t t t a a a a t	60
BPM3 .4	-----	0
BPM3 .1	-----t t a t g g t c g t t g g a c a c t a c t t t c g a g c c c a t t a c a t t t a a t a t c c t t t a a a a t	54
BPM3 .3	-----t t a t g g t c g t t g g a c a c t a c t t t c g a g c c c a t t a c a t t t a a t a t c c t t t a a a a t	54
BPM3 .2	aaaaaataaagaaggcgaaaacagtttcccccaattctcataattttcaaaaacaacct	120
BPM3 .4	-----t t t c c c c c a a a t t c t c a t a a t t t t c a c a a a c a a c c t	36
BPM3 .1	aaaaaataaagaaggcgaaaacagtttcccccaattctcataattttcaaaaacaacct	114
BPM3 .3	aaaaaataaagaaggcgaaaacagtttcccccaattctcataattttcaaaaacaacct	114
*****		
BPM3 .2	ctcgtcttctaggttaatccaatttcgtcgattcatgaagttcacaattctcccatcgga	180
BPM3 .4	ctcgtcttctaggttaatccaatttcgtcgattcatgaagttcacaattctcccatcgga	96
BPM3 .1	ctcgtcttctaggttaatccaatttcgtcgattcatgaagttcacaattctcccatcgga	174
BPM3 .3	ctcgtcttctaggttaatccaatttcgtcgattcatgaagttcacaattctcccatcgga	174
*****		
BPM3 .2	aaattcttcgtaatcgacgacgaagagatcatgagtagcgtcggaggtatagagcagttg	240
BPM3 .4	aaattcttcgtaatcgacgacgaagagatcatgagtagcgtcggaggtatagagcagttg	156
BPM3 .1	aaattcttcgtaatcgacgacgaagagatcatgagtagcgtcggaggtatagagcagttg	234
BPM3 .3	aaattcttcgtaatcgacgacgaagagatcatgagtagcgtcggaggtatagagcagttg	234
*****		
BPM3 .2	atacctgattccgtttcaacgctcgttcacgaaacggtgaacggttcgcaccagttcacg	300
BPM3 .4	atacctgattccgtttcaacgctcgttcacgaaacggtgaacggttcgcaccagttcacg	216
BPM3 .1	atacctgattccgtttcaacgctcgttcacgaaacggtgaacggttcgcaccagttcacg	294
BPM3 .3	atacctgattccgtttcaacgctcgttcacgaaacggtgaacggttcgcaccagttcacg	294
*****		
BPM3 .2	attcaaggttactctctagccaaaggcatgagccctgggaagtttatacagagcgatattc	360
BPM3 .4	attcaaggttactctctagccaaaggcatgagccctgggaagtttatacagagcgatattc	276
BPM3 .1	attcaaggttactctctagccaaaggcatgagccctgggaagtttatacagagcgatattc	354
BPM3 .3	attcaaggttactctctagccaaaggcatgagccctgggaagtttatacagagcgatattc	354
*****		
BPM3 .2	ttctccgttggtggatacattgggcatgatttacttctatcctgatgggaagaaccggag	420
BPM3 .4	ttctccgttggtggatacattgggcatgatttacttctatcctgatgggaagaaccggag	336
BPM3 .1	ttctccgttggtggatacattgggcatgatttacttctatcctgatgggaagaaccggag	414
BPM3 .3	ttctccgttggtggatacattgggcatgatttacttctatcctgatgggaagaaccggag	414
*****		

BPM3.2	gaccagtcctcgtatatctctttgttcatcgctttagcgagtgattcctaatgatattagg	480
BPM3.4	gaccagtcctcgtatatctctttgttcatcgctttagcgagtgattcctaatgatattagg	396
BPM3.1	gaccagtcctcgtatatctctttgttcatcgctttagcgagtgattcctaatgatattagg	474
BPM3.3	gaccagtcctcgtatatctctttgttcatcgctttagcgagtgattcctaatgatattagg *****	474
BPM3.2	gctttgtttgagcttacgcttatggatcagagtgaggaaagggaaacataaggtgcatagt	540
BPM3.4	gctttgtttgagcttacgcttatggatcagagtgaggaaagggaaacataaggtgcatagt	456
BPM3.1	gctttgtttgagcttacgcttatggatcagagtgaggaaagggaaacataaggtgcatagt	534
BPM3.3	gctttgtttgagcttacgcttatggatcagagtgaggaaagggaaacataaggtgcatagt *****	534
BPM3.2	cactttgatcgggcgcttgaaggtggtccttatacacttaagtataaaggaagcatgtgg	600
BPM3.4	cactttgatcgggcgcttgaaggtggtccttatacacttaagtataaaggaagcatgtgg	516
BPM3.1	cactttgatcgggcgcttgaaggtggtccttatacacttaagtataaaggaagcatgtgg	594
BPM3.3	cactttgatcgggcgcttgaaggtggtccttatacacttaagtataaaggaagcatgtgg *****	594
BPM3.2	ggttacaacgctttttcaaacgatcagctttagaaacctctgactacttaaaggatgat	660
BPM3.4	ggttacaacgctttttcaaacgatcagctttagaaacctctgactacttaaaggatgat	576
BPM3.1	ggttacaacgctttttcaaacgatcagctttagaaacctctgactacttaaaggatgat	654
BPM3.3	ggttacaacgctttttcaaacgatcagctttagaaacctctgactacttaaaggatgat *****	654
BPM3.2	tgtcttgtcatcaattgtactgttggcgttgttagagcccgactcgaggggtccaaaacag	720
BPM3.4	tgtcttgtcatcaattgtactgttggcgttgttagagcccgactcgaggggtccaaaacag	636
BPM3.1	tgtcttgtcatcaattgtactgttggcgttgttagagcccgactcgaggggtccaaaacag	714
BPM3.3	tgtcttgtcatcaattgtactgttggcgttgttagagcccgactcgaggggtccaaaacag *****	714
BPM3.2	tatggcattgtgctaccctgtcgaatatgggtcagggattgaaagacttgttagattct	780
BPM3.4	tatggcattgtgctaccctgtcgaatatgggtcagggattgaaagacttgttagattct	696
BPM3.1	tatggcattgtgctaccctgtcgaatatgggtcagggattgaaagacttgttagattct	774
BPM3.3	tatggcattgtgctaccctgtcgaatatgggtcagggattgaaagacttgttagattct *****	774
BPM3.2	gaagttggttgtgacatagctttccaagtcggagatgaaacatacaaagctcacaaactg	840
BPM3.4	gaagttggttgtgacatagctttccaagtcggagatgaaacatacaaagctcacaaactg	756
BPM3.1	gaagttggttgtgacatagctttccaagtcggagatgaaacatacaaagctcacaaactg	834
BPM3.3	gaagttggttgtgacatagctttccaagtcggagatgaaacatacaaagctcacaaactg *****	834
BPM3.2	attctcgcggcacgctccccagtttttagagctcagttttttggaccaattgggaataac	900
BPM3.4	attctcgcggcacgctccccagtttttagagctcagttttttggaccaattgggaataac	816
BPM3.1	attctcgcggcacgctccccagtttttagagctcagttttttggaccaattgggaataac	894
BPM3.3	attctcgcggcacgctccccagtttttagagctcagttttttggaccaattgggaataac *****	894
BPM3.2	aatgtggatagaatagtgatagacgacatcgaaccttctatcttcaaggctatgcttagc	960
BPM3.4	aatgtggatagaatagtgatagacgacatcgaaccttctatcttcaaggctatgcttagc	876
BPM3.1	aatgtggatagaatagtgatagacgacatcgaaccttctatcttcaaggctatgcttagc	954
BPM3.3	aatgtggatagaatagtgatagacgacatcgaaccttctatcttcaaggctatgcttagc *****	954
BPM3.2	ttcatttacaccgatgtacttccctaatgtgcatgaaattaccgggtcaacttctgccagt	1020
BPM3.4	ttcatttacaccgatgtacttccctaatgtgcatgaaattaccgggtcaacttctgccagt	936
BPM3.1	ttcatttacaccgatgtacttccctaatgtgcatgaaattaccgggtcaacttctgccagt	1014
BPM3.3	ttcatttacaccgatgtacttccctaatgtgcatgaaattaccgggtcaacttctgccagt *****	1014

BPM3.2	tcgtttacaacatgatacaacatctcttggcagctgctgacctctatgaccttgcaagg	1080
BPM3.4	tcgtttacaacatgatacaacatctcttggcagctgctgacctctatgaccttgcaagg	996
BPM3.1	tcgtttacaacatgatacaacatctcttggcagctgctgacctctatgaccttgcaagg	1074
BPM3.3	tcgtttacaacatgatacaacatctcttggcagctgctgacctctatgaccttgcaagg *****	1074
BPM3.2	ttaaagatattatgtgaagttttgctatgcgaaaaacttgatgttgataatgtggcaaca	1140
BPM3.4	ttaaagatattatgtgaagttttgctatgcgaaaaacttgatgttgataatgtggcaaca	1056
BPM3.1	ttaaagatattatgtgaagttttgctatgcgaaaaacttgatgttgataatgtggcaaca	1134
BPM3.3	ttaaagatattatgtgaagttttgctatgcgaaaaacttgatgttgataatgtggcaaca *****	1134
BPM3.2	acacttgcgttggctgaacagcaccaattcttacagctcaaagcgttctgcttagaattt	1200
BPM3.4	acacttgcgttggctgaacagcaccaattcttacagctcaaagcgttctgcttagaattt	1116
BPM3.1	acacttgcgttggctgaacagcaccaattcttacagctcaaagcgttctgcttagaattt	1194
BPM3.3	acacttgcgttggctgaacagcaccaattcttacagctcaaagcgttctgcttagaattt *****	1194
BPM3.2	gttgcatctccagcaaacttgggaggtlacgggttgcataatagtttcagggttttttcagtc	1260
BPM3.4	gttgcatctccagcaaacttgggagggagactcgatgcttgattagacggcttgaggttta	1176
BPM3.1	gttgcatctccagcaaacttgggag-----	1219
BPM3.3	gttgcatctccagcaaacttgggagagactcgatgcttgattagacggcttgaggttta *****	1254
BPM3.2	tgcacttttagatgcttatatagactcacactcgtgtatttttcttttgaatacatgttt	1320
BPM3.4	tcatcctcaactaggtgcgataaattagttgtttttgattat---ttttatcgacaatctag	1233
BPM3.1	-----ctgtaatgaagtcggaaggggttcaag---cacttgaacagagctg	1262
BPM3.3	tcatcctcaactagctgtaatgaagtcggaaggggttcaag---cacttgaacagagctg * * *	1311
BPM3.2	tcgtgctttaatgcaacattgttatcatatgatgagatagtagaatgtataggtcctgc	1380
BPM3.4	ttttaa-----agttaacaatgactagccaatgggtaaaatataatgttgcattc	1282
BPM3.1	tcccactttgttatctgagttgctgaacactggtgagcagcagataagagctcgacgag	1322
BPM3.3	tcccactttgttatctgagttgctgaacactggtgagcagcagataagagctcgacgag * ** * * *	1371
BPM3.2	attgaattggtgttactatca---atgtggtaaaacttagtt---taaaggtagtcca	1433
BPM3.4	tggaagatagagattcaataccacatgtcct----ggctcctaattgtaaaattcca---	1333
BPM3.1	tggacaatca---aacaagaaaagaagtgcgagcagtgatttaggtgtgacactacaaa	1379
BPM3.3	tggacaatca---aacaagaaaagaagtgcgagcagtgatttaggtgtgacactacaaa * * * * *	1428
BPM3.2	tggaatccttttcatcaacctacaacttgagctatactttgacactagaacaatggcaa	1493
BPM3.4	----cgtaaatgctgttatcacatcta--aaggtagtgcaatcatttgcagaacttaa	1386
BPM3.1	tgtgaggcaattgaggaggagaacacga--aaagaagtgcgagcagtgcttaggatcat	1437
BPM3.3	tgtgaggcaattgaggaggagaacacga--aaagaagtgcgagcagtgcttaggatcat * * * * *	1486
BPM3.2	tagtaacagagagaacaactttacgaaactatataatttttaaagatta--aaccttgta	1551
BPM3.4	-actaaacatttctttctttctctaaaactgaaactgggtaatatgg--atattgtgtt	1442
BPM3.1	tacataccgatgcaaaaattctagaa--ttatgcattgtgtttcaagcagagtttatgaa	1495
BPM3.3	tacataccgatgcaaaaattctagaa--ttatgcattgtgtttcaagcagagtttatgaa * * * * * **	1544
BPM3.2	tgaaggatcatctg---ccttattt-----gtat	1577
BPM3.4	ttccaaca---tgggtggac---ttttcttttgggtgtaatatagagtggttattagttggat	1495
BPM3.1	ttccaagtcatcccgtgaactttttaccagtgagaattatagaggcctgaactctgaac	1555
BPM3.3	ttccaagtcatcccgtgaactttttaccagtgagaattatagaggcctgaactctgaac * ** * *	1604

BPM3.2	gatccggtttatataatgcatttgggacttgggtgcttgggtgcttagtgtaatagtaatcc	1637
BPM3.4	gatattatggatgaaaagaat---ccaggaaaag-----taaaaagtaagtgatgttg	1545
BPM3.1	caaactgtttgtgtcaatcattttacatttctgg-----acaaaagaaagtacaatct	1608
BPM3.3	caaactgtttgtgtcaatcattttacatttctgg-----acaaaagaaagtacaatct	1657
	* * * * ** * * * * * * * * * *	
BPM3.2	attaaagatgtcgggtgtat--tattaatggaagttt-----tgtgagctaattttttt	1689
BPM3.4	ttttgtgca-----gctgtaatgaagtccgaagggtt-----	1577
BPM3.1	cccaaaagagctgtgagaattgactcaaaacaaatcctaaaactctgtaccagattgttc	1668
BPM3.3	cccaaaagagctgtgagaattgactcaaaacaaatcctaaaactctgtaccagattgttc	1717
	* * ** * *	
BPM3.2	ttttttttttttttttt-----	1706
BPM3.4	-----	1577
BPM3.1	aatttctcattaaatcccacaatatgattttcacgtcgct	1708
BPM3.3	aatttctcattaaatcccacaatatgattttcacgtcgct	1757

**Prilog IV.** Poravnanje sekvenci poznatih varijanti gena *BPM2.3* i *BPM2.4* s genomskom DNA gena *BPM2* i proučavanim fragmentom koji predstavlja dio sekvence nove varijante gena *BPM2.6*. Sekvence molekula cDNA i genomske DNA preuzete su iz baze TAIR, a poravnanje je provedeno u programu Clustal Omega. Zvezdicom su označeni nukleotidi koji su identični u sve četiri sekvence. Sivom bojom je označen slijed duljine 189 nt koji ne pokazuje homologiju s poznatim varijantama gena *BPM2*.

BPM2 . 3	TCGCAACCTACCAAACCTGTTGTGTTTAAACTTAAACCGATCTATCAAGCAAGTGGTTCC	60
BPM2 . 4	-----AAAACCTTAAACCGATCTATCAAGCAAGTGGTTCC	34
BPM2 . 6	-----AAACCGATCTATCAAGCAAGTGGTTCC	27
gDNA	tcgcaacctaccaaactgttgtgttttaaaacttaaacgatctatcaagcaagtggttcc	60
	*****	
BPM2 . 3	TCTCTCTCTACCTCTCGTTTTTGGCCAACGTCGTCGTTTACGATCCACGACGATTC	120
BPM2 . 4	TCTCTCTCTACCTCTCGTTTTTGGCCAACGTCGTCGTTTACGATCCACGACGATTC	94
BPM2 . 6	TCTCTCTCTACCTCTCGTTTTTGGCCAACGTCGTCGTTTACGATCCACGACGATTC	87
gDNA	tctctctctctacctctcgTTTTTggccaacgTCGTCGTTTcagatccacgacgattc	120
	*****	
BPM2 . 3	AGTTCTTGAGTTCGGCGATTATCGGTCTCTCACTTCTGGTTCCGTTGAACCCCTCATTT	180
BPM2 . 4	AGTTCTTGAGTTCGGCGATTATCGGTCTCTCACTTCTGGTTCCGTTGAACCCCTCATTT	154
BPM2 . 6	AGTTCTTGAGTTCGGCGATTATCGGTCTCTCACTTCTGGTTCCGTTGAACCCCTCATTT	147
gDNA	agttcttgagttcggcgattatcggtctctcacttctggttccgttgaaccctcattt	180
	*****	
BPM2 . 3	CTCTTCTCGCCCGTGTCTCTCAAATTCGATATTTGCCCTGTGATTTCGAAACCCTAATTT	240
BPM2 . 4	CTCTTCTCGCCCGTGTCTCTCAAATTCGATATTTGCCCTGTGATTTCGAAACCCTAATTT	214
BPM2 . 6	CTCTTCTCGCCCGTGTCTCTCAAATTCGATATTTGCCCTGTGATTTCGAAACCCTAATTT	207
gDNA	ctcttctcgcccgTGTCTCTCAAATTCGATATTTGCCCTGTGATTTCGAAACCCTAATTT	240
	*****	
BPM2 . 3	CGCCTATCAATCTGGAAAATCTCTCAATTCGAAGACTTTAGCAGCGCAAAGATACTCTAT	300
BPM2 . 4	CGCCTATCAATCTGGAAAATCTCTCAATTCGAAGACTTTAGCAGCGCAAAGATACTCTAT	274
BPM2 . 6	CGCCTATCAATCTGGAAAATCTCTCAATTCGAAGACTTTAGCAGCGCAAAGATACTCTAT	267
gDNA	cgctatcaatctggaaaatctctcaattcgaagactttagcagcgcaaagatactctat	300
	*****	
BPM2 . 3	CCGGTAATAAGATCGAAGAAACCATCAATTTCTTACCAAAGTCGTGATTCTTGGATCTC	360
BPM2 . 4	CCGGTAATAAGATCGAAGAAACCATCAATTTCTTACCAAAGTCGTGATTCTTGGATCTC	334
BPM2 . 6	CCGGTAATAAGATCGAAGAAACCATCAATTTCTTACCAAAGTCGTGATTCTTGGATCTC	327
gDNA	ccggtaataagatcgaagaacatcaatttcttaccaaagtcgtgattcttggatctc	360
	*****	
BPM2 . 3	GTCTTTGTTTGGATGGACACAATTAGGGTTTCCAAGGAGGTTCTGGATCTTCGAAATCGA	420
BPM2 . 4	GTCTTTGTTTGGATGGACACAATTAGGGTTTCCAAGGAGGTTCTGGATCTTCGAAATCGA	394
BPM2 . 6	GTCTTTGTTTGGATGGACACAATTAGGGTTTCCAAGGAGGTTCTGGATCTTCGAAATCGA	387
gDNA	gtctttgTTTggatggacacaattagggTTTccaaggaggttcttggatcttCGAAATCGA	420
	*****	
BPM2 . 3	CCGCACAGTCGCTCACGGAGTCGACCTCTCGCACGGAACCATCAATGGCTCCCACGAAT	480
BPM2 . 4	CCGCACAGTCGCTCACGGAGTCGACCTCTCGCACGGAACCATCAATGGCTCCCACGAAT	454
BPM2 . 6	CCGCACAGTCGCTCACGGAGTCGACCTCTCGCACGGAACCATCAATGGCTCCCACGAAT	447
gDNA	ccgcacagtcgctcacggagtcgacctctcgcacggaacatcaatggctcccacgaat	480
	*****	

BPM2 . 3 TCAAGATCAGCGGCTACTCTTTGGTCAAAGGCATGGGGATTGGCAAATACGTTGCCTCGG 540  
 BPM2 . 4 TCAAGATCAGCGGCTACTCTTTGGTCAAAGGCATGGGGATTGGCAAATACGTTGCCTCGG 514  
 BPM2 . 6 TCAAGATCAGCGGCTACTCTTTGGTCAAAGGCATGGGGATTGGCAAATACGTTGCCTCGG 507  
 gDNA tcaagatcagcggctactctttgggtcaaaggcattggggattggcaaatacgttgccctcgg 540  
 \*\*\*\*\*

BPM2 . 3 ATACTTTCATGGTCGGTGGATACTCCTGGGCCATCTACTTCTACCCAGATGGAAAGAGTC 600  
 BPM2 . 4 ATACTTTCATGGTCGGTGGATACTCCTGGGCCATCTACTTCTACCCAGATGGAAAGAGTC 574  
 BPM2 . 6 ATACTTTCATGGTCGGTGGATACTCCTGGGCCATCTACTTCTACCCAGATGGAAAGAGTC 567  
 gDNA atactttcatggtcggtggatactcctgggccatctacttctaccagatggaaagagtc 600  
 \*\*\*\*\*

BPM2 . 3 CAGAGGATAAATTCGTCTACGTGTCTCTCTTCATAGCCCTTGCGAGTGAAGGAGCCGATG 660  
 BPM2 . 4 CAGAGGATAAATTCGTCTACGTGTCTCTCTTCATAGCCCTTGCGAGTGAAGGAGCCGATG 634  
 BPM2 . 6 CAGAGGATAAATTCGTCTACGTGTCTCTCTTCATAGCCCTTGCGAGTGAAGGAGCCGATG 627  
 gDNA cagaggataaattcgtctacgtgtctctcttcattagcccttgcgagtgaaggagccgatg 660  
 \*\*\*\*\*

BPM2 . 3 TTAGGGCTTTGTTTGGAGCTTACCCTCGTGGATCAGAGCGGTAACGAAAGGCACAAAGTTC 720  
 BPM2 . 4 TTAGGGCTTTGTTTGGAGCTTACCCTCGTGGATCAGAGCGGTAACGAAAGGCACAAAGTTC 694  
 BPM2 . 6 TTAGGGCTTTGTTTGGAGCTTACCCTCGTGGATCAGAGCGGTAACGAAAGGCACAAAGTTC 687  
 gDNA ttagggtctttgtttggagcttaccctcgtggatcagagcggtaacgaaaggcacaaagttc 720  
 \*\*\*\*\*

BPM2 . 3 ATAGCCATTTTGGTAGAACTCTCGAAAGCGGACCCTATACTCTTAAATATCGAGGGAGTA 780  
 BPM2 . 4 ATAGCCATTTTGGTAGAACTCTCGAAAGCGGACCCTATACTCTTAAATATCGAGGGAGTA 754  
 BPM2 . 6 ATAGCCATTTTGGTAGAACTCTCGAAAGCGGACCCTATACTCTTAAATATCGAGGGAGTA 747  
 gDNA atagccatTTTGGTAGAACTCTCGAAAGCGGACCCTATACTCTTAAATATCGAGGGAGTA 780  
 \*\*\*\*\*

BPM2 . 3 TGTG----- 784  
 BPM2 . 4 TGTG----- 758  
 BPM2 . 6 TGTG----- 751  
 gDNA tgtggtgagtaaattattatccttctcttggaaaaaaattacagctttgagtgaatttaa 840  
 \*\*\*\*

BPM2 . 3 ----- 784  
 BPM2 . 4 ----- 758  
 BPM2 . 6 ----- 751  
 gDNA gaaatgctattgcctagtctctgccttgactgatgagtatagataatgtgacatgtttt 900

BPM2 . 3 -----GGGATACAAACGATT 799  
 BPM2 . 4 -----GGGATACAAACGATT 773  
 BPM2 . 6 -----GGGATACAAACGATT 766  
 gDNA tggtttctataatgtttaatttggttgatgattgcttaatttttaggggatacaaacgatt 960  
 \*\*\*\*\*

BPM2 . 3 TTTCAGAGGTCTCTTTTGGAGTCATCGGACTATCTGAAGGACAATGGTCTCTTGGTCCG 859  
 BPM2 . 4 TTTCAGAGGTCTCTTTTGGAGTCATCGGACTATCTGAAGGACAATGGTCTCTTGGTCCG 833  
 BPM2 . 6 TTTCAGAGGTCTCTTTTGGAGTCATCGGACTATCTGAAGGACAATGGTCTCTTGGTCCG 826  
 gDNA tttcaagaggtctcttttggagtcacggaactatctgaaggacaatggtctcttgggtccg 1020  
 \*\*\*\*\*

BPM2 . 3 GTGTTGTGTTGGAGTGGTGAAGTCACGCACAGAAGGACCGAGGTGTTACAATATCCCGGT 919  
 BPM2 . 4 GTGTTGTGTTGGAGTGGTGAAGTCACGCACAGAAGGACCGAGGTGTTACAATATCCCGGT 893  
 BPM2 . 6 GTGTTGTGTTGGAGTGGTGAAGTCACGCACAGAAGGACCGAGGTGTTACAATATCCCGGT 886  
 gDNA gtgttgtgttggagtgggtgaagtcacgcacagaaggaccgaggtgttacaatatcccggt 1080  
 \*\*\*\*\*



BPM2 . 3 GCCGGTTTCTGGCTTGGGTCAGCAGTTTGGAAAGCTTTTGGAAAGTGGGAAAGGAGCTGA 979  
 BPM2 . 4 GCCGGTTTCTGGCTTGGGTCAGCAGTTTGGAAAGCTTTTGGAAAGTGGGAAAGGAGCTGA 953  
 BPM2 . 6 GCCGGTTTCTGGCTTGGGTCAGCAGTTTGGAAAGCTTTTGGAAAGTGGGAAAGGAGCTGA 946  
 gDNA gccggtttctggcttgggtcagcagtttggaaagcttttggaaagtgggaaaggagctga 1140  
 \*\*\*\*\*

BPM2 . 3 CGTTACTTTCGAAGTTGATGGAGAAACATTTCTGCTCACAATTTGGTTCTTGCAGCAGC 1039  
 BPM2 . 4 CGTTACTTTCGAAGTTGATGGAGAAACATTTCTGCTCACAATTTGGTTCTTGCAGCAGC 1013  
 BPM2 . 6 CGTTACTTTCGAAGTTGATGGAGAAACATTTCTGCTCACAATTTGGTTCTTGCAGCAGC 1006  
 gDNA cgttactttcgaagttgatggagaaacatttcctgctcacaattggttcttgcagcagc 1200  
 \*\*\*\*\*

BPM2 . 3 TTCTGCAGTTTTTCAGGGCACAGCTTTTTGGCCCGTTGAGAAGTGAAAATACCAATTGTAT 1099  
 BPM2 . 4 TTCTGCAGTTTTTCAGGGCACAGCTTTTTGGCCCGTTGAGAAGTGAAAATACCAATTGTAT 1073  
 BPM2 . 6 TTCTGCAGTTTTTCAGGGCACAGCTTTTTGGCCCGTTGAGAAGTGAAAATACCAATTGTAT 1066  
 gDNA ttctgcagttttcagggcacagcttttggcccgttgagaagtgaaaataccaattgtat 1260  
 \*\*\*\*\*

BPM2 . 3 AATCATAGAAGACGTACAAGCCCCATTTTTCAAG----- 1133  
 BPM2 . 4 AATCATAGAAGACGTACAAGCCCCATTTTTCAAG----- 1107  
 BPM2 . 6 AATCATAGAAGACGTACAAGCCCCATTTTTCAAGGTTCTCCCTTTAACTCTCTTTCTGGA 1126  
 gDNA aatcatagaagacgtacaagcccctattttcaaggttctccctttaactctctttctgga 1320  
 \*\*\*\*\*

BPM2 . 3 ----- 1133  
 BPM2 . 4 ----- 1107  
 BPM2 . 6 CTA AAAACCTGTTTTCTCCTTGGCATGACTTTGTAGAATTTTATATTTGTAGCTTTAGAAGT 1186  
 gDNA ctaaaaacctgttttctccttggcatgactttgtagaattttatatattgtagctttagaagt 1380

BPM2 . 3 ----- 1133  
 BPM2 . 4 ----- 1107  
 BPM2 . 6 TGAGGCTGTTAGTTTTAGTCCTAAGTGATAAAGGCCTTATAAGAAGAGATAGCTTTCTTG 1246  
 gDNA tgaggctgttagtttttagtcctaagtgataaaggccttataagaagagatagctttcttg 1440

BPM2 . 3 -----GATTTTCTGTTTACGAG 1150  
 BPM2 . 4 -----GATTTTCTGTTTACGAG 1124  
 BPM2 . 6 GTTCCCTTGCCTTTTCTCGGGTGAGTGATTGTGGTGTGATACAGGATTTTCTGTTTACGAG 1306  
 gDNA gttccttgcccttttctcgggtgagtgattgtggtgtgatacaggatttctgtttacgag 1500  
 \*\*\*\*\*

BPM2 . 3 TGTACAATCCGGGACCTTCTCCTGGGGTGCTGCTCCCGTTCTCAAATATTACTACCCCGG 1210  
 BPM2 . 4 TGTACAATCCGGGACCTTCTCCTGGGGTGCTGCTCCCGTTCTCAAATATTACTACCCCGG 1184  
 BPM2 . 6 TGTACAATCCGGGACCTTCTCCTGGGGTGCTGCTCCCGTTCTCAAATATTACTACCCCGG 1366  
 gDNA tgtacaatccgggaccttctcctggtgctgctcccgttctcaaatattactcaccgg 1560  
 \*\*\*\*\*

BPM2 . 3 GATAAGGTTTAATCTTTCTACTTTTCTTTGGATTGCATGATTGTCTCGATTTCGCCAT 1270  
 BPM2 . 4 GATAAG----- 1190  
 BPM2 . 6 GATAAGGTTTAATCTTTCTACTTTTCTTTGGATTGCATGATTGTCTCGATTTC----- 1420  
 gDNA gataaggtttaatctttctacttttcttttggattgcatgattgtctcgatttcccgcat 1620  
 \*\*\*\*\*

BPM2 . 3 GCAGTAAATACATAGAGAAATTATGTTATAGATCATCATGTTTCATGTCAAATTTTCTGCT 1330  
 BPM2 . 4 ----- 1190  
 BPM2 . 6 ----- 1420  
 gDNA gcagtaaatacatagagaaattatgttatagatcatcatgttcatgtcaaattttctgct 1680

BPM2 . 3	TTTCAGCTTTGCTTTTTTTTGTAAAGATTGGTCTTTAGTCGATGTGCGAGTTTATAGATCA	1390
BPM2 . 4	-----	1190
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	tttcagctttgcttttttttgttaagattggctcttttagtcgatgtgcgagtttttagatca	1740
BPM2 . 3	TGGCTCCTGTAAATTTAAGGTTGATACAAATTCCTTCCTTTTGGTTTATTGTACTTTTT	1450
BPM2 . 4	-----	1190
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	tggctcctgtaaatttaaggttgatacaaatcccttccttttggtttattgtacttttt	1800
BPM2 . 3	TGTTGTTGTTGCAGATGTTGCTTCATTTTATCTACTGGGATGAAATGCCTGATATGCAAG	1510
BPM2 . 4	-----ATGTTGCTTCATTTTATCTACTGGGATGAAATGCCTGATATGCAAG	1236
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	tgttgttgttgcagatgttgcttcattttatctactgggatgaaatgcctgatatgcaag	1860
BPM2 . 3	ACTTAATCGGCACAGACTTGAAATGGGCATCAACTCTTGTGGCTCAGCATCTGCTTGCAG	1570
BPM2 . 4	ACTTAATCGGCACAGACTTGAAATGGGCATCAACTCTTGTGGCTCAGCATCTGCTTGCAG	1296
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	acttaatcggcacagacttgaaatgggcatcaactcttgggctcagcatctgcttgcaag	1920
BPM2 . 3	CTGCAGACCGTTATGCTCTTGAGCGGCTTAGAACAATATGCGAGTCAAACTCTGTGAAG	1630
BPM2 . 4	CTGCAGACCGTTATGCTCTTGAGCGGCTTAGAACAATATGCGAGTCAAACTCTGTGAAG	1356
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	ctgcagaccgttatgctcttgagcggcttagaacaatatgcgagtcaaaactctgtgaag	1980
BPM2 . 3	GAATCAGCATAAATACGGTAGCAACCACCTTGGCTCTTGCAGAGCAGCATCATTGTTTCC	1690
BPM2 . 4	GAATCAGCATAAATACGGTAGCAACCACCTTGGCTCTTGCAGAGCAGCATCATTGTTTCC	1416
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	gaatcagcataaatacggtagcaaccaccttggctcttgcagagcagcatcattgtttcc	2040
BPM2 . 3	AGCTGAAAGCCGCTGCCTCAAATTTATAGCTTTGCCAGAAAACCTGAAAG-----	1741
BPM2 . 4	AGCTGAAAGCCGCTGCCTCAAATTTATAGCTTTGCCAGAAAACCTGAAAG-----	1467
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	agctgaaagccgctgcctcaaatttatagctttgccagaaaacctgaaaggtagaag	2100
BPM2 . 3	-----	1741
BPM2 . 4	-----	1467
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	atcactccttgcttgtttgaatcgctttgatcatgtctgaaatctgaaggccgccttgt	2160
BPM2 . 3	-----CTGTGATGAAACGGATGGGTTTGATTATCTG	1773
BPM2 . 4	-----CTGTGATGAAACGGATGGGTTTGATTATCTG	1499
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	aacaaaaagttgtctgtaatttcttttagctgtgatggaaacggatgggtttgattatctg	2220
BPM2 . 3	AAGGAAAGCTGCCCGTCCCTACTAAGTGAGCTATTGGAGTATGTGGCTAGGCTGAGTGAG	1833
BPM2 . 4	AAGGAAAGCTGCCCGTCCCTACTAAGTGAGCTATTGGAGTATGTGGCTAGGCTGAGTGAG	1559
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	aaggaaagctgcccgccctactaagtgagctattggagtatgtggctaggctgagtgaag	2280

BPM2 . 3	CACTCTTTAACATCATCAGGGCATCGAAAGGAGTTATTTGCTGATGGTTGTGACTTAAAT	1893
BPM2 . 4	CACTCTTTAACATCATCAGGGCATCGAAAGGAGTTATTTGCTGATGGTTGTGACTTAAAT	1619
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	cactctttaacatcatcagggcatcgaaggagttatTTGCTGATGGTTGTGACTTAAAT	2340
BPM2 . 3	GGGAGACGTGTGAAGCAACGGTTACATTAGCAACTAATTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	1953
BPM2 . 4	GGGAGACGTGTGAAGCAACGGTTACATTAGCAACTAATTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	1679
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	gggagacgtgtgaagcaacggttacattagcaactaattgagagagagagagagagagag	2400
BPM2 . 3	GTCACTTCGAGAGCCTGAGAAGATGATGGTGAAGTAAACAGAATTTTAGAAGAGTAAAGA	2013
BPM2 . 4	GTCACTTCGAGAGCCTGAGAAGATGATGGTGAAGTAAACAGAATTTTAGAAGAGTAAAGA	1739
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	gtcacttcgagagcctgagaagatgatggTGAAGTAAACAGAATTTTAGAAGAGTAAAGA	2460
BPM2 . 3	TTTGTGTATTTGTCAATTGTAAGGATTAGTGTTGATCTGTGTTGTTTCAGCTAGCTAAT	2073
BPM2 . 4	TTTGTGTATTTGTCAATTGTAAGGATTAGTGTTGATCTGTGTTGTTTCAGCTAGCTAAT	1799
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	tttTGTATTTGTCAATTGTAAGGATTAGTGTTGATCTGTGTTGTTTCAGCTAGCTAAT	2520
BPM2 . 3	AGAGTGAAATGTTGGGTTTTTTTTCTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTGTTTTCCAGGATTTTATGA	2133
BPM2 . 4	AGAGTGAAATGTTGGGTTTTTTTTCTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTGTTTTCCAGGATTTTATGA	1859
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	agagtGAAATGTTGGGTTTTTTTTCTTTCTTTTCTTTTGTGTTTTCCAGGATTTTATGA	2580
BPM2 . 3	CCAGAACCGGTTCTCTCAAGGAAAAAGTTTCATGTGACTTCATTGATAAATTTGGACTTG	2193
BPM2 . 4	CCAGAACCGGTTCTCTCAAGGAAAAAGTTTCATGTGACTTCATTGATAAATTTGGACTTG	1919
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	ccagaacCGGTTCTCTCAAGGAAAAAGTTTCATGTGACTTCATTGATAAATTTGGACTTG	2640
BPM2 . 3	CCAAAAATCATTGCAGAACTGGTTCTAATATGTTTGAACAAAAAAGTTCACTAAGCTTT	2253
BPM2 . 4	CCAAAAATCATTGCAGAACTGGTTCTAATATGTTTGAACAAAAAAGTTCACTAAGCTTT	1979
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	ccaaaaatcattgcagaaactGGTTCTAATATGTTTGAACAAAAAAGTTCACTAAGCTTT	2700
BPM2 . 3	CTTATTTGAGGTCCCAGACAATAACCTTTTGATATGTCCAATAGGACAACCTATTTAAGTC	2313
BPM2 . 4	CTTATTTGAGGTCCCA-----	1995
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	cttatttgaggtcccagacaataacctTTTGATATGTCCAATAGGACAACCTATTTAAGTC	2760
BPM2 . 3	TCAACCACACAACAAAGT	2331
BPM2 . 4	-----	1995
BPM2 . 6	-----	1420
gDNA	tcaaccacacaacaaagt	2778

# ŽIVOTOPIS

## Osobne informacije:

Ime i prezime: Dorotea Pali

Datum rođenja: 21.11.1995.

## Obrazovanje:

2017 – 2020   Diplomski studij molekularne biologije  
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek  
Titula: mag. biol. mol

2014 – 2017   Preddiplomski studij molekularne biologije  
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek  
Titula: univ. bacc. biol. mol

2010 – 2014   Srednja škola  
II. Gimnazija, Zagreb

## Praktično iskustvo:

Student demonstrator na kolegijima: Molekularna genetika, Praktikum biokemije, Osnove fizikalne kemije  
Laboratorijska stručna praksa u Laboratoriju za molekularnu genetiku, Zavoda za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu

Organizacija i sudjelovanje u popularno-znanstvenoj manifestaciji „Noć biologije“ (2014/15; 2015/16; 2016/17; 2018/19)

Sudionik Biostudologije, javni seminar studenata Biološkog odsjeka (2015/16; 2018/19)

Terenska nastava iz zoologije i botanike

## Ostale vještine:

- jezici: hrvatski (materinski jezik), engleski
- digitalne vještine: Microsoft Windows, MS Office
- vozačka dozvola B kategorije

## Dodatne informacije:

Sudionik na 4. Simpoziju studenata bioloških usmjerenja (SiSB) (2018/19)