

Utvrđivanje gena s domenama MATH i BTB u genomu bundeve (Cucurbita pepo L.)

Gulin, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2009

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:745701>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2021-08-05**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Maja Gulin

**Utvrdjivanje gena s domenama MATH i BTB u
genomu bundeve (*Cucurbita pepo* L.)**

Diplomski rad

Zagreb, 2009. godina

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za kulturu biljnog tkiva na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Nataše Bauer.

Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. inž. biologije, smjer molekularna biologija.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Nataši Bauer, koja je vodila ovaj rad, na brojnim praktičnim savjetima, razumijevanju i pomoći tijekom eksperimentalnog rada u laboratoriju.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Dunji Leljak-Levani, koja je osmislila ovaj rad, na brojnim savjetima i znanstvenoj izobrazbi.

Od srca se zahvaljujem svojim roditeljima, rodbini, prijateljima i deku na podršci tijekom studija i izrade ovog rada.

Zagreb, 2009.

Maja Gulin

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UTVRĐENJE IZRAŽAVANJA I FUNKCIJE GENA S DOMENAMA MATH I BTB U GENOMU BUNDEVE (*Cucurbita pepo* L.)

Maja Gulin

Prirodoslovno-matematički fakultet
Horvatovac 102
Zavod za molekularnu biologiju
HR-10000 Zagreb, Hrvatska

Proteini s domenama MATH i BTB (MAB) su od iznimne važnosti u embrionalnom razvoju mnogih vrsta. Upleteni su i u uspostavljanje reda mreže kortikalnih mikrotubularnih niti koje izgrađuju vreteno tijekom stanične diobe. Pored toga, oni su dio kompleksa kulin E3 ligaze, kojoj pored toga imaju specifičnost prema različitim supstratima i sudjeluju u njihovoj razgradnji. Cilj ovog rada bio je identificirati gene *MAB* u genomu bundeve *C. pepo*. Služe i se slijedom gena *BPM1* iz vrste *A. thaliana*, konstruirane su probe za hibridizaciju po Southernu pomoću u kojih je dokazana postojanost homolognih gena u vrste *C. pepo*. Na temelju slika se određuje sekvenci gena s MATH i BTB domenama iz različitih biljnih vrsta konstruirane su degenerirane probe koje su upotrijebljene za umnažanje gena u bundevi. Degeneriranim probojnicama na kalupu genomske DNA bundeve umnožene su pomoću ugenske razmaknice ribosomalnih gena, dok na kalupu komplementarne DNA embriogenog tkiva bundeve nije bilo moguće umnožiti gene *MAB*.

61 stranica, 16 slika, 5 tablica, 26 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u:

Ključne riječi: proteinske domene MATH i BTB, MEL-26, BPM, *C. pepo*, ligaza E3 ovisna o kulinu, protein TaMAB

Voditelj: Doc. dr. sc. Nataša Bauer

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Nataša Bauer
Prof. dr. sc. Gordana Lacković Venturin
Doc. dr. sc. Mirna Turković Perica

Rad prihvaćen: 11.11.2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

DETERMINING MATH AND BTB CONTAINING GENES IN THE GENOME OF THE PUMPKIN (*Cucurbita pepo* L.)

Maja Gulin

Faculty of Science.
Department of Molecular Biology
Horvatovac 102
HR-10000 Zagreb, Croatia

MATH-BTB domain-containing proteins (MAB) are essentially important in a variety of species during the time of embryogenesis and post-embryonic development. Also, MAB proteins are involved in establishing the order within the cortical microtubule network which builds the spindle during the cell division, and increase the specificity of cullin E3 ligase against different substrates. Because of its importance, the aim of this study was to investigate the existence of genes with the MATH and BTB domains in the *C. pepo* genome. Using the gene sequence of the *BPM1* gene from *A. thaliana*, the probes for the Southern hybridization were constructed and *MAB* genes were identified in *C. pepo*. Based on similarities between different *MAB* gene sequences, primers were constructed for amplification of homologous genes in pumpkin. Using genomic DNA as template, intergenic spacers of ribosomal genes were amplified, and using complementary DNA from embryonic pumpkin tissue as template, no gene was amplified.

61 pages, 16 figures, 5 tables, 26 references, original in: Croatian

Thesis deposited in:

Key words: protein domains MATH and BTB, MEL-26, *BPM*, *C. pepo*, cullin3-based E3 ligase, TaMAB proteins

Supervisor: Doc. dr. sc. Nataša Bauer, doc.

Reviewers: Doc. dr. sc. Nataša Bauer
Prof. dr. sc. Gordana Lacković Venturin
Doc. dr. sc. Mirna Urković Perica

Thesis accepted: 11.11.2009.

POPIS KRATICA

ARF	od eng. Auxin Response Factor
Aux1	od eng. Auxin Influx carrier 1
BBK	od eng BTB – BACK – Kelch protein
BCL6	od eng. B-Cell Lymphoma 6 protein
BPM	BTB/POZ-MATH protein
BTB	od eng. Bric-a-brac, Tramtrack and Broadkomplex
BTB-NPH3	BTB - nefototropski hipokotilni protein
BTB-ZF	od eng. BTB - zinc finger proteini
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (od eng. complementary Deoxyribonucleic Acid)
Cul3	Kulin 3
dNTP	deoksiribonukleotid-3-fosfat
IL-1	Interleukin 1
NF kappaB	od eng. Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
MAB	<u>M</u> ATH- <u>B</u> TB protein
MAP	od engl. Microtubule-Associated Proteins
MAPKK	od eng. Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MATH	od eng. Mephrins and TRAF homology
mRNA	glasni ka ribonukleinska kiselina (od eng. messenger Ribonucleic Acid)

MEL-26	od eng. Maternal Effect Lethal
PCR	lan ana reakcija polimerazom (od eng. Polymerase Chain Reaction)
PIN	proteini koji prenose auksin od eng. PIN auxin efflux carriers,
PLZF	od eng. Promyelocytic Leukemia Zinc Finger protein
POZ	od eng. Pox virus and Zinc finger
RBX1	od eng. Ring-Box protein 1
SCF	Skp1, CDC53, i F-box scaffold protein
Spop	od eng. Speckle-type POZ protein
TD	od eng. TRAF domain
TIR1	od eng. Transport Inhibitor Response 1
TRAF	od eng. Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor
WOX	od eng. <u>WUSCHEL</u> related homeobox

SADRŽAJ

1	UVOD	10
1.1	Osnovne značajke domena MATH i BTB	11
1.2	Strukturalne značajke gena i proteina MAB	12
1.2.1	Opis strukture proteina MAB.....	12
1.2.2	Uloga proteina MAB u ubikvitinaciji proteina.....	15
1.2.3	Specijalizacija proteina MAB kod jednosupnica odnosno dvosupnica	16
1.3	Zigotna i somatska embriogeneza	17
1.4	Cilj istraživanja	19
2	MATERIJALI I METODE	20
2.1	Materijali.....	21
2.1.1	Kemikalije.....	21
2.1.1.1	Po etnice.....	21
2.1.1.2	Enzimi.....	21
2.1.1.3	Puferi.....	21
2.1.1.4	Komercijalni kompleti.....	22
2.1.1.5	Ostale kemikalije.....	23
2.1.2	Stanice.....	23
2.1.3	Plazmidni vektori.....	23
2.1.4	Hranjive podloge.....	24
2.1.5	Programski paketi.....	24
2.2	Metode.....	25
2.2.1	Izolacija genomske DNA.....	25
2.2.2	Izolacija plazmidne DNA.....	25
2.2.3	Izolacija RNA.....	25
2.2.4	Reverzna transkripcija na kalupu mRNA bundeve.....	26
2.2.5	Razgradnja DNA restrikcijskim enzimima.....	27
2.2.5.1	Razgradnja genomske DNA.....	27

2.2.5.2	Razgradnja plazmidne DNA.....	28
2.2.6	Elektroforeza DNA u agaroznom gelu.....	28
2.2.7	Detekcija gena <i>MAB</i> u genomu bundeve hibridizacijom po Southernu.....	29
2.2.7.1	Prijenos DNA s gela na membranu.....	29
2.2.7.2	Konstrukcija proba za hibridizaciju po Southernu.....	29
2.2.7.3	Obilježavanje proba.....	30
2.2.7.4	Hibridizacija.....	31
2.2.7.5	Detekcija.....	31
2.2.8	Reakcije PCR na kalupu genomske DNA bundeve <i>C. pepo</i>	32
2.2.9	Reakcije PCR na kalupu cDNA bundeve <i>C. pepo</i>	33
2.2.10	Ugradnja PCR produkta u vektorski plazmid.....	35
2.2.11	Transformacija bakterija.....	35
2.2.12	Umnažanje plazmidnih vektora pCR CpMAB u bakterijama.....	36
3	REZULTATI.....	37
3.1	Detekcija gena <i>MAB</i> u genomu bundeve hibridizacijom po Southernu	38
3.2	Umnažanje gena <i>MAB</i> u genomu bundeve <i>C. pepo</i>	41
3.2.1	Dizajniranje degeneriranih početnica.....	41
3.2.2	Izolacija genomske DNA bundeve	44
3.2.3	PCR reakcija na kalupu genomske DNA bundeve	44
3.2.4	Analiza odsječaka DNA dobivenih u reakciji PCR upotrebom degeneriranih MAB početnica i genomske DNA bundeve kao kalupa	45
3.3	PCR reakcije na kalupu cDNA iz embrionalnog kalusa bundeve	48
3.3.1	Izolacija mRNA i sinteza cDNA	48
4	RASPRAVA.....	51
4.1.	Važnost gena s domenama MATH i BTB i njihova posljedica na konzervaciju	52
4.2.	Detekcija gena s domenama MATH i BTB u genomu bundeve <i>C. pepo</i>	53
5	ZAKLJUČAK	55
6	LITERATURA.....	57

1 UVOD

1.1 Osnovne značajke domena MATH i BTB

Motiv MATH (od eng. Mephrins and TRAF) slijed je aminokiselina pronađen u trimernom TRAF-C (od eng. Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor) proteinu i C-terminalnoj regiji tetramernih meprina A i B. Proteini TRAF i meprini su potpuno različite funkcije. Receptori TRAF povezani s receptorom TNF-a (od eng. Tumor Necrosis Factor), reguliraju stanični rast i apoptozu vežu i se s membranski vezanim receptorima (Bradley i Pober 2001). Meprini su tkivno-specifične metaloendopeptidaze koje se pojavljuju u normalnim razvojnim i patološkim procesima te hidroliziraju različite peptide i proteine. Aminokiseline uključene u oligomerizaciju domena TRAF u trimerni protein TRAF-C odnosno četiri domene meprina A u tetramerni protein meprin A su vrlo konzervirane, pa su im najvjerojatnije upravo te oligomerizacijske površine zajedničke (Sunnerhagen i sur. 2002). Filogenetske analize domene MATH ukazuju na njezinu dugu evolucijsku povijest i prisutnost u različitim proteinima (Uren i Vaux 1996). Vjerojatno su evoluirale paralelno s određenim putevima proteolize, jer su gotovo sve obitelji proteina koje sadrže domenu MATH upletene u procesiranje i ubikvitinaciju proteina (Zapata i sur. 2007).

Domena BTB (također poznata i kao domena POZ) je prvotno bila određena kao konzervirani motiv u „Bric-a-brac, Tramtrack i Broadkomplex“ transkripcijskim regulatorima vrste *Drosophila melanogaster* i u proteinima „zinc finger“ mnogih virusa boginja (Godt i sur. 1993). Najvjerojatnije je nastala nakon odvajanja eukariota jer još nije pronađena u arheobakterijama ni bakterijama, osim u vrsti *Candidatus Protochlamidya amoebophila*, endosimbiontu amebe, koji je najvjerojatnije ishodište ove domene (Collingro i sur. 2004). Poznate su brojne različite funkcije ove domene, uključuju i represiju transkripcije, regulaciju citoskeleta, tetramerizaciju i otvaranje ionskih kanala te ubikvitinaciju i degradiranje proteina. Nadalje, nedavno je otkriveno da su BTB proteini interakcijski partneri kulin3-ovisnog-SCF-uvijetnog kompleksa ubikvitinske ligaze E3 (Perez-Torrado i sur. 2006).

Strukture svih domena BTB su vrlo dobro konzervirane u svojoj cjelokupnoj tercijarnoj strukturi ali zato postoji vrlo malo sličnosti između aminokiselinskih slijedova pripadnika različitih obitelji. Središnji dio domene BTB od približno 95 aminokiselina je osnova i sastoji se od 5 heliksa koji djelomično izgrađuju dvije

ukosnice te jednog tro lanog nabranog lista. Samo deset aminokiselina iz unutrašnjosti domene je konzervirano, dok su ostale aminokiseline varijabilne i o njima ovise vezne sposobnosti domene (Stogios i sur. 2005).

Osim u proteinima kao što su Skp1, koji je uključen u razgradnju proteina, te Elongin C, koji kontrolira elongaciju transkripcije gdje domena BTB dolazi samostalno, ova domena najčešće dolazi u kombinaciji s drugim proteinskim domenama (Perez-Torrado i sur. 2006). Često dolazi u obliku heterogenih oligomera, u interakciji sa do dvadesetak drugih različitih domena. Tako postoje kombinacije s domenom Kelch (BBK proteini), domenom NPH3 (NPH3-BTB proteini), prijenosnicima iona (T1 proteini) i „zinc finger“ (BTB-ZF ili POZ) proteinima. Rasprostranjenost im je vrlo raznolika. Vrsta *Arabidopsis thaliana* ukupno ima 80-tak proteina s domenom BTB, od toga, primjerice, ima puno različitih BTB-NPH3 proteina (prisutni su samo u toj vrsti), ali zato uopće nema BBK i BTB-ZF proteine. U vrste *Caenorhabditis elegans* također nema BBK ni BTB-ZF proteina, ali ima iznimno mnogo različitih MAB (Perez-Torrado i sur. 2006).

1.2 Strukturalne značajke gena i proteina MAB

1.2.1 Opis strukture proteina MAB

Obitelj proteina MAB karakterizira sličan sadržaj i raspored proteinskih domena MATH i BTB. Sastoje se od domene MATH na N-kraju te BTB domene na C-kraju (Huang i sur. 2004). Domena MATH služi kao dio koji prepoznaje supstrat u kompleksu ubikvitinske ligaze ovisne o kulinu 3. Spajanje domena MATH i BTB je evolucijski gledano vrlo povoljan proces jer je kombinacija tih dviju domena jedna od najčešćih kombinacija različitih domena među proteinima (Gingerich i sur. 2007). Proteini MAB se razlikuju od ostalih BTB proteina u tome što njihove domene BTB imaju dodatnih 70-100 aminokiselina koje se najčešće strukturiraju u formu α heliksa, te su za razliku od BBK i BTB-ZF proteina vrlo konzervirani. Zbog toga je moguće filogenetičko klasteriranje cijelovitih proteina sa sigurnošću se može vjerno pokazati

razgrani enje izme u vrste *Caenorhabditis elegans*, koja ima velik broj razli itih proteina MAB te ostalih vrsta (Stogios i sur. 2005).

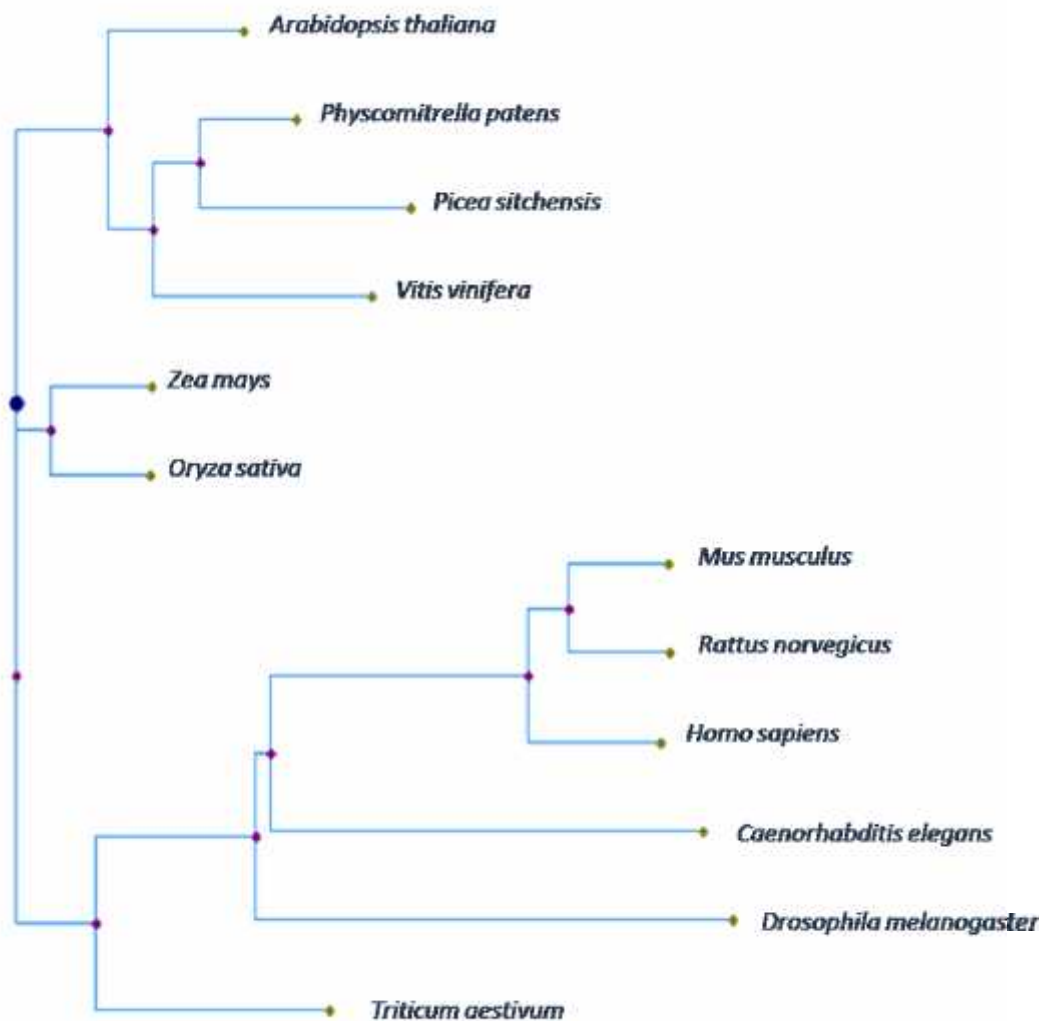
Proteini MAB su dakle jako zastupljeni u vrsti *C. elegans* gdje ak 46 od ukupnih 178 proteina BTB pripada ovoj obitelji. Nadalje, pretpostavlja se da proteini MAB stvaraju homodimere preko domene BTB, jer postoje brojni biološki i biokemijski dokazi koji govore o važnosti dimerizacije proteina MAB za njegovu biološku funkciju, primjerice za funkcionalnost važnog regulatornog proteina MEL-26 („Maternal Effect Lethal-26“) iz vrste *C. elegans*, koji je jedini poznati funkcionalno opisani protein MAB (Stogios i sur. 2005).

Nadalje kao jako važan MAB protein u mišu *Mus musculus* treba spomenuti 365 aminokiselina dug protein TDPOZ1 sli an evolucijski konzerviranom proteinu Spop (Nagai i sur. 1997), koji ima homologe u vrstama kao što su *H. sapiens*, *C. elegans* i *D. melanogaster*. Filogenetska srodnost me u proteinima MAB spomenutih vrsta može se primijetiti na slici 1. U genomu miša postoji bar 8 homologa *TDPOZ* gena, koji se sastoje od domena TRAF i POZ. Prepisuju se u ranim embrionalnim stadijima, na razini dvostani nog embrija, kad je najaktivniji genom zigote (Huang i sur. 2004). Za razliku od mišjih, neki štakorski *RTDPOZ* geni se prepisuju i u odraslim organima i tkivima (Choo i sur. 2007).

U genomu biljke *Arabidopsis thaliana* postoji 6 razli itih proteina MAB, tzv. proteini BPM. Prema aminokiselinskom slijedu, humanim proteinima Spop sli e otprilike 30% (Nagai i sur. 1997). Svih 6 pripadnika obitelji BPM su vrlo konzervirani, dužine oko 415 aminokiselina i mase oko 45 kDa (Weber i sur. 2005).

Za razliku od uro njaka *A. thaliana* koji kodira za samo 6 proteina MAB, genom riže *Oryza sativa* spp *japonica* cv Nipponbare kodira ak 69 razli itih neposrednih proteina MAB, 5 dodatnih proteina srodnih domeni MATH i još 41 pseudogen (Gingerich i sur. 2007).

Na filogenetskom stablu postoje tri ogranka koji razvrstavaju gene *MAB* iz razli itih vrsta prema njihovoj sli nosti. Jedan ogranak zahva a sve životinjske gene *MAB*, drugi gene *MAB* iz jednosupnica kao što su riža i kukuruz, a tre i gene *MAB* iz ostalih biljnih vrsta (Gingerich i sur. 2007) (slika 1).



Slika 1. Filogenetsko stablo srodnosti gena *MAB* nekih biljnih i životinjskih vrsta (*Arabidopsis thaliana*; At5g19000, *Physcomitrella patens*; XM_001772196, *Picea sitchensis*; EF677100, *Vitis vinifera*; XM_002277112, *Zea mays*; PC0096759, *Oryza sativa*; Os08g0406600, *Mus musculus*; BAB6842, *Rattus norvegicus*; RGD1559714, *Homo sapiens*; CAA04199, *Caenorhabditis elegans*; P34568, *Drosophila melanogaster*; AAF5507, *Triticum aestivum*; FJ515275). Nukleotidni slijedovei navedenih gena srađnati su u programu ClustalW, a filogenetsko stablo napravljeno je pomoću programa Treeview.

1.2.2 Uloga proteina MAB u ubikvitinaciji proteina

Ubikvitinska E3 ligaza ovisna o kulinu igra vrlo važnu ulogu u regulaciji različitih procesa razvoja i odgovora na u okoliša u eukariotskim organizmima. Kulin povezuje protein RBX1 (koji sudjeluje u vezanju ubikvitina na supstrat) i protein s domenom BTB (koji prepoznaje supstrat) i na taj način stvara novu obitelj E3 ligaza (Weber i sur. 2005). Protein MAB vrste *C. elegans*, to nije MEL-26, je zaseban protein u kompleksu ubikvitinske ligaze E3 pri čemu domena BTB intereagira s kulinom a domena MATH sa supstratom. Funkcija proteina MEL-26 je naročito bitna kod rane embriogeneze jer regulira mikrotubularni citoskelet tako da razgrađuje kataninu-slične proteine MEI-1 i MEI-2 (Luke-Glaser i sur. 2005; Clark-Maguire i Manis 1994). Proteini MEI su bitni za stvaranje bipolarnog vretena u nedostatku centrosoma tijekom mejoze te nakon mejoze zaostaju u jajnoj stanici. Uklanjanje se ubikvitinacijom i posljedičnom razgradnjom proteina prije nastupa prve mitotske diobe (Kurz i sur. 2002). Funkcija razgradnje suvišnih proteina najvjerojatnije vrijedi i za biljne proteine MAB. U genomu uro njaka postoji najmanje 80 proteina koji sadrže domenu BTB, pri čemu je domena BTB kodirana genom *At1g21780* najbliža domeni BTB iz gena *MEL-26* vrste *C. elegans* sa 35% sekventne identičnosti. Zbog nazočnosti velikog broja BTB proteina sa različitom strukturom i načinom ekspresije, smatra se da je uro njak sa uvao i konzervirao AtCUL3-RBX1-BTB ubikvitinsku ligazu E3 da bi mogao razgraditi različite proteinske supstrate (Weber i sur. 2005). Filogenetičkim istraživanjima 6 BTB proteina uro njaka utvrđeno je da postoje tri glavne grane proteina MAB (Gingerich i sur. 2005). Geni *MAB* iz pšenice *Triticum aestivum* i kukuruza *Zea mays* se prepisuju samo za vrijeme ranih stupnjeva oogeneze i embriogeneze u određenim stanicama embrionske vreće, što ukazuje na njihovu važnost za razvoj gametofita, oplodnju i početak embriogeneze. Iako se još ne zna točna uloga *TaMAB2* gena u uspostavljanju stanične polarnosti i asimetrične diobe, pokazalo se da se protein TaMAB2 u stanicama raspoređuje polarno pa je moguće da je uključen u uspostavljanje asimetrije prilikom premještanja mikrotubula, koje prethodi prvoj diobi zigote. Proteini MAB intereagiraju s proteinom kulin 3 pa se stoga može pretpostaviti da MAB proteini ostvaruju svoju funkciju putem mehanizama ubikvitinske razgradnje još nepoznatih ciljnih proteina (Leljak-Levani i sur. neobjavljeni rad; Šumanovac diplomski rad 2009).

Posljedice nefunkcionalnosti proteina MAB također ukazuju na njihovu veliku važnost za vrijeme rane embriogeneze. Naime u embrionalnim stanicama nematoda *C. elegans* dolazi do akumulacije MEI-1 nakon razgradnje proteina MEL-26 i kulina 3 interferencijom RNA, čime se onemogućuje sastavljanje mitotičkog vretena zigote i sama citokineza jednostaničnog embrija (Kurz i sur. 2002). Ipak, u biljnom tkivu ne dođe i do nakupljanja proteina nalik kataninu, a time ni do zastoja u embrionalnom razvoju (Dieterle i sur. 2005).

Iako do danas nije poznata prava funkcija mišjeg proteina TDPOZ bitno je napomenuti da domena POZ iz proteina PLZF i BCL6 intereagira direktno s ubikvitinskim faktorom Sp1 (Lee i sur. 2005), koji doprinosi sazrijevanju jajne stanice i razvoju ranih embrija miševa (Wang i Latham 2000) što opet ukazuje na sličnosti s proteinima MAB iz drugih vrsta.

1.2.3 Specijalizacija proteina MAB kod jednosupnica odnosno dvosupnica

Usporedbom aminokiselinskih slijedova riže i uro njaka otkrila se velika sličnost između regija za prepoznavanje supstrata. U vremenu od odvajanja razvojnih linija uro njaka i riže pojavile su se brojne duplikacije i delecije gena, što govori o mogućnosti stvaranja i razvijanja specijalizacija unutar individualnih obitelji gena *BTB*. Na taj način je došlo do širenja proteinskih obitelji gena *BTB* i do njihovog mijenjanja. Mijenjanje gena s domenama MATH i BTB je počelo u vrijeme kad su se razile jednosupnice od dvosupnica. Čini se da su ti geni evoluirali kako bi se adaptirali na nove supstrate (novi patogeni proteini) koje je trebalo ubikvitinirati. Superobitelj gena *BTB* riže broji čak 86% gena više nego uro njak (Gingerich i sur. 2005), što može biti posljedica ili povećanja broja gena u rižinom genomu ili/i gubitka gena u uro njaku nakon odvajanja dvosupnica i jednosupnica. Proteini BTB iz riže i uro njaka dobiveni su iz zajedničkog pretka, a to se može vidjeti i na slici 1. U njihovoj evoluciji je došlo do tri ekspanzije, a jedna od njih je i dramatična ekspanzija i separacija obitelji gena *MAB* u riži, iz čega je proizašlo da *A. thaliana* kodira za samo 6, a *O. sativa* za čak 69 različitih proteina MAB. Ekspanzija genske superobitelji riže je skoro u potpunosti rezultat dramatičnog vrsno-specifičnog umnažanja gena *MAB*. Duplikacija gena *MAB* odvijala se 50 puta brže od normalne duplikacije gena kod eukariota (Lynch i Conery 2000). *Physcomitrella*, *Selaginella*, *Medicago*, topola i bor

sa svojim genima *MAB* pripadaju istom kladu zajedno sa 6 gena *BPM* iz genoma uro njaka i 4 gena *MAB* iz genoma riže. Geni *MAB* riže združuju se s genima *MAB* siraka i jednim genom pšenice što ukazuje na injenu da su oni zasigurno nastali kao adaptacija i specijalizacija jednosupnica. Najvjerojatnije su se progenitori ekspanzije *MAB* grupe gena iz jednosupnica prvotno pojavili retropozicijom i onda se proširili tandemsom duplikacijom (Gingerich i sur. 2007).

1.3 Zigotna i somatska embriogeneza

Embriogeneza se u prirodi normalno događa kao rezultat spolnog razmnožavanja i stvaranja zigotnog embrija. Embrio se zajedno s ostalim stanicama mati ne biljke razvija u sjemenku odnosno slijede u generaciju, koja nakon klijanja izrasta u novu biljku. Embriogeneza se može podijeliti u dvije faze: prva po inje nastankom zigote i završava kotiledonarnim stadijem, a druga uključuje postembrionalni rast stanica i prikupljanje hranjivih tvari za klijanje sjemenja i rast mlade biljke. Embriogeneza uključuje stanični rast i diobe, staničnu diferencijaciju i programiranu staničnu smrt (Dodeman i sur. 1997). Za nastajanje normalnog embrija vrlo je bitna regulacija polarnosti. Postoje dva različita mehanizma koja održavaju asimetričnu diobu embrionalnih stanica kod biljaka. Prvi mehanizam je zasnovan na injenici da se imbenici koji određuju sudbinu stanica keri nejednako naslijeđuju jer su u majinskoj stanici bili nejednako raspodijeljeni. U tom slučaju na sudbinu stanica keri utječu unutrašnji faktori. Npr. kod diobe zigote ključna asimetričnost leži u samoj najnoj stanici prije oplodnje. Kod drugog mehanizma stanice keri su identične i imaju jednak potencijal za razvoj, ali se zbog interakcija s okolinom diferenciraju, pa na sudbinu stanica djeluju i vanjski faktori. Regulacija se dakle može postići faktorima iz unutrašnjosti stanice ali i faktorima koji dolaze iz okoline. Takvih faktora ima mnogo, ali postoje oni koji se pojavljuju češće nego drugi. Geni *WOX* (od eng. *WUSCHEL* related homeobox) su unutrašnji faktori koji su uključeni u asimetričnu podjelu zigote i osnivačke stanice obnog korijena te stvaranje progenitora matičnih stanica korijena. Drugi važan unutrašnji faktor je *MAPKK* (od eng. *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*) kinaza i njen signalni put (Heidstra 2007). Auksin je ključni regulator polarnosti biljnih stanica koji djeluje iznutra, ali i izvana. Mehanizam kojim auksini postižu tu polarnost se zasniva na uspostavljanju gradijenta auksina. Auksini se

prenose preko nejednako rasprostranjenih transportnih proteina PIN i AUX. Polarna lokalizacija PIN proteina je kontrolirana samim razvojem, ali i vanjskim utjecajima. Budući da auksin utječe na polariziranu rasprostranjenost transportnih proteina PIN može se reći da auksin djeluje kao autoregulacijski signal kod uspostavljanja polarnog transporta i usmjerenog toka (Gao i sur. 2008). Nadalje vezanje auksina na receptor TIR1 (od eng. Transport Inhibitor Response 1) dovodi ih u vezu sa ubikvitinskom SCF ligazom, jer je TIR1 podjedinica ligaze. Vezanjem auksina za SCF ligazu potiče se razgradnja transkripcijskih represora Aux/IAA. Proteini Aux/IAA se vežu na ARF (od eng. Auxin Response Factor) i inhibiraju transkripciju specifičnih gena za odgovor na auksin. Kako se povećava koncentracija auksina unutar stanice dolazi do jačeg vezanja auksina na TIR1 uzrokujući vezanje proteina Aux/IAA na TIR1 i time do njihove zajedničke razgradnje putem proteasoma (Heidstra 2007).

Zigotni embrio nastaje putem dvostruke oplodnje unutar ženskog gametofita i nastaju dvije strukture: embrio i endosperm, koji zajedno čine sjemenku. No sjemenke se mogu također dobiti i nespolnim putem, apomiksijom, a biljne stanice se mogu inducirati na stvaranje embrija u kulturi tkiva pa se takvi embriji nazivaju somatskim embrijima (Dodeman i sur. 1997). Upravo zbog toga što se somatski embriji razvijaju iz somatskih stanica biljke, doći će do narušavanja polarnosti embrija zbog nepostojanosti polarnog ženskog gametofita u kojemu se zigotni embriji normalno razvijaju. U tom kontekstu ženski gametofit djeluje kao vanjski faktor. Nakon oplodnje, zigota se asimetrično podijeli i nastaje mala apikalna stanica koja postaje embrio i velika bazalna stanica ili suspensor koja pomaže embriju u prikupljanju hranjivih tvari iz endosperma. Na taj način nastaje osnovna apikalno-bazalna os ustrojstva biljnog organizma. Asimetrične stanice diobe su jednako važne za razvoj somatskih embrija kao i zigotnih embrija, ali nemogućnost stvaranja suspensora bit će letalna samo za zigotne embrije (Dodeman i sur. 1997).

1.4 Cilj istraživanja

Obzirom na dosada opisanu funkciju proteina MAB u različitim organizmima koja se ostvaruje već na početku diobe zigote, najvjerojatnije tijekom uspostave polarnosti ili kasnije tijekom embrionalnog razvitka, cilj ovog istraživanja bio je identificirati gene *MAB* u genomu bundeve *C. pepo*. Ovi rezultati nadalje omogućiti će utvrđivanje funkcije gena *MAB* tijekom somatske embriogeneze.

2 MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Kemikalije

2.1.1.1 *Po etnice*

- uniMATHfw: AAGTATCGBGGVAGCATGTGG
- uniBTBrev: TGGTTCTTGCAGCDCGHTC
- uniBPM6rev: AANCGYTTGTADCCCCAC
- uniBPM652rev: GAWCGWGCAGCAARWACCAAYTT
- uniBPM770rev: TCYYWRTARATRAARTGKAGCA
- GAPDHfw: TAGCAAGGACTGGAGAGGTG
- GAPDHrev: TCATAGGATGCTGCCTTCTC

2.1.1.2 *Enzimi*

- *EcoRI* (Fermentas)
- *HindIII* (Fermentas)
- *BamHI* (Fermentas)
- *XbaI* (Fermentas)
- *Taq* polimeraza (Fermentas)
- HotStart Go *Taq* polimeraza (Promega)
- *Pfu* polimeraza (Stratagene)
- Reverzna transkriptaza RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas)

2.1.1.3 *Puferi*

Prilikom elektroforeze u gelu agaroze upotrijebila sam:

- TAE pufer (pH 8: 40 mM Tris, 20 mM natrij acetat, 2 mM EDTA)
- Pufer za nanošenje uzoraka na agarozni gel 6 x Loading dye (Fermentas)
- DNA marker *GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus* (Fermentas) s fragmentima molekularne mase 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031, 1200, 1500, 2000 i 3000 pb

- DNA marker *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Fermentas) s fragmentima molekularne mase 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000 i 10000 pb

Uz enzime sam po preporuci proizvođača upotrijebila pripadajuće puferne:

- Pufer za *EcoRI* enzim (Fermentas)
- Pufer za *HindIII* restrikcijski enzim (Fermentas)
- Pufer R uz *BamHI* (Fermentas)
- Pufer *Tango* (2 x) za enzim *XbaI* (Fermentas)
- Pufer (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) za *Taq* polimerazu (Fermentas)
- Pufer za *Pfu* polimerazu (Stratagene)

Za hibridizacijsku analizu po Southernu koristila sam:

- Predhibridizacijski pufer (5 x SSC, 0,1 g/l SDS, 5 g/l dekstran sulfat, 20 x razrijeđeni liquid block)
- 20 x SSC pufer (pH 9,5: 175 g/l NaCl, 88 g/l natrij citrat, 10 M NaOH)
- Detekcijski pufer A (pH 9,5: 10 mM Tris, 300 mM NaCl, steriliziran autoklaviranjem)

2.1.1.4 *Komercijalni kompleti*

- Za izolaciju biljne DNA koristila sam *DNEasy Plant Mini Kit* (Qiagen).
- Za izolaciju plazmidne DNA koristila sam *Wizard Plus SV Miniprep Kit* (Promega).
- Za obilježavanje probe i detekciju DNA u hibridizaciji po Southernu koristila sam *Amersham Gene Images AlkPhos Labelling and Detection System* (GE Healthcare) kit.
- Za izolaciju mRNA koristila sam *Dynabeads mRNA Direct Micro Kit* (Dyna).
- Za kloniranje PCR fragmenata koristila sam *pCR II-Blunt Topo kit* (Invitrogen).
- Za izolaciju DNA fragmenata iz agaroznog gela koristila sam *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

2.1.1.5 Ostale kemikalije

Agaroz (Sigma), etidijev-bromid (Sigma), bakto-tripton (Difco), dNTP (10mM) (Invitrogen), glicerol (Kemika), HCl (Kemika), Na-EDTA (Merck), NaCl (Kemika), suhi ekstrakt kvasca (Sigma), tris(hidroksimetil)-aminometan (Kemika), RnaseZap (Ambion), dietil-pirokarbonat; DEPC (Fluka), Trizol (Invitrogen), kanamicin (Sigma), izopropanol (Merck), etanol (Kemika), NaOH (Kemika), CDP Star (GE Healthcare), efke FR-16 razvija (Fotokemika), efke FF-2 fiksir (Fotokemika), Tween 20 (Sigma), BSA (Sigma), SDS (Sigma), teku i dušik (Masser), LiCl (Sigma), kloroform (Kemika), izoamil (Kemika)

2.1.2. Stanice

- Biljne stanice

U istraživanjima sam koristila biljno tkivo bundeve *Cucurbita pepo*, i to tkivo lista klijanaca i embriogeni kalus uzgajan *in vitro* (Leljak-Levani i sur. 2003). Tri tjedna nakon isključavanja sjemenki, mlade listove sam odrezala i zaledila u teku em dušiku te pohranila na -80 °C. Tako zale eno tkivo koristila sam za izolaciju nukleinskih kiselina. Kao kontrolu, koristila sam tkivo lista uro njaka *Arabidopsis thaliana*.

- Bakterije

Za umnažanje plazmida sa ugra enim insertom koristila sam stanice *E. coli* soja TOP10F' (Invitrogen) kompetentne za transformaciju elektroporacijom.

2.1.3. Plazmidni vektori

Za stvaranje DNA proba za hibridizacijsku anлізу po Southernu koristila sam plazmid pCR AtMB7. To je komercijalni pCR2.1 TOPO (Invitrogen) plazmid u koji je ugra en gen *BPM1* (At5g19000) biljke *Arabidopsis thaliana*.

Za kloniranje fragmenata dobivenih u PCR reakcijama, a u svrhu sekvenciranja, koristila sam vektor pCR II-Blunt Topo (Invitrogen).

2.1.4. Hranjive podloge

Za umnažanje transformiranih bakterija *E. coli* sam upotrijebila

- LB hranjivu podlogu (Lurija-Bertani) sastava 10 g/l NaCl, 5 g/l suhi ekstrakt kvasca i 10 g/l baktotripton

Za selekciju transformiranih bakterija sam upotrijebila:

- LB hranjivu podlogu s dodatkom kanamicina (50 mg/l) te
- krutu podlogu LB s dodatkom kanamicina (20 g/l agar; 50 mg/l kanamicin)
- SOC medij (20 g/l bakto-tripton, 5 g/l bakto-kvaš ev ekstrakt, 0,5 g/l NaCl, 18,6 g/l KCl, 0,05 g/l MgCl₂, 0,02 g/l glukoze)

2.1.5. Programski paketi

Usporedbu nukleotidnih slijedova različitih gena *MAB* i analizu sekvenciranih produkata napravila sam koristeći sljedeće programe:

Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Bioedit	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html
SIAS	http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html
T-Coffee	http://www.ebi.ac.uk/Tools/t-coffee/index.html
Phylodraw	http://pearl.cs.pusan.ac.kr/phyldraw/

2.2. Metode

2.2.1. Izolacija genomske DNA

U ohla eni tarionik sam stavila 100 mg tkiva lista biljke *C. pepo* odnosno *A. thaliana* i dobro izgnje ila tkivo u teku em dušiku. Nakon što sam dobila jednoli nu brašnastu smjesu zapo ela sam ekstrakciju DNA iz tkiva kitom *DNEasy Plant Mini* (Qiagen) prema uputama proizvo a a. Postupak se temelji na lizi stanica, inaktivaciji proteina i razgradnji RNA. DNA se veže na membranu na kojoj se etanolom pro iš ava te se zatim eluira sterilnom vodom. Nakon izolacije, DNA sam provjerila elektroforezom u 0,7% agaroznom gelu (poglavlje 2.2.6).

2.2.2. Izolacija plazmidne DNA

Plazmidne vektore sam izolirala korištenjem seta za izolaciju plazmidne DNA (*Wizard Plus SV Miniprep Kit*, Promega) prema uputama proizvo a a. Izolat plazmidne DNA provjerila sam elektroforezom (poglavlje 2.2.6) u 1% agaroznom gelu.

2.2.3. Izolacija RNA

Svo posu e i pribor koji sam koristila u izolaciji RNA sam oslobodila od RNaza ispiru i ga u 0,5 M NaOH i 1% DEPC vodi i zatim ga sterilizirala u autoklavu. Aparaturu sam prebrisala teku inom *RnaseZap* (Ambion). Uzela sam uzorak tkiva biljke *C. pepo* iz zamrziva a sa -80 °C i stavila ga u Eppendorf tubicu zajedno s metalnom kuglicom te dodala teku i dušik. Zatim sam tubicu stavila u vibracijski usitnjiva tkiva na 1,5 min na frekvenciju od 25 Hz. Dodala sam 1500 µL Trizola i dobro izmiješala koriste i vibracijsku mješalicu. Potom sam dodala 200 µL kloroform-izoamila i protresla smjesu pa stavila u centrifugu na 20 min na 4500 g pri 4 °C. Pažljivo sam odpipetirala supernatant u novu tubicu i precipitirala ga s 500 µL

mješavine 1V izopropanola i 1/10 V otopine NaOH centrifugiraju i smjesu 20 min na 13000 g. Precipitat sam isprala 70%-tnim etanolom te nakon centrifugiranja odbacila supernatant, a precipitat ostavila da se osuši. Precipitat sam otopila u vodi a onda istaložila RNA sa 5 M otopinom LiCl kroz 30 min pri temperaturi od -20 °C. RNA sam precipitirala centrifugiranjem na 13000 g pri temperaturi od 4 °C kroz 25 min. Istaloženu RNA sam isprala sa 75%-tnim etanolom. Nakon centrifugiranja na 9000 g kroz 5 min pri 4 °C, talog sam osušila i otopila u vodi.

mRNA sam izolirala kitom *Dynabeads mRNA direct Micro* (Dyna) prema uputama proizvođača. Ključna komercijalnog kita je u tome što koristi polistirenske kuglice na kojima su površinu kovalentno vezani oligo(dT)₂₅ lanci. Tijekom procesa izoliranja molekula mRNA, poliA rep mRNA molekula se sparuje s oligo(dT)₂₅ lancima koji ujedno služe i kao primjerice u reverznoj transkripciji pri sintezi cDNA molekula. Uspješnost ekstrakcije mRNA molekula provjerena je gel-elektroforezom u 1% agaroznom gelu.

2.2.4. Reverzna transkripcija na kalupu mRNA bundeve

Izoliranu mRNA prepisala sam pomoću reverzne transkriptaze u cDNA. 0,2 µg mRNA iz bundeve odnosno uro njaka pomiješala sam sa 1 µl primjerice oligo(dT)₁₈ te smjesu nadopunila vodom do volumena od 12 µl. Smjesu sam inkubirala 5 min na 70 °C. Za to vrijeme sam napravila smjesu od 4 µl reakcijskog pufera (5 x), 2 µl 5 mM otopine dNTP-ova (deoksiribonukleotid-3-fosfat), 1 µl ribonukleaznog inhibitora koncentracije 10 U/µL te 1 µl vode. Dobivene smjese sam pomiješala te ih držala 5 min na temperaturi od 37 °C, a onda dodala enzim reverznu transkriptazu RevertAid H Minus M-MuLV. Smjesu sam zatim ostavila 1 h na 42 °C te 10 min na 70 °C. Time je dobivena cDNA – DNA komplementarna sveukupnim mRNA molekulama iz stanice koja je korištena kao kalup u nekim reakcijama PCR.

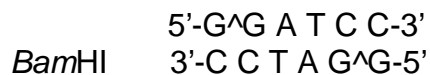
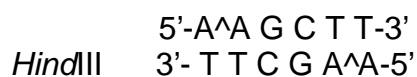
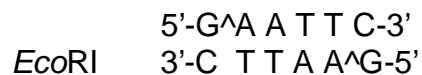
Da bih provjerila uspješnost izolacije RNA, reverzne transkripcije, kao i isto u dobivene cDNA, napravila sam kontrolnu reakciju PCR. Gen *GAPDH* kodira za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu i konstitutivno je eksprimiran u gotovo svim stanicama u velikim količinama te ga je stoga lako umnožiti reakcijama PCR. Primjerice *GAPDH* su konstruirane tako da obuhvaćaju intron, te se stoga u slučaju

prisutnosti genomske DNA u uzorku cDNA kalupa do i do pojave dviju vrpca DNA na agaroznom gelu; jedna vrpca sadržavati kraći fragment nastao na osnovu kalupa cDNA, a druga vrpca sadržavati duži fragment jer je nastao na osnovu genomske DNA koja sadrži intron. PCR reakcijska smjesa ukupnog volumena 50 µl je sadržavala 2 µl svake po etnice GAPDHfw i GAPDHrev koncentracije 10 µM, 1 µl 5 mM dNTP, 3 µl 25 mM MgCl₂, 5 µl pufera (10 x), 1 µl *Taq* polimeraze koncentracije 1 U/µl, te 2 µl cDNA. Nakon 3 min početne denaturacije na 95 °C, gen *GAPDH* sam umnožila pomoću 30 PCR ciklusa, pri čemu se denaturacija odvijala 45 sec na 95 °C, prijanjanje 45 sec na 57 °C, a produljivanje lanaca 1 min na 72 °C. Završno produljivanje lanaca trajalo je 3 min pri temperaturi od 72 °C. Rezultat reakcije PCR provjerila sam elektroforezom na agaroznom gelu (poglavlje 2.2.6).

2.2.5. Razgradnja DNA restrikcijskim enzimima

2.2.5.1 Razgradnja genomske DNA

Biljnu genomsku DNA sam razgradila restrikcijskim enzimima *EcoRI*, *HindIII* i *BamHI* koji prepoznaju i cijepaju slijedeća mjesta:



Za razgradnju sam koristila 1 µg genomske DNA. Reakcijske smjese inkubirala sam preko noći na 37 °C, zatim sam enzim inaktivirala na 65 °C, 5 min te uzorke nanijela na gel da bih provjerila uspješnost razgradnje DNA (poglavlje 2.2.6). Uzorke sam pohranila na 4 °C.

2.2.5.2 Razgradnja plazmidne DNA

Plazmidne vektore podvrgla sam razgradnji pomoću enzima *EcoRI* i/ili *XbaI* kroz 2 sata na 37 °C. Cijeplanjem plazmidnog vektora pCR AtMB7 nastali su odsjeci DNA koje sam upotrijebila kao probe (poglavlje 2.2.7.2) za detekciju gena *MAB* u biljci *C. pepo* putem hibridizacije po Southernu.

Plazmide rekonstruirane nakon TOPO reakcije razgradila sam enzimom *EcoRI* kroz 2 sata na 37 °C.

2.2.6. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Molekule DNA (dobivene razgradnjom restriktivnim enzimima, liganom reakcijom polimerazom i kloniranjem) analizirala sam standardnom metodom elektroforeze u 1%-tnom agaroznom gelu u TAE puferu za elektroforezu DNA. Elektroforeze za provjeru i analizu DNA provodila sam pri 100 V u trajanju od 20 min. Preparativne elektroforeze (za izolaciju i pročišćavanje molekula DNA) provodila sam pri 50 V, 60 min. Odsjeci razgrađene genomske DNA razdvajala sam u 0,7% agaroznom gelu. Gelove sam nakon elektroforeze bojala u otopini etidijeva bromida koncentracije 0,1 mg/mL kroz 10 min i analizirala koristeći instrument *Image master*. Kao standarde koristila sam smjesu molekula DNA veličine 100 pb do 3000 pb DNA markera *GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus* ili DNA marker *GeneRuler DNA Ladder Mix* s fragmentima molekularne mase od 100 pb do 10 000 pb.

2.2.7. Detekcija gena *MAB* u genomu bundeve hibridizacijom po Southernu

2.2.7.1 *Prijenos DNA s gela na membranu*

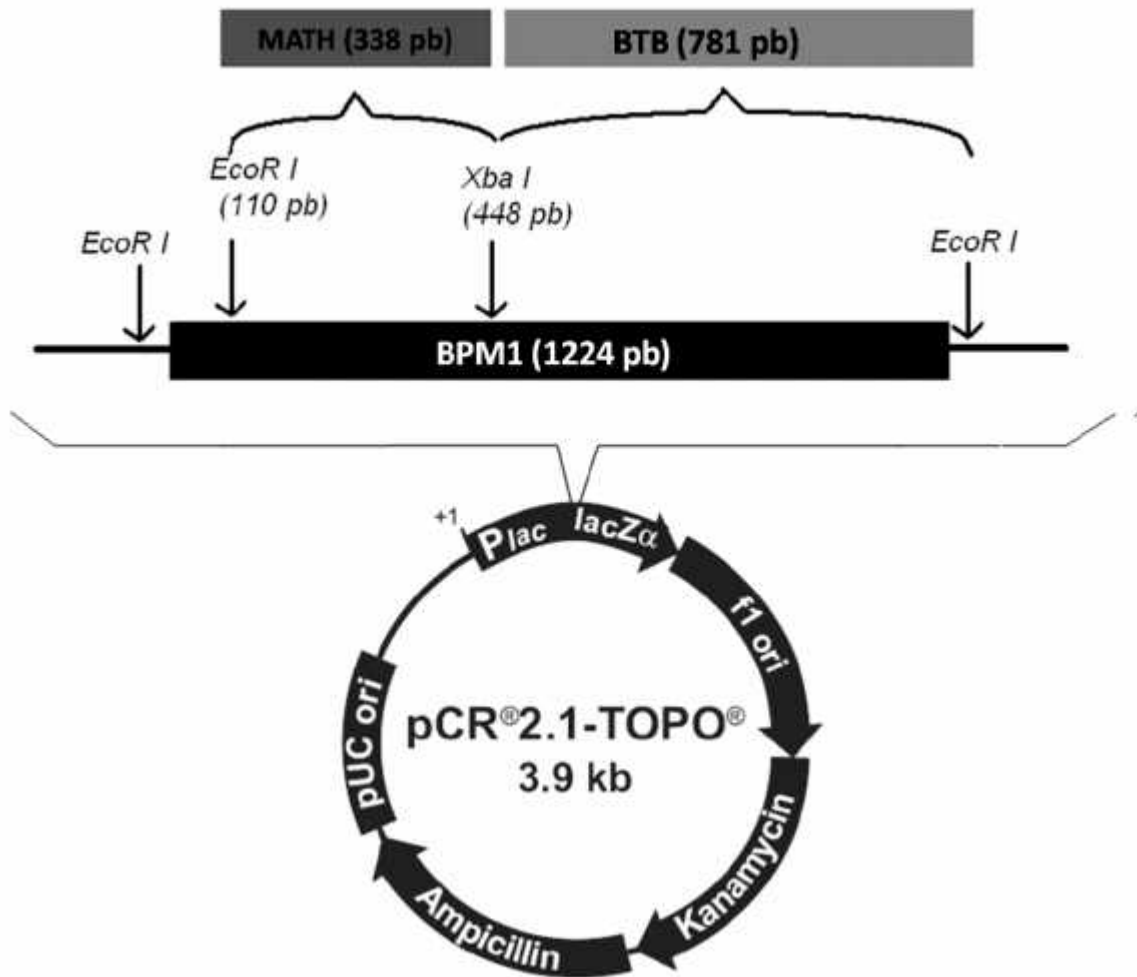
Genomska DNA je razgrađena restrikcijским enzimima i razdvojena u 0,7% agaroznom gelu kroz 4 sata pod naponom od 120 V. Nakon elektroforeze gel sam ispirala 250 mM otopinom HCl kroz 10 min. HCl uzrokuje depurinaciju molekula DNA nakon koje dolazi do prekidanja DNA lanaca. To olakšava prijenos velikih fragmenata iz gela na membranu. Da bih zaustavila djelovanje otopine HCl, gel sam isprala vodom kroz 2 minute uz miješanje, te inkubirala u otopini 1,5 M NaCl i 0,5 M NaOH kroz 30 min da bi denaturirala DNA. Gel sam zatim isprala vodom i izložila otopini 1,5 M NaCl i 0,5 M Trisa da bi se neutralizirao.

DNA je s gela na najlonsku membranu (*Nylon Membrane, positively charged, Roche*) prenesena vakuumom jačine 5 mm Hg kroz 1 h koristeći 10 x SSC pufer. Membranu sam prethodno namočila u 2 x SSC puferu, postavila je na stalak za prijenos i na nju gel. Sve sam prekrila 10 x SSC puferom.

Nakon prijenosa, membranu sam osušila UV svjetlom u transiluminatoru kroz 3 minute te osušila na zraku.

2.2.7.2 *Konstrukcija proba za hibridizaciju po Southernu*

Koristila sam se plazmidom pCR At MB7 koji je u osnovi komercijalni pCR2.1-TOPO plazmid u kojeg je ugrađen gen *BPM1* iz biljke *A. thaliana*. Da bi gen pocijepala na domene MATH i BTB, plazmid sam razgradila restrikcijским enzimima *EcoRI* i *XbaI*. Na taj način sam od 1224 pb dugog gena *BPM1* dobila dvije probe: probu MATH dugu 338 pb i probu BTB dugu 781 pb. Proba MATH sadrži domenu MATH gena *BPM1*, a proba BTB sadrži prijelazni dio između domena MATH i BTB, te domenu BTB gena *BPM1* i još 7 pb iz plazmidnog vektora pCR2.1-TOPO. Način konstrukcije hibridizacijskih proba prikazan je na slici 2.



Slika 2. Konstrukcija komplementarnih proba za hibridizaciju po Southernu cijepanjem plazmida pCR At MB7 restriksijskim enzimima *EcoRI* i *XbaI*.

2.2.7.3 Obilježavanje proba

Odsje ke DNA (338 pb i 781 pb) dobivene nakon razgradnje vektora pCR At MB7 obilježila sam fluoresceinom prema protokolu za *Amersham Gene Images AlkPhos Labelling and Detection System* (GE Healthcare) kit. U reakciji obilježavanja koristila sam 100 ng DNA.

2.2.7.4 Hibridizacija

U tuljac za hibridizaciju dodala sam 23 mL zagrijanog (55 °C) predhibridizacijskog pufera. Kona na koncentracija pufera s obzirom na površinu membrane bila je 0,25 mL/cm². Pažljivo sam pincetom unijela membranu i ostavila najmanje 30 min u hibridizacijskoj pe nici zagrijanoj na 55 °C. Potom sam u predhibridizacijski pufer dodala obilježenu, denaturiranu probu (5 min na 95° C). Membranu sam hibridizirala na 55 °C preko no i.

Po završetku hibridizacije hibridizacijski pufer (predhibridizacijski pufer + proba) sam sa uvala te ga po potrebi višestruko koristila (nakon denaturacije na 95 °C, 5 min).

Nakon hibridizacije slijedilo je ispiranje membrane uz lagano miješanje na 55 °C po 15 min, najprije u 1 x SSC i 0,1% SDS puferu te u 0,5 x SSC i 0,1% SDS puferu.

2.2.7.5 Detekcija

Prije detekcije membranu sam inkubirala 1 h u puferu A uz dodatak reagensa za blokiranje Liquid Block (9:1), koji spre ava nespecifi no vezanje antitijela. Zatim sam na membranu dodala svježi pufer A uz dodatak 0,5% BSA i antitijela za fluorescein (1:5000). Antitijelo je zapravo konjugat alkalne fosfataze i anti-fluorescein antitijela. Nakon vezanja antitijela, membranu sam isprala 3 puta po 10 min u puferu A s dodatkom 0,3% Tween 20. Vezano antitijelo detektirano je pomo u CDP Star-a. Alkalna fosfataza razlaže CDP Star tako da nastaje fluorescentni produkt koji sam detektirala izlaganjem membrane na film Hyperfilm-MP (Amersham) kroz 3 h. Na razvijenom filmu detektirane su linije koje odgovaraju domenama MATH u slu aju korištenja MATH probe, te domenama BTB u slu aju korištenja BTB probe.

2.2.8. Reakcije PCR na kalupu genomske DNA bundeve *C. pepo*

Gene *MAB* bundeve umnažala sam na kalupu genomske DNA pomoću degeneriranih po etnica uniMATHfw i uniBPM652rev odnosno uniMATHfw i uniBPM770rev, prema tablici 1.

Tablica 1. Reakcijska smjesa za umnažanje gena *MAB* lančanom reakcijom polimerazom.

Reagensi – radna otopina	Volumen (µL)	Kona na koncentracija
Po etnica uniMATHfw	4,0	0,8 µM
Po etnica uniBPM652rev/uniBPM770rev	4,0	0,8 µM
dNTP	1,0	0,2 mM
10 x pufer	5,0	1 x
Kalup DNA	5,0	100 ng
<i>Pfu</i> * polimeraza	1,0	1,25 U
dH ₂ O	30,0	-
Ukupni volumen:	50,0	-

**Pfu* polimerazu sam dodavala posljednju i odmah nakon dodavanja stavljala reakcijsku smjesu u uređaj za PCR na početnu denaturaciju.

Za umnažanje gena *MAB* koristila sam i par po etnica uniMATHfw i uniBPM6rev te polimeraze *Pfu* polimeraze (Stratagene) ili *Taq* (Fermentas). U slučaju korištenja *Taq* polimeraze reakcijskoj smjesi dodavala sam 3 µl 25 mM otopine MgCl₂. Uvjeti reakcija prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti lančanih reakcija polimerazom na kalupu genomske DNA bunđeve *C. pepo*.

Uvjeti reakcije PCR		Temperatura (°C)	Vrijeme
Po etna denaturacija		95	2 min
5 ciklus:	Denaturacija	95	20 s
	Sparivanje po etnica	45	1 min
	Produljivanje lanca DNA	72	1 min
30 ciklusa:	Denaturacija	95	20 s
	Sparivanje po etnica	52	45 s
	Produljivanje lanca DNA	72	1 min
Završno produljivanje lanca		72	7 min

Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je bila ohlađena na 4 °C.

Po završetku PCR reakcija napravila sam elektroforezu za provjeru uspješnosti reakcija, a zatim i preparativnu elektroforezu za pro iš avanje umnoženih fragmenata DNA iz gela. Nakon elektroforeze izrezala sam dijelove gela sa željenim fragmentima, a zatim ih ekstrahirala iz agaroznog gela koriste i *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) kit, a prema uputama proizvo a a.

2.2.9. Reakcije PCR na kalupu cDNA bunđeve *C. pepo*

Koriste i po etnice uniMATHfw i uniBTBrev uz pomo polimeraze *Taq* lan anom reakcijom polimerazom umnažala sam gene *MAB* na kalupu cDNA bunđeve *C. pepo*. Volumeni i kona ne koncentracije svih kemikalija korištenih u reakciji prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Reakcijska smjesa za umnažanje gena *MAB* lančanom reakcijom polimerazom.

Reagensi – radna otopina	Volumen (μL)	Kona na koncentracija
Po etnica uniMATHfw	2,0	0,4 μM
Po etnica uniBTBrev	2,0	0,4 μM
dNTP	1,0	0,2 mM
Pufer (+ $\text{NH}_4\text{-MgCl}_2$)	5,0	1 x
MgCl_2	3,0	1,5 mM
polimeraza <i>Taq</i>	1,0	1,25 U
Kalup cDNA	3,0	200 ng
dH ₂ O	33,0	-
Ukupni volumen:	50,0	-

Reakciju PCR za umnažanje gena *MAB* bundeve napravila sam i pomo u po etnica uniMATHfw i uniBPM6rev koriste i polimerazu HotStart Go*Taq* (dodana nakon 5 min denaturacije) prema tablici 3. Uvjeti reakcija PCR za umnažanje gena *MAB* bundeve prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Uvjeti reakcija PCR za umnažanje gena *MAB* bundeve.

Uvjeti reakcije PCR	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Vrijeme
Po etna denaturacija	94	5 min
Denaturacija	94	30 sec
Sparivanje po etnica	51	45 sec
Produljivanje lanaca	72	1 min
Završno produljivanje lanaca	72	5 min

Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je bila ohlađena na 4 $^{\circ}\text{C}$.

2.2.10. Ugradnja PCR produkta u vektorski plazmid

Produkti reakcija PCR na kalupu genomske DNA, ugraeni su u vektorski plazmid pCR II-Blunt Topo. Ovaj komercijalno pripremljeni plazmid je linearan te je na krajevima vezan enzim topoizomeraza. Tijekom Topo reakcije topoizomeraza obuhvaća krajeve PCR produkata i na taj ih način ugrađuje u plazmid. Sastav reakcijske smjese je prikazan u tablici 5.

Tablica 5. Reakcijska smjesa za ugradnju produkata PCR reakcije u plazmid pCR II-Blunt Topo

Reagensi	Topo smjesa I	Topo smjesa II	Topo smjesa III
PCR produkt	4 μ L PCR produkta I	4 μ L PCR produkta II	2 μ L PCR produkta III + 2 μ L PCR produkta IV
Otopina soli	1 μ L	1 μ L	1 μ L
pCR II-Blunt Topo plazmid	1 μ L	1 μ L	1 μ L

Topo smjese sam lagano promiješala i inkubirala 5 min na sobnoj temperaturi. Plazmide iz Topo smjese nastale miješanjem produkata PCR reakcija i plazmida pCR II-Blunt Topo nazvala sam pCR CpMAB plazmidima s tim da je plazmid s PCR produktom I nazvan plazmidom pCR CpMAB23, plazmid s PCR produktom II plazmidom pCR CpMAB10, a plazmid s PCR produktima III i IV plazmidom pCR CpMAB05.

2.2.11. Transformacija bakterija

Topo smjesom sam transformirala elektrokompetentne bakterije *E. coli* soj TOP10F'. Stanicama sam pri 4 °C dodavala 1 μ L Topo smjese. Kivete (BioRad, širina 2 mm) sa stanicama sam stavila u elektroporator pod naponom od 1800 V; impuls je trajao 3,2 do 3,4 ms. Neposredno nakon impulsa na elektroporirane bakterije sam dodala 250 μ L SOC medija. Eppendorfer tubice sa elektroporiranim bakterijama

stavila sam u treskaju i inkubator (250 rpm) na 37 °C kroz 1 h tijekom kojeg su se transformirane stanice revitalizirale.

2.2.12. Umnažanje plazmidnih vektora pCR CpMAB u bakterijama

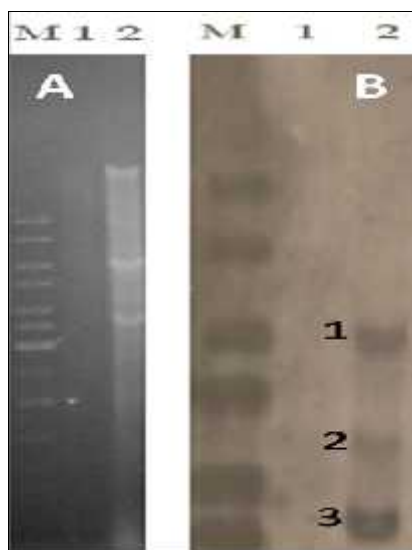
Elektrokompetentne stanice *E. coli* koje sadrže plazmidne vektore pCR CpMAB sam u laminaru inokulirala na krute LB podloge s kanamicinom. Bakterije su rasle u inkubatoru preko noći na 37 °C. Plazmid pCR II-Blunt Topo sadrži gen za otpornost na kanamicin te samoubilački gen *ccdB*. Ovaj gen se aktivira ukoliko dođe do samozatvaranja plazmida i time pokreće apoptozu. Ukoliko dođe do ugradnje PCR produkta, gen *ccdB* je inaktivan te se na podlogama s kanamicinom selektiraju bakterije s insertom. Kolonije koje su narasle na krutoj podlozi inokulirala sam u tekuću podlogu LB s kanamicinom, i inkubirala preko noći na 37 °C. Sutradan sam izolirala plazmidnu DNA koristeći *Wizard Plus SV Miniprep* (Promega) kit, a prema uputama proizvođača. Izolaciju plazmida dokazala sam elektroforezom na agaroznom gelu. Plazmidne vektore pCR CpMAB05 i pCR CpMAB10 razgradila sam pomoću enzima *EcoRI*, a pCR CpMAB23 enzimom *BamHI* (poglavlje 2.2.5.1) kako bih dokazala ugradnju željenog PCR fragmenta.

Nakon restrikcijske analize odabrani plazmidni vektori sekvencirani su u Macrogen-u, Koreja. Nukleotidne slijedove fragmenata analizirala sam programom Blast koji pronalazi sličnosti između u bioloških sekvenci.

3 REZULTATI

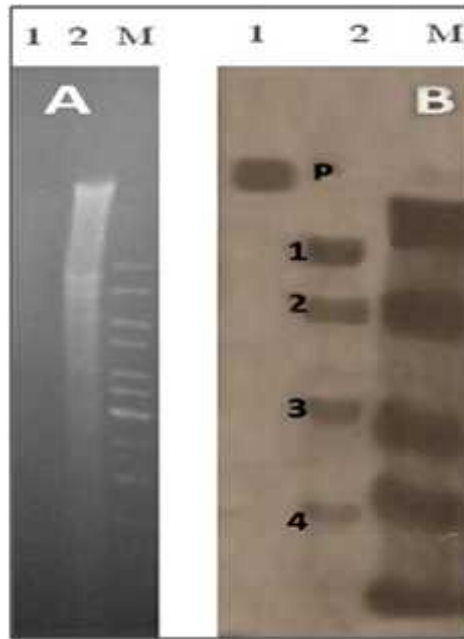
3.1 Detekcija gena *MAB* u genomu bundeve hibridizacijom po Southernu

Za detekciju gena *MAB* u genomu bundeve, kao komplementarne probe u hibridizaciji po Southernu, upotrijebila sam domene MATH i BTB gena *BPM1*. Genomsku DNA biljke *C. pepo* razgradila sam restrikcijom enzimom *EcoRI* i hibridizirala sam s probom MATH (338 pb). U genomu bundeve detektirane su tri vrpce veličine 6 000 pb (vrpca 1), 4 500 pb (vrpca 2) i 3 500 pb (vrpca 3) koje sadrže domene MATH (slika 3B, jažica 2).



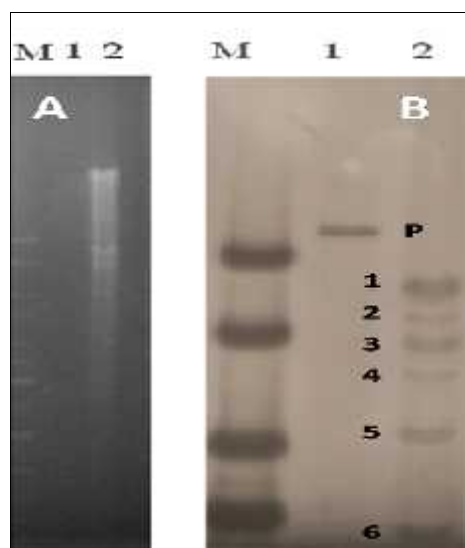
Slika 3. A) Genomska DNA bundeve *C. pepo* (jažica 2) razgrađena enzimom *EcoRI* nakon elektroforeze u 0,7 % agaroznom gelu. B) Hibridizacija po Southernu s probom MATH. M: DNA marker *GeneRuler DNA Ladder Mix* molekularne mase 100 pb do 10 000 pb.

Nakon razgradnje genomske DNA bundeve *C. pepo* s enzimom *BamHI*, te koriste i hibridizacijsku probu MATH (338 pb), u hibridizaciji po Southernu dobivene su 4 vrpce (slika 4B, jažica 2) veličina redom: 9 000 pb (vrpca 1), 7 900 pb (vrpca 2), 6 200 pb (vrpca 3), 4 800 pb (vrpca 4).



Slika 4. A) Genomska DNA bundeve *C. pepo* (jažica 2) razgrađena restriksijskim enzimom *Bam*HI nakon elektroforeze u 0,7% agaroznom gelu. B) Hibridizacija po Southernu s probom MATH. M: DNA marker *GeneRuler DNA Ladder Mix* molekularne mase 100 pb do 10 000 pb. P: pozitivna kontrola.

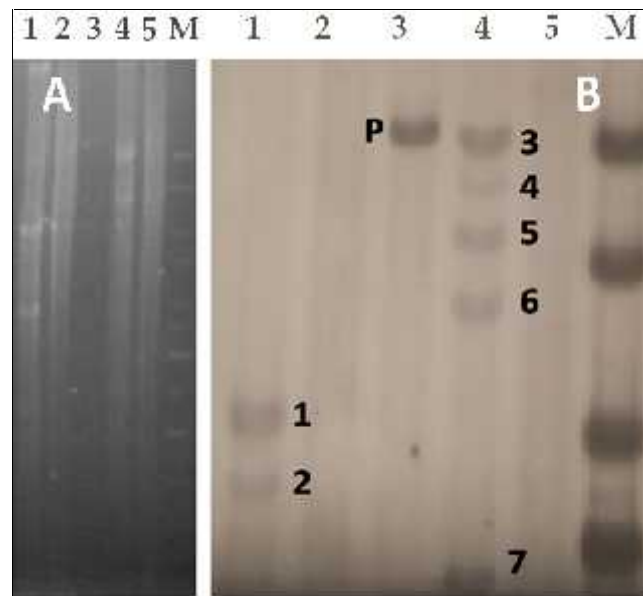
Genomska DNA bundeve *C. pepo* razgrađena je restriksijskim enzimom *Bam*HI I i hibridizirana probom BTB (781 pb). U genomu bundeve detektirano je 6 vrpca (slika 5B, jažica 3). Fragmenti DNA u vrpca su veli ina redom: 9 000 pb (vrpca 1), 8 500 pb (vrpca 2), 7 900 pb (vrpca 3), 7 000 pb (vrpca 4), 6 200 pb (vrpca 5), 4 800 pb (vrpca 6).



Slika 5. A) Genomska DNA bundeve *C. pepo* (jažica 2) razgrađena enzimom *Bam*HI nakon elektroforeze u 0,7% agaroznom gelu. B) Hibridizacija po Southernu s probom BTB. M: DNA marker *GeneRuler DNA Ladder Mix* molekularne mase 100 pb do 10 000 pb. P: pozitivna kontrola.

Genomska DNA biljke *C. pepo* razgrađena enzimom *EcoRI* hibridizirala sam probom BTB (781 pb) (slika 6B, jažica 1). Time su detektirane 2 vrpce veličina: 5 200 pb (vrpca 1), 4 800 pb (vrpca 2).

Genomska DNA biljke *C. pepo* razgrađena enzimom *HindIII* hibridizirala sam probom BTB (781 pb) (slika 6B, jažica 4) time je detektirano 5 vrpca veličina: 10 000 pb (vrpca 3), 9 500 pb (vrpca 4), 8 300 pb (vrpca 5), 7 700 pb (vrpca 6) i 3 800 pb (vrpca 7).



Slika 6. A) Rezultat elektroforeze genomske DNA bundeve *C. pepo* razgrađene enzimom *EcoRI* (jažica 1) i *HindIII* (jažica 4). B) Hibridizacija s probom BTB. M: DNA marker *GeneRuler DNA Ladder Mix* molekularne mase 100 pb do 10 000 pb. P: pozitivna kontrola.

Naime, poznato je da upotrebljeni restriktivni enzimi ne cijepaju gene *MAB* izmeđ u domena MATH i BTB pa se isto otkuže i u genima *MAB* bundeve. Iz dobivenih rezultata proizlazi da enzim *BamHI* najvjerojatnije ne cijepa unutar gena *MAB* bundeve, dok enzim *EcoRI* cijepa. Ukoliko je došlo do hibridizacije MATH i BTB proba na DNA odsjek iste veličine u genomske DNA bundeve smatrala sam da je identificiran jedan gen *MAB* bundeve. Rezultati razgradnje genomske DNA bundeve enzimom *BamHI* ukazuju na postojanje najmanje 4 gena *MAB* u genomu bundeve.

3.2 Umnažanje gena *MAB* u genomu bundeve *C. pepo*

Različiti geni *MAB* uro njaka, kao i geni drugih vrsta značajno variraju u nukleotidnoj sekvenci. Kako bi PCR-om umnožila gene *MAB* u genomu bundeve morala sam dizajnirati degenerirane po etnice.

3.2.1 Dizajniranje degeneriranih početnica

Programom T-Coffee sam usporedila sekvence gena *MAB* iz genoma biljaka *Vitis vinifera* (XM_002277049, XM_002277112, XM_002282500, XM_002279512), *Picea sitchensis* (EF677100) i *Physcomitrella patens* (XM_001782953, XM_001772196) (slika 7). Programom SIAS ustanovila sam da su sljedovi DNA navedenih gena 41,11% identični odnosno 63,93% slični. Analiza je pokazala da domene MATH i BTB navedenih gena ipak sadrže neke konzervirane dijelove. Također, usporedila sam sekvence svih 6 gena *MAB* iz uro njaka *A. thaliana* (slika 8). Najkonzerviranije dijelove gena *MAB* iskoristila sam za dizajniranje po etnicima kojima sam namjeravala umnožiti gene *MAB* u genomu bundeve. Na temelju homologije između u navedenih vrsta, dizajnirala sam 3 degenerirane po etnicima, uniMATHfw, uniBPM652rev i uniBPM770rev (slika 7 i 8).

S obzirom na genomsku sekvencu gena *BPM1* koji ima 4 egzona, po etnicima su konstruirane tako da par po etnicima uniMATHfw i uniBPM652rev obuhvaćaju prvi intron i većinu drugog egzona, a par po etnicima uniMATHfw i uniBPM770rev obuhvaćaju prvi i drugi intron te cijeli drugi egzon.

At5g19000	390	TATCTTCAAG	TAAGCTTGGAA	GAAGCTTGGG	ATGCAATGCG	TCTTTCAGAA	GCTCAGCTTC	AAATGCTGCG	GATGATTTAA	AGAGAGATGG	TTTTTCTGTC	685
Vitis chr8	365A.....A.....G.....T.....A.....G.....A.....T.....T.....	CT..AAAA..	685
Vitis chr6	342C.....T.....T.....C.....AC.....ATG.....T.....A.....T.....	CT..AAAA..	641
Vitis chr13	342T.....A.....T.....C.....AC.....A.....T.....A.....T.....	CT..TCTA..G	345
Physcomitrella205	354C.....G.....T.....C.....T.....C.....T.....T.....T.....	CT..GGAA..	653
Physcomitrella349	365G.....G.....T.....G.....G.....G.....G.....T.....G.....	CT..GGAA..	653
Vitis chr6	391G.....G.....T.....G.....G.....G.....G.....T.....G.....	CT..GGAA..	685
Picea	395G.....G.....T.....G.....G.....G.....G.....T.....G.....	CT..GGAA..	695
At5g19000	491	AGATGCGCG	AGATGCGCG	AGATGCGCG	AGATGCGCG	AGATGCGCG	AGATGCGCG	AGATGCGCG	AGATGCGCG	AGATGCGCG	AGATGCGCG	585
Vitis chr8	465A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	585
Vitis chr6	442A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	541
Vitis chr13	442A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	541
Physcomitrella205	454A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	585
Physcomitrella349	465A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	585
Vitis chr6	490A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	585
Picea	495A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	595
At5g19000	591	TGAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	679
Vitis chr8	569A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	668
Vitis chr6	546A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	541
Vitis chr13	546A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	545
Physcomitrella205	558A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	553
Physcomitrella349	569A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	568
Vitis chr6	590A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	589
Picea	599A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	598
At5g19000	680	AAATGCTGCG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	759
Vitis chr8	659	TA..AT..A..C..A..A..--GGGC	C...G..A..G..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	765
Vitis chr6	642	TA..AT..A..A..--AG..T..G..G..A..G..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	738
Vitis chr13	646	TA..AT..A..A..--AG..T..G..G..A..G..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	738
Physcomitrella205	658	TA..AT..A..A..--AG..T..G..G..A..G..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	753
Physcomitrella349	669	TA..AT..A..A..--AG..T..G..G..A..G..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	768
Vitis chr6	680	TA..AT..A..A..--AG..T..G..G..A..G..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	760
Picea	689	TA..AT..A..A..--AG..T..G..G..A..G..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	..A..C..G..A..	762
At5g19000	780	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	GAAGAGTGG	877
Vitis chr8	756A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	862
Vitis chr6	732A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	835
Vitis chr13	732A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	738
Physcomitrella205	744A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	835
Physcomitrella349	755A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	850
Vitis chr6	781A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	868
Picea	789A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	CT..GGAA..	852

Slika 7. Rezultati sravnivanja programom ClustalW gena *BPM1* iz uročnjaka (*At5g19000*) i različitih gena *MAB* iz vinove loze (*Vitis* chr 5: XM_002279512; *Vitis* chr 6: XM_002277112; *Vitis* chr 8: XM_002277049; *Vitis* chr 13: XM_002282500), fiskomitrele (*Physcomitrella205*: XM_001782953; *Physcomitrella349*: XM_001772196) i jele (*Picea*: EF677100). Najsljähniji dijelovi DNA sljedova odgovaraju degeneriranim početnicama: uniMATHfw (označeno crvenom bojom), uniBTB652rev (označeno zelenom bojom), uniBTB770rev (označeno ljubičastom bojom).

```

bpm5 342 CGATTTTGAG CGCTACTCG ATGGTGGCCG TTATACACTC AAATADAGAG GAAGGATGCG GGATATCGAG CATTCTTCA GACCTTCAT TCTTAGACA 441
bpm6 343 .....A.T .T.....T .....T.....G.T .....G.T .....G.T ..... 443
bpm4 345 .....C..T ..TG..T. ..G..C..T. ....T.... ..S..TC..T. ....C..... ..C..T..TC ..A..ACTT.. G..G..A.. 455
bpm3 347 T.....T ..G..G..T. ..A.....T. ....T.... ..S..T..A. ....T..... ..T..... ..C..T..... ..S..T..G..C ..A..A..A.. 459
bpm1 357 .....ST ..AG..T.... ..A..C..T. ....T.... ..S..TC..T. ....C..... ..G..T..... ..G..G..T..G ..A..A..T..G 456
bpm2 354 .....ST ..A..A..T.... ..A..C..T. ....T.... ..S..TC..T. ....C..... ..A..A..T.... ..G..G..T..C ..T..G..T..T. 458

bpm5 442 TCTACTACG TGAGAGCGA TTGGTTGATA ATGATATGTA CGGTGGAGT DTGGTTTCA GAATATCGT GCGCAGGTT AGATCTGTI GAGTGGCTG 541
bpm6 463 .....T.....T..... ..A.....T..... ..A..... ..C..... ..S..AT.....G..... ..T..... ..T..... ..T..... .. 563
bpm4 435 .....T..T. ....G..T. ....T..... ..C..G..... ..C..G..... ..GAT.....G..... ..T..... ..T..... ..T..... .. 555
bpm3 437 .....T.....T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... .. 529
bpm1 457 .....T..T ..A..G..T.... ..A..C..T..G ..T..G..C..C ..T..G..T..C ..C..... ..T..C..G..G..G ..A..A..G..A ..T..A..A..C ..T..C..T..C.. 556
bpm2 454 .....T.....T..... ..G..... ..G..C..G..G ..G..C..G..T ..G..... ..S..... ..G..C..G..G ..A..A..G..A ..T..A..A..C ..T..C..T..C.. 553

bpm5 549 ATTAGACTT TCACTACTC TTGAGATTC T-ACCTGATA GATGGAGAG TTCTGATTA AATTTTACA TTGGTGGCA GAATTTTCTT CTCATACAC 641
bpm6 566 ..C.....T..... ..A..AST ..S..... ..T..A..... ..C..G..G..C ..A..S..G ..C..T..... ..A..... ..T..... ..T..... 561
bpm4 535 CA..T..CA .....T... ..C..G..G..T ..T..A..G..A..G..... ..S..... ..S..... ..S..... ..CT.....T... ..A..... ..CT..... 554
bpm3 539 G..G..T..T ..G..G..G ..A..A..A..A ..T..T..A..T ..T..G..A..T.. ..G..... ..G..... ..C..G..A..T... ..C..A..A..A..... 528
bpm1 557 T...TA..CT ..G..CA..G ..S.....A..T ..T.....G.. ..T..G..A..... ..C..G..... ..G..T..... ..C..G..A..A ..C..C..CA..C ..A..C..T..T 555
bpm2 554 T...T..G..T ..G..T..A..G ..S.....A..G ..T..... ..T..G..A..... ..G..... ..G..... ..C..G..A..A ..C..C..CA..C ..A..C..T..T 553

bpm5 641 TACTACTGC TACTGATCT CATTTTTCA ATCTTAGAT TTGAGTATG TTGAGAGCA ACATATCGA G---TTACT ATTAGAGAT TGGAGCTAA 737
bpm6 662 ..G..TT..... ..A..... ..S..... ..G..A..T..... ..A..A..CT ..A..C..S..... ..C..G..C..... ..G---ACTG ..C..G..... ..T..... 753
bpm4 635 .....T..... ..T..G..C..T ..A..G..C..... ..C..G..A..T ..A..G..A..S..... ..S..... ..S..... ..T---C..G..A ..G..C..T..C..... 751
bpm3 639 ..G..T..C... ..G..A..C..C ..S.....T..... ..T..A..C..A ..A..G..A..T..... ..S..... ..T..G..A..A..T.. ..A..G..... ..C..... ..T.. 728
bpm1 655 ..G..T..T..... ..A..G..T..C ..S..... ..C..G..C..C..... ..T..C..CT ..A..G..A..C ..G..... ..C..A..... ..A..G..A..A..... ..A..G..A..C..... 725
bpm2 652 ..G..T..T..... ..A..A..T..... ..S..... ..S..A..A..C..... ..T..C..C..... ..G..G..A..A..... ..A..... ..T..C..T..A..A ..G..A..G..C--- ..A..G..A..C..... 721

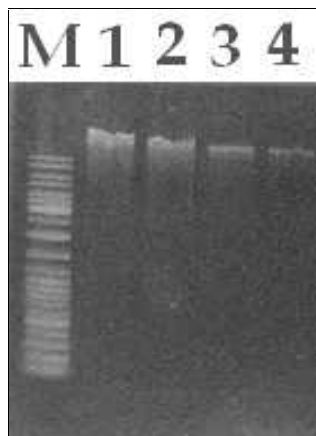
bpm5 738 GATTTTTGA GCTTCTCTG AACTATATTA GAAAGATTCT CTCCGGGAG ATGTGGAGCC TGCAAGACT CATACATTC AGCCCTTAA GCTGTAGAA 837
bpm6 759 .....C..... ..C..... ..T..... ..C..... ..C..... ..A..... ..A..... ..A..... ..T..... ..S..... ..T..... ..C..T..... ..G..... ..C..... 853
bpm4 732 .....C..... ..C..... ..C..... ..A..... ..G..... ..C..AT..... ..C..... ..T..... ..A..... ..T..... ..T..... ..C..G..... ..T..... ..G..... ..T..C..... 853
bpm3 734 T.....C..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... 819
bpm1 755 CA.....C..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... 849
bpm2 751 CG..C..T..T ..A..G..A..G..C ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... ..T..... 849

```

Slika 8. Rezultati sravnivanja gena *MAB* biljke *A. thaliana* (*BPM5*: At5g21010; *BPM6*: At3g43700; *BPM4*: At3g03740; *BPM3*: At2g39760; *BPM1*: At5g19000; *BPM2*: At3g06190) programom ClustalW. Najsličniji dijelovi DNA sljedova odgovaraju degeneriranim početnicama: uniMATHfw (označeno crvenom bojom), uniBTB652rev (označeno zelenom bojom), uniBTB770rev (označeno ljubičastom bojom).

3.2.2 Izolacija genomske DNA bundeve

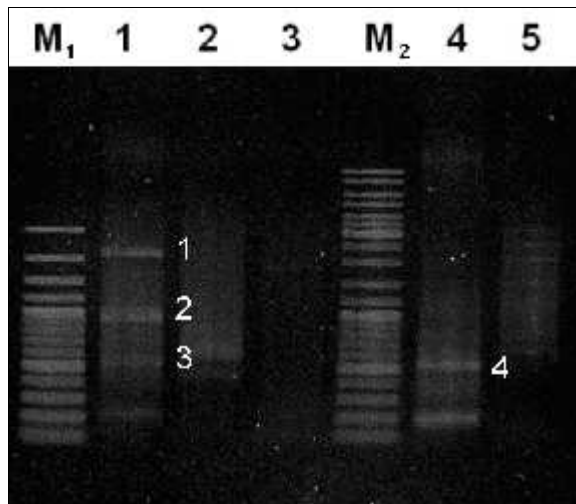
Genomsku DNA bundeve *C. pepo* i uročnjaka *A. thaliana* izolirala sam koristeći komercijalni set *DNEasy Plant Mini kit* (Qiagen) prema uputama proizvođača (slika 9).



Slika 9. Rezultati izolacije genomske DNA iz tkiva lista bundeve *C. pepo* (jažice 1 i 2) i uročnjaka *A. thaliana* (jažice 3 i 4). M: DNA marker *GeneRuler DNA Ladder Mix* molekularne mase 100 pb do 10000 pb.

3.2.3 PCR reakcija na kalupu genomske DNA bundeve

Umnažanjem gena po etnicama uniMATHfw i uniBPM652rev na kalupu genomske DNA bundeve *C. pepo* (slika 10, jažica 1) dobiveni su odsjeci DNA veličine 2300 pb (vrpca 1), 1000 pb (vrpca 2), 500 pb (vrpca 3) i 200 pb. Upotrebom po etnica uniMATHfw i uniBPM770rev na kalupu genomske DNA bundeve *C. pepo* (slika 10, jažica 4) dobiveni su odsjeci DNA veličine 0,2 kb i 0,5 kb (vrpca 4).



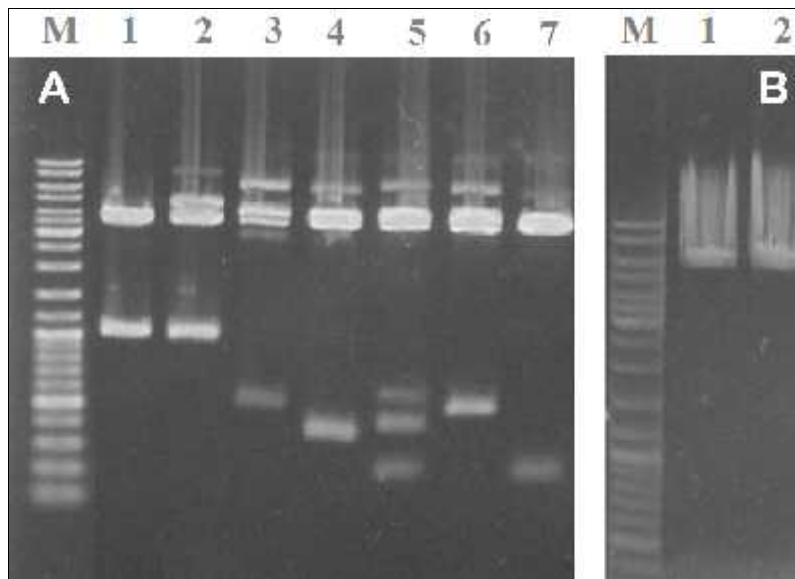
Slika 10. Produkti reakcija PCR s početnicama uniMATHfw i uniBPM652rev (jažica 1) te produkti reakcija PCR s početnicama uniMATHfw i uniBPM770rev (jažica 4). M₁: DNA marker *GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus* molekularne mase 100 pb do 3 000 pb. M₂: DNA marker *GeneRuler DNA Ladder Mix* molekularne mase 100 pb do 10 000 pb.

Vrpce DNA 1-4 su izrezane iz gela, a fragmenti DNA iz vrpca su prošli u pCR II-Blunt TOPO plazmid. Vrpce veličine 200 pb izostavljene su iz daljnje analize jer najvjerojatnije ne obuhvaćaju gene *MAB* bundeve. Umnažanjem odsjeka gena *MAB* dizajniranim po etnicama otkrivala sam fragmente veće od 300 pb, jer je razmak između po etnica (u cDNA) uniMATHfw i uniBPM652rev najmanje 280 pb, a razmak između uniMATHfw i uniBPM770rev 396 pb.

3.2.4 Analiza odsječaka DNA dobivenih u reakciji PCR upotrebom degeneriranih MAB početnica i genomske DNA bundeve kao kalupa

Odsjeci DNA umnoženi reakcijom PCR (slika 10) ugrađeni su u pCR-II Blunt TOPO plazmid. Pripremila sam 3 TOPO reakcije te su konstruirana 3 tipa TOPO plazmida koje sam nazvala: pCR CpMAB23 (sadrži ugrađeni odsjek DNA veličine 2 300 pb, slika 10, vrpca 1), pCR CpMAB10 (sadrži ugrađeni odsjek DNA veličine 1 000 pb, slika 10, vrpca 2), pCR CpMAB05 (sadrži ugrađene odsjeke DNA veličina 500 pb, slika 10, vrpce 3 i 4). Nakon izolacije plazmidne DNA iz bakterija *E. coli* i razgranje pomoću restrikcijskih enzima utvrdila sam da su u TOPO plazmid ugrađeni željeni odsjeci (slika 11). Razgradnjom plazmida pCR CpMAB enzimom EcoRI iz plazmida izrezuje se ugrađeni fragment, pa je stoga vidljiv na agaroznom gelu kao

posebna vrpca, a razgradnjom plazmida putem enzima BamHI, plazmid se linearizira pa je ve i za duljinu ugra enog fragmenta. Ugra enim odsje cima odre en je primarni slijed nukleotida.



Slika 11. A) Rezultati razgradnje plazmida pCR CpMAB10 (jažice 1 i 2) i plazmida pCR CpMAB05 (jažice 3,4, 5 6 i 7) restrikijskim enzimom *EcoRI*. B) Rezultati razgradnje plazmida pCR CpMAB23 (jažice 1 i 2) restrikijskim enzimom *BamHI*. M: DNA marker *GeneRuler DNA Ladder Mix* molekularne mase 100 pb do 10 000 pb.

Analizom primarnog slijeda nukleotida fragmenata od 1000 pb i 500 pb (slika 10, vrpce 2, 3 i 4), a koriste i se programom Blast utvrdila sam da su metodom lan ane reakcije polimerazom umnoženi dijelovi sli ni 25S – 18S rDNA me ugenskima razmaknicama ribosomskih gena bundeve (*X55960.1*), tzv. IGS geni (slike 12 i 13). Analizom nukleotidnih slijedova PCR produkta od 2300 pb, a koriste i se pogramom Blast utvrdila sam da su metodom lan ane reakcije polimerazom na 5' – kraju fragmenta umnoženi slijedovi sli ni 18S – 5S me ugenskima razmaknicama mitohondrijske rRNA (*AY357209.1*) bundeve *Cucurbita pepo* te slijedovi sli ni 18S – 5S me ugenskima razmaknicama mitohondrijske rRNA (*AY258278.1*) krastavca *Cucumis sativus* na 3' – kraju fragmenta.

CpMAB05	1																													49	
<i>C. pepo</i> JGS	3701	AACATGCACG	GTGGGGCGGT	GTCAAAATGCC	TTTGGGCGTG	CGACATGAGA	CT..TT..GC	...TA...	.G	...CCT..CC.	ACT..G..GC.	G..TTGAGG..																		3798	
CpMAB05	49	GCATCAAGCT	TGGTACCGAG	CTCGATCCA	CTAGTAACGG	CGG---CCAG	TGTGCTGGAA	T-TCMCCCTT	AAGTATCGTG	GNAGCATGTG	ATGTTGTAGT																				144
<i>C. pepo</i> JGS	3799	.GT..G.T.GCGAT.	A.GAA.CATG	.A..GTGG..	TG..AACTGG.	..CCT..C.GG	.G...GGGA.	G.ACC....T	...TG....	.C.....G..																			3897	
CpMAB05	145	GAGGOCATTC	GGCCAACCTT	GGGCCAGGCC	TATGTTTGA	AGGTGGCGTG	TTGGCAGAAC	ATGCATGGTG	GGGCTTGTC	AAGTGCCTTT	GGGCGTGTGA																			244	
<i>C. pepo</i> JGS	3898	.T...TC..	.C...T....C....G....A..T...C..																			3997	
CpMAB05	245	CATGAGCCTT	GTTTGCACT	GAATGTTGCG	ATGTTGCCTT	CTAACTGGG	CTGTCTTAG	GATGCTTAGT	GGCTTGACCG	CGCAGCAGT	TTTGGGCTTG																			344	
<i>C. pepo</i> JGS	3998GAT..TCT.....G..																			4073	
CpMAB05	345	GCTTCGAATG	ATGATTTGA	ACTCCCGCTT	GCCTGGGTG	TGAATAGTCC	ATCGTTCGCC	AAGCTCSTTT	TAGCTACGA	CGCATGAGTG	GTGATTTGGT																			444	
<i>C. pepo</i> JGS	4074TTGC.C	..C...A...C....G																			4172	
CpMAB05	145	TGCTGGGTG	TATAGGCTG	ATGCTGGGG	ATCAAAGTGT	AGGCAGATC	TCCTCTCAT	TGCTGTGTCC	CAAAGTATTT	TGAGTACCG	TA---GTTCAT																			542	
<i>C. pepo</i> JGS	4173	ATAT.....C.C....A..TA.....																				4272	
CpMAB05	543	TGGTCTTGC		TGCACGT	TCAAGGGCA	ATTCTGAGA	TATCAATCAC	ACTGCGCGCC	GCTCGAGCAT	GCAT---	CTAGAGGGCC																			623	
<i>C. pepo</i> JGS	4273	C.....	ATAGATTACC	TCA.....TG	GT..GCAT...G.	CT..TGT.	GTC..T.TCT	.TCA..AC..	CT..GTT..GG.	...GATGAA	..T.GAA...																			4372	
CpMAB05	624	CAATTCGGC		CTATAGTGA	TGTTATTACA	ATTCAGTGGC	CGTCTTTTA	CAAGCTGGTG	ACTGGGAAA	AGCCCTGGCT	TACCCAAGTT																			711	
<i>C. pepo</i> JGS	4373	TGC.....GT	ATCGCTTCAA	.C..T..CAT.	G.T.G..G.G	.AA.G.GTCT	..GTTC..G	T.CTC.T.GA	TG.C.T.C.T	TTGG....A.	G..TOTGCT..G																			4472	
CpMAB05	712	AATCGCT-T	GCAGCACATC	CCCTT---T	CGCCAGCTGG	CGTAAATAGC	AA-GAGGCCC	GCACCGA-T	CGCCCTTNC	AACAGTTCGG	CAGCCATATC																			804	
<i>C. pepo</i> JGS	4473	GGAA..CC.	.G.A..TG.T	G..TA.GTA.	T..T.AA..A	A.C.TG.AA.	..T..C.TTT	..T..T.CA.	T...CC.TT	GTTGCC.CTC	TCA.ACTCT.																			4572	
CpMAB05	805	GTACGGCAGT	TAAAGTTTA	CACCTATAAA	AGAGAGAGCC	GTTATC																								850	
<i>C. pepo</i> JGS	4573	T..GG.AGG.G	GAG.C.G.G.	A..TT..GTTG	CA..T.GT.T	.CA.CSTTGT	GTGAGAATGC	TACTGGTGG	ATCTGCGAG	TAGTCATATG	CTTGTCTCAA																			4672	

Slika 12. Rezultati sravnivanja nukleotidnog slijeda dobivenog reakcijom PCR na genomsnoj DNA bundeve *C. pepo* (vrpca 3, slika 10) koristeći početnice uniMATHfw (označeno crvenom bojom) i uniBPM652rev (označeno zelenom bojom) sa međugenskom razmaknicom (X55960.1) *C. pepo*.

CpMAB10	1	-----	GCNNYAA	ACCTGAAACG	GCACCCATA	TAA-TGATA	TCTGAGA-A	TTCCGCTT	ATATCTGAC	ACCATGAT	GTGTAGTGA	86	
C. pepo IGS	311	ITGATGCGC	GTAAE...G...	GAAGAI...A	AGGTGG...	GA...C...G...G	C...I...G...G	C...GGA...E	ACC...T...I...G...CG...CG...C	3195	
CpMAB10	87	-----	CTCCCTTAA	CCACCTCTG	GCACCCATA	TGTTTTAA	ATGCGCTAT	ACCAAAAT	GCATGATG	GCCTTCTCA	ATGCTCTTG	GTATGTA	186
C. pepo IGS	350	I...TC...C	...I...C...C	...I...C...C	...I...C...C	...I...C...C	...I...C...C	...I...C...C	...I...C...C	...I...C...C	...I...C...C	3995	
CpMAB10	137	-----	TGACCTTCT	TTGACCTCA	ATATGCAAT	ATACCTTCT	ACTTGGACT	ATCTTAA	TGATGATG	CTTACCCAC	CACGACCTT	TGACCTTCA	286
C. pepo IGS	420GAI...IC...T...G...	4079	
CpMAB10	237	-----	CTCAGATA	TGTTTTAA	CTCCGCTT	CGTAAATA	TAAATGCA	ATCTGATC	ACCATGAT	TACGATCA	CACGACCTT	GTATGTA	386
C. pepo IGS	475	...TTCCC...	...A...	4172	
CpMAB10	337	-----	TCTTGGATC	TATGCTT	ATCTGATC	ATCAACTT	AGGACATC	TCTCTCAT	TGATGATC	CACGACCTT	TGATGATC	TA-ATCAT	486
C. pepo IGS	470TAI...	4272	
CpMAB10	437	-----	TGCTTCTCA	ACGATGATC	TATGCTT	ATCAACTT	AGGACATC	TCTCTCAT	TGATGATC	CACGACCTT	TGATGATC	TA-ATCAT	586
C. pepo IGS	470	C.....	...T...	4272	
CpMAB10	533	-----	CCCTTCTCA	ATCTGATC	ATCAACTT	AGGACATC	TCTCTCAT	TGATGATC	CACGACCTT	TGATGATC	TA-ATCAT	686	
C. pepo IGS	470	I...C...EA...	4272	
CpMAB10	633	-----	GCACCCATA	ATATGCAAT	ATACCTTCT	ACTTGGACT	ATCTTAA	TGATGATG	CTTACCCAC	CACGACCTT	GTATGTA	786	
C. pepo IGS	470	4272	
CpMAB10	733	-----	TTGACCTCA	ATATGCAAT	ATACCTTCT	ACTTGGACT	ATCTTAA	TGATGATG	CTTACCCAC	CACGACCTT	GTATGTA	886	
C. pepo IGS	470	...E.....	...C...	...T...	...A...	4672	
CpMAB10	833	-----	ATATGCAAT	ATACCTTCT	ACTTGGACT	ATCTTAA	TGATGATG	CTTACCCAC	CACGACCTT	GTATGTA	986		
C. pepo IGS	470	4772	
CpMAB10	933	-----	ATATGCAAT	ATACCTTCT	ACTTGGACT	ATCTTAA	TGATGATG	CTTACCCAC	CACGACCTT	GTATGTA	1086		
C. pepo IGS	470	I...G...C	...TAGI...	...T...A...	...A...C...	...A...C...	...C...I...E	...E...F...TTA...	...A...E...A...	4636	
CpMAB10	1033	-----	ATATGCAAT	ATACCTTCT	ACTTGGACT	ATCTTAA	TGATGATG	CTTACCCAC	CACGACCTT	GTATGTA	1186		
C. pepo IGS	435	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	4355	

Slika 13. Rezultati sravnivanja nukleotidnog slijeda dobivenog reakcijom PCR na genomskoj DNA bundeve *C. pepo* (vrpca 2, slika 10) koristeći početnice uniMATHfw (označeno crvenom bojom) i uniBPM652rev (označeno zelenom bojom) sa međugenskom razmaknicom (X55960.1) *C. pepo*.

3.3 PCR reakcije na kalupu cDNA iz embrionalnog kalusa bundeve

3.3.1 Izolacija RNA i sinteza cDNA

Pri izolaciji ukupne RNA iz bundeve *C. pepo*, koristila sam se embrionalnim tkivom biljke. O ekivala sam da e geni *MAB* u tom tkivu biti ja e izraženi nego u diferenciranom tkivu listova. Sveukupne molekule RNA iz embriogenog kalusa bundeve i listova uro njaka izolirala sam Trizolom, a uspješnost izolacije potvr uje prisutnost vrpce s ribosomalnim genima (slika 14). Geni ribosomalne DNA se u stanici naj eš e prepisuju, pa e u izolatu RNA upravo tih gena biti najviše.

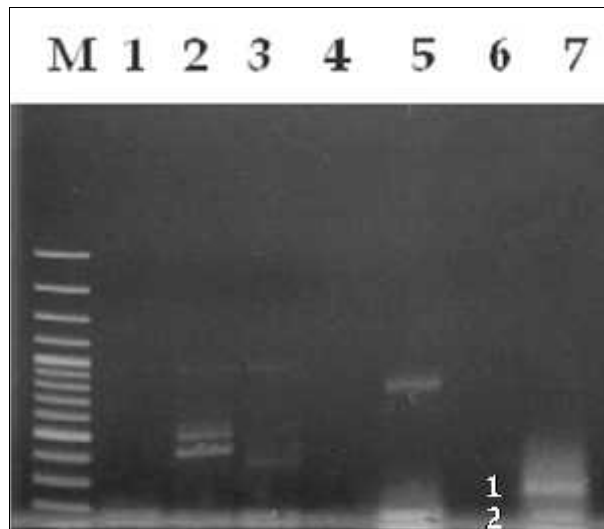


Slika 14. Rezultat izolacije sveukupne RNA iz embrionalnog tkiva bundeve *C. pepo* (jažice 1 i 2) i listova uročnjaka *A. thaliana* (jažice 3 i 4).

Pomoću reverzne transkriptaze, a koristeći i polietilenu oligo-dT₁₈ sintetiziranu je komplementarna DNA te su na kalupu cDNA umnoženi odsjeci gena *GAPDH* (slika 15). Na kalupu cDNA dolazi do umnažanja odsjeka veličine 190 pb, a u slučaju zagađenosti cDNA s genomskom DNA došlo bi do umnažanja većeg fragmenta. Prisutstvo vrpce odgovarajuće veličine na slici 15 u jažicama 3 i 4 govori o uspješnosti reverzne transkripcije mRNA u cDNA bundeve *C. pepo*, te potvrđuje da cDNA nije zagađena genomskom DNA. Korištenjem *Dynabeads mRNA direct Micro* (Dyna) kita izolirala sam mRNA iz embriogenog kalusa bundeve, no u ovom slučaju je izolat cDNA bio onaj i s genomskom DNA te je u PCR reakciji umnožen gen s i bez introna (slika 16, vrpce 1 i 2).



Slika 15. Umnažanje gena *GAPDH* početnicama GAPDHfw i GAPDHrev na kalupu cDNA bundeve dobivene metodom izolacije Trizolom (jažice 3, 4). M: DNA marker *GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus* molekularne mase 100 pb do 3 000 pb.



Slika 16. Umnažanje gena *GAPDH* početnicama GAPDHfw i GAPDHrev na kalupu cDNA bundeve dobivene metodom izolacije komercijalnim kitom *Dynabeads mRNA direct Micro* (jažica 7). M: DNA marker *GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus* molekularne mase 100 pb do 3 000 pb.

Upotrebom po etnica uniMATHfw i uniBTBrev, te uniMATHfw i uniBPM6rev, na kalupu cDNA bundeve, a koriste i polimerazu *Taq* (Fermentas) i polimerazu HotStart Go*Taq* (Promega) u reakcijama PCR nisu umnoženi nikakvi produkti.

4 RASPRAVA

U ovom radu sam ispitala postojanost gena s domenama MATH i BTB u genomu biljke *C. pepo*. Važnost funkcije proteina s domenama MATH i BTB pri diobi zigote vrste *C. elegans* nagovještavao je postojanje gena *MAB* u bundevi, a sličnost nukleotidnih slijedova čak i između u nekih udaljenijih biljnih vrsta obećava je uspješnost pronalaska gena *MAB* i unutar vrste *C. pepo*.

4.1. Važnost gena s domenama MATH i BTB i njihova posljedična konzervacija

Čini se da su geni *MAB* od velike važnosti u mnogim različitim vrstama. BTB proteini u biljkama sudjeluju u različitim procesima: biosintezi etilena, otpornosti na bolesti, fototropizmu, morfogenezi lista i percepciji hormona (Gingerich i sur. 2005). U tkivima u kojima se ekspimirani su mnogi proteini s domenom BTB, a to znači da ti proteini imaju bitnu ulogu u mnogim procesima tijekom rasta i razvoja biljnog organizma. Njihova važnost potvrđena je analizom *cul3a cul3b* dvostrukog mutanta. Gubitak oba kulina rezultira smrću u ranim stadijima embrionalnog razvoja (Dieterle i sur. 2005). Kulin je pak povezan sa jednim od osnovnih pitanja mehanizama regulacije proteinske razgradnje – kako stanica određuje koji protein mora biti razgrađen? Nadalje, kulin čini kompleks s domenom BTB, proteinom RBX1 i također čini E3 ligazu (Gingerich i sur. 2005). Na taj način nastaje i E3 ligaza iz vrste *C. elegans* gdje je MEL-26 samostalan protein koji se preko domene BTB veže na kompleks ligaze E3 i kao takav služi za razgradnju proteina MEI-1, nusprodukta acentrosomalne diobe (Luke-Glaser i sur. 2005). Rezultati istraživanja *MAB* proteina TaMAB2 i ZmMAB1 (Leljak-Levani, neobjavljeno) sugeriraju da ovi proteini ostvaruju važne uloge u jajnoj stanici i zigoti pšenice i kukuruza tijekom razvoja ženskog gametofita, oplodnje i rane embriogeneze. Dodatno, analiza ekspresije gena koji sadrže uputu za sintezu proteina *MAB* miša pokazuje visoku razinu tijekom rane embriogeneze, pogotovo u dvostaničnom stadiju embrija (Huang i sur. 2004). Ovi podaci govore u prilog činjenice o fundamentalnoj i konzerviranoj ulozi proteina *MAB* tijekom najranijih stadija razvoja i biljaka i životinja.

Za razliku od u kojima ima samo 6 gena s domenama MATH i BTB, u genomu riže je identificirano čak 69 gena koji sadrže uputu za sintezu proteina *MAB*.

Oita je ekspanzija i raznolikost MAB proteina kod riže i vjerojatno drugih jednosupnica koja se dogodila slijede i razdvajanje jednosupnica i dvosupnica (Gingerich i sur. 2007). Filogenetska analiza proteina MAB iz vrsta *A. thaliana*, *H. sapiens*, *R. norvegicus*, *M. musculus* ukazala je na to da se svi MAB proteini uro njaka grupiraju zajedno i odvojeno od životinjskih proteina MAB. Nadalje ve ina proteina MAB jednosupnica kao što su riža i kukuruz grupiraju se zajedno ali odvojeno od tri proteina MAB iz pšenice. Ova injenica ide u prilog pretpostavci Gingericha i suradnika iz 2007, o pove anju broja razli itih supstrata i funkcija.

4.2. Detekcija gena s domenama MATH i BTB u genomu bundeve *C. pepo*

Za detekciju gena *MAB* u genom bundeve odlučila sam iskoristiti sekvencu gena *BPM1* biljke *A. thaliana* kao komplementarnu probu za hibridizacijsku analizu po Southernu jer su svi *BPM* geni iz uro njaka vrlo slični jedan drugome, a uro njak je dvosupnica baš kao i bundeva. Proba MATH, duga 338 pb, sadržavala je slijed nukleotida domene MATH, a proba BTB, duga 781 pb, nukleotidne slijedove prijelaznog dijela domena MATH i BTB, domenu BTB te 7 pb vektorskog plazmida pCR2.1 TOPO. Nastale vrpce na filmu dokazuju prisutnost sekvenci u genomu bundeve *C. pepo* koje su dovoljno slične genu *BPM1* da se hibridiziraju. Budući da sve vrste imaju više različitih gena s domenama BTB a ne samo gene *MAB*, u genomu bundeve *C. pepo* prepoznati su i ostali geni BTB koji također predstavljaju zanimljive kandidate u proučavanju stanične degradacije proteina vezane uz kulin i ubikvitin. Uspješnost hibridizacije navedenih proba na razgrađenu genomsku DNA biljke *C. pepo* predlaže postojanje 4 gena *MAB*. Uspješnost hibridizacije potakla je daljnju potragu za genima *MAB* u genomu *C. pepo*.

Mogućnost detekcije gena *MAB* lananom reakcijom polimerazom (PCR) dovela je do dizajniranja degeneriranih proba. Kako životinjski proteini MAB imaju malo sličnosti sa biljnim proteinima MAB, pri konstruiranju degeneriranih proba uzimala sam u obzir samo nukleotidne slijedove gena *MAB* iz biljnih vrsta. U posljednjih godinu dana u banci gena su se pojavili nukleotidni slijedovi različitih biljnih vrsta slični genima *BPM* uro njaka. Oni su u bazi predstavljeni kao hipotetski proteini budući da su dobiveni iz cDNA biblioteka. Uspoređujući sličnost nukleotidnih

slijedova tih gena *MAB* zaključila sam da se jednosupnice dosta razlikuju od ostalih biljnih vrsta, pa sam degenerirane po etnicama odlučila dizajnirati najprije po uzoru na 6 gena *BPM* biljke *A. thaliana*. Nukleotidne slijedove gena *BPM* iz urošnjaka sam zatim usporedila i sa slijedovima iz vrsta *Picea sitchensis*, *Vitis vinifera* i *Physcomitrella patens*. Pokazalo se da je domena MATH u svih navedenih vrsta bolje konzervirana nego domena BTB pa su stoga i po etnicama BTB (uniBPM652rev i uniBPM770rev) i one degenerirane. Mnogobrojne reakcije PCR na njihene na osnovu genomske DNA ekstrahirane iz lišća bundeve nisu dale produkte ni nakon adaptacije uvjeta. Jedna od niza reakcija s uniMATHfw i uniBPM652rev po etnicama rezultirala je sa 3 fragmenta veličina 500 pb, 1 000 pb i 2 300 pb. Analizom dobivenih sekvenci utvrđeno je da su fragmenti od 500 pb i 1 000 pb slični različitim dijelovima IGS sekvenci tj. 25S – 18S rDNA meugenskih razmaknica ribosomalnih gena bundeve. Fragmenti od 2 300 pb su na svojim 5' – krajevima slični dijelovima 18S – 5S meugenskih razmaknica mitohondrijske rRNA bundeve, a na 3' – krajevima 18S – 5S meugenskim razmaknicama mitohondrijske rRNA krastavca. Oito je odabir degeneriranih po etnicama rezultirao njihovom sličnošću i komplementarnošću s najmnogobrojnijim genima – ribosomalnim genima. Vjerojatnost da se detektiraju nejednako zastupljeni *MAB* geni u ovim uvjetima su gotovo nemogući.

Nastojeli detektirati gene s MATH i BTB domenama u tkivu *C. pepo*, a kako bi izbjegnula meugenske razmaknice ribosomalnih gena, učinila sam i PCR reakcije na komplementarnoj DNA dobivenoj reverznom transkripcijom ukupnih mRNA molekula iz embriogenog kalusa bundeve. Sadržaj sveukupnih mRNA molekula reflektira trenutni uzorak ekspresije u stanici. Za istražene *MAB* proteine zna se da su eksprimirani u vrijeme embrionalnog razvoja, pa sam korištenjem embriogenog kalusa nastojala povećati mogućnost detektiranja upravo gena *MAB*. Ipak brojne izvedene PCR reakcije i njihove optimizacije nisu dale nikakve rezultate. Nemogućnost detekcije gena *MAB* upućuje na vjerojatno preveliku različitost između sekvenci poznatih gena *MAB* i gena *MAB* bundeve, a detekciju još dodatno otežava velika sličnost sekvence meugenskih razmaknica i najkonzerviranijih dijelova gena *MAB*. Različitost gena *MAB* bundeve govori o vjerojatnom stvaranju i razvijanju specijalizacija unutar *MAB* gena. To nadalje upućuje na zaključak da su se MATH i BTB domene *MAB* proteina biljke *C. pepo* mijenjale da bi se adaptirale na nove supstrate koje je E3 ligaza bundeve trebala ubikvitinirati.

3 ZAKLJUČAK

Hibridizacijska analiza po Southernu pomoću u hibridizacijskih proba nastalih cijepanjem gena *BPM1* iz vektorskog plazmida pCR AtMB7 dokazala je prisutstvo gena *MAB* s domenama MATH i BTB u genomu biljke *C. pepo*.

U genomu bundeve *C. pepo* postoji najmanje 4 različita gena *MAB*.

Lanana reakcija polimerazom na kalupu genomske DNA izolirane iz tkiva lišća biljke *C. pepo*, uz korištenje primera uniMATHfw, uniBPM652rev ili uniBPM770rev nije dala fragmente koji su imali sličnosti s genima *MAB*, zbog velike sličnosti s međugenskim razmaknicama ribosomalnih gena bundeve.

Lanana reakcija polimerazom na kalupu komplementarne DNA iz embriogenog kalusa bundeve *C. pepo* nije dala nikakve produkte.

Budući da je određeno da u genomu bundeve *C. pepo* postoji najmanje 4 gena *MAB* kojima nije bilo moguće odrediti nukleotidne slijedove lananim reakcijama polimerazom, određivanje nukleotidnih slijedova gena *MAB* ostaje otvoreno za daljnja istraživanja. Jedna od metoda koja bi se mogla primijeniti je stvaranje cDNA biblioteka, pri čemu bi se sve cDNA molekule dobivene izolacijom iz embrionalnog tkiva ugradile u vektorske plazmide. Plazmidima bi se transformirale bakterije koje bi se nasadile na hranjivu podlogu. Nastale bakterijske kolonije koje nose gene *MAB* prepoznale bi probe MATH (338 pb) i BTB (781 pb).

4 LITERATURA

BRADLEY JR, POBER JS 2001 Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20: 6482-6491

CLARK-MAGUIRE S, MANIS PE 1994 *MEI-1*, a gene required for meiotic spindle formation in *Caenorhabditis elegans*, is a member of a family of ATPases. *Genetics* 136: 533-546

CHOO KB, HSU MC, CHONG KY, HUANG CJ 2007 Testis-specific expression and genomic multiplicity of the rat *Rtdpoz* genes that encode bipartite TRAF- and POZ/BTB-domain proteins *Gene* 31: 141-149

COLLINGRO A, TOENSHOFF ER, TAYLOR MW, FRITSCHER TR, WAGNER M, HORN M 2004 *Candidatus Protochlamydia amoebophila*, an endosymbiont of *Acanthamoeba* spp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1863-1866

DIETERLE M, THOMANN A, RENOUE JP, PARMENTIER Y, COGNAT V, LEMMONIER G, MULLER R, SHEN WH, KRETSCH T, GENSCHIK P 2005 Molecular and functional characterization of *Arabidopsis* Cullin 3A. *Plant J.* 41: 386-399

DODEMAN VL, DUCREUX G, KREIS M 1997 Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Oxford J. Exp. Botany* 48: 1493-1509

GAO X, NAGAWA S, WANG G, YANG Z 2008 Cell Polarity Signaling: Focus on Polar Auxin Transport. *Carcinogenesis* 1: 899-909

GINGERICH DJ, GAGNE JM, SALTER DW, HELLMANN H, ESTELLE M, MA L, VIERSTRA RD 2005 Cullins 3a and 3b assemble with members of the Broad Complex/Tramtrack/Bric-a-Brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin-protein ligases (E3s) in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, 280: 18810-18821

GINGERICH DJ, HANADA K, SHIU SH, VIERSTRA RD 2007 Large-scale, lineage-specific expansion of a Bric-a-brac/Tramtrack/Broad Complex ubiquitin-ligase gene family in rice. *Plant Cell* 19: 2329-2348

GODT D, COULDERC JL, CRAMTON SE, LASKI FA 1993 Pattern formation in the limbs of *Drosophila*: bric a brack is expressed in both a gradient and a wave-like pattern and is required for specification and proper segmentation of tarsus. *Development* 119: 799-812

HEIDSTRA R 2007 Asymmetric cell division in plant development. *Prog. In Mol. and Subcell. Biol.* 11: 34-41

HUANG CJ, CHEN CY, CHEN HH, TSAI SF, CHOO KB 2004. TDPOZ, a family of bipartite animal and plant proteins that contain the TRAF (TD) and POZ/BTB domains. *Gene* 324, 117–127

KURZ T, PINTARD L, WILLIS JH, HAMILL DR, GONCZY P, PETER M AND BOWERMAN B 2002 Cytoskeletal regulation by the Nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway. *Science* 295: 1294-1298

LEE A, SUH DC, KANG JE, KIM MH, PARK H, LEE MN, KIM JM, JEON BN, ROH HE, YU MY, CHOI KY, KIM KY, HUR MW 2005 Transcriptional activity of SP1 is regulated by molecular interactions between the zinc finger DNA binding domain and the inhibitory domain with corepressors, and this interaction is modulated by MEK *J. Biol. Chem.* 280: 28061-28071

LELJAK-LEVANI D, BAUER N, MIHALJEVI S, JELASKA S 2003 Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): Control of somatic embryo development by nitrogen compounds. *J. Plant Physiol.* 161: 229-236

LUKE-GLASER S, PINTARD L, LU C, MAINS PE, PETER M 2005 The BTB protein MEL-26 promotes cytokinesis in *C. elegans* by a CUL-3-independent mechanism. *Curr. Biol.* 18: 1605-1615

LYNCH M, CONERY JS 2000 The evolutionary fate and consequence of duplicate genes. *Science* 290: 1151-1155

NAGAI Y, KOJIMA T, MURO Y, HACHIA T, NISHIZAWA Y WAKABAYASHI T, HAGIWARA M 1997 Identification of a novel nuclear speckle-type protein, SPOP. *FEBS Lett.* 418: 23-26

PEREZ-TORRADO R, YAMADA D, DEFOSSES PA 2006 Born to bind: the BTB protein-protein interaction domain. *BioEssays* 28: 1194-1202

STOGIOS PJ, DOWNS GS, JAUHAL JJS, NANDRA SK, PRIVE GG 2005 Sequence and structural analysis of BTB proteins. *Gen. Biol.* 6: R82

SUNNERHAGEN M, PURSGLOVE S, FLADVAD M 2002 The new MATH: homology suggests shared binding surfaces in meprin tetramers and TRAF trimers. *FEBS Lett.* 530: 1-3

ŠUMANOVAC 2009 Važnost proteinskih domena MATH I BTB u odreivanju polarnosti biljnih stanica. *Diplomski rad*

UREN AG, VAUX DL 1996 TRAF proteins and meprins share a conserved domain. *Trends Biochem. Sci.* 21: 244-245

WANG Q, LATHAM KE 1997 Requirements for protein synthesis during embryonic genome activation in mice. *Mol. Reprod. Dev.* 47: 265-270

WEBER H, BERNHARDT A, DIETERLE M, HANO P, MUTLU A, ESTELLE M, GENSCHIK P, HELLMAN H 2005 *Arabidopsis* AtCUL3a and AtCUL3b form

complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiol.* 137: 83-89

ZAPATA JM, MARTINEZ-GARCIA V, LEFEBVRE S, 2007 Phylogeny of the TRAF/MATH domain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 597: 1-24