

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana P. Nikolić

**Funkcionalna karakterizacija gena *DSS1(I)* i
DSS1(V) u odgovoru *Arabidopsis thaliana* na
oksidativni stres**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivana P. Nikolić

**Functional characterization of *DSS1(I)* and
DSS1(V) in response to oxidative stress in
*Arabidopsis thaliana***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

MENTORI:

dr Gordana Timotijević, viši naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Svetlana Radović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Aneta Sabovljević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Jelena Samardžić, viši naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Mira Milisavljević, viši naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom dr Jelene Samardžić. Jedan deo eksperimenata je urađen u laboratoriji Huswell, Biološkog departmana na Vašington Univerzitetu u Sent Luisu, Misuri, SAD, pod rukovodstvom dr Elizabeth Haswell.

Koristim ovu priliku da se zahvalim:

Mojoj mentorki, dr Gordani Timotijević, na neizmernoj posvećenosti, prenošenju znanja, timskom radu, strpljenju i ogromnoj podršci u svim fazama izrade i uobličavanja ove doktorske teze. Hvala na svim korisnim profesionalnim i prijateljskim savetima, još od perioda izrade master rada.

Dr Jeleni Samardžić, prvenstveno hvala na ukazanoj prilici da postanem deo ove laboratorije. Hvala na svim inspirativnim diskusijama, korisnim savetima, eksperimentalnom radu, kao i na komentarima koji su doprineli poboljšanju ove doktorske disertacije.

Dr Miri Milisavljević, takođe hvala na svim važnim sugestijama, aganžovanju tokom izrade doktorske teze, rešavanje teorijskih i praktičnih problema, kao i doprinosu u uobličavanju ove doktorske teze.

Profesorki dr Svetlani Radović, zahvaljući kojoj sam inicijalno dobila priliku da započnem sa eksperimentalnim radom u Laboratoriji 08. Hvala na korisnim savetima i sugestijama koji su doprineli ovoj disertaciji.

Dr Aneti Sabovljević se zahvaljujem što je pristala da, kao član komisije, učestvuje u kritičkoj oceni ovog rada.

Hvala dr Ivanu Radinu na saradnji, ukazanom poverenju i uloženom vremenu tokom mog jednomesečnog usavršavanja u laboratoriji Huswell u Sent Luisu, SAD.

Hvala celom timu Lab08, bivšim i sadašnjim članovima, sa kojima je uvek prijatno provoditi vreme, hvala što su spremni da u svakom trenutku pomognu i razmene iskustava. Omladini Lab08, hvala na pozitivnoj atmosferi i lepom druženju, a posebno koleginicama Sof, Jelenici i Marijici što su me bodrile od mojih prvih ekperimentalnih koraka. Veliko hvala dugujem dr Vesni Maksimović, prethodnom rukovodiocu naše laboratorije!

Hvala svim kolegama sa Instituta na druženju, savetima i iskustvu koje su mi preneli.

Hvala svim mojim prijateljima koji su me svih ovih godina pažljivo slušali i bili puni razumevanja. Mico, Tamy, Cumbi, Emi, Nato, Luka, obe Kaće, hvala što ste uvek tu za mene!

Hvala i baba Olgi, Slađani, Srđanu i Jani na razumevanju i podršci!

Mojoj porodici hvala na ljubavi, strpljenju, poverenju, pomoći, velikoj podršci koju mi pružaju i bez kojih ne bilo ovog rada. Hvala Tata, Mama, Marko i Maka što ste tu za mene i što verujete u mene!

NAJVEĆU ZAHVALNOST DUGUJEM MOM NAJDRAŽEM ĐOLETU, NA VELIKOJ LJUBAVI, RAZUMEVANJU I BODRENJU, POGOTOVO POSLEDNJIH PAR MESECI!!! Ne postoje te reči koje bi opisale koliko je bilo značajno što si uz mene!

...I svima onima koji nisu ovde, a u našim srcima su!

Funkcionalna karakterizacija gena *DSS1(I)* i *DSS1(V)* u odgovoru *Arabidopsis thaliana* na oksidativni stres

Sažetak

DSS1 je mali, visoko konzervisan protein i pripada porodici prirodno neuređenih proteina. Novija istraživanja su otkrila ulogu DSS1 u procesu DSSilacije, koja podrazumeva specifično označavanje oksidovanih proteina za uklanjanje putem proteazomnog sistema. Genom *Arabidopsis thaliana* sadrži dva visoko homologna gena *DSS1(I)* i *DSS1(V)*. Najbolje proučena uloga DSS1 u biljnom svetu je u održavanju integriteta DNK kroz homolognu rekombinaciju (HR). Cilj ovog rada je bio da se identifikuju funkcionalne različitosti između proteina DSS1 sa fokusom na njihovu potencijalnu ulogu u oksidativnom stresu. Istraživanje je zasnovano na ispitivanju različitih *dss1* mutantnih linija u model sistemu *A. thaliana*, kroz uporednu analizu sa biljkama divljeg tipa, u normalnim fiziološkim uslovima i uslovima oksidativnog stresa. Pokazano je da *t-dss1(V)* T-DNK insercionim mutanati imaju brže klijanje, dok u kasnijim fazama zaostaju u razviću. Dodatno, uspostavljene su pojedinačne linije mutanata *dss1(I).19* i *dss1(V).20* sa velikim indelima pomoću precizne tehnologije CRISPR/Cas9. Kod ovih mutanata su uočene razlike u dužini korena, stabla i površini rozete. Utvrđeno je da su mutanati *t-dss1(V)* (*knockdown*) i *dss1(V).20* (*knockout*) visoko osetljivi na oksidativni stres. Takođe, nemogućnost generisanja *dss1* duplih mutanata ukazuje na njihovu esencijalnu ulogu u biološkim procesima. Pored toga, pokazano je da samo overekspresija *AtDSS1(I)* kroz test funkcionalne komplementacije dovodi do povećanja rezistencije $\Delta dss1$ mutanta *Ustilago maydis* na ispitivane genotoksične agense, što ukazuje na evolutivnu očuvanost njegove uloge u popravci DNK putem HR. U skladu sa navedenim, postoji funkcionalna razlika između biljnih gena *DSS1* i može se smatrati da je protein DSS1(V) ključna komponenta u biljnom odgovoru na oksidativni stres.

Ključne reči: DSS1(I), DSS1(V), oksidativni stres, *Arabidopsis thaliana*, proteinska homeostaza, CRISPR/Cas9 tehnologija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija eukariota

Functional characterization of *DSS1(I)* and *DSS1(V)* in response to oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*

Abstract

DSS1 is a small, highly conserved protein and a member of the intrinsically disordered protein family. Recent studies revealed the role of DSS1 in a process called DSSylation, which represents the specific marking of oxidatively damaged proteins for removal by the proteasome system. The *Arabidopsis* genome contains two highly homologous genes *DSS1(I)* and *DSS1(V)* and role in maintaining DNA integrity through homologous recombination is the only well-studied function in plants. The aim of this work was to identify functional differences between DSS1 proteins by focusing on their potential roles in oxidative stress and considering that plants are sessile organisms exposed to harmful environmental influences. This study is based on examining various *dss1* mutant lines in the model system *A. thaliana* through comparative analysis with wild-type plants, under normal physiological conditions and oxidative stress. It was shown that *t-dss1(V)* T-DNA insertion mutants have faster germination, while having developmental delay in further stages. Additionally, single *dss1(I).19* and *dss1(V).20* mutant lines with large indels were generated using precision CRISPR/Cas9 technology. The characterization of these mutant lines revealed differences in root and stem lengths, and rosette area size. *t-dss1(V)* (*knockdown*) and *dss1(V).20* (*knockout*) mutants showed an increased sensitivity to oxidative stress. In this work, the *dss1* double mutant was not obtained. Also, only overexpressing *AtDSS1(I)* through functional complementation test increases resistance of the Δ *dss1* mutant of *U. maydis* to the exposed genotoxic agents. This indicates its conserved role in DNA repair via HR. Our study showed functional differences between plants *DSS1* genes and a potentially important component DSS1(V) in plant oxidative stress response.

Keywords: DSS1(I), DSS1(V), oxidative stress, *Arabidopsis thaliana*, protein homeostasis, CRISPR/Cas9 technology

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology of eukaryotes

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Oksidativni stres kod biljaka	1
1.1.1. Oksidativni stres izazvan metil-viologenom	3
1.1.2. Oksidativni stres izazvan UV radijacijom	3
1.2. Protein DSS1	4
1.2.1. Uloga DSS1 u homolognoj rekombinaciji.....	6
1.2.2. Interakcija proteina DSS1 i proteina sa PCI domenom	6
1.2.3. Proces DSSilacije oksidovanih proteina	7
1.2.4. Protein Dss1 u gljivi <i>Ustilago maydis</i>	8
1.2.5. Protein DSS1 u biljci <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
1.3. Primena genetičkih manipulacija na biljnom model sistemu <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
1.3.1. Transformacija <i>A. thaliana</i> posredstvom <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
1.3.2. T-DNK inserciona mutageneza	11
1.3.3. CRISPR/Cas9 posredovana mutageneza	12
2. CILJEVI	14
3. MATERIJAL I METODE	15
3.1. Upotreba bioinformatičkih alata	15
3.1.1. Web alati za predviđanje filogenetskog stabla i kompjuterska analiza sekvenci	15
3.1.2. Bioinformatičke metode za predviđanje trodimenzionalne strukture i protein-protein interakcija	15
3.2. Biljni materijal, uslovi gajenja i tretmani biljaka	15
3.2.1. Semena i njihova površinska sterilizacija.....	15
3.2.2. Uslovi gajenja u hidroponičnoj kulturi	16
3.2.3. Tretmani biljaka vodonik-peroksidom i metil-viologenom.....	17
3.2.4. Uslovi gajenja na čvrstim hranljivim podlogama	18
3.2.5. Uslovi gajenja biljaka u zemlji	18
3.2.6. Fenotipska analiza biljaka upotrebom <i>ImageJ</i> programa	18
3.3. Procedure za rad sa bakterijama	19
3.3.1. Bakterijski sojevi	19
3.3.2. Vektori	19
3.3.3. Hranljivi medijumi za uzgajanje bakterija.....	22
3.3.4. Gajenje i održavanje bakterija	23
3.3.5. Transformacija DH5 α ćelija toplotnim šokom	23
3.3.6. Transformacija One Shot® ccdB Survival™ 2 T1R ćelija toplotnim šokom	23
3.3.7. Transformacija MegaX DH10B T1R elektrokompetentnih ćelija.....	23
3.3.8. Transformacija <i>Agrobacterium tumefaciens</i> metodom elektroporacije	23

3.3.9. Transformacija <i>Agrobacterium tumefaciens</i> zaleđivanjem i odleđivanjem	24
3.4. Procedure za rad sa <i>Ustilago maydis</i>	24
3.4.1. Sojevi <i>U. maydis</i>	24
3.4.2. Vektori	24
3.4.3. Hranljivi medijumi za gajenje <i>U. maydis</i>	25
3.4.4. Gajenje i održavanje <i>U. maydis</i>	25
3.4.5. Pravljenje protoplasta i transformacija <i>U. maydis</i>	25
3.4.6. Tretman ćelija <i>U. maydis</i>	26
3.5. Test funkcionalne komplementacije <i>U. maydis</i> $\Delta dss1$ mutanata <i>AtDSS1</i> homologima <i>A. thaliana</i> i tretman UV radijacijom	26
3.5.1. Kloniranje transkripata <i>AtDSS1</i> u parentalni vektor pCRII	26
3.5.2. Subkloniranje sekvenci <i>AtDSS1</i> u vektor pCM1027	26
3.5.3. Subkloniranje sekvenci <i>AtDSS1</i> u ekspresioni vektor pCM955	27
3.6. Transformacija biljaka metodom - Floral dip	27
3.7. Prajmeri	28
3.8. Procedure generisanja linija mutanata <i>A. thaliana</i>	32
3.8.1. Generisanje mutanata tehnologijom CRISPR/Cas9	32
3.8.2. Generisanje duplih <i>dss1(I)/dss1(V)</i> CRISPR/Cas9 mutanata	34
3.8.3. Generisanje linija mutanata sa overekspimiranim proteinom	34
3.9. Procedure za rad sa DNK	36
3.9.1. Izolacija genomske DNK iz biljnog materijala	36
3.9.2. Izolacija plazmidne DNK iz bakterijskih sojeva	37
3.9.3. Reakcija lančanog umnožavanja fragmenata DNK	37
3.9.4. Reakcija umnožavanja fragmenata DNK sa visokom preciznošću	38
3.9.5. Analiza krive topljenja DNK visoke rezolucije (HRM)	39
3.9.6. Reakcija umnožavanja fragmenata DNK direktno iz bakterijskih kolonija	39
3.9.7. Elektroforeza DNK na gelu od agaroze	40
3.9.8. Prečišćavanje fragmenata DNK sa gela od agaroze	40
3.9.9. Digestija DNK restrikcionim enzimima	40
3.9.10. Ligacija DNK sa plazmidnim vektorima	40
3.9.11. Sekvenciranje DNK	40
3.10. Osnovne procedure rada sa RNK	40
3.10.1. Ekstrakcija ukupne RNK iz biljnog materijala	40
3.10.2. Izolacija RNK iz dormantnih i imbibovanih semena	40
3.10.3. Tretman dezoksiribonukleazom (DNazom)	41
3.10.4. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)	41
3.10.5. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (<i>Real time PCR</i> - qPCR)	41

3.10.6. Sekvenciranje i analiza transkriptoma	42
3.11. Osnovne procedure rada sa proteinima	42
3.11.1. Ekstrakcija ukupnih proteina	42
3.11.2. Vertikalna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu pod denaturišućim uslovima (SDS-PAGE).....	42
3.11.3. Poluvlažni prenos proteina sa gela na PVDF membranu	43
3.11.4. Imunoblot analiza	44
3.11.5. Oksiblot analiza	44
3.12. Procedura bojenja pomoću DAB za detekciju vodonik-peroksida u biljnom tkivu	45
3.13. Procedura za određivanje nivoa lipidne peroksidacije.....	45
3.14. Statistička obrada podataka	45
4. REZULTATI	46
4.1. Filogenetska analiza proteina DSS1 u biljnom svetu	46
4.2. In silico komparativna analiza proteina DSS1(I) i DSS1(V) i predikcija njihovih specifičnih interakcije sa drugim proteinima	47
4.3. Ekspresija gena DSS1 u ranim fazama razvića <i>A. thaliana</i>	49
4.4. Ekspresija gena i proteina DSS1 u oksidativnom stresu indukovanom vodonik-peroksidom i metil-viologenom u <i>A. thaliana</i>	49
4.5. Test funkcionalne komplementacije $\Delta dss1$ mutanta <i>U. maydis</i> heterolognom ekspresijom DSS1 varijanti <i>A. thaliana</i>	52
4.6. Analiza T-DNK insercionih <i>dss1</i> mutanata <i>A. thaliana</i>	54
4.6.1. Genotipizacija <i>t-dss1(V)</i> mutanata, analiza profila ekspresije transkripata i proteina za gen <i>DSS1(V)</i>	54
4.6.2. Fenotipska analiza <i>knockdown t-dss1(V)</i> linije mutanata	56
4.6.3. Analiza osetljivosti <i>t-dss1(V)</i> linija mutanata na oksidativni stres	58
4.6.4. Skrining <i>dss1(I)</i> T-DNK insercionih mutantima	60
4.7. Generisanje i analiza CRISPR/Cas9 mutanata za homologne gene DSS1 <i>A.thaliana</i>	62
4.7.1. Mutageneza dva visoko homologna gena <i>DSS1</i> CRISPR/Cas9 tehnologijom.....	62
4.7.2. Fenotipska karakterizacija CRISPR/Cas9 linija <i>dss1(I).19</i> i <i>dss1(V).20</i> <i>A. thaliana</i>	71
4.7.3. Osetljivost biljaka <i>dss1(I).19</i> i <i>dss1(V).20</i> na oksidativni stres indukovani vodonik-peroksidom	73
4.7.4. Analiza transkriptoma mutanata <i>dss1(I).19</i> i <i>dss1(V).20</i> nakon tretmana vodonik-peroksidom	75
4.7.5. Utvrđivanje osetljivosti biljaka <i>dss1(I).19</i> i <i>dss1(V).20</i> na oksidativni stres indukovani ultraljubičastim zračenjem.....	85
4.8. Generisanje i analiza linija <i>A. thaliana</i> sa overekspimiranim homolognim genima DSS1	87
4.8.1. Konstruisanje linija <i>A. thaliana</i> sa overekspimiranim proteinima DSS1(I), odnosno DSS1(V)	87

4.8.2. Fenotipska karakterizacija linije sa overekspimiranim proteinom DSS1(V).....	88
4.8.3. Analiza osetljivosti biljaka OE DSS1(V) na oksidativni stres indukovani vodonik-peroksidom	90
5. DISKUSIJA	92
<i>5.1. Evoluciona očuvanost primarne strukture dva biljna proteina DSS1 i njihove protein-protein interakcije.....</i>	<i>92</i>
<i>5.2. Ekspresioni profil oba gena DSS1 u semenu i mladim biljkama A. thaliana.....</i>	<i>93</i>
<i>5.3. Ekspresioni profili oba gena DSS1 u oksidativnom stresu indukovanim vodonik-peroksidom i metil-viologenom u A. thaliana</i>	<i>94</i>
<i>5.4. Ekspresija DSS1 varijanti A. thaliana u Δdss1 mutantu U. maydis.....</i>	<i>95</i>
<i>5.5. Uticaj tretmana vodonik-peroksidom i metil-viologenom na T-DNK insercionu mutant t-dss1(V).....</i>	<i>95</i>
<i>5.6. Fenotipska karakterizacija CRISPR/Cas9 generisanih mutanata oba gena DSS1 i njihova osetljivost na oksidativni stres</i>	<i>96</i>
<i>5.7. Fenotipska karakterizacija linije A. thaliana sa overekspimiranim DSS1(V) i analiza njene osetljivosti na oksidativni stres</i>	<i>101</i>
6. ZAKLJUČCI	104
7. LITERATURA	106

Biografija autora

Izjava o autorstvu

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije

Izjava o korišćenju

1. UVOD

1.1. Oksidativni stres kod biljaka

Svi živi organizmi su u kraćim ili dužim periodima izloženi ekstremnim i/ili nepovoljnim uslovima životne sredine. Za razliku od životinja, biljke su sesilni organizmi koji nemaju mogućnost da kretanjem izbegnu stresne faktore. Uprkos tome, biljke uspešno preživljavaju, jer su razvile mnogobrojne mehanizme prilagođavanja, odbrane i tolerancije na negativne faktore sredine (Singh et al., 2019). Oksidativni stres predstavlja promenu homeostaze u ćeliji i čitavom organizmu, koja se dešava kao posledica abiotičkog i/ili biotičkog stresa, što rezultira prekomernim stvaranjem i nakupljanjem reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Biotički stres je izazvan nepovoljnim uticajem drugih živih bića na biljku, dok abiotički stres može biti indukovan faktorima sredine kao što su: svetlost (visokog ili niskog intenziteta), teški metali, hipoksija, vodni disbalans (nedostatak ili višak vode), temperaturni stres (Apel & Hirt, 2004).

Stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta se dešava kao posledica fotosintetičkog transporta elektrona, i predstavlja posledicu procesa ćelijske respiracije i fotosinteze koji se odvijaju u mitohondrijama i hloroplastima. Ovi procesi su rezultat evolucije aerobnog metabolizma kod biljaka (Apel & Hirt, 2004). ROS forme predstavljaju jedinjenja, atome, molekule ili jonske grupe atoma i molekula, koji sadrže jedan ili više „aktiviranih“ oblika molekulskog kiseonika, ali ne moraju uvek biti u formi slobodnih radikala. Slobodni radikali su jedinjenja koja su nezavisna i imaju nespareni elektron (Demidchik, 2015). Neki od slobodnih radikala su superoksid anjon-radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoksil-radikal (HO_2^{\bullet}), hidroksil-radikal ($^{\bullet}OH$), lipidni peroksil-radikal (LOO^{\bullet}), alkoksil-radikal (RO^{\bullet}). Vodonič-peroksid (H_2O_2) i singletni kisonik (1O_2) su predstavnici neradikalnih ROS molekula (Hasanuzzaman et al., 2020). Prisustvo reaktivnih kiseoničnih vrsta u ćeliji je regulisano mehanizmima enzimskog i ne-enzimskog sistema antioksidativne zaštite. Superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), askorbat-peroksidaza (APX), glutation-reduktaza (GR), glutation-peroksidaza (GPX), su samo neki od predstavnika enzimskog odgovora na oksidativni stres (Hasanuzzaman et al., 2020). Najvažniji enzimski antioksidanti pokazuju afinitet prema specifičnim ROS molekulima i prikazani su u Tabeli 1 (Das & Roychoudhury, 2014). Komponente ne-enzimskog mehanizma deluju nespecifično na ROS, a pripadaju im: askorbinska kiselina (AsA), glutation (GSH), fenoli, fenolne kiseline, alkaloidi, flavonoidi, karotenoidi, prolin i tokoferol (Das & Roychoudhury, 2014).

Tabela 1. Lista enzima antioksidativnog sistema sa funkcijama i ćelijskom lokalizacijom. AsA- askorbinska kiselina; DHA - dehidroaskorbinska kiselina; NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat ; NADP - Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; GSSG – oksidovani glutation (disulfid). Preuzeto i modifikovano iz publikacije Das & Roychoudhury, 2014.

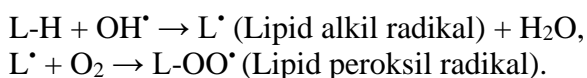
Enzimski antioksidanti	Reakcija katalize	Ćeliska lokalizacija
SOD	$O_2^{\bullet-} + 2 O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$	Peroksizomi, mitohondrije, citosol, hloroplasti
CAT	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$	Peroksizomi, mitohondrije
APX	$H_2O_2 + AsA \rightarrow 2H_2O + DHA$	Peroksizomi, mitohondrije, citosol, hloroplasti
GR	$GSSG + NADPH \rightarrow 2GSH + NADP^+$	Mitohondrije, citosol, hloroplasti
GPX	$H_2O_2 + DHA \rightarrow 2H_2O + GSSG$	Mitohondrije, citosol, hloroplasti, endoplasmatični retikulum

U uslovima kada se organizam nalazi u homeostazi, kada je niska ili umerena koncentracija ROS, ovi molekuli predstavljaju signal za regulaciju metabolizma, pokreću ekspresiju gena koji su odgovorni za antioksidativnu zaštitu i utiču na aklimatizaciju na novonastale sredinske faktore (Singh et al., 2019). Takođe, ROS forme kao sekundarni glasnici utiču na fundamentalne biološke procese, kao što su diferencijacija, proliferacija, polarnost, odgovor na gravitropizam i ćelijsku smrt (Demidchik, 2015).

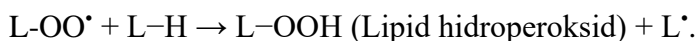
Nepovoljni uslovi životne sredine utiču na povećanu produkciju reaktivnih kiseoničnih formi u mnogim ćelijskim organelama, pa je za održavanje ćelijske homeostaze neophodno da postoji ravnoteža u produkciji i odstranjivanju ROS molekula. Oksidativni stres je odgovor na stresne faktore sredine koji oštećuje ćelijske komponente izazivajući: lipidnu peroksidaciju, destrukciju nukleinskih kiselina i proteina, kao i narušavanje metabolizma ugljenih hidrata; što može dovesti do disfunkcije i smrti ćelija (Hasanuzzaman et al., 2020).

Oksidacija lipida

Indikator oksidativnog stresa je oksidacija lipida, čiji je drugi termin lipidna peroksidacija. Lipidna peroksidacija je lančana reakcija u kojoj nastaju lipid-radikali i koja dovodi do oštećenja u fosfolipidnom sloju membrana ćelija i organela, narušavajući njihovu ulogu. Sastoji se iz tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Gaschler & Stockwell, 2017). Polinezasićene masne kiseline dugog lanca sa više od jedne dvostuke veze, kao i fosfolipidi, su najpodložnije oksidaciji. Faza inicijacije predstavlja reakciju između ROS formi i metilenske grupe masnih kiselina:



Nastali lipid-peroksil radikali imaju sposobnost da propagiraju lipidinu peroksidaciju izdvajanjem vodonika iz bočnog lanca susedne masne kiseline:



Lančana reakcija peroksidacije se nastavlja u smeru reakcije sa redukovanim metalima (Fe^{2+} i Cu^{+}) gde se formiraju lipid alkoksil radikali. U fazi terminacije dolazi do međusobne reakcije derivata lipid radikala i pri tome nastaju lipid dimeri. Takođe, lipid hidroperoksidi mogu formirati sekundarne reaktivne vrste kao što su lipid alkoksil radikali, aldehidi, alkeni, lipid epoksid i alkoholi (Das & Roychoudhury, 2014). Malonaldehid je jedan od reaktivnih aldehida, odnosno krajnjih agresivnih produkta lipidne peroksidacije (Gaschler & Stockwell, 2017). Ovo jedinjenje je izuzetno toksično za ćeliju i predstavlja marker oksidativnog stresa, koji se lako detektuje esejem sa tiobarbituratnom kiselinom ili metodom baziranoj na masenoj spektrometriji za identifikaciju pojedinačnih oksidovanih lipida (Hodges et al., 1999; Jorge et al., 2016).

Oksidacija proteina

Proteini su glavne mete oksidativnog stresa kod mnogih bioloških sistema usled njihove opšte zastupljenosti u svim kompartmanima unutar ćelije, kao i van nje (Davies, 2005). Oksidacija proteina dovodi do njihovih konformacionih promena tj. strukturnog odmotavanja i gubitka funkcije, što kao posledicu ima remećenje specifičnih metaboličkih puteva ili struktura u kojima učestvuju (Demidchik, 2015). Akumulacija oksidovanih proteina dovodi do stvaranja toksičnih proteinskih agregata koji oštećuju ćelije, a mogu dovesti i do programirane ćelijske smrti (Avery, 2011). Utvrđeno je da su određeni aminokiselinski ostaci izuzetno osetljivi na oksidativne modifikacije, naročito cistein, treonin, triptofan i histidin (Dröge, 2002). Direktno modifikacije dovode do nitrozilacije, karboksilacije, formiranje disulfidnih mostova i glutationilacije (Das & Roychoudhury, 2014). Neradikaliski prooksidativni molekuli izazivaju manja oštećenja u proteinima, dok je oksidativna

modifikacija proteina slobodnim radikalima brza i rezultira većim oštećenjima proteinske strukture (Davies, 2005). Modifikacije mogu biti ireverzibilne i njihov rezultat je nefunkcionalnost proteina, ili reverzibilne i njima podležu enzimi antioksidativne zaštite koji imaju ulogu u redoks regulaciji (Anjum et al., 2015). Oksidovani proteini su targeti za proteolitičku digestiju od strane ubikvitin-proteaznog sistema za degradaciju (Das & Roychoudhury, 2014).

Uloga vodonik-peroksida u oksidativnom stresu

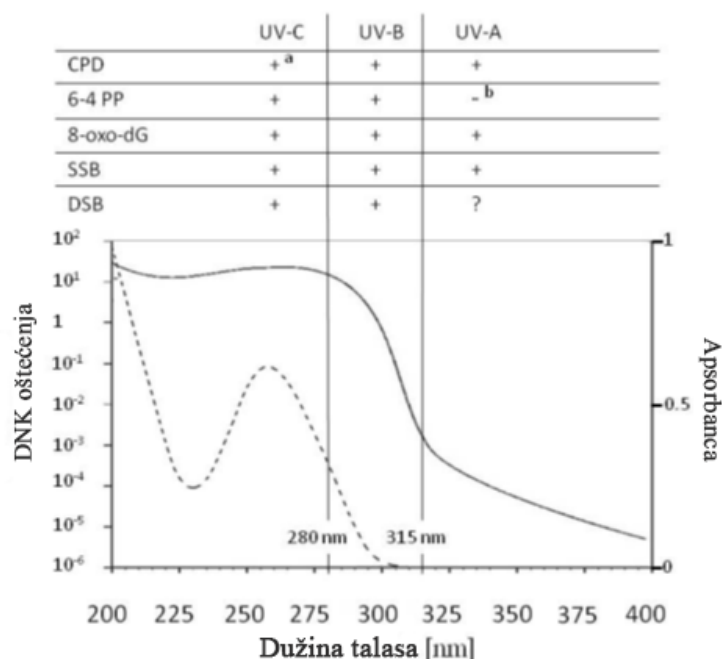
Vodonik-peroksid (H_2O_2) je najstabilnija ROS forma, koja se neprekidno stvara kao bioproduct aerobnog metabolizma. Kod biljaka, glavni izvor H_2O_2 u ćeliji su organele sa visokim nivoom aktivnosti oksidativnog metabolizma kao što su peroksizomi, hloroplasti, mitohodrije i endoplazmatski retikulum (Demidchik, 2015). Peroksizomi i hloroplasti akumuliraju 30-100 puta više H_2O_2 u poređenju sa mitohondrijama (Saxena et al., 2016). H_2O_2 nastaje tokom redukcije molekularnog kiseonika (O_2) u superoksid anjon ($O_2^{\cdot-}$) (Sutherland, 1991). Ovaj molekul ima kratak životni vek u tkivu (>1 s) zbog brzog delovanja antioksidativnih komponenti, kao što su katalaza i peroksidaza. Takođe, deo H_2O_2 brzo difunduje van ćelije preko akvaporina u ćelijskoj membrani. Za razliku od citosola koji je visoko redukovana sredina, ekstracelularna sredina je kisela i zbog odsustva antioksidativnih enzima, koji regulišu koncentraciju ROS formi, dolazi do akumulacije H_2O_2 u apoplastu i indukcije oksidativnog stresa. H_2O_2 , koji je sintetisan u apoplastu, je produkt aktivnosti NADPH oksidaza i ekstracelularnih peroksidaza klase III u prisustvu $O_2^{\cdot-}/HO^{\cdot-}$. U uslovima oksidativnog stresa H_2O_2 indukuje proces programirane ćelijske smrti (Saxena et al., 2016). Neophodno je napomenuti da je uloga H_2O_2 u ćeliji dualne prirode. Pored uloge u oksidativnom metabolizmu i oksidativnom stresu, uključen je u signalne puteve vezane za razviće biljaka, kao što su razviće korenovih dlaka, diferencijacija ksilema, izgradnja ćelijskog zida i kontrola izgradnje ćelijskog zida stoma (Saxena et al., 2016).

1.1.1. Oksidativni stres izazvan metil-viologenom

Metil-viologen (MV; N,N'-dimetil-4,4'-bipiridinium dihlorid) je glavni sastojak herbicida parakvata. MV deluje na pojačanu produkciju ROS formi u fotosistemu I. Kao akceptor elektrona, MV blokira proces fotosinteze tako što sa kraja elektron transportog lanca u fotosistemu I preusmerava elektron i redukuje O_2 do $O_2^{\cdot-}$, čime inicira genuz unutarćelijskih toksičnih kiseoničnih formi. Rezultat delovanja MV se ogleda u nedostataku NADPH i inhibiciji fiksacije CO_2 , što onemogućava normalno funkcionisanje hloroplasta usled razaranja tilakodinih membrana (Váradi et al., 2000). Takođe, MV izaziva produkciju ROS u endoplazmatskom retikulumu i mitohondrijama (Dodge, 1993).

1.1.2. Oksidativni stres izazvan UV radijacijom

Vaskularne biljke su tokom evolucije razvile mnoge fiziološke procese koji su zavisni od sunčevog zračenja, kao što su: klijanje, morfogenetske promene, razviće stoma, cirkadijalni ritam, cvetanje i mnoge druge (Nawkar et al., 2013). Sunčevo zračenje čini spektar različitih talasnih dužina elektromagnetnog zračenja, a koje obuhvata i ultraljubičasto zračenje (UV, 200-400 nm), fotosintetsko aktivno zračenje vidljivog dela spektra (PAR, 400-700 nm) i infracrvenu svetlost (IR, 700-780 nm) (Nawkar et al., 2013). UV elektromagnetno zračenje se sastoji od UV-A (talasne dužine 315-400 nm), UV-B (280-315 nm) i UV-C (200- 280 nm) (WHO, 2016). Ozon apsorbuje deo UV-B i kompletno UV-C zračenje, a UV-A zračenje u potpunosti stiže do površine Zemlje. Iako su biljke zavisne od sunčeve svetlosti, jak intenzitet svetlosti ima negativan efekat na biomakromolekule u biljnoj ćeliji. Oštećenja koja nastaju usled prekomernog zračenja su posledica akumulacije ROS formi i oksidativnog stresa (Banaš et al., 2020). Intenzitet UV zračenja u velikoj meri zavisi od atmosfere Zemlje i drugih faktora, kao što su ugao padanja Sunčevih zraka, stanje ozonskog omotača, godišnje doba, deo dana, geografska širina, pokrivenost oblacima itd. (Nawkar et al., 2013).



Slika 1. Fotoprodukti koji nastaju usled delovanja UV-A (315–400 nm), UV-B (280–315 nm) i UV-C (100–280 nm) zračenja na DNK molekul. Kontinuiranom linijom je predstavljen nivo oštećenja DNK; isprekidanom linijom je označen nivo apsorpcije UV. CPD -ciklobutan pirimidin dimeri; 8-oxo-dG - 7,8-dihidro-20-deksiguanozin; SSB – jednolančani prekidi DNK (od eng. *single strand breaks*); DSB – dvolančani prekidi DNK (od eng. *double strand breaks*). Preuzeto i modifikovano iz publikacije Banaš et al., 2020.

Iako ne dolazi do površine Zemlje, pokazano je da UV-C zračenje ima izuzetno štetan efekat na vaskularne biljke na nivou hloroplasta, mitohondrija, membrana, proteina i DNK molekula. Negativan efekat se odražava kroz inhibiciju funkcionisanja mitohondrija i hloroplasta, kao i povećanog formiranja ROS formi. Direktna meta radijacije UV-C su oksidovani plastokinoni u fotosistemu II, gde na talasnoj dužini 250-260 nm dolazi do njihove totalne destrukcije (Urban et al., 2016). Na istoj UV talasnoj dužini, mitohondrije gube transmembranski potencijal i indukuje se produkcija ROS formi, gde je krajnji rezultat programirana ćelijska smrt (Urban et al., 2016). Takođe, pod uticajem intenzivnog UV zračenja nastaju promene na nivou same strukture svih proteina, koje utiču na njihovu funkciju, aktivnost i protein-protein interakcije (Banaš et al., 2020). Slično velikim dozama UV-B i UV-C zračenje, ima mutageno dejstvo formirajući dimere pirimidina - ciklobutan pirimidin dimer (CPD) i pirimidin (6,4) pirimidon dimer (6,4 PP). UV-C uvodi i dvolančane prekide u molekulu DNK, ali češće utiče na formiranje fotoprodukata (Yao et al., 2011). Nivo oštećenja koja nastaju u molekulu DNK pod uticajem različitih tipova UV se mogu videti na Slici 1. Nastale DNK lezije pod uticajem UV-C su 10^6 puta veće u poređenju sa radijacijom UV-A (Banaš et al., 2020). U cilju očuvanja genetičke informacije i stabilnosti genoma, u ćeliji postoje mehanizmi popravke fotoprodukata koji su podeljeni na mehanizme zavisne od svetlosti i one koji to nisu. Fotoliazе su enzimi koji učestvuju u reparacionom sistemu fotoreaktivaciji, odnosno fotoreparaciji, i za čiju aktivaciju je neophodna energija svetlosti. Mehanizmi nezavisni od svetlosti pripadaju tamnoj fazi reparacije i to su nukleotidna ekscizionna reparacija, bazna ekscizionna reparacija i *mismatch* popravka (Gill et al., 2015).

1.2. Protein DSS1

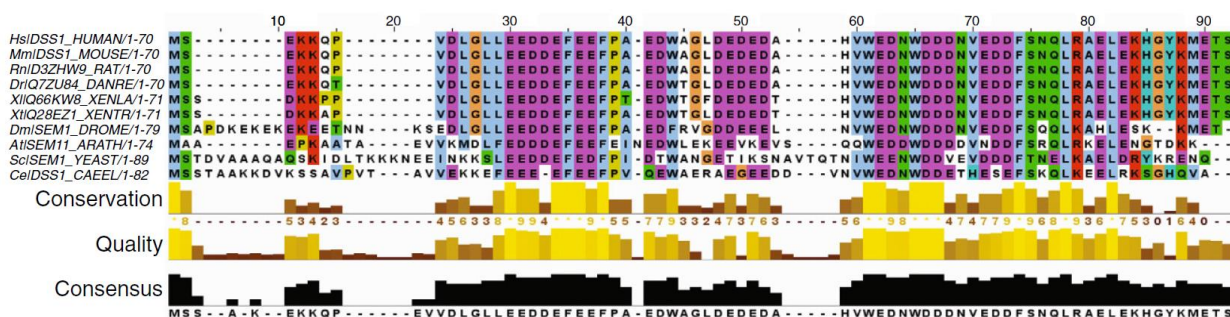
Uz dobro poznate komponente antioksidativnog sistema, primećeno je da su proteini velike porodice prirodno neuređenih proteina (eng. IDP - *an intrinsically disordered protein*) takođe nepohodni za adekvatan odgovor biljaka na stres. IDP su visoko zastupljeni u proteomu eukariota. Biljni IDP imaju ključnu ulogu u biologiji biljaka i uglavnom su spona između brojnih unutarćelijskih regulatornih signala ili signala spoljašnje sredine. Dosadašnja istraživanja su pokazala da ovi proteini

imaju značajnu ulogu u abiotičkom stresu, regulaciji transkripcije, percepciji svetlosti i razviću biljaka (Sun et al., 2013).

Protein DSS1 (od eng. *deletion of split hand/split foot 1*) je mali, kiseo i visoko konzervisan eukariotski protein. DSS1 pripada velikoj familiji prirodno neuređenih proteina, koji u formi slobodnog proteina nema definisanu trodimenzionalnu strukturu. Uprkos izostanku 3D strukture, neuređeni proteini učestvuju u funkcionisanju ćelije i doprinose stabilnosti bioloških kompleksa uglavnom kao regulatorne komponente, što je pokazano i kod proteina DSS1 (Van Der Lee et al., 2014). DSS1 je multifunkcionalan protein koji učestvuje u različitim biološkim procesima, gde stupa u interakciju sa komponentama mnogobrojnih proteinskih kompleksa. Kada se ovaj fleksibilni protein veže za partner-proteine, on biva fiksiran i zadobija konačnu trodimenzionalnu konformaciju.

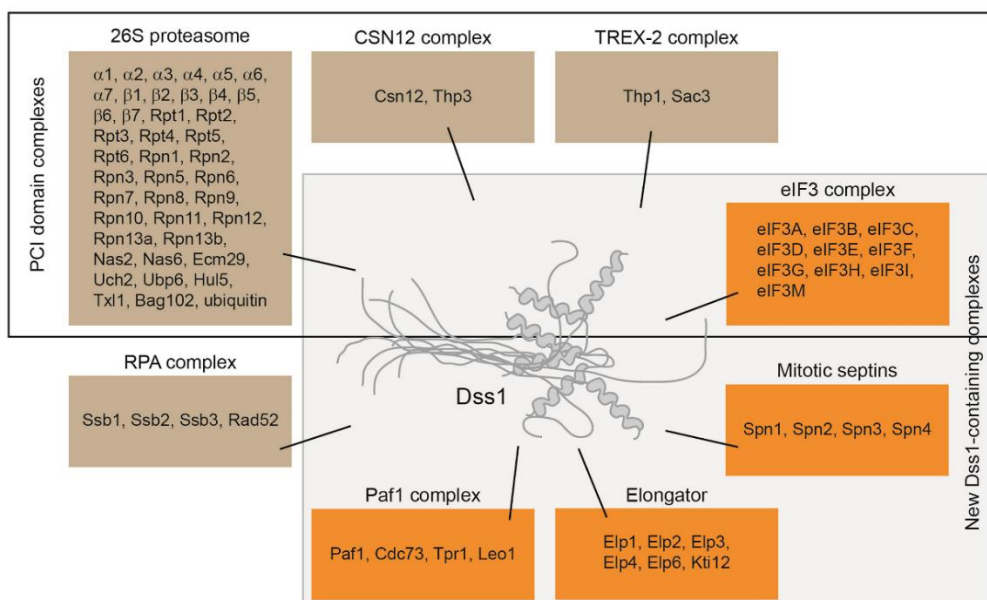
Humani DSS1, ili drugačije SHFM1 (od eng. *split hand/split foot malformation type 1*), je otkriven tokom karakterizacije razvojnog poremećaja ektrodaktilije, odnosno malformacije kod koje dolazi do odsustva ili fuzije pojedinih prstiju šake i stopala (Crackower et al., 1996). Ortolog humanog DSS1, Sem1 (od eng. *suppressor of exocyst mutations 1*), je izolovan iz ćelija *Saccharomyces cerevisiae* kao supresor različitih mutacija u multiproteinskom kompleksu koji je neophodan za egzocitozu (Jäntti et al., 1999; Marston et al., 1999). Ubrzo nakon toga, otkriven je i okarakterisan *dss1* mutant kod *Ustilago maydis*, koji pokazuje izuzetnu osetljivost na zračenje i poremećaj u rekombinaciji (Kojic et al., 2003). Prvi animalni model organizam kod koga je mutiran *dss1* gen i pokazana njegova uloga u oogenezi, embriogenezi i razviću larve je *Caenorhabditis elegans* (Pispa et al., 2008).

Molekulska masa proteina DSS1 je 7 – 9 kDa, a dužina njegovog polipeptidnog lanca varira u rasponu od 70 do 90 aminokiselina u različitim organizmima. Višestrukim poravnanjima aminokiselinske sekvence ortologa DSS1 je pokazan izuzetno visok nivo homologije između gljiva, biljaka, životinja i ljudi (Slika 2). Između miša, pacova i čoveka podudaranje u aminokiselinskoj DSS1 sekvenci je 100% (Yang et al., 2002). Pokazano je da je region dug petnaest aminokiselina proteina DSS1, koji je kompletno konzervisan kod mnogih vrsta, funkcionalno značajan za interakciju sa drugim proteinima (Y. Zhang et al., 2014). Sekundarna struktura DSS1 sadrži jednu tranzijentnu α -zavojniju na C-terminalnom kraju i dva kisela konzervisana regiona (Le et al., 2020; Schenstrøm et al., 2018).



Slika 2. Poravnanje proteinskih sekvenci DSS1 iz različitih vrsta. Kod čoveka - HsDSS1 (Q13437); miša - MmDss1 (Q13437); pacova - RnDss1 (D3ZHW9); zebra ribice - DrDss1 (Q7ZU84); žabe - XlDss1 (Q66KW8) i XtDss1 (Q28EZ1); voćne mušice - DmDss1 (Q9VM46); arabidopsisa - AtDss1 (Q9XIR8); kvasca - ScSem1 (O94742) i valjkastog crva - CeDss1 (Q95Y72). Najviši i svetlo žuti delovi na *conservation* histogramu predstavljaju visoko konzervisane regione aminokiselinske sekvence. Preuzeto iz publikacije Zhang et al., 2014.

Rezultati prethodnih istraživanja ukazuju da DSS1 deluje na nivou protein-protein i protein-DNK interakcija kroz modulaciju proteinskih kompleksa (Kragelund et al., 2016; Le et al., 2020; Schenstrøm et al., 2018). On učestvuje u formiranju kompleksa uključenih u raznovrsne biološke mehanizme kao što su popravka DNK, degradacija proteina, eksport i splajsovanje iRNK, itd. (Slika 3) (Kragelund et al., 2016; Schenstrøm et al., 2018).



Slika 3. Šematski prikaz neuređene 3D strukture slobodnog proteina DSS1 i njegovih partner-proteina.
Preuzeto iz publikacije Schenstrøm et al., 2018.

1.2.1. Uloga DSS1 u homolognoj rekombinaciji

U reparaciji dvolančanih prekida u molekulu DNK, koja je posredovana homolognom rekombinacijom (HR), sisarski DSS1 je partner medijatoru BRCA2 (od eng. *breast cancer type 2 susceptibility*). Protein BRCA2 je takođe evolutivno konzervisan od gljiva do sisara, što ukazuje na univerzalnost ovog tipa reparacije DNK u prirodi. U ovom procesu, DSS1 je neophodan za pravilnu aktivnost proteina BRCA2, tako što blokira njegovu multimerizaciju i stabilizuje BRCA2 monomer na jednolančanoj DNK (Le et al., 2020). Jedna od glavnih uloga BRCA2 je njegovo vezivanje za procesovani dvolančani prekid i postavljanje rekombinaze RAD51 na jednolančanu DNK, čime se omogućava formiranje nukleoproteinskog filameta, tj. polimerizacija RAD51 u filament (Mishra et al., 2022). Naime, DSS1-BRCA2 kompleks uklanja filamente RPA (od eng. *the replication protein A*) sa jednolančane DNK, koja je nastala obradom dvolančanog prekida egzonukleazama, i na njihovo mesto postavlja RAD51. RAD51 je rekombinaza koja omogućava invaziju homolognih partner lanaca DNK (Kristensen et al., 2010; Liu et al., 2010; Mishra et al., 2022; Zhao et al., 2015). Ova strategija popravke oštećenih molekula DNK je jedna od najznačajnijih u očuvanju integriteta genoma (Marston et al. 1999).

1.2.2. Interakcija proteina DSS1 i proteina sa PCI domenom

Na nivou mehanizama post-transkripcione i proteinske regulacije u ćeliji, u *in vivo* i *in vitro* studijama je pokazano da DSS1 ostvaruje veliki broj interakcija sa proteinima koji sadrže PCI domen (Kragelund et al., 2016; Schenstrøm et al., 2018). Termin PCI je proistekao iz naziva tri kompleksa: 26S proteazoma, COP9 signalozoma (CSN) i eIF3 kompleksa (eukariotski translacioni inicijacioni faktor 3) (Hofmann & Bucher, 1998). Subjedinice „kape“ 26S proteazoma i sve ostale subjedinice druga dva kompleksa sadrže PCI domen koji ima ulogu u stabilizaciji protein-protein interakcija. Inače, CSN kompleks je biohemijski i prostorno povezan sa ubikvitin-proteaznim proteolitičkim putem (Kim et al., 2001).

Kompleks eIF3

Eukariotski translacioni inicijacioni faktor 3 je centralna komponenta proteinske mreže faktora za sintezu proteina (Hinnebusch, 2006). Kompleks eIF3 stimuliše regrutovanje metionil-tRNK i iRNK ka 40S ribozomalnoj subjedinici u procesu inicijacije translacije. Na modelu

Schizosaccharomyces pombe je pokazano da Dss1 interaguje sa subjedinicama eIF3a, eIF3c i eIF3m koje poseduju PCI domen. Ove interakcije su očekivane, s obzirom na blisku prostornu organizaciju kompleksa eIF3 i proteazoma, kao i njihovu ulogu u metabolizmu proteina (Kragelund et al., 2016; Pick et al., 2009; Schenstrøm et al., 2018).

Kompleks Csn12 i TREX-2

Kao široko rasprostranjeni učesnik u raznim kompleksima, pretpostavlja se da je Sem1 (Dss1) kvasca deo i dva strukturno povezana dinamična kompleksa sa razdvojenim funkcijama u procesovanju iRNK. Jedan od njih je ternarni kompleks Thp3-Csn12-Sem1 za transkripcionu regulaciju, koji posreduje u splajsovanju pre-iRNK. Protein Thp3 se povezuje sa binarnim kompleksom Csn12-Sem1 gde je Sem1 čvrsto vezan samo za subjedinicu Csn12 (od eng. *Cop9 signalosome complex subunit 12*) (Faza et al., 2009; Kragelund et al., 2016; Pick et al., 2009; Schenstrøm et al., 2018). Drugi veći kompleks ima ulogu u eksportovanju iRNK, odnosno kompleks NCP (nuklearne pore) - TREX-2 (asocirane sa kompleksom transkripcionog-eksporta-2). U navedenom kompleksu, Sem1 ima funkciju u stabilizaciji veze između Sac3-Thp1 čime doprinosi sklapanju TREX-2 kompleksa. U *S. cerevisiae* je detektovano da se Sem1 primarno vezuje za subjedinicu Thp1, što je pokazano i u humanim ćelijama između humanog homologa Sem1 (DSS1) i Thp1 (PCID2, od eng. *PCI domain-containing protein 2*) (Faza et al., 2009; Kragelund et al., 2016; Schenstrøm et al., 2018).

26S proteazom

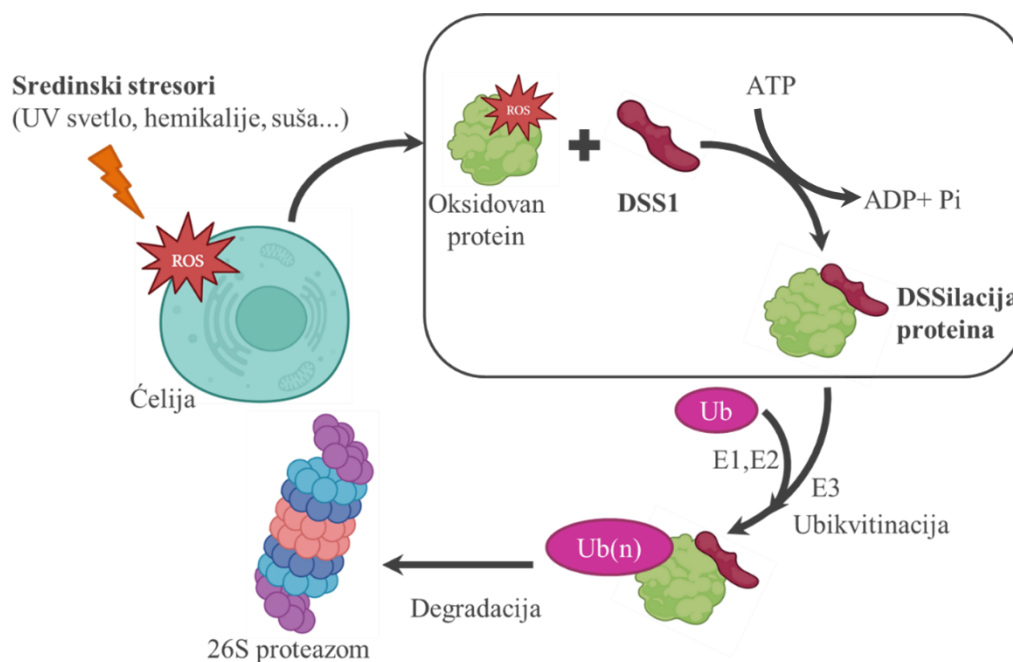
Glavno mesto degradacije unutraćelijskih proteina je 26S proteazom, kojeg grade 20S proteolitičko jezgro sa ATP-aznom funkcijom i dve 19S „kape“ koje predstavljaju regulatorne partikule pozicionirane na krajevima jezgra (Voges et al., 1999). Supstrat proteazoma čine proteini koji su ciljano konjugovani sa ubikvitinskim lancem, a prepoznati su od strane Rpn10 i Rpn13 (od eng. *regulatory particle non-ATPase 10/13*), regulatornih subjedinica 19S „kape“. Takođe je pokazano je da i Dss1 ima funkciju ubikvitin vezujućeg receptora (Paraskevopoulos et al., 2014). Ubikvitin vezujuća mesta u proteinu DSS1 su karakteristična po nizu kiselih i hidrofobnih ostataka. Između ostalog, detektovano je da mutacije u genu DSS1 koje obuhvataju lizine (K48 i K63) u okviru ubikvitin-vezujućih mesta izazivaju nagomilavanje ubikvitinovanih proteina i posledično dovode do velikih ćelijskih oštećenja (Paraskevopoulos et al., 2014).

Kao najmanja regulatorna i strukturna subjedinica 26S proteazoma, Dss1 pored ubikvitin-vezujuće aktivnosti učestvuje i u pravilnom sastavljanju proteazoma. Dss1 predstavlja regulatornu subjedinicu 19S „kape“ proteazoma i doprinosi njegovoj stabilnosti tako što uspešno regrutuje subjedinice Rpn3 i Rpn7, koje inače imaju nizak afinitet jedna prema drugoj (Kragelund et al., 2016; Reed et al., 2022; Tomko & Hochstrasser, 2014). Iako je potpuno sklapanje proteazoma moguće i u odsustvu Dss1, proteolitička aktivnost ovakvog proteazoma je nepotpuna. Dss1 je tokom proteolize neophodan za finu modulaciju Rpn7 u procesu efikasnog ATP-zavisnog odmotavanja supstrata (Reed et al., 2022).

1.2.3. Proces DSSilacije oksidovanih proteina

Pored spomenutih dobro proučenih uloga proteina DSS1 u izgradnji proteazoma i prepoznavanju poliubikvitinskog lanca, u *in vitro* eksperimentima na humanim ćelijskim linijama je otkrivena i njegova funkcija u specifičnom prepoznavanju oksidovanih proteina. Tokom oksidacionog stresa dolazi do visoke produkcije i nagomilavanja reaktivnih kiseoničnih vrsta što dovodi do oksidativnog oštećenja svih biomolekula, pa i proteina. U oksidativnom stresu, DSS1 ima ulogu u obeležavanju oksidovanih proteina i iniciranju njihove degradacije kroz ubikvitin-proteazni sistem. Ovakav tip post-translacione modifikacije proteina, posredovan proteinom DSS1, koji vodi ka prepoznavanju, obeležavanju i uklanjanju oksidovanih proteina je nazvan DSSilacija (Y. Zhang et

al., 2014). Pokazano je da je ovaj mehanizam ATP-zavisan i da se DSS1 kovalentno vezuje za proteine oštećene u oksidativnom stresu. Nastali markirani produkti (DSS1-protein) bivaju dalje prepoznati i ubikvitinovani od strane ubikvitin-ligaze E3, a zatim degradovani u 26S proteazomu. Za sposobnost vezivanja DSS1 za ciljne proteine su ključne 4 aromatične aminokiseline na konzervisanim pozicijama (triptofan- W27, W39, W43 i fenilalanin- F52). Mutacije ili zamene ovih aminokiselina dovode do gubljenja sposobnosti DSS1 da se veže za oštećene proteine. S obzirom na tu činjenicu, postoji mogućnost da je obeležavanje DSS1 proteinom u uslovima oksidativnog stresa evolutivno konzervisan mehanizam kod eukariota. Biološki smisao postojanja DSSilacije je još uvek nedovoljno ispitan, ali se pretpostavlja da predstavlja dodatni mehanizam u proteastazi i prevenciji od citotoksičnog delovanja proteinskih agregata (Y. Zhang et al., 2014).



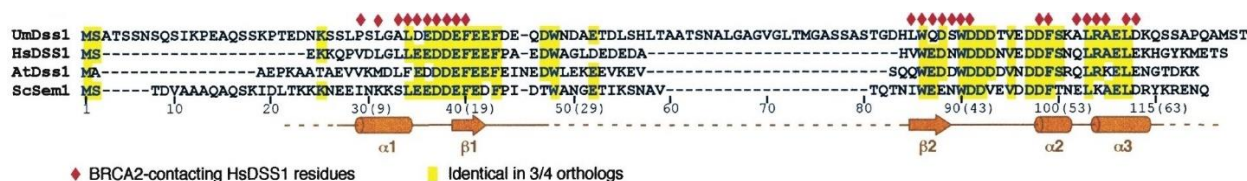
Slika 4. Predloženi mehanizam Dssilacije. Modifikovan prikaz mehanizma predloženog u publikaciji Zhang et al., 2014., kreiran pomoću programa *BioRender* (<https://www.biorender.com/>).

1.2.4. Protein Dss1 u gljivi *Ustilago maydis*

Ustilago maydis, mehurasta gar, pripadnik razreda *Basidiomycota*, je patogena gljiva koja inficira kukuruz (*Zea mays*) izazivajući velika oštećenja klipa, a samim tim smanjenje prinosa (Christensen, 1963; Mendgen & Hahn, 2002). Posедуje genom koji je u poređenju sa drugim gljivama koje su patogeni biljaka manji, veličine 20,5 Mbp, organizovan u 23 hromozoma (Kämper et al., 2006; Meksem et al., 2005). *U. maydis* je jednocelijski eukariotski model sistem na kom je britanski naučnik Robin Holidej postulirao mehanizam homologne rekombinacije (Holliday, 1974). Danas predstavlja pogodan model sistem za molekularno-genetičke i morfološke analize (Kämper et al., 2006).

U. maydis je dobar model organizam u istraživanjima koja se bave odgovorom i adaptacijama na mnogobrojne nepovoljne abiotičke faktore u toku saprofitske i biotrofne faze razvića. Tokom životnog ciklusa, *U. maydis* je izložen različitim spoljašnjim uticajima kao što su smanjena dostupnost hrane, vode, kiseonika i variranje temperature. Infekcija *U. maydis* inicira razviće tumorskog tkiva i produkciju diploidnih spora, koje mejozom daju saprofitske haplodine ćelije. *U. maydis* se, za potrebe genetičkih istraživanja u laboratoriji, gaji u haplodinoj i diploidnoj formi. Mogućnost propagacije haploida značajno olakšava molekularno-genetičke manipulacije na ovom organizmu (Kämper et al., 2006). Inače, *U. maydis* je poznat po visokoj toleranciji na ultraljubičasto i jonizujuće zračenje (Steinberg & Perez-Martin, 2008), što ga čini pogodnim model sistemom za izučavanje popravki DNK oštećenja.

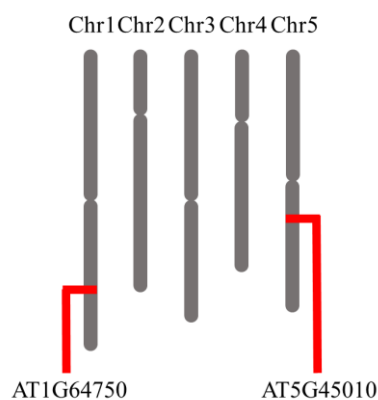
Na *U. maydis* je pokazano da je visoko konzervisani protein UmDss1 funkcionalno povezan sa ortologom humanog BRCA2, Brh2. *U. maydis* mutant $\Delta dss1$ (*Umdss1*) je visoko osetljiv na zračenje, ima poremećenu rekombinaciju, narušenu stabilnost genoma i nema sposobnost infekcije biljke i samim tim ne produkuje spore. Ovakav fenotip je izraženiji nego kod mutanata $\Delta rad51$ i $\Delta brh2$ kod kojih su deletirani *Rad51* i *Brh2* geni koji zajedno sa *Dss1* čine esencijalni kompleks u homolognoj rekombinaciji, što ukazuje da *Dss1* može imati i druge ćelijske funkcije pored regulacije HR u *U. maydis* (Kojic et al., 2003; Kojic et al., 2005).



Slika 5. Poravnanje proteinskih sekvenci DSS1 iz *U. maydis* (UmDss1), čoveka (HsDSS1), *A. thaliana* (AtDSS1) i *S. cerevisiae* (ScSem1). Žutom bojom su označeni identični aminokiselinski ostaci. Crvenim dijamantima su označena mesta interakcije HsDSS1 sa BRCA2. Narandžasti valjci predstavljaju α helikse, a strelice β ploče u sekundarnoj strukturi HsDSS1. Preuzeto iz publikacije Kojic et al., 2003.

1.2.5. Protein DSS1 u biljci *Arabidopsis thaliana*

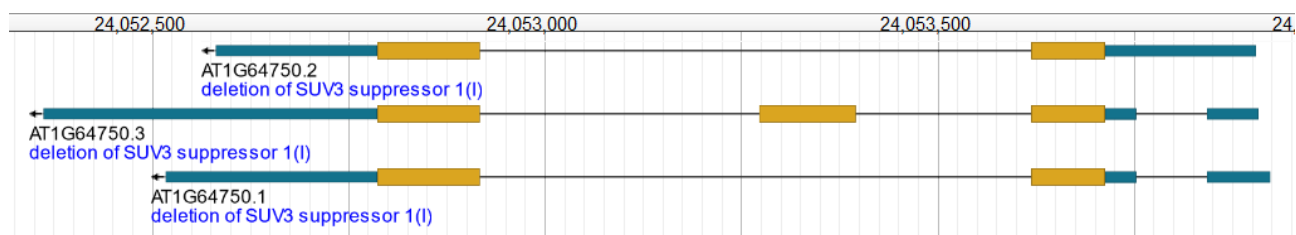
Sekvenciranjem genoma i anotiranjem sekvenci otkriveno je da genom vrste *Arabidopsis thaliana* sadrži dva visoko homologna gena *DSSI(I)* (pristupni br. AT1G64750) i *DSSI(V)* (pristupni br. AT5G45010), koji su locirani na istoimenim hromozomima I i V (Slika 6). Gen *DSSI(I)* čine tri egzona, a različitom obradom prekursora iRNK potencijalno mogu nastati tri splajs varijante (Slika 7). Izoforme iRNK označene AT1G64750.1 i AT1G64750.2, koje se sastoje od dva egzona, razlikuju se u sekvenci i dužini netranslatirajućeg regiona gena (UTR, od eng. *an untranslated region*) (Tabela 2) (Cheng et al., 2017). Međutim, treća i najduža pretpostavljena splajs varijanta AT1G64750.3, koja bi mogla biti kodirana sa tri egzona, eksperimentalno nije potvrđena u *A. thaliana* (Nikolić, 2016). *DSSI(V)* sadrži dva egzona i kodira jednu izoformu iRNK (Slika 8). Upoređivanjem transkripta gena *DSSI(I)* i *DSSI(V)*, uočena je sličnost koja iznosi 90,7% (Dray et al., 2006). Dužina proteina DSS1(I) iznosi 74 aminokiseline, a njegovog homologa DSS1(V) 73 aminokiseline (Tabela 2) (Cheng et al., 2017). Sekvence proteina DSS1 *A. thaliana* se 88% podudaraju sa sekvencama ortologa kod čoveka, *U. maydis* i *S. cerevisiae* (Dray et al., 2006).



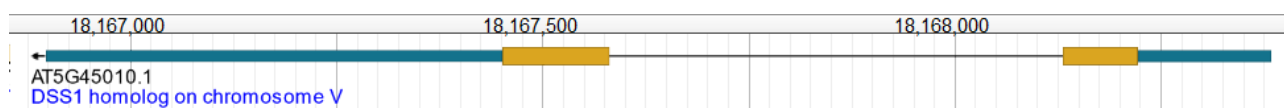
Slika 6. Šematski prikaz lokacije gena *DSSI(I)* i *DSSI(V)* u genomu *A. thaliana*.

Tabela 2. Izoforme iRNK i proteina DSS1 u *A.thaliana* registrovane u bazama TAIR i UniProt. CDS – kodirajuća sekvenca; AA – aminokiselina.

Gen	Pristupni br. gena	Broj egzona	Broj introna	Izoforme iRNK	Dužina gena (bp)	CDS (bp)	cDNK (bp)	Pristupni br. proteina	Dužina proteina (AA)
<i>DSS1(I)</i>	AT1G64750	3	2	<i>DSS1(I).1</i>	1407	225	616	Q9XIR8	74
				<i>DSS1(I).2</i>	1325	225	624		74
				<i>DSS1(I).3</i>	1547	348	879		115
<i>DSS1(V)</i>	AT5G45010	2	1	<i>DSS1(V)</i>	1486	222	937	Q9FL96	73



Slika 7. Grafički prikaz tri pretpostavljene splajs varijante gena *DSS1(I)*. Plavi pravougaonik – označava UTR sekvencu; žuti pravougaonik – egzon; linija – intron. Preuzeto i prilagođeno iz baze TAIR.



Slika 8. Grafički prikaz gena *DSS1(V)*. Plavi pravougaonik – označava UTR sekvencu; žuti pravougaonik – egzon; linija – intron. Preuzeto i prilagođeno iz baze TAIR.

Do sada je najbolje proučena uloga biljnih proteina DSS1 u očuvanju genetičke informacije kroz HR reparaciju DNK koja je posredovana proteinom BRCA2. U *A. thaliana* su identifikovane dve izoforme ortologa BRCA2 proteina, koje imaju 94,5% međusobne sličnosti. DSS1(V) interaguje samo sa AtBRCA2(V) proteinom, dok DSS1(I) uspostavlja vezu sa oba BRCA2(V) i BRCA2(IV) (Dray et al., 2006). Druge studije su pokazale da su DSS1 proteini u *A. thaliana* nezavisno povezani sa oba kompleksa TREX-2 i 26S proteazomom. Pretpostavlja se da DSS1 konekcija između ova dva velika kompleksa postoji u slučajevima kad je neophodno da se nađu u bliskom kontaktu (Lu et al., 2010; Tian et al., 2012).

Navedene studije pokazuju da je prisustvo DSS1 neophodno kao spona u sklapanju gradivnih blokova kompleksa u cilju stabilizovanja njihove arhitekture. Do sada nema dovoljno podataka koje ukazuju da su DSS1 i proces DSSilacije uključeni u odgovor biljaka na oksidativni stres.

1.3. Primena genetičkih manipulacija na biljnom model sistemu *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana je prvi, najbolje proučen i najšire korišćen biljni model sistem za potrebe istraživanja u molekularnoj genetici, biljnoj fiziologiji, biohemiji i biologiji razvića. *A. thaliana* je zastupljen u naučnim ispitivanjima preko pet decenija. Kompletan genom *A. thaliana*, ekotipa Columbia-0 (Col-0) je sekvenciran 2000. godine. Veličina genoma *A. thaliana* iznosi 125 Mbp u okviru koga je identifikovano 30000 gena, organizovanih u pet pari hromozoma (2n=10). Sekvenciranjem kompletnog genoma *A. thaliana*, otvorio se put ka razvijanju različitih pristupa u cilju determinisanja funkcije gena (Initiative, 2000; Provart et al., 2016; Redei, 1975).

A. thaliana je niska, zeljasta, vaskularna, korovska biljka iz porodice *Brassicaceae*, koja obuhvata veliki broj divljih, ali i kultiviranih vrsta/varijeteta koje se koriste u ishrani ili su značajne industrijske biljke. Ovu jednogodišnju biljku, poreklom iz Evroazije, prvi put je opisao Johannes Thal u 16. veku na padinama planine Harc u Severnoj Nemačkoj. Srpski naučnik Josif Pančić joj je dodelio ime uročnjak (Nešković et al., 2010). *A. thaliana* je kolonizator i pionirska biljka osiromašenih, stenovitih predela u senci. Danas se *A. thaliana* može naći i u nekim delovima Severne Amerike (Mitchell-Olds & Schmitt, 2006). Najbliže sestrinske vrste *A. thaliana*, koje su takođe dobro poznate u naučnim istraživanjima su *A. lyrata*, *A. arenosa* i *A. croatica* (Koch & Matschinger, 2007).

Osobine *A. thaliana* zbog kojih je postao univerzalni referentni model organizam u istraživanjima u oblasti molekularne biologije i fiziologije biljaka, jesu: kratak životni ciklus, sposobnost samooprašivanja, veliki broj semena iz velikog broja formiranih čaura, dobro anotiran genom, jednostavno uzgajanje i dobro razvijene metode za genetičku transformaciju. Životni ciklus biljke od klijanja do cvetanja i formiranja zrelog semena traje 6 do 8 nedelja. Biljku *A. thaliana* odlikuje kompaktna rozeta malih listova, pozicionirana u samom dnu stabla, tik iznad površine zemlje. Semena arabidopsisa su dugoživeća i visoko vijabilna u poređenju sa semenima njenih srodnika, što omogućava čuvanje semena u dužem vremenskom periodu uz očuvanje kljavosti. Ovakve osobine olakšavaju istraživanja u genetici, genetičkoj manipulaciji, kao i identifikaciji, selekciji i propagaciji transgenih linija ili linija mutanata (Krämer, 2015).

1.3.1. Transformacija *A. thaliana* posredstvom *Agrobacterium tumefaciens*

Efikasna genetička transformacija *A. thaliana* se izvodi dobro poznatom i standardnom metodom posredovanom bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* (Clough & Bent, 1998). *Agrobacterium tumefaciens* nastanjuje zemljište i patogen je dikotila koji izaziva tumore tkiva biljaka u blizini mesta infekcije (Hellens et al., 2000). Ovaj tip genetičke transformacije se dešava i spontano u prirodi tako što bakterija prebacuje segment iz svog Ti plazmida (od eng. *Tumor-inducing plasmid*) odnosno T-DNK region (od eng. *transferred DNA*) u biljnu ćeliju, koji se ugrađuje u genom biljke (Meyerowitz & Pruitt, 1985). Ovaj region je na svojim krajevima omeđen levim i desnim graničnikom (LB – *left border*; RB – *right border*) dužine oko 25 bp, koji su promenjeni i prilagođeni u naučne svrhe, a imaju ulogu u integraciji u genom biljke (O'Malley et al., 2015). Sekvenca između spomenutih graničnika može biti zamenjena sekvencom od interesa koja kao takva biva integrisana u genom domaćina (Wang et al., 1984). Naučnici su razvili mnogobrojne strategije za uvođenje strane DNK sekvence u T-DNK region. Jedna od najzastupljenijih i najuspešnijih strategija je manipulacija binarnim vektorima koje karakteriše odsustvo gena virulencije (Gelvin, 2003). Geni virulencije (*vir*), koji su odgovorni za transfer T-DNK i nalaze se prirodno u Ti-plazmidu, su razdvojeni u sistem binarnih vektora za potrebe povećane efikasnosti transformacije i lakše manipulacije. Tako su T-DNK i geni *vir* razdvojeni u zasebne plazmide u istoj ćeliji *A. tumefaciens*. Takođe, iz T-DNK sekvence su izbačeni onkogeni čime je sprečeno formiranje tumora u zaraženim biljkama, a bakterijski sojevi koji nose takve plazmide su „razoružani“. Danas postoji velika ponuda sofisticiranih i specijalizovanih kako T-DNK binarnih vektora, tako i „razoružanih“ sojeva *A. tumefaciens* koji nose *vir* plazmide (Brenda G. Leicht, 2008; Hellens et al., 2000; Lee & Gelvin, 2008).

1.3.2. T-DNK inserciona mutageneza

Jedna od brzih i lako dostupnih strategija za ispitivanje funkcije gena, jeste upotreba velike kolekcije komercijalno dostupnih linija mutanata *A. thaliana* koje su u manjoj ili većoj meri morfološki i funkcionalno okarakterisane i nose T-DNK inserciju. Preko dve decenije ovakva kolekcija semena ima značajnu primenu u biološkim istraživanjima na biljkama nudeći sveukupno 700000 transgenih linija *A. thaliana* (Pucker et al., 2021). Centralni alat u kreiranju velike kolekcije semena je T-DNK nasumična inserciona mutageneza posredovana *A. tumefaciens* pomoću transformacije na visokoj skali, pri čemu se T-DNK fragmenti pozicioniraju nasumično u genomu *A. thaliana*. T-DNK inserti su veličine od 5-25 kb i dovode do narušavanja funkcije gena ili regulatornih

genskih elemenata u genomu (Radhamony et al., 2005). U okviru Laboratorije za genomsku analizu na institutu Salk (*The Salk Institute Genome Analysis Laboratory - SIGnAL*), sekvenciranjem DNK na velikoj skali se identifikuju tačne lokacije mutacija u genomima transformisanih linija *A. thaliana* (Brenda G. Leicht, 2008). Generisani stokovi semena su javno dostupni i čuvaju se u tri velika najpoznatija centra. Jedan centar je *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC), u okviru Državnog Univerziteta Ohajo koji vrši distribuciju za Ameriku, drugi *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) je za Evropski kontinent i *RIKEN BioResource Research Center* u Japanu, za Azijski kontinent (Scholl et al., 2000; TAIR, 2023). Sveobuhvatna genomsko baza podataka arabidopsisa sa ponudom stokova transgenih semena i različitih bioinformatičkih alata je TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) (Lamesch et al., 2012). TAIR je centralna platforma koja sadrži pohranjene podatke o anotiranim sekvencama, strukturama i funkcijama gena, metaboličkim putevima, obrascima ekspresije gena, stokovima semena i mapama genoma. Neke od poznatih kolekcija mutanata sa definisanim mestima mutacija su SALK, GABI-KAT, SAIL i WISC linije biljaka (O'Malley & Ecker, 2010). Pretraživanje T-DNK kolekcije semena je moguće preko *T-DNA Express* web sajta, koji nudi grafički prikaz gena i regiona genoma sa tačnom pozicijom T-DNK za datu insercionu liniju (O'Malley et al., 2015; *T-DNA Express*).

1.3.3. CRISPR/Cas9 posredovana mutagenaza

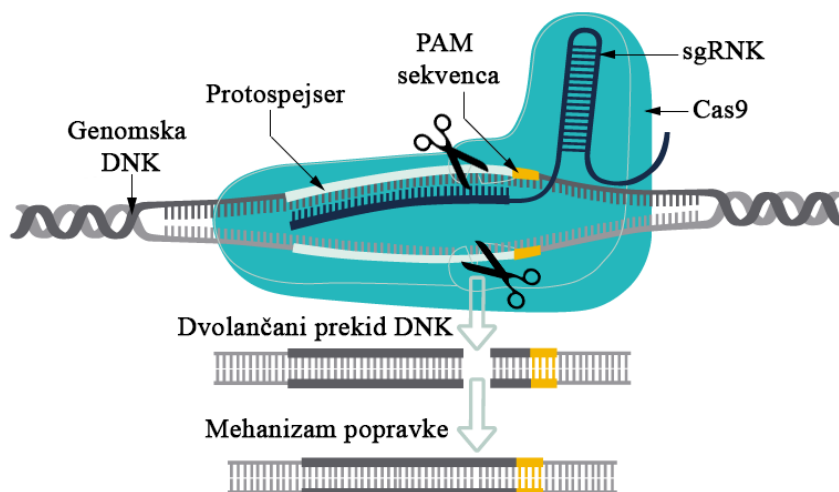
Sad već dobro poznat dvokomponentni alat za genetičku manipulaciju - *the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)/CRISPR-Assoiated protein 2 (Cas9) system*, je sredstvo za efikasnu i olakšanu modifikaciju genoma na precizan i predvidljiv način. Ova tehnologija se široko primenjuje od bakterija do sisarskih linija ćelija, a prilagođena je i za modifikaciju genoma biljaka. CRISPR/Cas9 strategija ima veliki potencijal u biljnoj biotehnologiji sa više aspekata, od ispitivanja funkcije gena do unapređivanja poljoprivrednih useva kroz pristup reverzne genetike (Bortesi & Fischer, 2015; Feng et al., 2014; Ran et al., 2013).

CRISPR/Cas sistem je otkriven kao deo adaptivnog imunskog odgovora gram pozitivne bakterije *Streptococcus pyogenes*. Ovaj imunski sistem individualne ćelije podrazumeva integrisanje delova genoma virusa ili plazmida u sopstvenu DNK i predstavlja memoriju koja ima funkciju u zaštiti od virusa i drugih mobilnih genetičkih elemenata (Gasiunas et al., 2012). CRISPR/Cas sistem se sastoji iz kratkih DNK sekvenci koje se ponavljaju kao graničnici između unikatnih sekvenci (eng. *spacer*) koje se perfektno poklapaju sa viralnom DNK i predstavljaju memorijski zapis prethodnih infekcija. Nakon nove virusne infekcije dolazi do imunizacije domaćina, tako što se viralna DNK integriše u obliku spejsera - ponovaka u CRISPR lokus, formirajući memoriju i antivirusni sistem. Tako se spejseri koriste kao matrica za crRNK (CRISPR RNK), za prepoznavanje viralnih DNK elemenata i za njihovo uništavanje. Aktivnost CRISPR sistema zahteva prisustvo CRISPR-asociranog (*Cas*) gena, koji se uglavnom nalazi u blizini i kodira protein nukleazu koji je neophodan u imunskom odgovoru (Gasiunas et al., 2012; Liu et al., 2015).

Naučnici su preuzeli i modifikovali CRISPR/Cas prirodni mehanizam u svrhu genetičke manipulacije na različitim organizmima. CRISPR/Cas predstavlja rutinsku i precizniju metodu u poređenju sa prethodnim platformama za genetičku manipulaciju pomoću mesto-specifičnih endonukleaza, kao što su nukleaze sa cinkanim prstima (eng. *zinc-finger nuclease* - ZFN) i efektorne nukleaze slične transkripcionom aktivatoru (eng. *transcription activator-like effector nuclease* - TALEN) (Gaj et al., 2013). Sistem CRISPR/Cas čini mesto specifična endonukleaza tipa II, Cas9, koja je udružena sa oligonukleotidnim jednolančanim vodičem za prepoznavanje ciljane sekvence ili gena - sgRNK (od eng. *single guide RNA*). Kompleks Cas9/sgRNK prepoznaje ciljnu sekvencu DNK (protospeser, dugačku oko 20 baznih parova), komplementarno se sparuje sa njom formirajući RNK/DNK heterodupleks. Uvođenje DNK dvolančanih prekida se odvija na 5'-kraju target sekvence, nekoliko baznih parova uzvodno od PAM sekvence (od engl. *a protospacer-adjacent motif*). PAM sekvenca sadrži 5'-NGG-3', gde N predstavlja bilo koji nukleotid. PAM region je neophodan za

pravilno pozicioniranje Cas9-sgRNA (Liu et al., 2015; Ran et al., 2013). Nastali dvolančani prekidi indukuju ćelijske mehanizme popravke: mehanizam sklon greškama - nehomologno spajanje dvolančanih krajeva - NHEJ (od eng. *n**o*n-*h*omologous *e*nd *j*oining) i mehanizam precizne popravke na osnovu matrice - homolognu rekombinaciju. Izbor između ova dva načina popravke zavisi od dostupnosti DNK strukture prema kojoj bi se izvršila popravka. Kod kopnenih biljaka je pokazano da se Cas9 indukovani dvolančani prekidi u molekulu DNK dominantnije popravljaju kroz NHEJ mehanizme reparacije. Ovakav tip popravke je nesavršen, dovodi do stvaranja indela (od eng. *indel*, insercija i/ili delecija) i pomeranja otvorenog okvira čitanja. Ukoliko se ovakve promene dese u genu, one mogu rezultirati u stvaranju *knockout* ili *knockdown* mutanata (Bortesi & Fischer, 2015; Feng et al., 2014; Ran et al., 2013).

U *A. thaliana* se stabilna integracija CRISPR/Cas9 sistema ostvaruje *floral dip* metodom transformacije gde se cvetovi biljke potapanjem u tečnu kulturu transformisanog *Agrobacterium tumefaciens*. Za tu svrhu je razvijen čitav niz binarnih vektora, kao nosača ovog sistema, koji se unosi pomoću *A. tumefaciens* u biljni ćeliju (Xing et al., 2014). Za ciljanu disrupciju gena ili editovanje genoma, CRISPR/Cas9 sistem je modifikovan i prilagođen za brzu i olakšanu modifikaciju biljnog genoma na precizan i predvidljiv način. Na ovaj način modifikovana sekvenca u T1 generaciji biljnog genoma je nasledna i ireverzibilno prisutna u narednim generacijama (Feng et al., 2014; Liu et al., 2015; Xing et al., 2014).



Slika 9. Vezivanje kompleksa gRNK-Cas9 za protospesjer sekvenca u genomske DNK i uvođenje dvolančanog prekida. Preuzeto sa <https://www.diagenode.com/en/categories/crispr-cas9-genome-editing> i prilagođeno.

2. CILJEVI

Činjenice da je na životinjskim model sistemima pokazana multifunkcionalnost proteina DSS1 i da je nedavno otkriven fenomen DSSilacije, ukazuju na potrebu da se i kod biljaka traga za potencijalno novim ulogama gena *DSS1*. Imajući u vidu da su biljke pod pritiskom delovanja faktora spoljašnje sredine razvile složenu mrežu efikasnih mehanizama koji služe za kontrolu homeostaze u ćelijama tokom oksidativnog stresa, nastala je i ideja da se ispita potencijalna uloga DSS1 proteina u odgovoru biljaka na abiotički stres. Koncept ovog rada je bio zasnovan na ispitivanju različitih linija mutanata *dss1* u biljnom model sistemu *Arabidopsis thaliana* i analizi njihove osetljivosti na oksidativni stres. Stoga je opšti cilj ovog istraživanja bio da se utvrdi da li se funkcija biljnih gena *DSS1(I)* i *DSS1(V)* može povezati sa oksidativnim stresom i koji je biološki smisao postojanja dve izoforme ovog proteina.

S obzirom na navedeno, definisani su sledeći ciljevi:

- genotipizacija i fenotipska karakterizacija komercijalno dostupnih T-DNK insercionih mutanata *dss1* za oba homologna gena, kao i analiza njihove osetljivost na oksidativni stres;
- uspostavljanje linija mutanata *dss1*, primenom precizne i efikasne CRISPR/Cas9 tehnologije, zbog postojanja mogućnosti da raspoloživi T-DNK insercioni mutanti nemaju željenu smanjenu ili ukinutu ekspresiju gena od interesa;
- analiza *knockout* i/ili *knockdown* pojedinačnih i duplih mutanata *dss1* u pogledu njihove senzitivnosti na oksidativni stres, kao i dodatno poređenje njihovih karakteristika sa biljkama u kojima su overekspimirani geni *DSS1*;
- ispitivanje nivoa oksidovanih proteina u biljkama divljeg tipa (WT) i linijama mutanata sa izmenjenom ekspresijom gena *DSS1*;
- analiza preživljavanja $\Delta dss1$ mutanta *Ustilago maydis* komplementiranog pojedinačnim biljnim genima *DSS1* pod dejstvom genotoksičnih agensa.

Kako su biljke, kao sesilni organizmi, izložene štetnim uticajima spoljašnje sredine, a time i uticaju oksidativnog stresa, cilj ovog rada je da doprinese rasvetljavanju potencijalne uloge DSS1 proteina kao novog učesnika u mehanizmima preživljavanja i odbrane od oksidativnog stresa, što je za biljne nauke i poljoprivredu od velikog značaja.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Upotreba bioinformatičkih alata

3.1.1. Web alati za predviđanje filogenetskog stabla i kompjuterska analiza sekvenci

Konstrukcija filogenetskog stabla je obavljena upotrebom web alata *PhylomeDB*, koja predstavlja javnu bazu podataka kompletne filogenije gena (Fuentes et al., 2021). Analiza homologije proteinskih sekvenci dobijenih generisanjem filogenetskog stabla je rađena u okviru programa *Clusal Omega* (Sievers et al., 2011). Web alatom *ExPASy Translate tool* je sprovedeno prevođenje nukleotidne sekvence u proteinsku sekvencu (<https://web.expasy.org/translate/>).

3.1.2. Bioinformatičke metode za predviđanje trodimenzionalne strukture i protein-protein interakcija

Primarne i sekundarne strukture oba proteina DSS1 su analizirana upotrebom PSIPRED, visoko preciznim algoritmom za predikciju aminokiselinskih struktura (McGuffin et al., 2000). Korišćenjem STRING baze podataka i web alata (od eng. *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*), koji predstavlja funkcionalnu proteinsku asocijacionu mrežu, urađeno je predviđanje protein-protein interakcija (PPI) (Jensen et al., 2009). Koordinatne datoteke za homologne modele su određene korišćenjem kriterijuma identiteta sekvenci (prosečan identitet 37%). Prvo su kreirani modeli trodimenzionalnih struktura proteina DSS1 upotrebom *PHYRE2 Protein Fold Recognition Server*, pomoću sledećih aminokiselinskih sekvenci: AtDSS1(I) (*Uniprot* pristupni broj proteina: Q9XIR8; Pristupni broj lokusa: AT1G64750) i AtDSS1(V) (*Uniprot* pristupni broj proteina: Q9FL96; Pristupni broj lokusa: AT5G45010) (Kelley et al., 2015). Zatim, za modelovanje bazirano po šablonu preuzeta je veza humanog 26S proteazoma sa kompleksom USP14 (ubikvitin specifična peptidaza 14) i UbA1 (ubikvitin-sličan modifikator-aktivacioni enzim 1) (*Protein Data Base – pdb* identifikacija: 5gjj). Ovaj tip poznate PPI ima 66% sličnosti sa ulaznom sekvencom DSS1 za koju se traže partner proteini (Huang et al., 2016). Nakon upotrebe *pdb* modela, za potrebu predviđanja komplementarnosti dokinga proteinskih kandidata, je urađen virtualni rigidni-doking algoritam pomoću prediktivnog programa *the PatchDock* sa kriterijumom RMSD (od eng. *cluster root mean square deviation*) od 4 Å (Duhovny et al., 2002). Predloženih prvih 20 klaster struktura su podvrgnuti alatu *FireDock* (od eng. *Fast Interaction REfinement in molecular DOCKing*) za modelovanje baziranom na transformaciji, odnosno preuređivanju i podešavanju položaja molekula (Andrusier et al., 2007). Funkcionalna procena se zasniva na geometrijskom uklapanju i energiji atomske desolvatacije (Zhang et al., 1997). Za izračunavanje predikcije globalne energije vezivanja (eng. GBE - the *global binding energy*) korišćeni su sledeći parametri: atomska energija kontakta ili atomska desolvatacija za protein u tranzitnoj formi nevezanog kompleksa (od eng. ACE - *Atomic Contact Energy*); vodonične i disulfidne veze (od eng. HB - *hydrogen bond*); zatim alifatične interakcije (od eng. ALIPH - the *aliphatic potential integrated*); van der Waals-ove veze; Kolumbove sile kratkog i dugog dometa; katjonska- π i π - π steking interakcije.

3.2. Biljni materijal, uslovi gajenja i tretmani biljaka

3.2.1. Semena i njihova površinska sterilizacija

U ovoj doktorskoj disertaciji su korišćena semena vrste *Arabidopsis thaliana*. Gajena su semena divljeg tipa Columbia-0 i različite linije mutanata. Komercijalno dostupna semena koja sadrže T-DNK insercije u pojedinačnim genima za *DSS1(I)* i *DSS1(V)* su nabavljena od banke semena ABRC, Ohajo, SAD i njihov kataloški broj je SALK_069888. Dodatno je nabavljen stok semena od ABRC, pod kataloškim brojem WiscDsLox374E10, koji je opisan kao T-DNK inserciona linija sa insercijom u 5' UTR gena *DSS1(I)*. Zatim su rađene i analize na biljkama napravljenih CRISPR/Cas9

mutantnih linija u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka, IMGGI i na overekspimiranim linijama za pojedinačne *DSSI(I)* i *DSSI(V)*, koja su generisana u laboratoriji *Huswell*, Biološkog deparmana na Vašington Univerzitetu u Sent Luisu, Misuri, SAD.

Semena koja su namenjena uzgajanju u hidroponičnoj kulturi (Conn et al. 2013) ili na Petri šoljama u sterilnom MS (eng. *Murashige and Skoog*) (Murashige & Skoog, 1962) medijumu su prethodno tretirana vlažnom sterilizacijom. Količina od po stotinak semena je sterilisana u 1,5 ml tubici u 70% etanolu (v/v) u trajanju od 5 min uz povremeno mućkanje, a zatim su semena kratko oborena centrifugiranjem, 20 s na 6000 rpm (*Mini Spin, Eppendorf*, Nemačka). Pipetom je zatim pokupljen etanol i zamenjen je rastvorom za sterilisanje (10% komercijalna varikina, 0.05% (v/v) Tween 20 (*Sigma-Aldrich*, SAD)). Semena su inkubirana 20 min na klackalici, na sobnoj temperaturi kako bi se oblivala i posle su oborena centrifugiranjem pod istim uslovima. Pipetom je rastvor zamenjen bidestilovanom vodom (bdH₂O) u cilju ispiranja, zatim je tubica kratko promućkana i semena su oborena kratkim centrifugiranjem pod istim uslovima. Ispiranje vodom je ponovljeno tri puta. Svako izvlačenje reagensa ili vode pomoću pipete rađeno je pažljivo da se ne bi povukla semena sa dna tubice.

3.2.2. Uslovi gajenja u hidroponičnoj kulturi

Za analiziranje odgovora odraslih biljaka na stres, biljke arabidosisa su gajene u hidroponici (Conn et al., 2013) i nakon 5 nedelja od klijanja biljke su tretirane 5 mM/10 mM vodonik-peroksidom (H₂O₂) i 100 μM/200 μM metil-viologenom (MV). Sterilisana semena su zasejana na podlogu od 0,2% agra (*Phytigel™, SIGMA*, SAD), rastvorenog u medijumu za klijanje (GM) (Tabela 3) u sistemu prilagođenom za hidroponično uzgajanje *A. thaliana*. Platforma za gajenje u hidroponici je sačinjena od prilagođenih sistema kutija, saksija i nosača za fitoagar. Između 350-400 ml fitoagra je stavljeno u nosač koji predstavlja probušeni i isečeni crni poklopac tubice zapremine 1,5 ml, tako da je fitoagar zadobijao ispupčen, konkavan oblik, dovoljan da što duži vremenski period opstane i ne osuši se. Poklopci tubica postavljeni su u stalak za nastavke od 5 ml u svako drugo ležište. Poklopac kutije za nastavke napunjen je skoro do vrha GM i stavljen je nosač. Prethodno sterilisana smena postavljena su na papirnu vatu i pripremljene su sterilne čačkalice. U svaki crni poklopac je stavljano po jedno seme *A. thaliana*, pomoću vlažne čačkalice. Kutija je zatvorena i pokrivena aluminijumskom folijom. Kako bi dormancija bila prekinuta, semena su 3-5 dana čuvana u mraku, pri vlažnim uslovima na fitoagru, na +4°C. Posle inkubacije, kutija je postavljena ispod LED lampi (*Apollo 4, max 140 W* i *Apollo 8, max 280 W, Cidly Co., Ltd.*, Šendžen, Kina) u sterilnu sobu za gajenje biljaka koja je klimatizovana, na intezitet svetlosti oko 11 klux (~150 μmol fotona po m⁻²s⁻¹) i izlagana kontrolisanim uslovima sredine: dnevno/noćni režim dugog dana od 16/8 h, pri temperaturi od 21±1°C, 70% vlažnost. Posle sedam dana, od trenutka postavljanja ispod lampi, GM je zamenjen, a posle 14 dana 3 dana zaredom se vrši se izmena GM sa po 1/3 osnovni hranljivi rastvor (BNS, od eng. *basal nutritive solution*) (modifikovani Hoaglandov rastvor) (Tabela 4) do 100% BNS u veći deo kutije gde je prebačen nosač sa klijanjima *A. thaliana*. Kutije su prekrivene providnom folijom radi održavanja veće vlage, koja je mestimično izbušena iglom. Biljke su postavljene na intezitet svetlosti od 6 klux. Nakon četiri nedelje, *A. thaliana* su zajedno sa poklopcima tubica stavljene u isečene rupe u tom prečniku u poklopce 50 ml falkon tubi kojima je isečeno dno, kako bi koren bio potopljen u BNS. Po pet tubi od 50 ml sa *A. thaliana* su postavljene u crne-neprozirne saksije zapremine 3 l, tako da rastvor i korenovi budu u mraku. BNS je neprekidno aerisan i obnavljan na nedelju dana. Spoljašnji kontrolisani uslovi su bili konstantni. Poluvlažna sterilizacija fitoagra, pojedinačnih makroelemenata i mikroelemenata je vršena u autoklavima 15 min na 121°C.

Tabela 3. Sastav GM rastvora.

Makroelementi		Mikroelementi	
Soli	Finalna koncentracija (mM)	Soli	Finalna koncentracija (μ M)
CaCl ₂	0,75	NaFe(III)EDTA	50
KCl	1	H ₃ BO ₃	50
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,25	MnCl ₂ ·4H ₂ O	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10
KH ₂ PO ₄	0,2	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,5
		Na ₂ MoO ₃	0,1

Tabela 4. Sastav BNS rastvora.

Makroelementi		Mikroelementi	
Soli	Finalna koncentracija (mM)	Soli	Finalna koncentracija (μ M)
NH ₄ NO ₃	2	NaFe(III)EDTA	50
KNO ₃	3	H ₃ BO ₃	50
CaCl ₂	0,1	MnCl ₂ ·4H ₂ O	5
KCl	2	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	2	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2	Na ₂ MoO ₃	0,1
KH ₂ PO ₄	0,6		
NaCl	1,5		

3.2.3. Tretmani biljaka vodonik-peroksidom i metil-viologenom

Nakon 5 nedelja rasta u BNS, *A. thaliana* su podeljenje u 6 grupa i tretmani su vršeni u kontrolisanim uslovima:

1. Kontrolna grupa biljaka za tretman vodonik-peroksidom,
2. Biljke tretirane 5 mM H₂O₂,
3. Biljke tretirane 10 mM H₂O₂,
4. Kontrolna grupa biljaka za tretman metil-viologenom,
5. Biljke tretirane 100 μ M MV,
6. Biljke tretirane 200 μ M MV.

Analize biljnog materijala su rađene prvog dana i trećeg dana tretmana sa H₂O₂ i MV za svih 6 grupa. Biljni materijal je podeljen na listove i koren. Svi uzorci su neposredno nakon prikupljanja smrznuti u tečnom azotu i dalje čuvani na -80°C. Uzorci su prikupljeni iz tri biološki nezavisna eksperimenta.

3.2.4. Uslovi gajenja na čvrstim hranljivim podlogama

Za genotipizaciju, fenotipsku analizu i ispitivanje biljnog odgovora na abiotički stres, klijanci *A. thaliana* su uzgajani na čvrstoj podlozi u horizontalnom i/ili vertikalnom položaju. Čvrsta podloga se sastojala od MS medijuma koja sadrži 1% saharoze (Suc). U Tabeli 5 je prikazan sastav MS podloge u čiji sastav pored makroelemenata i mikroelemenata, ulazi i 100 mg/l inozitola, 36,70 mg/l FeNaEDTA, 500 mg/l 2-(N-morfolino) etansulfonske kiseline (MES hidrat) (*Sigma-Aldrich*, SAD), 1% saharoze i 0,7% agra. Vrednost pH MS+Suc medijuma je podešena na pH 5,7 dodavanjem NaOH. Posle poluvlažne sterilizacije u autoklavima na temperaturi od 116°C, 25 min, medijum je izliven u Petri šolje. Semena su pripremljena u 0,1% rastvoru agaroze i zasejana na podlogu pomoću pipete (potrebno je da nastavak na pipeti ima širi otvor kako bi semena mogla da prođu). Petri šolje sa semenima su pokrivene aluminijumskom folijom i ostavljene na +4°C u cilju prekida dormancije. Posle pet dana Petri šolje su prenešene u uslove dugog dana (16 h svetlost, 8 h mrak) intenziteta 11 klux i temperaturu 21±1°C, u komoru za rast biljaka (*Percival* LT-36VL, SAD). U zavisnosti od daljeg toka eksperimenta, nakon 14 dana klijanci su prebačeni na nove MS+Suc šolje u uslove abiotičkog stresa, ili u zemlju u svrhu genotipizacije/fenotipizacije. Novi MS+Suc je sadržao 5 mM/10 mM H₂O₂ ili 10 μM/100 μM MV. U slučaju tretmana UV radijacijom, nakon 14 dana klijanci u Peri šoljama su izlagani intenzitetu 500 J/m² UV (tip UV-C lampe, λ=245 nm, *OSRAM*, *Germicidal lamp*, *Puritec* 30 W, G13 G30T8/OF). Klijanci su trećeg dana od izlaganja tretmanu uzorkovani i neposredno nakon toga smrznuti u tečnom azotu i dalje čuvani na -80°C.

Tabela 5. Sastav makro/mikroelemenata koji ulaze u sastav MS podloge.

Makroelementi		Mikroelementi	
Soli	Finalna koncentracija (mg/l)	Soli	Finalna koncentracija (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
KNO ₃	1900	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	H ₃ BO ₃	6,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	KJ	0,83
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025

3.2.5. Uslovi gajenja biljaka u zemlji

Za genotipizaciju i fenotipizaciju, klijanci *A. thaliana* starosti oko 14 dana od klijanja su prebačeni u zemlju sa peskom (*Flora supstrat* je mešan sa peskom veličine zrna 1 u razmeri 4:1 i dodato je tečno đubrivo 0.5% (v/v)) u baštenskim saksijama i/ili *Arasystem*-u (Belgija, <https://www.arasystem.com/#>). Nakon čega su biljke gajene u kontrolisanim uslovima dugog dana (16 h svetlo/8 h mrak), pri svetlosti intenziteta 11 klux, relativne vlažnosti od 70% i na temperaturi od 21°C.

3.2.6. Fenotipska analiza biljaka upotrebom *ImageJ* programa

U cilju praćenja i opisivanja morfoloških razlika između linija mutanata i WT biljaka, biljke su uslikane kamerom mobilnog telefona/fotoaparata (*Nikon* D3400, Tajland) u različitim fazama razvića. Dodatno, za ranije faze razvića korišćena je uveličavajuća lupa (3×) kao dodatak na kameru telefona. Za merenje dužine korena, ukupne površine rozete i dužine stabla sa fotografija, korišćen je program *ImageJ* otvorenog koda (Schneider et al., 2012). Dužina korena je utvrđena kako na vertikalnom, tako i na horizontalnom MS medijumu. Prvo je bilo neophodno skalirati sliku prema

uslikanom lenjiru pored biljaka, iscrtavanjem linija dužine 1 cm na lenjiru pomoću opcije *Straight Line*, koja se nalazi u osnovnom bar-u alata programa. Zatim u opciji *Analyze* je pozivana funkcija *Set scale (Menu Bar)*, podešena je *Known distance* i zatim je cm uveden kao jedinica mere u *Unit of Length*. Dužina svakog korena je utvrđena iscrtavanjem linije glavnog korena pomoću kompjuterskog alata *Freehand Lines (Tool Bar)* i pozivanjem funkcije *Measure* iz padajućeg menija *Analyze*.

U slučaju merenja površine rozete, za skaliranje je dodat beli kvadrat površine 1 cm² neposredno uz biljku na površinu zemlje. Istim postupkom je skalirana slika kao što je prethodno opisano za merenje dužine korena. Nakon toga je bilo neophodno podesiti boju fotografije kako bi se omogućilo olakšano označavanje rozete. U opcijama *Image/ Adjust/ Color Threshold* su podešeni sledeće parametri: *Hue* na 0/120; *Saturation* na 155/255; *Brightness* na 65/255 i odabrano je dugme *Filtered* (moguća su minimalna odstupanja u zavisnosti od pozadine i osvetljenja). Nakon toga je pozivana opcija *Analyze/ Tools/ ROI Manager* uz odabir *Show All + Labels*. Potom je opcijom *Wand Tracing Tool*-a obeležena površina koja je predstavljala rozetu i nakon svake selekcije je pozvana opcija *Add*. Nakon završenog merenja površina pojedinačnih rozeta, klikom na *Measure* dugme bilo je moguće kopirati rezultate u *Excel* tabelu (*Microsoft Office, SAD*), gde su dalje statistički obrađeni.

3.3. Procedure za rad sa bakterijama

3.3.1. Bakterijski sojevi

U cilju umnožavanja željenih plazmida za transformaciju su korišćene DH5 α hemijski kompetentne ćelije, soja *Escherichia coli*, koje imaju sposobnost da budu transformisane toplotnim šokom.

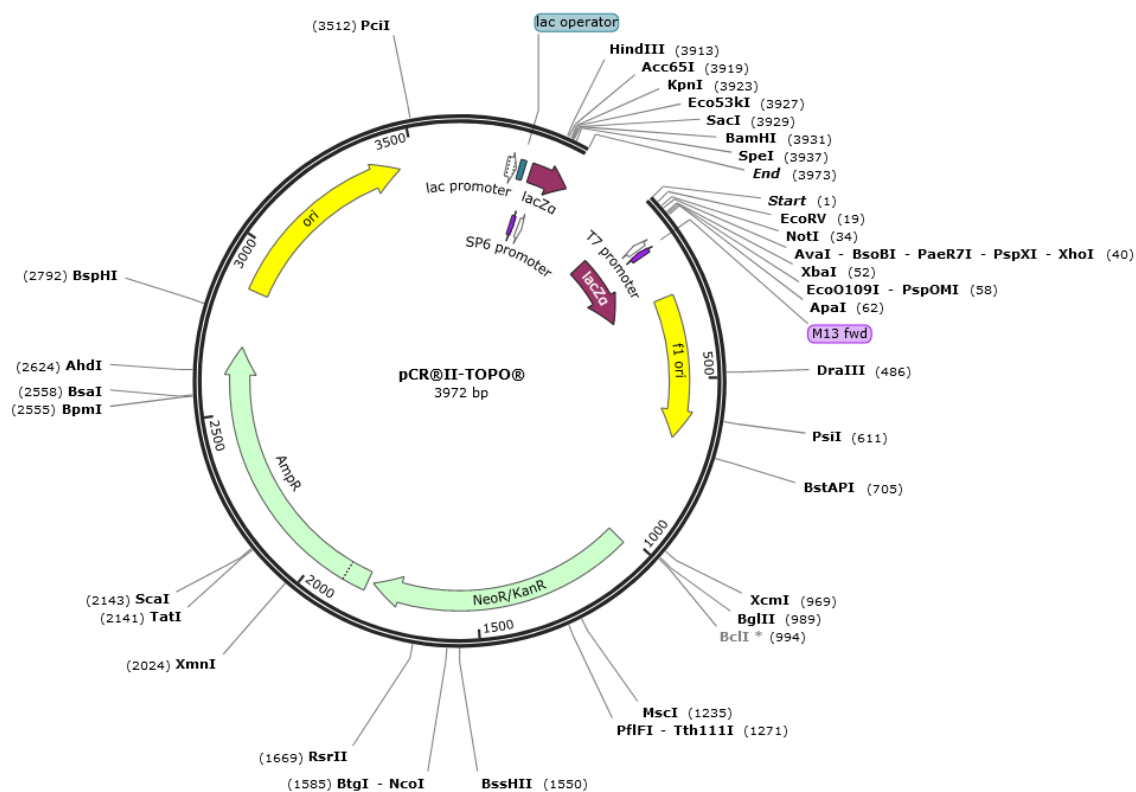
Da bi se izvršila propagacija i održivost plazmida koji sadrže *ccdB* gen, korišćene su specifične kompetentne ćelije *E. coli*, koje su potekle TOP10 soja, otporne na CcdB efekat – soj *One Shot*® *ccdB Survival 2 T1^R* hemijski kompetentnih ćelija (*InvitrogenTM, SAD*).

Takođe, korišćene su i komercijalne elektrokompetentne *E. coli* ćelije MegaX DH10B T1^R (*InvitrogenTM, SAD*).

Elektrokompetentne ćelije bakterijskog soja *Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 su korišćene za transformaciju *A. thaliana* u svrhu generisanja CRISPR/Cas9 transgenih linija. Za stvaranje DSS1 overekspimirajućih linija *A. thaliana* je upotrebljen soj *A. tumefaciens* GV3101 hemijski kompetentnih ćelija, GV3101.

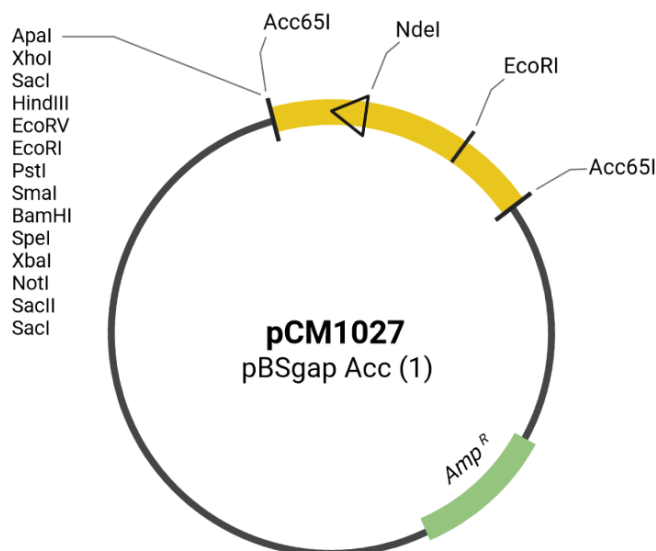
3.3.2. Vektori

Za potrebe ligacije specifičnih PCR produkata upotrebljen je komercijalni pCRTMII vektor koji sadrži: 3'-T preklapajuće krajeve za direktnu ligaciju *Taq*-amplifikovanog PCR produkta; promotore T7 i Sp6 za *in vitro* transkripciju i sekvenciranje RNK molekula; polilinker sa bočnim mestima za sečenje enzimom *EcoRI* za eksciziju i inserciju; komplementarna mesta za vezivanje prajmera M13 za sekvenciranje, gene za rezistenciju na ampicilin (*Amp^R*) i na neomicin/kanamicin (*Neo^R/Kan^R*) (Slika 10).



Slika 10. Mapa vektora pCRII za kloniranje. Preuzeto sa web stranice Addgene.com.

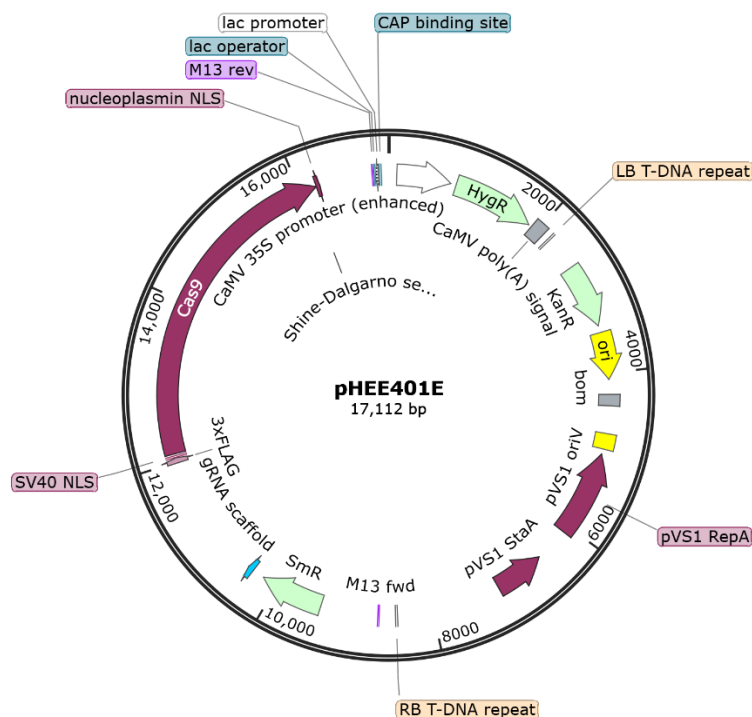
Kako bismo dalje subklonirali gene od interesa, korišćen je ekspresioni vektor pCM1027. pCM1027 je derivat vektora pBlueScript (Stratagene) koji može da se propagira u bakteriji *Escherichia coli*, a sadrži promotor *pgap* (odgovarajući promotor gena za glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenazu, za ekspresiju u *U. maydis*) i marker za selekciju na ampicilinu (Amp^R).



Slika 11. Mapa vektora pCM1027. Kreirano pomoću programa BioRender (<https://www.biorender.com/>).

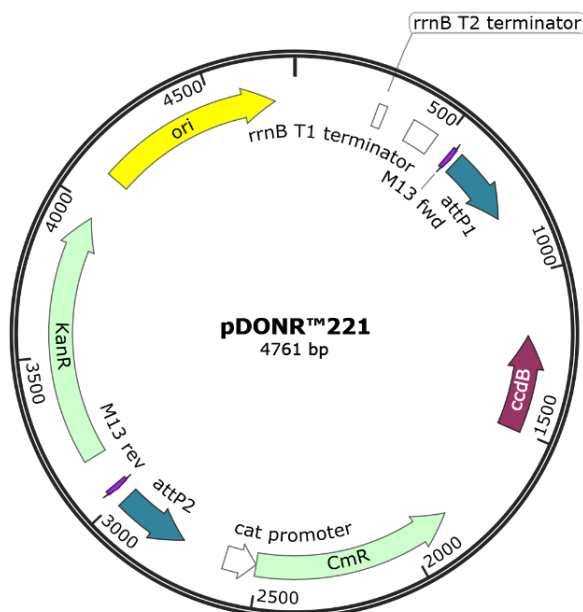
Za potrebe generisanja CRISPR/Cas9 mutiranih biljaka korišćena je *Golden Gate* tehnologija. Za tu svrhu korišćen je prilagođeni binarni vektor pHEE401E. Vektor pHEE401E (Slika 12, Br. 71287, ABRC stok broj CD3-1980) je CRISPR/Cas9 vektor veličine 17112 bp, koji služi za kloniranje gRNK molekula. Vektor sadrži: specifičnu kombinaciju promotor/pojačivač

EC1.2en/EC1.1p (od eng. *Egg cell-secreted protein 1.2/1.1p*) za kontrolisanu ekspresiju optimizovanog proteina kukuruza Cas9 ($3 \times \text{FLAG-NLS-zCas9-NLS}$) u semenom zametku; terminator rbcS-E9; pCAMBIA t.j. kičmu vektora; gRNK region za inserciju ciljne sekvence pod promotorom U6-26; gen za negativnu selekciju na antibiotik spektomicin (Sm^R), na čije mesto se ugrađuje gen od interesa; kao i gene za pozitivnu selekciju na antibiotik kanamicin (Kan^R) u bakterijama i na higromicin (Hyg^R) u biljkama.

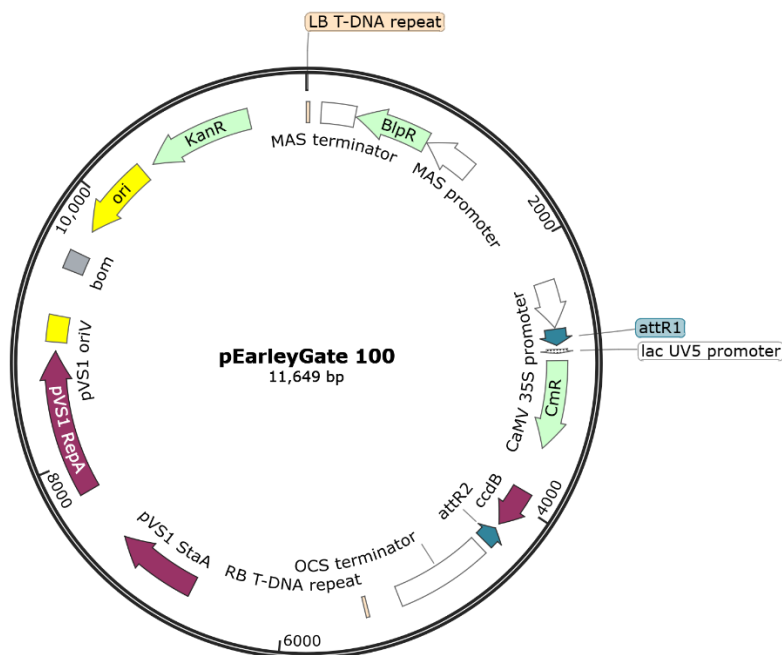


Slika 12. Mapa vektora za kloniranje *Golden Gate* tehnologijom. Preuzeto sa web stranice Addgene.com.

Za generisanje overekspimirajućih linija primenjeno je kloniranje pomoću *Gateway*TM tehnologije (*Invitrogen*TM, *Thermo Scientific*TM, SAD). Za ovu svrhu korišćeni su binarni vektori pDONRTM 221 i pEarlyGate100. pDONRTM 221 kao vektor donor omogućava brzo kloniranje, veličine je 4761 bp, derivat pUC vektora i sadrži: *attP1* i *attP2* sekvence tj. dva rekombinaciona mesta između kojih se u BP reakciji ubacuje sekvenca od interesa iz *Gateway* ekspresionog klona ili *attB* PCR produkta; smrtonosni gen *ccdB* (inhibitor žiraze) za negativnu selekciju, lociran između *attP* mesta, koji se tokom rekombinacionog kloniranja zamenjuje sa DNK od interesa; univerzalna M13 mesta za sekvenciranje; gene za rezistenciju na hloramfenikol (Cm^R) i na kanamicin (Kan^R) (Slika 13). pEarlyGate100 (broj ABRC stoka CD3-724) je ulazni vektor (od eng. *entry clone*), koji predstavlja ciljani vektor (od eng. *destination vector*) u ovom istraživanju. Veličina pEarlyGate100 je 11649 bp i nosi: rekombinaciona mesta *attR1* i *attR2* između kojih se ugrađuje gen od interesa u LR reakciji; gen *ccdB*; M13 sekvence; kao pozitivne markere na selekciju u bakterijama ima gene Cm^R i Kan^R za otpornost na hloramfenikol i kanamicin; a gen *Blp^R* za rezistenciju biljke na toksični efekat Basta (glufosinat-amonijum) herbicida (Slika 14).



Slika 13. Mapa donor vektora za kloniranje Gateway™ tehnologijom. Preuzeto sa web stranice Addgene.com.



Slika 14. Mapa ulaznog vektora za kloniranje Gateway™ tehnologijom. Preuzeto sa web stranice Addgene.com.

3.3.3. Hranljivi medijumi za uzgajanje bakterija

Luriya-Bertani (LB) medijum

Tečni LB medijum sadrži: 1% (w/v) tripton; 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) ekstrakt kvasca. Za pripremu čvrste podloge se u tečni LB medijum dodaje 1,5% (w/v) agar. Sterilizacija podloga se vrši u autoklavu na 121°C, 20 min ili u mikrotalasnoj pećnici na 100°C, 10 min. Antibiotici se dodaju nakon hlađenja medijuma (oko 50°C).

S.O.C. tečni medijum

Ovaj sterilni medijum služi za oporavak bakterija nakon transformacije i obezbeđen je u okviru kita za *One Shot® ccdB Survival™ 2 T1^R Chemically Competent Cells (Invitrogen™, SAD)*.

3.3.4. Gajenje i održavanje bakterija

Za potrebe kloniranja ili izolovanja, kulture transformanta *E. coli* su gajene u LB medijumu uz dodatak odgovarajućih antibiotika preko noći na 37°C, uz mućkanje na 180 obrtaja u minutu (*rpm*) radi optimalne aeracije, ili na čvrstoj podlozi LB. Soj *A. tumefaciens* je gajen u LB medijumu sa odgovarajućim antibioticima 2 dana na 28-30°C, ili na čvrstoj podlozi LB (videti detaljnije u Odeljku 3.6.). Petri šolje sa bakterijama su čuvane na +4°C i obnavljane na tri do četiri nedelje. Za dugoročnu upotrebu kulture bakterija sa željenim vektorima su zamrzavane na -80°C u 15% (v/v) glicerolu.

3.3.5. Transformacija DH5 α ćelija toplotnim šokom

Transformacija DH5 α ćelija, *E. coli* je vršena toplotnim šokom (*Heat shock*) izlaganjem ćelija toplotnom stresu u prisustvu plazmida ili ligacione smeše. Alikvot od 50 μ l kompetentnih bakterija, čuvan na -80°C, je otopljen na ledu. Nakon dodavanja 1–5 μ l (10 pg do 100 ng) DNK, smeša je lagano promešana i ostavljena 30 minuta na ledu. Smeša plazmida i bakterija je zatim izlagana toplotnom šoku tako što je iz leda brzo prebačena na 42°C u vodeno kupatilo (*Memmert Waterbath WBU 45*, Nemačka) u trajanju od 45-60 s, nakon čega je sledila inkubacija na ledu tokom 5-10 min. Transformisane ćelije su stavljene na oporavak u 1 ml neselektivnog LB medijuma na 37°C, 60 min, uz intenzivnu aeraciju na 220 rpm. Po oporavku, transformaciona smeša je oborena 1 min na 15000 rpm, odliven je supernatant i preostala smeša u proseku od 100 μ l je utrljana na odgovarajuću LA selektivnu podlogu i gajena preko noći na 37°C. Druga varijanta je da se direktno totalna oporavljena smeša ćelija utrlja u LA podlogu sa antibiotikom.

3.3.6. Transformacija One Shot® *ccdB Survival*TM 2 T1R ćelija toplotnim šokom

Uz izmene u odnosu na originalni protokol iz kita, primenjena je transformacija toplotnim šokom na *One Shot® ccdB Survival*TM 2 T1^R ćelije, *E. coli* u prisustvu plazmida. Polovina originalnog alikvota od 50 μ l kompetentnih bakterija, koja je čuvana na -80°C, je otopljena na ledu. Takođe, S.O.C. medijum sa +4°C je zagrejan na sobnoj temperaturi. Nakon dodavanja 0,5–2,5 μ L (5 pg do 50 ng) plazmida, smeša je nežno promešana i inkubirana 30 minuta na ledu. Smeša plazmida i bakterija je zatim izlagana toplotnom šoku tako što je iz leda brzo prebačena na 42°C u vodeno kupatilo (*Memmert Waterbath WBU 45*, Nemačka) u trajanju od 45 s, nakon čega je sledila inkubacija na ledu tokom 2 min. Transformisane ćelije su stavljene na oporavak u 125 μ l S.O.C. medijuma na 37°C, 60 min, uz konstantno mešanje na 225 rpm. Po oporavku, totalna transformaciona smeša je utrljana na LA podlogu u Petri šolji sa odgovarajućim antibiotikom i gajena preko noći na 37°C.

3.3.7. Transformacija MegaX DH10B T1R elektrokompetentnih ćelija

Transformacija *E. coli* elektroporacijom je rađena na uređaju *Electroporator 2510* (*Eppendorf*, Nemačka). Korišćene su komercijalne elektrokompetentne ćelije MegaX DH10B T1^R, soja *E. coli* (*Invitrogen*TM, SAD). U 10 μ l izdvojenih komercijalnih DH10B ćelija je dodavana bdH₂O do 80 μ l. Ćelije su inkubirane sa po 2-5 μ l plazmidne DNK na ledu 10 min. Smeša je prebacivana u ohlađenu kivetu za elektroporaciju (1 mm razmak između elektroda), stavljana u ležište uređaja *Electroporator 2510* (*Eppendorf*, Nemačka) i vršena je elektroporacija na 1250 V. Odmah po elektroporaciji bakterije su prebačene u 800 μ l LB medijuma i oporavljane 60 min na 37°C, pri mešanju na 220 rpm. Transformaciona smeša je utrljana na LA hranljivu podlogu sa 100 μ g/mL ampicilina i inkubirana preko noći na 37°C.

3.3.8. Transformacija *Agrobacterium tumefaciens* metodom elektroporacije

Za transformaciju biljaka su korišćeni alikvoti ćelijske suspenzije *A. tumefaciens* soja C58C1 zapremine od 40 μ l, čuvani na -80°C. Masa plazmidne DNK koja je dodata ohlađenim nastavkom u ćelijsku suspenziju, nakon što se otopila na ledu, bila je 600 ng. Nakon toga je ova smeša

prebacivana u hladne kivete (2 mm razmak između elektroda) za elektoporaciju. Uslovi elektoporacije su bili 1800 V na aparatu *Electroporator 2510* (Eppendorf, Nemačka). Po završenoj elektoporaciji u kivetu je brzo dodavano 500 µl LB medijuma i ćelije su oporavljane 2-4 h na 28°C, uz intenzivno mešanje na 150 rpm. Zatim su transformacione ćelije razmazivane na selektivnu LA podlogu sa 50 µg/ml kanamicina. Inkubacija je trajala 2 dana na 28°C.

3.3.9. Transformacija *Agrobacterium tumefaciens* zaleđivanjem i odleđivanjem

Transformacija hemijski kompetentnih ćelija *A. tumefaciens*, soja GV3101 je vršena zaleđivanjem i odleđivanjem, tj. izlaganjem tečnom azotu u prisustvu plazmida. Odleđenim ćelijama soja GV3101, zapremine 50 µl, je dodato 10 µl (50 ng - 500 ng) plazmidne DNK, tapkanjem su promešane i zatim inkubirane 30 min na ledu. Potom je smeša naglo zamrznuta u tečnom azotu u trajanju od 1 min, onda otopljena na 37°C i dodato je 900 µl LB medijuma za oporavak. Ćelije su oporavljene 1-2 h na 28°C, uz mešanje na 225 rpm i oborene u centrifugi na 10000 rpm, 2 min. Oceden je veći deo bistrog supernatanta, a ostatak od oko 100 µl je resuspendovan i izliven na LA medijum sa trostrukim antibiotikom: 50 µg/ml rifampicin, 30 µg/ml gentamicin i trećim odgovarajućim selektivnim antibiotikom za inokulirani plazmid. Inkubacija je trajala 2 dana na 28°C.

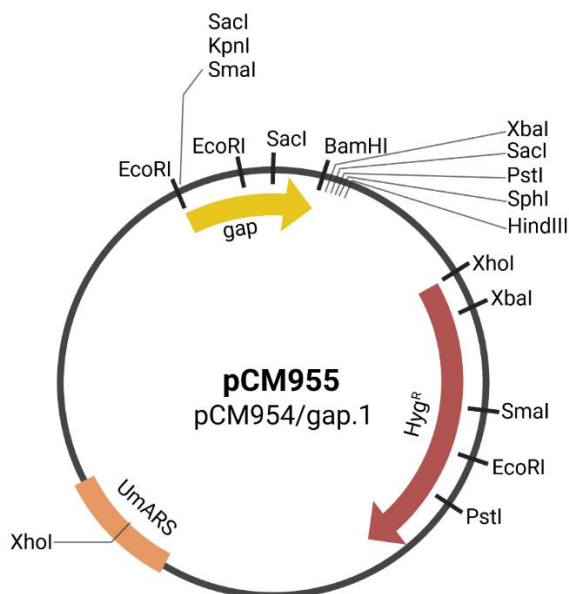
3.4. Procedure za rad sa *Ustilago maydis*

3.4.1. Sojevi *U. maydis*

Za test funkcionalne komplementacije korišćeni su *U. maydis* sojevi UCM350 i $\Delta dss1$. UCM350 je nominalni divlji laboratorijski soj (*nar1-6 pan1-1 alb1*), a $\Delta dss1$ soj je nastao disrupcijom *Dss1* gena u UCM350.

3.4.2. Vektori

Za ekspresiju biljnih gena *AtDSS1* u *U. maydis* mutantu $\Delta dss1$ korišćen je ekspresioni vektor pCM955. Vektor pCM955 poseduje: *ori* mesto replikacije (mesto početka replikacije u *E. coli* ćelijama); polilinker mesto za kloniranje; promotor *pgap*; mesto *UmARS* (sekvenca za autonomnu replikaciju) i gen za rezistenciju na higromicin (*Hyg^R*) (Slika 15).



Slika 15. Mapa vektora pCM955. Kreirano pomoću programa BioRender (<https://www.biorender.com/>).

Dodatno, transformacija *U. maydis* $\Delta dss1$ mutanta je sprovedena i vektorom pCM1019, koji nosi komplementarni gen za *Umdss1* i rezistenciju na *Hyg^R*.

3.4.3. Hranljivi medijumi za gajenje *U. maydis*

Hranljivi medijum YEPS

Tečni medijum YEPS (engl. Yeast Extract Peptone Succrose) je sadržavao: 1% ekstrakt kvasca, 2% pepton i 2% saharozu (Torlak, Srbija). Za pravljenje čvrste YEPS hranljive podloge, u medijum je dodavan agar (Torlak, Srbija) u finalnoj koncentraciji od 2% (w/v). Takođe, u svaki hranljivi medijum je dodavan tetraciklin (15 µg/ml) radi sprečavanja bakterijskih kontaminacija. Za gajenje transformanata, u podloge je dodavan higromicin u finalnoj koncentraciji 100 µg/ml.

Hranljivi medijum YSH

Nakon transformacije, protoplasti *U. maydis* su zasejavani na čvrste YSH hranljive podloge, odnosno YEPS podloge koje su dodatno sadržavale 1 M sorbitol (Centrohem, Srbija) radi održavanja izotonične sredine i 150 µg/ml higromicin za selekciju transformanata sa plazmidima koji nose rezistenciju na ovaj antibiotik.

3.4.4. Gajenje i održavanje *U. maydis*

U tečnom medijumu, sojevi *U. maydis* (divlji tip i mutanti) su rasli preko noći na 30°C, uz konstantno mešanje na orbitalnom šejkeru (*LabTherm LT-W, Kühner, Švajcarska*) (180 rpm) radi optimalne aeracije. Na čvrstim podlogama, sojevi su rasli 2-3 dana na 30°C, do pojave jasno uočljivih kolonija. Petri šolje su čuvane na +4°C, gde sojevi ostaju vijabilni tri do četiri nedelje, nakon čega su obnavljani iz glicerolskih stokova. Za dugoročnu upotrebu kulture su zamrzavane u glicerolu na -80°C.

3.4.5. Pravljenje protoplasta i transformacija *U. maydis*

Ćelije *U. maydis* iz logaritamske preonoćne tečne kulture su taložene centrifugiranjem na 3000 g/ 3 min/sobna temperatura. Ćelije su oprane vodom (50 ml), a potom i sa 10 ml SCS pufera (1M sorbitol, 20 mM natrijum-citrat, pH 5,8) i ponovo taložene centrifugiranjem pod istim uslovima. Nakon odlivanja pufera, ćelije su resuspendovane u ostatku pufera snažnim mešanjem, a potom je dodavan SCS pufer koji je sadržavao 60 mg enzima za lizu ćelijskog zida (*Vinotaste Pro, Novozymes, Danska*). Ćelije su inkubirane na 30°C uz konstantno mešanje 180 rpm tokom 30 min. Efikasnost protoplastiranja je proveravana mikroskopski na 40× uveličanju (BA80, *Motic*). Za razliku od intaktnih ćelija koje su štapičastog oblika, protoplasti su okrugli, te se lako mogu uočiti. Efikasno protoplastiranje podrazumeva generisanje više od 80% protoplasta u suspenziji ćelija. Nakon dobijanja protoplasta, svi dalji koraci su vršeni na ledu i sa prethodno ohlađenim puferima. Zaustavljanje enzimske reakcije je vršeno pranjem ćelija hladnim SCS puferom dva puta i taloženjem protoplasta centrifugiranjem na 1000 g/ 8 min/ 4°C. Nakon resuspendovanja laganim mešanjem na ledu, protoplasti su oprani u STC puferu (1 M sorbitol, 10 mM TRIS-Cl, pH 7,5, 0,1 M CaCl₂) i taloženi pod istim uslovima. Pelet je resuspendovan u 300 -500 µl STC pufera i po 100 µl je korišćeno za transformaciju ili je čuvano na -80°C do upotrebe.

Za transformaciju protoplasta *Ustilago maydis*, inkubirano je 5 µl rastvora DNK sa heparinom (30% heparin, 500 ng plazmidne DNK) na ledu u trajanju od 5 min. U rastvor DNK je dodavano je 100 µl protoplasta, smeša je blago promešana okretanjem tube i inkubirana na ledu 10 min. Potom je dodato 0,5 mL SPTC rastvora (1 M sorbitol, 10 mM Tris-Cl pH 7,5; 40% PEG 3350, 0,2 M CaCl₂), mikrotuba je invertovana 4-5 puta i ostavljena na sobnoj temperaturi. Posle 15 min suspenzija je razmazana bez pritiskanja na YSH podloge. Šolje su inkubirane na 30°C do pojave jasno uočljivih kolonija (tri dana).

3.4.6. Tretman ćelija *U. maydis*

Stepen rezistencije *U. maydis* na genotoksične agense je određivan semikvantitativno. Broj ćelija u prekončnoj kulturi je precizno određivan upotrebom komore za brojanje krvnih ćelija (hemocitometar) pod $10\times$ uveličavajućim objektivom svetlosnog mikroskopa (BA80, Motic). Gustina kulture je podešavana na 2×10^7 /ml. Od ove početne kulture pravljeno je pet $10\times$ serijskih razblaženja, od kojih je po 10 μ l iskapavano na čvrst YEPS medijum s leva na desno. Radi ispitivanja rezistencije ćelija na genotoksične agense, medijum je sadržavao ili 0,015% metil-metanosulfonat (MMS), ili 0,01% diepoksibutan (DEB), ili su Petri šolje bile izlagane UV zračenju jačine 100 J/m^2 .

3.5. Test funkcionalne komplementacije *U. maydis* $\Delta dss1$ mutanata *AtDSS1* homologima *A. thaliana* i tretman UV radijacijom

Za test funkcionalne komplementacije je sprovedena serija kloniranja i subkloniranja u cilju analize komplementacije *Ustilago maydis* $\Delta dss1$ mutanata osetljivog na UV stres, proteinima DSS1(I) i DSS1(V) *A. thaliana*.

3.5.1. Kloniranje transkripata *AtDSS1* u parentalni vektor pCRII

Pojedinačne kodirajuće sekvence gena *DSS1(I)* i *DSS1(V)*, dobijene umnožavanjem u PCR reakciji, su uklonirane u zasebne vektore pCRII. cDNK sekvenca *DSS1(I)* je umnožena prajmerima UmNdeI/cDNA I R, odnosno cDNK sekvenca *DSS1(V)* prajmerima UmNdeI/3UTR DV. Prajmerom UmNdeI je ugrađeno mesto prepoznavanja za restrikcioni enzim NdeI na koje se nastavlja start mesto translacije gena *DSS1 A. thaliana*. Reverzni prajmer cDNA I R je korišćen za specifično umnožavanje transkripta *DSS1(I)*, prajmer 3UTR DV r za transkript *DSS1(V)*. Ligacija PCR proizvoda (40 ng) sa pCRII vektorom je obavljena upotrebom *TA Cloning™ Kit, Dual Promoter kita (Invitrogen™, SAD)* prema uputstvu proizvođača. Po 5 μ l ligacione smeše pCRII-DSS1(I), odnosno pCRII-DSS1(V) je korišćeno za transformaciju elektrokompetentnih ćelija, *MegaX DH10B T1^R*. DH10B su gajene u hranljivom medijumu sa 50 μ g/ml kanamicina. Sekvenciranjem primenom prajmera M13 je proverena uspešnost kloniranja, kao i ispravnost sekvence ovih gena (*Europe BV, Amsterdam*).

3.5.2. Subkloniranje sekvenci *AtDSS1* u vektor pCM1027

Duplom digestijom restrikcionim enzimima NdeI i HindIII su linearizovani vektori pCM1027, pCRII-DSS1(I) i pCRII-DSS1(V). Reakcije su inkubirane preko noći na 37°C (Tabela 6). Zatim su sa 1,5% agaroznog gela produkti digestije eluirani i prečišćeni pomoću kita *PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™, SAD)* prema uputstvu. *DSS1(I)*, odnosno *DSS1(V)* inserti *A. thaliana* su ligirani u linearizovan vektor pCM1027 na poziciji nizvodno od promotora *pgap* za ekspresiju u *U. maydis*. Zatim je urađena transformacija DH10B soja *E.coli* produktima ligacije i transformanti su selektovani na podlozi sa 100 μ g/ml ampicilina.

Tabela 6. Sastav 40 μ l reakcione smeše digestije restrikcionim enzimima NdeI i HindIII.

Komponente	Količina za pCRII+ <i>DSS1</i>	Količina za pCM1027
10 \times pufer R	4 μ l	4 μ l
Plazmidna DNK	32 μ l	10 μ l
NdeI (10 U/ μ l)	2 μ l	2 μ l
HindIII (10 U/ μ l)	2 μ l	2 μ l
bdH ₂ O	/	22 μ l

3.5.3. Subkloniranje sekvenci *AtDSS1* u ekspresioni vektor pCM955

Duplom digestijom restrikcijom enzimima Acc65I i BamHI su linearizovani plazmidi pCM955, pCM1027-*DSS1(I)* i pCM1027-*DSS1(V)* (Tabela 7). Eluirani i prečišćeni fragmenti *pgap-DSS1(I)*, odnosno *pgap-DSS1(V)* inserti su ligirani u linearizovan ekspresioni *shuttle* vektor pCM955. Zatim je urađena transformacija DH5 α , *E.coli* ćelija produktima ligacije i transformanti su selektovani na podlozi sa 50 μ g/ml higromicina. Sekvenciranjem primenom prajmera M13 je proverena uspešnost kloniranja (*Europe BV*, Amsterdam).

Tabela 7. Sastav 20 μ l reakcione smeše digestije restrikcijom enzimima Acc65I i BamHI.

Komponente	Količina
10 \times pufer Tango	4 μ l
Plazmidna DNK pCM955/pCM1027+ <i>DSS1</i>	7 μ l
Acc65I	1 μ l
BamHI	1 μ l
bdH ₂ O	7 μ l

3.6. Transformacija biljaka metodom - *Floral dip*

Transformacija biljaka *A. thaliana* obavljena je alternativnom metodom transformacije potapanjem cvetova - *Floral dip*. Za ovu potrebu su pripremljene procvetale biljke, 5-8 nedelja od klijanja, sa mladim, neotvorenim pupoljcima i sa razgranatim stablom. Uklonjeni su svi otvoreni cvetovi. Takvim biljkama je većina stabla bilo potapano u suspenziju transformisanih bakterija *Agrobacterium tumefaciens*, uz pažnju da se ne potope rozete i zemlja.

U prvom koraku gajene su transformisane bakterije soja *A. tumefaciens*, koje su sadržavale plazmide od interesa, na selektivnim LA medijumima tako što su inkubirane 2 dana na 28°C. Selektivni medijum sadrži smešu dva antibiotika za selekciju pomoćnih plazmida i specifičan antibiotik za selekciju binarnog plazmida od interesa. Zatim su zasejane tečne početne kulture bakterija u zapremini 2,5 ml sa istom kombinacijom antibiotika i rasle su 24 h na 28°C, uz konstantno mešanje na 180 rpm. Narednog dana je 250 ml svežeg tečnog LB medijuma inokulirano sa 250 μ l prekoćne *Agrobacterium* pred-kulture u prisustvu kombinacije 3 antibiotika (50 μ g/ml rifampicin, 30 μ g/ml gentamicin i treći odgovarajući antibiotik za inokulirani plazmid) i 10 mM MgSO₄·7H₂O. Posle 18-20 h rasta merena je apsorbanca na 600 nm i OD je podešen na 1 (*Ultrospec 3300 pro*, *Amersham Biosciences*, UK), nakon čega je podeljen sadržaj kulture u 2 boce od 250 ml i centrifugiran 15 min na 3000 rpm (*Sorvall RC-5B refrigerated superspeed centrifuge*) na +4°C. Supernatant je odliven u posude sa varikinom, a talog je dobro rastvoren u 200 ml MS+5%Suc uz periodično mešanje tokom 15-30 min. U većoj staklenoj posudi je pripremljeno 300 ml resuspendovane kulture sa 80 μ l surfaktanta Silwet L-77 (*Lehle Seeds*, SAD) (0.02% finalne koncentracije) i 600 ml preostale 5% saharoze. U tako pripremljenu suspenziju bakterija ubačene su pripremljene biljke u trajanju 30 s, tako da su svi izdanci bili dobro potopljeni. Transformisane biljke su položene bočno na papirnu vatu u pokrivene tacne i odložene na mračno mesto. Poklopac je postavljen radi povećanja vlažnosti vazduha. Posle 24 h poklopac je malo otvoren, a nakon 48 h skroz uklonjen. Biljke su uspravljene i odložene u komoru za rast da se tako osuše. Takođe, do prvog zalivanja zemlja je ostavljena da se dobro osuši.

Semena (T1) transformisane generacije biljaka (T0) su sakupljena i dalje selektovana na antibiotik ili herbicid, u cilju identifikacije stabilnih transformanata.

3.7. Prajmeri

U reakcijama PCR, HRM i qPCR korišćeni su odgovarajući specifični prajmeri, čiji su nazivi, sekvence (u orijetaciji 5'→3') i veličine produkata navedeni u Tabelama 8-15. Prajmeri su dizajnirani u programu *Primer3Web* (<https://primer3.ut.ee/>), na osnovu sekvenci od interesa koje su preuzete iz baze podataka TAIR ili NCBI baze (*National Center for Biotechnology Information*). Moguće sekundarne strukture i komplementarnost između parova prajmera je proverena web alatom *OligoAnalyzer™ Tool (Integrated DNA Technologies, Inc., <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>)*. Sekvence prajmera za aktin, koji je korišćen kao endogena kontrola, su preuzeti iz publikacije Remans i saradnici (2008). Sekvence prajmera su navedene u Tabeli 3.1.; za katalazu iz Du i saradnici (2008); a za glutation sintetazu iz Semane i saradnici (2007).

Tabela 8. Lista prajmera za umnožavanje transkripata *DSSI(I)* i *DSSI(I)* u testu funkcionalne komplementacije *U. maydis* $\Delta dss1$ mutanta.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Veličina produkta (bp)
UmNdeI cDNA I R	TCCATATGGCGGCAGAACCG GCAAAGGAAAAGCAGAACCG	347
UmNdeI 3UTR DV r	TCCATATGGCGGCAGAACCG TGGCTAACTTCCTTCACTTCT	431

Tabela 9. Lista prajmera za genotipizaciju T-DNK mutanlih linija za oba gena *DSSI* i za pretragu dodatnih neželjenih T-DNK insercija kod biljaka u multi-insercionalnom stoku semena SALK_069888 (LP/RP – gen specifični prajmeri, LBb1/RP – prajmeri za detekciju T-DNA insercija). Prajmeri su dizajnirani u programu *T-DNA primer design* (www.signal.salk.edu/tdnaprimers.2).

Naziv polimorfizma	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Veličina produkta (bp)	Lokus
SALKSEQ_069888.1	LP.1 RP.1	TGTTTGAGGACGACGATGAG TCCATGTCCATACGGAACAC	1112	AT1G64750 (<i>DSS1</i> (I))
SALKSEQ_069888.2	LP.2 RP.2	TGGTACTTGATGTCTGAACAACC GCCAAGTTGAGAAACCGAAC	1165	AT1G77990 - AT1G78000 (intergenski region)
SALKSEQ_069888.3	LP.3 RP.3	AAACCGCACACGATGAAAG GTAACCACACGCGGTACATG	1179	AT1G26860 – AT1G26870 (intergenski region)
SALKSEQ_069888.4	LP.4 RP.4	CACTGCCCCAGTTAAGCTAGCC CTGATCCTTCCGTCAAAGC	1002	AT3G06750 (Galaktoza oksidaza/kelch ponovci superfamilije proteina)
SALKSEQ_069888.5	LP.5 RP.5	AACCAAAAATGTCTGGTCTGGTCTGAG ATTGCAGATCACGCTAGCAC	1136	AT3G21320 – ATG21330 (intergenski region)
SALKSEQ_069888.6	LP.6 RP.6	ACGAATGCGACTATTGGACC CGAGAAATTTGCATCCAAGG	1222	AT5G45010 (<i>DSS1V</i>)
SALK_069888.54.50.x	LP.x RP.x	TAGGATGCGTATTTGTCTGGTCT AGCGACAAGACAAAACAAAAGC	1239	AT5G60100 (promotor PRR3- Promotor regulatora pseudo-odgovora 3)
/	LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT		

Tabela 10. Lista prajmera za genotipizaciju T-DNK mutanlih linija za gen *DSSI(I)* u stoku semena WiscDsLox374E10.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
WISC dssI LP WISC dssI RP	TGATGAATCGATTCAAAAATCG CAAGGACTTGACAAAACCTCGC

Table 11. Lista prajmera koji su korišćeni u analizi nivoa ekspresije pojedinačnih gena *DSSI*, kao i gena *CAT*, *GSH2*, *UVR3*, *PHR1* u WT i mutantnim linijama biljaka.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Veličina produkta (bp)
ACTf ACTr	CTTGCACCAAGCAGCATGAA CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT	68
CAT1F CAT1R	AGGAGCCAATCACAGCC TCAAGACCAAGCGACCA	194
GSH2F GSH2R	ATTGGCTAAAGCTTGGTTGGAGTA CGTTCTTCTGGCTGTACAATTACCA	72
AtUVR3f AtUVR3r	TCCGGTTCTTGCTTGAGAGT CAAAGCAAAGCCTCTTCACC	141
AtPHR1f AtPHR1r	GGGACTGACAGCAGATCCTC GGGTCACGACCATCAATCTC	183
3UTR DI f 3UTR DI r	TTGTTTGTACTGCATCCTTTGG CCATGTCCATACGGAACACA	166
3UTR DV f 3UTR DV r	TTGAATTGCATCCTTTGGTTT GAGAGAAGATGGTGATTATCAGAATAG	150
tDSSI For tDSSI Rev	CTGAAGTAGTAAAGATGGATCTGTTT TGGCTAACTTCCTTCACTTCT	103
tDSSV For tDSSV Rev	AAGTGGTGAAGGTGGATCTATTC CATTTCTTCTCACTAGCATTCTCAAG	193

Table 12. Lista prajmera koji su korišćeni u pretraživanju CRISPR/Cas9 mutanata za gene DSS1.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Veličina produkta (bp)
ScsI f ScsI r	TCTCGATCTGGTTGGTTCCT CCTATCTCACACCTGAAATTGACA	477
ScaI f ScaI r	TCTCGATCTGGTTGGTTCCT CTCATCGTCGTCCCTCAAACA	105
ScsV f ScsV r	TCTCGATCTGGTTGATTTGCT ATCCGTTTTTCGCATCAGAAC	374
ScaV f SrcaV r	TCTCGATCTGGTTGATTTGCT ACTCATCGTCGTCCCTCGAAT	103

Tabela 13. Lista prajmera za amplifikaciju *off-target* sekvenci - neželjenih mesta delovanja CRISPR/Cas9 u mutiranim *dssI* linijama

Šifra gena	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Veličina produkta (bp)
AT4G03400	I34f I34r	TGAGGAAATGGCTTGGGACT AGGGACAGAACAGTGATGGG	178
AT4G04960	I496f I496r	TTGGGTTAGCTCGGGTTCAT TCCCCAAACCCAATCCATCA	212
AT5G01170	V117f V117r	CGGCGAGGAATAAGAGTTCG GCTATAGAGTGGCCGTGACT	187
AT4G14510	V145f V145r	GGGGTTATAAGTGGTGAGAACAG ACCGAACTCTTCTCAATTCTTCT	300
AT2G25800	V258f V258r	GTCACATTCGGCGACTTCAC ACAGCCGATGAGAGAGGTTT	168
AT1G17500	V175f V175r	TGCATAACTGTGGTGA ACTCA CCTCCAATGCATACGTTAGGG	169

Tabela 14. Lista prajmera koji su korišćeni za dodavanje *attB* specifičnih mesta transkriptima *DSSI* za BP reakciju, Gateway kloniranja.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Veličina produkta (bp)
DIattf DIattr	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTC TAC CAT GGC GGC AGA ACC GAA GG GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT TTA TTT CTT GTC AGT ACC ATT CTC	288 bp
DVattf DVattr	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTC TAC CAT GGC GGC AGA ACC CAA GG GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTTC ATT TCT TCT CAC TAG CAT TCTC	285 bp

Tabela 15. Spisak dodatnih parova prajmera korišćenih u ovom radu.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Svrha
M13 F M13 R	TCCCAGTCACGACGTCGT GGAAACAGCTATGACCATG	Provera uspešnosti transformacije
35Sf 35Sr	ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT	Provera uspešnosti integracije inserta umnožavanjem promotora <i>CaMV 35S</i>
U6-26p-F U6-26t-R	TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC CCCCAGAAATTGAACGCCGAAGAAC	Provera uspešnosti transformacije umnožavanjem promotora <i>U6-26</i>

3.8. Procedure generisanja linija mutanata *A. thaliana*

3.8.1. Generisanje mutanata tehnologijom CRISPR/Cas9

3.8.1.1. Dizajniranje sgRNA sekvenci

Kreirane su odgovarajuće sekvence sgRNK (jednolančani vodič RNK – *single guide RNA*) za ciljano prepoznavanje gena *DSSI(I)* (pristupni br. AT1G64750) i *DSSI(V)* (pristupni br. AT5G45010) upotrebom *in silico* alata CHOPCHOP v2 (Labun et al., 2016) i CRISPR-P v2.0 (Liu et al., 2017). Odabrane komplementarne sekvence sgRNK za editovanje su navedene u Tabeli 16. Kao takve, one sadrže dodatna nepalindromska 4 nukleotida na svojim 5' krajevima komplementarna lepljivim krajevima vektora generisanim usled digestije endonukleazom BsaI.

Tabela 16. Specifični prajmeri za *Golden Gate* kloniranje.

Delovi sekvence obeleženi sivom bojom predstavljaju mesta prepoznavanja za restrikcioni enzim BsaI.

Ciljana mesta editovanja	Prajmeri za <i>Golden Gate</i> kloniranje	
za <i>DSS1(I)</i>	sgDSS1(I)f	5' -ATTGGACTGCTGAAGTAGTAAAGA-3'
	sgDSS1(I)r	3' -CTGACGACTTCATCATTTCTCAAA-5'
za <i>DSS1(V)</i>	sgDSS1(V)f	5' -ATTGAGCTGTCTGAAGTGGTGAAGG-3'
	sgDSS1(V)r	3' -TCGACAGCTTCACCACTTCCCAAA-5'

3.8.1.2. Konstrukcija CRISPR/Cas9 binarnih vektora tehnologijom *Golden Gate*

Pomoću tehnologije *Golden Gate* konstruisani su pojedinačni pHEE401E binarni vektori za potrebe CRISPR/Cas9 editovanja oba gena *DSS1*. *Golden Gate* pristup je molekularna tehnika kloniranja koja se koristi za višestruko spajanje fragmenata DNK u jednoj reakciji (Engler et al., 2009). Prednost *Golden Gate* kloniranja je u optimizovanoj ko-inkubaciji restrikcionog enzima i ligaze u jednom koraku. Vektor pHEE401E je dizajniran da sadrži samo dva restrikciona mesta za enzim BsaI koji omogućavaju ugrađivanje željenog fragmenta između njih i time smanjuje insertovanje fragmenta u pogrešnom smeru. Komponente *Golden Gate* reakcione smeše su:

- 20 µM oligonukleotida (sgDSS1(I)f/sgDSS1(I)r ili sgDSS1(V)f/sgDSS1(V)r)
- 200 ng/ µl vektora pHEE401E
- 1 × BSA
- 5 U BsaI (*Restriction Endonuclease Products, New England Biolabs Inc. (NEB), SAD*)
- 200 U enzima T4 ligaze
- 1 × pufer T4 ligaze buffer (NEB).

Reakcija je inkubirana pod sledećim uslovima: 5 h na 37°C, 5 min na 50°C i 10 min na 80°C u PCR mašini (*Tprofessional Thermocycler, Biometra, Nemačka*).

Po 5 µl ligacione smeše pHEEK401E-DSS1(I), odnosno pHEEK401E-DSS1(V) je korišćeno za transformaciju toplotnim šokom soja DH5α, *E.coli*. Za brzo pretraživanje kolonija koje su izrasle na selektivnoj podlozi sa 50 µg/ml kanamicina, urađen je *Colony PCR* (Odeljak 3.8.6.) sa prajmerima U6-26p-F i U6-26t-R. U cilju utvrđivanja pravilne ugradnje oligonukleotidnih sekvenci od interesa u vektore, plazmidi su izolovani iz bakterija *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, SAD)* (Odeljak 3.8.2.) i poslani na uslužno komercijalno sekvenciranje (*MacroGen Europe BV, Holandija*). Plazmidi su potvrđeni prajmerima U6-26p-F i U6-26t-R koji su komplementarni delu kičme vektora pHEEK401E koji okružuje sgRNK.

3.8.1.3. *A. tumefaciens* posredovana transformacija *A. thaliana*

Kompetentni soj *A. tumefaciens*, C58C1 je transformisan dobijenim vektorima putem elektoporacije i zasejan na podloge koje su sadržavale 50 µg/ml kanamicina. Prisustvo vektora koji nosi Cas9 kasetu u bakterijskim kolonijama proveravano je metodom *Colony PCR* uz upotrebu prajmera U6-26p. Transformacija biljaka generacije T0 je sprovedena *floral dip* metodom sojevima C58C1 koji su nosioci vektora pHEEK401E-DSS1(I) ili pHEEK401E-DSS1(V). Selekcija stabilnih transgenih biljaka u T1 generaciji je urađena na MS hranljivim podlogama koje su sadržale antibiotik higromicin u koncentraciji 50 µg/ml.

3.8.1.4. Pretraživanje prisustva CRISPR/Cas9 mutiranih linija u T1 i T2 generaciji

U cilju potvrde prisustva mutanata, pomoću PCR metode je urađena analiza dela sekvence koja sadrži CRISPR/Cas9 ciljana mesta primenom ScaI f/ScaI r, odnosno ScaV f/ScaV r prajmera. PCR produkti su podvrgnuti PCR analizi restrikcijom enzimom Bsp143I (*Thermo Scientific*TM, SAD). Dalje je urađena HRM analiza na 2000× razblaženim i nesečenim PCR produktima u digestiji enzimom Bsp143I. Za precizno detektovanje primenom HRM metode (od eng. *High resolution melting PCR*), korišćeni su insert-specifični prajmeri dizajnirani za umnožavanje kratkih fragmenata (oko 100 bp) ScaI f/ScaI r i ScaV f/ScaV. PCR umnošci sa različitim krivama topljenja od WT kriva topljenja su dalje odabrani za sekvenciranje u *MacroGen Europe BV* (Holandija). Dobijeni sekvencirani hromatogrami su upoređeni upotrebom web softvera *Tide* (Brinkman et al., 2014).

Tabela 17. Sastav 20 µl reakcione smeše digestije restrikcijom enzimom Bsp143I.

Komponente	Količina
10× pufer Bsp143I	2 µl
PCR produkti	15 µl
<i>Bsp143I</i>	1 µl
bdH ₂ O	2 µl

3.8.1.5. Analiza *off-target* mesta

Potencijalno mutirana neželjena mesta (*off-target*) u genomu generacije CRISPR/Cas9 mutanata su pretražena CHOPCHOP v2 (Labun et al., 2016) i CRISPR-P v2.0 (Liu et al., 2017) softverima. Zatim su dizajnirani parovi prajmera koji su komplemetarni preklapajućim *off-target* mestima (Tabela 13). Umnoženi fragmenti su provereni sekvenciranjem da bi se identifikovale moguće promene u WT sekvenci genoma usled potencijalne aktivnosti Cas9 van ciljnih mesta.

3.8.2. Generisanje duplih *dssI(I)/dssI(V)* CRISPR/Cas9 mutanata

U cilju dobijanja duplih CRISPR/Cas9 mutanata za oba DSS1 gena, sprovedeno je ručno oprašivanje biljaka. U prvoj fazi donor polena su bili cvetovi biljaka *dssI(I)* mutanata, a pupoljci *dssI(V)* mutanata su predstavljali liniju ženskog pola odnosno recipijente polena. Prvo je bilo neophodno odabrati izdanake kod *dssI(V)* mutanta, koji su bili u fazi zatvorenog pupoljka i ukloniti im sve cvetne delove sem ženskog reproduktivnog dela. Zatim su ubrani zreli pupoljci *dssI(I)* mutanta i pincetom su uhvaćeni za samu bazu čašičnih listova. Ovim potezom pincete, čašični i krunični listovi se povlače i otvara se unutrašnjost cveta, čime se oslobađaju prašnici u slobodnu sredinu. Tako otvorenim cvetom se veštački oprašuje pripremljeni tučak *dssI(V)* biljke. Oprašeni tučak je potom obeležen crvenim koncem i odgovarajućim oznakama (genotip roditelja, datum, itd.). Nakon 7 dana od oprašivanja je moglo da se uoči izduživanje tučkova, odnosno formiranje čaura (eng. *siliqua*). U narednoj fazi je oprašivanje sprovedeno u obrnutom smeru, gde je biljka *dssI(V)* mutanta bila donor polena.

3.8.3. Generisanje linija mutanata sa overekspimiranim proteinom

3.8.3.1. Gateway sistem za kloniranje

U cilju kreiranja linija biljaka *A. thaliana* sa overekspimiranim proteinima DSS1(I) i DSS1(V), primenjena je metoda Gateway za kloniranje. Gateway sistem, razvijen od strane kompanije *Invitrogen*, nudi lak i ireverzibilan pristup kloniranja, kombinovanja i prenošenja fragmenata DNK

između različitog spektra specijalizovanih vektora za ovu svrhu. Ova visoko efikasna metoda umesto restrikcionih enzima sadrži modifikovane mesto-specifične rekombinaze λ bakteriofaga za inserciju fragmenta od interesa u vektor i odvija se u dvostepenoj reakciji (Katzen, 2007).

Tabela 18. Šematizovani prikaz Gateway kloniranja.

<i>attB1-DSS1(I)/DSS1(V)-attB2</i>	×	<i>attP1-ccdB-attP2</i>
(PCR produkt)		(pDONR221)
⇕		
<i>attL1-DSS1(I)/DSS1(V)-attL2</i>	×	<i>attR1-ccdB-attR2</i>
(Ulazni vektor)		(Ciljni vektor)

BP reakcija

Prvi stepen predstavlja BP reakcija, u kojoj se rekombinacija odvija između mesta *attB* u PCR produktu gena od interesa i mesta *attP* u donor vektora. U ovoj reakciji produkt je ulazni (*entry*) klon koji sadrži gen od interesa između novonastala dva *attL* mesta.

Prethodno umnoženi fragmenti *DSS1(I)/DSS1(V)* sa dodatkom *attb1* i *attb2* mesta (Tabela 14) na krajevima su uklonirani u vektor pDONR221. BP reakcija je postavljena prema izmenjenoj proceduri proizvođača *Invitrogen*, u ukupno 4 μ l zapremine, preko noći na 25°C. Sastav reakcije prikazan je u Tabeli 19.

Tabela 19. Komponente BP reakcije.

Komponente	Količina
attB-PCR produkti	≥ 5 ng/ μ l
pDONR221	75 ng/ μ l
TE pufer pH 8,0	do 4 μ l
+ BP Clonase™ II	1 μ l

Reakcija je prekinuta dodavanjem 0,5 μ l Proteinaze K i inkubacijom smeše na 37°C, 10 min. Od ukupne smeše uzet je 1 μ l za transformaciju toplotnim šokom DH5 α kompetentnih ćelija, koje su nakon toga zasejane na LA medijum sa 50 μ g/ml kanamicinom i 20 μ g/ml hloramfenikolom. Uspešnost kloniranja je proverena izolacijom plazmida koji su korišćeni kao matrica za PCR metodu u prisustvu M13 direktnog i reverznog prajmera i tDSSI For/tDSSIRev, odnosno tDSSV For/tDSSV Rev.

LR reakcija

Drugi stepen je LR reakcija, gde se zapravo odvija subkloniranje gena od interesa iz ulaznog vektora u ciljni (*destination*) vektor sa *attR* mestima za rekombinaciju i nastaje ekspresioni klon koji sadrži gen od interesa između novonastala dva *attB* mesta.

LR reakcija koja je sadržavala pDONR221-DSS1(I) (2774 bp), odnosno pDONR221-DSS1(V) (2773 bp) i pEarlyGate100, postavljena je prema modifikovanoj proceduri proizvođača. Prethodno su pDONR221 vektori sa genima od interesa linearizovani u digestiji sa endonukleazom

MluI (10 U/μl, *Thermo Scientific*TM) (Tabela 20), na 37°C, 16 h. Cilj ove digestije je da se ukine rezistencija na kanamicin i tako spreči ponovna transformacija DH5α zaostalim neželjenim produktima LR reakcije. U tabeli 21 je prikazan sastav LR reakcije u ukupno 4 μl zapremine, koja je inkubirana preko noći na 25° C. Zatim je reakcija prekinuta dodavanjem 0,5 μl Proteinaze K (2 μg/μl) na 37°C, 10 min. Za transformaciju DH5α, upotrebjeno je 1 μl reakcione smeše. Uspešnost kloniranja je proverena izolacijom plazmida koji su korišćeni kao matrica za PCR metodu u prisustvu M13 direktnog i reverznog prajmera i tDSSI For/tDSSIRev, odnosno tDSSV For/tDSSV Rev. Za najprecizniju proveru, plazmidi su sekvencirani u *MacroGen Europe BV* (Holandija).

Odabrani konstrukti su iskorišćeni za transformaciju tečnim azotom soja GV3101, *A. tumefaciens* i dalje inokulirani metodom floral dip u T0 generaciju WT zrelih biljaka *A. thaliana*.

Tabela 20. Digestija pDONR221-DSS1(I) i pDONR221-DSS1(V) restrikcionim enzimom MluI.

Komponente	Količina
H ₂ O	6 μl
10× pufer R	2 μL
Plazmid (0.5-1 μg/μl)	10 μl
MluI (10 U/μL)	2 μl

Tabela 21. Komponente LP reakcije.

Komponente	Količina
pDONR221+gen (150 ng/μl)	75 ng/μl
pEarlyGate 100	75 ng/μl
TE pufer pH 8,0	do 4 μl
+LP Clonase TM II	1 μl

3.8.3.2. Selekcija stabilno transformisanih biljaka

Nakon što su sakupljena semena T0 generacije biljaka i zatim gusto zasejena u zemlju, ostavljena su da rastu do faze drugog para primarnih listova (oko 2 nedelje od klijanja). Biljke T1 generacije su intenzivno prskane rastvorom herbicida Basta (1:1000), ukupno tri puta svaki drugi dan. Basta je komercijalni naziv za fosfinotricin ili glufosinat hemikaliju i kao selektivni agens se primenjuje u identifikaciji transgenih biljaka transformisanih vektorom koji sadrži gen za fosfinotricin acetiltransferazu, tj. koji omogućava rezistenciju na fosfinotricin.

3.9. Procedure za rad sa DNK

3.9.1. Izolacija genomske DNK iz biljnog materijala

U zavisnosti od zahteva analiza za određenim nivoom čistoće DNK uzoraka, dve metode su korišćene za izolaciju DNK.

Za potrebe genotipizacije, pojedinačni mladi listovi *A. thaliana* su odvajani u 2 ml tube sa 400 μl pufera za ekstrakciju (200 mM Tris-HCl pH 7,5-8; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA, 0.5% SDS). Mehaničko razbijanje biljnog tkiva, uz upotrebu kuglica od nerđajućeg čelika, je urađeno u *Tissue Lyser II* (*Qiagen*, Nemačka), 2× u trajanju 45 s, u pri frekvenciji vibracije od 30 Hz. Nakon

usitnjavanja biljnog materijala, ćelijski ostaci su oboreni >10000 g, 5 min (*Centrifuge 5424, Eppendorf, Nemačka*) i 300 µl supernatanta je izdvojeno u nove 1,5 ml tube sa 300 µl izopropanola. Sadržaj smeše je promešan okretanjem tubica 4-5 puta, zatim inkubiran na sobnoj temperaturi, 5 min. Uzorci su centrifugirani na maksimalnoj brzini 10 min i tečni deo je odbačen. Osušeni talog, u *Speed Vaac-u (Eppendorf, Nemačka)* na 30°C u trajanju od par minuta, je rastvoren u 100 µl sterilne bdH₂O ili TE puferu (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA).

Za izolovanje čiste visokomolekularne DNK visokog prinosa materijala za svrhu sekvenciranja, ekstrakcija DNK molekula je sprovedena upotrebom *DNeasy® Plant Kit (Qiagen, Germany)* po protokolu proizvođača.

Koncentracija molekula DNK je određivana spektrofotometrijski korišćenjem aparata *BioSpec-nano (Shimadzu, Japan)*.

3.9.2. Izolacija plazmidne DNK iz bakterijskih sojeva

Za izolovanje plazmidne DNK, pojedinačne kolonije *E. coli* ili *A. tumefaciens* su zasejavane u 3 mL LB medijuma u koji je dodat odgovarajući antibiotik i inkubirane preko noći na orbitalnom šejkeru (37°C/28°C, 180 rpm). Korišćene su dve metode, u zavisnosti od potrebnog nivoa čistoće izolata.

Ukoliko su izolati korišćeni samo za analizu dobijenih klonova, plazmidi su izolovani brzom procedurom koja daje izolate manje čistoće. Prekonoćna bakterijska kultura je taložena u 2 ml tubici, centrifugiranjem na 10000 g, 1 min (*Centrifuge 5424, Eppendorf, SAD*). Tečni medijum je odbačen, ali tako da preostane približno 150 µl. Zatim je ćelijski talog intezivno promešan na mešalici i pomešan sa sveže napravljenim 300 µl TENS puferom (10 M Tris-Hcl pH 8,0; 1 mM EDTA; 1 M NaOH; 0,5% (w/v) SDS). Daljim mešanjem sa 150 µl 3 M Na-acetata pH 5,6 formirao bi se beličast precipitat. Nakon centrifugiranja na 13000 g, 5 min supernatant je prebačen u čiste tubice sa 900 µl hladnog apsolutnog etanola i promešan obrtanjem tubica. U narednom koraku posle centrifugiranja 5 min na 13000 g, supernatant je odbačen i talog je intezivno promešan na mešalici (*Vortex-Genie 2, SAD*) sa 500 µl 70% etanola, u cilju ispiranja taloga. Izvršeno je kratko obaranje u centrifugi, 20 s na 6000 rpm. Talog je nakon sušenja u *Speed Vaac-u* rastvoren u 50 µl TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) sa 3 µl RNaze A (20 mg/ml) (*Invitrogen, SAD*) inkubiranjem na 65°C, 10 min.

Za izolovanje čiste plazmidne DNK upotrebljen je *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, SAD)* prema protokolu proizvođača. U poslednjem koraku, na kolonu je nanešeno 50 µl vode ili pufera za eluciju i nakon 5 min inkubacije DNK je eluirana kratkim centrifugiranjem 2 min, na 13000 g. Ovako prečišćeni plazmidi su korišćeni za sekvenciranje, transformacije i PCR.

Koncentracija plazmida je određivana spektrofotometrijski korišćenjem aparata *BioSpec-nano (Shimadzu, Japan)*.

3.9.3. Reakcija lančanog umnožavanja fragmenata DNK

Za umnožavanje DNK fragmenata metodom PCR (*Polymerase Chain Reaction*) korišćene su polimeraze *DreamTaq™ PCR Master Mix (2X)* i *DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X)* (*Thermo Scientific, SAD*) u svrhu genotipizacije i pretraživanja mutanata. U svrhu kasnijeg eluiranja sa gela ili analize HRM metodom PCR produkata, korišćen je *DreamTaq™ PCR Master Mix (2X)*. PCR reakcija, zapremine 25 µl sadržala je sledeće komponente: 12,5 µl *DreamTaq PCR Master Mix (2X)*, po 0,2 µM prajmera (direktnog i reverznog), 10 ng matrice DNK i bdH₂O do finalne zapremine. PCR reakcije su izvođene u uređaju *Tprofessional Thermocycler (Biometra, Nemačka)*. Oligonukleotidni prajmeri koji su korišćeni su prikazani u Tabelama 9, 10, 12 i 15. Temperaturni profili PCR reakcija i svrha upotrebe prikazani su tabelarno (Tabela 22).

Tabela 22. Temperaturni profil PCR reakcija.

Korišćeni prajmeri	PCR profil	Matrica	Svrha
LP.1/ RP.1; LBb1/ RP.1; LP.2/ RP.2; LBb1/ RP.2; LP.3/ RP.3; LBb1/ RP.3; LP.4/ RP.4; LBb1/ RP.4; LP.5/ RP.5; LBb1/ RP.5; LP.6/ RP.6; LBb1/ RP.6; LP.x/ RP.7; LBb1/ RP.x;	94°C/ 5 min; (94°C/ 30 s; 60°C/ 30 s; 72°C/ 1 min) ×40; 72°C/ 5 min	gDNK	Pretraživanja mutanata sa T-DNK insercijom u <i>DSSI</i> genima
LP WISC/ 3UTR DI r	94°C/ 5 min; (94°C/ 30 s; 58°C/ 30 s; 72°C/ 1,5 min) ×40; 72°C/ 5 min	gDNK	Pretraživanja mutanata sa T-DNK insercijom u <i>DSSI(I)</i> genu
ScsI f/ ScsI r; ScsV f / ScsV r	95°C/ 5 min; (95°C/ 45 s; 61°C/ 30 s; 72°C/ 1 min) ×30; 72°C/ 5 min	gDNK	Pretraživanja CRISPR/Cas9 mutanata za <i>DSSI</i> gene
M13f/M13R	94°C/ 5 min; (94°C/ 45 s; 60°C/ 35 s; 72°C/ 30 s) ×40; 72°C/ 5 min	Plazmidna DNK	Detekcija M13 sekvence
35Sf/35Sr	94°C/ 5 min; (94°C/ 45 s; 60°C/ 35 s; 72°C/ 30 s) ×40; 72°C/ 5 min	gDNK, plazmidna DNK	Detekcija <i>CaMV</i> 35S promotora
I34f /I34r; I496f /I496r; V117f /V117r; V145f /V145r; V258f /V258r; V175f /V175r	94°C/ 3 min; (94°C/ 1 min; 57°C/ 1 min; 72°C/ 1 min) ×40; 72°C/ 10 min	gDNK	Detekcija <i>off-target-a</i>
ACTf /ACTr	95°C/ 5 min; (95°C/ 30 s; 61°C/ 30 s; 72°C/ 1 min) ×30; 72°C/ 5 min	gDNK, cDNK	Umnožavanje gena / transkripta aktina
tDSSI For /tDSSIRev	95°C/ 5 min; (95°C/ 30 s; 61°C/ 30 s; 72°C/ 1 min) ×30; 72°C/ 5 min	cDNK	Umnožavanje gena / transkripta <i>DSSI(I)</i>
tDSSV For /tDSSV Rev	95°C/ 5 min; (95°C/ 30 s; 62°C/ 30 s; 72°C/ 30 s) ×30; 72°C/ 5 min	cDNK	Umnožavanje gena / transkripta <i>DSSI(V)</i>

3.9.4. Reakcija umnožavanja fragmenata DNK sa visokom preciznošću

Za potrebe testa funkcionalne komplementacije, sekvenciranja i *Gateway* kloniranja, umnožavanje fragmenata DNK je rađeno sa velikom preciznošću pomoću *Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase* (*New England Biolabs*, SAD). PCR reakcije su postavljane prema predloženoj proceduri proizvođača. Za zapreminu od 25 µl komponente su: 5 µl 5× Q5 pufera za reakciju; 0,2 µl 25 mM dNTP; 1,25 µl 10 µM prajmera; 1-2 µl matrica; 0,25 µl *Q5 High-Fidelity* DNK polimeraze i bdH₂O je dodato do finalne zapremine. Spektrofotometrijski metodom je vršeno merenje koncentracije

krajnjih produkata PCR. Temperaturni profili PCR reakcija i svrha upotrebe prikazani su tabelarno (Tabela 23).

Tabela 23. Temperaturni profil Q5® High-Fidelity PCR reakcija.

Korišćeni prajmeri	PCR profil	Matrica	Svrha
DIattf /DIattr; Dvattf /DVattr	98°C/ 30 s; (98°C/ 10 s; 72°C/ 1 min) ×35; 72°C/ 2 min	Plazmidna DNK	Gateway kloniranje
I34f /I34r; I496f /I496r; V117f /V117r; V145f /V145r; V258f /V258r; V175f /V175r	98°C/ 30 s; (98°C/ 10 s; 60°C/ 30 s; 72°C/ 30 s) ×30; 72°C/ 2 min	gDNK	Sekvenciranje
UmNdeI /cDNA I R	98°C/ 30 s; (98°C/ 10 s; 60°C/ 30 s; 72°C/ 30 s) ×30; 72°C/ 2 min	cDNK	Test funkcionalne komplementacije u mutantima <i>dss1 U. maydis</i>
UmNdeI /3UTR DV r	98°C/ 30 s; (98°C/ 10 s; 58°C/ 30 s; 72°C/ 30 s) ×30; 72°C/ 2 min	cDNK	Test funkcionalne komplementacije u mutantima <i>dss1 U. maydis</i>

3.9.5. Analiza krive topljenja DNK visoke rezolucije (HRM)

Provera uspešnosti uvođenja CRSIPR/Cas9 mutacija u gene *DSS1(I)* i *DSS1(V)*, između ostalog i uvođenja mutacija van željenih mesta sprovedena je analizom krive topljenja DNK visoke rezolucije (HRM – **H**igh-**R**esolution **M**elting). Visoko osetljiva HRM metoda omogućava detektovanje prisustva promena na nivou jednog nukleotida u sekvenci ispitivanog alela. Ova analitička metoda nakon konvencionalnog PCR se zasniva na detekciji razlika u tačkama topljenja hibridizovanih fragmenata DNK sa i bez mutacije.

Krive topljenja su analizirane softverom MicPCR, Verzija 2.12.2 (*Bio Molecular Systems*, Australija). U ovoj metodi za reakciju PCR je korišćena hemikalija pod nazivom 5× *HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix* (*Solis BioDyne*, Estonija). Komponente 10 µl reakcije su sledeće: 2 µl 5×*HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix*; po 0,25 µl 25 mM prajmera; 1 µl matrice koju predstavlja (2000×) razblažen rastvor PCR produkta; 6,5 µl bdH₂O. HRM reakcija je urađena u *Mic Real Time PCR Cycler* (*Bio Molecular Systems*, Australija), po sledećem programu: 15 min na 95°C i 40 ciklusa u okviru kojih se ponavljaju 3 koraka (15 s na 95°C; 20 s na 60°C; 20 s na 72°C). Standardna kriva topljenja je uporedo generisana sa malim temperaturnim inkrementom koji je iznosio 0.1°C/s. Prajmeri korišćeni u ovoj metodi su navedeni u Tabelama 12 i 13.

3.9.6. Reakcija umnožavanja fragmenata DNK direktno iz bakterijskih kolonija

U cilju brze provere prisustva željenog plazmida u bakterijskim kolonijama izraslih na selektivnoj podlozi korišćena je metoda PCR iz kolonije (*Colony PCR*). U pripremljene tubice od 0,5 ml sa 10 µl vode je ispran nastavak pipetmana kojim je prethodno zahvaćen deo kolonije. Petri šolje su vraćene na adekvatnu temperaturu rasta kako bi se oporavile. Tubice sa sadržajem razblaženih kolonija su stavljane na inkubaciju na 98°C u termoblok (*Thermoblock TB1*, *Biometra*, Nemačka) u trajanju od 6 min i odmah posle prebačene na led. PCR reakcija je puštana po sledećem programu: 95°C na 10 min, 95°C na 40 s, 60°C na 30 s, 72°C na 30 s i poslednja 3 koraka su ponovljena 30 puta.

3.9.7. Elektroforeza DNK na gelu od agaroze

Fragmenti DNK razdvajani su elektroforezom na gelu od agaroze (*SERVA Electrophoresis GmbH*, Nemačka) koncentracije 2% (w/v) u TAE puferu (0,04 M Tris-acetate; 1 mM EDTA). U gel je dodavan etidijum-bromid (*Sigma*, SAD) u koncentraciji 0,5 µg/ml. Raspon napona je bio od 5-10 V/cm gela. Posle završene elektroforeze, DNK je vizualizovana na UV transiluminatoru na talasnoj dužini od 266 nm (*BioDoc Analyzer*, *Biometra*, Nemačka). DNK marker, korišćen kao standard u svim elektroforetskim analizama je bio *GeneRuler DNA Ladder Mix* (*Thermo Scientific*TM, SAD), veličine 100 – 10000 bp.

3.9.8. Prečišćavanje fragmenata DNK sa gela od agaroze

Željeni fragmenti DNK su prečišćeni upotrebom *PureLink*TM *DNA Mini Kit* (*Invitrogen*TM, SAD), prema protokolu proizvođača. DNK je razdvojena elektroforezom na 1-1,5% gelu od agaroze (*Sigma*, SAD), a potom su fragmenti DNK od interesa vizualizovani na UV transiluminatoru, isečeni iz gela skalpelom i inkubirani u 3× većoj zapremini pufera.

3.9.9. Digestija DNK restrikcionim enzimima

U cilju utvrđivanja pravilno ligiranih željenih inserta u vektore ili lineararizovali vektore, rađena je digestija DNK restrikcionim enzimima prema proceduri proizvođača (*Thermo Scientific*, SAD). Reakcija digestije plazmida je trajala 1 h (*Fast Digest enzymes*) ili preko noći, u zavisnosti od tipa enzima. Reakcija restrikcione digestije je prekidana kratkom inkubacijom na 65°C.

3.9.10. Ligacija DNK sa plazmidnim vektorima

Reakciona smeša za ligaciju DNK fragmenta od interesa i vektora je sadržavala 50 - 100 ng plazmidnog vektora u 1× T4 DNK ligacionom puferu sa 1 U T4 DNK ligaze (*Thermo Scientific*, SAD). Kako bi se povećala efikasnost i prinos ligacije, insert je bio u 3 puta molarnom višku u odnosu na vektor. Reakciona smeša je inkubirana preko noći na 16°C.

3.9.11. Sekvenciranje DNK

Uslužno sekvenciranje plazmidne DNK je rađeno u kompaniji *MacroGen Europe BV*, Holandija (<https://dna.macrogen.com/>).

3.10. Osnovne procedure rada sa RNK

3.10.1. Ekstrakcija ukupne RNK iz biljnog materijala

Ukupna RNK je izolovana i prečišćena iz razorenog biljnog tkiva korišćenjem *GeneJET RNA Purification* kita (*Thermo Scientific*, SAD) prema uputstvu proizvođača. Na kraju je izmerena koncentracija RNK pomoću spektrofotometra *BioSpec-nano* (*Shimadzu*, Japan).

3.10.2. Izolacija RNK iz dormantnih i imbibovanih semena

U cilju ispitivanja profila ekspresije gena u fazi dormantnog i imbibovanog semena *A. thaliana*, izolovana je ukupna RNK.

U avanu pomoću tučka i tečnog azota usitnjeno je 100 mg semena i snažno promešano sa 700 µl ekstrakcionog pufera (8 M guanidin-hidroklorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA, 2% β-merkaptoetanol pH 7,0). Nakon što je dodat fenol (*Sigma*, SAD) u razmeri 1:1, uzorak je intezivno promešan na mešalici i taložen na 12000 rpm, 2 min (*Centrifuge 5415D*, *Eppendorf*, Nemačka). Supernatant je prebačen u nove tube i dodat mu je isti volumen rastvora SEVAG

(fenol:hloroform:izoamilalkohol = 25:24:1), posle mešanja, smeša je oborena na 12000 rpm, 2 min. Gornja faza je prebačena u nove tube i ponovljen je prethodni korak. Gornja faza je opet odvojena u nove tube sa dva puta većim volumenom apsolutnog etanola i 1/20 volumena 4 M Na-acetata pH 5,2, a potom lagano izmešana i inkubirana na -20°C, 30 min. Posle centrifugiranja 10 min na 12000 rpm, RNK talog je opran u 70% etanolu, osušen na ledu i rastvoren u 100 µl bdH₂O.

Za izolaciju RNK iz imbibovanih semena je korišćen sličan pristup. Nakon 4 dana inkubacije semena na vlažnom filter papiru, imbibovana semena su isprana sa papira pomoću bdH₂O u avan. Voda iz avana je pokupljne pipetmanom i pomoću suvog filter papira. U 100 mg usitnjenog biljnog materijala do praha je sipano 500 µl zagrejanog ekstrakcionog pufera (8 M guanidin-hidrohlrorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA, 2% β-merkaptotanol pH 7,0) na 80°C i isto toliko fenola, mešano 30 s da bi se homogenizovalo. Zatim je dodato 250 µl smeše hloroform-izoamilalkohol (24:1) i promešano na voteksu (*Vortex-Genie 2*, SAD). Nakon obaranja u centrifugi na 12000 rpm, 5 min na +4°C (*Centrifuge 5415D*, *Eppendorf*, Nemačka), gornja faza je odvojena u čistu tubu i ponovljen je prethodni korak. Posle ponovnog centrifugiranja, u tečnu fazu u novoj tubici je dodato isto toliko volumena 4 M LiCl i ostavljeno da precipitira preko noći na +4°C. Narednog dana, nakon što je uzorak oboren na maksimalnoj brzini, 20 min, +4°C, tečni deo je odbačen, a talog rastvoren u 250 µl bdH₂O. Zatim je dodato 1/3 od volumena Na-acetata pH 5,2 i duplo veći volumen apsolutnog etanola. Inkubirano je 30 min na -80°C i supernatant je odbačen nakon centrifugiranja na 12000 rpm, 20 min na +4°C. Talog je ispran u 70% etanolu i oboren 10 min. RNK je resuspendovana u bdH₂O.

Koncentracija ekstrahovane RNK je izmerena na *NanoVue™ Plus* spektorfotometru (*GE Healthcare*, UK).

3.10.3. Tretman dezoksiribonukleazom (DNazom)

Pre reverzne transkripcije vršen je DNazni tretman (*DNA-free™ DNA Removal Kit*, *Invitrogen*, SAD) RNK uzoraka u cilju uklanjanja zaostale genomske DNK. Po najviše 10 µg RNK pojedinačnih uzoraka biljnog tkiva, pomešano je sa 5 µl 10× pufera i 1 µl rDNaze tipa I u tubama od 0,5 ml, tako da finalna zapremina bude 44 µl. Uzorci su inkubirani 30 min na 37°C u termobloku (*Thermoblock TBI*, *Biometra*, Nemačka). Zatim je reakcija zaustavljena sa 5 µl inaktivatora DNaza I i inkubirana 2 min na sobnoj temperaturi uz povremeno mućkanje. Posle obaranja na 10000 g, 1,5 min u centrifugi (*Centrifuge 5424*, *Eppendorf*, Nemačka), 40 µl supernatanta je prebačen u nove tube i izmerena je koncentracija RNK na *BioSpec-nano* (*Shimadzu*, Japan).

3.10.4. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)

Za sintezu cDNK korišćen je *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Thermo Scientific™*). Iz svakog uzorka je uzeta neophodna zapremina u odnosu na pojedinačne koncentracije vodenog rastvora RNK uzoraka tako da bude dovoljno RNK za reakciju (0,1-5 µg), zatim je dodato 1 µl nasumičnih heksamernih prajmera (0,2 µg/ µl) i „*Nuclease-free*“ vode do 6,5 µl finalne zapremine. Takva smeša je inkubirana 5 min na 65°C. Nakon inkubiranja, uzorci se odmah ohlađeni na ledu, 2 min i dodate su sledeće komponente: 4 µl 5× reakcionionog pufera, 2 µl 10 mM dNTP smeša, 0,5 µl RNaze (*RiboLock RNase Inhibitor* (40 U/µl)) i 1 µl reverzne transkriptaze (*RevertAid RT* (200 U/µl)). Reakcija je nastavljena po sledećem programu: 25°C, 10 min; 42°C, 60 min i 70°C, 10 min u PCR mašini (*TProfessional Thermocycler*, *Biometra*, Nemačka).

3.10.5. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (*Real time PCR - qPCR*)

PCR u realnom vremenu (*Real time PCR - qPCR*) omogućava da se umnoženi proizvod detektuje i meri kako reakcija napreduje. Uzorci cDNK su razblaženi 1:5 „*Nuclease-free*“ vodom. Alikvoti istog cDNK uzorka upotrebljeni su kao matrica za qPCR sa prajmerima koji su navedeni u Tabeli 9, 10 i 11. Reakcija je urađena na ploči od 96 bunarića, ili u tubicama, i korišćen je *Maxima*

SYBR Green qPCR Master Mix (2X), with separate ROX vial (*Thermo Scientific™*, SAD) za praćenje ekspresije gena. Ukupni volumen reakcione smeše je 12,5 µl i sadrži 6,25 µl *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2×)*, po 0,5 µl specifičnih prajmera (10 pmol), 0,25 µl H₂O i 1 µl cDNK razblažene matrice. Reakcije su izvođene u triplikatima korišćenjem 7500 Real-Time PCR Systems aparata (*Applied Biosystems*) ili u *Magnetic Induction Cycler (Mic qPCR, Bio Molecular Systems, Australija)*. Reakcije su se odvijale po sledećem programu: 50°C, 2 min; 95°C, 10 min, za čim je sledilo 40 ciklusa od po 15 sekundi na 95°C i 1 min na 60°C. Akumulacija PCR produkata je detektovana u realnom vremenu i rezultati su analizirani u *Excel* tabeli (*Microsoft office, SAD*). Relativna ekspresija analiziranih gena prikazana je kao $2^{-\Delta Ct}$, gde je ΔCt razlika između Ct vrednosti target gena i endogene kontrole.

3.10.6. Sekvenciranje i analiza transkriptoma

Sekvenciranje transkriptoma i bioinformatička analiza rezultata je rađena u kompaniji *Novogene* (<https://en.novogene.com/>). Ova usluga je obuhvatila utvrđivanje količine i kvaliteta uzoraka izolovane totalne RNK, pripremu iRNK biblioteke, sekvenciranje (*Illumina Novaseq platform*). Takođe, izvršena je i analiza rezultata: kontrola kvaliteta; mapiranje prema referentnom genomu (softver *HISAT2- Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts 2*); kvantifikacija nivoa genske ekspresije preko FPKM (od eng. **F**ragments **P**er **K**ilobase of transcript sequence per **M**illions base pairs sequenced); testiranje diferencijalne ekspresije (od eng. *DEGs*) (softver *DESeq2 R*); *Enrichment analysis* - funkcionalna GO (od eng. **G**ene **o**ntology) i KEGG (od eng. **K**yoto **E**ncyclopedia of **G**enes and **G**enomes) analiza.

3.11. Osnovne procedure rada sa proteinima

3.11.1. Ekstrakcija ukupnih proteina

Izdvojeno je 100 mg samlevenog biljnog materijala (koren i list ili klijanci) uz pomoć tučka i avana u tečnom azotu. Za izolovanje proteina korišćen je ekstrakcioni pufer koji je sadržao 25 mM trisaminometan (Tris) - HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 0,1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) i 50 mM ditiotritol (DTT). DTT je dodat da bi inhibirao dalju oksidaciju proteina koja je mogla da se javi nakon lize ćelija. Tokom 60 min inkubacije na ledu, uzorci su snažno povremeno mešani na vorteksu (*Vortex-Genie 2, SAD*), a zatim centrifugirani 20 min na 10000 g (*Centrifuge 5417R, Eppendorf, Nemačka*). Supernatant je korišćen za dalje analize.

3.11.2. Vertikalna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu pod denaturišućim uslovima (SDS-PAGE)

Proteinski uzorci su analizirani SDS-PAGE metodom (sodium dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza). Uzorci za analizu su pripremani tako što su rastvarani u puferu za uzorak (125 mM Tris, pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 0,025% boja bromfenol plavo; 4% β-merkptoetanol). Ovako pripremljeni uzorci su inkubirani 5 min na 100° C. U 12% ili 15% akrilamidnim gelovima proteini su razdvajani prema molekulskoj masi prema modifikovanoj metodi po Laemmli-ju (Laemmli, 1970). Denaturišući SDS poliakrilamidni gel sastoji se iz dva dela: za koncentrovanje uzorka (od eng. *stacking gel*) i gela za razdvajanje uzoraka (od eng. *running gel*). 12% SDS-poliakrilamidni gelovi su korišćeni za analizu oksidativnog statusa ukupnih proteina ili za verifikaciju proteinskih izolata tako što je gel dalje bojen **C**omassie **b**rilliant **b**lue bojom R-250 (0,25%) (CBB). 15% SDS-poliakrilamidni gel korišćen za imunoblot detekciju DSS1 proteina. Sastav delova gelova je detaljno izlistan u Tabeli 24. Dimenzije gelova su bile 8 × 5 cm, dok je njihova debljina bila 1 mm.

Tabela 24. Procedura za pravljenje 12% i 15% SDS-poliakrilamidnih gelova.

Gel za razdvajanje uzoraka			Gel za koncentrovanje uzoraka	
Komponente	Količina komponenti za 5 ml		Komponente	Količina komponenti za 2 ml
Rastvor akriamida-bis akrilamid(29:1) (30% w/v) (<i>SERVA</i> , Nemačka)	12%	15%	Rastvor akriamida-bis akrilamid (29:1) (30% w/v) (<i>SERVA</i> , Nemačka)	5%
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,3 ml		1 M Tris-HCl pH 6,8	130 μ l
10% SDS	50 μ l		10% SDS	20 μ l
10 % amonijumpersulfat (APS)	50 μ l		10 % amonijumpersulfat (APS)	20 μ l
tetrametiletilendiamin (TEMED)	2 μ l		tetrametiletilendiamin (TEMED)	2 μ l

Neposredno pre nanošenja na gel, uzorci (25 μ g) su pomešani sa 4 \times koncentrovanim denaturišućim puferom za uzorak (125 mM Tris pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 0,2 M DTT ili 4% β -markaptoetanol) koji je sadržao boju (0,02%, brom-fenol plavo), a zatim denaturisani na 95°C, 5 min. Radi određivanja molekulske mase proteina, korišćeni su komercijalni proteinski markeri (*PageRuler*, *ThermoFisher Scientific*, SAD), veličine u proseku od 10-180 kDa.

Totalni proteinski ekstrakti su razdvojeni elektroforezom u TGB puferu (25 mM Tris, 250 mM glicin, 0,1% SDS u ddH₂O) pri naponu od 130 V i jačini struje od 30 mA (*Biometra* aparatura za vertikalnu elektroforezu).

Vizualizacija proteina je vršena bojenjem gelova bojom CBB rastvorenoj u 45% metanolu i 10% sirćetnoj kiselini i njihovim obezbojavanjem u rastvoru 45% metanola i 10% sirćetne kiseline (Sambrook et al., 1989).

3.11.3. Poluvlažni prenos proteina sa gela na PVDF membranu

Transfer proteina je sproveden na odgovarajuće poliviniliden-difluorid (PVDF) membrane sa porama veličine 0,45 μ m (Immobilone-P, Millipore, MA, SAD), korišćenjem *Semi-dry Fastblot B43* transfer sistem (*Biometra*, *Analytik Jena*, Nemačka). Izuzetak je 15% poliakrilamidni gel koji je nakon elektroforeze podeljen na dva dela i prenos je rađen u 2 zasebna sistema za transfer u cilju efikasnijeg prenosa proteina od interesa, a i kasnije imunodetekcije.

Standardna procedura počinje potapanjem gela u katodnom puferu (25 mM Tris pH 9,4; 40 mM glicin; 20% (v/v) metanol) u trajanju od 5 min. Anoda sistema je nakvašena anodnim puferom I (300 mM Tris pH 10,4; 20% metanol), dva sloja 3 MM papira u dimenziji gela, su natopljeni anodnim puferom I i postavljena na anodu. Jedan sloj 3 MM papira nakvašen je anodnim puferom II (25 mM Tris, pH 10,4; 20% (v/v) metanol) i dodat u "sendvič" za transfer. Prethodno isečena PVDF membrana po dimenzijama poliakrilamidnog gela, je kratko aktivirana u metanolu (2 s), a zatim je oprana u vodi 5 min i inkubirana u anodnom puferu II dodatnih 5 min. Membrana je nakon inkubacije stavljena u "sendvič" i prevlačenjem pomoću staklenog štapića preko membrane istisnuti su mehurići. Gel je nakon toga stavljen na membranu i dodata su tri sloja 3 MM papira prethodno potopljena u katodni pufer. Elektrotransfer je u ovom sistemu vršen tako što je postupak prenošenja proteina sa gela na membranu odgovarajuće površine trajao 20 min (za detekciju proteina DSS1) i 40 min (za detekciju aktina) pri konstantnoj jačini struje od 5 mA po 1 cm², prema uputstvu proizvođača.

3.11.4. Imunoblot analiza

Po završetku transfera, membrane su inkubirane preko noći u puferu za blokiranje, koji sadrži 5% goveđeg seruma albumina (*BSA, Bovine Serum Albumin, Sigma, SAD*) rastvorenog u fosfatnom puferu (PBS - 50 mM NaCl, 40 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄) soli sa 0,1% deterdžentom Tween® 20 (*Sigma, SAD*) (PBST pufer) uz konstantno obilivanje na klackalici na +7°C. Posle toga su membrane isprane 1× 15 min i 2× 5 min u PBST puferu. Potom je membrana sa proteinima veće molekulske mase inkubirana u rastvoru primarnog antitela specifičnog na aktin (ab197345, *abcam, UK*). Druga polovina membrane, na kojoj su proteini manje molekulske mase, su potopljeni u rastvor primarnog antitela na protein DSS1 (FL-70, *SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., SAD*), preko noći na +7°C. Višak antitela je sa membrane ispran u PBST puferu (1× 15 min i 2× 5 min), a zatim su inkubirani u rastvoru istog sekundarnog antitela kuplovanih sa HRM (HAF008, *R&D Systems™, SAD*). Detaljna specifikacija antitela i procedura pripreme rastvora primarnih i sekundarnih antitela se nalaze u Tabeli 25. Prema protokolu proizvođača, hemiluminiscentna detekcija je urađena pomoću *the Immobilon Western Chemiluminescent Horseradish Peroxidase (HRP) Substrate (Millipore)*. Membrana je pokrivena 0,1 ml supstratom za peroksidazu po 1 cm², koji je sačinjen od rastvora peroksida i reagensa luminola u razmeri 1:1. Nakon reakcije u trajanju od 5 min, signal je zabeležen digitalnim sistemom za slikanje (*the ChemiDoc Imaging System, Bio Rad, SAD*). Kvantifikacija oksidovanih proteina je urađena denzitometrijskom analizom u softveru *ImageJ*.

Tabela 25. Primarna i sekundarna antitela korišćena u imunoblot analizi.

Primarno antitelo	Razblaženje	Uslovi inkubacije	Sekundarno antitelo	Razblaženje	Uslovi inkubacije
Zečje anti-DSS1 antitelo	1:1000 u 1% BSA u puferu PBST	1 h na ST	koziji HRP-konjugovani anti-zečji-IgG	1:1000 u 1% BSA u puferu PBST	1h na ST
Zečje anti-aktin antitelo	1:1000 u 1% BSA u puferu PBST	1 h na ST			

3.11.5. Oksiblot analiza

Ukupni biljni proteinski ekstrakti su analizirani brzim i senzitivnim pristupom za detekciju proteina modifikovanih ROS formama - Oksiblot metodom. Ova metoda omogućava detekciju karbonilovanih grupa u bočnim lancima oštećenih proteina oksidativnim stresom. Priprema i analiza uzoraka je rađena prema uputstvu *OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (Merck Millipore, SAD)*. U 5 µL (25 µg) izdvojenog proteinskog izolata je dodato 5 µL 12% SDS kako bi finalna koncentracija bila 6% SDS. Proces derivatizacije uzoraka je urađen po principu dodavanja 10 µL komercijalnog rastvora 1×2-4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Nakon inkubacije 15 min na sobnoj temperaturi i dodavanja 7,5 µL neutralizacionog pufera, uzorci su bili spremni i čuvani su maksimalno do 7 dana na +4°C. Zatim je po 10 µL derivatizovanih uzoraka nanošeno i razdvojeno na 12% poliakrilamidnom gelu, metodom SDS-PAGE, a potom je vršen njihov transfer na PDFV membranu (procedura opisana u Odeljku 3.11.3.). PDFV membrana nakon prekonoćne inkubacije u puferu za blokiranje je kratko isprana u 1×PBS-T i svi naredni koraci su rađeni na sobnoj temperaturi. Zatim je membrana potopljena 60 min u primarno antitelo (zečji anti-2,4-dinitrofenilhidrazon (DNP), razblaženje 1:150 u 1% BSA). Membrana je nakon toga isprana u 1×PBS-T na sledeći način: 1× 15 min, potom 2× po 5 min. U narednom koraku membrana je 60 min inkubirana u sekundarnom antitelu (kozije HRP-konjugovano anti-zečji-IgG, razblaženje 1:150 u 1% BSA u PBST puferu). Ponovljen je identičan korak pranja membrane kao što je opisano prethodnjem koraku. Signal hemiluminiscencije je vizualizovan kao što je prethodno opisano u odeljku 3.11.4., na *ChemiDoc*

Imaging System (Bio Rad, SAD) uz ekspoziciju membrane u trajanju od 30 s. Kvantifikacija oksidovanih proteina je urađena denzitometrijskom analizom u softveru *ImageJ*.

3.12. Procedura bojenja pomoću DAB za detekciju vodonik-peroksida u biljnom tkivu

Nakon primenjenog tretmana oksidativnim stresom, na klijancima (5-6 biljaka) je uređena *in situ* detekcija molekula vodonik-peroksida bojenjem pomoću DAB (3,3'-diaminobenzidine) (*SERVA*, Nemačka) (Thordal-Christensen & Zhang, 1997). Klijanci su potopljeni u 5 ml sveže pripremljeni vodeni rastvor DAB (1 mg/ml, pH 3,8) u staklene boce sa poklopcem (do 6 ml zapremine). Tako pripremljeni klijanci su inkubirani u mraku tokom 24 h, uz konstatno obilivanje na klackalici. U cilju fiksiranja DAB boje i uklanjanja hlorofila iz tkiva klijanaca, obojeni klijanci su prebačeni u 10 ml etanola (100%) u pripremljene tube zapremine 15 ml i zagrevani 20 min na 100°C uz periodično mešanje. Vizualizacija DAB bojenja je sprovedena na klijancima postavljenim na plastičnu podlogu sa 60% glicerola. Izgled obojenih klijanaca pomoću DAB je zabeležen fotografijama.

3.13. Procedura za određivanje nivoa lipidne peroksidacije

U prikupljenom biljnom materijelu analiziran je nivo lipidne peroksidacije kao mera nivoa oksidativnog stresa u biljnim ćelijama nakon tretmana. Merenje je sprovedeno detekcijom koncentracije produkta malondialdehida (MDA), kao markera oksidativne degradacije lipida, koji nastaje u reakciji sa tiobarbituratnom kiselinom (TBA) (Heath & Packer, 1968). Prethodno zamrznuti biljni materijal, samleven je u avanu sa tečnim azotom pomoću tučka. Približno je odvojeno 100 mg samlevenog materijala u 1,5 ml tube u duplikatu i rastvoreno u 800 µl 20% trihlorsirćetne kiseline (TCA), promešano i ohlađeno na ledu. Zatim je talog centrifugiran na 13000 rpm, 20 min na temperaturi od +4°C u hladnoj centrifugi (*Centrifuge 5417 R, Eppendorf*, Nemačka). U prethodno pripremljene 1,5 ml tubice, sa izbušenim poklopcem pomoću igle, izdvojeno je 600 µl supernatanta i pomešano sa istom zapreminom 20% TCA koja je sadržala 0,5% TBA. Takva smeša je inkubirana 30 min u vodenom kupatilu (*Memmert Waterbath WBU 45*, Nemačka) na 95°C, brzo ohlađena na ledu 5 min i centrifugirana na 13000 rpm, 30 min na +4°C. Količina MDA je dobijena razlikom između specifične apsorbancije supernatanta na talasnoj dužini 532 nm i nespecifične apsorbancije na 600 nm na spektrofotometru (*Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences*, UK). Nivo lipidne peroksidacije izražen je u sadržaju MDA po količini biljnog tkiva u reakcionoj smeši, tj. kao nmol MDA po gramu sveže mase i izračunat korišćenjem ekstinkcionog koeficijenta 155 mM⁻¹cm⁻¹.

3.14. Statistička obrada podataka

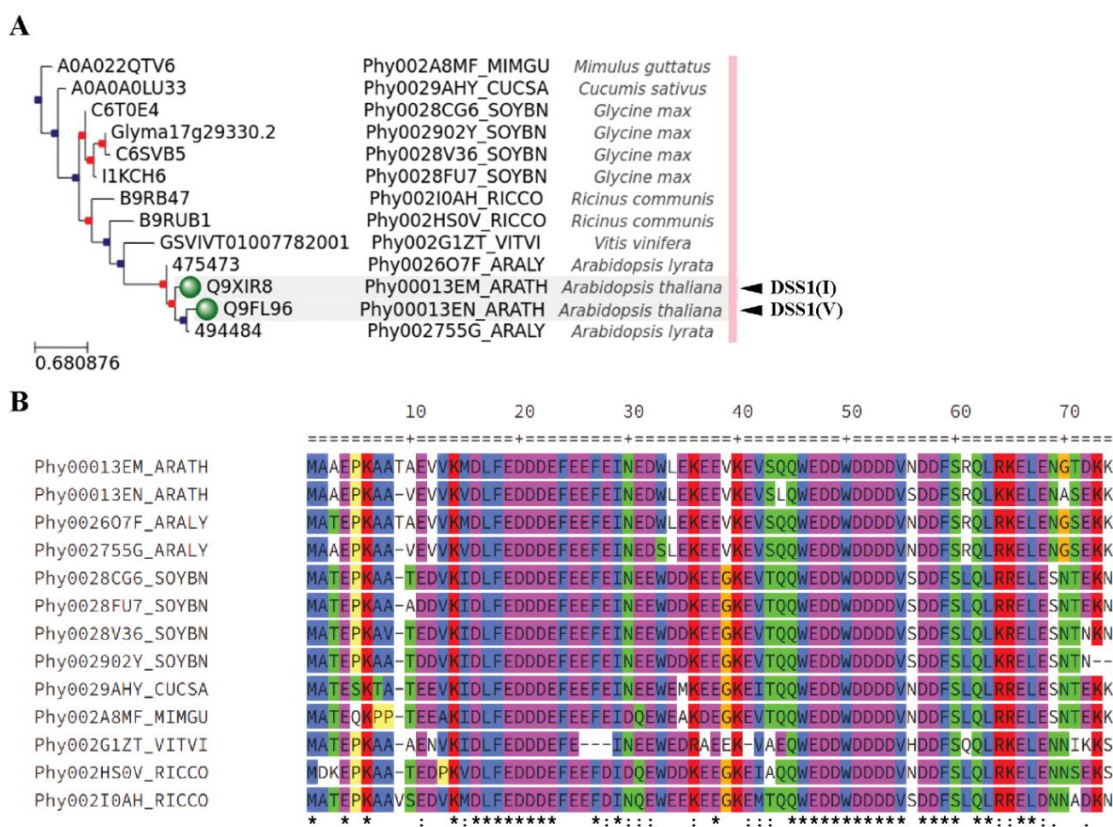
Prikupljeni podaci su statistički obrađeni u programu *Excel (Microsoft Office 2016, SAD)* i prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD), koja je dobijena u ponovljenim biološkim eksperimentima i ponovljenim merenjima u okviru svakog od eksperimenta. Program *GrafPad Prism 8.0* je korišćen za određivanje statističke značajnosti, upotrebom *Turkey's multiple comparison test* kroz *two-way* analizu varijanse (od eng *Analysis of Variance*, ANOVA). U slučajevima gde je *p* vrednost iznosila manje od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Filogenetska analiza proteina DSS1 u biljnom svetu

Prvi korak u analizi DSS1 proteina *A. thaliana* bila je *in silico* filogenetska analiza, koja je vršena u programu *PhylomeDB* (Fuentes et al., 2021). Izvedeni su evolucionni podaci iz javne baze *PhylomeDB* koja sadrži anotirane sekvence, poravnanja i filogeniju homolognih gena. Za ulazne parametre su upotrebljeni nazivi gena *DSS1(I)* i *DSS1(V)* na osnovu kojih je dobijeno filogenetsko stablo evolutivno srodnih biljnih proteina DSS1 (Slika 16A). Prema pozicioniranju oba gena *DSS1* u biljnom svetu ovih visoko konzerviranih neuređenih proteina, baza *PhylomeDB* je omogućila predikciju paraloga i ortologa za ovu familiju gena. Pretpostavlja se da nakon razdvajanja nove vrste od *Vitis vinifera* dolazi do događaja duplikacije gena *DSS1* kod vrsta *A. lyrata* i *A. thaliana*. Predikcija ukazuje na to da je rezultat tog događaja tokom evolucije nastanak gena *DSS1(V)*.

Primarne proteinske strukture vrsta dobijenih generisanjem filogenetskog stabla, su međusobno poređene i analizirane u programu *Clustal Omega* (Sievers et al., 2011). Dobijeni rezultati jasno ukazuju na visoku homologiju, tj. konzervisanost proteina DSS1 u biljnom svetu (Slika 16B). Pretraživanjem baze *UniProt*, utvrđeno je da su svi proteini hipotetički i da su jedino detektovani na nivou transkripata gena označenih C6T0E4 i C6SVB5 kod vrste *Glycine max* (Sievers et al., 2011). Konstruisanje filogenetskog stabla je imalo za cilj da otkrije evolutivnu vezu između oba proteina DSS1 *A.thaliana* i ostalih srodnih biljnih vrsta.

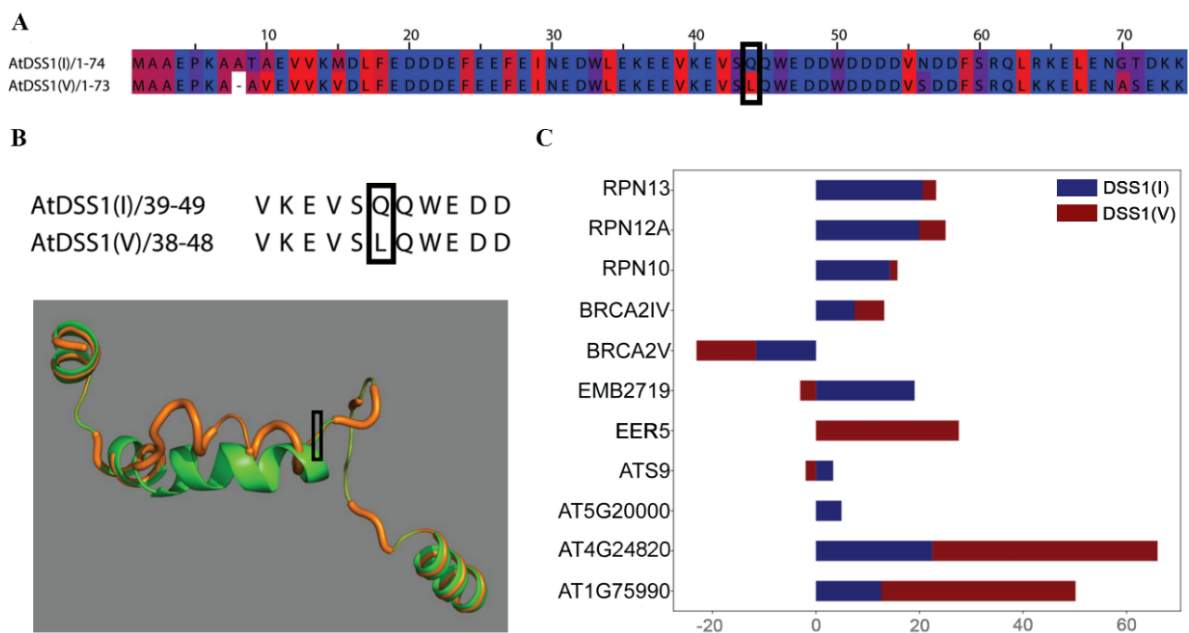


Slika 16. Filogenetska analiza proteina DSS1(I) i DSS1(V) *A. thaliana* upotrebom Web programa *PhylomeDB* i *Clustal Omega*. (A) Filogenetsko stablo DSS1 bliskih ortologa i paraloga u biljnom svetu koje predstavlja hipotetičke evolutivne pretke. Plavi čvor na mestu grananja filogenetskog stabla označava razdvajanje nove grupe od predačke vrste; crveni čvor duplikaciju tokom evolucije; zelenim krugom su obeleženi proteini od interesa; *UniProt* pristupni brojevi su izlistani uz filogenetsko stablo; desno od stabla su izlistana *PhylomeDB* imena za iste proteine; u desnoj koloni su navedena specifična imena biljnih vrsta iz kojih potiče protein. (B) Poređenje aminokiselinskih sekvenci biljnih proteina DSS1. Aminokiseline su obeležene bojama na sledeći način: plavom – male hidrofobne; ljubičastom – kisele; crvenom – bazne; zelenom – polarne nenaelektrisane; žutom - prolina; narandžastom – glicin. Pozicije u sekvenci označene zvezdicom su visoko konzervirane; dve tačke ukazuju na konzervisanost između aminokiselinskih grupa sa sličnim osobinama; tačka ukazuje na konzervisanost između grupa sa manje sličnim osobinama.

4.2. *In silico* komparativna analiza proteina DSS1(I) i DSS1(V) i predikcija njihovih specifičnih interakcije sa drugim proteinima

Aminokiselinska sekvenca DSS1(I) i DSS1(V) je analizirana korišćenjem algoritma PSIPRED (Buchan & Jones, 2019), i poređenja sekvenci su prikazana na Slici 17, gde su plavom bojom obeležene hidrofилne, a crvenom bojom hidrofobne aminokiseline. Uočava se visok nivo homologije između ove dve izoforme, pri čemu je pokazano da je DSS1(V) za jednu aminokiselinu kraći od DSS1(I) proteina i da postoji razlika u osam aminokiselina. Među tih osam razlika, samo jedna je značajnija promena– iz polarnog glutamina u nepolarni leucin na poziciji 44 (Q44L) (Slika 17A, crni kvadrat). U zavisnosti od primarne proteinske strukture pretpostavlja se da postoji potencijalna razlika u savijanju proteina između izoformi DSS1 koja je prikazana na Slici 17B. Mutacija anotirana Q44L koja pravi razliku u polarnosti između DSS1 tipova, može uticati na drugačiju prostornu organizaciju proteina.

Zbog neuređene prirode proteina DSS1, rezultati dokinga nisu mogli da budu dovoljno precizni da bi se objasnila razlika između DSS1(I) i DSS1(V) u interakcijama sa njihovim partner proteinima. Svakako, poređenje PPI (protein protein interakcija) između dva DSS1 i njihovih potencijalnih partnera bila bi korisna u svojstvu tumačenja evolutivnog značaja promene samo jedne aminokiseline. Na Slici 17C predstavljen je grafik energije vezivanja DSS1 izoformi za partner proteine. Prema energiji vezivanja, DSS1(I) se lakše vezuje za regulatorne subjedinice „kape“ 26S proteazoma (od eng. RPT6B - *Regulatory particle triple-AATPase subunit 6b* ili regulatorna subjedinica 8 homolog B 26S proteazoma) i EMB2719 (od eng. *EMBRYO DEFECTIVE 2719*, pristupni broj lokusa: AT1G20200). Nasuprot tome, sa manje afiniteta se vezuje za *Heat shock* protein 70-1 hloroplasta (pristupni br. lokusa: AT4G24280) i PCI/PINT asocirani modul (PAM) domen protein (pristupni br. lokusa: AT1G75990). DSS1(I) i DSS1(V) su pokazali međusobno slične energije vezivanja kako za protein BRCA2V (BRCA2B na Slici 18B), tako i za ATS9 (od eng. *non-ATPase subunit 9*). U prilog energijama vezivanja, protein EER5 (od eng. *enhanced ethylene response 5 protein*, pristupni br. lokusa: AT2G19560) jedino može da se veže za DSS1(V), dok protein iz familije ATPaze AAA-tipa (pristupni br. lokusa: AT5G2000) je isključivo partner proteinu DSS1(I). Na Slici 18. su prikazani parametri pomoću kojih su dobijene neophodne energije PPI za obe izoforme DSS1.



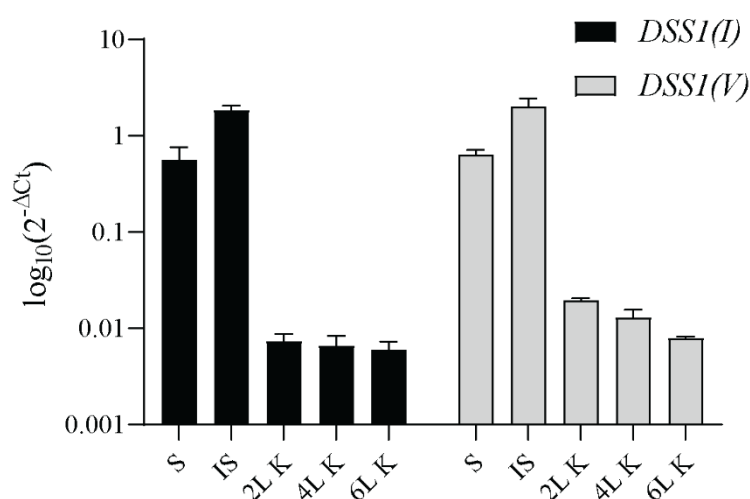
Slika 17. *In silico* analiza aminokiselinske sekvence proteina DSS1 i protein-protein interakcija. (A) Poređenje primarnih sekvenci proteina DSS1(I) i DSS1(V), koje su obojene prema hidrofobnosti aminokiselina: crveno – hidrofobna; plavo – hidrofilna. Crni kvadrat ukazuje na značajnu razliku u jednoj aminokiselini, promeni iz glutamina u leucin na poziciji 44 (Q44L). (B) Vizuelni prikaz poređenja mogućih konformacija proteina DSS1(I) i DSS1(V) preko 3D protein modela izvedenog pomoću PHYRE V 2.0; crnim pravougaonikom je uokvirena promena glutamina (Q) u leucin (L) na poziciji 44. (C) Energije vezivanja izražene u kcal/mol za date specifične proteinske partnere; fizičke osobine PPI su izračunate upotrebom softvera *PatchDock* i *FireDock*.

		GBE	ACE	HB	ALIPH
	inter_2				
	inter_1				
AT1G75990	dss1	12.646667	4.775556	-1.813333	-0.833333
	dss5	37.482857	4.454286	-2.390000	-2.214286
AT4G24820	dss1	22.474000	4.867000	-1.342000	-0.500000
	dss5	43.506250	4.695000	-1.367500	-0.375000
AT5G20000	dss1	4.911818	7.035455	-1.869091	-0.727273
ATS9	dss1	3.304444	2.781111	-0.922222	-0.222222
	dss5	-1.987778	2.115556	-0.858889	-0.444444
EERH5	dss5	27.595833	5.945833	-1.957500	-1.416667
EMB2719	dss1	19.040000	6.229167	-2.310833	-0.791667
	dss5	-3.043333	3.983333	-0.510000	0.000000
brca2B	dss1	-11.611333	1.464000	-1.312000	-2.133333
	dss5	-11.460667	1.633333	-1.339333	-1.733333
brca2IV	dss1	7.463750	3.525000	-1.653750	0.000000
	dss5	5.709091	3.500909	-1.635455	-0.500000
rpn10	dss1	14.307059	4.128824	-1.640000	-0.558824
	dss5	1.425000	5.994375	-2.035625	-0.750000
rpn12a	dss1	19.924000	4.293000	-1.301000	-0.800000
	dss5	5.108182	3.272727	-0.903636	-0.500000
rpn13	dss1	20.591818	5.419091	-1.891818	-1.181818
	dss5	2.602727	1.583636	-0.997273	-0.545455

Slika 18. Energija protein-protein interakcija. Proračuni globalne energije vezivanja (GBE), stanje nevezanih kompleksa (ACE), vodonične i disulfidne veze (HB) i alifatične interakcije (ALIPH) između datih proteina i DSS1(I) (dss1 na slici), odnosno DSS1(V) (dss5 na slici).

4.3. Ekspresija gena *DSS1* u ranim fazama razvića *A. thaliana*

Kako u literaturi ne postoje podaci o nivou ekspresije *DSS1* izoformi kroz razviće i u uslovima stresa, vršena je analiza ekspresije oba gena *DSS1* upotrebom qPCR (Slika 19). Profili ekspresije *DSS1* transkripata su praćeni u ranim fazama razvića *A. thaliana*. Analizirane su ekspresije u dormantnim semenima, imbibovanim semenima, kao i u klijancima sa dva lista (primarni par listova rozete), četiri lista (sekundarni par) i šest listova (tercijarni par). Oba gena pokazuju izraženo povećanu ekspresiju (oko 10 puta) u dormantnim i imbibovanim semenima u odnosu na faze nakon početka klijanja. Dok klijanci u fazama 2, 4 i 6 listova imaju nepromenjen nivo ekspresije za gen *DSS1(I)*, nivo ekspresije *DSS1(V)* pokazuje postepeni trend opadanja tokom razvića.



Slika 19. Profil relativne ekspresije gena *DSS1(I)*, odnosno *DSS1(V)* kroz rane faze razvića *A. thaliana*. Na apscisi su predstavljene faze semena i klijanaca: dormantno seme (S), imbibovano seme (IS), klijanci sa: dva lista (2L K); četiri lista (4L K); šest listova (6L K). Na ordinati su prikazane vrednosti relativne ekspresije izražene kao $\log_{10}(2^{-\Delta C_t})$. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD dobijena od ponovljenih merenja iz zbirnog uzorka od 50-70 biljaka.

4.4. Ekspresija gena i proteina *DSS1* u oksidativnom stresu indukovanom vodonik-peroksidom i metil-viologenom u *A. thaliana*

Na početku istraživanja je bilo neophodno ispitati kakav je efekat abiotičkog stresa na ekspresiju dva visoko homologna gena *A. thaliana* koja kodiraju dve izoforme proteina *DSS1*. Za dobijanje profila ekspresije gena *DSS1(I)* i *DSS1(V)* tokom oksidativnog stresa, biljke *A. thaliana* su rasle do faze odraslih biljaka u hidroponičnom sistemu za uzgajanje i nakon pet nedelja od klijanja izložene su koncentracijama 5 mM i 10 mM vodonik-peroksida (H_2O_2) (Slika 22). Na Slikama 20 i 21 su predstavljeni hidroponični sistemi za gajenje klijanaca i odraslih biljaka *A. thaliana*. Upotrebene toksične koncentracije H_2O_2 su preuzete iz ranijih studija (Akter et al., 2017). Kako bi promene koje se dešavaju pod uticajem oksidativnog stresa bile uočljivije, odgovor na nivou ekspresije gena je testiran u dve vremenske tačke: prvog i trećeg dana tretmana. S obzirom na to da su prve mete u peroksidaciji lipidi i lipoproteini u ćelijskoj membrani, urađen je esej lipidne peroksidacije za procenu oksidativnog statusa (Slika 22A). Nakon trećeg dana od izlaganja H_2O_2 , u biljnim uzorcima nivo lipidne peroksidacije je bio značajno povećan u listovima i korenovima tretiranih biljaka u poređenju sa kontrolnim biljkama. Povećana lipidna peroksidacija nije detektovana u listovima i korenovima tretiranih biljaka nakon prvog dana tretmana vodonik-peroksidom u hidroponici.



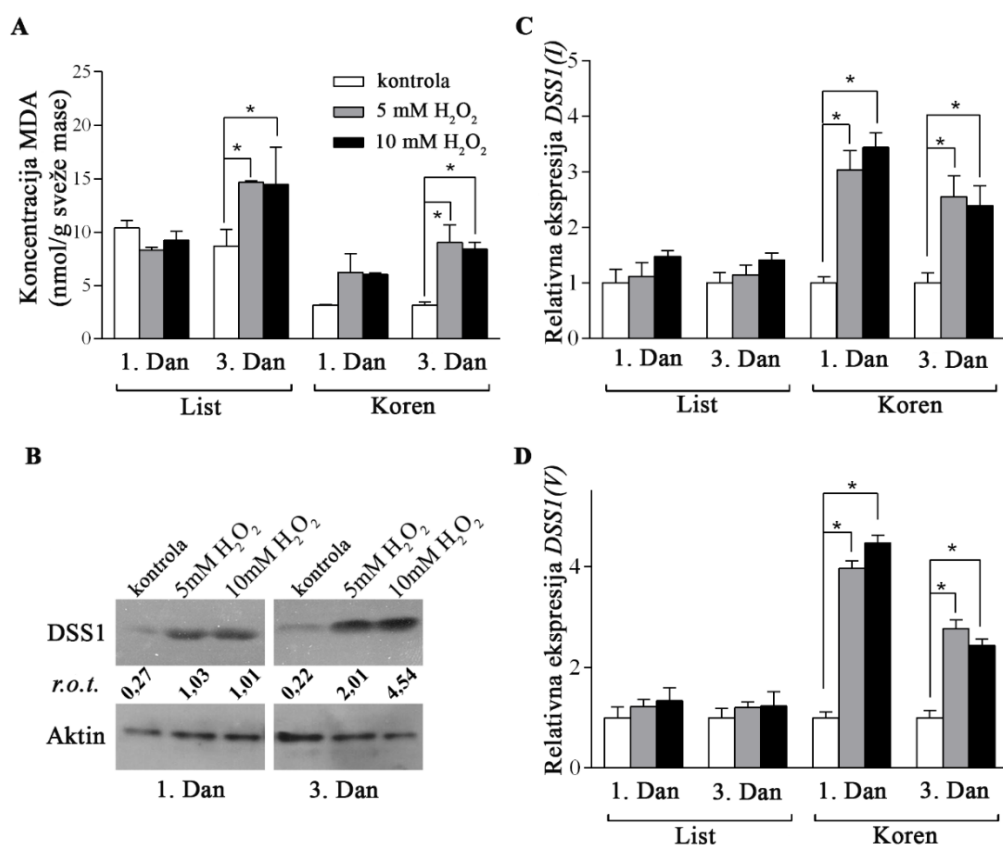
Slika 20. Gajenje klijanaca *A.thaliana* u rastvoru za klijanje u hidroponici.



Slika 21. Gajenje zrelih biljaka *A.thaliana* u osnovnom hranljivom rastvoru.

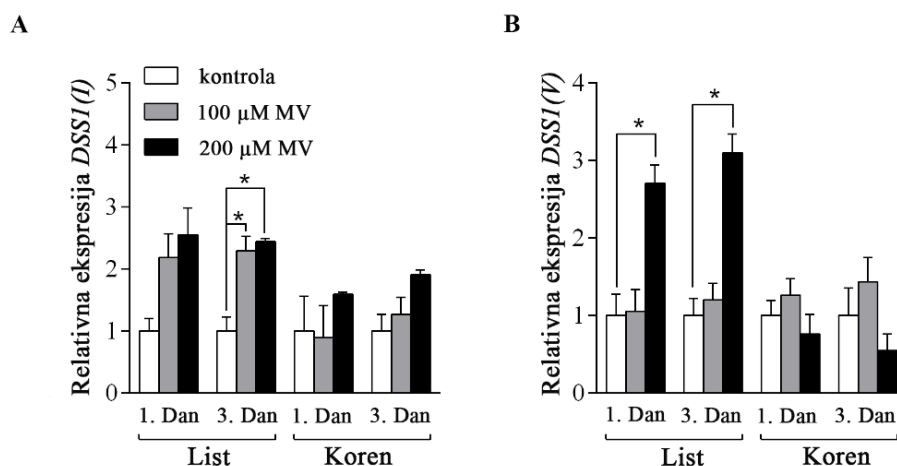
Takođe, semi-kvantitativnom imunoblot analizom ukupnih proteina iz korena, detektovani su proteini DSS1 pomoću poliklonskih anti-DSS1 antitela. Međutim, detekcija ovim antitelima nije omogućavala razgraničenje između dve biljne proteinske izoforme DSS1. Nakon denzitometrijske kvantifikacije upotrebom programa *ImageJ*, količine ukupnih proteina DSS1 su prikazane kao relativni odnos inteziteta signala DSS1 i aktina detektovanih na membrani na Slici 22B. Analiza je otkrila da je nivo ukupnih proteina DSS1 četverostruko povećan u korenovima prvog dana u uslovima 5 ili 10 mM H₂O₂ naspram kontrole. Dalje, nakon trećeg dana nivo ukupnih proteina DSS1 u korenovima *A. thaliana* je povećan 9 do 21 puta u tretmanu sa 5 ili 10 mM H₂O₂. Imunoblot analiza na uzorcima proteina izolovanih iz listova biljaka tretiranih vodonik-peroksidom nije pokazala značajne promene u nivou ekspresije proteina DSS1.

Za precizno određivanje ekspresije ova dva visoko homologna gena, dva para prajmera su dizajnirana tako da specifično umnožavaju svaku od dve izoforme DSS1 proteina. Svaki od njih sadržavao je uzvodni prajmer koji je komplementaran kodirajućem regionu gena i nizvodni prajmer koji je komplementaran regionu 3' UTR *DSS1(I)* ili *DSS1(V)*. Rezultati PCR analize pokazuju da je relativna ekspresija gena *DSS1(I)* tri puta veća u korenovima biljaka tretiranih vodonik-peroksidom nego u kontrolnim biljkama posle prvog dana od izlaganja stresoru (Slika 22C). Nakon trećeg dana od početka tretmana vodonik-peroksidom je pokazano da je ekspresija transkripata *DSS1(I)* dva puta povećana u tretiranim u odnosu na kontrolne korenove (Slika 22C). U slučaju gena *DSS1(V)*, primećen je sličan obrazac relativne ekspresije (Slika 22D). Štaviše, uočeno je da je nivo iRNK u korenovima drastičnije povećan, čak do pet puta prvog dana posle izlaganja 5 ili 10 mM H₂O₂. Takođe, nakon trećeg dana tretmana je izmerena tri puta veća ekspresija *DSS1(V)* u tretiranim korenovima *A. thaliana* u odnosu na korenove netretiranih kontrolnih biljaka (Slika 22D). U listovima tretiranih biljaka u odnosu na netretirane nije detektovan značajan efekat na nivou profila ekspresije oba gena.



Slika 22. Efekat oksidativnog stresa u prvom/ trećem danu tretmana 5 mM/ 10 mM vodonik-peroksidom (H₂O₂) na lipidnu peroksidaciju, ekspresiju proteina i gena *DSS1* u *A. thaliana*. (A) Nivo lipidne peroksidacije (MDA nmol/g sveže mase) u korenovima i listovima biljaka. (B) Semi-kvantitativna imunoblot analiza totalnih proteina *DSS1* u korenovima *A. thaliana*. Prikazan je reprezentativni imunoblot; *r.o.t.*- relativni odnos inteziteta signala *DSS1*/aktin određen denzitometrijski. (C i D) Profil relativne ekspresije gena *DSS1(I)*, odnosno *DSS1(V)* merenih u listovima i korenovima. (A, C i D) Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD dobijena iz tri biološki ponovljena eksperimenta. Zvezdicom je prikazana statistički značajna rezlika u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu ($p < 0,05$).

Da bi se potvrdilo da se ekspresija ovih izoforni menja u oksidativnom stresu, primenjen je još jedan prooksidans – metil-viologen, koji dovodi do oksidativnog stresa putem generisanja O₂^{•-}. Analogno prethodnoj postavci eksperimenta, u ovom slučaju su zrele biljke podvrgnute stresu 100 i 200 μM MV u hidroponičnoj kulturi i biljni materijal je uzorkovan prvog i trećeg dana za dalje analize (Slika 23). Relativna ekspresija gena *DSS1(I)* je statistički značajno povećana i to više od dva puta u listovima tretiranih biljaka nakon tretmana u odnosu na netretirane biljke (Slika 23A). Takođe, značajno povećanje iRNK *DSS1(V)* je uočeno u obe vremenske tačke u listovima, ali samo pod uticajem 200 μM MV (Slika 23B). Ovi rezultati ukazuju na to da do povećanja ekspresije *DSS1(I)* ili *DSS1(V)* može doći ne samo u uslovima tretmana peroksidom, nego i pod dejstvom drugih oksidativnih stresora.

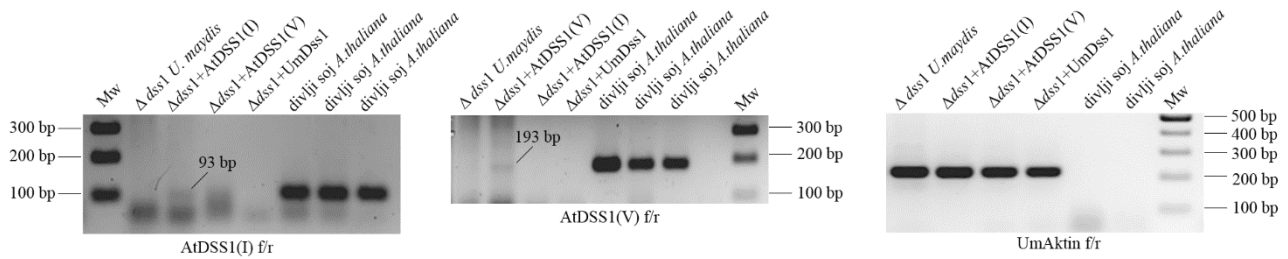


Slika 23. Efekat oksidativnog stresa u prvom / trećem danu tretmana 100/ 200 μM metil-viologenom (MV) na ekspresiju gena *DSS1* u *A. thaliana*. Relativni profili ekspresije gena (A) *DSS1(I)* i (B) *DSS1(V)* mereni u listovima i korenovima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD dobijena iz tri biološka ponovljena eksperimenta. Zvezdicom je prikazana statistički značajna rezlika u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu ($p < 0,05$).

4.5. Test funkcionalne komplementacije $\Delta dss1$ mutanta *U. maydis* heterolognom ekspresijom *DSS1* varijanti *A. thaliana*

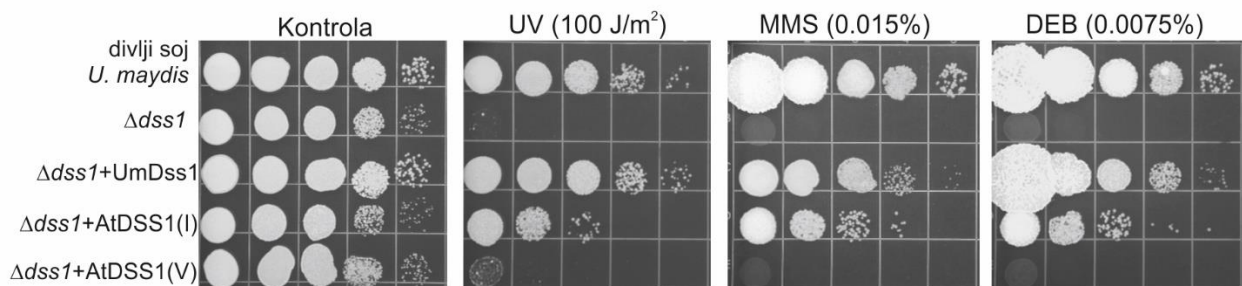
Kako *A. thaliana* poseduje dve varijante *DSS1* koje međusobno pokazuju visok stepen sličnosti, jedan od ciljeva rada je bio da se utvrdi da li produkti ovih gena imaju različite funkcije u ćeliji. *DSS1* je visoko konzerviran među vrstama i pokazano je da ima ulogu regulatornog molekula (aktivira BRCA2 kompleks) u procesu homologne rekombinacije, koja je izuzetno značajna u procesima popravke dvolančanih DNK lezija. Pošto je region koji prepoznaje i za koji se veže *DSS1* protein filogenetski najkonzervisaniji domen BRCA2 molekula, da bi se utvrdilo da li obe varijante *DSS1* imaju ulogu u homolognoj rekombinaciji, geni su eksprimirani u $\Delta dss1$ mutantu *U. maydis* kod koga je ovaj gen deletiran (*knockout dss1* mutant) i praćena je njihova sposobnost da kompenzuju nedostatak UmDss1.

Pojedinačni ORF-ovi (od eng. *an open reading frame* – otvoreni okvir čitanja) su uklonirani u ekspresioni vektor pod jak konstitutivni *pgap* promotor, i sa dobijenim konstruktima je potom transformisan $\Delta dss1$ mutant *U. maydis*. Ekspresija ovih gena je potvrđena umnožavanjem genspecifičnim prajmerima na cDNK matrici generisanoj od iRNK izolovane iz transformanata. Ekspresija gena aktina *U. maydis* je koršćena kao endogena kontrola.



Slika 24. PCR detekcija transkripata *DSS1(I)* i *DSS1(V)* izolovanih iz transformanata $\Delta dss1$ mutant *U. maydis*. Gel elektroforeza (levo) PCR reakcije gen-specifičnim prajmerima za cDNK *DSS1(I)* *A. thaliana*. Gel elektroforeza (u sredini) PCR reakcije gen-specifičnim prajmerima za cDNK *DSS1(V)* *A. thaliana*. Gel elektroforeza (desno) PCR reakcije gen-specifičnim prajmerima za aktin *U. maydis*. $\Delta dss1 -dss1$ mutant *U. maydis*; $\Delta dss1+AtDSS1(I) - \Delta dss1$ mutant *U. maydis* komplemetiran WT sekvencom *DSS1(I)* *A. thaliana*; $\Delta dss1+AtDSS1(V) - \Delta dss1$ mutant *U. maydis* komplemetiran WT sekvencom *DSS1(V)* *A. thaliana*; $\Delta dss1+UmDss1 - \Delta dss1$ mutant *U. maydis* komplemetiran WT genom *Dss1* *U. maydis*; divlji soj *A.thaliana* – pozitivna kontrola reakcije gen-specifičnim prajmerima za *DSS1* *A. thaliana*.

$\Delta dss1$ mutant je izrazito senzitivn na genotoksične agense koji izazivaju različite tipove lezija (UV zračenje dovodi do DNK jednolančanih prekida, MMS je alkilirajući agens, DEB je *cross-linking* agens) (Slika 25). Ove lezije mogu biti popravljene na različite načine, a prethodno je bilo pokazano da u njihovom popravljanju presudnu ulogu igra i popravka putem homologne rekombinacije. Stepent komplementacije nedostatka *Dss1* u *U. maydis* *DSS1* proteinima *A. thaliana* je određivan semikvantitativno, poređenjem preživljavanja transformanata na genotoksičnim agensima sa preživljavanjem $\Delta dss1$ mutanta. Kao kontrolni sojevi su korišćeni divlji soj koji je rezistentan na ispitivane agense, kao i $\Delta dss1$ mutant u kome je overekspimiran WT alel *Dss1* iz *U. maydis*. Korišćene su doze genotoksičnih agenasa koje ne dovode do pada vijabilnosti divljeg soja *U. maydis*. Na Slici 24 se može videti da overekspresija *DSS1(I)* dovodi do značajnog povećanja rezistencije $\Delta dss1$ mutanta na ispitivane genotoksične agense. Preživljavanje je 3 loga (1000 puta) veće u odnosu na mutantni soj, ali je niže u odnosu na stepent preživljavanja koji se ostvaruje homolognom ekspresijom *UmDss1*. Značajno je da za razliku od *AtDSS1(I)*, *AtDSS1(V)* ne može da komplementira nedostatak *Dss1*, tj. *AtDSS1(V)*-transformanti pokazuju isti nivo senzitivnosti na genotoksične agense kao i netransformisani $\Delta dss1$ soj.



Slika 25. Test funkcionalne komplementacije $\Delta dss1$ mutanata *Ustilago maydis* *DSS1* homologizima *Arabidopsis thaliana*. Divlji soj *U. maydis* -UCM350; $\Delta dss1 -dss1$ mutant *U. maydis*; $\Delta dss1+UmDss1 - dss1$ mutant *U. maydis* komplemetiran WT genom *Dss1* *U. maydis*; $\Delta dss1+AtDSS1(I) - \Delta dss1$ mutant *U. maydis* komplemetiran WT genom *DSS1(I)* *A. thaliana*; *Umdss1+AtDSS1(V) - \Delta dss1* mutant *U. maydis* komplemetiran WT genom *DSS1(V)* *A. thaliana*. Po 10 μ L 10x sukcesivnih serijskih razblaženja ćelijske suspenzije (2×10^7 ćelija/mL) je iskapavano, s leva na desno, na čvrste hranljive podloge sa označenim koncentracijama različitih agenasa, ili je Petri šolja izlagana UV zračenju. Čelije su rasle 2 dana na 30°C.

4.6. Analiza T-DNK insercionih *dss1* mutanata *A. thaliana*

4.6.1. Genotipizacija *t-dss1(V)* mutanata, analiza profila ekspresije transkripata i proteina za gen *DSS1(V)*

U cilju funkcionalne karakterizacije izoformi DSS1 u *A. thaliana*, urađeno je ispitivanje T-DNK insercionih *dss1* mutantnih linija ove vrste pohranjenih u *Arabidopsis Biological Resources Center* (ABRC) koji poseduje kolekcije semena mutiranih linija za svaki od oko 27000 gena u genomu *A. thaliana*. Za tu svrhu, biljke su gajene u zemljišnom supstratu u kontrolisanim uslovima i zaštićene folijama u cilju sprečavanja unakrsnog oprašivanja (Slika 26).

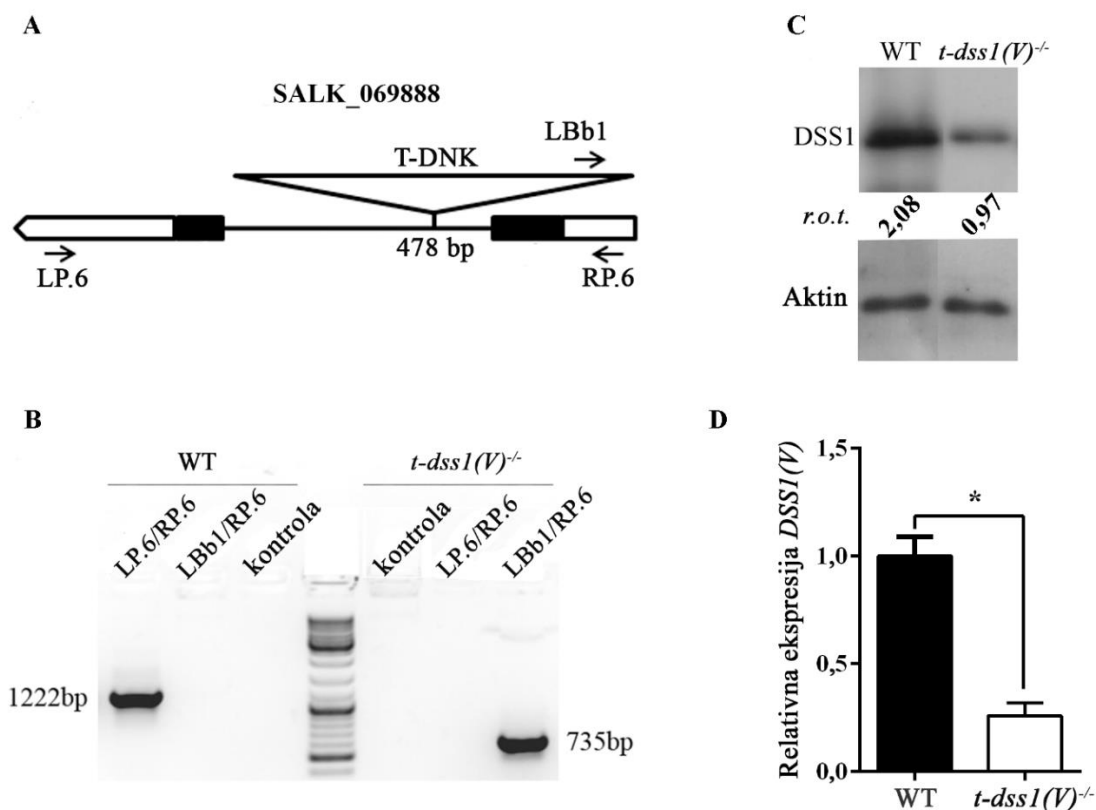
U ovom eksperimentu korišćen je stok semena pod katalogskim brojem SALK_069888, koji sadrži T-DNK inserciju u intronu *DSS1(V)* kao što je prikazano na Slici 27A. T-DNK insert je pozicioniran 478 bp nizvodno od mesta starta transkripcije, što je identifikovano PCR analizom i Sangerovim sekvenciranjem pomoću prajmera LBb1/RP.6. Prajmer LBb1 je komplementaran segmentu T-DNK i jedan je od predloženih univerzalnih prajmera za pretraživanje T-DNK insercionih mutanata od strane instituta Salk (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Takođe, uz pomoć web platforme *SIGNAL*, Salk instituta u kome su eksperimentalno verifikovani svi mutanti iz ABRC kolekcije, su predloženi i kreirani dodatni gen specifični prajmeri (LP.6 i RP.6), kao i prajmeri za potencijalne nasumične neželjene insercije koje su identifikovane u ovom stoku semena. U T2 generaciji, identifikovana je homozigotna linija biljaka koja je nosilac mutacije u genu *DSS1(V)* (*t-dss1(V)^{-/-}*), primenom PCR metode uz upotrebu različitih kombinacija prajmera LBb1, LP.6 i RP.6. Umnožavanje prajmerima LP.6 i RP.6 u kojem je matrica bila gDNK porekom iz homozigotnih mutanata za *DSS1(V)* nije rezultiralo pojavom PCR produkta, što je posledica disrupcije *DSS1* gena T-DNA insertom dužine 8-25 kb. Međutim, PCR reakcija sa gDNK iz WT homozigota za *DSS1* dala je amplikon očekivane dužine od 1222 bp (Slika 27B). Amplikon od 735 bp koji je nastao u PCR reakciji sa prajmerima LBb1 i RP.6 je korišćen kao dodatna potvrda homozigotnosti mutanata *t-dss1(V)^{-/-}*, odnosno prisustva T-DNK (Slika 27B).



Slika 26. Gajenje *A. thaliana* u supstratu za potrebe skrininga mutanata. Slika levo - biljke u klima komori, slika desno - biljke u Arasystem-u.

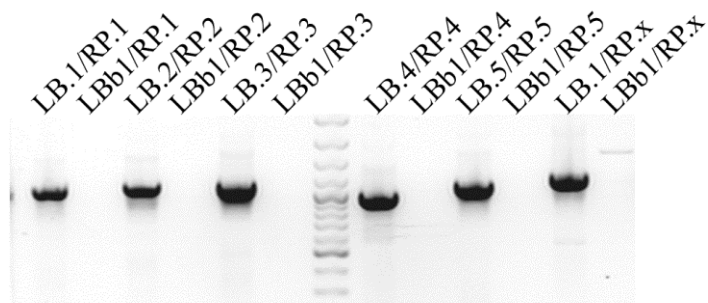
Semi-kvantitativnom imunoblot analizom je uočeno da sadržaj totalnih DSS1 proteina smanjen za 48% u mutiranoj liniji u odnosu na WT biljke (Slika 27C). Ovom analizom nije bilo moguće specifično detektovati DSS1(V) tj. razgraničiti ga od DSS1(I) proteina, pomoću dostupnih DSS1 antitela, jer ona prepoznaju zajedničke epitope u obe izoforme proteina. U mutantima *dss1(V)^{-/-}* je potvrđeno značajno smanjenje nivoa totalnog DSS1, što ukazuje da je produkcija proteina DSS1(V) zaista smanjena u mutantima. Takođe, u homozigotnoj liniji mutanata je detektovan

smanjen nivo transkripata *DSSI(V)* upotrebom gen-specifičnih prajmera 3UTR DVf/ 3UTR DVr koji su komplementarni genomskoj sekvenci lociranoj nizvodno od T-DNK insercije (Slika 27D). Analiza ekspresije gena ukazuje na to da se u T-DNK mutiranoj liniji *A. thaliana* akumulira 75% manje iRNK *DSSI(V)* u odnosu na WT biljke. Obe transkript i protein specifične analize potvrđuju da je uspešno uspostavljena *knockdown* mutanata linija za *t-dss1(V)*.



Slika 27. Identifikacija T-DNK insercionih *t-dss1(V)*^{-/-} alela. (A) Šematski prikaz organizacije gena *DSSI(V)* sa pozicijama egzona, introna i inserta T-DNK u liniji semena (kataloški br. SALK_069888). Crni kvadrati predstavljaju egzone, a linija između intron. Beli petougao i desni četvorougao na krajevima reprezentuju regione 5' UTR i 3' UTR. Beli trougao ukazuje na mesto T-DNK insercije u genu, 478 bp od starta transkripcije. LBb1 - uzvodni univerzalni specifični granični prajmer komplementaran T-DNK inserciji; LP.6 i RP.6 – uzvodni i nizvodni prajmeri specifično komplementarni sekvenci *DSSI(V)*. (B) Prisustvo T-DNK insercije u oba alela u genu *DSSI(V)* determinisano je PCR analizom na gDNK iz WT biljaka i potencijalnih mutanata pomoću kombinacije sledećih prajmera: LP.6, RP.6 i LBb1. (C) Nivo totalnih proteina DSS1 u WT i *dss1(V)*^{-/-} linijama detektovan imunoblot analizom pomoću anti-DSS1 antitela. Prikazani su reprezentativni podaci tri eksperimenta; *r.o.t.* - relativni odnos inteziteta signala DSS1/aktin određen denzitometrijski. (D) Nivo ekspresije transkripata *DSSI(V)* kod WT biljaka i mutanata za *dss1(V)*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD dobijena iz tri biološka eksperimenta. Zvezdicom je prikazana statistički značajna razlika u odnosu na WT biljke ($p < 0,05$).

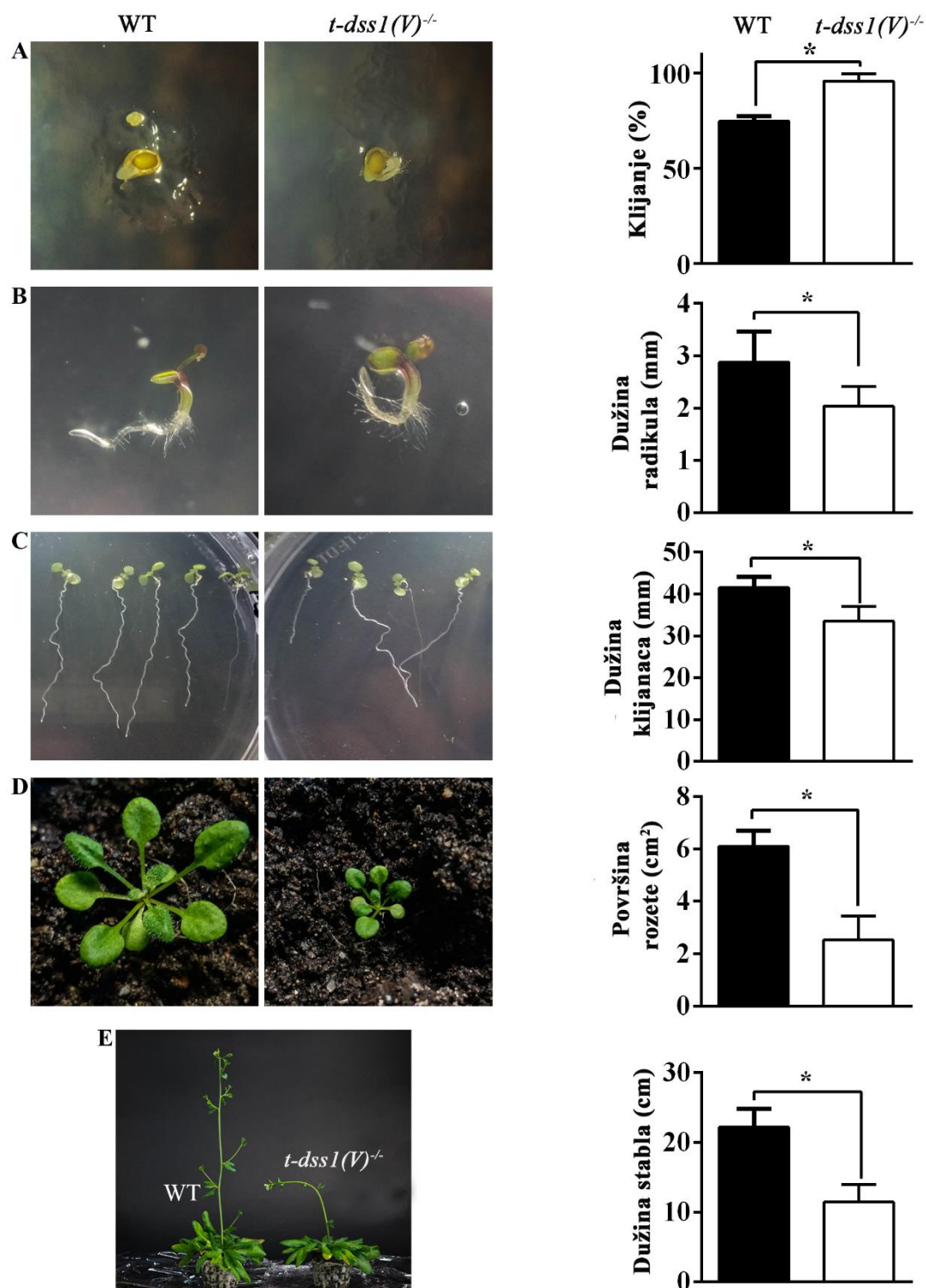
Treba naglasiti da je SALK_069888 originalno multi-insercioni stok semena koji sadrži inserte T-DNK u sedam različitih genskih lokusa. Pored ranije navedene T-DNK insercije u genu *DSSI(V)*, linija SALK_069888 semena inicijalno sadrži insercije u sledećim lokusima: u kodirajućim regionima gena *DSSI(I)* (pristupni br.: AT1G64750), u genu koji kodira galaktoza oksidazu (*GAO*), koja pripada superfamiliji proteina sa *kelch* ponovcima (pristupni br.: AT3G06570) i u regionu promotora gena regulatora pseudo-odgovora 3 (*PRR3*, pristupni br.: AT5G60100). Dodatne postoje insercije u tri intergenska regiona koje su zabeležene u specifikaciji linije SALK_069888: AT1G77990 – AT1G78000, AT1G26860 – AT1G26810 i AT3G21320 – AT3G21330. Kroz šest sukcesivnih kontrolisanih ukrštanja, uspešno je sprovedeno eliminisanje neželjenih navedenih mutacija. Izolacija čistih homozigotnih linija mutanata *t-dss1(V)* je potvrđena u PCR reakciji sa navedenim prajmerima iz Tabele 9 (Slika 28).



Slika 28. Potvrda čistih homozigotnih linija mutanata *dss1(V)* PCR reakcijom. Parovi prajmera specifični za sledeće sekvence: LP.1/RP.1 - *DSS1(I)*; LP.2/RP.2 - AT1G77990 - AT1G78000; LP.3/RP.3 - AT1G26860 - AT1G26870; LP.4/RP.4 - *GAO*; LP.5/RP.5 - AT3G21320 - ATG21330; LP.x/RP.x - *PRR3*.

4.6.2. Fenotipska analiza *knockdown t-dss1(V)* linije mutanata

Morfološke razlike između *t-dss1(V)* i WT biljaka su praćene kroz faze razvika (Slika 29). Biljke su inicijalno rasle u MS medijumu na Petri šoljama, a zatim u supstratu. Na početku klijanja, drugog dana od izlaganja svetlu, radikuli semena *t-dss1(V)* su bili napredniji i probijali su semenjaču dan ranije u poređenju sa WT radikulima. U toj fazi je kod 95% od ukupnih semena mutanata primećeno intezivno izduživanje radikula, dok je kod samo 74% WT semena došlo do pojave primarnog korenka (Slika 29A). Nasuprot tome, već narednog dana klijanci mutanata su značajno usporili rast. Iako je većina kotiledona bila razvijena, radikuli *t-dss1(V)* klijanaca su bili značajno kraći i intezivnije pokriveni korenovim dlačicama u poređenju sa radikulima WT klijanaca (Slika 29B). Generalno, klijanci linija mutanata su bili dužine oko 2 mm i imali su za 1 mm kraći korenak u odnosu na WT. Korenovi *t-dss1(V)*, stari osam dana od početka klijanja, su bili talasasti i pokazivali su neujednačeni rast na vertikalnim šoljama (Slika 29C). WT korenovi su bili oko 40 mm dugački, dok su korenovi mutanta bili 10 mm kraći u ovoj fazi. Posle 14 dana od početka klijanja, klijanci su presađeni u zemljišni supstrat. U fazi 23 dana od početka klijanja, a devet dana nakon prebacivanja klijanaca u zemljani supstrat, nastavio se sličan odnos u rastu između mutiranih i WT biljaka (Slika 29D). Uočeno je da su u ovoj fazi biljke WT imale rozete sa osam listova, dok su mutanti imali šest listova. Takođe, u ovoj fazi na nivou površine rozete uočena je značajna razlika, *dss1(V)* biljke imale 2,6 puta manju rozetu od WT biljaka. U stadijumu zrelih biljaka, mutanti su imali značajno kraći koren, skoro dva puta u poređenju sa WT biljkama (Slika 29E). Između ostalog, u ovoj fazi je liniju *dss1(V)* biljaka odlikovalo tanko i pleglo stablo.

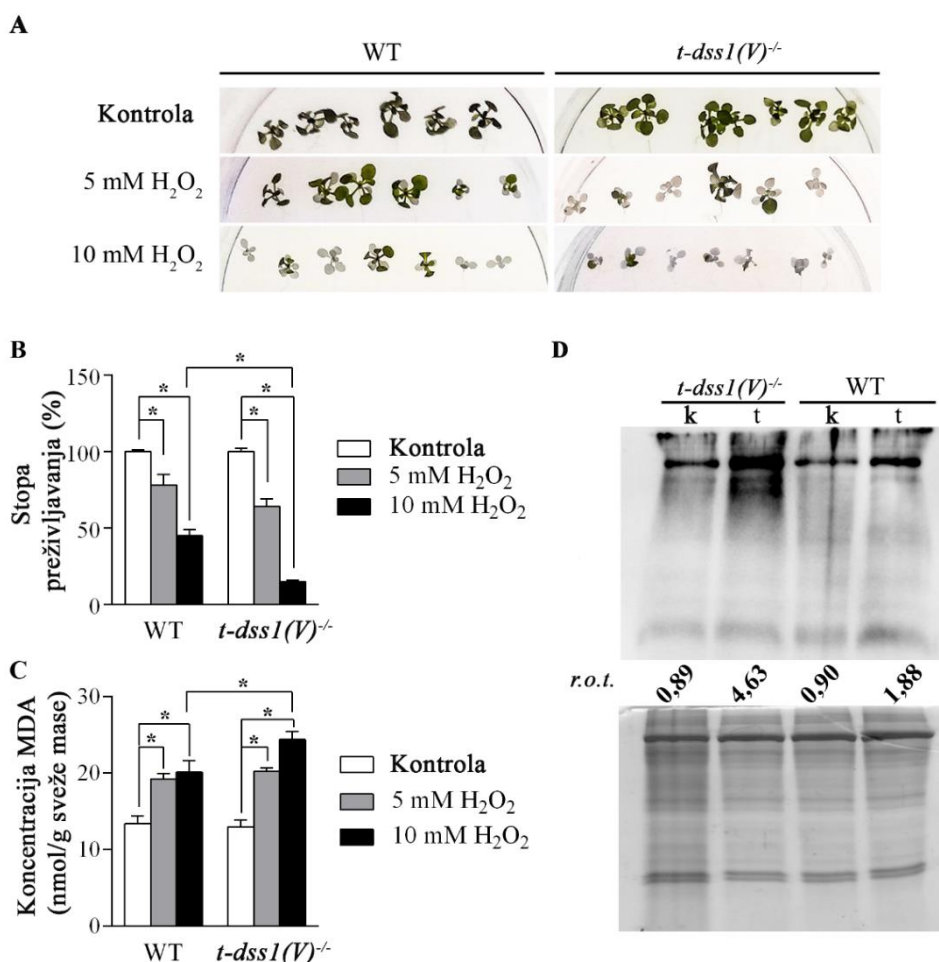


Slika 29. Uporedna analiza fenotipskih razlika između WT *A. thaliana* i T-DNK insercionih *t-dss1(V)* mutanata tokom razvića. Semena su zasađena na MS čvrst medijum. Nakon 14 dana od početka klijanja, biljke su presađene u zemlju. **(A)** Fotografije 2 dana starih semena WT i *dss1(V)* na Petri šoljama; histogramski prikaz stope klijanja predstavljene kao broj semena kod kojih se pojavio radikul u odnosu na ukupan broj zasađenih semena. **(B)** Fotografije 3 dana starih klijanaca; histogram predstavlja dužinu radikula u mm. **(C)** Fotografije klijanaca starosti osam dana: histogram predstavlja dužinu klijanaca u mm. **(D)** Fotografije 23 dana starih biljaka u zemlji; histogram prikazuje površine rozeta izražene u cm². **(E)** Fotografije 34 dana starih biljaka; histogramski prikaz dužine stabala u cm. Na histogramima, crni stubići predstavljaju kvantifikovane različite parametre WT linije biljaka, a beli stubići predstavljaju parametre *t-dss1(V)* linije. Prikazane su reprezentativne fotografije biljaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD dobijena iz tri biološki ponovljena eksperimenta (n = 30 po eksperimentu). Zvezdicom su prikazane statistički značajne razlike između WT i *dss1(V)* biljaka (p<0,05).

4.6.3. Analiza osetljivosti *t-dss1(V)* linija mutanata na oksidativni stres

Osetljivost *t-dss1(V)* linija mutanata na oksidativni stres je ispitivana tokom rane faze razvića *A. thaliana*. Rana faza razvića je odabrana iz razloga što 15 dana stare biljke *t-dss1(V)* i WT imaju sinhronizovani rast. Klijanci su prebačeni na svež MS medijum bez (kontrolne grupe) i sa vodonik-peroksidom (koncentracije 5 mM i 10 mM) (Slika 30). Klijanci su analizirani trećeg dana od početka tretmana H₂O₂, kada su uočavani prvi efekti stresa na mladim listovima. Pod uticajem 5 mM H₂O₂ detektovane su hlorotične promene na listovima *t-dss1(V)* klijanca sa oštećenjima tkiva, dok većina listova WT klijanaca nije pokazivala nikakve promene (Slika 30A). Posle izlaganja većoj koncentraciji vodonik-peroksida (10 mM), efekat oksidativnog stresa je bio izražen u oba analizirana genotipa, s tim što je hloroza bila izraženija kod mutiranih biljaka. U cilju kvantifikacije dejstva primenjenog stresora, određivana je stopa preživljavanja klijanaca koja je predstavljena kao procenat klijanaca koji su nastavili rast nakon tretmana stresom u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka (Slika 30B). Stopa preživljavanja *t-dss1(V)* biljaka pri većoj koncentraciji H₂O₂ je izrazito snižena, tako da je detektovano samo 15% preživelih biljaka. Tretman 5 mM H₂O₂ je imao blaži efekat i stopa preživelih mutanata je bila 64%. Mlade WT biljke su bile mnogo otpornije na stres i njihova stopa preživljavanja pri izlaganju 5 mM je iznosila 78%, odnosno 45% na 10 mM peroksidu. Najniži nivo preživljavanja je otkriven kod klijanaca *t-dss1(V)* u uslovima tretmana 10 mM H₂O₂. Takođe, takva stopa preživljavanja je bila značajno niža i u odnosu na WT biljke pri istoj koncentraciji H₂O₂. Tri puta niža stopa preživljavanja *t-dss1(V)* ukazuje na to da su mutanti biljaka osetljiviji na uslove oksidativnog stresa u poređenju sa WT biljkama.

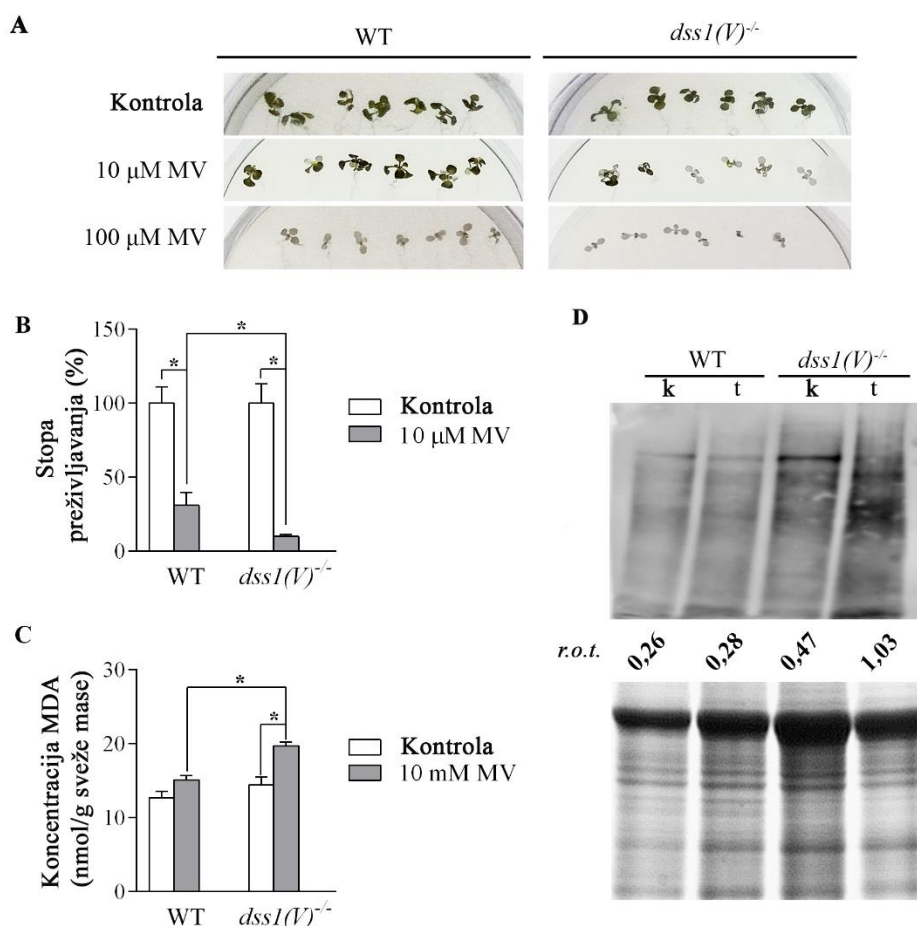
Dalje, detektovano je značajno povećanje nivoa lipidne peroksidacije u *t-dss1(V)* klijancima u poređenju sa WT klijancima tretiranih 10 mM peroksidom (Slika 30C). Ovaj pokazatelj stresa potvrđuje povećanu senzitivnost mutanata na oksidativni stres. Imajući na umu štetan uticaj peroksida na proteostazu, analiziran je i nivo oksidovanih proteina pomoću metode oksiblot, upotrebom antitela DNP koja prepoznaju karbonilovane grupe u oštećenim proteinima (Slika 30D). Signal najvećeg inteziteta je detektovan u totalnom proteinskom ekstraktu *t-dss1(V)* klijanaca tretiranih peroksidom i bio je pet puta veći u poređenju sa kontrolnim biljkama. Nivo oksidovanih proteina je bio 1,88 puta veći u tretiranim WT klijancima, ali je to povećanje bilo manje nego kod mutanata. Velika akumulacija oksidacijom oštećenih proteina u mutantima *t-dss1(V)* dovodi do povećanja njihove osetljivosti na oksidativni stres.



Slika 30. Efekat H₂O₂ na klijance divljeg tipa (WT) i T-DNK insercione *t-dss1(V)* mutante. 15 dana stari klijanci su prebačeni na MS medijum bez stresora ili sa 5/10 mM H₂O₂. (A) Klijanci su bili izloženi vodonik peroksidu tri dana pre fotografisanja. Prikazane su reprezentativne fotografije klijanaca. (B) Stopa preživljavanja (%) klijanaca WT i *t-dss1(V)* pod dejstvom 5/10 mM H₂O₂. (C) Nivo lipidne peroksidacije (MDA nmol/g sveže mase) u klijancima WT i *t-dss1(V)*.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD dobijena iz tri biološka ponovljena eksperimenta. Zvezdicom je prikazana statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu, netretiranu grupu ($p < 0,05$). (D) Determinacija karbonilovanih proteina: oksiblot (gornja slika); CCB vizuelizacija ukupnih proteina na akrilamidnom gelu (donja slika), totalnih proteina iz uzoraka kontrolnih (k) i 10 mM H₂O₂ tretiranih (t) biljaka WT i *t-dss1(V)*; *r.o.t.* - relativni odnos inteziteta traka karbonilovanih proteina detektovanih DNP antitelima u odnosu na intenzitet signala totalnih proteina bojenih CBB. Totalni *r.o.t.* je određen denzitometrijski.

Kada je primenjen 10 μM metil-viologen kao alternativni stresor, statistički značajna razlika u stopi preživljavanja je detektovana između WT i *t-dss1(V)* klijanaca (Slika 31A). Nakon prvog dana od izlaganja 10 μM MV, stopa preživljavanja WT klijanca je 31%, dok je preživelo samo 10% klijanaca mutirane linije (Slika 31B). Ni klijanci divljeg tipa, ni mutiranih biljaka nisu preživeli izlaganje 100 μM metil-viologenu. Takođe, primećeno je da je nivo lipidne peroksidacije značajno veći kod *t-dss1(V)* linija tretiranih 10 μM MV u poređenju sa WT (Slika 31C). Nije bilo moguće izmeriti nivo MDA u klijancima tretiranim 100 μM MV, verovatno zbog destrukcije tkiva. Signali detektovani primenom oksiblot metode su bili dva puta većeg inteziteta u *t-dss1(V)* biljkama u uslovima 10 μM MV u odnosu na WT biljke (Slika 31D). Ovi rezultati ukazuju da su T-DNK insercioni mutanti (*t-dss1(V)*) osetljivi ne samo na tretman vodonik-peroksidom, već i na metil-viologen.



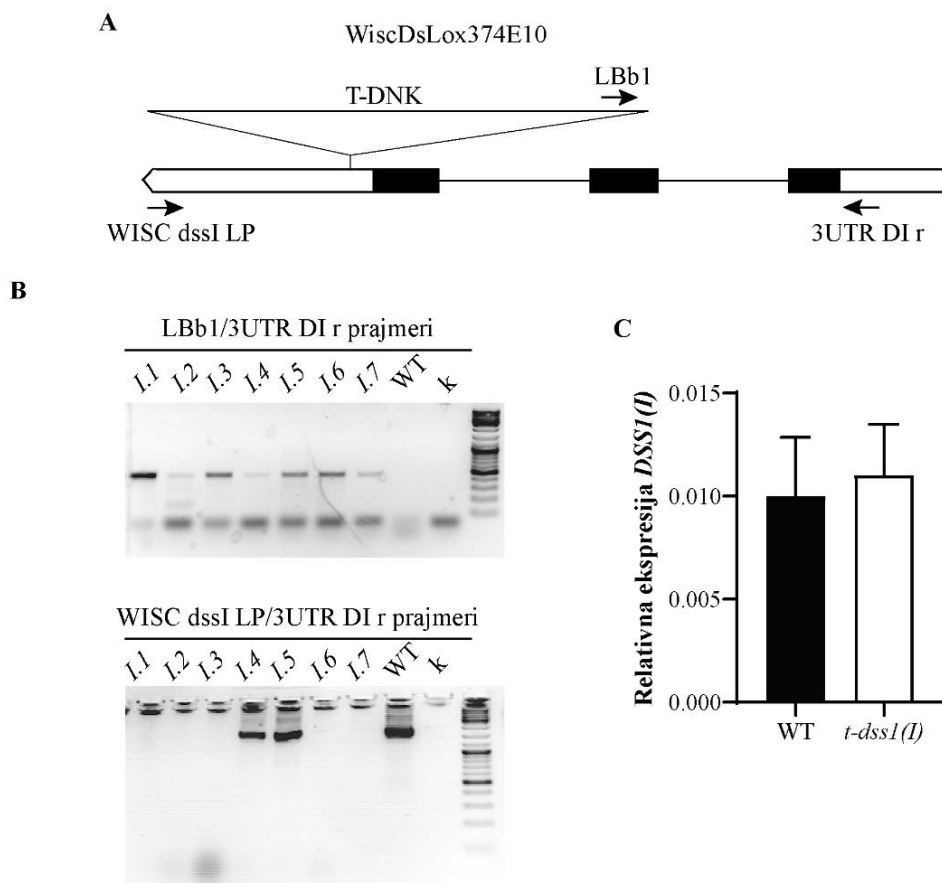
Slika 31. Efekat stresa izazvanog metil-viologenom (MV) na klijance divljeg tipa (WT) i T-DNK insercione *t-dss1(V)* mutante. 15 dana stari klijanci su prebačeni na MS medijum bez stresora ili sa 10/100 μM MV. (A) Klijanci su bili izloženi metil-viologenu jedan dan pre fotografisanja. (B) Stopa preživljavanja klijanaca WT i *t-dss1(V)* pod dejstvom 10/100 μM MV. (C) Nivo lipidne perokidacije (MDA nmol/g sveže mase) u klijancima WT i *t-dss1(V)* izmeren nakon jednog dana u uslovima 10 μM MV. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD dobijena iz tri biološka ponovljena eksperimenta. Zvezdicom je prikazana statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu ($p < 0,05$). (D) Determinacija karbonilovanih proteina: oksiblot analiza (gornja slika); CBB obojeni akrilamidni gel (donja slika) totalnih proteina izolovanih iz kontrolnih (k) i 10 μM MV tretiranih (t) biljaka WT i *t-dss1(V)* klijanaca; *r.o.t.* - relativni odnos intenziteta traka karbonilovanih proteina detektovanih DNP antitelima u odnosu na intenzitet trakatotalnih proteina bojenih CBB. Totalni *r.o.t.* je određen denzitometrijski. Prikazani rezultati su preklom iz tri eksperimenta.

4.6.4. Skrining *dss1(I)* T-DNK insercionih mutantima

Kako u analiziranom stoku semena SALK_069888 nije pronađen *DSSI(I)* T-DNK insercioni mutant, urađena je analiza dodatnog stoka semena. Za ispitivanje potencijalnih *t-dss1(I)* insercionih mutanata, izabran je *ABRC* stok semena pod kataloškim brojem WiscDsLox374E10. U opisu ovog stoka semena je navedeno da sadrži T-DNK inserciju 160 nukleotida (nt) uzvodno od start kodona gena za *DSSI(I)*, što je proizvođač potvrdio sekvenciranjem (Slika 32A).

Nakon skrininga i identifikacije heterozigotnih linija za *t-dss1(I)* u prvoj generaciji, u generaciji T2 su tražene homozigotne biljke koje sadrže T-DNK inserciju u oba alela željenog gena. PCR analizom nekoliko desetina gajenih T2 biljaka je pokazano da postoji navedena T-DNK insercija u genu *DSSI(I)* *A. thaliana* u homozigotnoj formi. Na gornjoj gel elektroforezi su prikazani PCR produkti dobijeni LBb1/3UTR DI r prajmerima dizajniranim da detektuju prisustvo T-DNK sekvence (Slika 32B). Za verifikaciju prisustva WT sekvence gena *DSSI(I)* su korišćeni prajmeri WISC *dssI* LP i 3UTR DI r u PRC reakciji. Uzvodni prajmer WISC *dssI* LP je predložen na platformi instituta Salk i komplementaran je delu sekvence koji se nalazi uzvodno od mesta insercije T-DNK. PCR

analizom su potvrđena četiri homozigotna mutanta označena kao *t-dss1(I).1*, *t-dss1(I).3*, *t-dss1(I).6* i *t-dss1(I).7*. Međutim, analiza nivoa transkripata *DSSI(I)* upotrebom gen-specifičnih prajmera 3UTR DIr/ 3UTR DIr, koji su komplementarni genomskoj sekvenci lociranoj nizvodno od T-DNK insercije, u potencijalnim homozigotima *t-dss1(I)* nije izmerena smanjena ekspresija u poređenju sa WT biljkama (Slika 32C). Može se zaključiti da T-DNK disrupcija regiona 5'UTR nije imala uticaj na ekspresiju gena *DSSI(I)*.



Slika 32. Identifikacija *t-dss1(I)*^{-/-} alela sa T-DNK insercijom. (A) Šematski prikaz organizacije gena a *DSSI(I)* i pozicije inserta T-DNK u liniji semena pod kataloškim brojem WiscDsLox374E10. Crni kvadrati predstavljaju egzone, a linija između introne. Beli levi petougao i desni četvorougao na krajevima reprezentuju regione 5' UTR i 3' UTR.

Veliki beli trougao ukazuje na mesto T-DNK insercije u genu. LBb1 - uzvodni univerzalni specifični granični prajmer komplementaran T-DNK inserciji; WISC DI LP i 3UTR DI r –prajmeri specifično komplementarni sekvenci *DSSI(I)*.

(B) Prisustvo T-DNK insercije u oba alela u genu *DSSI(I)* potvrđeno je analizom PCR na gDNK iz WT biljaka i potencijalnih mutanata pomoću kombinacije sledećih prajmera: LBb1, WISC DI LP i 3UTR DI r. (C) Nivo ekspresije transkripata *DSSI(I)* kod WT biljaka i mutanata za *t-dss1(I)* upotrebom kvantitativniog PCR-a u realnom vremenu.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD.

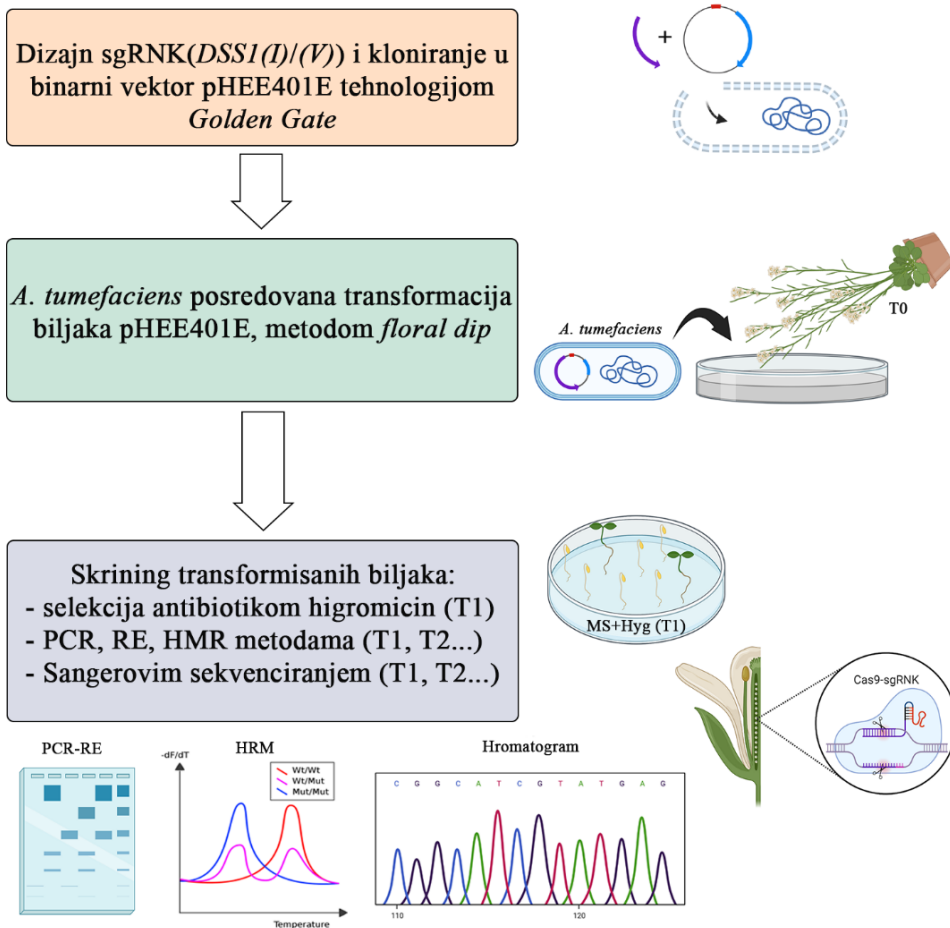
4.7. Generisanje i analiza CRISPR/Cas9 mutanata za homologne gene *DSS1 A.thaliana*

4.7.1. Mutageneza dva visoko homologna gena *DSS1* CRISPR/Cas9 tehnologijom

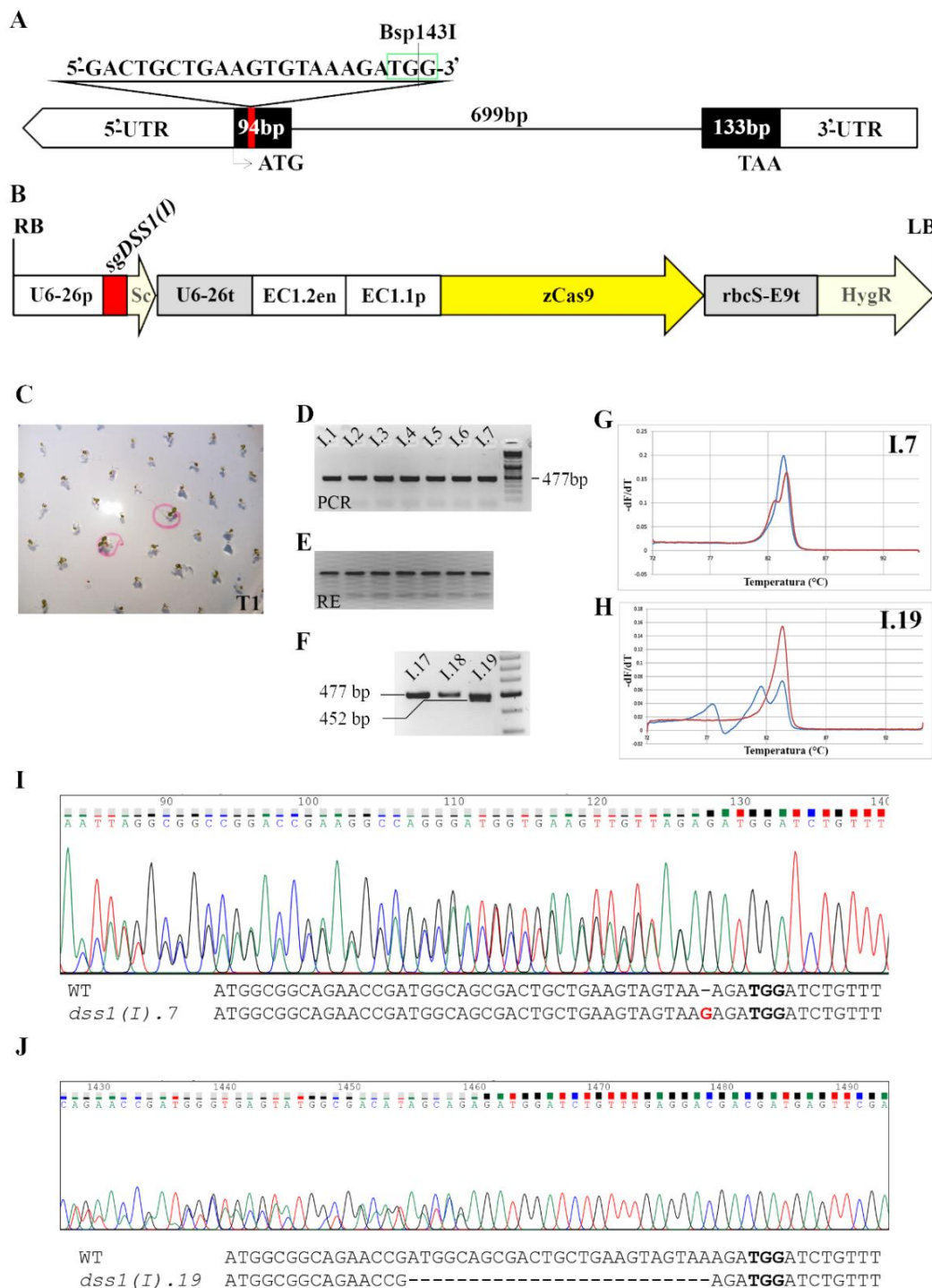
Da bi se utvrdile potencijalne razlike u funkcijama dva visoko homologna gena *DSS1(I)* i *DSS1(V)*, bilo je potrebno generisati mutirane biljke u kojima je ekspresija pojedinačnih gena isključena. Metoda izbora je precizno editovanje genoma primenom CRISPR/Cas9 tehnologije. Upotrebom dvokomponentnog sistema CRISPR/Cas9 moguće je generisanje kako pojedinačnih, tako i duplih mutanata gena od interesa.

Dve odvojene sgRNK su dizajnirane tako da navode Cas9 protein za ciljano editovanje kroz komplementarno sparivanje sa delom sekvence u prvom egzonu *DSS1(I)*, odnosno *DSS1(V)* (Slika 34A, 35A) gde su jedino uočene razlike u sekvencama dve izoforme. Sintetisani oligonukleotidi sgRNK-*DSS1(I)* i sgRNK-*DSS1(V)* su pojedinačno uklonirani u CRISPR/Cas9 kasetu u okviru binarnog vektora pHEE401E i stavljeni pod jak promotor *U6-26p*, koji potiče od *U6* promotora za vezivanje RNK polimeraze III (Slika 34B, 35B). Ovaj prilagođeni vektor sadrži optimizovanu upotrebu kodona (*codon usage*), koji kodira protein zCas9 kukuruza, a pod zajedničkom kontrolom promotora i pojačivača koji su odgovorni za tkivno specifičnu ekspresiju u semenim zamecima *A. thaliana* (na eng. *egg-cell-specific promoter/enhancer, EC1.2en/EC1.1p*).

Selekcija transformisanih biljaka (T0 generacija) je vršena zasejavanjem semena u hranljivoj podlozi sa higromicinom, kao selektivnim markerom. Nakon osam dana od izlaganja biljaka svetlosti, uočeni su transgeni klijanci T1 generacije, otporni na higromicin (Slika 34C, 35C). Procenjena frekvencija transformacije je iznosila 0,4 - 0,8%. Nakon kontrolisanog samooprašivanja T1 generacije biljaka, dobijene su T2 biljke koje su dalje podvrgnute detaljnom skriningu na prisustvo potencijalnih mutacija u željenim genima. Korišćene su tri različite strategije u svrhu genotipizacije generacije T2: analiza dužine PCR fragmenata, DNK analiza PCR produkata restrikcijom digestijom i *High Resolution Melting* (HRM) analiza. Za pretraživanje prve serije biljaka koje su potencijalni nosioci mutacija u genu *DSS1(I)*, sprovedena je PCR analiza pomoću prajmera ScsIf/ScsIr. Ovim prajmerima se umnožavaju produkti koji obuhvataju potencijalna mesta promene. Od desetak analiziranih kandidata, detektovan je samo jedan PCR produkt sa oznakom *dss1(I).19*, koji odstupa od očekivanog umnoška od 477 bp koji odgovara WT biljkama (Slika 34F). Detektovan PCR ampikon biljke *dss1(I).19* je bio 20 nt kraći u odnosu na WT fragment. Takođe, senzitivnom HRM analizom svih PCR proizvoda potencijalnih mutanata za gen *DSS1(I)*, identifikovana je još jedna biljka sa oznakom *dss1(I).7* (Slika 34D, G). Biljka *dss1(I).7* je imala izmenjeni profil krive topljena DNK u odnosu na krive koje predstavljaju WT gen, a potvrđena je i promena u *dss1(I).19* (Slika 34G, H). Analizom PCR fragmenata nije bilo moguće detektovati biljku *dss1(I).7*, s obzirom na to da nije izgubila restrikciono mesto za Bsp143I i nije se razlikovala od WT kontrole na gel elektroforezi (Slika 34E). Obe detektovane mutacije su bile prisutne u heterozigotnom stanju i ampikoni su selektovani za sekvenciranje. Sekvenciranjem je pokazano sledeće: *dss1(I).7* biljka sadrži inserciju (*ins* u daljem tekstu) jednog nukleotida na poziciji tri nukleotida uzvodno od PAM mesta (Slika 34I); dok je u biljci *dss1(I).19* je došlo do delecije 25 nt u sekvenci *DSS1(I)* (Slika 34J).

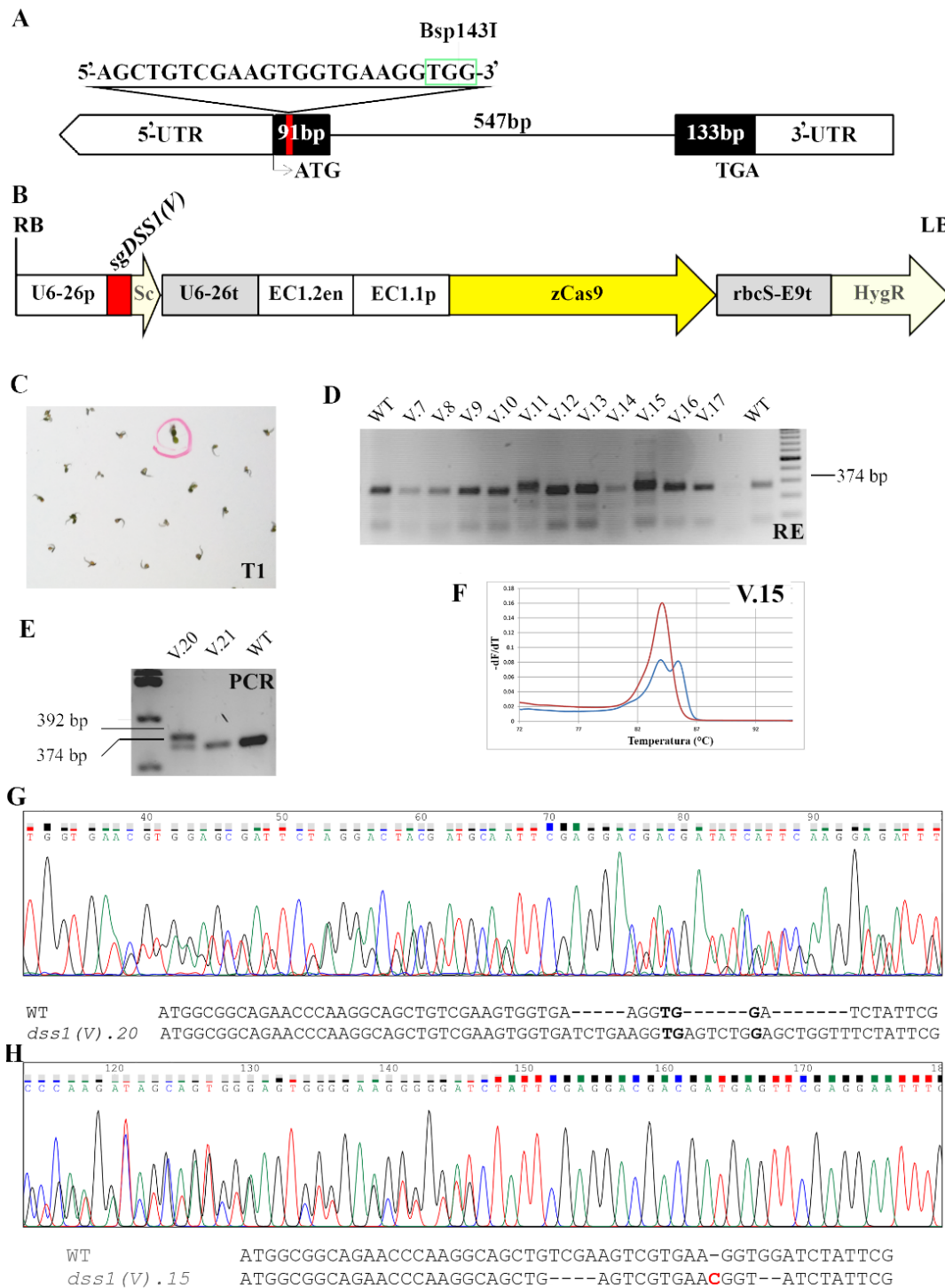


Slika 33. Šematski prikaz metodološkog pristupa uspostavljanja linija CRISPR/Cas9 mutanata za homologne gene *DSS1 A.thaliana*. Kreirano pomoću programa *BioRender* (<https://www.biorender.com/>)



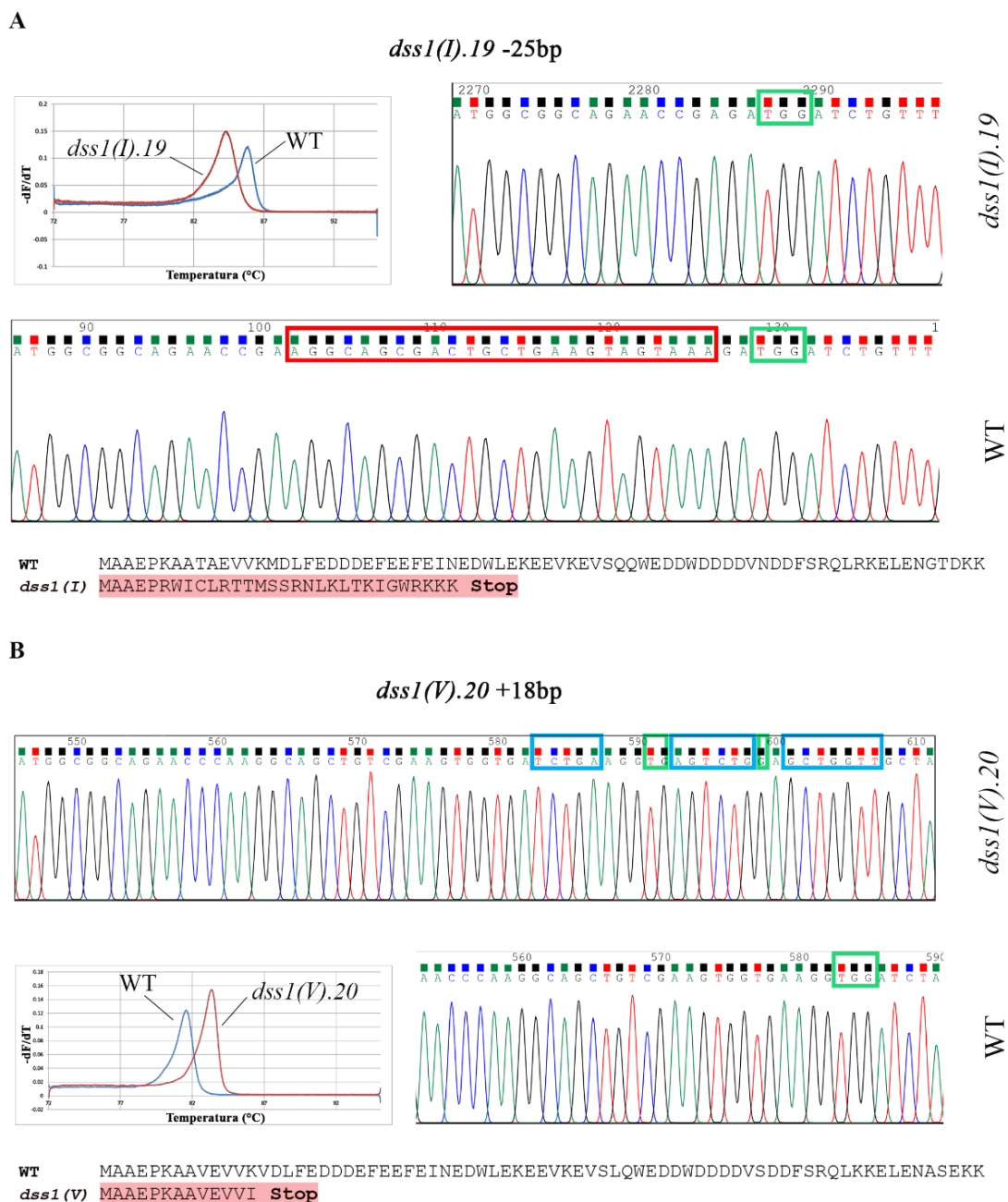
Slika 34. Strategija konstruisanja vektora za CRISPR/Cas9 ciljanu *DSS1(I)* mutagenezu u *A. thaliana* i pristupi pretraživanja mutanata generisanih ovom metodom. (A) Šematski prikaz gena *DSS1(I)*: crni kvadrati predstavljaju egzone, a linija između intron; beli petougao na levom i četvorougao na desnom kraju reprezentuju regione 5' UTR i 3' UTR; beli trougao sa sekvencom sgRNK iznad ukazuje na komplementarno target mesto označeno crvenom linijom u egzonu; zeleni pravougaonik u sgRNK sekvenci uokviruje PAM region i mesto za digestiju enzimom Bsp143I; ATG – start kodon i TAA – kodon. (B) Fizička mapa sekvence T-DNK CRISPR/Cas9 binarnog vektora pHEE401E za transformaciju *A. thaliana*: RB/LB – granične sekvence T-DNK inserta; sgDSS1(I) – sgRNK pod kontrolom promotora *U6-26p*; Sc – scaffold vektora; *U6-26t* – terminator; kombinacija pojačivača *EC1.2en* i promotora *EC1.1p* za ekspresiju *zCas9*; *rbcS-E9t* – terminator za *zCas9*; *Hyg* – gen za rezistenciju na higromicin. (C) Selekcija T1 semena na MS medijumu sa 50 µg/ml higromicina. (D, F) Analiza PCR produkata umnoženih prajmerima ScsIf/ScsIr koji obuhvataju potencijalnu promenu u genomu na gel elektforezi. (E) RE – Analiza PCR fragmenata (prikazanih pod D) restrikcionim enzimom Bsp143I. (G, H) Krive topljenja PCR proizvoda amplifikovanih iz dva selektovana genotipa (*dss1(I).7* i *dss1(I).19*) u odnosu na WT, analizom HRM. -dF/dT je promena fluorescence pri promeni temperature. (I, J) Hromatogrami Sangerovog sekvenciranja heterozigota generisanih u generaciji T2 i poređenje DNK sekvenci WT i datog mutanta.

Tokom brzog skrininga restrikcijom digestijom PCR produkata umnoženih ScsVf/ScsVr prajmerima, uočeno je da u potomstvu higromicin-rezistentnih biljaka CRISPR/Cas9-*DSSI(V)* postoje uzorci koji su izgubili restrikciono mesto za Bsp143I i razlikuju se od WT kontrole na gel elektroforezi (Slika 35D). Programom za sgRNK je pronađeno mesto za sečenje enzimom Bsp143I u genomske sekvenci WT *DSSI* u regionu PAM, nekoliko nt nizvodno od očekivane lokacije potencijalne mutacije. Nesečeni PCR proizvod je detektovan u biljci sa oznakom *dssI(V).15* i prisustvo promene je potvrđeno promenjenim profilom krive topljenja DNK u odnosu na WT sekvencu (Slika 35F). Takođe, PCR analizom istim parom prajmera ScsVf/ScsVr, koji obuhvataju potencijalno target mesto, u biljci *dssI(V).20* je detektovana dodatna traka na gel elektroforezi (Slika 35E). Sekvenciranjem je potvrđeno da su odabrani kandidati *dssI(V).15* i *dssI(V).20* prisutni u heterozigotnom stanju. Biljka *dssI(V).20* sadrži tri insercije u genu *DSSI(V)*, odnosno ukupno 18 dodatno ugrađenih nukleotida (+5 nt, +6 nt i +7 nt) (Slika 35H). Za mutanta *dssI(V).15* je ustanovljeno da ima nekoliko promena u sekvenci: inserciju od jednog nukleotida i dve delecije (*del*) od četiri nukleotida i dva nukleotida, od kojih je druga locirana u PAM regionu (Slika 35G).



Slika 35. Strategija konstruisanja vektora za CRISPR/Cas9 ciljanu *DSS1(V)* mutagenezu u *A. thaliana* i pristupi pretraživanja mutanata generisanih ovom metodom. (A) Šematski prikaz gena *DSS1(V)*: crni kvadrati predstavljaju egzone, a linija između intron; beli petougao na levom i četvorougao na desnom kraju reprezentuju regione 5' UTR i 3' UTR; beli trougao sa sekvencom sgRNK iznad ukazuje na komplementarno target mesto označeno crvenom linijom u egzonu; zeleni pravougaonik u sgRNK sekvenci uokviruje PAM region i mesto za digestiju enzimom Bsp143I; ATG – start kodon i TGA – stop kodon. (B) Fizička mapa sekvence T-DNK CRISPR/Cas9 binarnog vektora pHEE401E za transformaciju *A. thaliana*: RB/LB su granične sekvence T-DNK inserta; sgDSS1(V) – sgRNK pod kontrolom promotora *U6-26p*; Sc – scaffold vektora; *U6-26t* – terminator; kombinacija pojačivača *EC1.2en* i promotora *EC1.1p* za ekspresiju *zCas9*; *rbcS-E9t* – terminator za *zCas9*; *Hyg* – gen za rezistenciju na higromicin. (C) Selekcije T1 semena na MS šoljama sa 50 µg/ml higromicina. (D) RE – Analiza PCR fragmenata restrikcionim enzimom Bsp143I. (E) Analiza PCR produkata umnoženih prajmerima ScsVf/ScsVr koji obuhvataju potencijalnu promenu u genomu na gel elektroforezi. (F) Krive topljenja PCR proizvoda amplifikovanih iz heterozigota *dss1(V).15* u odnosu na WT, analizom HRM. -dF/dT je promena fluorescence pri promeni temperature. (I,J) Hromatogrami Sangerovog sekvenciranja generisanih heterozigota u generaciji T2 i poređenje DNK sekvenci WT i datog mutanta.

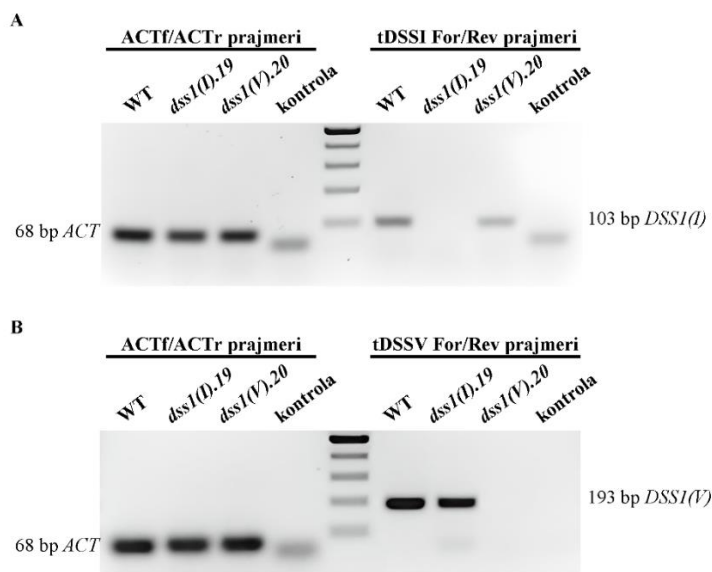
Dobijene linije mutanata *A. thaliana* sa velikim indelima (*del*25 nt i *ins*18 nt) su odabrane za dalju karakterizaciju. HRM metodom analizirane, biljke *dss1(I).19* i *dss1(V).20* koje su homozigotni nosioci mutacija i selektovane su u T3 generaciji i verifikovane sekvenciranjem (Slika 36). Ova dva događaja editovanja gena su rezultirala generisanjem linija mutanata u kojima je uveden rani stop kodon. Izvedene primarne proteinske sekvence se dobijene web alatom *ExPASy Translate tool*.



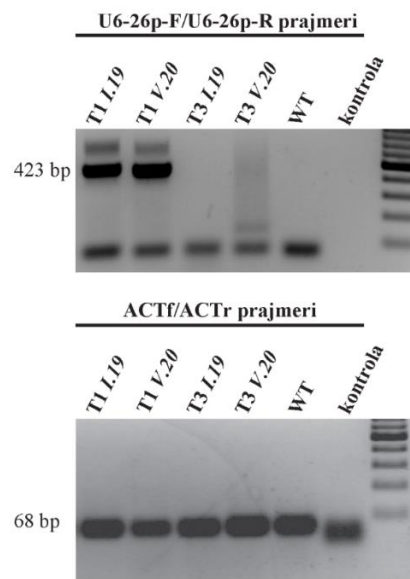
Slika 36. Analiza CRISPR/Cas9 mutanata u T3 generaciji. (A) Hromatogrami DNK sekvenci, profili krive topljenja DNK dobijene analizom HRM i poravnanje aminokiselinske sekvence mutirane *dss1(I).19* linije i WT biljaka; (B) Hromatogrami DNK sekvenci, profili krive topljenja DNK dobijene analizom HRM i poravnanje aminokiselinske sekvence mutirane *dss1(V).20* linije i WT biljaka. Zeleni kvadrat uokviruje PAM sekvencu; crveni kvadrat označava 25 nt u WT sekvenci koja je deletirana u mutiranoj liniji *dss1(I).19*; plavi kvadrati označavaju insercije ukupne dužine 18 nt u *dss1(V).20* mutiranoj liniji; -dF/dT je promena fluorescence pri promeni temperature.

U cilju potvrde disrupcije gena *DSS1* i odustva WT transkripata u mutiranim linijama, dizajnirani su uzvodni prajmeri koji su komplementarni regionima u koje su uvedeni indeli. Konvencionalom PCR metodom, nakon reverzne transkripcije, je verifikovano odsustvo specifičnih *DSS1* transkripata u dobijenim CRISPR/Cas9 linijama mutanata T3 generacije, dok je aktin korišćen kao endogena kontrola (Slika 37).

Između ostalog, pokazano je da biljke T3 generacije nisu transgene, tj. nisu nosioci CRISPR/Cas9 kasete, za razliku od T1 generacije u kojoj je potvrđeno prisustvo CRISPR/Cas9 kasete (Slika 38). Prisustvo CRISPR/Cas9 kasete je provereno na uzorcima genomske DNK izolovane iz biljaka mutiranih linija generacije T1 i T3, u PCR reakciji primenom prajmera koji specifično detektuju sekvencu promotora *U6-26p*, dužine 432 bp iz CRISPR/Cas9 kasete.



Slika 37. Detekcija transkripata *DSS1(I)* i *DSS1(V)* u linijama CRISPR/Cas9 mutanata i WT biljkama T3 generacije. (A) PCR detekcija prisustva ili odsustva transkripata *DSS1(I)* u linijama *dss1(I).19* pomoću prajmera tDSSIFor/tDSSIRev. (B) PCR detekcija prisustva ili odsustva transkripata *DSS1(V)* u linijama *dss1(V).20* pomoću prajmera tDSSVFor/tDSSVRev. ACTf/ACTr par prajmera je korišćen za umnožavanje aktina kao endogene kontrole.

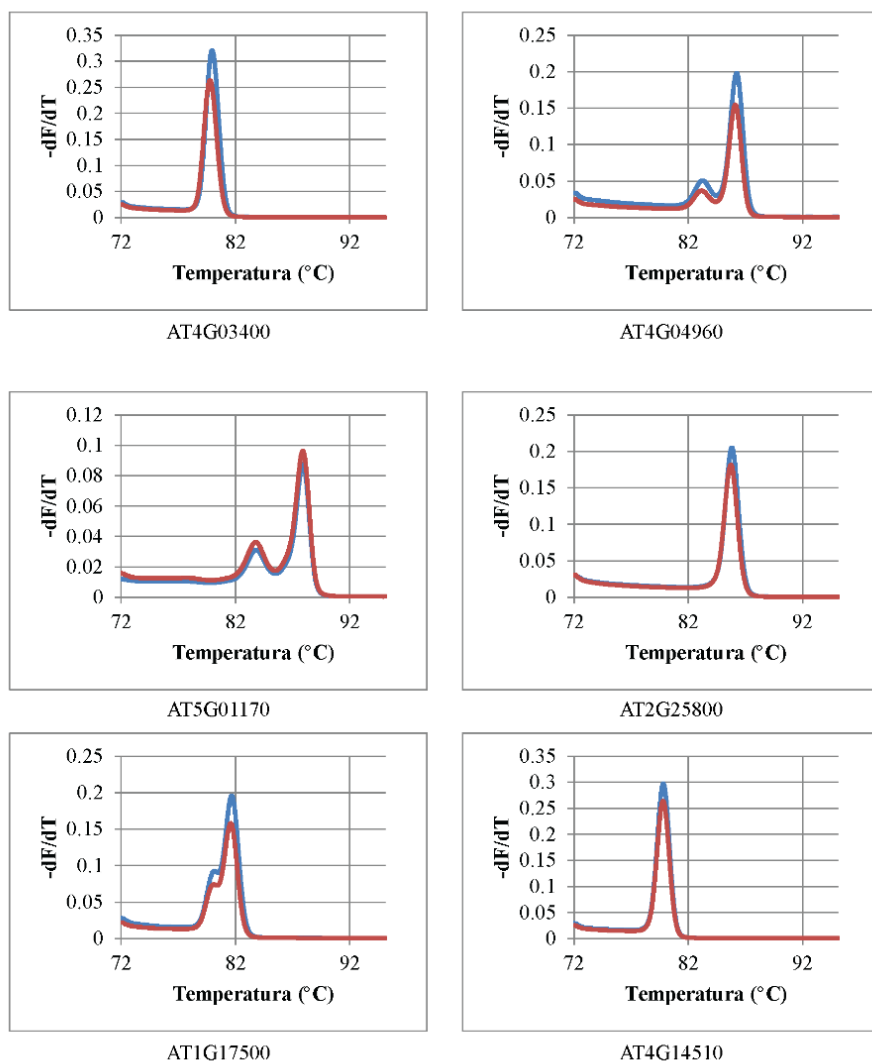


Slika 38. Detekcija promotorske *U6-26* sekvence iz CRISPR/Cas9 kasete u linijama *dss1(I).19*, *dss1(V).20* i WT biljkama generacije T1 i T3. PCR reakcija prajmerima *U6-26p-F/ U6-26p-R* (gornja gel elektroforeza). Prajmeri ACTf/ACTr su korišćeni za amplifikaciju aktina kao referentnog gena (donja gel elektroforeza).

Da bismo potvrdili da korišćene sgRNK nisu izazvale generisanje nespecifičnih i neželjenih mutacija u genomu *A. thaliana*, potencijalna *off-target* mesta su pretraživana upotrebom web alata CHOPCHOP v2 i CRISPR-P v2.0, a odabrana su najviše rangirana mesta koja nisu imala podudarnosti sa WT genima u tri ili više bazna para (Tabela 26). Uz pomoć specifično generisanih parova prajmera, konvencionalnom PCR metodom su umnoženi regioni koji okružuju genomsku DNK oko potencijalnih *off-target* mesta u T3 generaciji mutanata. Zatim su PCR produkti analizirani metodom HRM i pokazano je da potencijalna *off-target* mesta u okviru genoma imaju isti profil krive topljenja DNK lanca kao i referentne sekvence iz WT linije biljaka (Slika 39). Rezultat HRM metode je bio pokazatelj da u potencijalno neželjenim delovima genoma linija *dss1(I).19* i *dss1(V).20* nema promena, što je takođe potvrđeno Sangerovim sekvenciranjem.

Tabela 26. Lista potencijalnih *off-target* mesta. Prva tri navedena moguća *off-target* mesta su u genomu linije *dss1(I).19* (iznad isprekidane crte), a preostalih pet su u genomu *dss1(V).20* (ispod isprekidane crte).

Pristupni broj	Ime gena	Pozicija	Ciljne DNK sekvence	PAM region	Promena (bp)
AT1G64750	<i>DSS1(I)</i>	Egzon	GACTGCTG[AAGTAGTAAAGA]	TGG	
AT4G03400	<i>GH3</i> -sličan protein	Egzon	GACTG TTG [A TG TAGAAAAGA]	TGG	3
AT4G04960	Konkanavalin A-sličan lektin protein kinazi	Egzon	GGCTCCTG [AAGT GGT TAAGA]	CGG	4
AT5G45010	<i>DSS1(V)</i>	Intergenski region	AGCTGTCG[AAGTGGTGAAGG]	TGG	
AT5G01170	Oktopus-sličan 1 hipotetički protein	Egzon	AGC GGTGG [T AGTGGT GG AGG]	CGG	4
AT2G25800	Elongacioni faktor Ts (DUF810)	Egzon	AG TTGTCC [G AGTGGTGA TGG]	AGG	4
AT1G17500	<i>ATPaza E1-E2</i> tip familija proteina	Egzon	AGCTGT GC [AA A TGGTGAAG C]	TGG	4
AT4G14510	CRM domen proteina CFM3b	Egzon	AG T AGTCG[AAGTGGTGA TGT]	TGG	4



Slika 39. Analiza potencijalnih *off-target* mesta metodom HRM. Pristupni brojevi lokusa AT4G03400 i AT4G04960 ispod grafika kriva topljenja pripadaju mogućim neželjenim mestima promene u genomu *dss1(I).19*. Pristupni brojevi lokusa AT5G01170, AT2G25800, AT1G17500 i AT4G14510 ispod grafika krivih topljenja se odnose na moguća neželjena mesta promene u genomu *dss1(V).20*. -dF/dT je promena fluorescence pri promeni temperature.

U narednom setu eksperimenata mutanati *dss1(I).19^{-/-}* i *dss1(V).20^{-/-}* su povratno ukrštani (eng. *backcrossing*) sa divljim sojem *A. thaliana* u cilju segregacije potencijalnih *off-targeta*. Povratno ukrštanje je sprovedeno tradicionalnim ručnim ukrštanjem kroz nekoliko generacija. Dobijeni heterozigotni mutanti biljaka za *dss1(I).19^{-/+}*, odnosno *dss1(V).20^{-/+}*, su kontrolisano samooprašivani nakon čega su obnovljene i ponovo uspostavljene linije homozigota za mutacije *dss1(I).19^{-/-}* i *dss1(V).20^{-/-}*.

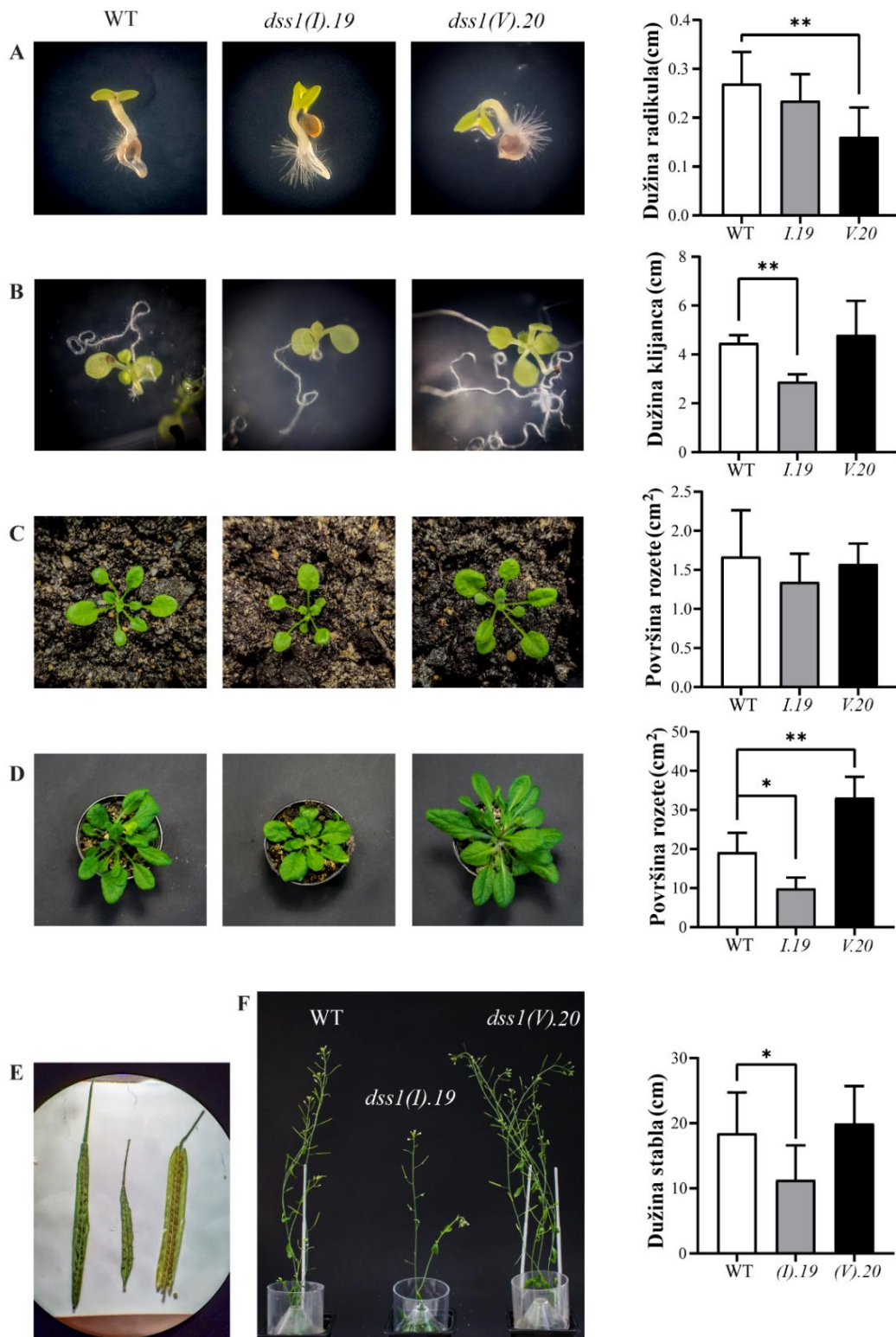
U cilju generisanja duplih *dss1(I)dss1(V)* mutanata, urađeno je ukrštanje između rekonstuisanih *dss1(I).19^{-/-}* i *dss1(V).20^{-/-}* linija. Izvršena je genotipizacija semena dobijenih oprašivanjem *dss1(I).19^{-/-}* tučkova polenom *dss1(V).20^{-/-}*, kao i oprašivanjem *dss1(V).20^{-/-}* tučkova polenom *dss1(I).19^{-/-}*. Metodom PCR su odabrani genotipovi *dss1(I)^{-/-}dss1(V)^{-/+}* i *dss1(I)^{-/+}dss1(V)^{-/-}* za dalje samooprašivanje. Testirano je ukupno 152 biljaka i ni u jednom slučaju nije detektovano prisustvo *dss1(I)^{-/-}dss1(V)^{-/-}* genotipa t.j. duplih *dss1* mutanata.

4.7.2. Fenotipska karakterizacija CRISPR/Cas9 linija *dss1(I).19* i *dss1(V).20* *A. thaliana*

Cilj fenotipizacije *dss1(I).19* i *dss1(V).20* mutiranih biljaka je bio da se otkrije da li su ciljane promene u genomu *A. thaliana* dovele do promena u morfološkim osobinama. Praćene su određene morfološke karakteristike kroz različite faze razvića *dss1* mutanata *A. thaliana* u odnosu na WT biljke (Slika 40).

Inicijalno tokom prve dve nedelje mlade biljke su uzgajane na MS medijumu za klijanje, a zatim su presađivane u supstrat gde su rasle do kraja životnog ciklusa. Primećeno je da klijanci mutanata u ranom stadijumu razvića imaju sporije klijanje u poređenju sa dinamikom klijanja WT klijanaca (Slika 40A). Takođe, u ovom stadijumu su WT klijanci imali potpuno otvorene kotiledone, dok su oni kod mutanata još uvek bili zatvoreni. Kod mladih biljaka *dss1(V).20* se pored zatvorenih kotiledona uočava izražena apikalna kuka i značajno kraća radikula u poređenju sa WT biljkama. Analizom mutanata nakon 12 dana od početka klijanja je uočeno da je dužina klijanaca *dss1(V).20* skoro identična dužinama WT klijanca, dok su klijanci *dss1(I).19* bili značajno kraći, i to oko 1,6 puta od WT kontrole (Slika 40B).

U fazi razvića 25 dana od početka klijanja, a nakon prebacivanja u zemljani supstrat, zadržao se sličan, ali ne statistički značajan trend rasta (Slika 40C). U narednoj fazi ispitivanja, kada su biljke bile sedam nedelja stare, razviće *dss1(V).20* biljaka je ubrzano, i uočeno je da su površine rozeta bile 1,7 puta veće u poređenju sa WT rozetama. Suprotno tome, rozete *dss1(I).19* biljaka su 1,9 puta manje u odnosu na WT (Slika 40D). Dalja merenja su pokazala da je i stabljika biljaka *dss1(I).19* u proseku kraća od *dss1(V).20* i kontrolnih biljaka (Slika 40F). Osim toga, zbog naglog rasta, početak sazrevanja, otvaranje čaura, kao i oslobađanje semena se dešavalo ranije kod *dss1(V).20* biljaka. Poredeći sa WT kontrolama, čaure *dss1(I).19* biljaka su sitnije i detektovano je uglavnom par semena po plodu (Slika 40E). Sveobuhvatno, *dss1(I).19* pokazuje zaostatak u razviću u poređenju sa WT, dok biljke *dss1(V).20* odlikuje brže razviće.



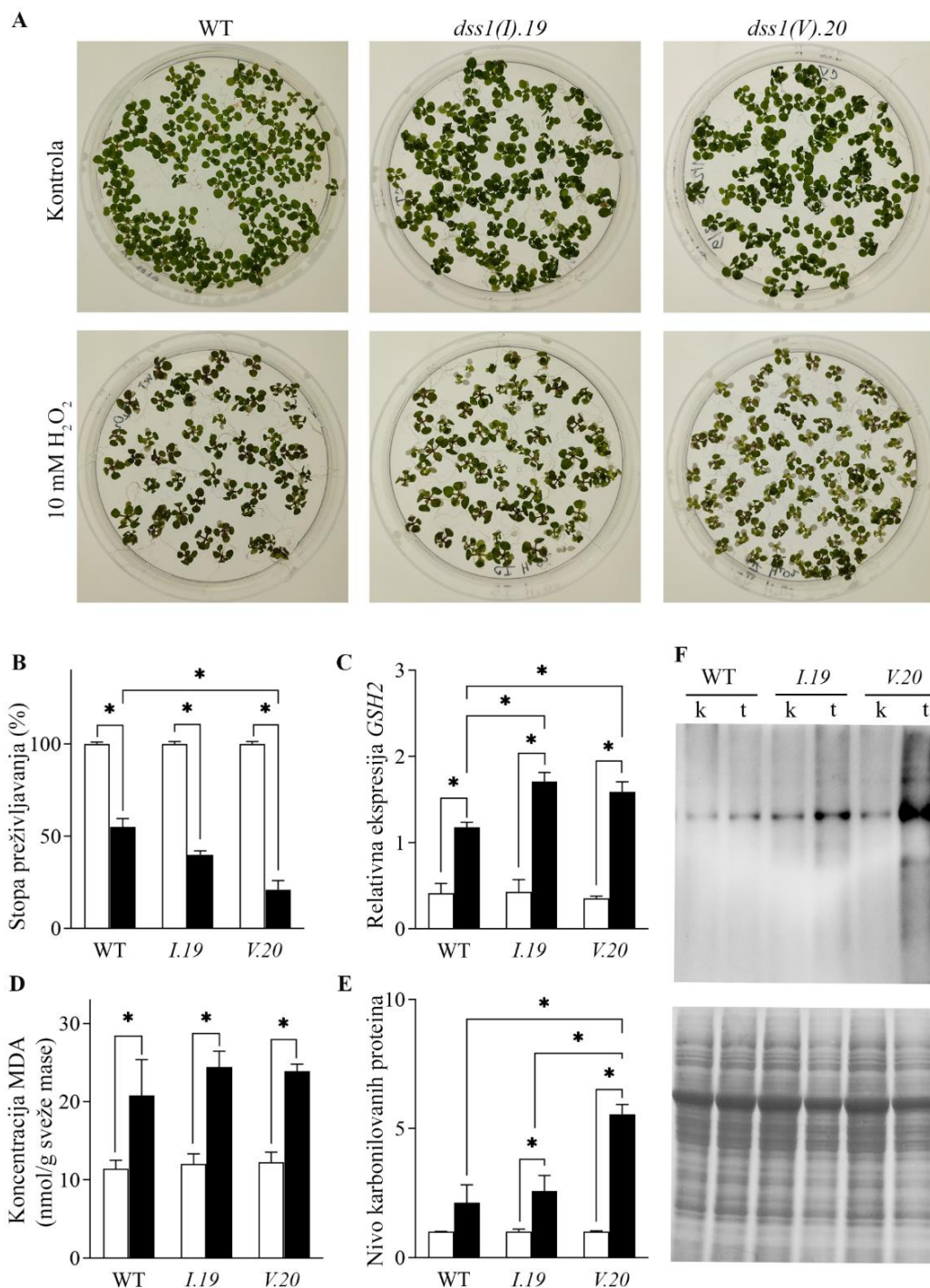
Slika 40. Uporedna analiza fenotipa tokom razvića divljeg tipa (WT), *dss1(I).19* i *dss1(V).20* linija *A. thaliana*. Nakon 2 nedelje klijanja i rasta na MS medijumu u Petri šoljama, klijanci su presađeni u zemlju. (A) Fotografije 2 dana starih klijanaca WT, *dss1(I).19* i *dss1(V).20* u Petri šoljama; histogram predstavlja dužinu radikula u cm. (B) Fotografije 12 dana starih klijanaca u Petri šoljama; histogram predstavlja dužinu klijanaca u cm. (C) Fotografije 25 dana starih klijanaca u zemlji; histogram predstavlja površinu rozete u cm². (D) Fotografije sedam nedelja starih klijanaca u zemlji; histogram predstavlja površinu rozete u cm². (E) Fotografija reprezentativnih čaura WT (leva), *dss1(I).19* (centralna) i *dss1(V).20* (desna). (F) WT, *dss1(I).19* i *dss1(V).20* izdanci starosti sedam nedelja u zemlji; histogram dužine stabla u cm. Beli stubići se odnose na WT biljake; sivi stubići - *dss1(I).19*; crni stubići - *dss1(V).20*. Prikazani su reprezentativni fenotipovi biljaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD dobijena iz tri biološki ponovljena eksperimenta (n = 30 po eksperimentu). Zvezdicom je prikazana statistički značajna razlika između WT- *dss1(I).19* i WT- *dss1(V).20* biljaka (p<0,05).

4.7.3. Osetljivost biljaka *dss1(I).19* i *dss1(V).20* na oksidativni stres indukovani vodonik-peroksidom

Biljke divljeg soja, linije mutanata *dss1(I).19* i *dss1(V).20* su gajene 14 dana na MS medijumu nakon čega su prebačene na nov medijum koji sadrži 10 mM H₂O₂ (Slika 41). U ranoj fazi tretmana vodonik-peroksidom, primećena je upadljiva hloroza mladih listova kod linija mutanata (Slika 41A). Kako bi se kvantifikovao efekat primenjenog stresora, određivana je stopa preživljavanja klijanaca (Slika 41B). Prisustvo povišene koncentracije H₂O₂ je uticalo na statistički značajno snižavanje stope preživljavanja kod sva tri genotipa klijanaca u odnosu na kontrolne grupe biljaka. Primećeno je da *dss1(V).20* ima 61% smanjenju stopu preživljavanja u poređenju sa WT biljkama gajenim u istim uslovima, dok je stopa preživljanja kod *dss1(I).19* klijanaca smanjena za 27%. Suprotno *dss1(I).19* mutantima, *dss1(V).20* su pokazali veću senzitivnost na primenjeni oksidativni stres.

Kao pokazatelj odgovora biljaka na stres, analizirani su profili ekspresije gena koji kodiraju antioksidativne enzime glutation sintetazu 2 (GSH2) i katalazu 1 (CAT1). Značajno povećanje nivoa ekspresije gena *GSH2* od 31% je detektovano u mutiranim linijama *dss1(I).19* u odnosu na WT kontrole, dok je kod genotipa *dss1(V).20* pokazana viša ekspresija *GSH2* za 26% (Slika 41C). Ispitivanjem nivoa ekspresije gena *CAT1* u *dss1(I).19*, *dss1(V).20* i WT biljkama nije uočena statistički značajna promena u uslovima izlaganja oksidativnom stresu (rezultati nisu prikazani). Rezultati ekspresije ukazuju da ovaj tip abiotičkog stresa utiče na pozitivnu regulaciju gena *GSH2* u obe linije *dss1(I).19* i *dss1(V).20*.

Takođe, kvantifikovan je i sadržaj MDA u ćelijama oštećenim tokom oksidativnog stresa. Sve analizirane mutantne linije biljaka su pokazale povećanje koncentracije MDA od 20 do 24% u tretmanu H₂O₂ u odnosu na kontrolne biljke, iako nije detektovana značajna promena na nivou lipidne peroksidacije u linijama mutanata (Slika 41D). Karbonilacija, kao ireverzibilni proces oksidacije proteina, je merena u cilju ispitivanja efekta oksidativnog stresa. Uočena je veća akumulacija karbonilovanih proteina u linijama mutanata nego u WT biljkama gde je takođe došlo do oksidativnog oštećenja proteina. Najintenzivnija oksidacija je uočena kod *dss1(V).20* biljaka, gde je količina oksidovanih proteina bila 60% veća nego kod WT biljaka (Slika 41E i F). U *dss1(I).19* mutantima je detektovano samo 18% više oštećenih proteina. Kako je otkriveno da je značajno više oksidovanih proteina prisutno u *dss1(V).20* biljkama, rezultati ukazuju da su CRISPR/Cas9 mutanti za *DSS1(V)* osetljiviji na oksidativni stres u poređenju sa mutantima u kojima je izvršena disrupcija gena *DSS1(I)*.

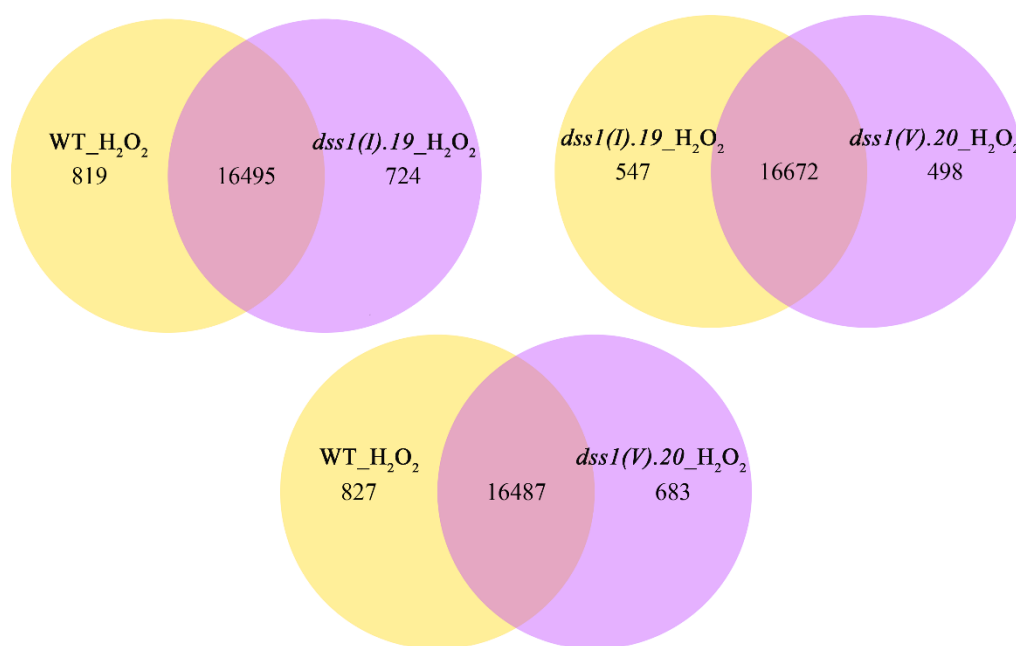


Slika 41. Uticaj oksidativnog stresa izazvanog peroksidom na WT, *dss1(I).19* i *dss1(V).20* klijance. 14 dana stari klijanci su preneti na nove MS podloge sa 10 mM vodonik peroksidom. Na histogramima beli stubiçi predstavljaju dobijene podatke netretiranih grupa klijanaca, a crni stubiçi tretirane klijance tretirane 10 mM H₂O₂. **(A)** Klijanci nakon 3 dana u pod uticajem dejstva H₂O₂ stresa. **(B)** Stopa preživljavanja WT, *dss1(I).19* i *dss1(V).20* klijanaca 3. dana u uslovima oksidativnog stresa. **(C)** Profil relativne ekspresije gena *GSH2* (glutation sintetaza 2). **(D)** Nivo lipidne peroksidacije (MDA nmol/g sveže mase) u WT, *dss1(I).19* i *dss1(V).20* klijancima izmeren nakon jednog dana u uslovima 10 mM H₂O₂. **(E)** Nivo karbonilovanih proteina dobijen denzitometrijskom analizom nakon oksiblot metode. **(F)** Detekcija karbonilovanih proteina: oksiblot analiza (gornja slika) i CBB bojenje (donja slika) totalnih proteina izolovanih iz kontrolnih (k) i 10 mM H₂O₂ tretiranih uzorka (t) biljaka WT, *dss1(I).19* i *dss1(V).20*. Prikazane su slike reprezentativnog eksperimenta. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD dobijena iz tri biološki ponovljena eksperimenta. Zvezdicom je prikazana statistički značajna razlika (p<0,05).

4.7.4. Analiza transkriptoma mutanata *dss1(I).19* i *dss1(V).20* nakon tretmana vodonik-peroksidom

Kako bi se razjasnio mogući funkcionalni značaj uočenih razlika u linijama mutanata *dss1(I).19* i *dss1(V).20* u odnosu na WT klijance u uslovima delovanja 10 mM H₂O₂, identifikovani su geni na čiju transkripciju je uticao nedostatak DSS1 proteina. Tehnikom RNK sekvenciranja (*RNA-seq*) dobijena je velika količina podataka koja je zatim analizirana preciznim bioinformatičkim alatima. *RNA-seq* je metoda baziran na sekvenciranju nove generacije - NGS (od eng. Next generation sequencing) koja se koristi za otkrivanje prisustva i kvantifikaciju RNK u biološkom uzorku u datom trenutku. Analizom transkriptoma uzoraka *dss1(I).19*, *dss1(V).20* i WT, uočene su razlike u ekspresiji gena (eng. Differentially expressed genes, DEG). Geni sa razlikama u ekspresiji su podvrgnuti analizi Ontologije gena (od eng. Gene Ontology, GO) da bi im se odredila funkcija, učešće u određenim biološkim procesima, kao i lokalizacija proteina koji su kodirani ovim genima. Zatim je izvršena analiza Kjoto enciklopedije gena i genoma (od eng. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG).

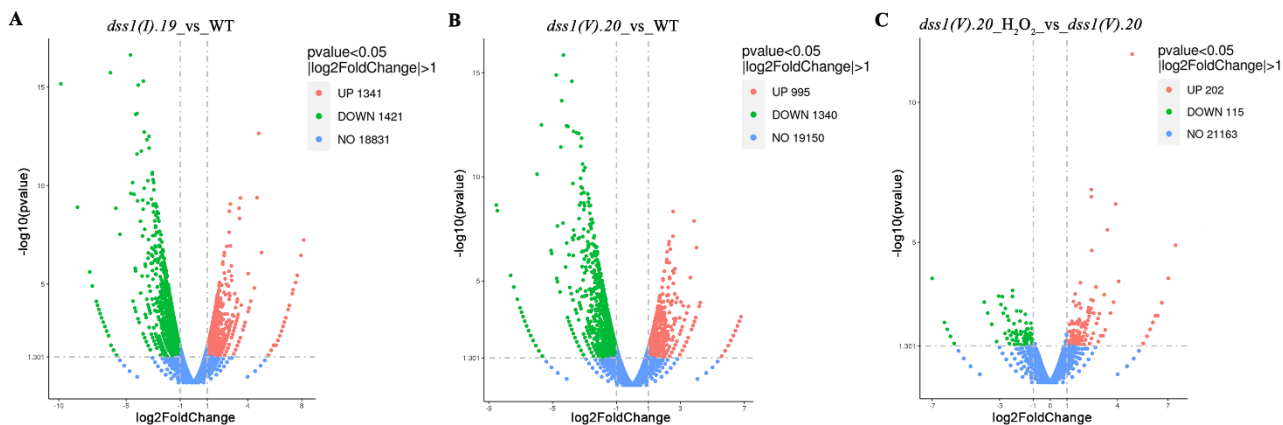
Na Slici 42 su predstavljeni Venovi dijagrami kao vizuelni prikaz sumiranih rezultata analize DEG, gde su sa jedne strane geni koji su unikatno eksprimirani u okviru pojedinačnog genotipa u uslovima oksidativnog stresa, a sa druge strane geni koji su koeksprimirani u dva genotipa, odnosno uzorka, u preklapajućim regionima dijagrama. Generalno, u uporednoj analizi WT sa *dss1(I).19*, *dss1(I).19* sa *dss1(V).20* i WT sa *dss1(V).20*, je dobijen veliki broj zajedničkih gena koji se koeksprimiraju kod sva tri genotipa i koji su predstavljeni preklapajućim domenima dijagrama. Njihov broj iznosi približno 16500.



Slika 42. Vizualizacija diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) između tri analizirana genotipa *A.thaliana* u uslovima oksidativnog stresa. Venovi dijagrami ilustruju broj gena, koji su unikatno eksprimirani u okviru jednog uzorka, kao i broj gena koji su koeksprimirani u dva uzoraka u preklapajućem regionu. WT_H₂O₂ – WT klijanci u tretmanu H₂O₂; *dss1(I).19*_H₂O₂ – *dss1(I).19* klijanci u tretmanu H₂O₂; *dss1(V).20*_H₂O₂ – *dss1(V).20* klijanci u tretmanu H₂O₂. Slike su preuzete iz dokumentacije rezultata bioinformatičke analize kompanije *Novogene*.

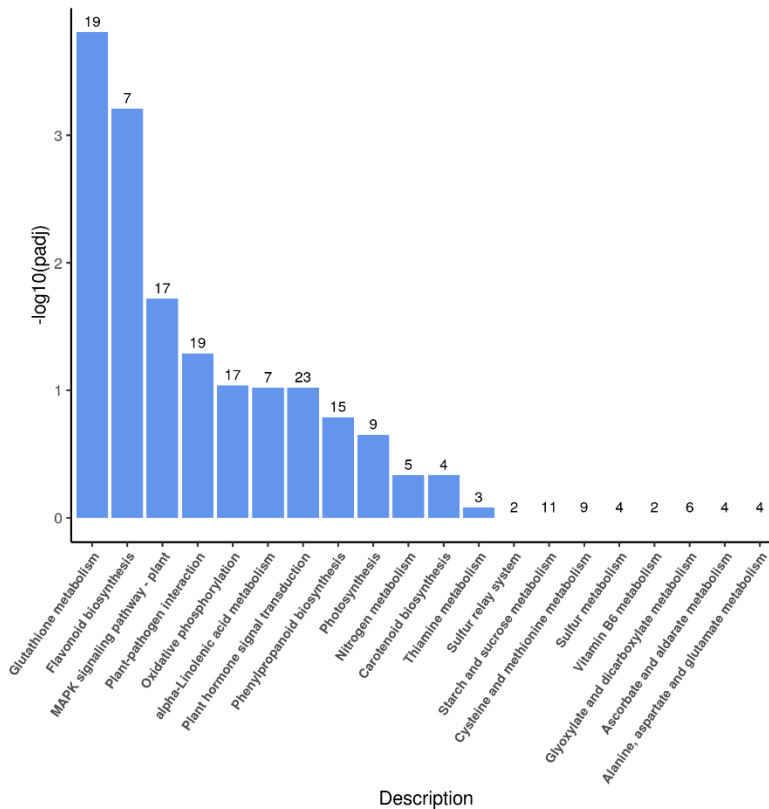
Biostatistička analiza transkriptoma je pokazala da postoje promene u ekspresiji gena između mutanata i WT linije pod uticajem vodonik-peroksida i prikazane su preko *volcano* grafika (Slika 43). U poređenju sa WT biljkama, kod *dss1(I).19* mutanata je detektovano 1341 gena sa statistički značajno povišenom ekspresijom i skoro podjednaki broj gena sa smanjenom ekspresijom koji iznosi

1421 (Slika 43A). U poređna analiza *dss1(V).20* i WT biljaka takođe pokazuje drastičnu razliku u nivou broja transkripata, gde je broj gena sa povišenom ekspresijom nešto manji i iznosi 955, a negativno regulisanih gena je 1340 (Slika 43B). Međusobno poređenje linija mutanata pokazuje značajne, ali nešto manje razlike od 202 pozitivno i 115 negativno regulisanih gena. U cilju karakterizacije funkcionalnih procesa diferencijalno eksprimiranih gena i sortiranja u metaboličke puteve, ovi geni su dalje prikazani kroz KEGG analizu.



Slika 43. Volcano grafički prikaz distribucije diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) između tri analizirana genotipa *A.thaliana* u uslovima oksidativnog stresa. Apscisa predstavlja nivo promene ekspresije gena (\log_2 Fold Change) – upotrebom *DESeq2* *R/EdgeR* softverskih paketa), a ordinata statističku značajnost nivoa promene genske ekspresije ($-\log_{10}(pvalue)$) – upotrebom *Benjamini-Hochberg* metode). Crvene tačke označavaju: gene sa statistički značajno povišenom ekspresijom (\log_2 FoldChange ≥ 1 , $pvalue < 0.05$); zelene tačke: gene sa statistički značajno smanjenom ekspresijom (\log_2 FoldChange ≤ -1 , $pvalue < 0.05$); plave tačke: geni bez statistički značajne promene u ekspresiji. Slike su preuzete iz dokumentacije rezultata bioinformatičke analize kompanije *Novogene*.

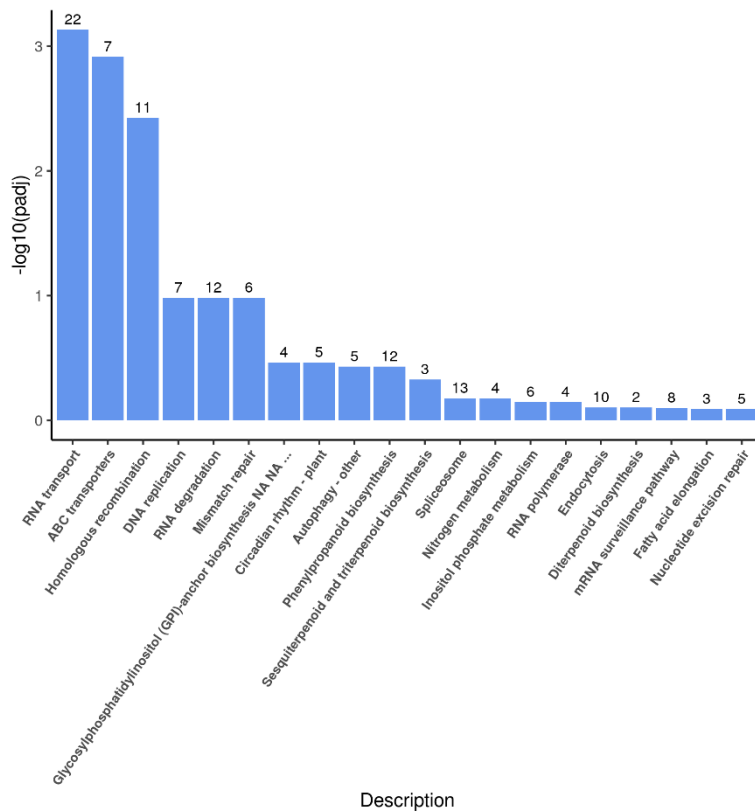
Primećeno je da od ukupnog broja identifikovanih metaboličkih puteva, nekoliko statistički značajnih puteva imaju direktnu ili indirektnu povezanost sa biljnim odgovorom na abiotički stres. Pokazano je da smanjenu ekspresiju imaju geni koji su svrstani u 86 KEGG puteva kod *dss1(I).19* u odnosu na WT biljke (Slika 44). Statističku značajnost su imali geni uključeni u metabolizam glutaciona, biosintezu flavonoida i MAPK (mitogenom aktivirana protein kinaza) signalni put (Tabela 27). Povišen nivo ekspresije imaju geni čiji proteini učestvuju u 79 metaboličkih puteva, od kojih najveću značajnost imaju geni sa ulogom u transportu RNK, ABC proteinima (ATP-vezujući kasetni transporter) i u homolognoj rekombinaciji (Slika 45; Tabela 28).



Slika 44. Grafički prikaz rezultata KEGG analize metaboličkih puteva (Kjoto enciklopedija gena i genoma) u kojima učestvuju proteini čiji su geni sniženo ekspimirani u *dss1(I).19* klijancima u odnosu na gene WT klijanaca u tretmanu vodonik-peroksidom. Na apscisi su prikazani opisi funkcija KEGG puteva (*Description*); na ordinati je predstavljena podešena p-vrednost ($-\log_{10}(padj)$). Redosled puteva je zasnovan prema p-vrednosti (visina stuba). Za KEGG puteve je uzeta statistički značajna vrednost $p < 0,05$. Brojevi predstavljaju ukupan broj gena koji se odnose na opisani put.

Tabela 27. Spisak gena koji imaju statistički značajno smanjenje ekspresije u mutantu *dss1(I).19* u odnosu na WT biljke u odgovoru na oksidativni stres vodonik-peroksidom. Odnos gena - odnos diferencijalno ekspimiranih gena prema svim genima koji su analizirani u navedenim KEGG putevima. Statistička metoda: hipergeometrijski test. *padj* – podešena p-vrednost, FDR (od eng. *false discovery rate*) metoda korekcije: *Benjamini-Hochberg*. Za KEGG puteve je uzeta statistički značajna vrednost $p < 0,05$.

Opis KEGG puteva	Odnos gena	<i>padj</i>	Pristupni br. gena	Naziv gena
Metabolizam glutationa	19/260	0,000155	AT5G17220/ AT2G29470/ AT2G29460/ AT1G17170/ AT2G29420/ AT1G75270/ AT1G74590/ AT2G29490/ AT3G09640/ AT1G59700/ AT4G35970/ AT1G02930/ AT3G43800/ AT1G59670/ AT5G26220/ AT1G02940/ AT1G69920/ AT1G49860/ AT1G53680	<i>GSTF12/ GSTU3/ GSTU4/ GSTU24/ GSTU7/ DHAR2/ GSTU10/ GSTU1/ APX2/ GSTU16/ APX5/ GSTF6/ GSTU27/ GSTU15/ GGCT2;1/ ATGSTF5/ GSTU12/ GSTF14/ GSTU28</i>
Biosinteza flavodoida	7/260	0,000616	AT5G07990/ AT4G22880/ AT5G05270/ AT5G13930/ AT3G55120/ AT5G42800/ AT1G67980	<i>CYP75B1/ LDOX/ CHI3/ CHS/ CH11/ DFRA/ CCOAMT</i>
MAPK signalni put - biljke	17/260	0,019068	AT2G14610/ AT4G11280/ AT3G11410/ AT5G59220/ AT1G07430/ AT3G25250/ AT1G05100/ AT2G38470/ AT3G23240/ AT4G40010/ AT2G29380/ AT4G26080/ AT5G57050/ AT1G73500/ AT2G41090/ AT2G09225/ AT2G32510	<i>PR1/ ACS6/ PP2CA/ SAG113/ AIP1/ OX11/ MAPKKK18/ WRKY33/ ERF1B/ SRK2F/ HAI3/ ABI1/ ABI2/ MKK9/ CML10/ -/ MAPKKK17</i>

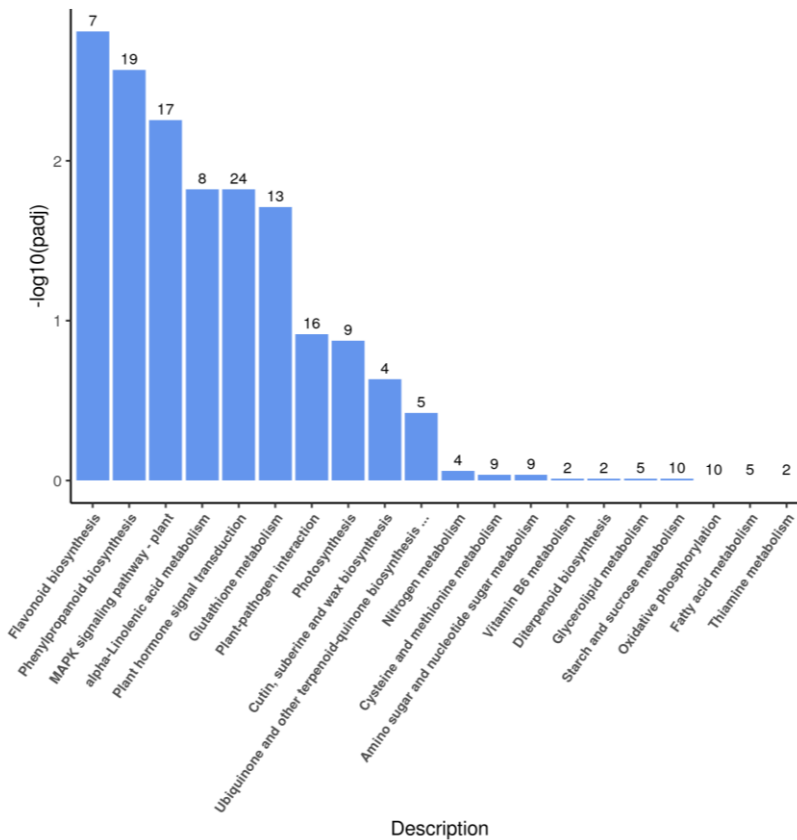


Slika 45. Grafički prikaz rezultata KEGG analize metaboličkih puteva (Kjoto enciklopedija gena i genoma) u kojima učestvuju proteini čiji su geni povišeno eksprimirani u *dssI(I).19* klijanacima u odnosu na gene WT klijanaca u tretmanu vodonik-peroksidom. Na apscisi su prikazani opisi funkcija KEGG puteva (*Description*); na ordinati je predstavljena podešena p-vrednost ($-\log_{10}(padj)$). Redosled puteva je zasnovan prema p-vrednosti (visina stuba). Za KEGG puteve je uzeta statistički značajna vrednost $p < 0,05$. Brojevi predstavljaju koliko je gena koji se odnose na opisani put.

Tabela 28. Spisak gena koji imaju statistički značajno povećanje ekspresije kod mutanata *dss1(I).19* u odnosu na WT biljke u odgovoru na oksidativni stres vodonik- peroksidom. Odnos gena - odnos diferencijalno eksprimiranih gena prema svim genima koji su razmotreni u navedenim KEGG putevima. Statistička metoda: hipergeometrijski test. *p*adj – podešena p-vrednost, FDR (od eng. *false discovery rate*) metoda korekcije: *Benjamini-Hochberg*. Za KEGG puteve je uzeta statistički značajna vrednost $p < 0,05$.

Opis KEGG puteva	Odnos gena	<i>p</i> adj	Pristupni br. gena	Naziv gena
Transport RNK	22/224	0,000737	AT1G55540/ AT1G79280/ AT5G51200/ AT5G40480/ AT1G73240/ AT1G76720/ AT3G60240/ AT1G24706/ AT5G53480/ AT5G47010/ AT4G38760/ AT3G14120/ AT1G10390/ AT2G05120/ AT1G14850/ AT1G80680/ AT2G36660/ AT1G76810/ AT2G45000/ AT5G18410/ AT4G37130/ AT1G76820	<i>NUP214/ NUA/ -/ GB210/ -/ -/ EIF4G/ THO2/ KPNB1/ UPF1/ -/ NUP107/ NUP98A/ -/ NUP155/ NUP96/ PAB7/ -/ NUP62/ PIR/ NUP58/ -</i>
ABC transporteri	7/224	0,001213	AT3G28860/ AT1G28010/ AT4G25960/ AT3G62150/ AT2G07680/ AT2G39480/ AT2G41700	<i>ABCB19/ ABCB14/ ABCB2/ ABCB21/ ATMRP11/ ABCB6/ ABCA1</i>
Homologna rekombinacija	11/224	0,003783	AT5G45400/ AT4G21070/ AT2G22140/ AT2G01440/ AT1G60930/ AT1G77320/ AT2G32000/ AT2G31970/ AT5G63960/ AT1G10930/ AT1G05490	<i>RPA1C/ BRCA1/ EME1B/ RECG/ RECQLAB/ MEI1/ -/ RAD50/ -/ RECQL4A/ CLSY3</i>

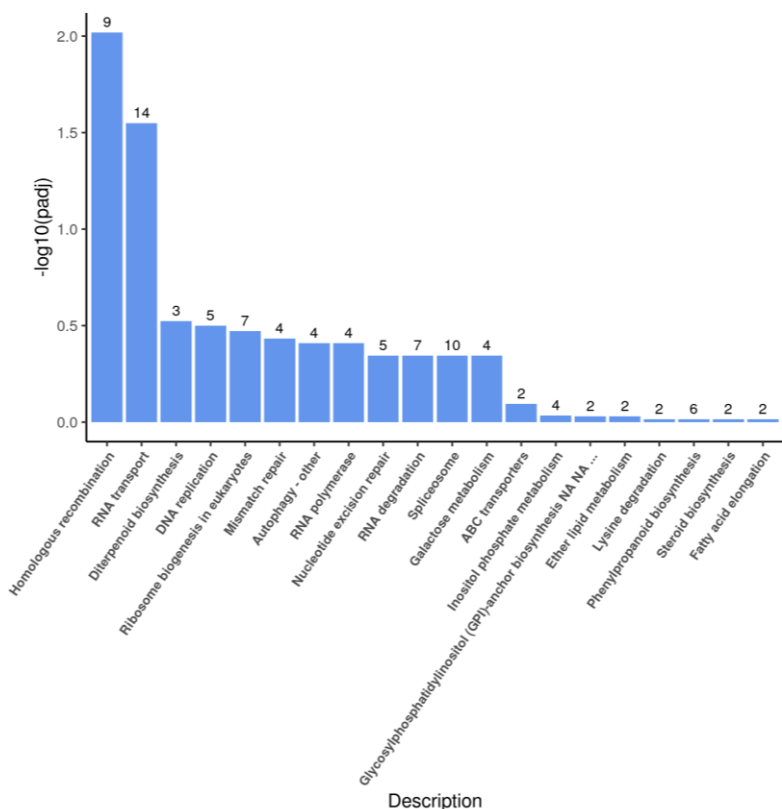
U slučaju mutanata *dss1(V).20*, detektovano je ukupno 234 gena koji su negativno regulisani, od kojih se izdvajaju geni asocirani sa biosintezom flavonoida, biosintezom fenilpropanoida, MAPK signalnim putem, signalnom transdukcijom biljnih hormona, metabolizmom glutationa i sa interakcijom biljka-patogen (Slika 46; Tabela 29). Što se tiče gena sa povišenim nivoom ekspresije u *dss1(V).20* u poređenju sa WT biljkama, od 148 analiziranih gena statističku značajnost u promenama ekspresije su pokazali geni uključeni u homolognu rekombinaciju DNK i u transport RNK (Slika 47; Tabela 30).



Slika 46. Grafički prikaz rezultata KEGG analize metaboličkih puteva (Kjoto enciklopedija gena i genoma) u kojima učestvuju proteini čiji su geni smanjeno eksprimirani u *dss1(V).20* klijanacima u odnosu na gene WT klijanaca u tretmanu vodonik-peroksidom. Na apscisi su prikazani opisi funkcija KEGG puteva (*Description*); na ordinati je predstavljena podešena p-vrednost ($-\log_{10}(padj)$). Redosled puteva je zasnovan prema p-vrednosti (visina stuba). Za KEGG puteve je uzeta statistički značajna vrednost $p < 0,05$. Brojevi predstavljaju koliko je gena koji se odnose na opisani put.

Tabela 29. Spisak gena koji imaju statistički značajno smanjenje ekspresije kod mutanata *dss1(V).20* u odnosu na WT biljke u odgovoru na oksidativni stres vodonik- peroksidom. Odnos gena - odnos diferencijalno eksprimiranih gena prema svim genima koji su razmotreni u navedenim KEGG putevima. Statistička metoda: hipergeometrijski test. *p*_{adj} – podešena p-vrednost, FDR (od eng. *false discovery rate*) metoda korekcije: *Benjamini-Hochberg*. Za KEGG puteve je uzeta statistički značajna vrednost $p < 0,05$.

Opis KEGG puteva	Odnos gena	<i>p</i> _{adj}	Pristupni br. gena	Naziv gena
Biosinteza flavonoida	7/234	0,001551	AT4G22880/ AT5G05270/ AT5G07990/ AT5G42800/ AT3G55120/ AT5G13930/ AT1G67980	<i>LDOX/ CHI3/ CYP75B1/ DFRA/ CH11/ CHS/ CCOAMT</i>
Biosinteza fenilpropanoida	19/234	0,002702	AT3G60140/ AT2G44460/ AT2G18150/ AT3G17070/ AT5G64110/ AT4G37980/ AT4G36430/ AT4G08780/ AT5G64100/ AT5G04330/ AT2G18980/ AT1G45191/ AT3G13610/ AT2G21890/ AT1G80820/ AT2G22420/ AT1G67980/ AT1G65060/ AT5G58400	<i>BGLU30/ BGLU28/ PER15/ PER29/ PER70/ CAD7/ PER49/ PER38/ PER69/ CYP84A4/ PER16/ BGLU1/ F6'H1/ CAD3/ CCR2/ PER17/ CCOAMT/ 4CL3/ PER68</i>
MAPK signalni put - biljke	17/ 234	0,005571	AT2G14610/ AT4G11280/ AT3G11410/ AT4G40010/ AT5G59220/ AT3G25250/ AT1G07430/ AT2G29380/ AT2G38470/ AT3G23240/ AT4G26080/ AT5G57050/ AT2G41090/ AT1G73500/ AT3G18690/ AT5G24770/ AT2G14580	<i>PR1/ ACS6/ PP2CA/ SRK2F/ SAG113/ OX11/ AIP1/ HAI3/ WRKY33/ ERF1B/ ABI1/ ABI2/ CML10/ MKK9/ MKS1/ VSP2/ PRB1</i>
Metabolizam alfa-linoleinske kiseline	8/234	0,015097	AT1G72520/ AT3G01420/ AT3G25780/ AT1G77120/ AT5G48880/ AT1G19640/ AT3G25770/ AT1G17420	<i>LOX4/DOX1/AOC3/ADH1 /KAT5/JMT/AOC2/LOX3</i>
Signalna transdukcija biljnih hormona	24/234	0,015097	AT2G14610/ AT3G11410/ AT4G40010/ AT5G13320/ AT3G61900/ AT5G59220/ AT4G03400/ AT1G07430/ AT2G29380/ AT3G23240/ AT4G34750/ AT4G26080/ AT1G17380/ AT5G57050/ AT1G19050/ AT3G48100/ AT5G50760/ AT1G04250/ AT5G18050/ AT2G14580/ AT5G20810/ AT3G16360/ AT2G16580/ AT4G34800	<i>PR1/ PP2CA/ SRK2F/ PBS3/ -/ SAG113/ DFL2/ AIP1/ HAI3/ ERF1B/ -/ ABI1/ TIFY11A/ ABI2/ ARR7/ ARR5/ -/ IAA17/ SAUR22/ PRB1/ -/ AHP4/ -/-</i>
Metabolizam glutationa	13/234	0,019468	AT5G17220/ AT2G29470/ AT5G26220/ AT3G09640/ AT1G02940/ AT1G17170/ AT3G43800/ AT2G29460/ AT1G59700/ AT1G75270/ AT2G29490/ AT1G74590/ AT1G78340	<i>GSTF12/ GSTU3/ GGCT2;1/ APX2/ ATGSTF5/ GSTU24/ GSTU27/ GSTU4/ GSTU16/ DHAR2/ GSTU1/ GSTU10/ GSTU22</i>
Biljka-patogen interakcija	16/234	0,12139	AT2G14610/ AT1G76650/ AT2G43290/ AT2G38470/ AT3G57530/ AT1G21550/ AT4G37010/ AT1G66400/ AT3G01830/ AT2G41410/ AT2G41090/ AT3G51920/ AT1G04220/ AT3G50770/ AT2G14580/ AT3G10190	<i>PR1/ CML38/ CML5/ WRKY33/ CPK32/ CML44/ CEN2/ CML23/ CML40/ CML35/ CML10/ CML9/ KCS2/ CML41/ PRB1/ CML36</i>

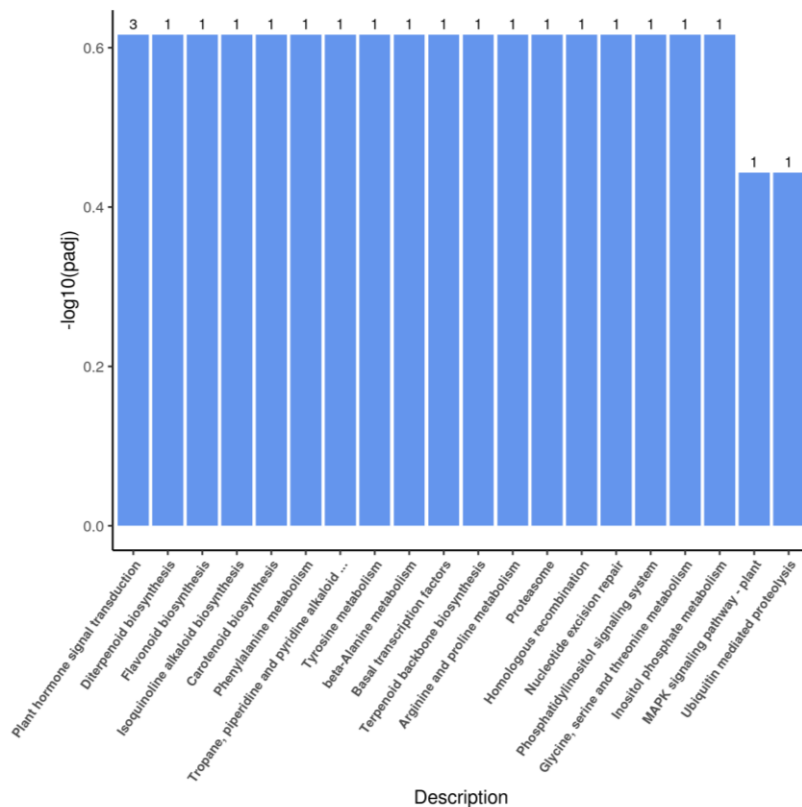


Slika 47. Grafički prikaz rezultata KEGG analize metaboličkih puteva (Kjoto enciklopedija gena i genoma) u kojima učestvuju proteini čiji su geni povišeno ekspimirani u *dss1(V).20* klijanacima u odnosu na gene WT klijanaca u tretmanu vodonik-peroksidom. Na apscisi su prikazani opisi funkcija KEGG puteva (*Description*); na ordinati je predstavljena podešena p-vrednost ($-\log_{10}(padj)$). Redosled puteva je zasnovan prema p-vrednosti (visina stuba). Za KEGG puteve je uzeta statistički značajna vrednost $p < 0,05$. Brojevi predstavljaju koliko je gena koji se odnose na opisani put.

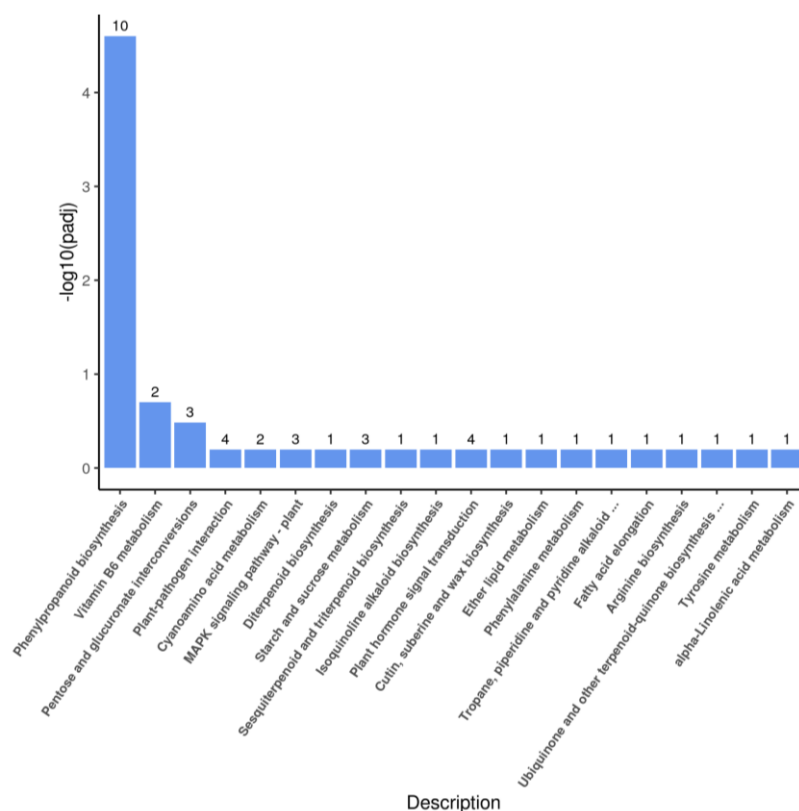
Tabela 30. Spisak gena koji imaju statistički značajno povećanje ekspresije kod mutanata *dss1(V).20* u odnosu na WT biljke u odgovoru na oksidativni stres vodonik-peroksidom. Odnos gena - odnos diferencijalno ekspimiranih gena prema svim genima koji su razmotreni u navedenim KEGG putevima. Statistička metoda: hipergeometrijski test. *padj* – podešena p-vrednost, FDR (od eng. *false discovery rate*) metoda korekcije: *Benjamini-Hochberg*. Za KEGG puteve je uzeta statistički značajna vrednost $p < 0,05$.

Opis KEGG puteva	Odnos gena	<i>padj</i>	Pristupni br. gena	Naziv gena
Homologna rekombinacija	9/148	0,009573	AT2G32000/AT5G45400/AT2G22140 /AT2G01440/AT2G28560/AT1G20720 /AT1G10930/AT5G63960/AT4G02110	-/RPA1C/EME1B/RECG/ ATRAD51B/ -/RECQL4A/-/-
Transport RNK	14/148	0,028215	AT1G73240/AT1G55540/AT1G79280 /AT5G40480/AT2G45000/AT5G51200 /AT3G60240/AT1G24706/AT1G33410 /AT5G53480/AT3G14120/AT1G48970 /AT1G76720/AT1G14850	-/NUP214/ NUA/GB210/NUP62/ -/EIF4G/THO2/SAR1/KPNB1/ NUP107/-/-/NUP155

KEGG analizom diferencijalne ekspresije gena između samih mutanata *dssI(I).19* i *dssI(V).20* nije procenjena statistički značajno snižena ekspresija gena (Slika 48). Međutim, postoji značajna razlika u pozitivno regulisanoj ekspresiji gena koji imaju funkciju u biosintezi fenilpropanoida u *dssI(I).19* mutantima (Slika 49; Tabela 31).



Slika 48. Grafički prikaz rezultata KEGG analize metaboličkih puteva (Kjoto enciklopedija gena i genoma) u kojima učestvuju proteini čiji su geni sniženo ekspimirani u *dssI(I).19* u odnosu na gene *dssI(V).20* klijanaca u tretmanu vodonik-peroksidom. Na apscisi su prikazani opisi funkcija KEGG puteva (*Description*); na ordinati je predstavljena podešena p-vrednost ($-\log_{10}(padj)$). Redosled puteva je zasnovan prema p-vrednosti (visina stuba). Za KEGG puteve je uzeta statistički značajna vrednost $p < 0,05$. Brojevi predstavljaju koliko je gena koji se odnose na opisani put.



Slika 49. Grafički prikaz rezultata KEGG analize metaboličkih puteva (Kjoto enciklopedija gena i genoma) u kojima učestvuju proteini čiji su geni povišeno ekspimirani u *dss1(I).19* u odnosu na gene *dss1(V).20* klijanaca u tretmanu vodonik-peroksidom. Na apscisi su prikazani opisi funkcija KEGG puteva (*Description*); na ordinati je predstavljena podešena p-vrednost ($-\log_{10}(padj)$). Redosled puteva je zasnovan prema p-vrednosti (visina stuba). Za KEGG puteve je uzeta statistički značajna vrednost $p < 0,05$. Brojevi predstavljaju koliko je gena koji se odnose na opisani put.

Tabela 31. Spisak gena koji imaju statistički značajno povećanje ekspresije kod mutanata *dss1(I).19* u odnosu na *dss1(V).20* biljke u odgovoru na oksidativni stres vodonik-peroksidom. Odnos gena - odnos diferencijalno ekspimiranih gena prema svim genima koji su razmotreni u navedenim KEGG putevima. Statistička metoda: hipergeometrijski test. *padj* – podešena p-vrednost, FDR (od eng. *false discovery rate*) metoda korekcije: *Benjamini-Hochberg*. Za KEGG puteve je uzeta statistički značajna vrednost $p < 0,05$.

Opis KEGG puteva	Odnos gena	<i>padj</i>	Pristupni br. gena	Naziv gena
Biosinteza fenilpropanoida	136/4495	2.51E-05	AT1G30870/AT5G64110/AT5G17820/ AT5G67400/AT1G61820/AT2G34790/ AT5G15180/AT2G18980/AT4G26010/ AT5G04330	PER7/PER70/ /PER73/BGLU46/MEE23/ PER56/PER16/ /CYP84A4

4.7.5. Utvrđivanje osetljivosti biljaka *dss1(I).19* i *dss1(V).20* na oksidativni stres indukovano ultraljubičastim zračenjem

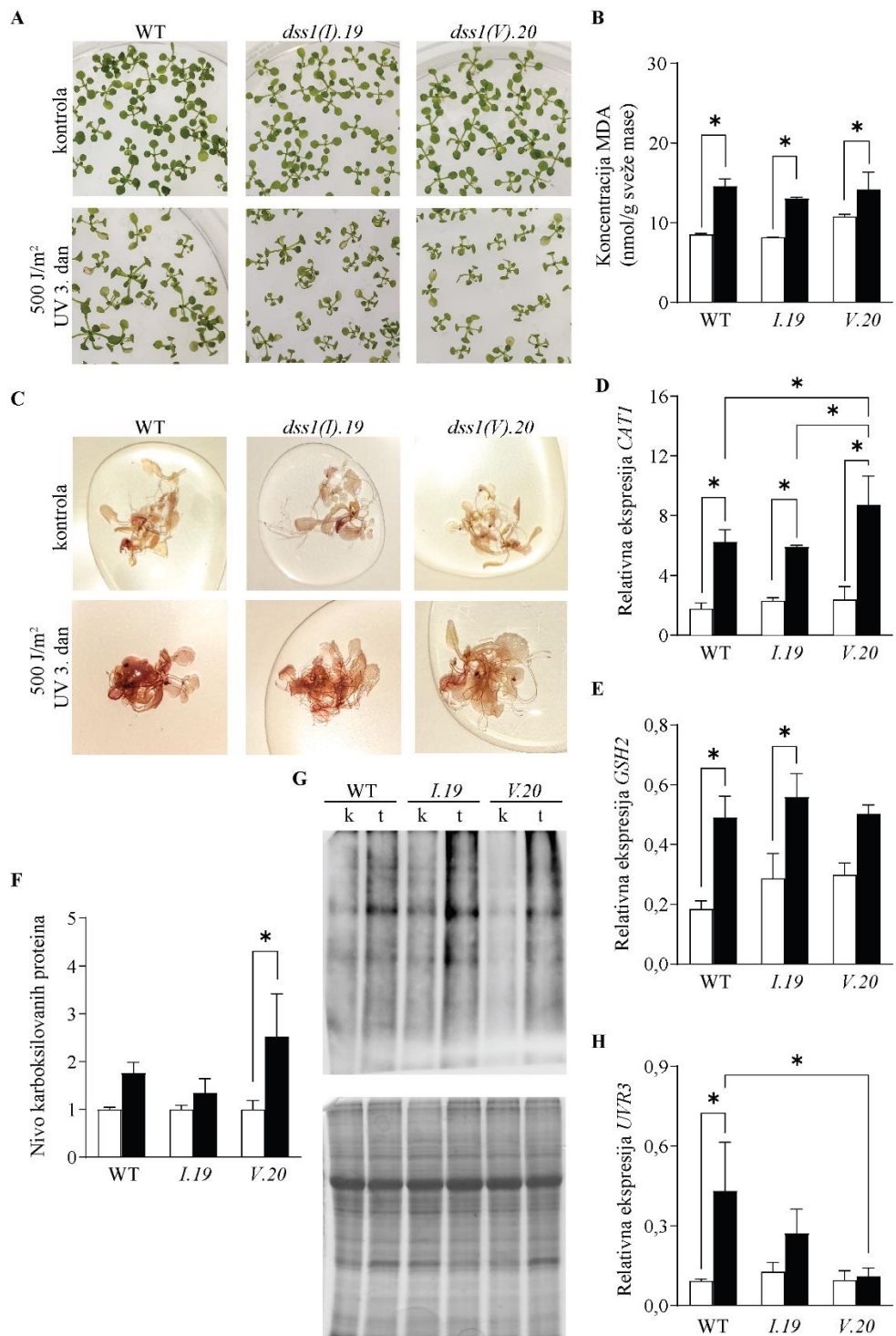
U cilju ispitivanja pretpostavljene veze između *knockout* mutanata *dss1 A. thaliana* i osetljivosti na UV zračenje, ispitivane su ćelijske promene indukovane UV-zračenjem u *dss1* mutantima mladih biljaka. Klijanci WT, *dss1(I).19* i *dss1(V).20*, kao i u prethodnim tretmanima, izlagani su zračenju intenziteta 500 J/m², a talasne dužine 245 nm (UV-C svetlo) u istoj fazi razvića (14 dana od klijanja). Nakon tri dana zračenja primećena su prosvetljenja i oštećenja na listovima biljaka sva tri genotipa u odnosu na kontrolne grupe koje su imale zelene listove (Slika 50A).

Merenjem nivoa lipidne peroksidacije je detektovan značajno povišen nivo MDA u svim biljkama tretiranim UV talasima u odnosu na kontrolne biljke (Slika 50B). Prisustvo H₂O₂ u tkivima tretiranih biljaka je analizirano bojenjem 3,3'-diaminobenzidinom (DAB). Braon precipitat, koji se javlja usled polimerizacije DAB u prisustvu H₂O₂, uočen je u tkivima lista sva tri genotipa trećeg dana od izlaganja UV zračenju (Slika 50C). Akumulacija H₂O₂ nije detektovana u kontrolnim biljkama, kao ni razlika u akumulaciji H₂O₂ između tretiranih WT biljaka i tretiranih linija mutanata.

U uslovima oksidativnog stresa, aktivnost gena *CAT1* i *GSH2* je, na nivou transkripata, povećana kod tretiranih biljaka. Značajni porast nivoa relativne ekspresije *CAT1* od 3,6 puta, je uočen kod tretiranih *dss1(V).20* u odnosu na netretirane biljke, a 1,4 puta veći u odnosu na tretirane WT i *dss1(I).19* klijance (Slika 50D). Što se tiče nivoa prisutnih iRNK *GSH2*, detektovan je dvostruko veći porast ekspresije kod WT i *dss1(I).19* klijanaca u odnosu na njihove kontrolne grupe (Slika 50E).

Denzitometrijskom analizom oksidovanih proteina analiziranih oksiblot metodom, uočeno je da je u tretiranim uzorcima *dss1(V).20* linije značajno povišen nivo oštećenih proteina u odnosu na kontrolu (Slika 50F i G). Kod WT i *dss1(I).19* biljaka izloženih stresu nije detektovana promena u nivou oksidovanih proteina u odnosu na netretirane biljke.

U cilju praćenja ekspresije gena, čiji produkti učestvuju u reparaciji fotoprodukata koji nastaju usled delovanja UV zraka, odmah nakon primene UV tretmana, određivan je nivo transkripata za *PHR1* (fotoliaza 1) i *UVR3* (od eng. UV *repair defective 3*). Naime, metodom kvantitativnog PCR nisu uočene promene u nivou relativne ekspresije *PHR1* ni kod jedne grupe biljaka (rezultati nisu prikazani). Analizom relativne ekspresije *UVR3* je detektovano značajno smanjenje broja transkripata kod tretiranih mutanata *dss1(V).20* u odnosu na tretiranu grupu WT, dok su tretirani WT klijanci imali značajno povećanje ekspresije *UVR3* u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu. Na osnovu dobijenih rezultata se izvodi zaključak da linije CRISPR/Cas9 mutanata *dss1* i WT biljke pokazuju sličan ćelijski odgovor na stres izazvan UV-C talasima, pri dozi 500 J/m².



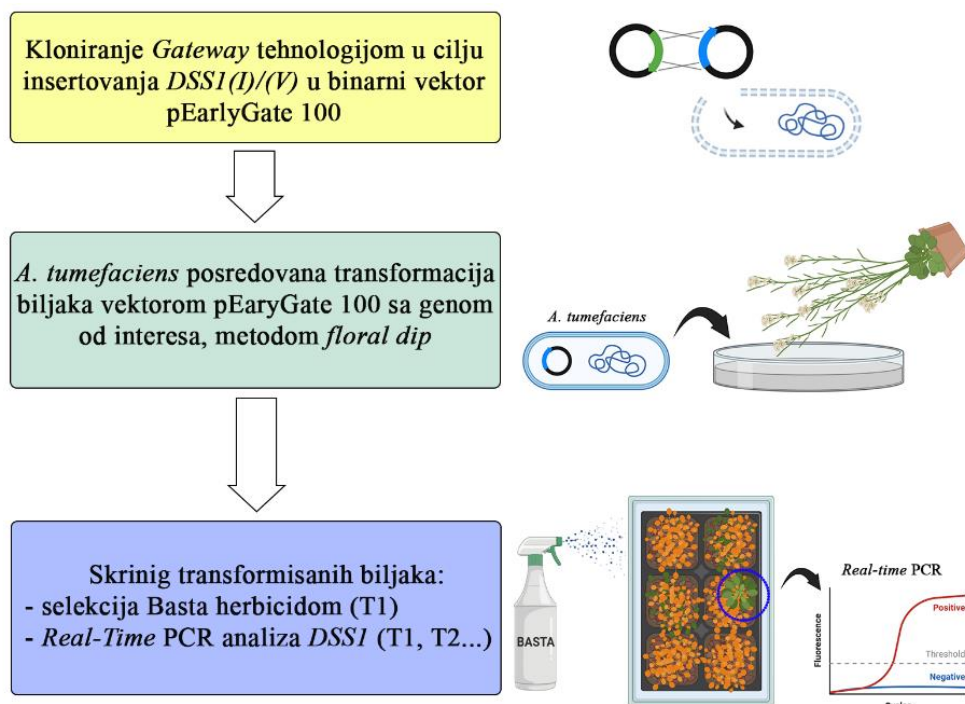
Slika 50. Uticaj oksidativnog stresa izazvanog vodik-peroksidom na WT, *dss1(I).19* i *dss1(V).20* klijance. 14 dana stari klijanci su tretirani UV-C zračenjem (500 J/m²). Na histogramima beli stubići predstavljaju netretirane grupe klijanca, a crni stubići klijance tretirane 500 J/m² UV-C talasima. (A) Klijanci nakon tri dana od izlaganja 500 J/m² UV-C radijacije. Prikazane su reprezentativne fotografije mladih biljaka. (B) Nivo lipidne peroksidacije (MDA nmol/g sveže mase) u WT, *dss1(I).19* i *dss1(V).20* klijancima izmeren nakon tri dana tretmanom UV-C. (C) Vizualizacija H₂O₂ bojenjem DAB rastvorom. Prikazane su grupe od po tri klijanca. (D) Profil relativne ekspresije gena *CAT1* (katalaza 1). (E) Profil relativne ekspresije gena *GSH2* (glutation sintetaza 2). (F) Nivo karbonilovanih proteina dobijen denzitometrijskom analizom nakon oksiblot metode. (G) Determinacija karbonilovanih proteina: oksiblot analiza (gornja slika) i CBB bojenje (donja slika) totalnih proteina izolovanih iz kontrolnih (k) i UV talasima tretiranih uzorka (t) biljaka WT, *dss1(I).19* i *dss1(V).20* klijanaca. Prikazane su slike reprezentativnog eksperimenta. (H) Profil relativne ekspresije gena *UVR3* (2-3h nakon primenjenog tretmana). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD dobijena iz tri biološka ponovljena eksperimenta. Zvezdicom je prikazana statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu i tretiranu grupu ostalih genotipova (p<0,05).

4.8. Generisanje i analiza linija *A. thaliana* sa overekspimiranim homolognim genima *DSS1*

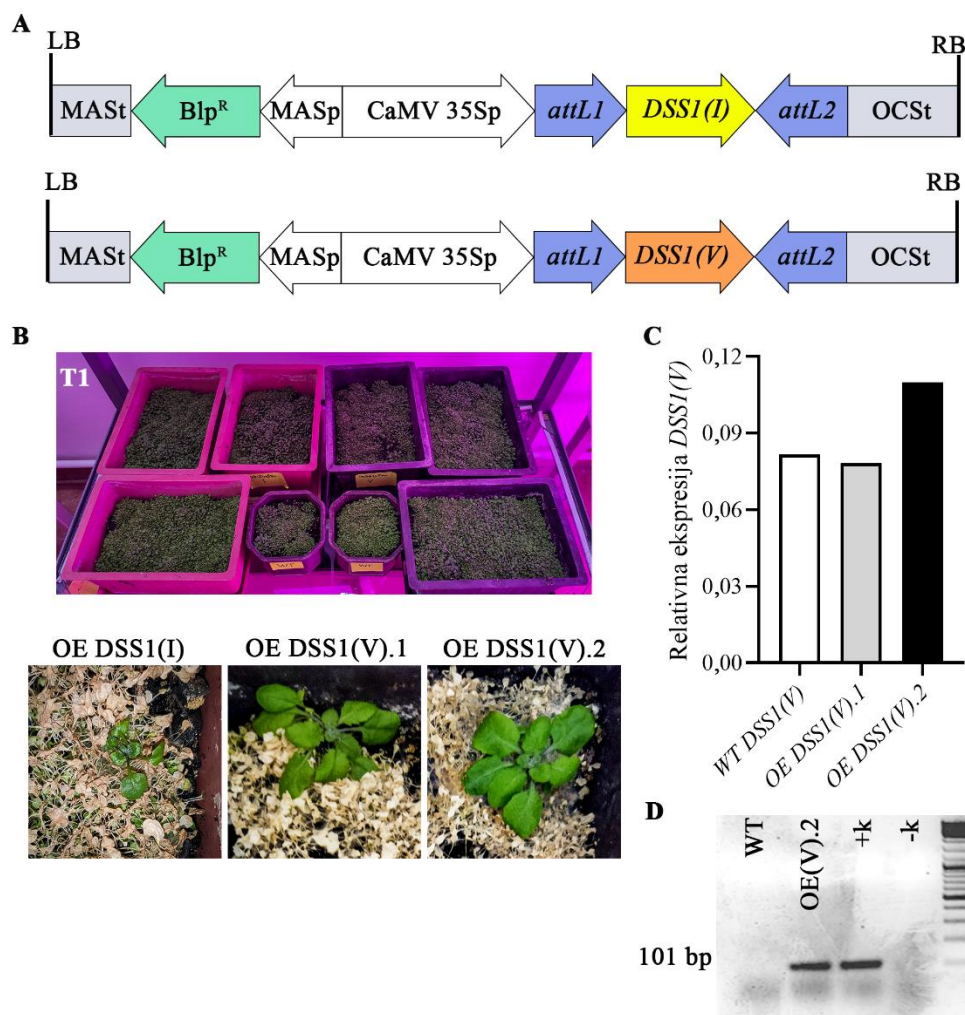
4.8.1. Konstruisanje linija *A. thaliana* sa overekspimiranim proteinima *DSS1(I)*, odnosno *DSS1(V)*

Za potrebe ispitivanja tolerancije na oksidativni stres pojedinačnih linija *A. thaliana* kod kojih su overekspimirani geni *DSS1(I)* i *DSS1(V)*, generisane su transgene biljke (Slika 51, 52). Zrele biljke T0 generacije *A. thaliana* su transformisane vektorom koji nosi T-DNK kasetu za overekspresiju proteina primenom *floral dip* metode posredovane *A. tumefaciens*. WT linije su transformisane pojedinačnim plazmidima pEarlyGate 100 koji nose jak promotor mozaičnog virusa karfiola (*CaMV*) *35S* za pojačanu ekspresiju cDNK gena *DSS1(I)*, odnosno *DSS1(V)* (Slika 52A). Takođe, kasetu sadrži i gen za fosfinotricin acetiltransferazu koja omogućava rezistenciju na herbicid Basta, čime je bilo moguće efikasno selektovanje transgenih biljaka iz stoka semena T1 generacije transformisanih biljaka. Nakon primene rastvora Basta na klijancima, preživele su tri biljke koje su izdvojene i obeležene kao: OE *DSS1(I)*, OE *DSS1(V).1* i OE *DSS1(V).2* (Slika 52B). WT kontrole i biljke koje nisu transformisane su nakon tri dana pokazale vidljive simptome hloroze i nekroze mladih listova u uslovima tretmana Basta herbicidom, a nakon sedam dana su uginule usled toksičnog dejstva ovog herbicida.

Stabilnost genetičke transformacije proverena je metodom *Real-time* PCR kao promena nivoa ekspresije obe izoforme gena *DSS1*. U biljci označenoj OE *DSS1(I)* nije detektovana pojačana ekspresija gena *DSS1(I)* (rezultat nije prikazan). U slučaju druga dva kandidata koji potencijalno overekspimiraju *DSS1(V)*, OE *DSS1(V).1* i OE *DSS1(V).2*, pokazano je da OE *DSS1(V).2* ima povećan nivo transkripata *DSS1(V)* 25% u odnosu na WT (Slika 52C). Dodatno je urađen konvencionalni PCR prajmerima koji su komplementarni promotoru *CaMV 35S* i tako potvrđeno prisustvo transgena u OE *DSS1(V).2* biljkama (Slika 52D). Dalja fenotipska karakterizacija i ispitivanje efekta oksidativnog stresa na biljkama analizirana je u narednim generacijama u potomcima nastalim samooprašivanjem biljke OE *DSS1(V).2*.



Slika 51. Šematski prikaz metodološkog pristupa kreiranja linija *A. thaliana* sa pojačanom ekspresijom *DSS1(I)* i *DSS1(V)*. Kreirano pomoću programa *BioRender* (<https://www.biorender.com/>)

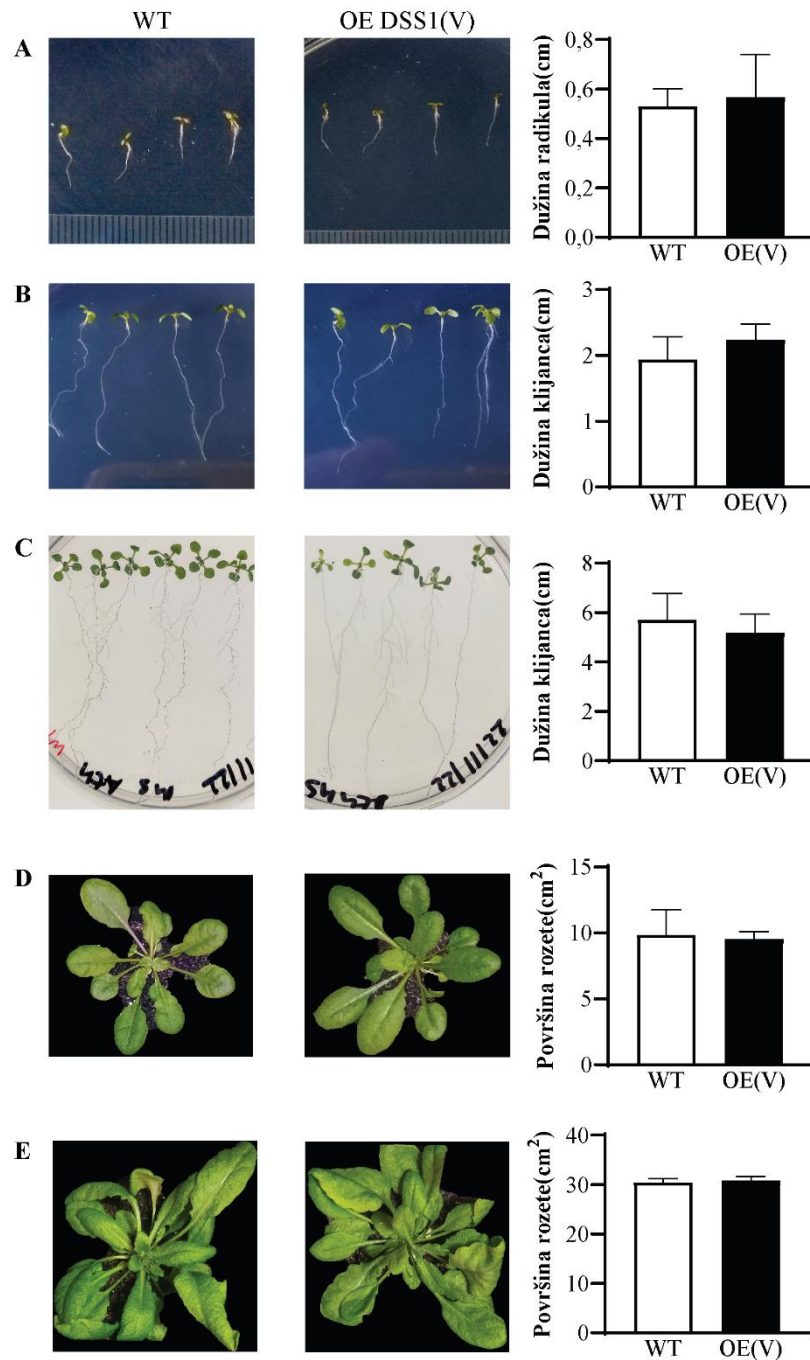


Slika 52. Strategija kreiranja pojedinačnih linija *A. thaliana* sa pojačanom ekspresijom DSS1(I) i DSS1(V). (A) Šematski prikaz T-DNK inserta binarnog vektora pEarlyGate 100-*DSS1(I)* (gornja šema) i pEarlyGate 100-*DSS1(V)* (donja šema) : RB/LB – granične sekvence T-DNK inserta; *MASt* – terminator manopin sintaze; *Blp^R* – gen za rezistenciju na Basta; *MASp* – promotor manopin sintaze; *CaMV 35Sp* – jak konsitutivni promotor mozaičnog virusa karfiola 35S; *attL1/attL2* - rekombinaciona mesta za *Gateway* BP reakciju; *DSS1(I)* – cDNK sekvenca gena od interesa; *DSS1(V)* - cDNK sekvenca gena od interesa; *OCSst* – treminator oktopin sintaze. (B) Gornja fotografija: WT klijanci - kao negativna kontrola i klijanci pojedinačnih linija T1 generacije dobijenih od T0 transformisanih biljaka plazmidom pEarlyGate 100 sa genom od interesa, pre Basta tretmana; donje fotografije: tri transgene biljke OE DSS1(I), OE DSS1(V).1 i OE DSS1(V).2, posle Basta tretmana. (C) Relativna ekspresija *DSS1(V)* analizirana u WT, OE DSS1(V).1 i OE DSS1(V).2 biljkama. (D) Detekcija prisustva promotora *CaMV 35S* PCR reakcijom primenom prajmera 35Sf/35Sr u uzorcima gDNK iz WT biljke i OE DSS1(V).2 (na slici OE(V).2); k+ - pozitivina kontrola; k- - negativna kontrola bez DNK.

4.8.2. Fenotipska karakterizacija linije sa overekspimiranim proteinom DSS1(V)

Upoređivanjem morfoloških osobina pokazalo se da ne postoje vidljive i statistički značajne razlike između potomstva selektovane biljake OE DSS1(V) i WT linije (Slika 53). U trećem danu od klijanja, dužina radikula klijanaca je kod oba genotipa prosečno iznosila 0,5 cm (Slika 53A). Zatim je izmerena je dužina svih klijanaca koja je iznosila približno 2 cm, sa malim odstupanjima nakon sedam dana od klijanja (Slika 53B). Neposredno pre prenošenja biljaka u supstrat, svi klijanci su bili dužine između 5-6 cm (Slika 53C). Površine rozeta biljaka starosti 24 dana iznosile su oko 9 cm² kod obe linije biljaka (Slika 53D). Uočeno je da se izdanci pojavljuju ranije kod OE DSS1(V) biljaka u poređenju sa WT, jer je u 30. danu od klijanja 33% WT i 50% OE DSS1(V) biljaka imalo prvi

izdanak. Merenjem površine rozete u sedmoj nedelji je pokazano da oba genotipa imaju površine 30 cm² u proseku (Slika 53E).



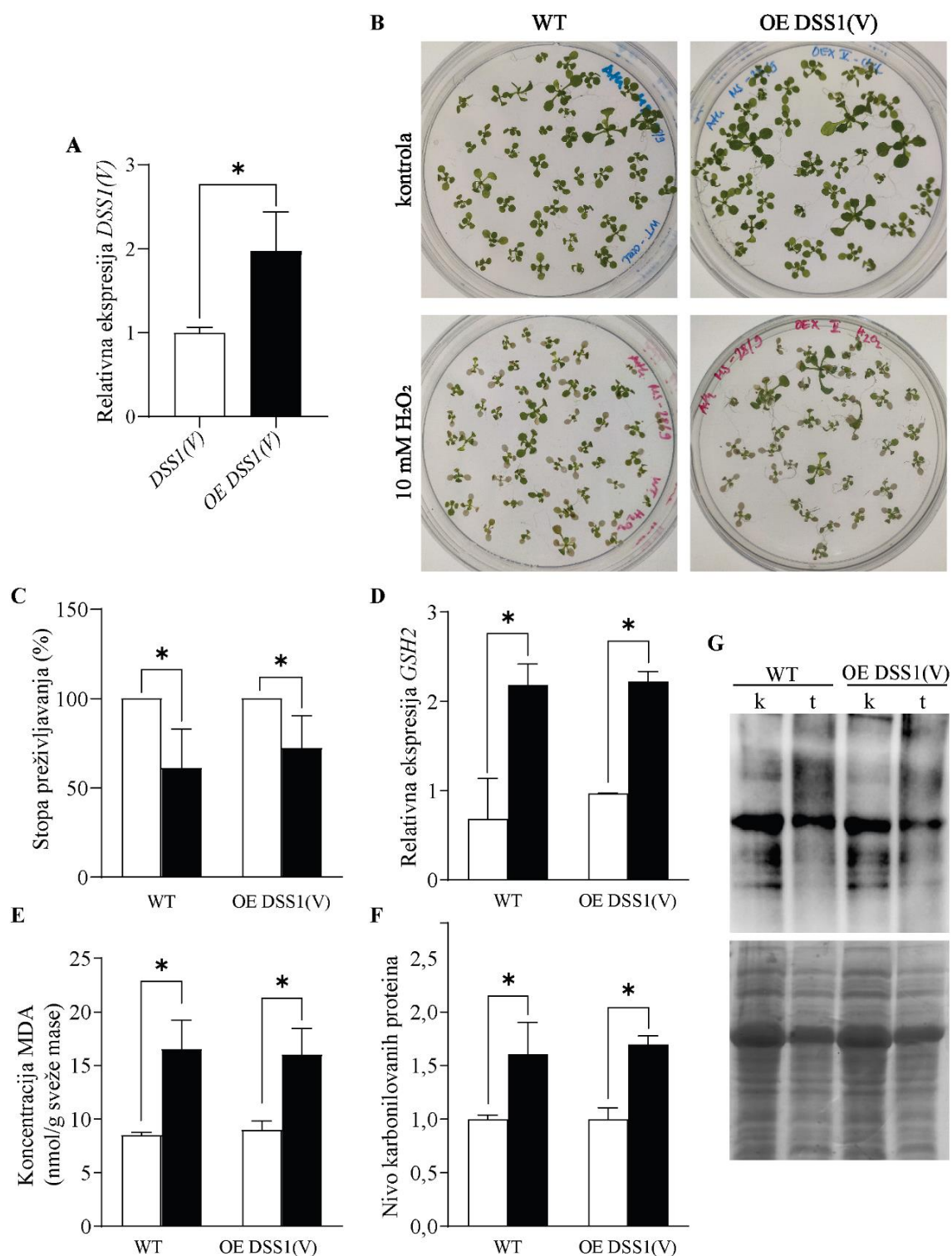
Slika 53. Uporedna analiza fenotipa divljeg tipa (WT) i OE DSS1(V) linija *A. thaliana* tokom razvika. Nakon 2 nedelje klijanja i rasta na MS medijumu u Petri šoljama, klijanci su presađeni u zemlju; oznaka OE(V) se odnosi na OE DSS1(V) biljke. **(A)** Fotografije tri dana starih klijanaca WT i OE DSS1(V) u Petri šoljama; histogram predstavlja dužinu radikula u cm. **(B)** Fotografije sedam dana starih klijanaca u Petri šoljama; histogram predstavlja dužinu klijanaca u cm. **(C)** Fotografije 14 dana starih klijanaca u Petri šoljama; histogram predstavlja dužinu klijanaca u cm. **(D)** Fotografije 24 dana starih klijanaca u zemlji; histogram predstavlja površinu rozete u cm². **(E)** Fotografije sedam nedelja starih klijanaca u zemlji; histogram predstavlja površinu rozete u cm². Beli stubići odgovaraju merenjima različitih parametara WT biljaka; crni stubići - OE DSS1(V). Prikazani su reprezentativni fenotipovi biljaka. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost ± SD dobijena iz tri biološka ponovljena eksperimenta (n = 20 po eksperimentu).

4.8.3. Analiza osetljivosti biljaka OE DSS1(V) na oksidativni stres indukovani vodonik-peroksidom

U cilju analize osetljivosti DSS1(V) overekspimirajućih biljaka na oksidativni stres, biljke stare 14 dana su bile podvrgnute tretmanu 10 mM H₂O₂. U OE DSS1(V) biljkama T2 i T3 generacije koje su korišćene za dalje ispitivanje senzitivnosti na oksidativni stres, potvrđena je značajno povećana ekspresija *DSSI(V)* transkripata u odnosu na biljke divljeg tipa (Slika 54A). Međutim, analiza različitih parametara stresa pokazala je da su detektovane promene koje se dešavaju na ćelijskom nivou u OE DSS1(V) klijancima slične promenama kod WT klijanaca u uslovima oksidativnog stresa. Analiza morfoloških simptoma oštećenja listova ispitivanih biljaka pokazala je da obe linije biljaka ispoljavaju slične hlorotične promene na tkivu mladih listova (Slika 54B). Takav efekat je nesumnjivo potvrđen i analizom stope preživljavanja koja je bila snižena za 40% kod WT biljaka, odnosno za 30% kod OE DSS1(V) biljaka koje su bile izložene stresu u poređenju sa njihovim kontrolnim grupama. Razlike u stopama preživljavanja između analiziranih genotipova nakon tretmana nisu bile statistički značajne (Slika 54C).

Praćenjem promena na nivou ekspresija gena koji kodiraju antioksidativne enzime GSH2 i CAT, značajno povećanje transkripata *GSH2* je zapaženo kod oba genotipa u tretmanu u odnosu na kontrolne grupe, ali ne i između OE DSS1(V) i WT biljaka izloženih vodonik-peroksidu (Slika 54D). Analiza nivoa ekspresije gena *CAT* pokazala je da ne postoji značajna promena u profilu ekspresije transkripata ni u jednom ispitivanom genotipu u uslovima stresa u poređenju sa kontrolnim biljkama (rezultati nisu prikazani).

Analizom koncentracije MDA i prisustva karbonilovanih proteina u tkivima tretiranih biljaka uočeno je da postoji značajan efekat oksidativnog stresa u odnosu na netretirane grupe biljaka, ali da ne postoji statistički značajna razlika između biljaka sa prekomerno ekspimiranim DSS1(V) i WT biljaka u uslovima stresa (Slika 54E, F i G). Na osnovu ovih rezultata zaključuje se da uspostavljena linija OE DSS1(V) biljka nije pokazivala očekivanu povećanu otpornost na oksidativni stres.



Slika 54. Uticaj oksidativnog stresa izazvanog peroksidom na WT i OE DSS1(V) klijance. 14 dana stari klijanci su preneti na nove MS podloge sa 10 mM H₂O₂. (A) Profil relativne ekspresije gena *DSS1(V)* u WT (beli stubić) i OE DSS1(V) klijancima (crni stubić). (B) Klijanci nakon tri dana pod uticajem dejstva H₂O₂ stresa. (C) Stopa preživljavanja WT i OE DSS1(V) klijanaca trećeg dana u uslovima oksidativnog stresa. Na histogramima beli stubići predstavljaju netretirane grupe klijanca, a crni stubići klijance tretirane 10 mM vodonik peroksidom. (C, D, F). (D) Profil relativne ekspresije gena *GSH2* (glutation sintetaza 2). (E) Nivo lipidne peroksidacije (MDA nmol/g sveže mase) u WT i OE DSS1(V) klijancima izmeren nakon trećeg dana u uslovima 10 mM H₂O₂. (F) Nivo karbonilovanih proteina dobijen denzitometrijskom analizom nakon oksiblot metode. (G) Determinacija karbonilovanih proteina: oksiblot analiza (gornja slika) i CBB bojenje (donja slika) totalnih proteina izolovanih iz kontrolnih (k) i tretiranih (t) WT i OE DSS1(V) klijanaca. Prikazane su reprezentivne slike eksperimenta. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD dobijena iz tri biološka ponovljenja eksperimenta. Zvezdicom je prikazana statistički značajna razlika kontrolne netretirane grupe u odnosu na tretiranu grupu biljaka (p<0,05).

5. DISKUSIJA

Svi oblici života na Zemlji su u manjoj ili većoj meri izloženi nepovoljnim uticajima sredine u kojoj se nalaze. Dobro je poznato da su biljke, kao sesilni organizmi, neprekidno izložene delovanju različitih faktora iz okoline. Tokom evolucije, biljke su razvile odbrambene mehanizme i adaptacije pomoću kojih uspešno prevazilaze stresne uslove. Delovanja nepovoljnih abiotičkih faktora, kao što su nagle promene temperature, nedostupnost vode, hemijska zagađenost vazduha, vode i zemljišta, teški metali ili visoki stepen radijacije, mogu u velikoj meri narušiti homeostazu i biti okidač nekontrolisane produkcije ROS formi (Hasanuzzaman et al., 2020; Zhang et al., 2022). Molekuli koji sadrže aktivnu formu kiseonika dovode do promene redoks stanja ćelije izazivajući velika oštećenja i nestabilnost svih ćelijskih kompartmana (Hasanuzzaman et al., 2020). U uslovima oksidativnog stresa, biomolekuli, kao što su: nukleinske kiseline, lipidi, proteini i ugljeni-hidrati, bivaju oksidovani i potrebno je da u što kraćem periodu budu neutralisani kako bi se sprečio njihov štetan efekat na ćeliju. Brojni ćelijski antioksidativni odbrambeni mehanizmi su uključeni u smanjivanje oksidativnih oštećenja u biljnim ćelijama (Chmielowska-Bąk et al., 2015). Jedan od najvažnijih ciljeva nauke o biljakama je identifikacija novih faktora uključenih u biljne odbrambene mehanizme i mehanizme održanja ćelijske homeostaze koji doprinose prevazilaženju negativnih uticaja spoljašnje sredine (Kmiecik et al., 2016).

Prirodno neuređeni protein DSS1 bi mogao biti jedan od faktora uključenih u ćelijske mehanizme regulacije proteostaze i odbrane od oksidativnog stresa. Podaci koji se odnose na moguće biološke funkcije biljnih proteina DSS1 su i dalje nedovoljno istražene, prevashodno su proistekli iz analize interakcije sa proteinima BRCA2 i TREX-2 kompleksom u procesima očuvanja integriteta i regulacije genoma. Imajući u vidu novootkrivenu funkciju DSS1 proteina, kao i njegovu visoku konzerviranost u eukariotskom svetu, pretpostavljamo da DSS1ilacija kao novi mehanizam uklanjanja oštećenih proteina može biti prisutan i u biljnom svetu i da se može povezati sa održavanjem ćelijske homeostaze tokom oksidativnog stresa. Osim toga, pretpostavka je da dva genska paraloga *DSS1(I)* i *DSS1(V)* u genomu *A. thaliana* mogu imati razdvojene, ali i preklapajuće funkcije.

5.1. Evoluciona očuvanost primarne strukture dva biljna proteina DSS1 i njihove protein-protein interakcije

Prisustvo genskih paraloga je rasprostranjeno u biljnom svetu, nastalo je usled evolucionih pritisaka i dovodi do povećanja raznolikosti genoma. Podaci iz literature ukazuju na to da postoji mogućnost da jedan ili oba genska paraloga evoluiraju pod smanjenim selektivnim pritiskom, što u nekim slučajevima rezultuje pojavom novih funkcija gena koje doprinose adaptaciji (Panchy et al., 2016). Genom *A. thaliana* sadrži dve kopije gena *DSS1* koje se razlikuju u dužini i sekvenci. *DSS1(I)* ima 225 bp i kodira protein dužine 74 aminokiseline, dok *DSS1(V)* ima 222 bp i proteinski produkt dužine 73 aminokiseline (Berardini et al., 2015; Dray et al., 2006; TAIR, 2023). Pretpostavlja se da između *DSS1* gena može postojati razlika u biološkim funkcijama u kojima učestvuju, kao i da mogu uspostaviti interakcije sa različitim proteinskim partnerima.

In silico analiza pokazuje da DSS1(I) i DSS1(V) imaju veliku sličnost u aminokiselinskoj sekvenci. DSS1(I) je duži za jednu aminokiselinu od DSS1(V) i razlikuje se u osam aminokiselina i to sa jednom bitnom promenom, koja bi mogla da utiče na proteinsku strukturu i funkciju. Na poziciji 44 u aminokiselinskoj sekvenci DSS1(I) proteina nalazi se polarni glutamin, dok je na istoj poziciji u DSS1(V) nepolarni leucin (Slika 17A). Razmatrajući primarnu strukturu ortologa DSS1 u *S. pombe*, *S. cerevisiae* (Funakoshi et al., 2004) i *C. elegans* (Pispa et al., 2008) koji sadrže polarne aminokiseline treonin ili aspragin na istoj poziciji kao kod DSS1(I), može se pretpostaviti da je DSS1(V) nastao kao rezultat duplikacije gena. Duplikacija gena nije neuobičajen događaj u biljnom svetu, što je

ustanovljeno i filogenetskom analizom DSS1 *A. thaliana* i biljnih ortologa kod srodnih vrsta. Pretpostavlja se da nakon nastanka novih vrsta *A. thaliana* i *A. lyrata* od zajedničkog pretka, došlo je do dupliciranja gena *DSS1* kod obe vrste (Slika 16A). Prema literaturnim podacima, oko 65% anotiranih gena u biljnom genomu je duplirano i ovi geni su uglavnom otporni na selektivni pritisak, kojem su konstantno izloženi (Bozorgmehr, 2012). Ovakav fenomen može da vodi ka akumulaciji višestrukih mutacija u sekvenci dupliranog gena, potencijalno rezultirajući novom funkcijom (Panchy et al., 2016). Na osnovu višestrukih poravnanja biljnih DSS1 sekvenci (Slika 16) je ustanovljeno da postoji visok stepen homologije u delu sekvence koja je konzervisana i kod životinjskih vrsta (Y. Zhang et al., 2014). Ovakav rezultat ukazuje da aminokiselinski ostaci u ovom delu sekvence imaju bitnu funkciju i u biljnom svetu. Jasno se uočava da su i kod biljaka hidrofobni regioni okruženi kiselim aminokiselinskim ostacima, kao i kod ostalih vrsta (Kragelund et al., 2016). Visok procenat homologije između dva DSS1 proteina *A. thaliana* može ukazivati na njihove preklapajuće funkcije, kao i na to da dele zajedničke partner proteine. Kako je DSS1 kao multifunkcionalan protein uključen u brojne važne biološke procese, biljni DSS1 proteini su verovatno funkcionalno komplementarni u većini ovih funkcija. Postojanje male, ali značajne promene na nivou primarne strukture neuređenih proteina DSS1 možda doprinosi pojavi novih funkcija.

Dodatno je sprovedena analiza interakcija izoformi proteina DSS1 sa drugim proteinima čime je omogućeno bolje razumevanje prirode interakcija i funkcionalnih razlika (Slika 17C). Prema predikciji, obe izoforme imaju potencijal za vezivanje istih partner proteina, ali su uočeni i jedinstveni partneri za pojedinačne DSS1. Tako je za DSS1(I) predložen kao partner protein sa ATP-aznom aktivnošću, koji je kodiran lokusom AT5G2000 - RPT6B. Postoji mogućnost da DSS1(I) kao „spoljašnji“ receptor za ubikvitin, specifično intereaguje sa RPT6 u okviru „kape“ proteazoma, gde predaje ubikvitinovan supstrat „unutrašnjim“ receptorima proteazoma i fizički je bliži ATP-aznom prstenu (Paraskevopoulos et al., 2014). Partner protein koji se prema predikciji isključivo vezuje za izoformu DSS1(V) je protein EER5 (THP1), koji je deo jezgra TREX-2 kompleksa i učestvuje u negativnoj regulaciji odgovora na etilen (Christians et al., 2008; Zhang et al., 2020). Iako podaci iz literature ukazuju na to da u eksperimentu na dvohibridnom kvašćevom sistemu EER5 direktno intereaguje sa oba DSS1, potrebno je dodatno potvrditi u biljnom modelu (Zhang et al., 2020).

Analize interkatoma u *A. thaliana* ukazuju da geni koji su duplirani imaju tendenciju ka različitim partner proteinima i da se biološki procesi u kojima učestvuju razlikuju između njih (Panchy et al., 2016). Prema kombinovanom evolutivnom modelu subneofunkcionalizacije, očekuje se da je ishod dupliranja gena prevashodno podela funkcija predačkog gena koja je zatim praćena sticanjem novih funkcija genskih paraloga (Panchy et al., 2016). Shodno tome, na osnovu *in silico* analize može se pretpostaviti da se partner proteini paraloga DSS1 u velikoj meri preklapaju.

5.2. Ekspresioni profil oba gena DSS1 u semenu i mladim biljkama *A. thaliana*

Dormantna semena sadrže velike količine molekula iRNK, koje nisu samo deponovani ostaci od embriogeneze i sazrevanja semena, već predstavljaju zalihe za klijanje. Prvi put je velika količina iRNK pronađena u suvom semenu pamuka, zatim je ova pojava potvrđena kao univerzalni fenomen koji postoji kod svih biljnih vrsta (Nakabayashi et al., 2005). Generalno, funkcija deponovane iRNK u semenu je u sintezi proteina prilikom pripreme semena za ranu fazu klijanja (Nakabayashi et al., 2005)

Prvi korak u ispitivanju aktivnosti gena *DSS1(I)* i *DSS1(V)* je bila analiza ekspresije oba gena u fazi dormatnog i imbibovanog semena, a zatim i u početnim fazama klijanja. U semenu *A. thaliana*, količina iRNK oba gena *DSS1* je skoro 10 puta veći u odnosu na faze nakon klijanja (Slika 19). Ova prolazna akumulacija *DSS1* transkripata u semenima se objašnjava potrebom semena da savlada promene koje slede prilikom prelaska iz faze mirovanja u fazu aktivnog metabolizma. U fazi klijanja

se dešavaju generalna remodelovanja hromatina, koja uključuju regulatornu mrežu promena na nivou transkriptoma i epigenoma (Narsai et al., 2017). Inače, pokazano je da je u semenu vrste *A. thaliana* prisutan sličan broj transkripata u suvom semenu i u semenu 24 h nakon imbibicije (Nakabayashi et al., 2005). Zanimljiv je podatak da je detektovana velika količina transkripata koja kodira peptidaze i peptide povezane sa ubikvitin-proteaznom degradacijom (Nakabayashi et al., 2005). Kako je DSS1 sastavni deo proteazoma, postoji mogućnost da ovaj protein doprinosi selektivnoj i intezivnoj degradaciji proteina tokom klijanja semena (Nakabayashi et al., 2005). Između ostalog, na primeru prirodno neuređenih proteina je poznato da se LEA proteini (od eng. *late embryogenesis abundant*) akumuliraju tokom sazrevanja semena i imaju veliki doprinos u prevazilaženju stresnih uslova koji utiču na seme (Battaglia et al., 2008). Ova analiza je izvršena u cilju određivanja nivoa ekspresije oba *DSS1* gena u ranim fazama razvića kako bi se u daljem eksperimentalnom radu fokusirali na analizu osetljivosti klijanaca na oksidativni stres. Prednosti koje leže u osnovi eksperimenata na klijancima su lako uzgajanje, jednostavna sprovođenje tretmana i efikasno ispitivanje hipoteze.

5.3. Ekspresioni profili oba gena *DSS1* u oksidativnom stresu indukovanim vodonik-peroksidom i metil-viologenom u *A. thaliana*

Kako je u različitim organizmima pokazano da DSS1 proteini ulaze u sastav 19S regulatorne subjedinice 26S proteazoma u kome se vrši degradacija oksidovanih proteina, analiziran je profil ekspresije *AtDSS1* gena pod uticajem vodonik-peroksida (Slika 22). Ekspresija *DSS1* gena je analizirana u listu i korenu zrelih biljaka arbidopsisa koje su uzgajane u hidroponičnom sistemu. Kao generator oksidativnog stresa izabran je vodonik-peroksid. Ukupna analiza transkriptoma *A. thaliana* je pokazala da se pod uticajem 1% H₂O₂ gena promenjeno eksprimira. (Desikan et al., 2001). Iz literature je poznato da biljke *A. thaliana* reaguju na 1,25 mM ili veću koncentraciju H₂O₂ povećanom ekspresijom gena koji su markeri oksidativnog stresa (Claeys et al., 2014), kao i da iste koncentracije H₂O₂ imaju značajan uticaj na razviće biljaka (Hsiao & Xu, 2000; Verslues et al., 2006). Poseban negativan efekat se uviđa na izdancima i rozetama, iz tog razloga su ova biljna tkiva čest predmet analize stresa (Hsiao & Xu, 2000; Verslues et al., 2006).

U analiziranim biljnim organima, tretiranim 5 mM ili 10 mM H₂O₂ u hidroponičnoj kulturi, uočen je povišen nivo lipidne peroksidacije (Slika 22). Finalni toksični produkt oksidacije nezasićenih masnih kiselina je malondialdehid (MDA) i njegovo prisustvo je marker oksidativnog stresa (Gaschler & Stockwell, 2017). Povišen nivo MDA u tkivima tretiranih biljaka je bio jasan pokazatelj oksidativnog stresa u eksperimentima sprovedenim u okviru ovih istraživanja. Izgleda da do najveće oksidacije dolazi u korenu, organu koji prvi ima kontakt sa stresnim agensom u hidroponici. U korenu *A. thaliana* je detektovana značajno povišena ekspresija gena *DSS1(I)* i *DSS1(V)* nakon tri dana od početka tretmana H₂O₂. *DSS1(V)* pokazuje viši nivo ekspresije u odnosu na *DSS1(I)* u odgovoru na stres izazvan H₂O₂. Ovi rezultati su dodatno potkrepljeni imunoblot analizom kojom je detektovan povećan nivo ekspresije ukupnih proteina DSS1 u tretiranim biljkama u odnosu na kontrolne biljke. S obzirom na to da antitela anti-DSS1 interaguju sa obe izoforme proteina DSS1 *A. thaliana*, imunoblot detekcija nije mogla da pruži jasniji uvid u individualno učešće proteina DSS1(I) ili DSS1(V) u oksidativnom stresu.

Dodatno je analizirana ekspresija *DSS1* gena u tretmanu herbicidom metil-viologenom koji dovodi do intenzivnog oksidativnog stresa i koji je doveo do porasta prisustva transkripata oba *DSS1* gena, ali prevashodno u listovima (Slika 23). Promena ekspresije *DSS1(I)* je izraženija pod delovanjem MV u poređenju sa *DSS1(V)* ekspresijom, i povećanje *DSS1(I)* transkripata je detektovano pri nižim koncentracijama MV. Uzrok razlike u nivoima ekspresije u odgovoru na oksidativni stres indukovan H₂O₂ i MV, mogu da budu različiti mehanizmi delovanja ova dva stresora. Dok H₂O₂ slobodno difunduje kroz fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane i izaziva direktno oštećenje ćelijskih komponenti, MV ima indirektno dejstvo (Saxena et al., 2016; Váradi et al., 2000). Zapravo, MV narušava funkciju tilakoidnih membrana i reaguje sa kiseonikom usled čega nastaje

O₂⁻, koji dovodi do narušavanja redoks potencijala ćelije. Superoksid pokreće lančanu reakciju produkujui reaktivne kiseonične forme (Váradi et al., 2000). Naši rezultati ukazuju na to da gen DSS1 može da bude bitan faktor uključen u fiziološke procese koji se odvija u biljnoj ćeliji tokom oksidativnog stresa.

5.4. Ekspresija DSS1 varijanti *A. thaliana* u $\Delta dss1$ mutantu *U. maydis*

Semikvantitativnim pristupom, kroz test funkcionalne komplementacije, je pokazano da DSS1(I) protein *A. thaliana* rekonstruiše WT fenotip $\Delta dss1$ mutantu *U. maydis* (Slika 25). Mutant $\Delta dss1$ u kojem je overekspimiran DSS1(I) *A. thaliana* je značajno rezistentniji na subletalne doze primenjenih gentoksičnih agensa u odnosu na $\Delta dss1$. Stopa preživljavanja transformanta $\Delta dss1+AtDSS1(I)$ je 1000 puta veća u odnosu na $\Delta dss1$, a niža u odnosu na stopu koju ostvaruje transformant $\Delta dss1+UmDSS1$.

DSS1 i BRCA2 su visoko konzervisani proteini koji ostvaruju vezu preko domena heliksa (HD) u okviru C-terminusa BRCA2 molekula. Literaturni podaci ukazuju na visok stepen sličnosti u HD domenu, koji između *U. maydis* (Brh2) i humanog BRCA2 iznosi 38% identičnosti, a između *A. thaliana* BRCA2 i humanog 44% (Kojic et al., 2003). Iako se UmDss1 i AtDSS1 razlikuju u proteinskoj sekvenci, regioni u okviru ovih proteina odgovorni za interakcije sa partner proteinima su takođe visoko konzervisani (Kojic et al., 2003). U skladu sa navedenim podacima, može se pretpostaviti da pored razlika koje postoje u aminokiselinskim sekvencama proteina, DSS1(I) uspešno ostvaruje inetrakciju sa Brh2 kompleksom *U. maydis* usled evolutivne očuvanosti njihovih domena koji međusobno interaguju. U prilog ide činjenica da u DSS1(I) *A. thaliana* ima sposobnost vezivanja za obe izoforme BRCA2IV i BRCA2V (Dray et al., 2006). Ovaj rezultat jasno ukazuje na to da dve varijante DSS1 proteina *A. thaliana* imaju različite uloge u rekombinacionoj popravci DNK lezija.

Međutim, odsustvo funkcionalne komplementacije DSS1(V) *A. thaliana* u $\Delta dss1$ mutantu *U. maydis* se može objasniti kroz moguću različitu strukturnu organizaciju ovih proteina. Poznato je da je genetička redudantnost rezultat poliploidije kod biljaka i da takva pojava omogućava da se mutacije akumuliraju, što dovodi do pojave novih alela i proširenja porodice gena (Roulin et al., 2013). Evolutivni model neofunkcionalizacije ukazuje na to da usled duplikacije gena, „pređački“ gen zadržava svoje funkcije, dok njegov paralog zadobija nove (Panchy et al., 2016). U kontekstu pretpostavke da je gen *DSS1(V)* rezultat duplikacije gena, kao i pokazane mutacije na poziciji Q44L u aminokiselinskoj sekvenci i iznetih literaturnih podataka, može se smatrati da je tokom evolucije došlo do promena u proteinskoj strukturi, a samim tim i do pojave razlika u funkciji ovih gena.

5.5. Uticaj tretmana vodonik-peroksidom i metil-viologenom na T-DNK insercionu mutant *t-dss1(V)*

U cilju rasvetljavanja potencijalne uloge gena DSS1 u oksidativnom stresu, okarakterisane su T-DNK insercione linije mutanata. Odabrana je T-DNK linija (SALK_069888) iz postojećih kolekcija semena ABRC koja sadrži insert u oba gena DSS1, kao i u dva dodatna gena. Čista homozigotna linija sa T-DNK insertom u intronu gena *DSS1(V)* je dobijena nakon uspešnog ukrštanja i genotipizacije (Slika 27). Pokušaj da se dobije genotip koji nosi inserciju u genu *DSS1(I)* nije bio uspešan. Podaci iz literature ukazuju da 12,6% analiziranih SALK kolekcija ne sadrži T-DNK inserciju u identifikovanom lokusu (O'Malley et al., 2015). Dodatno se može pretpostaviti da ovaj lažno pozitivan rezultat identifikacije T-DNK sekvence u lokusu *DSS1(I)*, proizilazi iz greške u obrađivanju podataka sekvenciranja usled postojanja kratkih i visoko homolognih sekvenci *DSS1* u genomu *A. thaliana*. Pored toga, kao alternativni pristup, analiziran je dodatni stok semena (WiscDsLox374E10) koji sadrži T-DNK inserciju u 5'UTR, 160 nukleotida od start kodona gena

DSS1(I) (Slika 32). Međutim, u ovom slučaju analizom ekspresije gena *DSS1(I)* nije detektovano da insercija u ovom regionu dovodi do smanjenja ili potpunog ukidanja ekspresije iRNK *DSS1(I)*. Meta-analiza objavljenih T-DNK insercionih linija je pokazala da verovatnoća izostanka efekta iznosi samo 4% u slučaju kada je insercija locirana 51-200 bp uzvodno od start kodona (Wang, 2008).

Analiza profila ekspresije *DSS1* gena pokazuje da kod linije mutanata *t-dss1(V)* nije potpuno ukinuto prisustvo iRNK *DSS1(V)* i da je moguće detektovati oko 25% transkripata (Slika 27D). Dodatno je imunoblot metodom detektovan redukovani nivo totalnih proteina DSS1 u mutiranim biljkama, što je ukazalo na to da ove biljke predstavljaju *t-dss1(V)* homozigotnu *knockdown* mutiranu liniju (Slika 27C). Detekcija smanjene količine iRNK *DSS1(V)*, nije neočekivana, znajući da postoji mogućnost da se prilikom procesa splajsovanja izvrši ekscizija T-DNK sekvence zajedno sa intronom (O'Malley et al., 2015; Rodríguez et al., 2014). Očigledno da T-DNK mutageneza ne uspeva uvek efikasno da dovede do ukidanja funkcije gena. Prema literaturnim podacima među 263 analizirana mutanta *A. thaliana* sa T-DNK insercijom u okviru intorna, samo 0,7% nema efekat na transkripcionom nivou (Wang, 2008).

Iako efekat razaranja introna, integracijom T-DNK sekvence, nije uvek dovoljan za kompletno ukidanje prisustva transkripata gena *DSS1(V)*, *t-dss1(V)* biljke pokazuju plejotropni defekt u rastu tokom različitih faza razvića (Slika 29). Uočeno je da kod semena mutanata dolazi do ranijeg pucanja semenjače i izduživanja radikula u poređenju sa biljkama divljeg tipa. Međutim, otkriveno je da i ROS molekuli imaju značajnu ulogu u regulaciji klijanja semena i dormanciji (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008). Kratkoživeći ROS molekuli ostvaruju svoju signalnu aktivnost specifičnim oksidativnim modifikacijama proteina koje dalje mogu imati ulogu signala za pokretanje procesa klijanja (El-Maarouf-Bouteau et al., 2013). Može se pretpostaviti da *t-dss1(V)* biljke nemaju sposobnost da adekvatno uklanjaju oksidovane proteine, i da tako akumulirani oštećeni proteini mogu biti signal za raniju indukciju klijanja semena. Naime, ubrzo nakon pucanja semenjače i početnog ubrzanog rasta radikula, mutanti ispoljavaju usporeniji rast u poređenju sa WT klijancima. Pretpostavlja se da poremećaj u skladištenju oštećenih proteina dovodi do nedovoljnog snabdevanja ćelije esencijalnim aminokiselinama što ometa dalji rast klijanaca.

Takođe je uočeno da klijanci mutanata imaju povećanu senzitivnost na oksidativni stres indukvan H₂O₂ ili MV (Slika 30 i 31). Niža stopa preživljavanja kod klijanca *t-dss1(V)* je u skladu sa povišenim nivoom lipidne peroksidacije u poređenju sa WT biljkama. Takođe, značajno povišen nivo oksidovanih proteina u tretiranim mutantima H₂O₂ ili MV u odnosu na WT klijance, ukazuje na to da DSS1(V) može imati potencijalnu ulogu u odgovoru na oksidativni stres kod *A. thaliana*. Ovakvi rezultati mogu biti dodatni pokazatelj da je DSS1(V) jedan od značajnih učesnika u ćelijskoj detoksifikaciji od oksidativno-oštećenih proteina i samim tim u održavanju proteostaze.

5.6. Fenotipska karakterizacija CRISPR/Cas9 generisanih mutanata oba gena *DSS1* i njihova osetljivost na oksidativni stres

Za ispitivanje funkcionalne povezanosti između gena *DSS1* u ćelijskoj homeostazi proteina tokom oksidativnog stresa, korišćena je CRISPR/Cas9 tehnologija u cilju precizne manipulacije *DSS1* genima. Prednost CRISPR/Cas9 sistema je u istovremenom editovanju većeg broja lokusa u istoj biljci, omogućavajući sinhronizovanu mutagenezu više funkcionalno povezanih gena koji pripadaju istoj familiji (Yang et al., 2022). Za pojedinačno editovanje dva visoko homologna gena *DSS1* je upotrebljena CRISPR/Cas9 ciljana mutageneza. Iako je multipleks CRISPR/Cas9 sistem za editovanje gena strategija od izbora za simultanu i brzu mutagenezu, u ovom radu je ipak primenjen metod tradicionalnog ukrštanja za generisanje duplih mutanata. Metoda tradicionalnog ukrštanja je bila u ovom slučaju metoda od izbora zbog prednosti u izvođenju povratnog ukrštanja sa divljim sojem *A. thaliana* i uklanjanju potencijalnih *off-target* mesta. Nakon ove manipulacije željene mutacije su bile vraćene u homozigotno stanje putem kontrolisanog samooprašivanja. Ovakav

efikasan i jednostavan način „razblaživanja“ potencijalnih neželjenih mutacija ima veliku prednost u biljnim naukama u odnosu na animalne sisteme ili kulture humanih ćelija (Hahn & Nekrasov, 2019).

Pored nekoliko dobijenih mutanata sa malim indelima u pojedinačnim genima za *DSS1*, odabrane su dve linije biljke sa velikim promenama u genima koje se jednostavno detektuju genotipizacijom. Generisana su dva CRISPR/Cas9 konstrukta za ciljano editovanje pojedinačnih kopija gena *DSS1* i selektovane su dve homozigotne linije mutanata za dalju karakterizaciju – linija koja sadrži deleciju dužine 25 nt u genu *DSS1(I)* i druga linija sa insercijom od 18 nt u genu *DSS1(V)*. Analizom izvedene aminokiselinske sekvence je pokazano da CRISPR/Cas9-indukovane mutacije koje su se dogodile u odabranim linijama rezultuju formiranjem preuranjenog stop kodona, tj. okrnjenim proteinskim produktom (Slika 36).

Pomoću nekoliko web alata za predikciju *off-target* mesta pronađene su pozicije mutacija van ciljanih lokusa u genomu *A. thaliana*. Neophodno je napomenuti da je nepreciznost CRISPR/Cas9 sistema i pojava *off-targeta* u manjoj meri prisutna kod biljnih vrsta, nego što je kod životinjskih. Preciznost CRISPR/Cas9 sistema zavisi od dizajnirane sgRNK, izbora nukleaze i strategije isporuke samog sistema (Bortesi et al., 2016). Osim toga, pokazano je da efikasnost može da varira među organizmima, pa je tako visoko prisustvo *off-targeta* detektovano na humanim ćelijama, a nešto niže kod miševa i zebrica (Pan et al., 2016). Podaci iz literature ukazuju na to da je specifičnost CRISPR/Cas9 sistema visoka kod biljaka, što je potvrđeno u istraživanjima na vrsti *A. thaliana*, pirinču, paradajzu i pamuku (Feng et al., 2014; Li et al., 2019; Nekrasov et al., 2017; H. Zhang et al., 2014). Dodatno, smanjena verovatnoća pojave *off-targeta* u ovom radu je obezbeđena upotrebom promotora/pojačivača *EC1.2en/EC1.1p* za specifičnu ekspresiju Cas9 enzima. Razlog visoke specifičnosti delovanja enzima Cas9 je usled vremenske i tkivno-specifične regulacije ekspresije u semenim zamecima (Wang et al., 2015).

S obzirom na skoro identične i izuzetno kratke sekvence dupliciranih *DSS1* gena, mutageneza izoformi *DSS1* je predstavljala tehnički prilikom primene CRISPR/Cas9 tehnologije. U cilju generisanja *knockout* mutanata *A. thaliana*, dizajn sgRNK je zavisio od izbora osobina ciljne sekvence. Za najefikasnije editovanje pojedinačnih gena *DSS1* su odabrane dve sekvence koje su locirane u okviru 5'-kraja kodirajućeg regiona gena i visoko su specifične, kako bi se izbeglo stvaranje mutacija van željenog lokusa. Kako nije uspešno pronađeno adekvatno restrikciono mesto koje bi imalo preklapajuću poziciju sa mogućim indelom u cilju brzog skrininga, pretraga potencijalnih biljnih mutanata je bila složena i zahtevala je analizu većeg broja biljaka, posredstvom nekoliko pristupa za skrining (Slika 34 i 35).

Dalja karakterizacija linija mutanata *A. thaliana* sa disrupcijom u pojedinačnim genima *DSS1* (*dss1(I).19* i *dss1(V).20*) je pokazala uočljive fenotipske razlike u odnosu na WT biljke (Slika 40). Razlike koje se detektuju između samih CRISPR/Cas9 mutanata ukazuju na to da *DSS1* izoforme imaju i različite uloge pored svojih preklapajućih funkcija, kao što je ranije pretpostavljeno. Primećeno je da su odrasle *dss1(I).19* biljke sitnijeg rasta, manjih rozeta, sa manjim brojem grana i da produkuju silike sa samo par razvijenih semena za razliku od WT biljaka. Može se smatrati da je pojava abortivnih semena povezana sa narušenom funkcijom BRCA2 kompleksa usled izostanka interakcije *DSS1(I)* i proteina AtBRCA2, što rezultuje u narušavanju procesa homologne rekombinacije u mejozi tokom reproduktivne faze *A. thaliana*. Za sada je poznato da, odustvo oba AtBRCA2 dovodi do fenotipa koga karakteriše izmenjeno razviće ženskog, a sterilitet muških gametofita (Seeliger et al., 2012). Takođe, u slučaju *C. elegans* mutanta *dss-1* je zapažena smanjena produkcija oocita i da je razviće larvi inhibirano, što dovodi do smrti (Pispa et al., 2008). Imajući u vidu navedene činjenice i multifunkcionalnost *DSS1*, pretpostavlja se da u slučaju disrupcije gena *DSS1* sem izostanka pravilne regulacije mejoze, postoji poremećaj i u drugim mehanizmima zavisnim od *DSS1(I)* koji se odigravaju u oogenezi. Verovatno da nedostatak *DSS1(I)*, kao komponente proteazoma utiče i na njegovu nepravilno funkcionisanje tokom oogeneze. Postoje literaturni podaci

koji ukazuju da je funkcija proteazoma neophodna za normalno odvijanje oogeneze i embriona u *Drosophila melanogaster*, i da u suprotnom dolazi do indukcije programirane ćelijske smrti i autofagije (Velentzas et al., 2011). Imajući u vidu navedenu činjenicu, može se pretpostaviti da za funkcionisanje proteazoma u oogenezi zahteva prisustvo obe varijante DSS1 proteina. Dodatno, možda je ovo jedan od razloga neuspešnog generisanja duplih *dss1* mutanata. Međutim, otvara se pitanje da li je fenomen nastanka abortivnih semena u mutantu *dss1(I).19 A. thaliana* rezultat steriliteta oba ili samo jednog gametofita.

Tokom fenotipske analize mladih biljaka *dss1(V).20*, u početnim fazama razvića se uočavaju zatvoreni kotiledoni sa izraženom apikalnom kukom u poređanju sa otvorenim kotiledonima WT biljaka. Formiranje apikalne kuke, kao i inhibicija rasta primarnog korena je pod regulacijom etilena. Kod biljaka uloga aplikalne kuke je u zaštiti kotiledona i vrha meristema pri klijanju, tokom probijanja kroz tlo ka izvoru svetlosti (Ahmed et al., 2020). Zanimljiv je podatak da klijanci mutanata *eer5* ispoljavaju hipersenzitivnost na etilen u prisustvu ekstremno niskih koncentracija ovog hormona, rezultujući u razvoju kratkog hipokotila i izraženu apikalnu kuku (Christians et al., 2008). EER5 učestvuje u inhibiciji ekspresije gena koji su odgovorni za promovisanje odgovora na etilen. Kako su *in silico* rezultati ove teze pokazali vezu između proteina EER5 i DSS1(V), a takođe se smatra da ova veza predstavlja sponu između TREX-2 kompleksa i proteazoma (Lu et al., 2010), može se pretpostaviti da je u DSS1 mutiranim biljkama, generalno narušena regulacija ekspresije što je dovelo do nepravilnog funkcionisanja vitalnih procesa. Sa aspekta funkcionisanja TREX-kompleksa, izostanak komponente EER5 dovodi do defekta u biogenezi i eksportu miRNK (Zhang et al., 2020). Imajući u vidu da etilen takođe reguliše sazrevanje ploda i starenje, može se objasniti da su preurenjeno pucanje silika, oslabljavanje semena, kao i starenje koji su detektovani kod mutanata *dss1(V).20* rezultat nepravilnog odgovora na ovaj fitohormon usled nedostatka interakcije između proteina EER5 i DSS1(V).

Zanimljivo je da *knockout* mutanti *dss1(V).20* generisani CRISPR/Cas9 tehnologijom pokazuju značajne fenotipske razlike u poređenju sa *knockdown* T-DNK insercionim mutantima *t-dss1(V)*. Ipak sličan nivo osetljivosti na oksidativni stres karakteriše oba tipa mutanata. Na primer, odrasle biljke sa T-DNK insercijom u DSS1(V) pokazale su zakržljali rast, dok se suprotni morfološki fenomen zapaža kod CRISPR/Cas9 *dss1(V).20* čija rozeta je žbunasta i sa brojnim izdancima. Razgranati fenotip se podudara sa *brca2* mutantom *A. thaliana* (Seeliger et al., 2012) što nije iznenađujuće s obzirom na već pomenuto učešće homologoj rekombinaciji za koju je neophodno formiranje kompleksa DSS1 sa proteinom BRCA2 (Dray et al., 2006; Kojic et al., 2005; Seeliger et al., 2012). Sa druge strane, postojanje fenotipskih razlika između mutanata generisanih T-DNK integracijom u intron gena DSS1(V) i CRISPR/Cas9 mutanata može se objasniti iskrajanjem T-DNK i introna tokom procesa splajsovanja, tako da izostaje efekat insercije. Ranija istraživanja su pokazala da određeni regulatori ekspresije mogu biti locirani u okviru introna, ili da neki introni mogu sadržati promotorske sekvence za alternativno procesovanje transkriptata (Furger et al., 2002; Gallegos & Rose, 2017; Heyn et al., 2015). Neke studije ukazuju da se mnoge sekvence koje kodiraju mikroRNK nalaze u intronima gena (Ambros et al., 2003; Lin et al., 2003; Meng & Shao, 2012; Rodriguez et al., 2004). Mirtroni, molekuli mikroRNK kodirani sekvencom introna su alternativni prekursori za biogenezu mikroRNK i nastaju obradom introna gena (Lin et al., 2003). Stoga, izmenjeni fenotip *t-dss1(V)* može biti povezan sa potencijalnim regulatornim DNK elementima u okviru introna. Imajući u vidu navedene literaturne podatke jasan je nemerljiv značaj predvidljivog i preciznog editovanja gena upotrebom CRISPR/Cas9 tehnologije.

Pored toga što su obe pojedinačne linije *dss1(I).19* i *dss1(V).20* vijabilne, uočeno je da *dss1(I).19* mutanati imaju smanjen fertilitet. U pokušaju da se dobiju dupli mutanti *dss1(I).19 dss1(V).20 A. thaliana*, pokazano je da mutacije u oba genska paraloga DSS1 verovatno dovode do letalnog ishoda. Zabeleženo je da ukrštanje muškog gametofita *dss1(I).19* i ženskog gametofita *dss1(V).20*, kao i u obrnutom slučaju, ne dovodi do formiranja genotipa duplog mutanta za gene DSS1

A. thaliana, što je analizirano na stotinak biljka narednih generacija. Ovo otkriće ukazuje na značaj gena *DSS1* s obzirom na to da istovremeni izostanak obe kopije utiče na vijabilnost biljke. Takođe, rezultati ove teze na CRISPR/Cas9 mutantima nedvosmisleno ukazuju da geni *DSS1(I)* i *DSS1(V)* komplementiraju jedan drugog u fundamentalnim biološkim funkcijama.

Ispitivanje oksidativnog stresa u klijancima CRISPR/Cas9 mutanata ukazuje na to da su *dss1(V).20* klijanci senzitivniji na stres izazvan H_2O_2 u poređenju sa *dss1(I).19* klijancima (Slika 41). Smanjen nivo preživljavanja mutanata je u saglasnosti sa povišenim nivoom lipidne peroksidacije koji je detektovan u mutiranim biljkama u odnosu na WT biljke u tretmanu. Pored toga, najniži stepen preživljavanja imaju *dss1(V).20* biljake. Značajni porast prisustva transkripata *GSH2* je izmeren kod oba tipa *dss1* mutanata u odnosu na WT biljke. Poznato je da glutation-sintetaza 2 reguliše početne faze u biosintezi glutationa (GSH), pogotovo u kataboličkim putevima izazvanim stresom u endoplazminom retikulumu, a koji je posledica nepravilnog savijanja proteina i njihove akumulacije (Uzilday et al., 2017), te se enzim može smatrati dobrim pokazateljem oksidativnog stresa.

Može se pretpostaviti da bi protein DSS1 mogao biti uključen u organizaciju regulatorne mašinerije ekspresije gena, samim tim u regulaciji ekspresije gena *GSH2*. Ovakva pretpostavka se može povezati sa činjenicom da BRCA2-RAD51 kompleks, koji učestvuju u homolognoj rekombinaciji, ima takođe ulogu transkripciji gena koji učestvuju u odbrani tokom biljnog imunskog odgovora (Wang et al., 2010). Sa druge strane, DSS1-BRCA2 promoviše interakciju RAD51 sa jednolančanom DNK, samim tim inicira DNK popravku posredovanu homolognom rekombinacijom (Marston et al., 1999). Stoga, pretpostavljamo da bi DSS1 bi mogao da bude molekularna spona koja doprinosi funkcionalnom integritetu višekomponentnih proteinskih kompleksa uključenih u transkripciju gena.

Uočeno je, na nivou ekspresije gena da približno 10% dupliciranih gena *A. thaliana* ima novu ulogu u odgovoru na stresne uslove sredine (Panchy et al., 2016). Postoji mogućnost da ova dva proteina različito doprinose konstituciji 26S proteazoma, i tako posledično eliminaciji oštećenih proteina. Stoga, verovatno je da proteini DSS1 potencijalno imaju različit afinitet za vezivanje proteina oštećenih oksidacijom u procesu DSSilacije, što se objašnjava kroz evolutivni model neofunkcionalizacije kada samo jedna kopija gena stiče nove funkcije. Za potvrdu procesa DSSilacije potrebni su dodatni *in vivo* eksperimenti i proteomske analize. Rezultati ove teze podržavaju ovakve pretpostavke, s obzirom na to da ukidanje funkcije gena *DSS1(V)* dovodi do neefikasnog uklanjanja oksidovanih proteina za razliku od disrupcije gena *DSS1(I)*, čime je samo delimično ograničen efekat detoksifikacije.

Upoređivanjem ukupnog transkriptoma mladih biljaka CRISPR/Cas9 mutanata sa WT biljkama koje su bile izložene oksidativnom stresu izazvanim H_2O_2 su pokazani diferencijalni profili ekspresije (Slika 43-49). Dobijeni podaci o genima sa većim promenama u nivou ekspresije u mutiranim linijama u odnosu na WT biljke su kroz KEGG bioinformatičku analizu dalje klasifikovani u metaboličke puteve. U odnosu na WT klijance, kod *dss1(I).19* i *dss1(V).20* mutanata je zabeleženo da dolazi do redukovane ekspresije gena uključenih u MAPK signalni put, koji imaju različitu ulogu u prenosu ćelijskog signala van i unutar ćelije. Ovaj signalni put čini klasa protein kinaza koje su odgovorne za promene na nivou ćelijske reorganizacije i ekspresije gena (Taj et al., 2010). MAPK kinaze imaju funkciju u transdukciji ekstracelularnih stimulusa kao što su biotički i abiotički stres, kao i u nizu procesa tokom razvića, uključujući diferencijaciju, proliferaciju i ćelijsku smrt (Taj et al., 2010). Kako je pokazano da detektovani učesnici MAPK signalnog puta imaju značajnu ulogu u odbrani od patogena i ROS molekula, nije neobično što *dss1(I).19* i *dss1(V).20* mutanati imaju povećanu osetljivost na oksidativni stres usled njihove redukovane ekspresije (Birkenbihl et al., 2012; Rentel et al., 2004). Očigledno da izostanak oba DSS1, kao mogućih regulatora ekspresije nekog od detektovanih gena za MAPK kinaze, dovodi do narušavanja celokupnog MAPK signalnog puta.

Što se tiče smanjene ekspresije pojedinih učesnika metabolizma glutaciona kod obe linije *dssI* mutanata, pretpostavlja se da ovo takođe doprinosi nemogućnosti prevazilaženja oksidativnog disbalansa u ćelijama mutiranih *dssI* linija. Poznato je da kod biljaka metabolizam GSH uključuje enzime za biosintezu i degradaciju GSH, kao i enzime koji GSH koriste kao supstrat (Uzilday et al., 2017). Postoji ograničen broj podataka o proteinima superfamilije biljnih enzima glutation S-transferaza detektovanih u transkriptomu mutanata, a za pojedine članove ovih superfamilija se samo zna da učestuju u detoksifikaciji ćelije (Fu et al., 2020; Pérez-Martín et al., 2021). Prema tome, možemo pretpostaviti da nedostatak proteina DSS1 ima inhibitorni uticaj na njihovu ekspresiju. Ipak, povišena ekspresija gena *GSH2*, kao učesnika biosinteze GSH, koja je eksperimentalno potvrđena u ovom radu, može se objasniti kroz uzvodnu regulaciju signalima oksidativnog stresa koji promovišu ekspresiju *GSH2* u cilju dodatne sinteze glutaciona (Uzilday et al., 2017).

Redukovana ekspresija gena uključenih u biosintezu sekundarnih metabolita kao što su flavonoidi (polifenolna jedinjenja) i fenilpropanoidi, ukazuje da bi DSS1 proteini potencijalno mogli imati važnu ulogu u regulaciji ekspresije nekih od identifikovanih gena. Generalno, ovi sekundarni metaboliti pomažu biljkama u uklanjanju citoskičnih produkata i ROS molekula (Falcone Ferreyra et al., 2012). Iako su identifikovani i okarakterisani brojni regulatori transkripcije biosinteze flavonoida, još uvek nedostaju informacije koje bi upotpunile razumevanje regulacije ovog metaboličkog puta u odgovoru na signale iz životne sredine (Liu et al., 2021). Moguća uloga DSS1 u procesu sinteze sekundarnih metabolita bi bila ostvarena kroz regulaciju transkripcije, uz pretpostavku da DSS1 proteini predstavljaju deo transkripcionih kompleksa (Kragelund et al., 2016; Schenstrøm et al., 2018). Međutim, tokom analize transkriptoma mutanata utvrđeno je da pojedini proteini koji su uključeni u sintezu fenilpropanoida imaju povišenu ekspresiju u mutantima *dss(I).19* u odnosu na *dssI(V).20*, ali ne i kod WT biljaka. Ovo ukazuje na moguću specifičnu funkciju DSS1(V) proteina u odgovoru na oksidativni stres, kao modulatora proteinske mreže u iniciranju ekspresije enzima uključenih u biosintezu fenilpropanoida.

Usled disrupcije proteina DSS1(V) u mutantima *dssI(V).20*, analizom transkriptoma utvrđena je smanjena ekspresija gena uključenih u biosintezu biljnih hormona u odnosu na WT biljke. Zapravo, ovaj podatak je u skladu sa *in silico* analizom promotorskog regiona gena *DSSI(V)* kojom je pokazano prisustvo *cis*-aktivirajućih regulatornih elemenata uključenih u odgovor na fitohormone, kao što su jasmonati i salicilna kiselina (Nikolić, 2016).

Nije iznenađujuće da kod obe linije *dssI* mutanata dolazi do povišene ekspresije gena uključenih u homolognu rekombinaciju i transport RNK, s obzirom na već spomenute interakcije proteina DSS1 sa ključnim kompleksima u procesu HR (Dray et al., 2006; Faza et al., 2009; Tian et al., 2012). Pretpostavlja se da u cilju očuvanja stabilnosti genoma, ćelija ima strategiju da moduliše ekspresiju alternativnih gena u zamenu za nedostajuće funkcije jednog od proteina DSS1. Ovakvi rezultati ukazuju na to da je za očuvanje integriteta genoma neophodno prisustvo oba funkcionalna *DSSI* gena.

U odnosu na WT biljke, u *dssI(I).19* je dodatno uočena značajno povišena ekspresija gena koji kodiraju ABC transportere (transporter ATP-vezujuća kasete). ABC transporteri predstavljaju najveću familiju proteina u svim živim organizmima (Lane et al., 2016). U poređenju sa životinjskim, genom biljke sadrži dva puta veći broj ABC proteina. Ovi proteini imaju ulogu u popravci DNK, translokaciji RNK, a najviše izučavana je njihova uloga u aktivnom transportu brojnih jedinjenja kroz različiti tip membrana (Lane et al., 2016). S obzirom na širok spektar njihovih uloga i nepovoljne uslove delovanja H₂O₂ na ćelije mutata *dssI(I).19*, kao i izostanak DSS1(I) u potencijalnoj regulaciji proteazoma i eksporta RNK, postoji mogućnost da se inicira ekspresija većeg broja ABC transportera kako bi se ubrzao transport RNK intracelularno, a toksični molekuli eliminisali ekstracelularno (Lane et al., 2016).

Na linijama CRISPR/Cas9 mutanata je praćen efekat oksidativnog stresa u trećem danu od primenjenog UV-C zračenja (Slika 50). Iako UV-C nije fiziološki relevantan za biljke, jer je blokiran slojem stratosfere, pokazano je da izaziva lezije u molekulu DNK i oksidaciju ćelijskih komponenti (Danon & Gallois, 1998; Mintoff et al., 2015). Nakon tri dana rasta u normalnim fiziološkim uslovima uočeni su vidljivi simptomi toksičnosti tretmana na mladim listovima WT, *dss1(I).19* i *dss1(V).20* biljaka. Oštećenja tkiva lista izazvana UV-C zračenjem se mogu objasniti iniciranjem ćelijskih promena sličnih apoptozi (Danon & Gallois, 1998). Podaci iz literature ukazuju na to da se ćelijska smrt povećava u listovima izloženim UV-C zračenju na dozno zavisani način u tretmanima 250 -1000 J/m², pri čemu se ćelijska smrt detektuje već nakon 48 h pri dozi od 500 J/m² (Mintoff et al., 2015). U ovoj studiji zapažene promene na listovima su u skladu sa izmerenim visokim sadržajem MDA i intenzivnijim DAB bojenjem produkata oksidativnog stresa u tretiranim klijancima u odnosu kontrolne biljke. Intenzivna braon boja tretiranih klijanaca predstavlja precipitat koji je poreklom od oksidacije DAB vodonik-peroksidom u prisustvu proteina koji sadrže hem grupu, kao što je peroksidaza. Bojenjem se otkriva prisustvo i distribucija peroksida u biljnim ćelijama (Daudi & O'Brien, 2012). Takođe je ustanovljen porast ekspresije *GSH2* - markera oksidativnog stresa, u svim tretiranim grupama biljaka, kao što je uočeno u tretmanu vodonik-peroksidom na istom tipu mutanata. Analizom gena koji kodira fotoliazu UVR3 je pokazano da nakon nekoliko sati od radijacije dolazi do značajnog porasta ekspresije u WT tretiranim biljkama u odnosu na njihovu kontrolu i ozračene mutante. Fotoliazе učestvuju u popravkama DNK lezija tokom fotoreaktivacije, od kojih je poznato da UVR3 popravlja pirimidin (6-4) pirimidon fotoprodukt (6-4 PP) (Castells et al., 2010). Fotolezije su izuzetno toksične, blokiraju transkripciju i inhibiraju replikaciju (Britt, 1995). Literaturni podaci ukazuju na to da u normalnim fiziološkim uslovima nakon tri sata od radijacije UV-C, dozom od 1000 J/m², dolazi do reparacije 30% nastalih fotolezija u genomu WT soja *A. thaliana* (Castells et al., 2010). Prema tome, možemo pretpostaviti da je u mutantima usled nedostatka pojedinačnih proteina DSS1, kao bitnih učesnika u reparaciju homolognom rekombinacijom i regulaciji ekspresije na nivou transkripcije, ekspresija gena *UVR3* inhibirana. Međutim, zanimljivo je da delovanje UV ima upadljiv efekat na povećanje ekspresije gena *CAT1* u *dss1(V).20* mutantima u odnosu na WT i *dss1(I).19* tretirane biljke. U prethodnim naučnim studijama analiza nivoa transkripata antioksidativnih enzima u vrsti *A. thaliana* kroz vremenske tačke u toku tri dana pokazuje da njihova ekspresija postepeno raste u odgovoru ćelije na povećano generisanje ROS formi tokom „opravka“ od UV-C, uključujući i *CAT1* (Xie et al., 2012). Pored toga, samo u tretiranim *dss1(V).20* mutantima je detektovana značajno veća zastupljenost oksidovanih proteina. Stoga su ovakvi rezultati dodatni pokazatelj veze oksidovanih proteina sa proteinom DSS1(V) i u tretmanu UV zračenjem.

Značajno povećanje oksidovanih proteina u mutantima *dss1(V).20* tretiranih-peroksidom i UV zračenjem u poređenju sa WT biljkama, kao i sa *dss1(I).19* mutantima, potvrđuje prethodnu tvrdnju da DSS1(V), za razliku od DSS1(I), ima ulogu u odgovoru na oksidativni stres kod *A. thaliana*. Prekomerna akumulacija oksidovanih proteina u biljkama *dss1(V).20* izloženim H₂O₂ stresu ukazuje na to da je gen DSS1(V) jedan od ključnih učesnika u ćelijskoj detoksifikaciji od proteina oštećenih oksidacijom i održavanju proteinske homeostaze. Rezultati ovog rada su u skladu sa novom DSS1-zavisnom post-translacionom modifikacijom proteina koja je pokazana u humanim ćelijama, tj. DSSilacijom (Y. Zhang et al., 2014).

5.7. Fenotipska karakterizacija linije *A. thaliana* sa overekspimiranim DSS1(V) i analiza njene osetljivosti na oksidativni stres

U cilju dodatnog rasvetljavanja bioloških funkcija *DSS1* gena pristupilo se generisanju linija *A. thaliana* koje prekomerno proizvode DSS1 proteine. Polazna pretpostavka je bila da prekomerno ekspimirani proteini DSS1 mogu doprineti povećanju otpornosti biljaka prema oksidativnom stresu putem različitih mehanizama, kao što su učesće u regulaciji transkripcije odbrambenih gena,

intezivnijoj i efikasnijoj eliminaciji oštećenih proteina, ili u izgradnji odbrambenog „molekularnog štita“.

Kao što je pomenuto BRCA2-RAD51 kompleks, poznat po svojoj funkciji u HR, takođe je direktno uključen i u regulaciju transkripcije odbrambenih gena čija aktivacija predstavlja značajan deo biljnog imunskog odgovora (Wang, et al., 2010), dok DSS1-BRCA2 kompleks promovira interakciju RAD51 sa jednolančanom DNK, (Marston, et al., 1999). Stoga pretpostavljamo da bi DSS1 mogao biti vrsta „molekularnog lepka“ koja doprinosi stabilnosti kompleksa koji su uključeni u transkripciju gena.

Takođe je poznato da LEA proteini kao multifunkcionalni i prirodno neuređeni, imaju značajnu ulogu u ostvarivanju tolerencije na abiotički stres kod biljaka. LEA proteini zbog svoje strukturne plastičnosti imaju sposobnost da formiraju „molekularni štiti“ tokom desikacije. U nastalim uslovima suše usled dehidrirane citoplazme, LEA proteini smanjuju interakcije između delimično denaturisanih proteina i tako sprečavaju formiranje toksičnih agregata (Tunnacliffe & Wise, 2007). Slično tome, pretpostavljeno je da bi protein DSS1 mogao učestvovati u formiranju „molekularnog štita“ u uslovima oksidativnog stresa.

Stabilno generisana transgena linija OE DSS1(V) sadrži inkorporiranu kasetu u okviru koje je gen *DSS1(V)* pod kontrolom jakog konstitutivnog promotora *CaMV35S*. U ovim biljkama je izmeren značajan porast transkripata *DSS1(V)* kako u T2 generaciji, tako i u narednim generacijama. Overekspresija gena od interesa je još jedan pristup u proučavanju sličnosti i razlika funkcija dve izoforme proteina DSS1 kod *A. thaliana* (Zhang, 2003). Razlog izostanka povećane ekspresije gena kod preostalih potencijalno dobijenih transgenih biljaka (OE DSS1(I) i OE DSS1(V).1) se može pripisati efektu nasumučne ugradnje kasete za overekspresiju u deo genoma u kome susedni geni mogu imati uticaj na nivo ekspresije transgena, kao što je na primer transkripciona interferencija od strane uzvodnih gena i njihovih *cis*-regulatornih elemenata (Betts et al., 2019).

Tokom fenotipske karakterizacije i analize osetljivosti na oksidativni stres nisu uočene značajne razlike na morfološkom i fiziološkom nivou između WT biljaka i biljaka sa prekomerno ekspimiranim *DSS1(V)* (Slika 53 i 54). Odnosno, OE DSS(V) biljke su pokazivale fenotip sličan divljem tipu. Iako bi se na osnovu ovih rezultata moglo zaključiti da overekspresija *DSS1(V)* ne doprinosi boljem odgovoru na oksidativni stres, prisustvo proteina nije dokazano usled nedostupnosti komercijalnih antitela koja specifično kros-reaguju sa biljnim DSS1 proteinima.

Overekspresija gena *DSS1(V)*, a izostanak prekomerno prisutnih proteina DSS1(V) se može objasniti podacima iz literature koji ukazuju na to da koncentracija određenih proteina jeste samo u izvesnoj meri u korelaciji sa količinom njihove iRNK. Prisustvo proteina u ćeliji može biti ograničeno njihovim polu-životom, bez obzira na uočeno povećanje u količini njihovih transkripata (Laurent et al., 2010). Sem prisustva iRNK za određen protein, na njegovu sintezu utiče energentski status ćelije i post-translaciona regulacija (Li et al., 2017). Generalno, sinteza proteina i proteostaza podrazumevaju niz povezanih procesa koji su strogo regulisani, a koji obuhvataju transkripciju, translaciju, obradu i degradaciju iRNK, kao i lokalizaciju, modifikaciju i degradaciju samih proteina (Vogel & Marcotte, 2012). Tako posmatrajući, u overekspimiranim biljkama postoji mogućnost da nije došlo do prekomerne akumulacije proteina DSS1(V). Iz prethodno navedenog može da se pretpostavi da porast ekspresije gena *DSS1(V)* nema efekat na sintezu samog proteina u OE DSS1(V) biljkama kako je pokazano da ne postoji razlika na nivou morfologije u normalnim fiziološkim uslovima i promenjenoj osetljivosti u tretmanu vodonik-peroksida u odnosu WT biljkama.

Rezultati iz ovog rada ukazuju na mogućnost postojanja funkcionalne razlike između dva gena DSS1, njihov različiti doprinos biljnom fenotipu, kao i različiti doprinos dinamici razvića. Dva proteina DSS1 imaju različit efekat u održavanju homeostaze proteina, što može da se pripiše različitoj osetljivosti mutanata na oksidativni stres u poređenju sa WT biljkama. Pretpostavlja se da

Q44L supstitucija može uticati na primećene fenotipske razlike između ove dve izoforme proteina DSS1. Jedna od mogućnosti je da ova dva proteina imaju različito učešće u konstituciji 26S proteazoma, stoga i u eliminaciji oštećenih proteina. Pored toga, moguće je da ova dva proteina imaju drugačiji afinitet u vezivanju oksidovanih proteina u procesu DSSilacije. Naši rezultati doprinose takvoj pretpostavci, s obzirom na to da nedostatak proteina DSS1(V) vodi ka akumulaciji i neefikasnom uklanjanju oksidovanih proteina, dok disrupcija gena DSS1(I) ima ograničeni efekat na ovaj proces. Ova otkrića naglašavaju značaj važnost u razumevanju molekularnih mehanizama biljnog odgovora na oksidativni stres.

Rasvetljavanje učešća proteina DSS1 u biljnim mehanizmima odbrane može biti od velikog značaja za poljoprivredne useve, s obzirom na štetne posledice klimatskih promena i oksidativni stres kao zajednički sadržalac.

6. ZAKLJUČCI

1. Bioinformatička predikcija filogenetskog stabla evolutivno srodnih biljnih proteina DSS1 upućuje na to da je rezultat duplikacije biljnog gena *DSS1* tokom evolucije nastanak novog *DSS1(V)* gena.
2. *In silico* analizom poređenja sekvenci proteina DSS1 je zabeležen visok nivo homologije u aminokiselinskoj sekvenci između DSS1(I) i DSS1(V). Identifikovana je supstitucija iz polarnog glutamina u nepolarni leucin na poziciji 44 u proteinu DSS1(V), koja ukazuje na potencijalno različitu prostornu organizaciju proteina.
3. Kvantitativnom PCR analizom pokazano je da su najveće promene u relativnoj ekspresiji gena *DSS1* detektovane u korenovima odraslih biljaka divljeg soja koje su tretirane 10 mM H₂O₂ nakon jednog dana od početka izlaganja stresoru. Gen *DSS1(V)* pokazuje veću responzivnost na uslove primenjenog stresa u odnosu na gen *DSS1(I)*, jer je pet puta više transkriptata *DSS1(V)* detektovano u odnosu na kontrolne biljke, dok je ekspresija *DSS1(I)* samo tri puta povišena u tretmanu 10 mM H₂O₂.
4. Imunoblot analizom je pokazano da je profil ekspresije ukupnih DSS1 proteina sinhronizovan sa analiziranim profilima ekspresije *DSS1* gena i da je najdramatičniji porast od 20 puta detektovan u korenu biljaka izloženih 10 mM H₂O₂.
5. Oksidativni stres izazvan 200 μM metil-viologenom izaziva delimično izmenjeni profil ekspresije *DSS1(I)* i *DSS1(V)* gena u odnosu na stres izazvan H₂O₂, i to pre svega u listovima tretiranih biljaka divljeg soja u odnosu na kontrolne biljke, što je posledica različitih efekata koje ovi stresori izazivaju u biljnim ćelijama.
6. Semikvantitativnim pristupom, kroz test funkcionalne komplementacije je pokazano da overekspimirani DSS1(I) protein *A. thaliana* rekonstruiše WT fenotip $\Delta dss1$ mutanta *U. maydi*, obezbeđujući mu delimičnu rezistentnost na subletalne doze primenjenih genotoksičnih agensa u donosu na soj $\Delta dss1$. Biljni AtDSS1(V) nije pokazao mogućnost da komplementira nedostatak *U. maydis* Dss1, sugerišući na to da ove dve varijante DSS1 proteina *A. thaliana* mogu imati različite uloge u rekombinacionoj popravci DNK lezija.
7. Čista homozigotna T-DNA inserciona linija koja je sadržavala inserciju u okviru introna gena *DSS1(V)* pokazala je 75% snižen nivo ekspresije gena *DSS1(V)*, kao i 48% redukovani nivo ukupnih DSS1 proteina, što ukazuje na to da je ovim postupkom generisana *knockdown* mutirana linija *t-dss1(V)*.
8. Morfološka karakterizacija pokazuje da *t-dss1(V)* imaju plejotropni defekt u rastu na različitim nivoima razvića, imaju brže klijanje i ranije izduživanje radikula, a zatim zaostajanje u rastu u kasnijim fazama. Ranija indukcija klijanja semena sugeriše da u *t-dss1(V)* mutantima dolazi do akumulacije oštećenih proteina koji mogu biti signal za klijanje.
9. Analiza osetljivosti T-DNK insercionih mutanata *t-dss1(V)* je pokazala povišen nivo oksidovanih proteina i lipidne peroksidacije, kao i značajno smanjenu stopu preživljavanja u oksidativnom stresu izazvanim vodonik-peroksidom i metil-viologenom. Najveći nivo oksidovanih proteina je detektovan pri tretmanu 10 mM H₂O₂ i bio je pet puta veći u *t-dss1(V)* u poređenju sa kontrolnim biljkama ukazujući na to da je DSS1(V) jedan od značajnih učesnika u ćelijskoj detoksifikaciji i procesima održavanju proteostaze.

10. CRISPR/Cas9 tehnologijom su generisane mutirana linija sa delecijom od 25 nukleotida u sekvenci *DSS1(I)* i insercijom od 18 nukleotida u sekvenci *DSS1(V)*. PCR metodom je potvrđeno odsustvo specifičnih *DSS1* transkripata u dobijenim CRISPR/Cas9 linijama mutanata, a analizom izvedenih aminokiselinskih sekvenci je pokazano da indukovane mutacije u odabranim linijama rezultuju formiranjem preuranjenih stop kodona.
11. Zrele *dss1(I)* mutirane biljke su bile sitnijeg rasta, manjih rozeta, sa manjim brojem grana i produkovale su silike sa malim brojem razvijenih semena u poređenju sa WT biljkama. Pojava abortivnih semena, ukazuje na narušene funkcije BRCA2 kompleksa i 26S proteazoma usled izostanka proteina *DSS1(I)* što dovodi do letalnog ishoda.
12. Fenotipska analiza mutiranih *dss1(V)* biljaka pokazuje da su u početnim fazama njihovog razvića kotiledoni zatvoreni i sa izraženom apikalnom kukom, dok je u kasnijim fazama dinamika njihovog razvića u odnosu na WT biljke. Ovakav fenotip se može objasniti hipersenzitivnim odgovorom na etilen usled narušene funkcije proteina *EER5* kao negativnog regulatora odgovora na etilen usled izostanka *DSS1(V)*.
13. Ispitivanjem oksidativnog stresa u klijancima CRISPR/Cas9 mutanata pri tretmanu peroksidom i UV-zračenjem uočena je visoka senzitivnost *dss1(V)* klijanca na oksidativni stres u poređenju sa *dss1* i WT biljkama. Pri tretmanu vodonik-peroksidom, detektovana je da 61% smanjenju stopu preživljavanja i 60% veće prisustvo oksidovanih proteina u *dss1(V)* biljkama u komparaciji sa WT biljkama, što dodatno potvrđuje ulogu proteina *DSS1(V)* u mehanizmu odgovora na oksidativni stres.
14. Metodom tradicionalnog ukrštanja je izvršeno recipročno ukrštanje muških i ženskih gametofita između linija mutanata *dss1(I)* i *dss1(V)* u cilju generisanja duplih mutanata *dss1*. Testiranjem ukupno 152 biljke nije detektovano prisustvo *dss1(I)dss1(V)* genotipa tj. duplih *dss1* mutanata, što sugeriše da mutacije oba genska paraloga *DSS1* dovodi do letalnog ishoda.
15. Rezultati analize morfoloških osobina i osetljivosti na oksidativni stres linija *A. thaliana* u kojima je overeksprimiran gen *DSS1(V)* nisu pokazale vidljive i statistički značajne razlike između linije biljaka OE *DSS1(V)* i WT biljaka.

7. LITERATURA

- Ahammed, G. J., Gantait, S., Mitra, M., Yang, Y., & Li, X. (2020). Role of ethylene crosstalk in seed germination and early seedling development: A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, *151*, 124-131.
- Akter, S., Carpentier, S., Van Breusegem, F., & Messens, J. (2017). Identification of dimedone-trapped sulfenylated proteins in plants under stress. *Biochemistry and biophysics reports*, *9*, 106-113.
- Ambros, V., Lee, R. C., Lavanway, A., Williams, P. T., & Jewell, D. (2003). MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Current Biology*, *13*(10), 807-818.
- Andrusier, N., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2007). FireDock: fast interaction refinement in molecular docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *69*(1), 139-159.
- Anjum, N. A., Sofu, A., Scopa, A., Roychoudhury, A., Gill, S. S., Iqbal, M., Lukatkin, A. S., Pereira, E., Duarte, A. C., & Ahmad, I. (2015). Lipids and proteins—major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*, 4099-4121.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, *55*, 373-399.
- Avery, Simon V. (2011). Molecular targets of oxidative stress. *Biochemical Journal*, *434*(2), 201-210. <https://doi.org/10.1042/BJ20101695>
- Banaś, A. K., Zgłobicki, P., Kowalska, E., Dziga, D., & Strzałka, W. (2020). All you need is light. Photorepair of UV-induced pyrimidine dimers. *Genes*, *11*(11), 1304.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. A. (2008). The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiology*, *148*(1), 6-24. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120725>
- Berardini, T. Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E., & Huala, E. (2015). The Arabidopsis information resource: making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *genesis*, *53*(8), 474-485.
- Betts, S. D., Basu, S., Bolar, J., Booth, R., Chang, S., Cigan, A. M., Farrell, J., Gao, H., Harkins, K., & Kinney, A. (2019). Uniform expression and relatively small position effects characterize sister transformants in maize and soybean. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1209.
- Birkenbihl, R. P., Diezel, C., & Somssich, I. E. (2012). Arabidopsis WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiol*, *159*(1), 266-285. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192641>
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*, *33*(1), 41-52.
- Bortesi, L., Zhu, C., Zischewski, J., Perez, L., Bassié, L., Nadi, R., Forni, G., Lade, S. B., Soto, E., Jin, X., Medina, V., Villorbina, G., Muñoz, P., Farré, G., Fischer, R., Twyman, R. M., Capell, T., Christou, P., & Schillberg, S. (2016). Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant Biotechnol J*, *14*(12), 2203-2216. <https://doi.org/10.1111/pbi.12634>
- Bozorgmehr, J. E. H. (2012). The effect of functional compensation among duplicate genes can constrain their evolutionary divergence. *Journal of Genetics*, *91*(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s12041-012-0125-y>
- Brenda G. Leicht, C.-L. C. (2008). Reverse Genetics: Identification of Arabidopsis Lines with T-DNA Insertions in a Gene of Interest. *ABLE 2008 Proceedings*, *30*.
- Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M., & van Steensel, B. (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic acids research*, *42*(22), e168-e168. <https://doi.org/10.1093/nar/gku936>
- Britt, A. B. (1995). Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. *Plant Physiology*, *108*(3), 891.
- Buchan, D. W., & Jones, D. T. (2019). The PSIPRED protein analysis workbench: 20 years on. *Nucleic acids research*, *47*(W1), W402-W407.

- Castells, E., Molinier, J., Drevensek, S., Genschik, P., Barneche, F., & Bowler, C. (2010). det1-1-induced UV-C hyposensitivity through UVR3 and PHR1 photolyase gene over-expression. *The Plant Journal*, *63*(3), 392-404.
- Cheng, C. Y., Krishnakumar, V., Chan, A. P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S., & Town, C. D. (2017). Araport11: a complete reannotation of the Arabidopsis thaliana reference genome. *Plant J*, *89*(4), 789-804. <https://doi.org/10.1111/tpj.13415>
- Chmielowska-Bąk, J., Izbiańska, K., & Deckert, J. (2015). Products of lipid, protein and RNA oxidation as signals and regulators of gene expression in plants. *Front Plant Sci*, *6*, 405. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00405>
- Christensen, J. J. (1963). Corn smut caused by *Ustilago maydis*. *Monographs. American Phytopathology Society*, *2*.
- Christians, M. J., Robles, L. M., Zeller, S. M., & Larsen, P. B. (2008). The eer5 mutation, which affects a novel proteasome-related subunit, indicates a prominent role for the COP9 signalosome in resetting the ethylene-signaling pathway in Arabidopsis. *Plant J*, *55*(3), 467-477. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03521.x>
- Claeys, H., Van Landeghem, S., Dubois, M., Maleux, K., & Inzé, D. (2014). What Is Stress? Dose-Response Effects in Commonly Used in Vitro Stress Assays. *Plant Physiology*, *165*(2), 519-527. <https://doi.org/10.1104/pp.113.234641>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *16*(6), 735-743.
- Conn, S. J., Hocking, B., Dayod, M., Xu, B., Athman, A., Henderson, S., Aukett, L., Conn, V., Shearer, M. K., & Fuentes, S. (2013). Protocol: optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of Arabidopsis thaliana and other plants. *Plant methods*, *9*(1), 1-11.
- Crackower, M. A., Scherer, S. W., Rommens, J. M., Hui, C.-C., Poorkaj, P., Soder, S., Cobben, J. M., Hudgins, L., Evans, J. P., & Tsui, L.-C. (1996). Characterization of the split hand/split foot malformation locus SHFM1 at 7q21. 3–q22. 1 and analysis of a candidate gene for its expression during limb development. *Human molecular genetics*, *5*(5), 571-579.
- Danon, A., & Gallois, P. (1998). UV-C radiation induces apoptotic-like changes in Arabidopsis thaliana. *FEBS letters*, *437*(1-2), 131-136.
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science*, *2*, 53.
- Daudi, A., & O'Brien, J. A. (2012). Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in Arabidopsis leaves. *Bio-protocol*, *2*(18), e263-e263.
- Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1703*(2), 93-109. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.08.007>
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and experimental botany*, *109*, 212-228.
- Desikan, R., A.-H.-Mackerness, S., Hancock, J. T., & Neill, S. J. (2001). Regulation of the Arabidopsis Transcriptome by Oxidative Stress. *Plant Physiology*, *127*(1), 159-172. <https://doi.org/10.1104/pp.127.1.159>
- Dodge, A. D. (1993). Herbicide action and effects on detoxification processes. In *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants* (pp. 219-236). CRC Press.
- Dray, E., Siaud, N., Dubois, E., & Doutriaux, M. P. (2006). Interaction between Arabidopsis Brca2 and its partners Rad51, Dmc1, and Dss1. *Plant Physiol*, *140*(3), 1059-1069. <https://doi.org/10.1104/pp.105.075838>
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*.
- Du, Y. Y., Wang, P. C., Chen, J., & Song, C. P. (2008). Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in Arabidopsis thaliana. *Journal of Integrative Plant Biology*, *50*(10), 1318-1326.

- Duhovny, D., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2002). Efficient unbound docking of rigid molecules. Algorithms in Bioinformatics: Second International Workshop, WABI 2002 Rome, Italy, September 17–21, 2002 Proceedings 2,
- El-Maarouf-Bouteau, H., & Bailly, C. (2008). Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant signaling & behavior*, 3(3), 175-182. <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5539>
- El-Maarouf-Bouteau, H., Meimoun, P., Job, C., Job, D., & Bailly, C. (2013). Role of protein and mRNA oxidation in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 4, 77.
- Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2009). Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS One*, 4(5), e5553.
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3, 222.
- Faza, M. B., Kemmler, S., Jimeno, S., Gonzalez-Aguilera, C., Aguilera, A., Hurt, E., & Panse, V. G. (2009). Sem1 is a functional component of the nuclear pore complex-associated messenger RNA export machinery. *J Cell Biol*, 184(6), 833-846. <https://doi.org/10.1083/jcb.200810059>
- Feng, Z., Mao, Y., Xu, N., Zhang, B., Wei, P., Yang, D.-L., Wang, Z., Zhang, Z., Zheng, R., & Yang, L. (2014). Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(12), 4632-4637.
- Fu, Z., Tang, S.-F., & Hou, X. (2020). Probing the molecular toxic mechanism of di-(2-ethylhexyl) phthalate with glutathione transferase Phi8 from Arabidopsis thaliana. *International journal of biological macromolecules*, 145, 165-172. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.148>
- Fuentes, D., Molina, M., Chorostecki, U., Capella-Gutiérrez, S., Marcet-Houben, M., & Gabaldón, T. (2021). PhylomeDB V5: an expanding repository for genome-wide catalogues of annotated gene phylogenies. *Nucleic acids research*, 50(D1), D1062-D1068. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab966>
- Funakoshi, M., Li, X., Velichutina, I., Hochstrasser, M., & Kobayashi, H. (2004). Sem1, the yeast ortholog of a human BRCA2-binding protein, is a component of the proteasome regulatory particle that enhances proteasome stability. *Journal of cell science*, 117(26), 6447-6454.
- Furger, A., O'Sullivan, J. M., Binnie, A., Lee, B. A., & Proudfoot, N. J. (2002). Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes & development*, 16(21), 2792-2799.
- Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*, 31(7), 397-405.
- Gallegos, J. E., & Rose, A. B. (2017). Intron DNA sequences can be more important than the proximal promoter in determining the site of transcript initiation. *The Plant Cell*, 29(4), 843-853.
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 419-425. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), E2579-E2586.
- Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67(1), 16-37, table of contents. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.16-37.2003>
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Jha, M., & Tuteja, N. (2015). DNA damage and repair in plants under ultraviolet and ionizing radiations. *The Scientific World Journal*, 2015.
- Hahn, F., & Nekrasov, V. (2019). CRISPR/Cas precision: do we need to worry about off-targeting in plants? *Plant Cell Reports*, 38(4), 437-441.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., Fujita, M., & Fotopoulos, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681.

- Hellens, R., Mullineaux, P., & Klee, H. (2000). Technical focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in plant science*, 5(10), 446-451.
- Heyn, P., Kalinka, A. T., Tomancak, P., & Neugebauer, K. M. (2015). Introns and gene expression: cellular constraints, transcriptional regulation, and evolutionary consequences. *Bioessays*, 37(2), 148-154.
- Hinnebusch, A. G. (2006). eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends in biochemical sciences*, 31(10), 553-562. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.08.005>
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604-611.
- Hofmann, K., & Bucher, P. (1998). The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *Trends in biochemical sciences*, 23(6), 204-205.
- Holliday, R. (1974). *Ustilago maydis*. Handbook of Genetics, Vol. 1 (King RC, ed). In: Plenum, New York.
- Hsiao, T. C., & Xu, L. K. (2000). Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany*, 51(350), 1595-1616. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.350.1595>
- Huang, X., Luan, B., Wu, J., & Shi, Y. (2016). An atomic structure of the human 26S proteasome. *Nature structural & molecular biology*, 23(9), 778-785. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3273>
- Initiative, T. A. G. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *nature*, 408(6814), 796-815.
- Jääntti, J., Lahdenranta, J., Olkkonen, V. M., Söderlund, H., & Keränen, S. (1999). SEM1, a homologue of the split hand/split foot malformation candidate gene *Dss1*, regulates exocytosis and pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(3), 909-914. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.909>
- Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., & Simonovic, M. (2009). STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D412-D416.
- Jorge, T. F., Rodrigues, J. A., Caldana, C., Schmidt, R., van Dongen, J. T., Thomas-Oates, J., & António, C. (2016). Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. *Mass Spectrometry Reviews*, 35(5), 620-649.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A. B., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., . . . Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *nature*, 444(7115), 97-101. <https://doi.org/10.1038/nature05248>
- Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert opinion on drug discovery*, 2(4), 571-589.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, 10(6), 845-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kim, T.-H., Hofmann, K., Von Arnim, A. G., & Chamovitz, D. A. (2001). PCI complexes: pretty complex interactions in diverse signaling pathways. *Trends in plant science*, 6(8), 379-386.
- Kmiecik, P., Leonardelli, M., & Teige, M. (2016). Novel connections in plant organellar signalling link different stress responses and signalling pathways. *Journal of Experimental Botany*, 67(13), 3793-3807. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw136>
- Koch, M. A., & Matschinger, M. (2007). Evolution and genetic differentiation among relatives of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), 6272-6277.
- Kojic, M., Yang, H., Kostrub, C. F., Pavletich, N. P., & Holloman, W. K. (2003). The BRCA2-interacting protein DSS1 is vital for DNA repair, recombination, and genome stability in

- Ustilago maydis. *Mol Cell*, 12(4), 1043-1049. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00367-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00367-8)
- Kojic, M., Zhou, Q., Lisby, M., & Holloman, W. K. (2005). Brh2-Dss1 interplay enables properly controlled recombination in *Ustilago maydis*. *Molecular and Cellular Biology*, 25(7), 2547-2557.
- Kragelund, B. B., Schenstrom, S. M., Rebula, C. A., Panse, V. G., & Hartmann-Petersen, R. (2016). DSS1/Sem1, a Multifunctional and Intrinsically Disordered Protein. *Trends Biochem Sci*, 41(5), 446-459. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.02.004>
- Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *Elife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.06100>
- Kristensen, C. N., Bystol, K. M., Li, B., Serrano, L., & Brenneman, M. A. (2010). Depletion of DSS1 protein disables homologous recombinational repair in human cells. *Mutat Res*, 694(1-2), 60-64. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.08.007>
- Labun, K., Montague, T. G., Gagnon, J. A., Thyme, S. B., & Valen, E. (2016). CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic acids research*, 44(W1), W272-W276. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw398>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D. L., & Garcia-Hernandez, M. (2012). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic acids research*, 40(D1), D1202-D1210. <https://www.arabidopsis.org/index.jsp>
- Lane, T. S., Rempe, C. S., Davitt, J., Staton, M. E., Peng, Y., Soltis, D. E., Melkonian, M., Deyholos, M., Leebens-Mack, J. H., Chase, M., Rothfels, C. J., Stevenson, D., Graham, S. W., Yu, J., Liu, T., Pires, J. C., Edger, P. P., Zhang, Y., Xie, Y., . . . Stewart, C. N. (2016). Diversity of ABC transporter genes across the plant kingdom and their potential utility in biotechnology. *BMC Biotechnology*, 16(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0277-6>
- Laurent, J. M., Vogel, C., Kwon, T., Craig, S. A., Boutz, D. R., Huse, H. K., Nozue, K., Walia, H., Whiteley, M., & Ronald, P. C. (2010). Protein abundances are more conserved than mRNA abundances across diverse taxa. *Proteomics*, 10(23), 4209-4212.
- Le, H. P., Ma, X., Vaquero, J., Brinkmeyer, M., Guo, F., Heyer, W.-D., & Liu, J. (2020). DSS1 and ssDNA regulate oligomerization of BRCA2. *Nucleic acids research*, 48(14), 7818-7833.
- Lee, L.-Y., & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 146(2), 325-332. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113001>
- Li, J., Manghwar, H., Sun, L., Wang, P., Wang, G., Sheng, H., Zhang, J., Liu, H., Qin, L., Rui, H., Li, B., Lindsey, K., Daniell, H., Jin, S., & Zhang, X. (2019). Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants. *Plant Biotechnol J*, 17(5), 858-868. <https://doi.org/10.1111/pbi.13020>
- Li, L., Nelson, C. J., Trösch, J., Castleden, I., Huang, S., & Millar, A. H. (2017). Protein Degradation Rate in *Arabidopsis thaliana* Leaf Growth and Development. *Plant Cell*, 29(2), 207-228. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00768>
- Lin, S.-L., Chang, D., Wu, D.-Y., & Ying, S.-Y. (2003). A novel RNA splicing-mediated gene silencing mechanism potential for genome evolution. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310(3), 754-760.
- Liu, H., Ding, Y., Zhou, Y., Jin, W., Xie, K., & Chen, L. L. (2017). CRISPR-P 2.0: An Improved CRISPR-Cas9 Tool for Genome Editing in Plants. *Mol Plant*, 10(3), 530-532. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.003>
- Liu, J., Doty, T., Gibson, B., & Heyer, W.-D. (2010). Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nature structural & molecular biology*, 17(10), 1260-1262.

- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., & Yin, H. (2021). The Flavonoid Biosynthesis Network in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12824. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/23/12824>
- Liu, W., Zhu, X., Lei, M., Xia, Q., Botella, J. R., Zhu, J.-K., & Mao, Y. (2015). A detailed procedure for CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana*. *Science Bulletin*, 60, 1332-1347.
- Lu, Q., Tang, X., Tian, G., Wang, F., Liu, K., Nguyen, V., Kohalmi, S. E., Keller, W. A., Tsang, E. W., Harada, J. J., Rothstein, S. J., & Cui, Y. (2010). *Arabidopsis* homolog of the yeast TREX-2 mRNA export complex: components and anchoring nucleoporin. *Plant J*, 61(2), 259-270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04048.x>
- Marston, N. J., Richards, W. J., Hughes, D., Bertwistle, D., Marshall, C. J., & Ashworth, A. (1999). Interaction between the product of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 and DSS1, a protein functionally conserved from yeast to mammals. *Mol Cell Biol*, 19(7), 4633-4642. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.7.4633>
- McGuffin, L. J., Bryson, K., & Jones, D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 16(4), 404-405.
- Meksem, K., Shultz, J., Tebbji, F., Jamai, A., Henrich, J., Kranz, H., Arenz, M., Schlueter, T., Ishihara, H., & Jyothi, L. N. (2005). A bacterial artificial chromosome based physical map of the *Ustilago maydis* genome. *Genome*, 48(2), 207-216.
- Mendgen, K., & Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in plant science*, 7(8), 352-356.
- Meng, Y., & Shao, C. (2012). Large-scale identification of mirtrons in *Arabidopsis* and rice. *PLoS One*, 7(2), e31163.
- Meyerowitz, E. M., & Pruitt, R. E. (1985). *Arabidopsis thaliana* and Plant Molecular Genetics. *Science*, 229(4719), 1214-1218. <https://doi.org/10.1126/science.229.4719.1214>
- Mintoff, S., Rookes, J., & Cahill, D. (2015). Sub-lethal UV-C radiation induces callose, hydrogen peroxide and defence-related gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 17(3), 703-711.
- Mishra, A. P., Hartford, S. A., Sahu, S., Klarmann, K., Chittela, R. K., Biswas, K., Jeon, A. B., Martin, B. K., Burkett, S., Southon, E., Reid, S., Albaugh, M. E., Karim, B., Tessarollo, L., Keller, J. R., & Sharan, S. K. (2022). BRCA2-DSS1 interaction is dispensable for RAD51 recruitment at replication-induced and meiotic DNA double strand breaks. *Nat Commun*, 13(1), 1751. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29409-y>
- Mitchell-Olds, T., & Schmitt, J. (2006). Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in *Arabidopsis*. *nature*, 441(7096), 947-952. <https://doi.org/10.1038/nature04878>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshihara, T., Kamiya, Y., & Nambara, E. (2005). Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *The Plant Journal*, 41(5), 697-709.
- Narsai, R., Gouil, Q., Secco, D., Srivastava, A., Karpievitch, Y. V., Liew, L. C., Lister, R., Lewsey, M. G., & Whelan, J. (2017). Extensive transcriptomic and epigenomic remodelling occurs during *Arabidopsis thaliana* germination. *Genome biology*, 18, 1-18.
- Nawkar, G. M., Maibam, P., Park, J. H., Sahi, V. P., Lee, S. Y., & Kang, C. H. (2013). UV-Induced cell death in plants. *Int J Mol Sci*, 14(1), 1608-1628. <https://doi.org/10.3390/ijms14011608>
- Nekrasov, V., Wang, C., Win, J., Lanz, C., Weigel, D., & Kamoun, S. (2017). Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Scientific reports*, 7(1), 1-6.
- Nešković, M., Konjević, R., & Čulafić, L. (2010). *Fiziologija biljaka*, ISBN 978-86-83635-92-4.
- Nikolić, I. (2016). *Analiza ekspresije gena za protein DSS1 arabidopsisa u uslovima oksidativnog stresa*. [Master rad, BIOLOŠKI FAKULTET, UNIVERZITET U BEOGRADU]

- O'Malley, R. C., Barragan, C. C., & Ecker, J. R. (2015). A user's guide to the Arabidopsis T-DNA insertion mutant collections. *Methods Mol Biol*, *1284*, 323-342. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2444-8_16
- O'Malley, R. C., & Ecker, J. R. (2010). Linking genotype to phenotype using the Arabidopsis unimutant collection. *Plant J*, *61*(6), 928-940. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04119.x>
- Pan, C., Ye, L., Qin, L., Liu, X., He, Y., Wang, J., Chen, L., & Lu, G. (2016). CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Scientific reports*, *6*(1), 24765. <https://doi.org/10.1038/srep24765>
- Panchy, N., Lehti-Shiu, M., & Shiu, S.-H. (2016). Evolution of Gene Duplication in Plants. *Plant Physiology*, *171*(4), 2294-2316. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00523>
- Paraskevopoulos, K., Kriegenburg, F., Tatham, M. H., Rosner, H. I., Medina, B., Larsen, I. B., Brandstrup, R., Hardwick, K. G., Hay, R. T., Kragelund, B. B., Hartmann-Petersen, R., & Gordon, C. (2014). Dss1 is a 26S proteasome ubiquitin receptor. *Mol Cell*, *56*(3), 453-461. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.008>
- Pérez-Martín, L., Busoms, S., Tolrà, R., & Poschenrieder, C. (2021). Transcriptomics Reveals Fast Changes in Salicylate and Jasmonate Signaling Pathways in Shoots of Carbonate-Tolerant Arabidopsis thaliana under Bicarbonate Exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(3), 1226. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/3/1226>
- Pick, E., Hofmann, K., & Glickman, M. H. (2009). PCI complexes: Beyond the proteasome, CSN, and eIF3 Troika. *Mol Cell*, *35*(3), 260-264. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.009>
- Pispa, J., Palmén, S., Holmberg, C. I., & Jäntti, J. (2008). C. elegans dss-1 is functionally conserved and required for oogenesis and larval growth. *BMC Dev Biol*, *8*, 51. <https://doi.org/10.1186/1471-213x-8-51>
- Provart, N. J., Alonso, J., Assmann, S. M., Bergmann, D., Brady, S. M., Brkljacic, J., Browse, J., Chapple, C., Colot, V., & Cutler, S. (2016). 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. *New Phytologist*, *209*(3), 921-944.
- Pucker, B., Kleinbölting, N., & Weisshaar, B. (2021). Large scale genomic rearrangements in selected Arabidopsis thaliana T-DNA lines are caused by T-DNA insertion mutagenesis. *BMC genomics*, *22*(1), 1-21.
- Radhamony, R. N., Mohan Prasad, A., & Srinivasan, R. (2005). T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis: a tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology*, *8*(1), 82-106.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, *8*(11), 2281-2308.
- Redei, G. P. (1975). Arabidopsis as a genetic tool. *Annual review of genetics*, *9*(1), 111-127.
- Reed, R. G., Jobin, G. W., & Tomko, R. J. (2022). Sem1/DSS1 accelerates ATP-dependent substrate unfolding by the proteasome through a conformation-dependent intercomplex contact. *bioRxiv*, 2022.2006.2027.497739. <https://doi.org/10.1101/2022.06.27.497739>
- Remans, T., Smeets, K., Opdenakker, K., Mathijsen, D., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2008). Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in Arabidopsis thaliana exposed to increased metal concentrations. *Planta*, *227*, 1343-1349.
- Rentel, M. C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S. L., Petersen, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, S. C., Grierson, C. S., Hirt, H., & Knight, M. R. (2004). OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis. *nature*, *427*(6977), 858-861. <https://doi.org/10.1038/nature02353>
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*, *14*(10a), 1902-1910.
- Rodríguez, M. C., Wawrzyńska, A., & Sirko, A. (2014). Intronic T-DNA insertion in Arabidopsis NBR1 conditionally affects wild-type transcript level. *Plant signaling & behavior*, *9*(12), e975659.

- Roulin, A., Auer, P. L., Libault, M., Schlueter, J., Farmer, A., May, G., Stacey, G., Doerge, R. W., & Jackson, S. A. (2013). The fate of duplicated genes in a polyploid plant genome. *The Plant Journal*, 73(1), 143-153.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
- Saxena, I., Srikanth, S., & Chen, Z. (2016). Cross talk between H₂O₂ and interacting signal molecules under plant stress response. *Frontiers in Plant Science*, 7, 570.
- Schenstrøm, S. M., Rebula, C. A., Tatham, M. H., Hendus-Altenburger, R., Jourdain, I., Hay, R. T., Kragelund, B. B., & Hartmann-Petersen, R. (2018). Expanded Interactome of the Intrinsically Disordered Protein Dss1. *Cell Rep*, 25(4), 862-870. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.080>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Scholl, R. L., May, S. T., & Ware, D. H. (2000). Seed and Molecular Resources for Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124(4), 1477-1480. <https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1477>
- Seeliger, K., Dukowic-Schulze, S., Wurz-Wildersinn, R., Pacher, M., & Puchta, H. (2012). BRCA2 is a mediator of RAD51-and DMC1-facilitated homologous recombination in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist*, 193(2), 364-375.
- Semane, B., Cuypers, A., Smeets, K., Van Belleghem, F., Horemans, N., Schat, H., & Vangronsveld, J. (2007). Cadmium responses in Arabidopsis thaliana: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiologia plantarum*, 129(3), 519-528.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., & Söding, J. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1), 539. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
- Singh, A., Kumar, A., Yadav, S., & Singh, I. K. (2019). Reactive oxygen species-mediated signaling during abiotic stress. *Plant Gene*, 18, 100173.
- Steinberg, G., & Perez-Martin, J. (2008). Ustilago maydis, a new fungal model system for cell biology. *Trends in cell biology*, 18(2), 61-67.
- Sun, X., Rikkerink, E. H., Jones, W. T., & Uversky, V. N. (2013). Multifarious roles of intrinsic disorder in proteins illustrate its broad impact on plant biology. *The Plant Cell*, 25(1), 38-55.
- Sutherland, M. W. (1991). The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39(2), 79-93.
- T-DNA Express*. <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>
- TAIR. (2023). *The Arabidopsis Information Resource*. <https://www.arabidopsis.org/> ; [<https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=27316&type=locus> , <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=132105&type=locus>]
- Taj, G., Agarwal, P., Grant, M., & Kumar, A. (2010). MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signal Behav*, 5(11), 1370-1378. <https://doi.org/10.4161/psb.5.11.13020>
- Thordal-Christensen, H., & Zhang, Z. (1997). Wei. Y. and Collinge, DB (1997) Subcellular localisation of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley–powdery mildew interaction. *Plant J*, 11, 1187-1194.
- Tian, G., Lu, Q., Kohalmi, S. E., Rothstein, S. J., & Cui, Y. (2012). Evidence that the Arabidopsis Ubiquitin C-terminal Hydrolases 1 and 2 associate with the 26S proteasome and the TREX-2 complex. *Plant Signal Behav*, 7(11), 1415-1419. <https://doi.org/10.4161/psb.21899>
- Tomko, R. J., Jr., & Hochstrasser, M. (2014). The intrinsically disordered Sem1 protein functions as a molecular tether during proteasome lid biogenesis. *Mol Cell*, 53(3), 433-443. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.009>
- Tunnacliffe, A., & Wise, M. J. (2007). The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94(10), 791-812. <https://doi.org/10.1007/s00114-007-0254-y>

- Urban, L., Charles, F., de Miranda, M. R. A., & Aarouf, J. (2016). Understanding the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential before and after harvest. *Plant Physiology and Biochemistry*, *105*, 1-11.
- Uzilday, B., Ozgur, R., Sekmen, A. H., & Turkan, I. (2017). Endoplasmic reticulum stress regulates glutathione metabolism and activities of glutathione related enzymes in Arabidopsis. *Functional Plant Biology*, *45*(2), 284-296.
- Van Der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R. J., Daughdrill, G. W., Dunker, A. K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., & Jones, D. T. (2014). Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chemical reviews*, *114*(13), 6589-6631.
- Váradi, G., Darkó, E., & Lehoczki, E. (2000). Changes in the xanthophyll cycle and fluorescence quenching indicate light-dependent early events in the action of paraquat and the mechanism of resistance to paraquat in *Erigeron canadensis* (L.) Cronq. *Plant Physiology*, *123*(4), 1459-1470.
- Velentzas, P. D., Velentzas, A. D., Mpakou, V. E., Papassideri, I. S., Stravopodis, D. J., & Margaritis, L. H. (2011). Proteasome inhibition induces developmentally deregulated programs of apoptotic and autophagic cell death during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Cell Biology International*, *35*(1), 15-27.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, *45*(4), 523-539.
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, *13*(4), 227-232. <https://doi.org/10.1038/nrg3185>
- Voges, D., Zwickl, P., & Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual review of biochemistry*, *68*(1), 1015-1068.
- Wang, K., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., & Zambryski, P. (1984). Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from agrobacterium to the plant genome. *Cell*, *38*(2), 455-462. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90500-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90500-2)
- Wang, S., Durrant, W. E., Song, J., Spivey, N. W., & Dong, X. (2010). Arabidopsis BRCA2 and RAD51 proteins are specifically involved in defense gene transcription during plant immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(52), 22716-22721. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1005978107>
- Wang, Y. H. (2008). How effective is T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis? *Journal of Biochemical Technology*, *1*(1), 11-20.
- Wang, Z.-P., Xing, H.-L., Dong, L., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Wang, X.-C., & Chen, Q.-J. (2015). Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation. *Genome biology*, *16*, 1-12.
- WHO. (2016). *Radiation: Ultraviolet (UV) radiation*. World Health Organization. [https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/radiation-ultraviolet-\(uv\)](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/radiation-ultraviolet-(uv))
- Xie, Y., Xu, D., Cui, W., & Shen, W. (2012). Mutation of Arabidopsis HY1 causes UV-C hypersensitivity by impairing carotenoid and flavonoid biosynthesis and the down-regulation of antioxidant defence. *Journal of Experimental Botany*, *63*(10), 3869-3883.
- Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., Wang, X.-C., & Chen, Q.-J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC plant biology*, *14*(1), 1-12.
- Yang, H., Jeffrey, P. D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N. H., Zheng, N., Chen, P. L., Lee, W. H., & Pavletich, N. P. (2002). BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science*, *297*(5588), 1837-1848. <https://doi.org/10.1126/science.297.5588.1837>

- Yang, N., Yan, L., Zheng, Z., Zhang, Y., Zhan, H., Tian, Y., Zhang, T., Li, R., Gong, X., & Xu, M. (2022). Editing gene families by CRISPR/Cas9: accelerating the isolation of multiple transgene-free null mutant combinations with much reduced labor-intensive analysis. *Plant Biotechnology Journal*, 20(2), 241.
- Yao, Y., Danna, C. H., Zemp, F. J., Titov, V., Ciftci, O. N., Przybylski, R., Ausubel, F. M., & Kovalchuk, I. (2011). UV-C-irradiated Arabidopsis and tobacco emit volatiles that trigger genomic instability in neighboring plants. *The Plant Cell*, 23(10), 3842-3852.
- Zhang, B., You, C., Zhang, Y., Zeng, L., Hu, J., Zhao, M., & Chen, X. (2020). Linking key steps of microRNA biogenesis by TREX-2 and the nuclear pore complex in Arabidopsis. *Nature plants*, 6(8), 957-969.
- Zhang, C., Vasmatazis, G., Cornette, J. L., & DeLisi, C. (1997). Determination of atomic desolvation energies from the structures of crystallized proteins. Edited by B. Honig. *Journal of Molecular Biology*, 267(3), 707-726. [https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0859](https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0859)
- Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., Mao, Y., Yang, L., Zhang, H., & Xu, N. (2014). The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6), 797-807.
- Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., & Zhu, J. K. (2022). Abiotic stress responses in plants. *Nat Rev Genet*, 23(2), 104-119. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00413-0>
- Zhang, J. Z. (2003). Overexpression analysis of plant transcription factors. *Current opinion in plant biology*, 6(5), 430-440.
- Zhang, Y., Chang, F.-M., Huang, J., Junco, J. J., Maffi, S. K., Pridgen, H. I., Catano, G., Dang, H., Ding, X., & Yang, F. (2014). DSSylation, a novel protein modification targets proteins induced by oxidative stress, and facilitates their degradation in cells. *Protein & Cell*, 5(2), 124-140.
- Zhao, W., Vaithiyalingam, S., San Filippo, J., Maranon, D. G., Jimenez-Sainz, J., Fontenay, G. V., Kwon, Y., Leung, S. G., Lu, L., Jensen, R. B., Chazin, W. J., Wiese, C., & Sung, P. (2015). Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Mol Cell*, 59(2), 176-187. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.032>

BIOGRAFIJA

Ivana P. Nikolić je rođena 13.06.1992. u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija, je upisala školske godine 2011/2012, a diplomirala je 2015. godine. Na istom fakultetu je završila master akademske studije 2016. godine, modul Molekularna biologija i fiziologija, studijska grupa Genetičko inženjerstvo i biotehnologija. Master rad pod nazivom „Analiza ekspresije gena za protein DSS1 arabidopsisa u uslovima oksidativnog stresa” je uradila u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom dr Gordane Timotijević. Iste godine je odbranila master rad u oktobru 2016. Za ovaj rad dobila je nagradu „Goran Ljubijankić“ za najbolji master rad iz oblasti molekularne biologije u Srbiji. Na istom fakultetu upisuje i doktorske studije školske 2016/2017, studijski program - Molekularna biologija, modul-Molekularna biologija eukariota, pod mentorstvom dr Gordane Timotijević. Od marta 2017. godine je zaposlena u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Učestvovala je na nacionalnom projektu „Molekularni mehanizmi odgovora biljaka na abiotički stres-uloga transkripcionih faktora i malih RNK i analiza genetičkog diverziteta biljnih kultura od interesa za poljoprivredu i biotehnologiju (173005)”. U okviru „Programa saradnje srpske nauke sa dijasporom” je bila učesnik na projektu pod nazivom “*OxInDisPro*”, Fonda za Nauku, Republike Srbije. Tokom ovog projekta je boravila mesec dana na usavršavanju u Sent Luisu, u SAD. Trenutno je učesnica projekta “*GENOVA - Factors of the BRCA2-mediated Homologous Recombination: Uncovering New Players, Their Interplay, and Contribution to Genome Integrity and Stress Response*”, Fonda za Nauku, Republike Srbije. Ivana Nikolić je do sada objavila dva rada M21 kategorije, imala je osam saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i jedno saopštenje na nacionalnom naučnom skupu.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ивана П. Николић

Број индекса М3009/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Функционална карактеризација гена *DSSI(I)* и *DSSI(V)* у одговору *Arabidopsis thaliana* на оксидативни стрес

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 27.06.2023.

ПРИЛОГ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана П. Николић

Број индекса М3009/2016

Студијски програм Молекуларна биологија; модул: Молекуларна биологија еукариота

Наслов рада Функционална карактеризација гена *DSSI(I)* и *DSSI(V)* у одговору *Arabidopsis thaliana* на оксидативни стрес

Ментор др Гордана Тимотијевић, др Светлана Радовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 27.06.2023.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Функционална карактеризација гена *DSSI(I)* и *DSSI(V)* у одговору *Arabidopsis thaliana* на оксидативни стрес

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, , _____ 27.06.2023.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.