

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Antonio Sermek

**Utjecaj razvoja i toplinskog stresa na transkripciju satelitske DNA u
kestenjastom brašнару *Tribolium castaneum* Herbst**

Doktorska disertacija

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacije

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

Utjecaj razvoja i toplinskog stresa na transkripciju satelitske DNA u kestenjastom brašнару *Tribolium castaneum* Herbst

Antonio Sermek

Disertacija je izrađena u: Laboratoriju za evolucijsku genetiku, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mentor/i: prof. dr. sc. Đurđica Ugarković

Kratki sažetak doktorske disertacije:

U ovom istraživanju pokazana je različita dinamika ekspresije glavne i sporedne satelitske DNA tijekom toplinskog stresa i stadija razvoja. Transkripti sporedne satelitske DNA dolaze isključivo u obliku piRNA, dok se transkripti glavne satelitske DNA razlikuju tijekom embriogeneze i mogu biti procesirani kao piRNA u ranijim stadijima, te siRNA u kasnijim. Za razliku od glavne satelitske DNA, kod sporedne ne postoji H3K9me3 biljeg na ponavljajućim regijama.

Broj stranica: 62

Broj slika: 35

Broj tablica: 14

Broj literaturnih navoda: 48

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: satelitska DNA, *Tribolium castaneum*, siRNA, piRNA, toplinski stres, sekvenciranje RNA, sekvenciranje malih RNA

Datum obrane: 26. studenog 2020.

Stručno povjerenstvo za obranu:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.
6. (zamjena)

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

PhD thesis

University of Dubrovnik

Ruđer Bošković Institute

University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of

Molecular biosciences

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

The effect of development and heat stress on satellite DNA transcription in red flour beetle *Tribolium castaneum* Herbst

Antonio Sermek

Thesis performed at: Laboratory of Evolutionary Genetics, Department of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Croatia

Supervisor/s: prof. Đurđica Ugarković, PhD

Short abstract:

We show different dynamics of major and minor satellite DNA transcription after heat stress and during development. Minor satellite transcripts are exclusively processed in piRNA, while major are differently processed during development, in form of piRNA in early development and siRNA in adults and late embryogenesis. Unlike major satellite DNA regions, minor does not show H3K9me3.

Number of pages: 62

Number of figures: 35

Number of tables: 14

Number of references: 48

Original in: croatian

Key words: satellite DNA, *Tribolium castaneum*, siRNA, piRNA, heat stress, RNA sequencing, small RNA sequencing

Date of the thesis defense: 26. November 2020.

Reviewers:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.
- 6.(substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za evolucijsku genetiku, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom prof. dr. sc. Đurđice Ugarković u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Satelitska DNA u genskoj regulaciji i ekološkoj adaptaciji“ (HRZZ-IP-2014-09-3733)

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Modelni kukac <i>Tribolium castaneum</i> | 1 |
| 1.2. Satelitske DNA | 2 |
| 1.3. Satelitske DNA brašnara <i>T. castaneum</i> | 3 |
| 1.4. Male nekodirajuće RNA | 4 |
| 2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA | 5 |
| 2.1. Ciljevi istraživanja | 5 |
| 2.2. Hipoteze istraživanja | 5 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 6 |
| 3.1. Materijali | 6 |
| 3.1.1. Modelni organizam | 6 |
| 3.1.2. Kompleti | 6 |
| 3.1.3. Kemikalije | 7 |
| 3.1.4. Uređaji | 7 |
| 3.1.5. Taqman probe | 8 |
| 3.1.6. Sekvenciranje RNA za uzorke toplinskog stresa | 8 |
| 3.1.7. Sekvenciranje malih RNA za uzorke toplinskog stresa | 8 |
| 3.1.8. Podaci sekvenciranja RNA i malih RNA za stadije razvoja | 9 |
| 3.2. Metode | 10 |
| 3.2.1. Toplinski stres | 10 |
| 3.2.2. Izolacija RNA | 10 |
| 3.2.3. Provjera kvalitete izolirane RNA | 11 |
| 3.2.4. Izolacija malih RNA | 12 |
| 3.2.5. Taqman kvantitativni PCR | 12 |
| 3.2.6. Pretprocesiranje očitavanja sekvenciranja RNA | 13 |
| 3.2.7. Pretprocesiranje očitavanja sekvenciranja malih RNA | 13 |
| 3.2.8. Mapiranje RNA na satelitske DNA | 14 |
| 3.2.9. Kallisto pseudoporavnanje | 14 |
| 3.2.10. Mapiranje malih RNA na satelitske DNA | 14 |
| 3.2.11. Ekstrakcija kromatina i kromatinska imunoprecipitacija | 15 |

| | |
|--|-----------|
| 4. Rezultati | 16 |
| 4.1. Sekvenciranje RNA i transkripcija satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2 u uvjetima toplinskog stresa | 16 |
| 4.2. Transkripcija satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2 tijekom razvoja | 25 |
| 4.3. Rezultati sekvenciranja malih RNA u uvjetima toplinskog stresa | 28 |
| 4.3.1. Duljina transkripata satelitske DNA kod uvjeta toplinskog stresa | 28 |
| 4.3.2. Nukleotidni motivi malih RNA u uvjetima toplinskog stresa | 33 |
| 4.3.3. Specifičnost transkripcije DNA lancu..... | 35 |
| 4.3.4. Mjesta nastanka transkripata na satelitskoj DNA kod toplinskog stresa | 37 |
| 4.4. Rezultati sekvenciranja malih RNA tijekom razvoja | 39 |
| 4.4.1. Duljina transkripata satelitske DNA tijekom razvoja | 39 |
| 4.4.2. Nukleotidni motivi malih RNA tijekom razvoja | 44 |
| 4.4.4. Mjesta nastanka transkripata na satelitskoj DNA tijekom razvoja | 48 |
| 4.5. Taqman kvantitativni PCR..... | 49 |
| 4.6. Rezultati kromatinske imunoprecipitacije..... | 50 |
| 5. RASPRAVA | 51 |
| 6. ZAKLJUČAK | 54 |
| 7. LITERATURA..... | 55 |
| 8. SAŽETAK..... | 59 |
| 9. SUMMARY..... | 60 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 61 |

1. UVOD

1.1. Modelni kukac *Tribolium castaneum*

Kestenjasti brašnar *Tribolium castaneum* pripada najbrojnijem redu eukariota, kornjašima (Coleoptera), porodici crnokrilci (Tenebrionidae) (Brown i sur., 2003). Smatra se globalnom štetnočinom u poljoprivrednoj industriji uzrokujući milijarde dolara gubitaka na uskladištenim žitaricama. Razvojni ciklus mu se sastoji od 4 stadija: jaje, ličinka, kukuljica i odrasla jedinka te kod njega dolazi do potpune metamorfoze (holometabolija). Trajanje pojedinog stadija ovisno je o temperaturi (Howe, 1956). Genom mu se sastoji od diploidnog broja kromosoma ($2n=20$) (Goodman i sur., 2012). Od mušice *Drosophila melanogaster* je evolucijski odvojen prije približno 300 milijuna godina (Savard i sur., 2006).

Iako je mušica *D. melanogaster* najčešći modelni organizam, u novije vrijeme brašnar *T. castaneum* postaje sve popularniji jer za razliku od mušice *D. melanogaster*, brašnar *T. castaneum* ima „short germ“ embriogenezu koja je tipična za evolucijski mlađe vrste, dok mušica *D. melanogaster* ima „long germ“ (Ansari i sur., 2018, David i Patel 2002).

Karakteristike dobrog modelnog organizma dijeli s mušicom *D. melanogaster* kao što su lakoća uzgoja, visoka plodnost, veličina legla, kratko vrijeme generacije te laka genetska istraživanja. Najveći potencijal za genetičke analize je pokazan kroz mehanizam interferencije RNA (Tomoyasu i sur., 2004, Bucher i sur., 2002). Kao model se koristi i u istraživanju razvoja insekata, populacijskoj genetici te komparativnoj genomici (Pavlek i sur., 2015).

Genom mu je sekvenciran 2008. godine što je uvelike doprinijelo njegovom sve boljem istraživanju. To je ujedno i prvi sekvencirani genom kornjaša. Podaci sekvenciranja pružaju korisne informacije o identifikaciji i funkciji gena kao i pronalazak ortologa u drugim vrstama. 20 % genoma nije uključeno zbog ponavljajućih regija koje pripadaju heterokromatinu (Richards i sur., 2008, Herndon 2020).

1.2. Satelitske DNA

Genomi eukariotskih organizama sadrže veliki udio nekodirajućih sljedova. Veliki udio u tim nekodirajućim sljedovima dolazi u obliku ponavljajućih DNA sljedova, raspršenih (transpozoni, retrotranspozoni) ili organiziranih kao uzastopna ponavljanja (rRNA, satelitske DNA, telomerna DNA, centromerna DNA) (Plohl, 2010).

Satelitske DNA su otkrivene centrifuriranjem u gradijentu gustoće cezijeovog klorida tako što su se odvojile od ostatka genomske DNA kao sekundarna (satelitska) vrpca pa otuda i naziv (Schweber, 1974). Primarno su smještene u centromernim, pericentromernim i telomernim regijama kromosoma (Charlesworth, 1994). Sastoje se od dugačkih nizova uzastopno ponovljenih monomera u orijentaciji glava rep. Susjedni monomeri mogu formirati novu jedinicu ponavljanja koju zovemo jedinicom organizacije višeg reda (eng. *High order repeat*, *HOR*). Najbolje opisana organizacija višeg reda je ona karakteristična za α -satelitsku DNA primata koja se temelji na jedinici ponavljanja duljine 171 pb (Koga i sur., 2014).

Sudjeluju u formaciji heterokromatina i centromera, te se mogu ponašati kao regulacijski elementi genske ekspresije (Felicello i sur., 2015). Njihova transkripcija je dokazana u kralješnjacima, beskralješnjacima te biljkama. Transkripcija satelitskih DNA varira tijekom staničnog ciklusa, tijekom razvoja, diferencijacije te je povezana sa različitim tipovima stresnih uvjeta (Pezer i Ugarković 2012, Biscotti i sur., 2015). . U jednom vrsti može postojati i više satelitskih DNA, međutim uvijek dominiraju jedna ili dvije. Grašak *Pisum sativum* ima 15 različitih satelitskih DNA (Macas i sur., 2007), 62 satelitske DNA u skakavcu *Logusta migratoria* ili primjerice 9 satelitskih DNA u genomu čovjeka (Levy i sur., 2007; Miga i sur., 2015).

Udio satelitskih DNA varira u životinjskom carstvu gdje može biti od 0,1 % pa do 50 %. Također, satelitske DNA doprinose veličini genome pa tako bliske vrste mogu imati veliku razliku u veličini genoma (Hribova i sur., 2010, Ambrozova i sur., 2011). Srodne vrste mogu imati velike razlike u udjelu satelitskih DNA u genomu. Kod mušice *D. melanogaster* satelitske DNA zauzimaju 20 % dok kod mušice *D. virilis* oko 50 % (Wei i sur., 2014).

Otkrićem sekvenciranja nove generacije uvelike je promijenilo pristup istraživanju ponavljajućih sljedova. Za proučavanje i otkrivanje novih satelitskih DNA nije potrebno imati genom određene vrste jer postoje mnogi programi koji mogu *de novo* identificirati ponavljajuće DNA sljedove (Repeat Explorer) (Novak i sur., 2010).

Satelitske DNA insekata u najvećoj mjeri spadaju u dvije skupine prema duljini ponavljajućeg monomera: 140-190 pb i 300-400 pb (King i Cummings, 1997).

1.3. Satelitske DNA brašnara *T. castaneum*

Vrste roda *Tribolium* imaju specifične profile satelitskih DNA: u svakoj vrsti detektirana je jedan visoko zastupljeni slijed te satelitske DNA ne pokazuju sličnosti u slijedu osim strukturnih značajki u obliku stabilnih struktura ukosnice i blokova bogatih A+T (Ugarković i sur., 1996).

Glavna satelitska DNA brašnara *T. castaneum*, TCAST1, sastoji se od ponavljajućih monomera duljine 360 pb te je smještena u centromernim i pericentromernim regijama svih kromosoma i dijeli većinu značajki ostalim satelitskim DNA roda *Tribolium* (Feliciello i sur., 2011). Sastoji se od podobitelji TCAST1a i TCAST1b, sadrži veliki udio A+T (73 %) , nema značajnu unutarnju strukturu te je transkribirana u svim stadijima razvoja (Pezer i Ugarković, 2011, Brajković i sur., 2014).

Sporedna satelitska DNA, TCAST2, sastoji se od ponavljajućih monomera duljine 359 pb i izgrađuje oko 1 % genomske DNA. Sastoji se od 3 podobitelji, TCAST2a, TCAST2b i TCAST2c koje se razlikuju po duljini monomera, razmještaju u genomu te pokazuju specifične mutacije za pojedinu podobitelj. Među različim sojevima brašnara različito su umnožene što podupire hipotezu da satelitske DNA doprinose genomskoj različitosti na populacijskom nivou (Feliciello i sur., 2014). Osim u heterokromatinu, i TCAST1 i TCAST2 nalaze se raspršene u eukromatinu u blizini gena što upućuje na njihovu ulogu u regulaciji gena (Feliciello i sur., 2015, Ugarković, 2005).

Uz TCAST1 i TCAST2, opisano je još 8 TCAST obitelji satelitske DNA, koje se također osim u heterokromatinu, nalaze i kao raspršene u eukromatinu (Brajković i sur., 2018).

1.4. Male nekodirajuće RNA

Još od otkrića prvih malih nekodirajućih RNA 1993. godine (Lee i sur., 1993), nađen je velik broj različitih nekodirajućih RNA uključujući mirko RNA (miRNA), male interferirajuće RNA (siRNA) i Piwi-vezujuće RNA (piRNA). Razlikuju se u biogenezi, načinu ciljne regulacije te biološkom putu koji reguliraju. Usprkos razlikama, putevi malih RNA se isprepliću i surađuju u regulaciji gena te štite genom od unutarnjih i vanjskih štetnih utjecaja.

Njihova glavna značajka je duljina (20-30 nt) te njihova povezanost s proteinskom obitelji argonaut (Ago) koji ih vodi do regulatornih meta što najčešće rezultira smanjenom ekspresijom krajnjih gena (Ghildiyal i sur., 2009; Kim i sur., 2009).

siRNA i piRNA su uključene u modifikaciju kromatina kroz navođenje heterokromatinskih biljega H3K9me3 na homologne regije genoma što vodi do transkripcijskog utišavanja (Le Thomas i sur., 2013, Castel i Martiensen 2013). siRNA su male RNA duljine 21–22 nt, dolaze od ponavljajući sljedova, posebice satelitskih DNA, i imaju ulogu u formaciji heterokromatina što je prvi put pokazano u kvascu *Scizosaccharomyces pombe*, biljkama i insektima (Volpe 2001, Zakrzewski 2011). piRNA su male RNA duljine 26-30 nt i najčešće potječu od transpozona i njihova uloga je u utišavanju istih (Huang i sur., 2012). piRNA su transkribirane u životinjskim spolnim stanicama i kao primarni cilj im je zaštititi i očuvati genom, ali su prisutne i u somatskim stanicama mnogih člankonožaca (Lewis i sur., 2018). Proces nastanka siRNA i miRNA iz prekursora zahtijeva rezanje endonukleazom Dicer prije nego stvore kompleks s proteinom iz obitelji argonaut. piRNA nastaju u procesu koji je neovisan o Dicer mehanizmu.

Tijekom toplinskog stresa dugi primarni transkripti se procesiraju u molekule siRNA čije povećanje prate epigenetski biljezi H3K9me2 i H3K9me3 u heterokromatinu što ukazuje na ulogu TCAST1 povezanih siRNA u modulaciji strukture heterokromatina (Pezer i Ugarković, 2012, Feliciello i sur., 2015).

Studije malih RNA kod testisa i ranih embrija mušice *D. melanogaster* pokazuju nakupljanje malih RNA duljine 23-29 nukleotida koje potječu od ponavljajućih regija (Aravin i sur., 2003).

Genomsko mapiranje piRNA nastalih iz transpozona u brašnaru *T. castaneum* pokazuje njihovo preklapanje sa eukromatinskim klasterima ponavljajućih sljedova (Ninova i sur., 2017). U brašnaru *T. castaneum* postoje dva homologa Piwi proteinske obitelji, Tc-Piwi i Tc-Ago3 (Tomoyasu i sur., 2008).

Mnogi piRNA klasteri kao i glavna i sporedna satelitska DNA brašnara *T. castaneum* pronađeni su u nesklopljenom dijelu genoma što upućuje njihovu lokalizaciju u heterokromatinu (Pavlek i sur., 2015, Wang i sur., 2008).

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

Primarni cilj je odrediti razliku u transkripciji glavne i sporedne satelitske DNA brašnara *T. castaneum* kao i njihovih transkripata nakon toplinskog stresa te tijekom različitih stadija razvoja.

Ciljevi uključuju:

1. Odrediti transkripciju satelitskih DNA bioinformatičkom analizom sekvencirane RNA
2. Identificirati transkripte satelitskih DNA, njihovu duljinu, nukleotidni slijed te specifičnost transkripcije pojedinom lancu iz podatka sekvenciranja malih RNA
3. Taqman probama eksperimentalno pratiti pojedine transkripte u različitim uvjetima toplinskog stresa
4. Eksperimentalno istražiti epigenetske biljege na satelitskim DNA sljedovima

2.2. Hipoteze istraživanja

U istraživanje krećemo s pretpostavkama da se nakon toplinskog stresa kao i tijekom razvoja transkripcija glavne i sporedne satelitske DNA mijenja. Očekujemo da se transkripti satelitskih DNA procesiraju u obliku malih molekula RNA. Pretpostavljamo da male RNA koje potječu od glavne i sporedne satelitske DNA pripadaju različitim kategorijama malih RNA te da se neke od njih nasljeđuju. Očekujemo više transkripata satelitskih DNA nakon toplinskog stresa te jednako tako i povećanje represivnih epigenetskih biljega na satelitskim regijama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Modelni organizam

U ovom istraživanju je korišten brašnar *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797.), laboratorijski soj GA2 koji je originalno korišten u projektu sekvenciranja genoma, a proizlazi iz soja divljeg tipa prikupljenog 1982. u Georgii u SAD-u. Brašnari su uzgajani u mračnom inkubatoru pri temperaturi od 25 °C i relativnoj vlažnosti 70 % na standardnom mediju brašno:kvasac (20:1).

3.1.2. Kompleti

U tablici 1. naveden je popis kompleta i njihova upotreba u ovom istraživanju.

Tablica 1. Popis komercijalnih kompleta koji su korišteni u istraživanju.

| Naziv kompleta | Upotreba | Proizvođač |
|---|--|--------------------|
| RNeasy Plus Mini Kit | Izolacija RNA | Qiagen |
| mirVana miRNA Isolation Kit | Izolacija ukupne RNA | Invitrogen |
| Qubit RNA BR Assay Kit | Određivanje koncentracije RNA | Invitrogen |
| Qubit microRNA Assay Kit | Određivanje koncentracije malih RNA | Invitrogen |
| TURBO DNA-free Kit | Uklanjanje genomske DNA | Invitrogen |
| TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit | Određivanje količine specifičnih malih RNA | Applied biosystems |

3.1.3. Kemikalije

U tablici 2. navedene su kemikalije i reagensi koji su korišteni u istraživanju.

Tablica 2. Popis kemikalija koje su korištene u istraživanju.

| Kemikalije | Proizvođač |
|--|--------------------------|
| Destilirana voda | AccuGene |
| Custom TaqMan Small RNA Assays | ThermoScientific |
| TaqMan Fast Advanced Master Mix | Invitrogen |
| Power SYBR Green PCR Master mix | Applied biosystems |
| Formaldehid | Sigma Aldrich |
| Etanol | Kemika |
| Triton X-100 | Sigma Aldrich |
| EDTA | Sigma Aldrich |
| Dynabeads Protein A | Invitrogen |
| IgG | Santa Cruz Biotechnology |
| Kloroform | Sigma Aldrich |
| Fenol:kloroform:izoamil alkokohol(25:24:1) | Sigma Aldrich |

3.1.4. Uređaji

U tablici 3. naveden je popis uređaja koji su korišteni u ovom istraživanju.

Tablica 3. Popis uređaja koji su korišteni u istraživanju.

| Uređaj | Proizvođač |
|---------------------------|--------------------|
| Qubit 1.0 | Invitrogen |
| Agilent Bioanalyzer 2100 | Agilent |
| 7300 Real Time PCR System | Applied Biosystems |
| Qubit 3.0 | Invitrogen |
| Centrifuge 5417R | Eppendorf |
| TissueRuptor | Qiagen |
| Termoblok | Biometra |

3.1.5. Taqman probe

Taqman probe naručene su preko stranice Thermo Fisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/order/custom-genomic-products/tools/small-rna/>).

Nukleotidni sljedovi najzastupljenijih mali RNA, koji su dobiveni iz podataka sekvenciranja malih RNA, unesu se u tražena polja i program vrati podatak o mogućnosti sinteze takve probe. Naručene su dvije probe za siRNA, jedna proba za piRNA te jedna proba za kontrolu (tRNALys).

Tablica 4. Nukleotidni sljedovi Taqman proba koje su se koristile u ovom istraživanju.

| Ime probe | Nukleotidni slijed |
|-----------|--|
| tRNALys | GCCCGGGUAGCUCAGUCGGUAGAGCAUUGGACUUU AAUCCAAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGCUCGGGCG |
| siRNA2 | CUUGUAGGACCAACCAUAAGC |
| siRNA5 | CAUAAGCGAGUUAUAGAGUUG |
| piRNA | UAAAUCGGACGAUUUAUUUCACGAGUGG |

3.1.6. Sekvenciranje RNA za uzorke toplinskog stresa

Priprema knjižnice i sekvenciranje uzoraka RNA napravljeno je u servisu za sekvenciranje GeneCore (EMBL, Heidelberg). Barkodirane mRNA knjižnice pripremljene su od ukupno 6 uzoraka RNA visoke kvalitete (500 ng po uzorku) kompletno Illumina TruSeq RNA Sample v2 kit prema uputama proizvođača. Pripremljene knjižnice prošle su test kvalitete i sekvencirane na uređaju Illumina NextSeq 500. Sekvenciranje je bilo s oba kraja s duljinom očitavanja od 75 pb te je po uzorku nastalo približno 90 milijuna očitavanja.

3.1.7. Sekvenciranje malih RNA za uzorke toplinskog stresa

Priprema knjižnice i sekvenciranje uzoraka RNA napravljeno je u servisu za sekvenciranje GeneCore (EMBL, Heidelberg). Knjižnice su pripremljene za 6 uzoraka kompletno NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set prema uputama proizvođača. U pripremanje knjižnice krenuto je s 450 ng uzoraka s 13 ciklusa umnažanja PCR-om. Pripremljene knjižnice prošle su test kvalitete i sekvencirane su na uređaju Illumina HiSeq2500. Sekvenciranje je bilo s jednog kraja s duljinom očitavanja od 50 pb.

3.1.8. Podaci sekvenciranja RNA i malih RNA za stadije razvoja

Koristili smo javno dostupno podatke sekvenciranja RNA i malih RNA za stadije razvoja brašnara *T. castaneum*. Pristupni broj u bazi NCBI za podatke sekvenciranja RNA i malih RNA je GSE63770.

3.2. Metode

3.2.1. Toplinski stres

Za utvrđivanje utjecaja temperature na transkripciju satelitske DNA brašnari su bili podvrgnuti toplinskom stresu. Toplinski stres provodio se pri temperaturi od 40 °C u trajanju od 24 sata. Nakon toplinskog stresa brašnari su bili podvrgnuti oporavku od stresa u unaprijed određenim vremenskim intervalima. Kontrole su bile brašnari koji nisu bili podvrgnuti temperaturnom stresu.

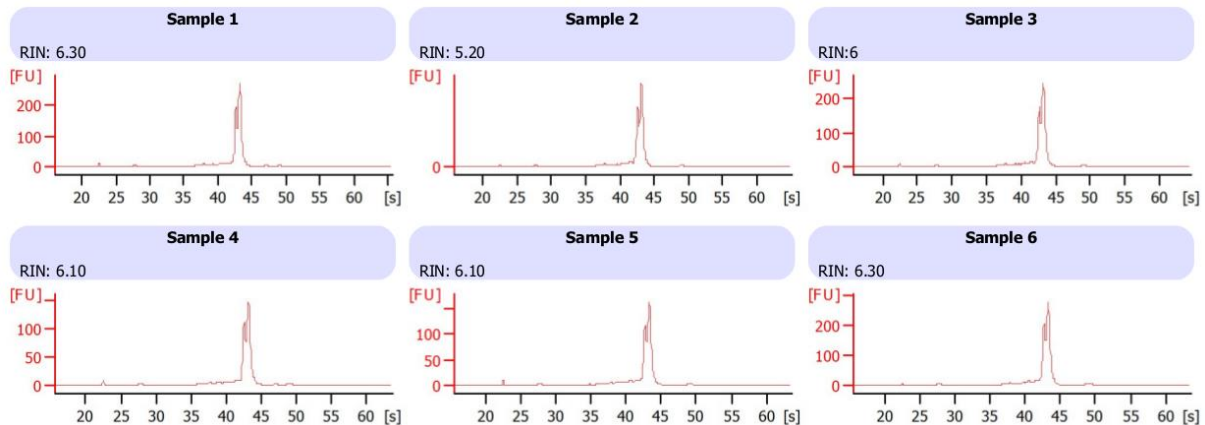
3.2.2. Izolacija RNA

Za potrebe sekvenciranja nove generacije izolirana je RNA iz brašnara koji su bili podvrgnuti toplinskom stresu te brašnara koji služe kao kontrole. Imali smo dvije točke oporavka od toplinskog stresa, 30 i 60 minuta. Svaki eksperiment je proveden u dvije biološke replike.

RNA je iz populacije brašnara izolirana pomoću kompleta „RNeasy Plus Mini Kit“ prema uputama proizvođača. Korišteno je 15 brašnara po biološkom replikatu. Nakon smrzavanja u tekućem dušiku, brašnari su pomoću rotor-stator homogenizatora homogenizirani u 600 µL pufera RLT u koji je dodan β-merkaptotanol. Nehomogenizirano tkivo odvojeno je centrifugiranjem 3 minute na 12000 o/min. Zatim se 500 µL supernatanta prebaci u čistu epruvetu, doda 1 volumen 70 % etanola i pomiješa vorteksiranjem. Nakon toga se 700 µL uzorka prebaci na RNeasy kolonu te se centrifugira 15 sekundi na 10000 o/min. Odstrani se dio koji je prošao kroz kolonu. Membrana na koloni je isprana s 700 µL pufera RW1 te se centrifugira 15 sekundi na 10000 o/min. Zatim je membrana 2 puta isprana s po 500 µL pufera RPE i centrifugira 15 sekundi i 2 minute na 10000 o/min. Na kraju je kolona stavljena u novu i čistu 1,5 mL epruvetu za sakupljanje. Direktno na membranu je bilo dodano 50 µL vode bez RNaza i centrifugiralo se 1 minutu na 10000 o/min. Eluati RNA podijeljeni su u alikvote po 25 µL te su čuvani na -80 °C do upotrebe.

3.2.3. Provjera kvalitete izolirane RNA

Kvaliteta izoliranih RNA bila je provjerena pomoću uređaja Bioanalyzer 2100, a rezultat istih je prikazan na slici 1.



Slika 1. Rezultat kvalitete RNA dobiven na uređaju Agilent Bioanalyzer 2100. Na slikama je moguće vidjeti 2 pika koja su slabo razlučena između 40 i 45 sekundi.

Izolirane molekule RNA dobre su kvalitete i koncentracije (tablica 5.) te spremne za sekvenciranje nove generacije. Za analizu transkriptomskih podataka eukariota potrebni su RIN (eng. *RNA Integrity Number*) brojevi od 8 i veći. RIN brojevima, između ostalog, doprinose i pikovi rRNA. Kod insekata se elektroforezni profili značajno razlikuju od ostalih eukariota jer kod podjedinica rRNA 28S kod većine insekata tijekom denaturacije dolazi do unutarnjeg razdvajanja 28S na dvije podjedinice, 28S α i 28S β . Novonastale podjedinice su sličnih veličina i elektroforezom putuju bliže 18S podjedinici (Winnebeck i sur., 2010). Profil kao što je dobiven na slici ne odgovara degradiranosti molekule RNA već normalnom elektrogramu kod insekata.

Tablica 5. Koncentracije molekula RNA u uzorcima kontrola i nakon toplinskog stresa.

| uzorak | Koncentracija ng/ μ L |
|---------------|---------------------------|
| Kontrola rep1 | 682 |
| Kontrola rep2 | 392 |
| 30 min rep1 | 902 |
| 30 min rep2 | 300 |
| 1 h rep1 | 806 |
| 1h rep2 | 444 |

3.2.4. Izolacija malih RNA

Za potrebe sekvenciranja nove generacije malih RNA izolirana je ukupna RNA iz brašnara koji su bili podvrgnuti toplinskom stresu te brašnara koji služe kao kontrole. Oporavak od toplinskog stresa je trajao 60 minuta. Svaki eksperiment je proveden u tri biološke replike.

Za izolaciju ukupne RNA korišten je „mirVan miRNA Isolation Kit“ prema uputama proizvođača. Korišteno je 20 brašnara po biološkom replikatu. Nakon smrzavanja u tekućem dušiku, brašnari su homogenizirani rotor-stator homogenizatorom u 300 ml Lysis/Binding Buffer puferu.

Smjesa se vorteksira dok otopina ne postane homogena. Doda se 1/10 volumena miRNA homogenat aditiva (30 ml), vorteksira i ostavi na ledu 10 min. Doda se 300 ml kisele otopine fenol:kloroform, vorteksira 60 s i centrifugira 5 min na maksimalnoj brzini kako bi se odvojile vodena i organska faza. Vodena faza se otpipetira u novu Eppendorf epruvetu od 2 ml te joj se doda 1,25 volumen 100 %-tnog etanola. Smjesa se vorteksira nakon čega se prebaci maksimalno 700 ml te smjese na Filter Catridge kolonu i centrifugira 15 s pri 10000 g. Odbaci se nevezana frakcija. Kolona se ispere sa 700 ml miRNA otopine za ispiranje 1 i centrifugiranjem 10 s pri 10000 g. Ispere se još dva puta s po 500 ml miRNA otopine za ispiranje 2/3 i centrifugiranjem 10 s pri 10000 g. Kako bi se kolona osušila, centrifugira se još 2 min pri maksimalnoj brzini. Kolona se prebaci u čistu tubicu za sakupljanje i doda joj se 100 ml otopine za eluiranje koja je prethodno zagrijana na 95 °C. Centrifugira se 30 s pri maksimalnoj brzini čime se RNA eluira s kolone. Prosječna masa izolirane RNA iz 20 jedinki brašnara iznosi 50 mg.

3.2.5. Taqman kvantitativni PCR

Za reverznu transkripciju i kvantitativni PCR malih molekula RNA korišten je „TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit“ prema uputama proizvođača. Male RNA su duljine 20-30 nt i nije ih moguće umnožiti standarnim qPCR metodama. Za male RNA su potrebne posebne početnice s ukosnicom (eng. *stem loop*) na koje se sljepljuju male RNA nakon čega se reverznom transkriptazom sintetizira cDNA koja je optimalne duljine (oko 60 nt).

Taqman probe koje su naručene na Thermo Fisher-ovoj stranici dolaze u paketu s početnicama s ukosnicom.

Najprije se pripremi reakcijska smjesa za reverznu transkripciju koja sadrži 0,15 ml 100 mmol dm⁻³ otopine dNTP; 1,00 ml 50 U ml⁻¹ MultiScribe reverzne transkriptaze; 1,50 ml 10X pufera za reverznu transkripciju; 0,19 ml 20 U ml⁻¹ inhibitora RNaze i 4,16 ml vode bez nukleaza po uzorku. RT reakcijskoj smjesi ukupnog volumena 7 ml u epici za PCR se doda 5 ml ukupne RNA. Masa ukupne RNA približno je jednaka 10 ng. Smjesa se vorteksira i kratko centrifugira,

nakon čega joj se doda 3 ml RT početnica (početnica s ukosnicom) specifičnih slijedu koji se želi umnožiti. Program za transkripciju je sljedeći: 30 minuta na temperaturi 16 °C, 30 minuta na temperaturi 42 °C, 5 minuta na temperaturi 85 °C.

Koncentracija dobivene komplementarne DNA (cDNA) određena je Qubit 1.0 fluorimetrom (Invitrogen) i u prosjeku iznosi 3 ng/ml. Takva cDNA se može čuvati pri temperaturama od -25 °C do -15 °C najdulje tjedan dana.

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

3.2.6. Pretprocesiranje očitavanja sekvenciranja RNA

Podaci koje servis šalje korisniku su ne procesirani, tj. dolaze direktno iz uređaja za sekvenciranje. Među takvim podacima nalaze se i očitavanja koja su lošije kvalitete, očitavanja koja sadrže adaptore, očitavanja koja nisu optimalne duljine te visoko ponavljajući sljedovi. Provjera kvalitete sekvenciranih podataka napravljena je u programu FastQC i provjerena je i prije i nakon procesiranja. Jedan od parametara koje možemo vidjeti u FastQC programu su i Phred vrijednosti. Phred vrijednost je definirana kao $-10\log_{10}P$, gdje P označava vjerojatnost da je baza očitavanja na tom mjestu pogrešna. Primjerice Phred vrijednost 10 nam govori da postoji vjerojatnost 1 od 100 da je baza pogrešna, dok vrijednost 60 govori da je vjerojatnost 1 od 1000000 da je baza pogrešna. Uklanjanje adaptera i loših očitavanja napravljeno je programu cutadapt sa zadanim parametrima. Zadržana su očitavanja kod kojih su Phred vrijednosti veće ili jednake 20.

3.2.7. Pretprocesiranje očitavanja sekvenciranja malih RNA

Provjera kvalitete sekvenciranih podataka napravljena je u programu FastQC i provjerena je i prije i nakon procesiranja. Uklanjanje adaptera i loših očitavanja napravljeno je programu cutadapt sa zadanim parametrima osim što su zadržana samo očitavanja koja su imala adapter. U programu BBDuk uklonjena su sva očitavanja osim onih duljine 17-36 nukleotida. Zadržana su očitavanja kod kojih su Phred vrijednosti veće ili jednake 20.

3.2.8. Mapiranje RNA na satelitske DNA

Očitavanja smo mapirati na dimer satelitske DNA. Mapiranje očitavanja na satelitske DNA napravljeno je u programu bowtie2. Svi parametri su bili zadani osim opcije o očitavanjima koja mogu biti smještena na 2 ili više mjesta u genomu te broju pogrešno sparenih baza (-m 1). S obzirom da poravnavamo na dimer satelitske DNA, očekujemo da će 1 očitavanje biti moguće smjestiti na 2 mjesta te ćemo odabrati parametar -a.

3.2.9. Kallisto pseudoporavnanje

Kada se poravnava s programom kallisto nas ne zanima točno poravnanje između očitavanja i genoma nego samo mjesto s kojeg dolazi. Vremenski je puno brži od klasičnih poravnavanja na genom. Kao rezultat daje broj očitavanja i transkripata na milijun. Kao ulazni podatak za kallisto nije genom nego set transkripata u koji smo dodali dimere satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2.

3.2.10. Mapiranje malih RNA na satelitske DNA

Očitavanja malih RNA mapirati ćemo na dimer satelitske DNA programom bowtie2. Iako se za kraća očitavanja češće koristi bowtie, usporedbom rezultata bowtie i bowtie2 nije bilo značajne razlike. Koristili smo zadane bowtie2 parametre osim što je uključen parametar -a i parametar -m 1.

Prije samog poravnavanja na satelitske DNA potrebno je iz ukupnih očitavanja maknuti ona koja bi nam mogla smeta u daljnjoj analizi. Nama su zanimljive male interferirajuće RNA (siRNA) i Piwi-vezujuće RNA (piRNA). Ostale male RNA (miRNA, Rnase R RNA, snRNA, tRNA, rRNA,...) u prvom koraku moramo ukloniti. Uklonit ćemo ih tako da očitavanja poravnamo sa ostalim malim RNA i zadržimo samo ona koja se nisu poravnala. U tu svrhu smo koristili bowtie2 sa zadanim parametrima.

3.2.11. Ekstrakcija kromatina i kromatinska imunoprecipitacija

U ekstrakciju kromatina krenulo se s 15 brašnara koji su bili smrznuti u tekućem dušiku te smrvljeni u izolacijskom puferu. Nakon dodatka formaldehida (1 %), smjesa se inkubirala na sobnoj temperaturi 30 min i nakon toga se dodao glicin u finalnoj koncentraciji od $0,136 \text{ mol dm}^{-3}$. Nakon cetrifugiranja 5 min na 5000 o/min na talog se doda 600 μL nuklearnog pufera za lizu. Smjesa se sonicira 6 puta po 20 sekundi s razmakom između sonikacije od 30 sekundi. Nakon sonikacije se centrifugira na 12000 o/min na 4°C 3 minute i supernatant se premjesti u novu tubicu.

Kromatin se razrijedi 10 puta u ChIP puferu za razrjeđenje. Kao input se uzme 10 % te razrijeđene otopine. Ostatak se raspodijeli prema potrebi broju antitijelima koja ćemo koristiti, u našem slučaju H3K9me3, H3K9ac te IgG. Frakcije se inkubiraju preko noći na 4°C s 2 μL antitijelima te 40 μL kuglica Dynabeads Protein A.

Kuglice se isperu 6 puta s ChIP puferom za razrjeđenje. Za taj korak koristili smo magnete. Za ispiranje kompleksa s kuglica koristio se pufer za eluiranje. Elucija je trajala preko noći na 65°C .

Izolacija DNA napravljena je fenol:kloroform:izoamil alkohol (25:24:1) izolacijom. Doda se 450 μL fenol:kloroform_izoamil alkohola inputu i eluiranoj frakciji. Vorteksira se 5 minuta te centrifugira 5 minuta na 13000 o/min. Cijeli postupak se ponovi još jednom, vodena faza se odvoji u novu tubicu. U sljedećem koraku se za pročišćavanje koristi kloroform. Doda se 450 μL , vorteksira 5 minuta te centrifugira na 5 minuta na 13000 o/min.

Vodena faza se odvoji, dodaju se 3 volumena čistog etanola, 0,1 volumen natrijevo acetata i 1 μL glikogena (29 μg). Inkubira se preko noći na -20°C , centrifugira 10 minuta na 4°C i 14000 o/min. Talog se ispere s 70 %-tnim etanolom. Centrifugira se na 5 min na 14000 o/min. Talog se resuspendira u 20 μL vode.

DNA iz zadnjeg koraka koristi se dalje u kvantitativnom PCR-u.

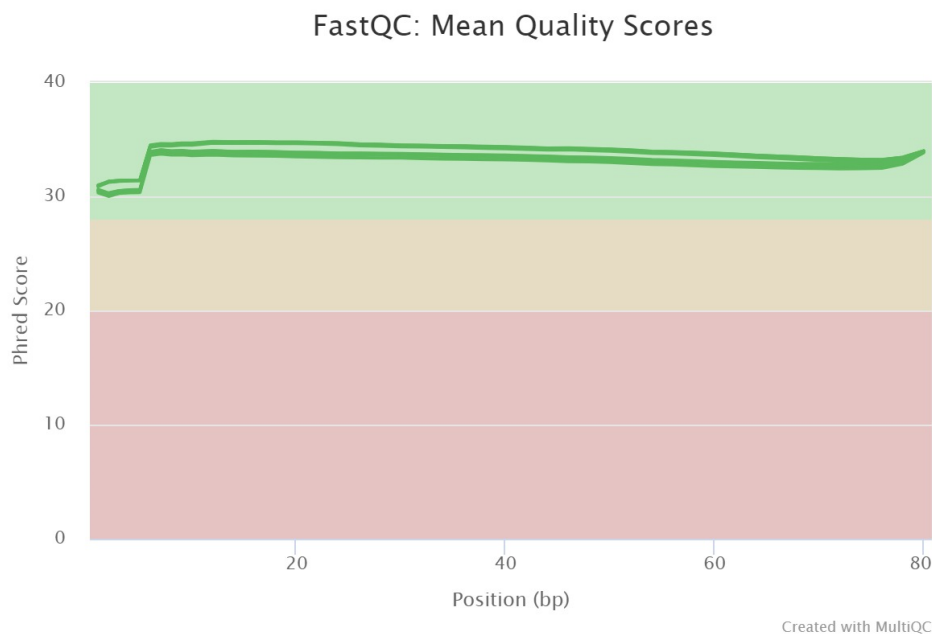
4. Rezultati

4.1. Sekvenciranje RNA i transkripcija satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2 u uvjetima toplinskog stresa

Rezultati sekvenciranja 6 uzoraka RNA, odnosno broj očitavanja prije i nakon procesiranja (opisanog u Materijalima i metodama) naveden je u tablici 6. Također je provjerena kvaliteta očitavanja svih uzoraka prema Phred vrijednostima (slika 2). Prema tablici 6. i slici 2. možemo zaključiti da su nakon procesiranja očitavanja visoke kvalitete te je ovaj set podataka pogodan za transkriptomsku analizu.

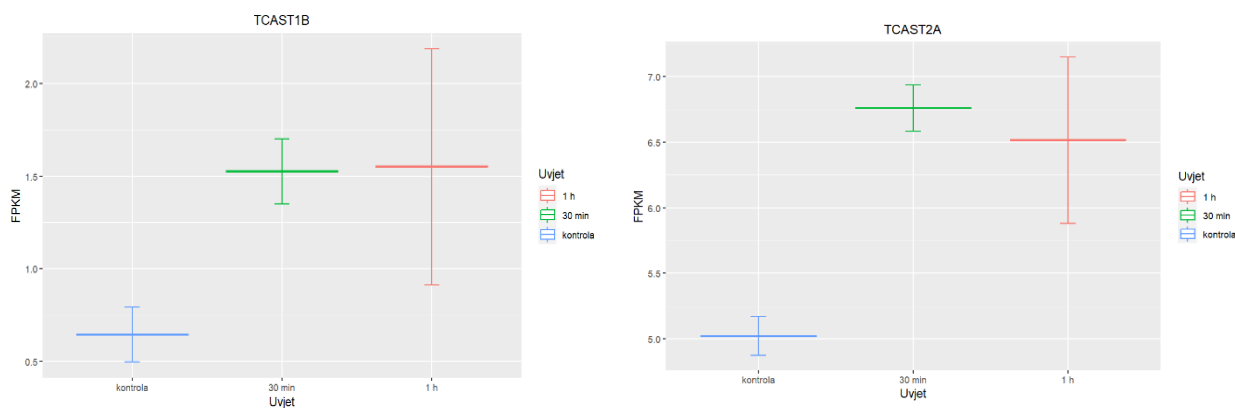
Tablica 6. Karakteristike očitavanja za 6 uzoraka RNA: kontrolne uzorke i uzorke nakon toplinskog stresa.

| tretman | Početan broj očitavanja | Broj očitavanja nakon procesiranja | Vrsta knjižnice | Duljina očitavanja |
|---------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------|--------------------|
| Kontrola rep1 | 107282650 | 104688564 | Paired-end | 2x76 pb |
| Kontrola rep2 | 97494332 | 96076930 | Paired-end | 2x76 pb |
| 30 min rep1 | 97270518 | 96154265 | Paired-end | 2x76 pb |
| 30 min rep2 | 98132846 | 96195348 | Paired-end | 2x76 pb |
| 1 h rep1 | 84604856 | 81845918 | Paired-end | 2x76 pb |
| 1 h rep2 | 88329012 | 86915053 | Paired-end | 2x76 pb |



Slika 2. Kvaliteta očitavanja svih uzoraka prema Phred vrijednostima. Očitavanja za sve uzorke imaju Phred vrijednost veću od 30 što znači da je vjerojatnost krive baze u očitavanju 1 na 10000.

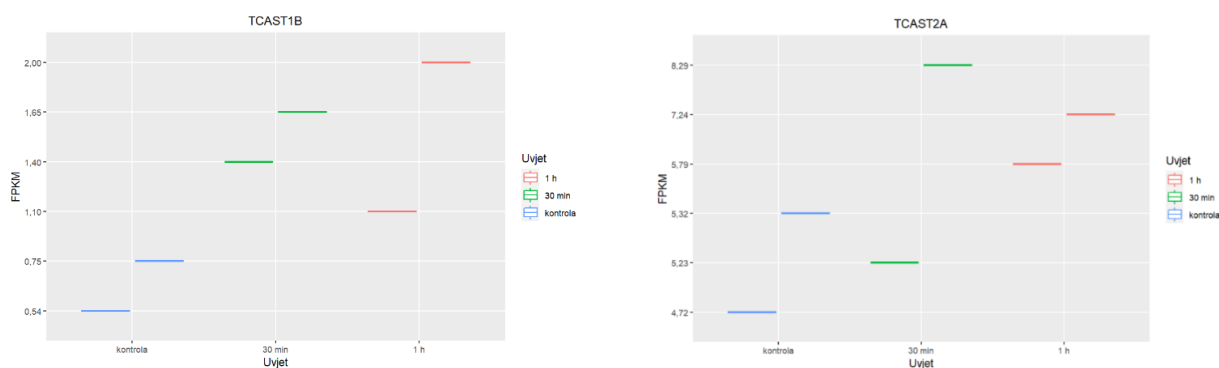
Transkripcija satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2 prikazana je na više načina. Mali je broj satelitskih sljedova po cijeloj dužini u genomu. Najčešće se nalaze u heterokromatinu koji nije anotiran niti u najnovijoj verziji genoma brašnara *T. castaneum*, Tcas5.2 (Herndon i sur., 2020). Sljedeće slike (3. i 4.) prikazuju mapiranje očitavanja na dimer satelitskih DNA sljedova.



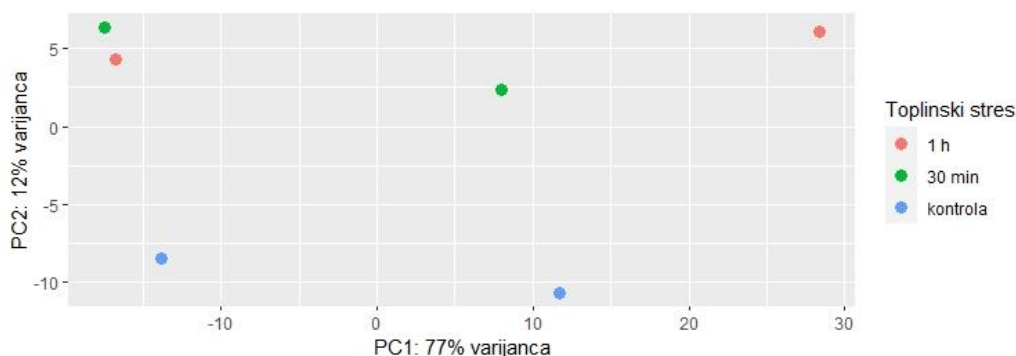
Slika 3. Transkripcija satelitske DNA TCAST1B i transkripcija satelitske DNA TCAST2A kod toplinskog stresa. FPKM vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost među biološkim replikatima, a greška predstavlja standardnu devijaciju među biološkim replikatima.

Kada se uzmu u obzir srednje vrijednosti replikata standardna devijacija je velika (slika 3.) što upućuje na to da postoji velika varijacija među biološkim replikatima. Međutim, sa slike je vidljivo da toplinski stres ima utjecaja na glavnu satelitsku DNA TCAST1 kod koje je transkripcija povećana skoro 3 puta. Toplinski stres nema ujecaja na promjenu sporedne satelitske DNA TCAST2 kod koje je transkripcija nakon toplinskog stresa zanemarivo povećana.

Na slici 4. je realniji prikaz bioloških replikata i ekspresije satelitskih DNA za svaki pojedini replikata. Za svaku pojedinu točku nakon toplinskog stresa postoje određene varijacije među biološkim replikatima. Sa slike 7 je vidljivo da postoji dosljednost povećane transkripcije satelitske DNA TCAST1 i jednako tako da nema promjene kod satelitske DNA TCAST2.



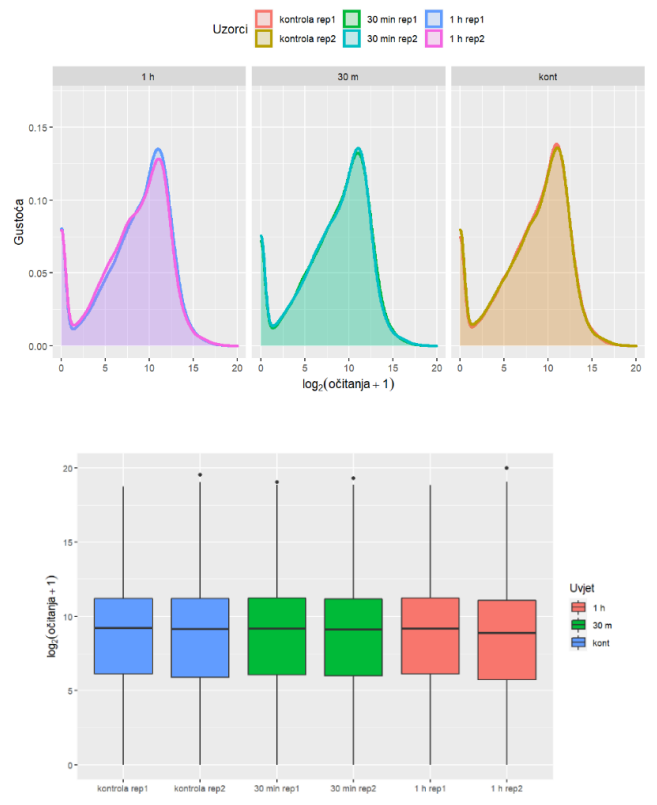
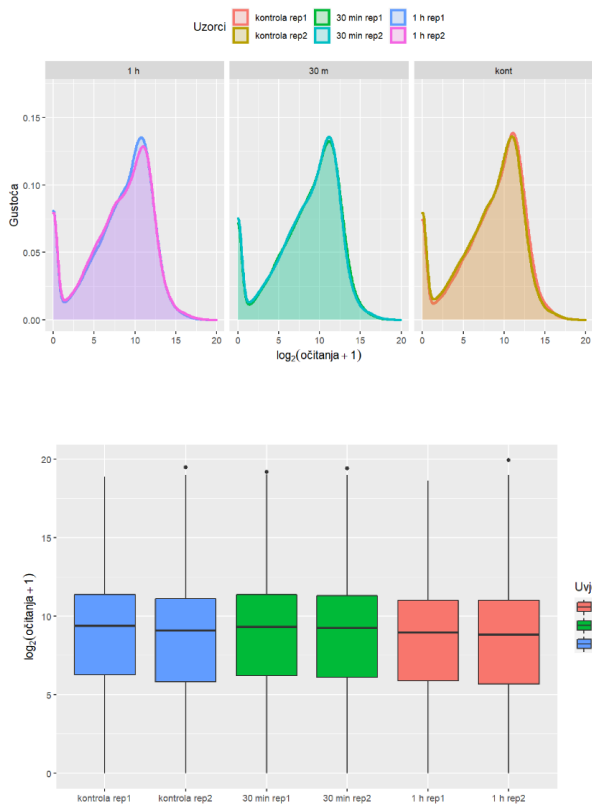
Slika 4. Prikaz transkripcije satelitske DNA TCAST1 i transkripcije satelitske DNA TCAST2 prema biološkim replikatima. Na ovoj slici FPKM vrijednosti su vrijednosti svakog pojedinog replikata.



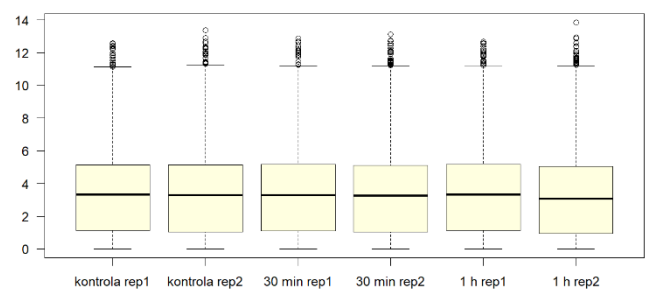
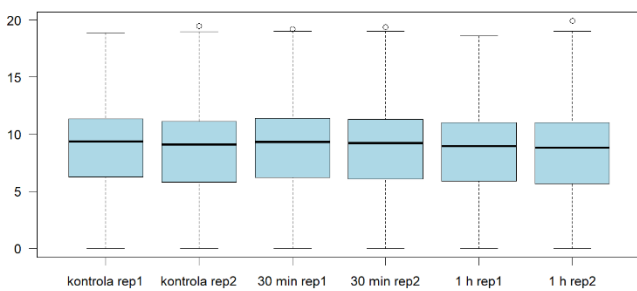
Slika 5. Analiza glavnih komponenti (*engl. PCA, principal component analysis*) za uzorke toplinskog stresa. Biološki replikati nisu klasterirani jer je velika varijacija među njima.

Iz podataka analize glavnih komponenti (slika 5.) možemo zaključiti da naši biološki replikati nisu odstupaju jedan od drugoga. U našem slučaju kontrole ne odstupaju previše jedna od druge, ali uzorci toplinskog stresa da. Jedan replikat uzorka toplinskog stresa s vremenom oporavka od 1 sat najviše odstupa. Idealan prikaz analize glavnih komponenti bila bi kada bi se biološki replikati klasterirali jedan uz drugoga.

Razlozi ovakve situacije mogu biti različiti. Najveći utjecaj ima eksperimentalna priprema uzoraka. Uzorci kod kojih izolacija RNA nije napravljena na isti dan ili sličan način imat će približno jednak prikaz analize glavnih komponenti. Također krivac može biti i priprema knjižnica za sekvenciranje. Naši uzorci pripremljeni su na isti dan i na jednak način tako da je nejasno zašto imamo odstupanja u biološkim replikatima.



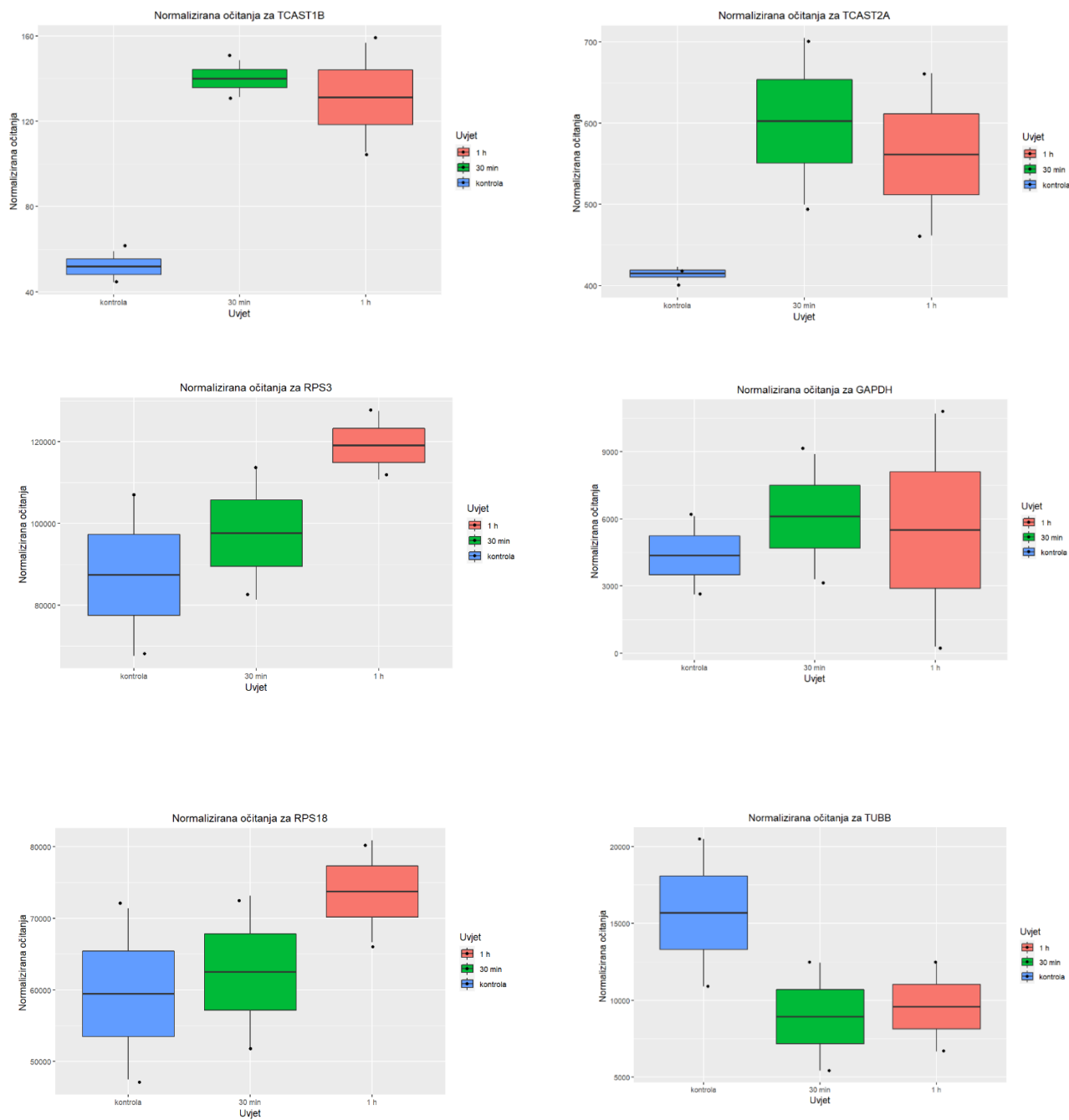
Slika 6. Lijeve slike prikazuju nenormalizirana očitajna i njihovu gustoću te desne normalizirana očitajna i njihovu gustoću. Očitajna su prikazana na logaritamskoj ljestvici. Normalizacija je napravljena u programu R u paketu DESeq2 (medijan omjera).



Slika 7. Nenormalizirana i normalizirana očitajna napravljena metodom normalizacije TMM u paketu edgeR u programu R.

Prema informacijama sa slike 9. i slike 10. vidljivo je da nakon normalizacije medijani naših očitavanja su približno jednaki kroz različite uzorke što znači da je normalizacija uspješna i moguće je međusobno uspoređivati uzorke. Za bilo kakve analize genske ekspresije sa zadanim setom podataka potrebno će biti pronaći i maknuti neželjene efekte koji vode do visoke varijacije među uzorcima toplinskog stresa.

Rezultati poravnavanja očitavanja na transkriptom prikazani su sljedećim slikama. U tu svrhu smo koristili program kallisto i njegovu opciju quant u kojoj kvantificira transkripte. Kao rezultat poravnavanja daje normalizirane podatke u jedinicama transkripti na milijun (TPM) te broj očitavanja po transkriptu. Ti rezultati su dalje analizirani u paketu DESeq2 koji koristi broj očitavanja po transkriptu.

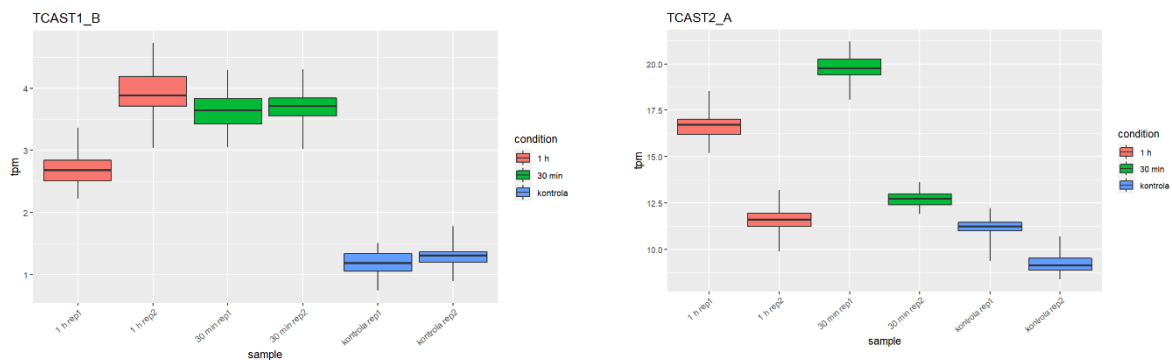


Slika 8. Normalizirana očitavanja za satelitske DNA sljedove i gene koji služe kao endogene kontrole u brašнару *T. castaneum* napravljene poravnanjem očitavanja programom kallisto. Normalizacija je napravljena u programu R u paketu DESeq2 (medijan omjera).

Rezultati transkripcije satelitskih DNA programom kallisto su precizniji od rezultata dobivenih računanjem mapiranih očitavanja na dimer satelitske DNA programom bowtie2 (FPKM). Ukoliko usporedimo rezultate transkripcije sa slike 8 vidljivo je da i kod endogenih kontrola imamo odstupanja po biološkim replikatima. Gen za ribosomski protein 18 se koristi kao jedna od endogenih kontrola u kvantitativnom PCR-u pri uvjetima toplinskog stresa gdje njezina ekspresija ostaje nepromijenjena usporebom kontrola i toplinskog stresa. Ako usporedimo sve endogene kontrole sa slike 8. vidimo odstupanja.

I prema gornjoj slici glavna satelitska DNA ostaje primijenjena nakon toplinskog stresa dok sporedna DNA TCAST2 ostaje nepromijenjena.

Rezultati kallisto poravnanja osim u paket DESeq2 mogu se uvesti i u paketu sleuth u programu R. Sleuth je posebno napravljen da bi se rezultati kallisto poravnanja lakše analizirali. Na slici 9. je rezultat transkripcije satelitskih DNA napravljen u paketu sleuth. Kao ekspresijska jedinica u ovom slučaju je TPM.



Slika 9. Normalizirana očitavanja TPM (*engl. Transcripts per milion*) dobivena u paketu sleuth u programu R.

Prema slici 9. satelitska DNA TCAST1 ima povećanu transkripciju nakon toplinskog stresa, dok TCAST2 ostaje zanemarivo promijenjena. U tablici 7., 8. i 9. prikazane su relativne promjene kod satelitskih DNA nakon toplinskog stresa sa statističkim vrijednostima.

Tablica 7. Relativne promjene transkripcije satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2 dobivene mapiranjem očitavanja na dimer satelitskih DNA programom bowtie2. Korištene su FPKM vrijednosti pojedinih replikata koji su sličniji prema PCA analizi te FPKM srednje vrijednosti svih replikata.

| FPKM | Relativna promjena | |
|-------------------------------|--------------------|---------|
| | TCAST1B | TCAST2A |
| 30 min rep1 / kontrola rep1 | 2,59 | 1,50 |
| 30 min rep 2 / kontrola rep 2 | 2,20 | 1,10 |
| 1 h rep1 / kontrola rep1 | 2,04 | 1,40 |
| 1 h rep 2 / kontrola rep 2 | 2,66 | 1,22 |
| 30 min / kontrola | 2,40 | 1,30 |
| 1 h / kontrola | 2,35 | 1,31 |

Tablica 8. Relativna promjena transkripcije satelitske DNA TCAST1 dobivene poravnanjem očitavanja na transkriptom u koji su dodani dimeri satelitskih DNA. Rezultat relativne promjene i satističkih podataka dolazi iz paketa DESeq2.

| DESeq2 | Relativna promjena | p vrijednost | q vrijednost |
|-------------------|--------------------|--------------|--------------|
| 30 min / kontrola | 2,79 | 0,0010 | 0,0258 |
| 1 h / kontrola | 2,55 | 0,0022 | 0,0594 |
| sleuth | | | |
| 30 min / kontrola | 3,71 | - | < 0,05 |
| 1 h / kontrola | 3,23 | - | <0,05 |

Tablica 9. Relativna promjena transkripcije satelitske DNA TCAST2 dobivene poravnanjem očitavanja na transkriptom u koji su dodani dimeri satelitskih DNA. Rezultat relativne promjene i satističkih podataka dolazi iz paketa DESeq2.

| DESeq2 | Relativna promjena | p vrijednost | q vrijednost |
|-------------------|--------------------|--------------|--------------|
| 30 min / kontrola | 1,44 | 0,1311 | 0,5904 |
| 1 h / kontrola | 1,35 | 0,2212 | 0,8331 |
| sleuth | | | |
| 30 min / kontrola | 2,10 | - | 0,8112 |
| 1 h / kontrola | 1,43 | | 0,7855 |

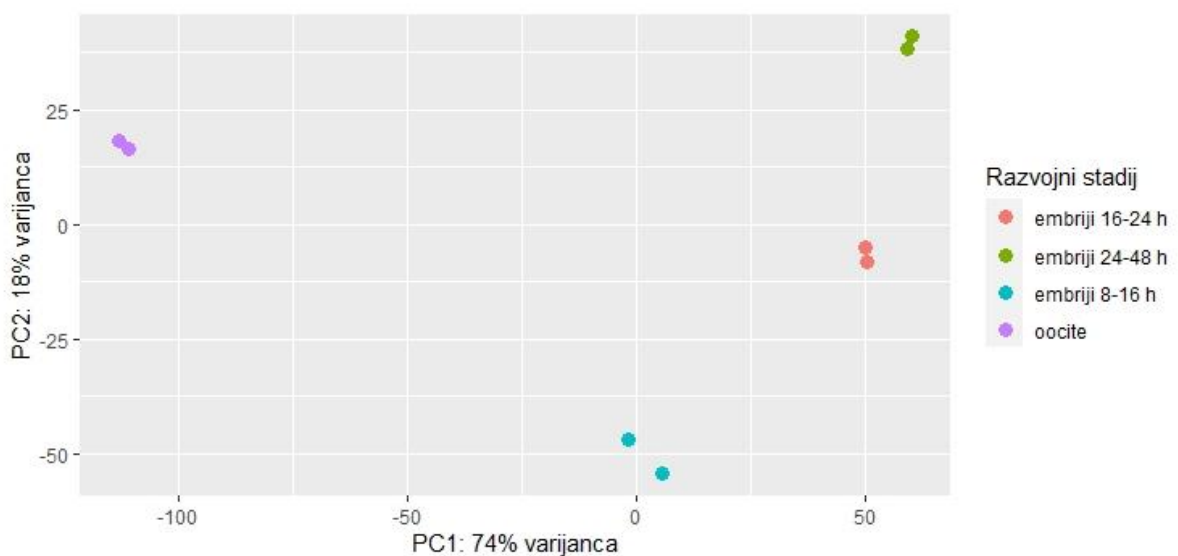
Usprkos velike varijacije među replikatima, rezultati prikazani na slikama 3., 4., 8., i 9. te tablicama 7., 8., i 9. pokazuju da postoji konzistentnost u promjeni transkripcije satelitskih DNA u uvjetima toplinskog stresa. Satelitska DNA TCAST1 se statistički značajno mijenja nakon toplinskog stresa dok satelitska DNA TCAST2 statistički ostaje nepromijenjena.

4.2. Transkripcija satelitskih DNA TCAST1 i TCAST2 tijekom razvoja

Podaci su skinuti s NCBI baze i procesirani jednako kao i podaci toplinskog stresa. U tablici 10. prikazane su karakteristike sekvencirane RNA.

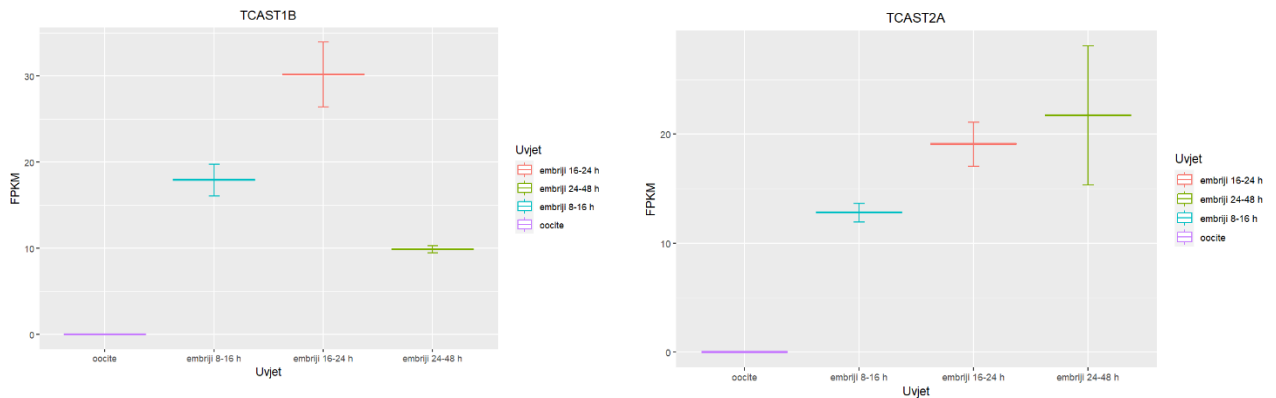
U tablici 10. prikazane su karakteristike očitavanja za pojedine uzorke stadija razvoja.

| Razvojni stadij | Početan broj očitavanja | Broj očitavanja nakon procesiranja | Vrsta knjižnice | Duljina očitavanja |
|----------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------|--------------------|
| Oocyte rep1 | 49613763 | 48534531 | Paired-end | 2x101 pb |
| Oocyte rep2 | 35505093 | 34397221 | Paired-end | 2x101 pb |
| Embriji 8-16 h rep1 | 36415192 | 36039216 | Paired-end | 2x101 pb |
| Embriji 8-16 h rep2 | 36767514 | 36368812 | Paired-end | 2x101 pb |
| Embriji 16-24 h rep1 | 32936864 | 32548248 | Paired-end | 2x101 pb |
| Embriji 16-24 h rep2 | 21587800 | 21062351 | Paired-end | 2x101 pb |
| Embriji 24-48 h rep1 | 40112778 | 39605645 | Paired-end | 2x101 pb |
| Embriji 24-48 h rep2 | 44104924 | 43430137 | Paired-end | 2x101 pb |



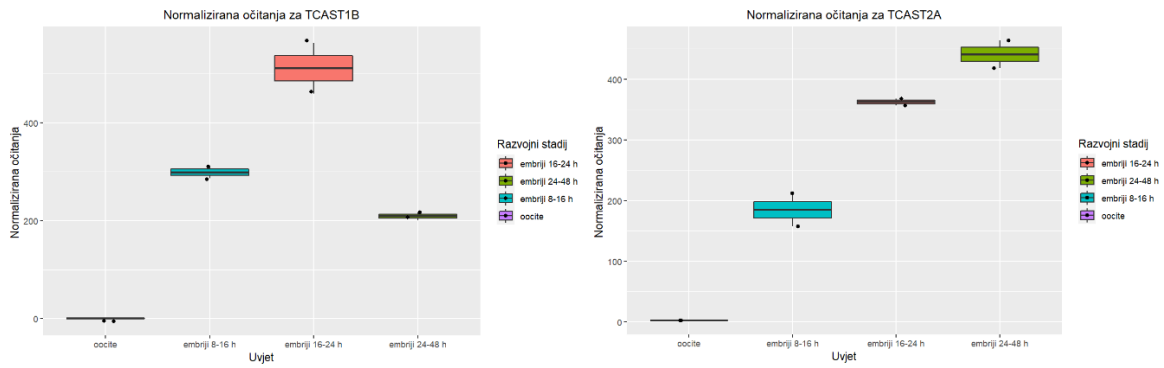
Slika 10. Analiza glavnih komponenti (engl. *PCA, principal component analysis*) za uzorke tijekom razvoja. Replikati su klasterirani te nema velike varijacije među njima.

Analiza glavnih komponenti (slika 10.) za ovaj set podataka pokazuje potpuno drugačiji profil od onoga koji smo dobili za podatke sekvenciranja za toplinski stres. U ovom slučaju biološki replikati su kalsterirani i očekujemo da neće biti prevelike varijacije među njima.

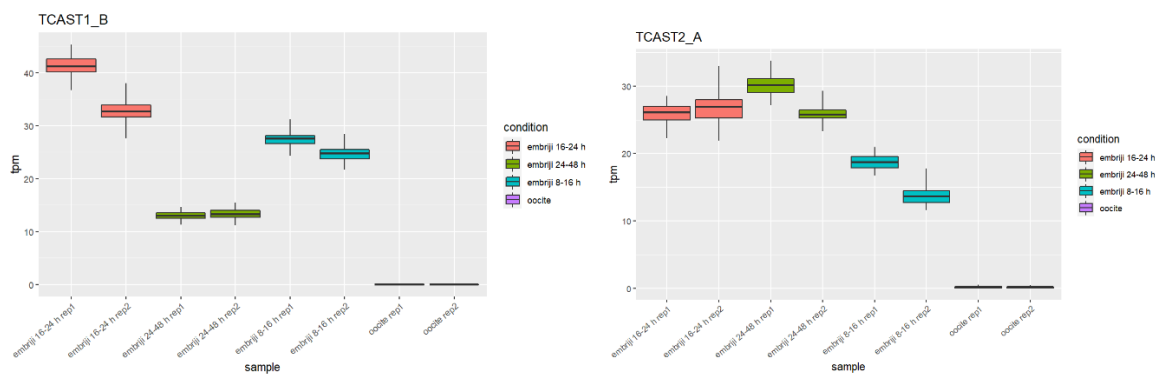


Slika 11. Prikaz transkripcije satelitske DNA TCAST1 i satelitske DNA TCAST2 kod tijeka razvoja brašnara dobivena mapiranjem očitavanja na dimer satelitske DNA programom bowtie2. FPKM vrijednosti je srednja vrijednost među replikatima, a greška predstavlja standardnu devijaciju među replikatima.

Sa slike 11. je vidljivo da je varijacija među replikatima mala kao što je bilo za očekivati iz PCA analize. Prema slici 11. nemamo transkripciju satelitskih DNA u oocitama brašnara. Kako tijekom razvoja napreduje imamo i povećanje transkripcije satelitskih DNA. Profil transkripcije satelitske DNA TCAST1 i TCAST2 je podjednak u stadijima embrija 8-16 h te embrija 16-24 h. U najkasnijoj fazi, embriji 24-48 h, transkripcija satelitskih DNA se mijenja. S jedne strane imamo smanjenje transkripcije za glavnu satelitsku DNA TACST1, a TCAST2 ostaje i dalje visoko transkribirana kao u stadiju embriji 16-24 h pa i malo više.



Slika 12. Prikaz transkripcije satelitske DNA TCAST1 i satelitske DNA TCAST2 kod tijeka razvoja brašnara dobivena poravnanjem očitavanja na transkriptom brašnara programom kallisto. Normalizirana očitavanja predstavljaju vrijednosti mapiranih očitavanja normaliziranih u paketu DESeq2 (medijan omjera), a greška predstavlja standardnu devijaciju među replikatima.



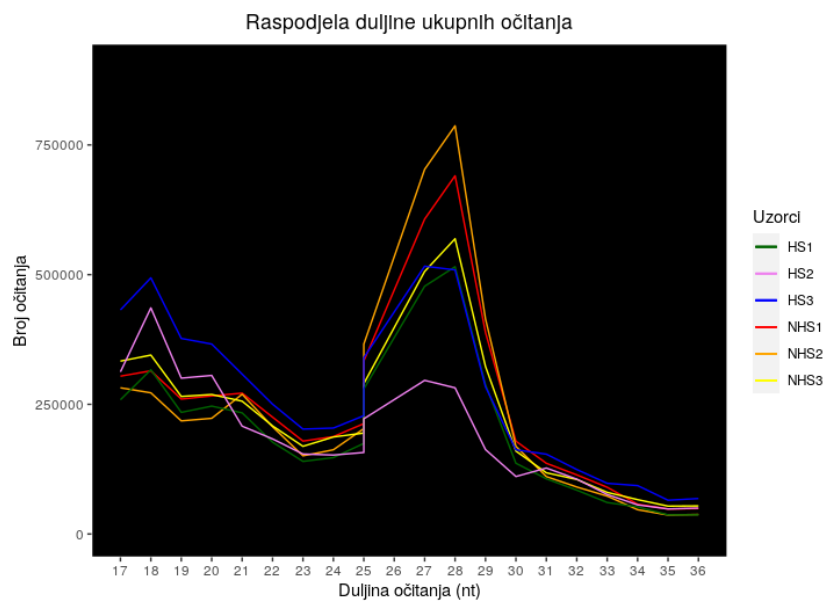
Slika 13. Prikaz transkripcije satelitske DNA TCAST1 i satelitske DNA TCAST2 kod tijeka razvoja brašnara dobivena poravnanjem očitavanja na transkriptom brašnara programom kallisto. tpm vrijednosti predstavljaju ekspresijsku jedinicu izračunatu u paketu sleuth, a greška predstavlja standardnu devijaciju među replikatima.

Prema slikama 11., 12., i 13. vidljiv je različitim profil transkripcije glavne i sporedne satelitske DNA u kasnijim stadijima brašnara.

4.3. Rezultati sekvenciranja malih RNA u uvjetima toplinskog stresa

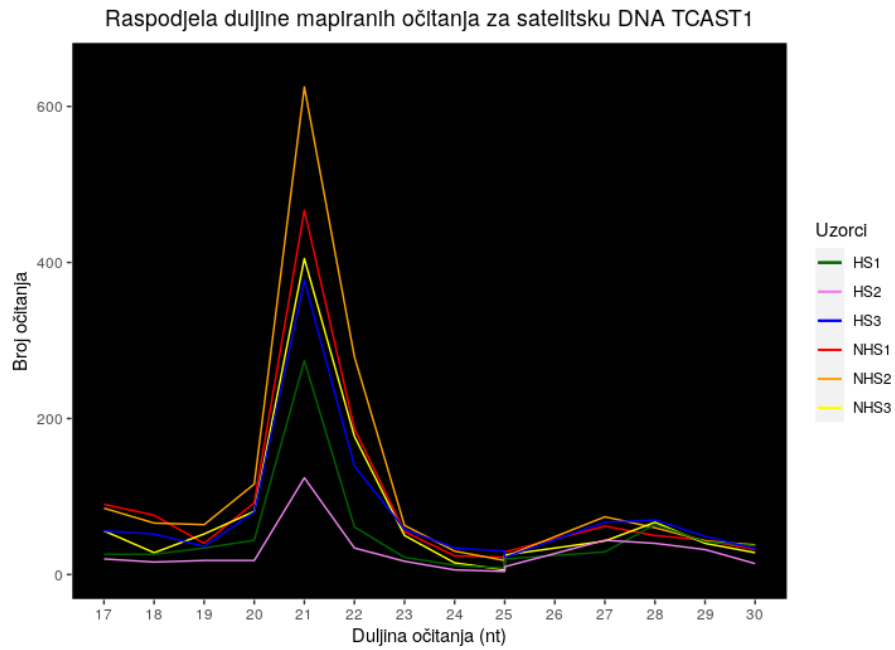
4.3.1. Duljina transkripata satelitske DNA kod uvjeta toplinskog stresa

Transkripti satelitskih DNA dolaze u obliku malih RNA koje su duljine 20-30 nukleotida. Rezultati sekvenciranja malih RNA provjereni su u programu FastQC i pokazuju da je sekvenciranje bilo uspješno te da su očitavanja visoke kvalitete (Phred vrijednost za sve je iznad 30).



Slika 14. Prikaz raspodjele ukupnih očitavanja prema duljini. Iz ukupnih očitavanja uklonjene su sve male RNA koje su dosad anotirane za brašnara, osim siRNA i piRNA. Uzorci predstavljaju sekvencirane uzorke gdje NHS predstavlja kontrole, a HS uzorke nakon toplinskog stresa s vremenom oporavka od 1 sat.

Prema slici 14. imamo najviše očitavanja duljine 27-28 nukleotida. Taj raspon duljina odgovara piRNA. Imamo i velik broj očitavanja u rasponu od 19-22 nukleotida što odgovara siRNA.

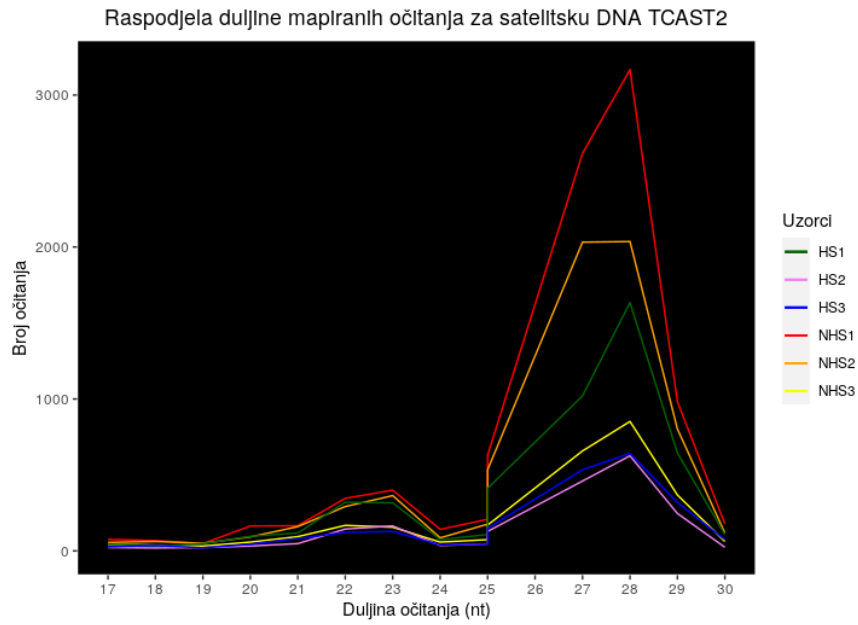


Slika 15. Prikaz raspodjele mapiranih očitavanja na dimer satelitske DNA TCAST1 prema duljini. Uzorci predstavljaju sekvencirane uzorke gdje NHS predstavlja kontrole, a HS uzorke nakon toplinskog stresa s vremenom oporavka od 1 sat.

Tablica 11. Raspodjela mapiranih očitavanja na dimer satelitske DNA TCAST1 za uzorke toplinskog stresa.

| Duljina očitavanja / nt | NHS1 | NHS2 | NHS3 | HS1 | HS2 | HS3 |
|-------------------------|------|------|------|-----|-----|-----|
| 17 | 90 | 85 | 56 | 26 | 20 | 56 |
| 18 | 76 | 66 | 28 | 26 | 16 | 52 |
| 19 | 40 | 64 | 52 | 34 | 18 | 36 |
| 20 | 92 | 116 | 81 | 44 | 18 | 80 |
| 21 | 467 | 625 | 405 | 274 | 124 | 377 |
| 22 | 187 | 279 | 177 | 61 | 34 | 139 |
| 23 | 55 | 63 | 50 | 22 | 17 | 58 |
| 24 | 24 | 30 | 15 | 12 | 6 | 34 |
| 25 | 22 | 18 | 6 | 8 | 4 | 30 |
| 26 | 29 | 23 | 25 | 20 | 10 | 22 |
| 27 | 62 | 74 | 43 | 29 | 44 | 67 |
| 28 | 50 | 60 | 67 | 64 | 40 | 70 |
| 29 | 44 | 43 | 40 | 42 | 32 | 49 |
| 30 | 32 | 38 | 28 | 37 | 14 | 33 |
| 31 | 2 | 6 | 4 | 10 | 4 | 4 |
| 32 | 4 | 2 | 2 | 2 | 0 | 8 |
| 33 | 4 | 2 | 4 | 4 | 0 | 6 |
| 34 | 4 | 8 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 35 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 |
| 36 | 1 | 2 | 0 | 0 | 4 | 8 |

Prema slici 15. i tablici 11. nakon mapiranja očitavanja malih RNA na dimer satelitske DNA TCAST1 najviše mapiranih očitavanja ima duljinu 20-22 nukleotida, s maksimumom na 21 nukleotid. Taj raspon duljine odgovara siRNA.



Slika 16. Prikaz raspodjele mapiranih očitavanja na dimer satelitske DNA TCAST2 prema duljini. Uzorci predstavljaju sekvencirane uzorke gdje NHS predstavlja kontrole, a HS uzorke nakon toplinskog stresa s vremenom oporavka od 1 sat.

Tablica 12. Raspodjela mapiranih očitavanja na dimer satelitske DNA TCAST2 za uzorke toplinskog stresa.

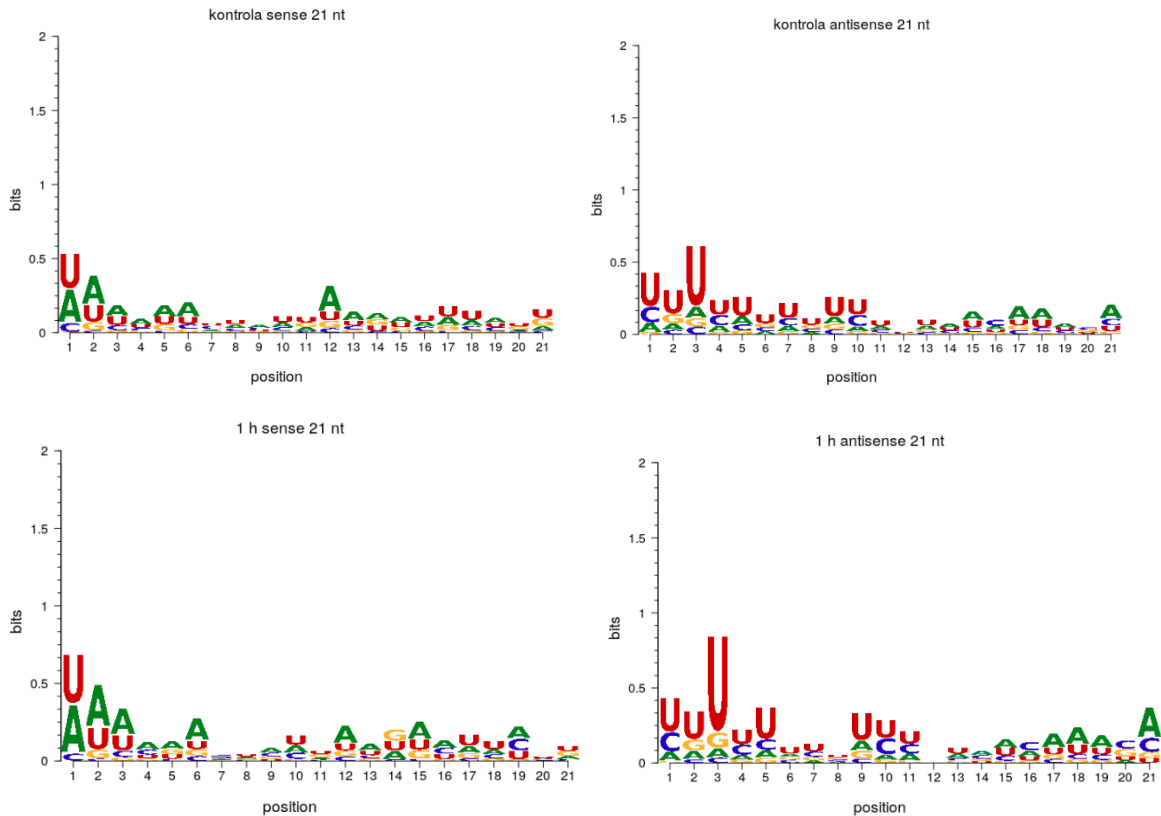
| Duljina očitavanja / nt | NHS1 | NHS2 | NHS3 | HS1 | HS2 | HS3 |
|-------------------------|------|------|------|------|-----|-----|
| 17 | 76 | 56 | 44 | 46 | 22 | 26 |
| 18 | 68 | 62 | 38 | 32 | 19 | 36 |
| 19 | 48 | 50 | 32 | 48 | 22 | 20 |
| 20 | 164 | 92 | 58 | 96 | 32 | 44 |
| 21 | 166 | 160 | 94 | 118 | 48 | 82 |
| 22 | 346 | 292 | 168 | 320 | 144 | 122 |
| 23 | 400 | 364 | 156 | 316 | 164 | 128 |
| 24 | 142 | 86 | 58 | 74 | 36 | 40 |
| 25 | 208 | 176 | 74 | 108 | 46 | 44 |
| 26 | 630 | 534 | 170 | 412 | 128 | 148 |
| 27 | 2616 | 2032 | 658 | 1020 | 460 | 534 |
| 28 | 3168 | 2036 | 852 | 1634 | 626 | 642 |
| 29 | 982 | 802 | 368 | 644 | 246 | 318 |
| 30 | 178 | 118 | 62 | 108 | 24 | 74 |
| 31 | 58 | 50 | 14 | 18 | 10 | 22 |
| 32 | 34 | 16 | 16 | 18 | 10 | 8 |
| 33 | 6 | 8 | 8 | 6 | 4 | 6 |
| 34 | 6 | 6 | 4 | 4 | 2 | 6 |
| 35 | 6 | 6 | 8 | 0 | 0 | 2 |
| 36 | 14 | 2 | 12 | 6 | | 0 |

Prema slici 16. i tablici 12. nakon mapiranja očitavanja malih RNA na dimer satelitske DNA TCAST2 najviše mapiranih očitavanja ima duljinu 26-30 nukleotida, s maksimumom na 28 nukleotid. Taj raspon duljine odgovara piRNA.

Procesiranje transkripata glavne i sporedne satelitske DNA brašnara odvije se dvama različitim mehanizmima što možemo vidjeti prema duljini transkripata koji nastaju.

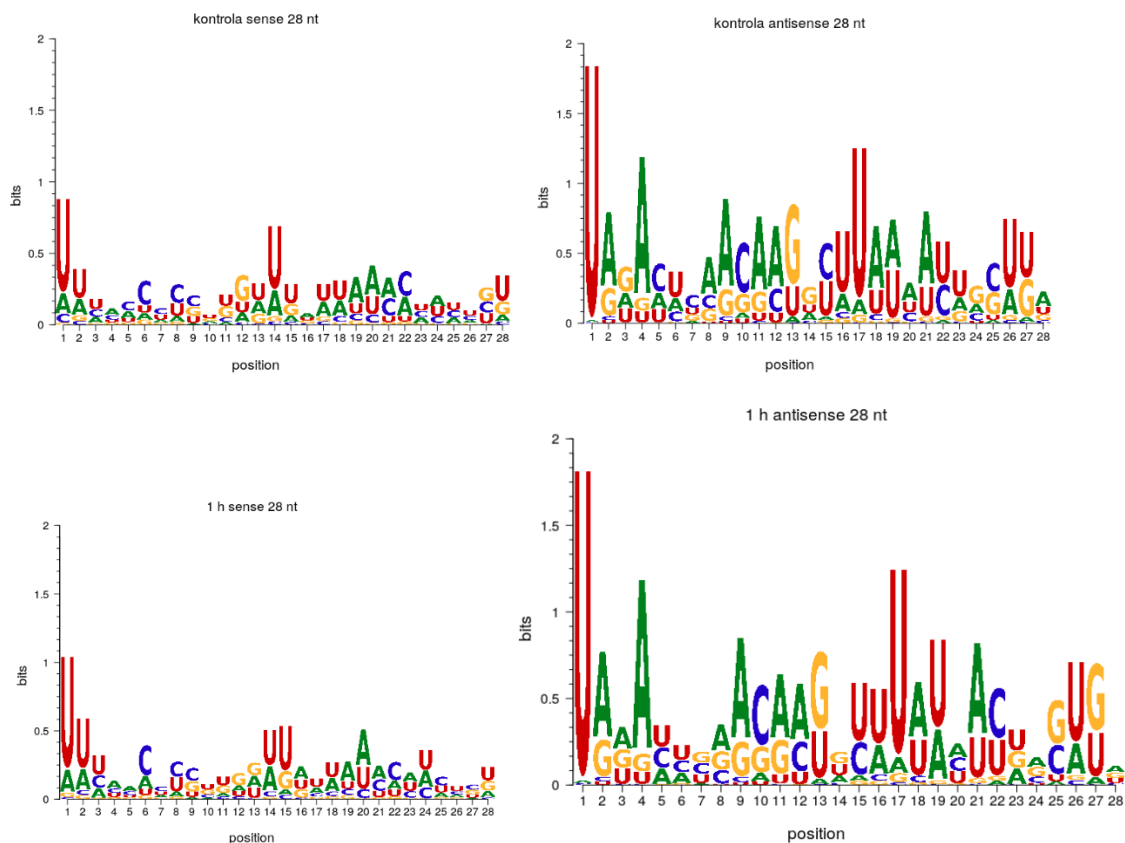
4.3.2. Nukleotidni motivi malih RNA u uvjetima toplinskog stresa

Obzirom da transkripti glavne i sporedne satelitske DNA pokazuju različite profile, provjerit ćemo i nukleotidne motive transkripata.



Slika 17. Nukleotidni motivi mali RNA satelitske DNA TCAST1 duljine 21 nukleotid. Prikazani su transkripti za kontrolu i toplinski stres te s kojeg lanca potječu.

Nema očuvanih nukleotidnih motiva za siRNA duljine 21 nukleotid koje potječu od TCAST1 (slika 17). Identični motivi nastaju i za TCAST1 siRNA duljine 20 i 22 nukleotida.

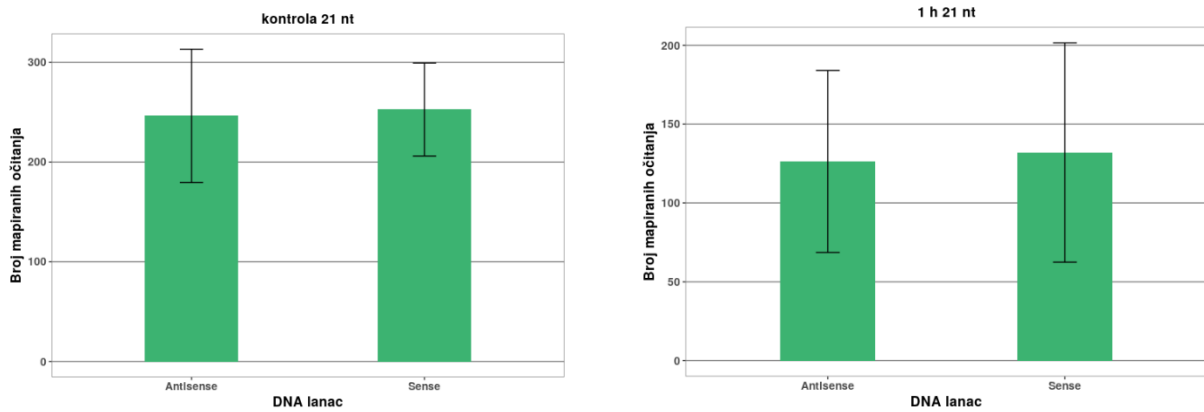


Slika 18. Nukleotidni motivi mali RNA satelitske DNA TCAST2 duljine 28 nukleotida. Prikazani su transkripti za kontrolu i toplinski stres te s kojeg lanca potječu.

Transkripti satelitske DNA TCAST2 pokazuju drugačiji profil od TCAST1. Kod malih piRNA koje potječu od TCAST2 imamo očuvanost uracila na prvom mjestu. Profili su jednaki za kontrolu i toplinski stres. Sa slike 18. je također vidljiva razlika između antisense i sense transkripcije. Kod antisense je uracil na prvom mjestu gotovo uvijek, dok kod sense postoje i drugi nukleotidi. Također imamo očuvanost adenina na mjestu broj 9. Ovaj profil vrijedi i za ostale duljine TCAST2 piRNA (26-30 nt).

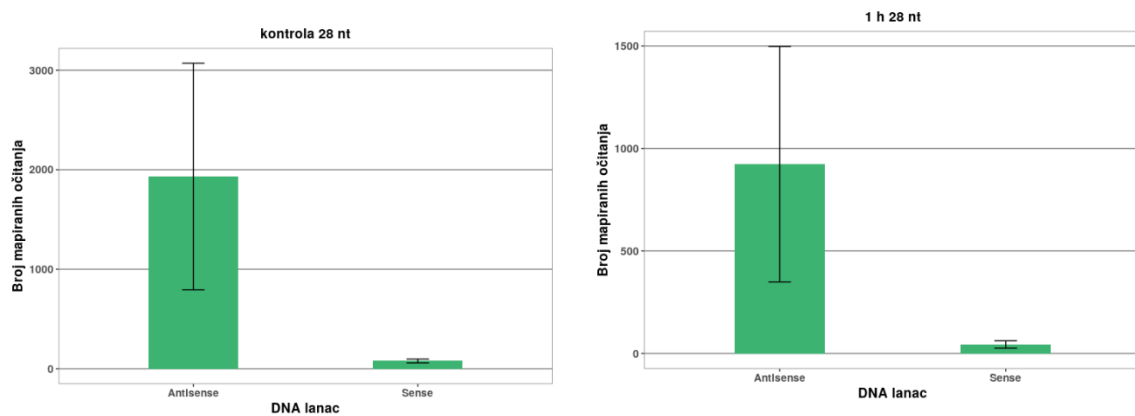
4.3.3. Specifičnost transkripcije DNA lancu

Male siRNA i piRNA osim što se razlikuju u duljini, razlikuju se i prema sense i antisense transkripciji. siRNA je transkribirana podjednako s oba lanca, dok je kod piRNA antisense lanac preferirajući.



Slika 19. Transkripti satelitske DNA TCAST1 prema lancu s kojeg potječu. Greška prikazuje standardnu devijaciju 3 biološka replikata.

Transkripti TCAST1 potječu podjednako s oba lanca i nema preferencije prema jednom. Jednako vrijedi i za transkripte duljine 20-22 nukleotida.

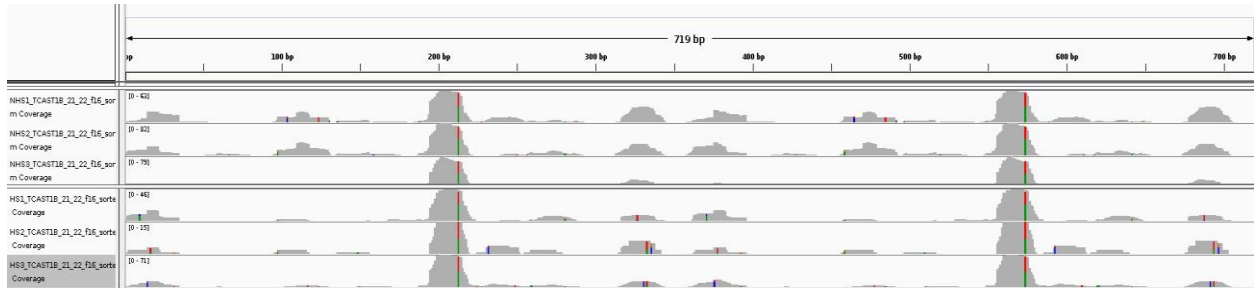


Slika 20. Transkripti satelitske DNA TCAST2 prema lancu s kojeg potječu. Greška prikazuje standardnu devijaciju 3 biološka replikata.

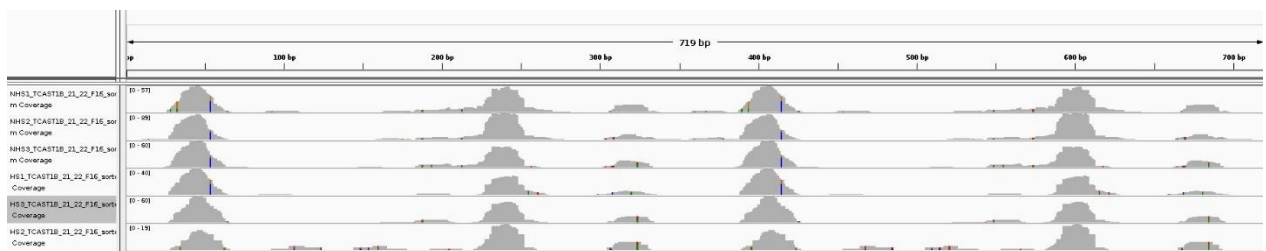
Dok kod transkripata koji potječu od TCAST1 nema preferencijalne transkripcije prema lancu, u slučaju transkripata satelitske DNA TACST2 ima. Transkripcija je preferencijalno s antisense lanca. Jednako vrijedi i za transkripte duljine 26-30 nukleotida.

4.3.4. Mjesta nastanka transkripata na satelitskoj DNA kod toplinskog stresa

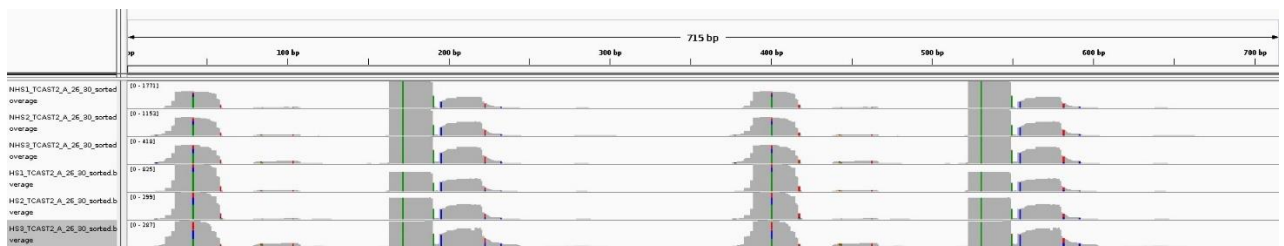
Očitavanja su poravnavana i mapirana na dimer satelitske DNA. Na sljedećim slikama prikazana su mjesta s kojih ti transkripti potječu.



Slika 21. Gustoća sense transkripata za satelitsku DNA TCAST1.



Slika 22. Gustoća antisense transkripata za satelitsku DNA TCAST1.



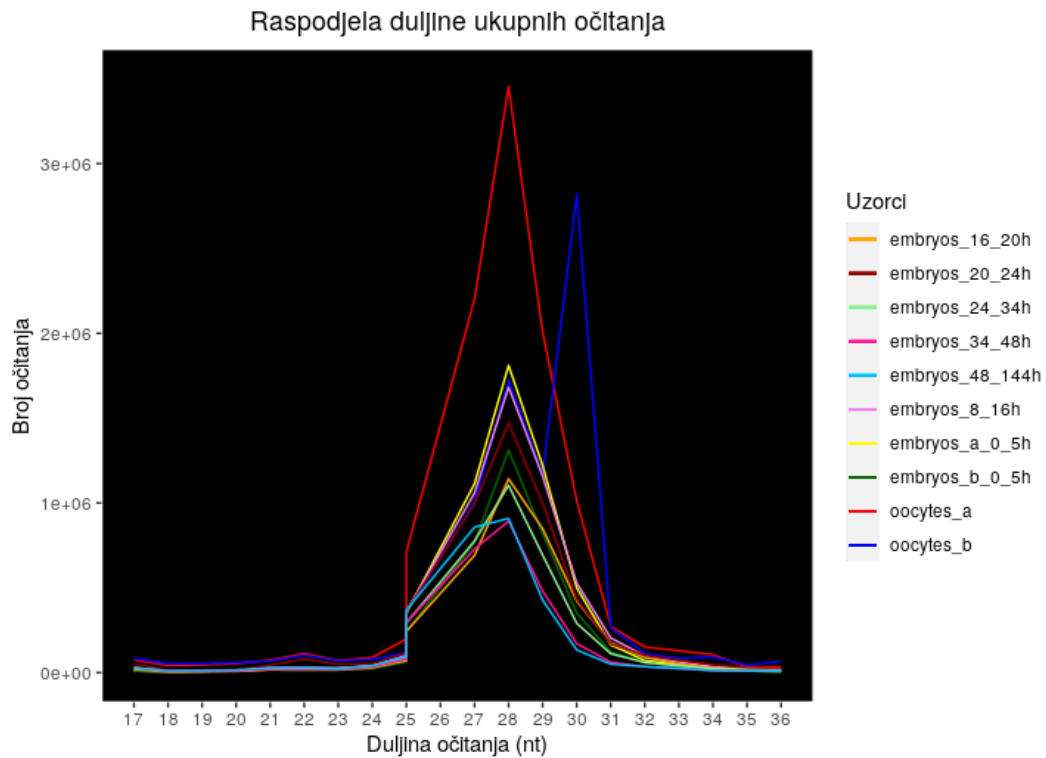
Slika 23. Gustoća transkripata za satelitsku DNA TCAST2.

Na gornji slikama je vidljivo da transkripti ne dolaze s bilo kojih mjesta na satelitskim DNA sljedovima nego sa određenih.

Usporedba transkripata glavne i sporedne TCAST pokazuje različitosti u nukleotidnom motivu, transkripciji prema lancu te duljini transkripata. Pretpostavljamo da transkripti satelitske DNA TCAST1 dolaze u obliku siRNA (TCAST1 siRNA), a transkripti satelitske DNA TCAST2 u obliku piRNA (TCAST2 piRNA).

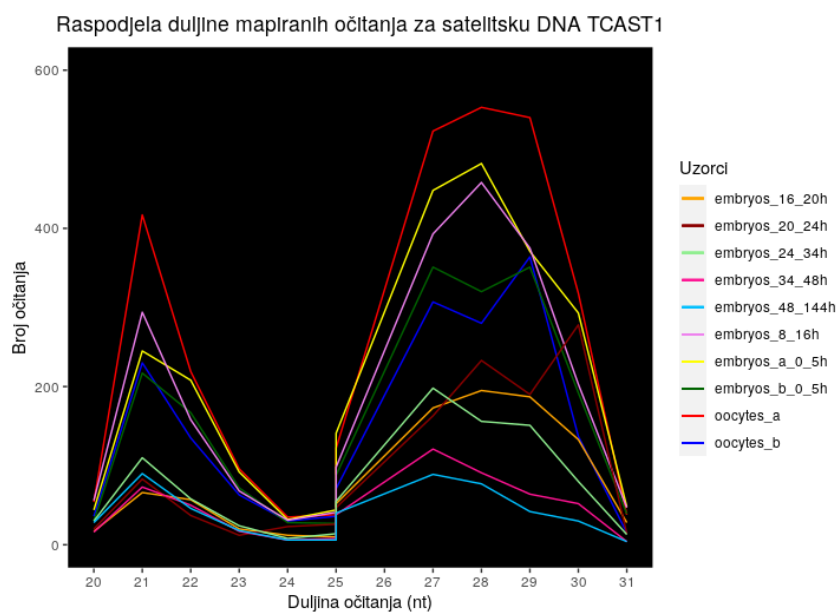
4.4. Rezultati sekvenciranja malih RNA tijekom razvoja

4.4.1. Duljina transkripata satelitske DNA tijekom razvoja



Slika 24. Prikaz raspodjele ukupnih očitavanja prema duljini. Iz ukupnih očitavanja uklonjene su sve male RNA koje su dosad anotirane za brašnara, osim siRNA i piRNA. Uzorci predstavljaju sekvencirane uzorke stadija razvoja brašnara.

Prema duljini očitavanja najviše očitavanja dolazi iz područja 26-30 nukleotida. Jako mali broj dolazi iz područja 20-22 nukleotida.

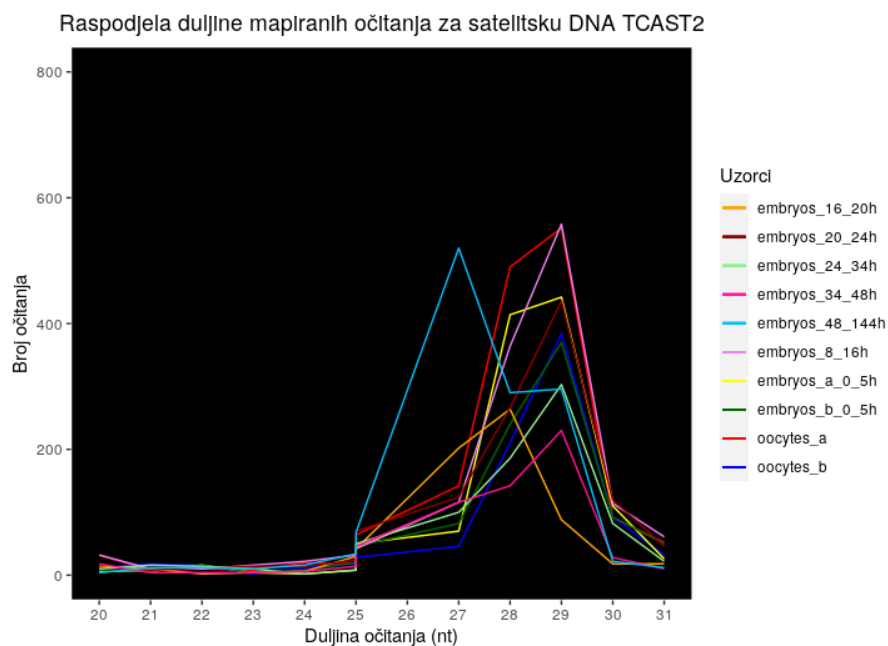


Slika 25. Prikaz raspodjele mapiranih očitavanja na dimer satelitske DNA TCAST1 prema duljini. Uzorci predstavljaju sekvencirane uzorke stadija razvoja brašnara.

Tablica 13. Raspodjela mapiranih očitavanja na dimer satelitske DNA TCAST1 za stajje razvoja.

| Duljina očitavanja / nt | Ooc rep1 | Ooc rep2 | Emb 0-5 h rep1 | Emb 0-5 h rep2 | Emb 8-16 h | Emb 16-20 h | Emb 20-24 h | Emb 24-34 h | Emb 34-48 h | Emb 48-144 h |
|-------------------------|----------|----------|----------------|----------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| 17 | 6 | 10 | 0 | 8 | 20 | 2 | 12 | 2 | 6 | 0 |
| 18 | 10 | 8 | 4 | 2 | 6 | 4 | 10 | 2 | 4 | 2 |
| 19 | 24 | 8 | 10 | 14 | 8 | 4 | 6 | 6 | 8 | 6 |
| 20 | 54 | 36 | 44 | 30 | 56 | 17 | 20 | 30 | 16 | 28 |
| 21 | 417 | 230 | 245 | 217 | 294 | 66 | 83 | 110 | 73 | 90 |
| 22 | 219 | 135 | 208 | 167 | 158 | 57 | 37 | 58 | 50 | 46 |
| 23 | 96 | 63 | 92 | 72 | 68 | 20 | 12 | 24 | 17 | 18 |
| 24 | 35 | 30 | 32 | 28 | 31 | 12 | 23 | 8 | 6 | 6 |
| 25 | 38 | 36 | 44 | 27 | 41 | 10 | 26 | 14 | 8 | 6 |
| 26 | 122 | 71 | 141 | 88 | 98 | 52 | 47 | 55 | 38 | 40 |
| 27 | 523 | 307 | 448 | 351 | 393 | 173 | 163 | 198 | 121 | 89 |
| 28 | 553 | 280 | 482 | 320 | 458 | 195 | 233 | 156 | 91 | 77 |
| 29 | 540 | 364 | 371 | 351 | 375 | 187 | 190 | 151 | 64 | 42 |
| 30 | 318 | 137 | 293 | 192 | 203 | 133 | 278 | 80 | 52 | 30 |
| 31 | 38 | 15 | 48 | 39 | 47 | 28 | 14 | 13 | 4 | 4 |
| 32 | 8 | 4 | 4 | 8 | 5 | 2 | 8 | 2 | 0 | 0 |
| 33 | 2 | 0 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | 4 | 2 | 2 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 4 | 0 |
| 35 | 2 | 0 | 6 | 2 | 4 | 6 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| 36 | 4 | 2 | 2 | 0 | 2 | 4 | 2 | 6 | 0 | 0 |

Za očekivati je bilo da mapirana očitavanja na satelitsku DNA TCAST1 će dati profil gdje ćemo imati najviše onih očitavanja duljine 21 nukletid. No, prema slici 25. i tablici 13. ispada da nije tako. Jedan od maksimuma je na 21 nukleotid, ali imamo i onaj koji je na 27-29 nukleotida. U ovom slučaju izgleda da transkripti satelitske DNA TCAST1 dolaze i u obliku TCAST1 siRNA i TCAST2 piRNA. Također je vidljivo da prema kasnijim stadijima transkripti opadaju.



Slika 26. Prikaz raspodjele mapiranih očitavanja na dimer satelitske DNA TCAST2 prema duljini. Uzorci predstavljaju sekvencirane uzorke stadija razvoja brašnara.

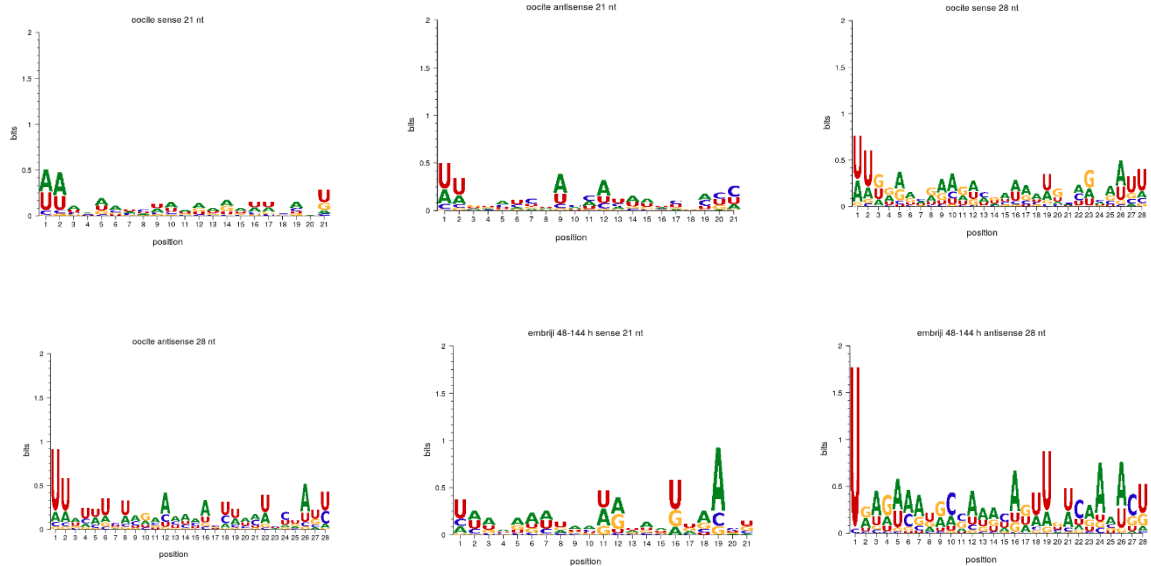
Tablica 14. Raspodjela mapiranih očitavanja na dimer satelitske DNA TCAST2 za stadije razvoja.

| Duljina očitavanja / nt | Ooc rep1 | Ooc rep2 | Emb 0-5 h rep2 | Emb 0-5 h rep2 | Emb 8-16 h | Emb 16-20 h | Emb 20-24 h | Emb 24-34 h | Emb 34-48 h | Emb 48-144 h |
|-------------------------|----------|----------|----------------|----------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| 17 | 10 | 6 | 4 | 8 | 24 | 8 | 24 | 12 | 4 | 8 |
| 18 | 8 | 16 | 2 | 0 | 4 | 4 | 10 | 4 | 0 | 2 |
| 19 | 6 | 8 | 0 | 6 | 10 | 0 | 0 | 6 | 2 | 6 |
| 20 | 32 | 12 | 6 | 8 | 32 | 14 | 12 | 10 | 18 | 4 |
| 21 | 8 | 18 | 6 | 6 | 10 | 0 | 8 | 16 | 4 | 12 |
| 22 | 10 | 16 | 16 | 16 | 10 | 10 | 12 | 14 | 4 | 12 |
| 23 | 8 | 2 | 4 | 4 | 16 | 2 | 14 | 10 | 4 | 10 |
| 24 | 20 | 12 | 2 | 8 | 22 | 4 | 14 | 2 | 6 | 16 |
| 25 | 18 | 18 | 8 | 20 | 32 | 6 | 24 | 8 | 14 | 34 |
| 26 | 64 | 28 | 50 | 46 | 42 | 30 | 70 | 50 | 46 | 68 |
| 27 | 142 | 46 | 70 | 82 | 116 | 42 | 124 | 100 | 116 | 520 |
| 28 | 490 | 210 | 414 | 240 | 364 | 202 | 266 | 186 | 142 | 290 |
| 29 | 552 | 384 | 442 | 370 | 558 | 264 | 436 | 303 | 230 | 296 |
| 30 | 92 | 92 | 110 | 92 | 114 | 88 | 120 | 82 | 28 | 22 |
| 31 | 52 | 32 | 26 | 50 | 61 | 18 | 46 | 22 | 10 | 12 |
| 32 | 58 | 46 | 36 | 34 | 56 | 18 | 30 | 16 | 6 | 2 |
| 33 | 2 | 0 | 4 | 6 | 14 | 8 | 4 | 6 | 2 | 0 |
| 34 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 | 0 | 4 | 2 | 2 | 0 |
| 35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 4 | 0 | 2 | 0 |
| 36 | 4 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |

Prema slici 26. i tablici 14. vidimo da transkripti satelitske DNA TCAST2 dolaze u duljinama 26-30 nukleotida, što odgovara piRNA TCAST2.

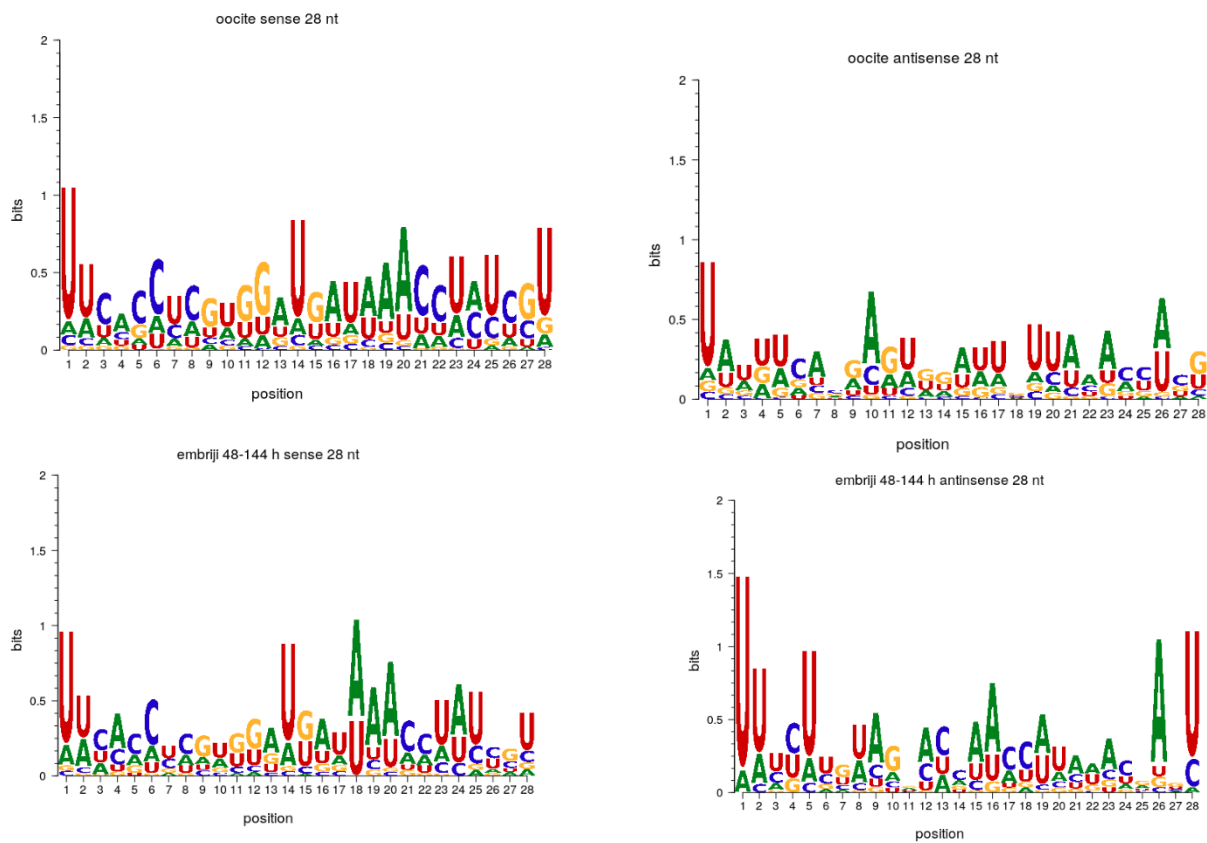
Zanimljivo je da u slučaju oocita imamo TCAST1 siRNA i TCAST1 piRNA. U usporedbi s transkripcijom RNA tijekom razvoja, i satelitske DNA TCAST1 i satelitske DNA TCAST2 nisu bile transkribirane u stadiju oocita.

4.4.2. Nukleotidni motivi malih RNA tijekom razvoja



Slika 27. Nukleotidni motivi mali RNA satelitske DNA TCAST1 duljine 21 i 28 nukleotida. Prikazani su transkripti za tijek razvoja brašnara za točke oocita i embrija 48-144 sati te s kojeg lanca potječu.

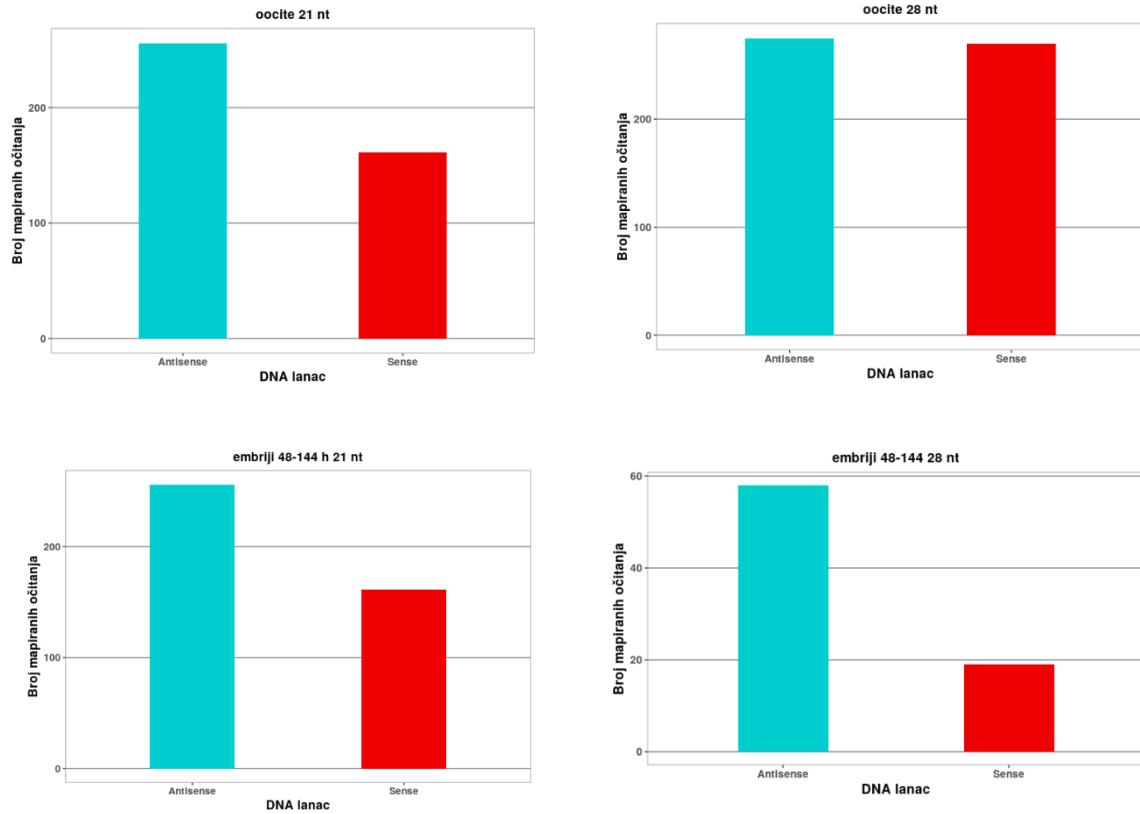
Transkripti duljine 21 nukleotida ne pokazuju očuvanost motiva prema mjestu, dok transkripti duljine 28 nukleotida prikazuju očuvanost uracila na prvom mjestu što odgovara piRNA, u ovom slučaju TCAST1 piRNA.



Slika 28. Nukleotidni motivi mali RNA satelitske DNA TCAST2 duljine 28 nukleotida. Prikazani su transkripti za tijekom razvoja brašnara za točke oocita i embrija 48-144 sati te s kojeg lanca potječu.

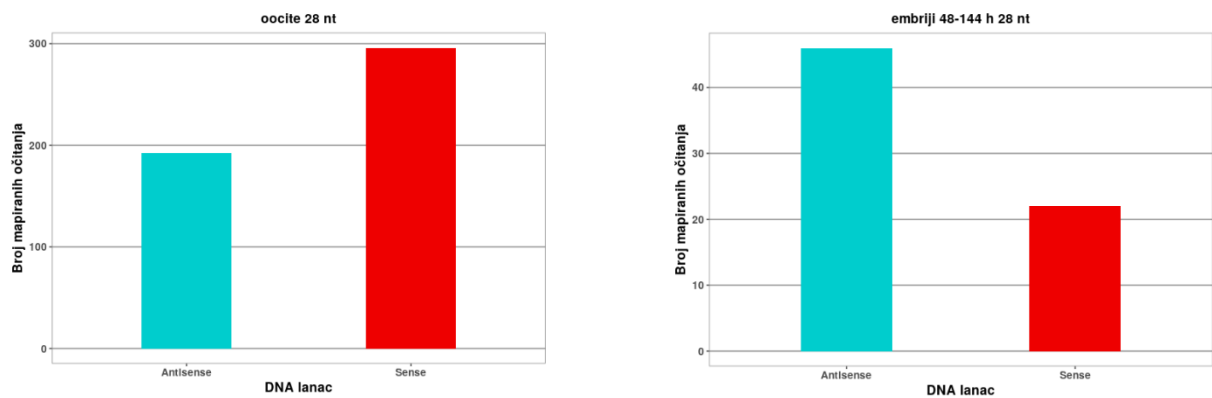
Kod oocita imamo očuvanost uracila na prvom mjestu i kod sense i antisense transkripcije. Kako razvoj teče preferencijalno dolazi do antisense transkripcije.

4.4.3. Specifičnost transkripcije DNA lancu



Slika 29. Transkripti satelitske DNA TCAST1 prema lancu s kojeg potječu. Prikazani su samo stadiji oocite i embriji 48-144 h.

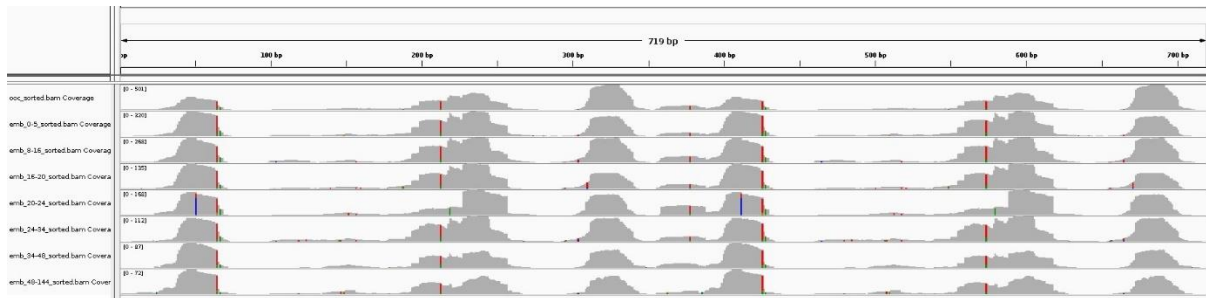
Transkripti duljine 21 nukleotid preferencijalno dolaze s oba lanca. U oocitima transkripti duljine 28 nukleotida podjednako se transkribiraju s oba lanca, međutim, u kasnijim stadijima razvoja antisense lanac postaje preferencijalan.



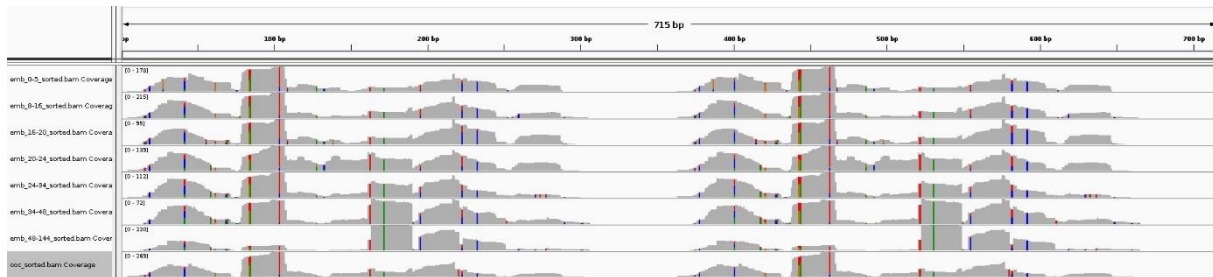
Slika 30. Transkripti satelitske DNA TCAST2 prema lancu s kojeg potječu. Prikazani su samo stadiji oocite i embriji 48-144 sati.

Transkripti satelitske DNA TCAST2 duljine 28 nukleotida pokazuju sličnosti sa transkriptima satelitske DNA TCAST1 duljine 28 nukleotida. U oocitima imamo podjednaku transkripciju s oba lanca, dok u kasnijim stadijima razvoja dolazi do preferencijalne transkripcije s antisense lanca.

4.4.4. Mjesta nastanka transkripata na satelitskoj DNA tijekom razvoja



Slika 31. Gustoća transkripata za satelitsku DNA TCAST1

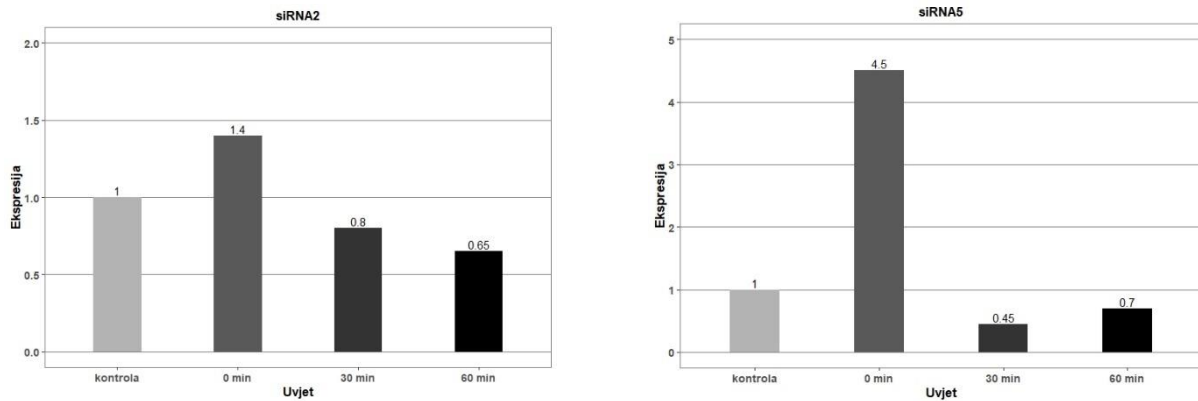


Slika 32. Gustoća transkripata za satelitsku DNA TCAST2.

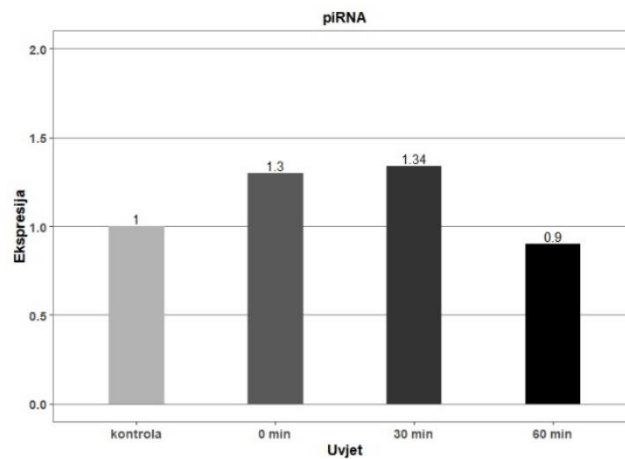
Zanimljiva je gustoća nastanka transkripata kod satelitske DNA TCAST2 na mjestu 150-200 nukleotida. Ako usporedimo s rezultatima za toplinski stres, to je mjesto koje odgovara transkriptima TCAST2 gdje ih kod odraslih ima puno.

4.5. Taqman kvantitativni PCR

Taqman probama su praćeni transkripti TCAST1 siRNA i TCAST2 piRNA nakon temperaturnog stresa s određenim vremena oporavka od istog.



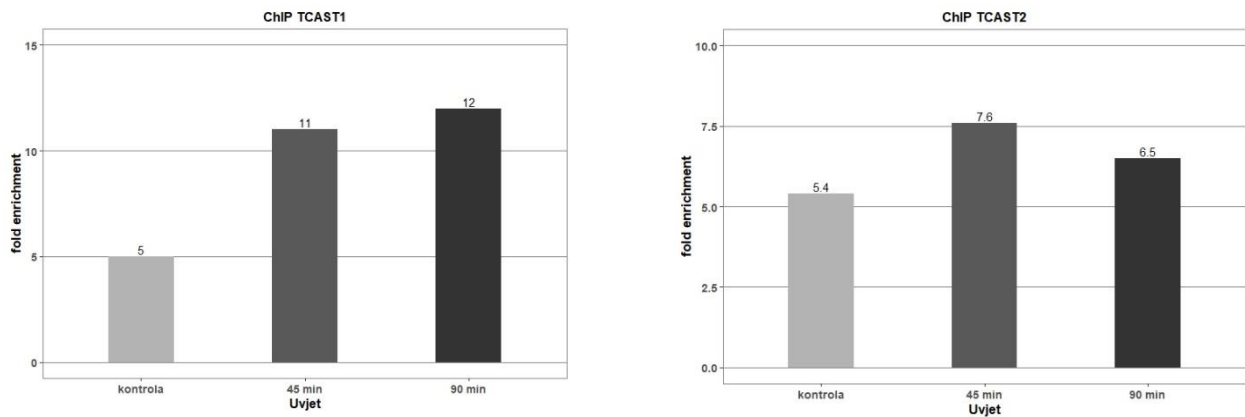
Slika 33. Dinamika ekspresije transkripata pri različitim uvjetima oporavka od toplinskog stresa za TCAST1 siRNA. Imamo povćanu ekspresiju odma nakon toplinskog stresa, a s vremenom opada. siRNA2 i siRNA5 potjeću s razlićitih mjesta satelitske DNA i s dva razlićita lanca.



Slika 34. Dinamika ekspresije transkripata pri različitim uvjetima oporavka od toplinskog stresa za TCAST2 piRNA. Ekspresija piRNA je lagano povećana odma nakon toplinskog stresa te nakon 30 minuta oporavka da bi se nakon sat vremena vratila na početnu razinu.

4.6. Rezultati kromatinske imunoprecipitacije

Provjerena je i razina trimetilacije lizina 9 histona 3 (H3K9me3) što je epigenetski biljeg heterokromatina i doprinosi utišavanju ekspresije ukoliko je metilacija u blizini kodirajućih gena.



Slika 35. Razina metilacije H3K9me3 na satelitskim regijama u genomu.

5. RASPRAVA

Brašnar *T. castaneum* postao je važan modelni organizam za proučavanje tijeka razvoja zbog toga što njegova embriogeneza više nalikuje embriogenezi kralješnjaka (Tomoyasu, 2004). Morfologija njegove rane embriogeneze je među najbolje opisanih od svih insekata s „short germ“ embriogenezom (Benton i sur., 2014).

Njegove glavne i sporedne satelitske DNA čine preko 30 % genoma što ga čini dobrim modelom za istraživanje satelitskih DNA sljedova. Glavna satelitska DNA TCAST1 i sporedna satelitska DNA TCAST2 se nalaze na svih 20 kromosoma brašnara. Iako ih je najviše u heterokromatskom dijelu genoma, nalazimo ih i kao raspršene po eukromatskom dijelu (Brajković i sur., 2018). Struktura heterokromatina i razina ekspresije ponavljajućih DNA vrlo su osjetljive na okolišne uvjete, posebice temperaturu. U biljci *Arabidopsis* nakon dugog toplinskog stresa dolazi do povećanja transkripcije satelitske DNA i promjene u kromatinu (Pecinka i sur., 2010).

Transkripcija glavne satelitske DNA TCAST1 je razvojno regulirana i transkribirana je tijekom embriogeneze i u kasnijim razvojnim stadijima (Pezer i Ugarković, 2012). Također TCAST1 je inducirana toplinskim stresom što dovodi do povećanja metilacije (H3K9me2/3) na ponavljajućim regijama TCAST1 u eukromatinu što rezultira smanjenjem ekspresije gena u blizini gdje se nalaze (Felicello i sur., 2015).

Dugi transkripti TCAST1 procesiraju se u male RNA za koje se pretpostavlja da su siRNA ali nisu posebno okarakterizirane (Pezer i Ugarković, 2012). Nisu poznate niti sličnosti ili razlike između transkripata glavne i sporedne satelitske DNA te imaju li utjecaja na gensku ekspresiju. Ovdje smo pokazali metodama sekvenciranja RNA i malih RNA povezanih sa kvantitativnim PCR-om sličnosti i razlike među glavne i sporedne satelitske DNA te njihovi transkripata.

Rezultati eksperimenata kod odraslih jedinki nakon toplinskog stresa su pokazali povećanje transkripcije glavne satelitske DNA dok transkripcija sporedne DNA ostaje nepromijenjena. Također, H3K9me3 nivo je povećan kod glavne satelitske DNA dok kod sporedne ostaje nepromijenjen.

Transkripti sporedne satelitske DNA dolaze samo u obliku piRNA i tijekom embriogeneze i u odraslim jedinkama što ukazuje da je sporedna satelitska DNA dobar izvor piRNA i u spolnim i u somatskim stanicama. Za razliku od sporedne satelitske DNA, transkripti glavne satelitske DNA su različito procesirani tijekom embriogeneze. Tijekom ranijih stadija procesiraju se samo u piRNA te isključivo u siRNA u kasnijim stadijima i odraslim jedinkama. TCAST1 piRNA nastaju samo u spolnim stanicama.

Kao odgovor na povećanje satelitskih DNA TCAST1 nakon toplinskog stresa došlo je do utišavanja genske ekspresije u čijoj blizini su se nalazili elementi satelitske DNA TCAST1

Transkripcija glavne satelitske DNA TCAST1 inducirana je toplinskim stresom dok kod sporedne satelitske DNA TCAST2 ne dolazi do promjene. Transkripti TCAST2 procesiraju se samo u obliku piRNA dok su transkripti TCAST1 ovisni o stadiju razvoja i razlikuje se procesiranje u ranijim stadijima od onih u kasnijim.

Transkripti TCAST1 procesiraju se u obliku siRNA kod odraslih jedinki dok tijekom embriogeneze dominiraju u obliku piRNA. To dovodi do zaključka da postoje dva heterokromatinska stanja tijekom embriogeneze gdje u ranijim stadijima imamo TCAST1 piRNA, a u kasnijim TCAST1 siRNA. TCAST1 piRNA nastaju u spolnim stanicama, dok TCAST1 siRNA nastaju u somatskim. Različito procesiranje TCAST1 tijekom stadija razvoja i odraslih jedinki upućuje na to da TCAST1 siRNA i TCAST1 piRNA imaju različite uloge tijekom razvoja.

Prema slici 3. je vidljivo da je najveća transkripcija TCAST1 u embrijima 8-16 sati (formacija blastoderma) i embrijima 16-20 sati (diferencijacija blastoderma i početak gastrulacije) što može biti povezano s početkom nastanka konstitutivnog heterokromatina (Dorer i sur., 1994). U fazi embrija 34-48 sati transkripcija TCAST1 opada i ostaje nepromijenjena tijekom stadija ličinke, kukuljice i odraslih jedinki (Pezer i Ugarković, 2012).

Analiza transkripata u ranoj fazi embrija 0-5 sati, prije početka zigotne transkripcije, pokazuje postojanje TCAST1 povezanih malih RNA gdje su piRNA dominantne, ali postoje i siRNA. Takve male RNA se nasljeđuju i potječu od majke. Kod mušice *Drosophila* piRNA nastaju u jajnicima i preko majke su prenesene na oocite (Brennecke i sur., 2008). Također je u mušici *Drosophila* pokazano transgeneracijske, nasljeđene od majke piRNA potiču piRNA biogenezu preko piRNA specifičnih heterokromatina na homolognim genskim regijama inducirajući procesiranje prekursora (Le Thomas i sur., 2014). Možemo pretpostaviti sličnu uloga i za TCAST1 piRNA i siRNA koje su naslijeđene. Tijekom transkripcijski aktivnih faza embriogeneze kao rani blastoderm (embriji 8-16 h), diferencijacija blastoderma (embriji 16-20 h) i gastrulacija (embriji 20-24 h) dovode do povećanja TCAST1 piRNA i smanjenja TCAST1 siRNA. Najveći omjer između TCAST1 piRNA i siRNA je 6,5 i događa se kod embrija 20-24 sata i poklapa se sa najvećom ekspresijom TCAST1 prekursora upućujući na ulogu TCAST1 piRNA u formaciji heterokromatina. Nakon gastrulacije počinje opadati nastajanje TCAST1 piRNA i počinje nastajati TCAST1 siRNA. Kod embrija 48-144 sata je omjer TCAST1 piRNA i siRNA 1,6. U kasnijim stadijima transkripcija je s oba lanca (Pezer i Ugarković, 2012), TCAST1 siRNA preferencijalno nastaju gdje omjer TCAST1 piRNA i siRNA iznosi 0,2. TCAST1 piRNA biogeneza je aktivna samo spolnim stanicama dopuštajući prijenos na sljedeće generacije.

Povećanje TCAST1 transkripata nakon toplinskog stresa je u korelaciji sa promjenama metilacije histona (H3K9me3) na heterokromatinu pa je pretpostavljeno da transkripti satelitske DNA dovode do „heterokromatizacije“ homolognih sljedova u genomu i ulogu heterokromatina u oporavku od stresa (Pezer i Ugarković, 2012). Dvolančani prekursori siRNA koji nastaju u kasnijim stadijima razvoja i inducirani su toplinskim stresom mogu imati ulogu u održavanju heterokromatina i njegov oporavak od toplinskog stresa.

Povećana metilacija pokazana nakon toplinskog stresa na raspršenim TCAST1 elementima povezana je sa utišavanjem genske ekspresije u čijoj se blizini satelitske DNA nalaze i upućuje

na ulogu TCAST1 siRNA u regulaciji ekspresije. Ekspresija heterokromatina je drugačije regulirana tijekom razvoja i toplinskog stresa, gdje heterokromatin može različito reagirati na različite tipove stresa.

piRNA najčešće nastaju iz transpozona, ali ovdje je dokazano na temelju TCAST2 da tijekom embriogeneze i u odraslim jedinkama nastaju TCAST2 piRNA što znači da i satelitske DNA mogu biti izvori piRNA. Transkripcija TCAST2 ne pokazuje maksimum ekspresije kod embrija 16-20 sati kao što je slučaj za TCAST1. TCAST2 profili transkripata tijekom embriogeneze pokazuju konstantan omjer TCAST2 piRNA i siRNA, gdje je omjer piRNA i siRNA 32 i ostaje konstantan tijekom embriogeneze. Omjer TCAST1 piRNA i siRNA mijenja se značajno tijekom embriogeneze i u kasnijim stadijima. Nasljeđene TCAST2 piRNA i siRNA ukazuju na očuvanost slijeda tijekom cijele embriogeneze što također upućuje na ulogu u nastanku i organizaciji heterokromatina. Nije potvrđena metilacija histona (H3K9me3) na elementima TCAST2 nakon toplinskog stresa kao niti u heterokromatinu. To potvrđuje hipotezu da satelitske DNA mogu sudjelovati u modulaciji kromatina i utišavanju genske ekspresije (Felicello i sur., 2015). Rezultati potvrđuju da se piRNA sporednih satelitskih DNA ne mijenjaju tijekom toplinskog stresa niti sudjeluje u reorganizaciji heterokromatin što ujedno i vodi do nepromijenjene genske ekspresije gena u čijoj blizini se nalaze TCAST2 elementi.

Biogeneza siRNA i piRNA je različita, koriste se različiti enzimi te su prekursori drugačiji, a prema slici 31. možemo vidjeti da i siRNA i piRNA dolaze sa istih mjesta u nukleotidnom slijedu satelitske DNA TCAST1. Kao posljedicu toga može biti da i TCAST1 piRNA i siRNA ciljaju ista mjesta u genomu tijekom širenja heterokromatina ili utišavanju transkripcije.

6. ZAKLJUČAK

1. Transkripcija glavne satelitske DNA TCAST1 povećana je nakon toplinskog stresa, dok transkripcija sporedne DNA TCAST2 ostaje nepromijenjena.
2. Transkripti TCAST1 nemaju očuvane nukleotidne motive, duljine su 20-22 nukleotida te potječu s oba lanca što je karakteristika siRNA.
3. Transkripti TCAST2 pokazuju preferenciju uracila na prvom mjestu nukleotidnog sljeda, duljine su 26-30 nukleotida te je preferencijalna antisense transkripcija.
4. Transkript TCAST1 pokazuju različitu dinamiku transkripcije tijekom stadija razvoja gdje u ranijim stadijima dolaze u obliku TCAST1 piRNA, a u kasnijim stadijima u obliku TCAST1 siRNA.
5. Transkripti TCAST2 pojavljuju se isključivo kao piRNA.
6. TCAST1 piRNA i TCAST2 piRNA se nasljeđuju od majke.
7. Nakon toplinskog stresa ne dolazi do povećanja metilacije (H3K9me3) na regijama TCAST2, dok je kod TCAST1 metilacija povećana.
8. U brašnaru *T. castaneum* piRNA osim što nastaju iz transpozona mogu nastati i iz sporedne satelitske DNA TCAST2.
9. Sekvenciranje nove generacije daje dobre rezultate u analizi ponavljajućih sljedova.
10. Transkripti satelitskih DNA TCAST sudjeluju u formaciji heterokromatina.

7. LITERATURA

Ambrožová, K., Mandáková, T., Bureš, P., Neumann, P., Leitch, I.J., Koblížková, A., Macas, J., Lysak, M.A., Diverse retrotransposon families and an AT-rich satellite DNA revealed in giant genomes of *Fritillaria* lilies. *Ann. Bot.*, 2011, 107, 255–268.

Ansari S., Troelenberg N., Van Anh Dao, Richter T., Bucher G., Klingler M., Double abdomen in a short-germ insect: Zygotic control of axis formation revealed in the beetle *Tribolium castaneum*. *PNAS*, 2018, 115(8), 1819-1824.

Aravin, A. A. et al. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev. Cell*, 2003, 5, 337–350.

Benton, M. A., & Pavlopoulos, A., *Tribolium* embryo morphogenesis: may the force be with you. *Bioarchitecture*, 2014, 4(1), 16–21.

Biscotti, M.A., Canapa, A., Forconi, M., Olmo, E., Barucca, M. Transcription of tandemly repetitive DNA: Functional roles. *Chromosome Res.* 2015, 23, 463–477.

Brajković J, Feliciello I, Bruvo-Madžarić B, Ugarković Đ. Satellite DNA-like elements associated with genes within euchromatin of the beetle *Tribolium castaneum*. *G3 (Bethesda, Md.)*, 2012 2(8), 931-941.

Brajković J, Pezer Ž, Bruvo-Madžarić B, Sermek A, Feliciello I, Ugarković Đ. Dispersion Profiles and Gene Associations of Repetitive DNAs in the Euchromatin of the Beetle *Tribolium castaneum*. *G3 (Bethesda)*, 2018, 8(3), 875-886.

Bucher, G., Scholten, J., Klingler, M. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr. Biol.* 2002, 12, 85–86.

Charlesworth, B., Sniegowski, P. & Stephan, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 1994, 371, 215–220.

Dorer DR., Henikoff S, Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila.*, *Cell.*,1994, 77, 993–1002.

Feliciello I., Akrap I., Brajković J., Zlatar I., Ugarković Đ., Satellite DNA as a driver of population divergence in the red flour beetle *Tribolium castaneum.*, *Genome Biol Evol.*, 2014, 7(1), 228-239.

Feliciello I., Akrap I., Ugarković Đ., Satellite DNA Modulates Gene Expression in the Beetle *Tribolium castaneum* after Heat Stress., *PLOS Genetics*, 2015, 11(9), e1005547

Feliciello, I., Chinali, G., Ugarković, Đ., Structure and population dynamics of the major satellite DNA in the red flour beetle *Tribolium castaneum* . *Genetica*, 2011, 139, 999

Garrido-Ramos, M.A. Satellite DNA in Plants: More than Just Rubbish. *Cytogenet. Genome Res.* 2015, 146, 153–170.

- Ghildiyal, M., Zamore, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe., *Nature Rev. Genet.*, 2009, 10, 94–108.
- Herndon, N., Shelton, J., Gerischer, L., Ioannidis, P., Ninova, M., Dönitz, J., Waterhouse, R. M., Liang, C., Damm, C., Siemanowski, J., Kitzmann, P., Ulrich, J., Dippel, S., Oberhofer, G., Hu, Y., Schwirz, J., Schacht, M., Lehmann, S., Montino, A., ... Bucher, G., Enhanced genome assembly and a new official gene set for *Tribolium castaneum*., *BMC Genomics*, 2020, 21(1), 47.
- Hribová, E., Neumann, P., Matsumoto, T., Roux, N., Macas, J., Dolezel, J. Repetitive part of the banana (*Musa acuminata*) genome investigated by low-depth 454 sequencing., *BMC Plant Biol.*, 2010, 10, 204.
- Huang C.R., Burns K.H., Boeke J.D., Active transposition in genomes., *Annu Rev Genet.*, 2012, 46, 651-675.
- Kim, N. V., Han, J., Siomi M. C., Biogenesis of small RNAs in animals., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009, 10, 126–139.
- King L. M., Cummings M. P., Satellite DNA repeat sequence variation is low in three species of burying beetles in the genus *Nicrophorus* (Coleoptera: Silphidae)., *Molecular Biology and Evolution*, 1997, 14(11), 1088–1095,
- Koga A., Hirai Y., Terada S., Jahan I., Baicharoen A., Arsaithamkul V., Hirai H., Evolutionary Origin of Higher-Order Repeat Structure in Alpha-Satellite DNA of Primate Centromeres. *DNA Research*, 2014, 21(4), 407–415.
- Le Thomas, A. et al., Piwi induces piRNA-guided transcriptional silencing and establishment of a repressive chromatin state., *Genes Dev.*, 2013, 27, 390–399.
- Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V., The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993, 75, 843–854.
- Levy, S., Sutton, G., Ng, P.C., Feuk, L., Halpern, A.L., Walenz, B.P., Axelrod, N., Huang, J., Kirkness, E.F., Denisov, G., et al. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol.* 2007, 5, e254.
- Lewis SH, Quarles KA, Yang Y, et al., Pan-arthropod analysis reveals somatic piRNAs as an ancestral defence against transposable elements., *Nat Ecol Evol.*, 2018, 2(1), 174-181.
- Macas, J., Neumann, P., Navratilova, A., Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: Comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*., *BMC Genom.* 2007, 8, 427.
- Miga, K.H. Completing the human genome: The progress and challenge of satellite DNA assembly, *Chromosome Res.*, 2015, 23, 421–426.
- Ninova M, Griffiths-Jones S, Ronshaugen M., Abundant expression of somatic transposon-derived piRNAs throughout *Tribolium castaneum* embryogenesis., *Genome Biol.*, 2017, 18(1), 184.

- Novák, P., Neumann, P., Macas, J., Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data., *BMC Bioinform.*, 2010, 11, 378.
- Pavlek, M., Gelfand, Y., Plohl, M., Meštrović, N., Genome-wide analysis of tandem repeats in *Tribolium castaneum* genome reveals abundant and highly dynamic tandem repeat families with satellite DNA features in euchromatic chromosomal arms. *DNA Research*, 2015, 22(6), 387–401.
- Pecinka A., Dinh H., Baubec T., Rosa M., Lettner N., Scheid O.M., Epigenetic Regulation of Repetitive Elements Is Attenuated by Prolonged Heat Stress in *Arabidopsis*., *The Plant Cell*, 2010, 22(9), 3118-3129.
- Pezer Ž, Ugarković Đ., Satellite DNA-associated siRNAs as mediators of heat shock response in insects, *RNA Biology*, 2012, 9(5), 587-595.
- Pezer, Z., Brajković, J., Feliciello, I., Ugarković, Đ. Satellite DNA-Mediated Effects on Genome Regulation., *Genome Dyn.*, 2012, 7, 153–169
- Plohl M., Those mysterious sequences of satellite DNAs, *PERIODICUM BIOLOGORUM UDC*, 2010, 112(4), 57-61.
- Richards, S., Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Brown, S., Denell, R., Beeman, R. W., Gibbs, R., Bucher, G., Friedrich, M., Grimmelikhuijzen, C. J. P., Klingler, M., Lorenzen, M., Roth, S., Schröder, R., Tautz, D., Zdobnov, E. M., Muzny, D., Attaway, T., Bell, S., ... Grossmann, D. (2008). The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*., *Nature*, 452(7190), 949–955.
- Saito, K. et al. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome., 2006, *Genes Dev.* 20, 2214–2222.
- Savard, J., Tautz, D., Lercher, M. J. Genome-wide acceleration of protein evolution in flies (Diptera)., *BMC Evolutionary Biology*, 2006, 6, 7.
- Schweber M. S., The satellite bands of the DNA of *Drosophila virilis*, *Chromosoma*, 1974, 44, 371–382.
- Tomoyasu Y, Miller SC, Tomita S, Schoppmeier M, Grossmann D, Bucher G., Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology*. *Genome biology.*, 2008, 9. R10.
- Tomoyasu, Y., Denell, R. E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development., *Dev. Genes Evol.*, 2004, 214, 575–578.
- Ugarković Đ., Functional elements residing within satellite DNAs., *EMBO Rep.*, 2005, 6(11), 1035-1039.
- Ugarković Đ., Podnar M. Plohl M., Satellite DNA of the red flour beetle *Tribolium castaneum*--comparative study of satellites from the genus *Tribolium*, *Mol. Biol. Evol.*, 1996, 13(8), 1059-1066.

- Vagin, V. V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V. & Zamore, P. D. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline., *Science*, 2006, 313, 320–324.
- Volpe T. A., Kidner C., Hall I. M., Teng G., Grewal S. I., et al., Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi., *Science*, 2002, 297, 1833–1837.
- Wang, S., Lorenzen, M.D., Beeman, R.W. *et al.*, Analysis of repetitive DNA distribution patterns in the *Tribolium castaneum* genome., *Genome Biol* , 2008, 9, R61.
- Wei, K.H.C., Grenier, J.K., Barbash, D.A., Clark, A.G. Correlated variation and population differentiation in satellite DNA abundance among lines of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, 111, 18793–18798.
- Winnebeck E.C., Millar C.D., Warman G.R.. Why does insect RNA look degraded?. *J Insect Sci.*, 2010, 10, 159.
- Zakrzewski, F., Weisshaar, B., Fuchs, J., Bannack, E., Minoche, A.E., Dohm, J.C., Himmelbauer, H. and Schmidt, T., Epigenetic profiling of heterochromatic satellite DNA. *Chromosoma*, 2011, **120**, 409–422.

8. SAŽETAK

Genomi eukariotskih organizama sadrže veliki udio nekodirajućih sljedova DNA. Veći dio nekodirajućih sljedova čine različiti tipovi ponavljajućih sljedova DNA koji se mogu naći organizirani u uzastopnom ili raspršenom ponovljenom obliku. Satelitne DNA se sastoje od dugačkih nizova uzastopno ponovljenih monomera u orijentaciji glava-rep. Građevni su elementi centromernih, pericentromernih i telomernih regija kromosoma. U eukariotskim organizmima čine značajan dio genomske DNA

Brašnar *Tribolium castaneum* dobar je modelni organizam zbog jednostavnog uzgoja, kratkog generacijskog vremena i ima sekvencirani genom. Dobar je modelni organizam i za proučavanje ponavljajućih sljedova DNA. Glavna i sporedna satelitska DNA nalaze se na svim kromosomima u pericentromernom i centromernom području te čine oko 30 genoma.

Transkripcija satelitskih DNA je pokazana u mnogim vrstama i inducirana je različitim tipovima stresova, posebice toplinskim stresom. Glavna satelitska DNA pokazuje povećanu transkripciju nakon toplinskog stresa dok sporedna ostaje nepromijenjena.

Transkripti glavne satelitske DNA nakon toplinskog stresa dolaze u obliku siRNA, dok transkripti sporedne satelitske DNA u obliku piRNA. Pokazano je da nakon toplinskog stresa transkripti glavne satelitske DNA imaju ulogu u reorganizaciji heterokromatina što direktno utječe na regulaciju genske ekspresije, dok kod sporedne satelitske DNA to nije pokazano.

Tijekom embriogeneze transkripti glavne satelitske DNA se mijenjaju. Tijekom ranih stadija embriogeneze dolaze u obliku siRNA i piRNA, dok kod kasnijih stadija dominira siRNA, a kod odraslih isključivo dolazi u obliku siRNA. Transkripti sporedne satelitske DNA ne mijenjaju se tijekom embriogeneze i uvijek dolaze u obliku piRNA.

Transkripti glavne i sporedne satelitske DNA se nasljeđuju od majke te sudjeluju u formaciji heterokromatina.

9. SUMMARY

The genomes of eukaryotic organisms contain a large amount of non-coding DNA sequences. Most of the non-coding sequences are made up of different types of repetitive DNA sequences that can be either disperse or arranged in tandem. Satellite DNA consists of long arrays repeated monomers in head-tail orientation. They are the building blocks of centromeric, pericentromeric and telomeric regions of chromosomes. In eukaryotic organisms they form a significant part of genomic DNA.

Red flour beetle *Tribolium castaneum* is a good model organism due to its simple cultivation, short generation time and has a sequenced genome. It is also a good model organism for studying repetitive DNA sequences. The major and minor satellite DNAs are located on all chromosomes in the pericentromeric and centromeric regions and make up about 30% of genome.

Satellite DNA transcription has been shown in many species and is induced by different types of stress, especially heat stress. The major satellite DNA shows increased transcription after heat stress while the minor remains unchanged.

Transcripts of major satellite DNA after heat stress come in the form of siRNA, while transcripts of minor satellite DNA come in the form of piRNA. It has been shown that after heat stress, the transcripts of the main satellite DNA play a role in the reorganization of heterochromatin, which directly affects the regulation of gene expression, while in the case of minor satellite DNA, this has not been shown.

During embryogenesis, the transcripts of the major satellite DNA are dependent of developmental stage. During the early stages of embryogenesis they comes in the form of siRNA and piRNA, while in the later stages siRNA dominates, and in adults it comes exclusively in the form of siRNA. Transcripts of minor satellite DNA do not change during embryogenesis and always come in the form of piRNA.

Transcripts of major and minor satellite DNA are inherited from the mother and participate in the formation of heterochromatin.

10. ŽIVOTOPIS

Obrazovanje

2016. godina – danas

Doktorand - poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti , Sveučilište Josip Juraj Strossmayer, Osijek (Hrvatska)

2013. – 2015. godine

Magistar kemije (mag. chem.)

Sveučilišni istraživački diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Sveučilište u Zagrebu, grane: analitička kemija i biokemija

2009. – 2013. godine

Sveučilišni prvostupnik kemije (univ. Bacc. Chem.)

Preddiplomski studij Kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Sveučilište u Zagrebu

Radno iskustvo

01/11/2016 – danas

Suradničko radno mjesto asistenta na HRZZ projektu „Satelitska DNA u genskoj regulaciji i ekološkoj adaptaciji“, Laboratorij za evolucijsku genetiku, Zavod za molekularnu biologiju, Institutu Ruđer Bošković

Popis objavljenih znanstvenih radova

Brajković J., Pezer Ž., Bruvo-Mađarić B., **Sermek A.**, Feliciello I., Ugarković Đ. (2018) Dispersion profiles and gene associations of repetitive DNAs in the euchromatin of the beetle *Tribolium castaneum*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 8 : 875-886. (Q2; 5 year IF 3.508)

Feliciello I., **Sermek A.**, Pezer Ž., Matulić M., Ugarković Đ. (2020) Heat stress affects H3K9me3 level at human alpha satellite DNA repeats. *Genes* 11:663 (Q2, IF 3.822)

Popis aktivnih sudjelovanja na kongresima

Sermek A., Feliciello I., Ugarković Đ. Transcriptional activity of repetitive families in the beetle *Tribolium castaneum*. 4th Congress of Croatian Genetisists with international participation. Book of Abstracts. Krk, 26-29.9.2018.

Sermek A., Feliciello I., Ugarković Đ. Satellite DNA-derived siRNAs and piRNAs: differential processing and induction of satellite DNA transcripts in the beetle *Tribolium castaneum*. EMBO/EMBL Symposium: The Non-Coding Genome. Book of Abstracts. Heidelberg, 16-19.10.2019.