

Pojačana ekspresija delecijских mutanata gena BPM1 u uročnjaku Arabidopsis thaliana

Franjković, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:839950>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivona Franjković

Pojačana ekspresija delecijских mutanata gena *BPM1* u uročnjaku *Arabidopsis thaliana*

Diplomski rad

Zagreb, 2019. godina

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biljnu molekularnu biologiju na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nataše Bauer. Rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekta „MATH-BTB proteini kao regulatori transkripcije i RNA posredovane metilacije DNA u biljnom razvitku“ IP 2016-06-6229.

Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ZAHVALE

Iskreno zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Nataši Bauer na strpljivosti u radu sa mnom, velikodušnom dijeljenju znanja i prenošenju iskustava u eksperimentalnom radu, te gotovo majčinskoj potpori i brizi.

Nadalje zahvaljujem na ljubaznosti, pažnji i korisnim savjetima izv. prof. dr. sc. Dunji Leljak-Levanić.

Također hvala Ani-Mariji Boljkovac na njezinom radu te trudu sa mnom tijekom mogega rada u laboratoriju.

Hvala na pomoći u fluorescentnoj mikroskopiji te uputama i savjetima u obradi slika mag. mol. biol. Mateji Jagić.

Veliko hvala mojim roditeljima i sestri na njihovoj ustrajnosti i strpljivosti, potpori i ljubavi kroz čitav tijek mogega studiranja. Na hrabrenju, podršci, savjetima i molitvama od srca zahvaljujem svim dragim prijateljima.

Najveća hvala dragome Bogu bez kojega ni moje studiranje ni diplomski rad ne bi bili ni mogući niti dovršeni.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

POJAČANA EKSPRESIJA DELECIJSKIH MUTANATA GENA *BPM1* U UROČNJAKU
Arabidopsis thaliana

Ivona Franjković

Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek,
Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Proteini BPM sudjeluju u ciljanoj degradaciji proteina putem proteasoma 26S. Tijekom rasta, razvoja i u stresu, u stanici neprekidno dolazi do ciljane degradacije proteina. Pri tome ključnu ulogu ima degradacija transkripcijskih faktora koji su važni regulatori rasta i razvoja. Proteini BPM su adaptor E3 ligazi CUL3 (kulin 3) te svojim vezanjem na transkripcijske faktore sudjeluju u njihovoj ubikvitinaciji i regulaciji degradacije. Dosadašnja istraživanja su pokazala da protein BPM1 iz uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) lokalizira u jezgri i u citoplazmi transformiranih stanica duhana BY2 te je otkriven C-terminalni bipartitni nuklearni lokalizacijski signal (NLS) proteina BPM1, a u ovome je radu istražena njegova uloga u uročnjaku. U tu svrhu regenerirane su transgenične biljke uročnjaka s pojačanom ekspresijom krnjeg BPM1 proteina (kojem je deletirana C-terminalna NLS regija) fuzioniranog sa zelenim fluorescentnim proteinom (GFP), te biljke s pojačanom ekspresijom nuklearnog lokalizacijskog signala proteina BPM1 fuzioniranog s GFP-om. U transgeničnim biljkama provjerena je prisutnost transgena i njihova ekspresija, a imunodetekcijom je provjerena prisutnost rekombinantnih proteina. Fluorescentnom mikroskopijom je utvrđeno da nuklearni lokalizacijski signal proteina BPM1 fuzioniran s GFP-om (NLSbpm1-GFP) lokalizira u jezgri te da je time zaslužan za smještaj proteina BPM1 u jezgru, što je preduvjet za sudjelovanje proteina BPM1 u različitim staničnim procesima koji se u jezgri odvijaju. Sub-stanična lokalizacija krnjeg proteina BPM1 fuzioniranog s proteinom GFP (delta-3-BPM1-GFP) nije utvrđena.

(37 stranica, 6 slika, 8 tablica, 55 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u: Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: transgenične biljke *Arabidopsis thaliana*, degradacija proteina, nuklearni lokalizacijski signal

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

Ocjenitelji: Dr. sc. Nataša Bauer, izv. prof.
Dr. sc. Dijana Škorić, red. prof.
Dr. sc. Domagoj Đikić, red. prof.

Zamjena: Dr. sc. Dunja Leljak-Levanić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 18.9.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

OVEREXPRESSION OF *BPM1* DELETION MUTANTS IN *Arabidopsis thaliana*

Ivona Franjković

Faculty of Science, Department of Biology,
Roosevelt Square 6, 10000 Zagreb, Croatia

BPM proteins participate in targeted protein degradation via the 26S proteasome. During growth, development and stress in the cell, targeted degradation of the protein occurs continuously. The degradation of transcription factors, which are important regulators of growth and development, plays a key role in this. BPM proteins are adapters of the E3 ligase CUL3 (cullin 3) and by their binding to transcription factors participate in their ubiquitination and regulation of degradation. Studies to date have shown that the *Arabidopsis thaliana* BPM1 protein localizes to the nucleus and cytoplasm of transformed BY2 tobacco cells, and the C-terminal bipartite nuclear localization signal (NLS) of BPM1 protein was detected. Its role in the *Arabidopsis* was investigated in this paper. For this purpose, transgenic plants with enhanced expression of truncated BPM1 protein (to which the C-terminal NLS region was deleted) fused with green fluorescent protein (GFP) and plants with enhanced expression of the nuclear localization signal of BPM1 protein fused with GFP were regenerated. In transgenic plants, the presence of transgenes and their expression was checked, and the presence of recombinant proteins was checked by immunodetection. Fluorescence microscopy has determined that the nuclear localization signal of BPM1 fused with GFP (NLSbpm1-GFP) localizes to the nucleus and is thus responsible for the placement of BPM1 in the nucleus, which is a prerequisite for the involvement of BPM1 in various cellular processes in the nucleus place. Sub-cellular localization of truncated BPM1 protein fused with GFP protein (delta-3-BPM1-GFP) has not been established.

(37 pages, 6 figures, 8 tables, 55 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in: Central Biological Library

Key words: *Arabidopsis thaliana* transgenic plants, protein degradation, nuclear localization signal

Supervisor: PhD Nataša Bauer, Assoc. Prof.

Reviewers: PhD Nataša Bauer, Assoc. Prof.
PhD Dijana Škorić, Prof.
PhD Domagoj Đikić, Prof.

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

Thesis accepted: 18.9.2019.

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1. 1. Osnovni molekularni putevi proteinske degradacije u eukariotskim stanicama....	1
1. 2. Degradacija proteina u biljnim stanicama.....	3
1. 3. Uloga proteina BPM u ubikvitiniranju ciljnih proteina.....	7
1. 4. <i>Arabidopsis thaliana</i> – modelni organizam.....	8
1. 5. Cilj istraživanja.....	9
2. Materijali i metode.....	10
2. 1. Materijali.....	10
2. 1. 1. Biljni materijali.....	10
2. 1. 2. Hranjiva podloga.....	12
2. 1. 3. Komercijalni kompleti.....	12
2. 1. 4. Puferi i gelovi.....	12
2. 1. 5. Boje i standardi.....	14
2. 1. 6. Enzimi.....	14
2. 1. 7. Početnice.....	15
2. 1. 8. Protutijela.....	16
2. 2. Metode.....	16
2. 2. 1. Regeneracija transgeničnih biljaka na podlozi sa selekcijskim biljegom.....	16
2. 2. 2. Izolacija genomske DNA.....	17
2. 2. 3. Izolacija mRNA i reverzna transkripcija transgena.....	17
2. 2. 4. Umnažanje gena metodom PCR.....	18
2. 2. 5. DNA elektroforeza.....	19
2. 2. 6. Izolacija topljivih proteina i utvrđivanje prisutnosti rekombinantnih proteina metodom imunodetekcije.....	20
2. 2. 7. Analiza sub-stanične lokalizacije i stabilnosti rekombinatnih proteina fluorescentnom mikroskopijom.....	21
3. Rezultati.....	22
3. 1. Selekcija transgeničnih biljaka na podlozi s amonijevim glufosinatom.....	22
3. 2. Umnažanje transgena <i>delta-3-BPM1-GFP</i> i <i>NLSbpm1-GFP</i> izoliranih iz regeneriranih klijanaca uročnjaka.....	23

3. 3. Transkripcijska aktivnost transgena <i>delta-3-BPM1-GFP</i> i <i>NLSbpm1-GFP</i> u regeneriranim klijancima.....	24
3. 4. Imunodetekcija rekombinantnih proteina <i>delta-3-BPM1-GFP</i> i <i>NLSbpm1-GFP</i> u proteinskim ekstraktima klijanaca uročnjaka.....	25
3. 5. Sub-stanična lokalizacija proteina <i>delta-3-BPM1-GFP</i> i <i>NLSbpm1-GFP</i> u transgeničnim biljakama.....	26
4. Rasprava.....	29
5. Zaključak.....	32
6. Literatura.....	33

1. UVOD

1. 1. Osnovni molekularni putevi proteinske degradacije u eukariotskim stanicama

Brojni stanični procesi zahtijevaju strogo kontroliranu koordinaciju sinteze i razgradnje proteina. Na taj se način stanica prilagođava promjenjivim vanjskim okolnostima, ali i regulira vlastiti rast, diobu i brojne unutarstanične procese. Pritom se može razlikovati proces podlaganja proteina ograničenom broju specifičnih proteolitičkih cijepanja, djelovanjem proteolitičkih enzima (endoproteaza i egzoproteaza). Primjerice, tijekom procesa unutarstanične lokalizacije ili tijekom sazrijevanja početnog translacijskog produkta pri čemu nastaju biološki aktivni zreli proteini, te tijekom razgradnje proteina u kojoj dolazi do hidrolize peptidnih veza sa ciljem oslobađanja aminokiselina. Kada je riječ o ovom potonjem procesu, u eukariotskim stanicama opisana su dva glavna molekularna puta pomoću kojih se odvija takva proteinska degradacija – put ubikvitin-proteasomske degradacije i lizosomska proteoliza (Cooper 2004a).

Lizosomska proteoliza jest put unosa proteina u lizosome, jednostrukom membranom obavijene organele koji sadrže brojne hidrolitičke enzime, uključujući i nekoliko proteaza. Uz degradaciju različitih unutarstaničnih molekula i citoplazmatskih organela, lizosomi također sudjeluju i u razgradnji molekula unijetih endocitozom. Što se tiče probira proteina poradi unosa u vezikule koje će ih transportirati u lizosome gdje će biti degradirani, taj proces može biti i neselektivan (što postupno dovodi do degradacije dugoživućih proteina) i selektivan (prilikom gladovanja, kada se u lizosomima proteolitički degradiraju određeni citosolni proteini, specifičnog aminokiselinskog sastava, koji mogu biti žrtvovani da bi stanica dobila aminokiseline i energiju za odvijanje temeljnih metaboličkih procesa) (Cooper 2004b).

Najvažnijim mehanizmom selektivne proteinske degradacije smatra se ipak put koji koristi protein ubikvitin kao biljeg za ciljano označavanje citosolnih i jezgrinih proteina namijenjenih brzom degradaciji u proteasomskom kompleksu. Proteasomi su visoko konzervirani proteolitički kompleksi veličine 600 – 900 kDa, koji su inače prisutni u citosolu i jezgri eukariotskih stanica, a utvrđeno je da kompleksi slični proteasomima postoje i u nekim eubakterija i arheobakterija (Tanaka i Tanahashi 1998). Za ubikvitinaciju je odgovorno uzastopno djelovanje triju enzima, pri čemu je ubikvitin-aktivirajući enzim (E1) važan za aktivaciju molekule ubikvitina koja se potom prebacuje na ubikvitin-konjugirajući enzim (E2), a s njega na ubikvitin-ligirajući enzim (E3), koji je zaslužan za prepoznavanje supstrata

i posreduje u njegovoj ubikvitin-ovisnoj razgradnji (Cooper 2004a). Spomenuti protein ubikvitin je polipeptid duljine 76 aminokiselina koji je visoko konzerviran u svih eukariota (Vierstra 1996). Proteinima koji se obilježavaju njime za degradaciju dodaje se poliubikvitinski lanac. Najprije se dodaje jedna molekula ubikvitina na bočni lanac lizinskog aminokiselinskog ostatka ciljnog proteina, a potom se sam ubikvitin poliubikvitinira, najčešće lizin na poziciji 48 (Lys48), premda je poznato da se ubikvitin može poliubikvitinirati na svih sedam lizina koje sadrži (Lys 6, 11, 27, 29, 33, 48 i 63; Xu i Peng 2008). U procesu poliubikvitinacije na prvi vezani ubikvitin dodaju se jedna po jedna druge molekule ubikvitina do nastanka poliubikvitinskog lanca. Tako obilježene (poliubikvitinirane) ciljne proteine prepoznaje proteinski kompleks nazvan proteasom 26S (engl. *26S proteasome*, 26SP). Međutim, osim u svrhu degradacije, ustanovljeno je da su moguće i druge namjene poliubikvitinacije proteina, primjerice, ako se poliubikvitinski lanac dodaje na Lys63, takav biljeg predstavlja signal mehanizmima popravka DNA (Hofmann i Pickart 1999). Nadalje, osim opisanog specifičnog načina označavanja proteina dodavanjem lanca ubikvitina, neki proteini podlažu se monoubikvitinaciji – dodatku jedne molekule ubikvitina. To je jedan od mehanizama kojim se utječe na regulaciju transkripcije, npr. ubikvitinacija histona H2B (na Lys123) preduvjet je za metilaciju histona H3 (na Lys4) a spomenuta metilacija za posljedicu ima promjenu u stupnju kondezacije kromatina odnosno utječe na utišavanje genske ekspresije (Sun i Allis 2002). Monoubikvitinacija može utjecati i na regulaciju drugih staničnih procesa, poput transporta receptora, popravka DNA i pupanja virusa (Ikeda i Đikić 2008; Husnjak i Đikić 2012). Zanimljivo je da je moguća i višestruka monoubikvitinacija – dodatak pojedinačnih molekula ubikvitina na različite lizine ciljnog proteina, što može dovesti do endocitoze na taj način ubikvitinima obilježenog proteina. Primjerice, receptor epidermalnog faktora rasta jednim se ubikvitinom označava za endocitozu i degradaciju u stanici, ali se također, nakon odvajanja od stanične membrane i unosa vezikulom u stanicu, naknadno višestruko monoubikvitinira (Mosesson i sur. 2003).

Za razliku od ranije spomenute degradacije dugoživućih proteina u lizosomu, u proteasomu se pretežno degradiraju kratkoživući proteini – i jezgrini i citosolni, kao i novosintetizirani proteini koji nastaju na membrani endoplazmatskog retikuluma ali se ne mogu ispravno smotati pa se retrotranslociraju u citosol da bi se tamo degradirali (Cooper 2004a). Osobito je za život stanice važna ubikvitinom posredovana degradacija regulatornih proteina kao mehanizam kontrole različitih staničnih procesa, uključujući napredovanje kroz

stanični ciklus, regulaciju transkripcije, prijenos signala, utišavanje receptora (receptorsku *down-regulaciju*) i endocitozu te programiranu staničnu smrt (Hershko i Ciechanover 1998).

1. 2. Degradacija proteina u biljnim stanicama

Proteinska degradacija u biljaka je složeni proces, kao uostalom u svih eukariotskih stanica, i uključuje brojne proteolitičke puteve. Prepoznato je dosad pet grupa (klasa) endoproteaza u biljnim stanicama, koje se klasificiraju s obzirom na aminokiselinski ostatak prisutan u aktivnom mjestu tih enzima na: cisteinske proteaze, serinske proteaze, metaloproteaze, aspartatske proteaze te posebnu petu grupu čiji katalitički mehanizam ne pripada ranije navedenim grupama. Istraživanja u različitim biljnim vrstama su pokazala da su različite grupe ovih proteaza smještene u vakuoli, kao što se i moglo pretpostaviti s obzirom da većinom u uvjetima *in vitro* pokazuju da su za njihovu katalitičku aktivnost optimalne niske pH vrijednosti (Callis 1995). Međutim, različite proteaze i proteazni kompleksi prisutni su i u drugim staničnim odjeljcima. Jedan je primjer proteazni sustav Clp (engl. *caseinolytic protease*), koji je evolucijski visoko konzerviran te je proteaza Clp pronađena prvotno u prokariotskim stanicama, ali su njezini homolozi prisutni i u mitohondrijima i plastidima eukariotskih stanica. U mitohondrijima je Clp vezan za unutrašnju membranu mitohondrija i iznimno je važan za sustav kontrole kvalitete mitohondrijskih proteina i uklanjanje oštećenih ili pogrešno smotanih proteina matriksa, no unatoč tolikom značaju, dosad je pronađena u biljnim mitohondrijima samo jedna proteaza Clp tipa (Peltier i sur. 2004). Što se tiče plastida, u kojima se razlikuju tri veće porodice plastidnih proteaza, proteaze Clp predstavljaju najsloženiji plastidni proteazni sustav. Primjerice, u uročnjaku je ustanovljeno da se plastidni sustav Clp sastoji od petnaest molekula kodiranih genomom jezgre i jedne kodirane genomom plastida. Navedena složenost toga sustava, kao i ustanovljena prisutnost brojnih drugih proteaza u plastidima, u skladu je s brojnim ulogama koje plastidne proteaze imaju: N-terminalno procesuiranje tisuća prekursorskih proteina kodiranih jezgrinim genomom i dorada dvaju prekursorskih proteina kodiranih plastidnim genomom, uklanjanje oštećenih ili nepotrebnih plastidnih proteina, recikliranje aminokiselina i kontrola plastidne genske ekspresije (Olinares i sur. 2011).

Biljne stanice sadrže i proteasomske komplekse, koji, u usporedbi s ranije spomenutim proteazama, imaju neutralni pH optimum, a cijepanja koja se odvijaju u njima

su relativno nespecifična (dok proteaze cijepaju svoje supstrate na malobrojnim točno određenim mjestima) te rezultiraju stvaranjem peptidnih fragmenata duljine šest do devet aminokiselina (Wenzel i sur. 1994). Proteasomski kompleks 26S sastoji se od dviju podjedinica: cilindrično oblikovanog proteasomskog kompleksa 20S (engl. *20S proteasome*, 20SP) u kojem dolazi do razgradnje proteina i regulatornih podjedinica koje se vezuju za cilindar kompleksa 20SP a omogućuju specifično prepoznavanje poliubikvitiniranih ciljnih proteina te su nužne za degradaciju proteina ovisnu o ubikvitinu (Kurepa i Smalle 2008). Međutim, biljne stanice sadrže i slobodne komplekse 20SP, a analize mutanata uročnjaka s gubitkom funkcije određenih regulatornih podjedinica proteasoma 26S pokazale su da kad je na taj način smanjena funkcionalnost kompleksa 26SP, dolazi do povećanja aktivnosti u slobodnim kompleksima 20SP, koji posreduju u putu proteolize neovisne o ubikvitinu (Kurepa i sur. 2008). Nadalje, iste su analize mutanata pokazale povezanost porasta razine slobodnih kompleksa 20SP u stanici i povećanja tolerancije stanice na oksidativni stres, pa se zaključuje da u uvjetima staničnog stresa, kompleks 26SP je odgovoran za degradaciju pogrešno smotanih proteina, a slobodni kompleksi 20SP su potrebni za uklanjanje oksidiranih proteina (Kurepa i sur. 2009).

Što se tiče lokalizacije proteasomskih kompleksa u biljnim stanicama, ustanovljeno je da su prisutni i u citoplazmi i u jezgri biljnih stanica (Vallon i Kull 1994; Vierstra 1996). Pritom, s obzirom na specifičnosti biljnih stanica, zanimljiva je uloga proteasomskog sustava ovisnog o obilježavanju proteina ubikvitinom u regulaciji dvosmjerne komunikacije između plastida i jezgre (Hirosawa i sur. 2017). Naime, ne samo da je većina plastidnih proteina kodirana genomom jezgre pa se takvi prekursorski proteini moraju unijeti u plastide, nego i plastidi također šalju signale u jezgru i ti su signali neophodni u regulaciji ekspresije gena koji kodiraju za plastidne proteine u oba genoma (i plastidnom i jezginom), kako bi se u biljnoj stanici mogla odvijati biogeneza i razvoj plastida kao i ispravno složiti fotosintetski aparat (Pogson i sur. 2008). Međutim, otkriveno je da je za tu interakciju jezgre i plastida važna i regulacija putem proteasomskog sustava ovisnog o ubikvitinaciji ciljnih proteina. Ciljevi ove regulacije su: neuneseni plastidni prekursorski proteini u citosolu (kako bi se izbjeglo nakupljanje takvih proteina u citosolu; Lee i sur. 2013), proteini uključeni u translokaciju na membrani plastida (direktnom regulacijom razine komponenti translokacijskog sustava vanjske plastidne membrane pomoću poliubikvitinacije istih; Ling i Jarvis 2015) i transkripcijski faktori u jezgri. Na primjer, za transkripcijske faktore GLK

(engl. *GOLDEN2-LIKE*), koji potiču (pozitivno reguliraju) ekspresiju gena povezanih s fotosintezom u različitim biljnim vrstama, utvrđena je takva proteasomska regulacija. Naime, u uročnjaku je prisutan transkripcijski faktor GLK1 koji je na razini transkripcije reguliran plastidnim signalima što dolaze u jezgru i utječu na razinu ekspresije gena *GLK1* u jezgri (čime se utječe posljedično na razinu ekspresije gena povezanih s fotosintezom koji su pod kontrolom transkripcijskog faktora GLK1), međutim njegova se razina u stanici kontrolira i na razini translacije, koja je barem djelomično regulirana ubikvitin-proteasomskim sustavom u citoplazmi (Tokumaru i sur. 2017). Slično je utvrđeno i za transkripcijski faktor GLK2 u rajčici, da se razina GLK2 negativno regulira degradacijom pomoću kompleksa ubikvitin-ligaze kulin 4 (CUL 4) (Tang i sur. 2016).

Osim što je ubikvitinacija važna za regulaciju citosolnih proteina, sve je više pokazatelja da je ubikvitinacija pomoću ubikvitin-proteasomskog sustava važna i za regulaciju jezgrinih proteina. U jezgri, ubikvitin-proteasomski sustav regulira gensku ekspresiju, remodeliranje genoma i prijenos signala. S obzirom na procese koji se u jezgri odvijaju, jedan od glavnih ciljeva ubikvitin-proteasomskog sustava u ovome staničnom odjeljku jest pravovremena i brza degradacija transkripcijskih faktora, kao važnih regulatora rasta, razvoja i odgovora na stres u stanici (Serrano i sur. 2018). Primjerice, u uročnjaku su pronađene ubikvitin-ligaze E3 koje sudjeluju u regulaciji odgovora stanice na vanjske stresne signale, poput izloženosti biljke sušnim uvjetima. Ustanovljeno je da su smještene uglavnom u jezgri gdje izravno interagiraju sa ciljnim transkripcijskim faktorima i posreduju njihovu ubikvitinaciju i proteasomsku degradaciju u proteasomu 26S (Qin i sur. 2008). No, osim transkripcijskih faktora, ubikvitin-proteasomski sustav može regulirati i proteolizu drugih važnih jezgrinih regulatornih komponenti. Jedan je primjer transkripcijski koaktivator NPR1 (engl. *nonexpressor of pathogenesis-related genes 1*), koji se uobičajeno nalazi u citoplazmi, tvoreći komplekse od više podjedinica, i konstantno se odvodi u degradaciju pomoću kompleksa ubikvitin-ligaze kulin 3 (CUL 3). Međutim, u prisutnosti patogena koji potiču nakupljanje salicilne kiseline, što posljedično dovodi do razdvajanja multimernih kompleksa na pojedinačne proteine NPR1, taj se transkripcijski koaktivator translocira u jezgru (pomoću bipartitnog nuklearnog lokalizacijskog signala; Kinema i sur. 2000). U jezgri se NPR1 vezuje za odgovarajuće transkripcijske faktore i potiče transkripciju ciljnih gena povezanih sa staničnim odgovorom na napad patogena (Weigel i sur. 2005). No, ustanovljeno je da ubrzo nakon što je omogućio početnu aktivaciju transkripcije ciljnih gena, protein NPR1 biva

fosforiliran što mu onemogućuje da dalje djeluje kao transkripcijski aktivator te biva uklonjen ubikvitin-proteasomskom degradacijom u jezgri (Spoel i sur. 2009). U navedenom slučaju ubikvitinacija uključuje aktivnost više ubikvitin-ligaza, odnosno jedna ubikvitin-ligaza E3 odgovorna je za prvi korak ubikvitinacije proteina NPR1 a tek nakon poliubikvitinacije NPR1 pomoću ubikvitin-ligaze E4 slijedi proteosomska degradacija toga proteina. K tome, u jezgri su pronađene i dvije deubikvitinaze koje djeluju u suprotnom smjeru od ranije opisanih ubikvitin-ligaza te tako produljuju životni vijek proteina NPR1 (Skelly i sur. 2019). Nadalje, osim proteolitičke aktivnosti ubikvitinacije u modulaciji razine jezgrinih proteina tijekom odgovora na stres i različite stanične procese, ubikvitinacija također ima i neproteolitičko djelovanje, primjerice u regulaciji strukture kromatina, osobito pomoću monoubikvitinacije histona H2B, što za posljedicu ima promjenu u genskoj transkripciji ciljnih gena. Primjerice u uročnjaka, ustanovljeno je da u slučaju napada određenih nekrotrofičkih gljiva, potiče se spomenutom monoubikvitinacijom histona H2B promjena u strukturi kromatina koja dovodi do transkripcije gena odgovornih za obrambeni odgovor (Dhawan i sur. 2009).

Osim svih navedenih procesa degradacije proteina u jezgri, kao mehanizama regulacije genske transkripcije i drugih važnih procesa specifičnih za jezgru, i ovaj stanični odjeljak karakterizira prisustvo određene količine proteina koji su oštećeni ili pogrešno smotani pa njihovo prisustvo potiče aktivnost sustava kontrole kvalitete jezgrinih proteina. Taj sustav čine jezgrine ubikvitin-ligaze koje eliminiraju nefunkcionalne proteine odvođajući ih u različite jezgrine subkompartimente. Prema dosadašnjim istraživanjima koja su ponajviše rađena na kvascima, pronađeno je više molekularnih puteva jezgrinog sustava kontrole kvalitete proteina, smještenih u različitim jezgrinim subkompartimentima, koji imaju različite mehanizme prepoznavanja svojih pogrešno smotanih supstrata te su regulirani na različite načine (Enam i sur. 2018) no, tek predstoji istražiti i definirati homologe spomenutih ubikvitin-ligaza u viših eukariota, pa tako i u biljnim stanicama. Osim razgradnje u jezgri, nefunkcionalni se proteini mogu i iznijeti iz nje i odvesti u citoplazmu, da se tamo razgrade, odnosno može ih se unijeti u vakuolu poradi degradacije. Slično navedenom, a što se tiče sustava kontrole kvalitete proteina endoplazmatskog retikuluma, utvrđeno je da se neki od pogrešno smotanih proteina toga staničnog odjeljka mogu usmjeriti u vakuolu, vezikularnim transportom povezanim s Golgijevim aparatom, a da se neki iznose u citoplazmu pa pomoću komponenti citoskeleta dovode u jezgru i naposljetku se nakupljaju unutar nukleoplazme pa se pretpostavlja da se onda tamo degradiraju (Brandizzi i sur. 2003). I konačno, što se tiče

procesa sličnih autofagiji u animalnim stanicama, prilikom koje se vlastite stanične komponente poput primjerice staničnih odjeljaka degradiraju u lizosomima, u biljnim stanicama takvi se procesi odvijaju u vakuoli (Nelson i sur. 2014).

1. 3. Uloga proteina BPM u ubikvitiniranju ciljnih proteina

S obzirom da eukariotske stanice imaju brojne stanične odjeljke, u kojima se odvijaju različiti stanični procesi, neophodno je da proteini posjeduju odgovarajuće lokalizacijske signale koji im omogućuju transport u ciljni odjeljak u kojemu obavljaju svoju funkciju. Na smještaj proteina u stanici i regulaciju njihove aktivnosti stoga utječe i dostupnost odnosno izloženost njihovih lokalizacijskih signala. Primjerice, regulacija aktivnosti nekih proteina može se odvijati na način da njihov lokalizacijski signal bude zaklonjen zbog interakcije s proteinom inhibitorom, pa se upravo na taj način neki transkripcijski faktori zadržavaju u citoplazmi sve dok ne dođe odgovarajući signal koji, na primjer, potakne fosforilaciju proteina inhibitora i njegovu proteolizu posredstvom ubikvitin-proteasomskog sustava, čime jezgrin lokalizacijski signal transkripcijskog faktora postaje dostupan proteinima koji mu omogućuju unos u jezgru (Cooper 2004c). Proteini koji su uključeni u održavanje stabilnosti kromosoma, replikaciju DNA, gensku transkripciju, procesuiranje RNA, slaganje ribosomskih podjedinica, regulaciju staničnog ciklusa i sl. moraju posjedovati aktivni i lokalizacijski signal za unos u jezgru (jezgrin ili nuklearni lokalizacijski signal, engl. *Nuclear Localization Signal* ili *Sequence*, NLS) i lokalizacijski signal za iznos iz jezgre (jezgrin ili nuklearni izlazni signal, engl. *Nuclear Export Signal* ili *Sequence*, NES) (Cokol i sur. 2000; Bauer i sur. 2015).

Uročnjak *Arabidopsis thaliana* sadrži 6 gena obitelji BPM. Proteini BPM se sastoje od dviju domena, na N-terminalnom kraju se nalazi domena MATH (engl. *Meprin and TRAF Homology*), a na C-terminalnom kraju domena BTB (engl. *Bric-a-Brac*, *Tramtrack*, *Broad Complex*). Obje domene su važne za interakciju proteina BPM s drugim proteinima. Primjerice, poznato je da domena BTB interagira s ubikvitin-ligazom CUL3, koja je dio enzimskog kompleksa ubikvitin-ligaza E3, dok domena MATH prepoznaje i veže supstrat (ciljni protein) kojeg je potrebno ubikvitinirati i na taj način obilježiti za degradaciju na proteasomu (Weber i sur. 2005). Do sada je opisano nekoliko različitih molekula supstrata s kojima proteini BPM ulaze u proteinske interakcije (Lechner i sur. 2011; Chen i sur. 2013,

2015; Morimoto i sur. 2017), i svi ti proteini imaju ulogu u regulaciji transkripcije, što navodi na zaključak da je lokalizacija proteina BPM u jezgri ključna.

Istraživanja su pokazala da proteini BPM lokaliziraju u jezgri (Morimoto i sur. 2017) te da primjerice protein BPM1 iz uročnjaka sadrži nuklearni lokalizacijski signal na samom C-terminalnom kraju (Leljak Levanić i sur. 2012). Radi se o bipartitnom NLS-u koji fuzioniran sa zelenim fluorescentnim proteinom (engl. *Green Fluorescent Protein*, GFP) i transformiran u staničnu kulturu duhana BY2 uzrokuje apsolutnu lokalizaciju GFP-a u jezgrama transformiranih BY2 stanica (Leljak Levanić i sur. 2012). S obzirom da je određivanje sub-stanične lokalizacije proteina u stanici važno za razumijevanje i određivanje njegove funkcije, potrebno je, poradi određivanja uloge proteina BPM1, istražiti ulogu spomenutog nuklearnog signala, ispitujući sub-staničnu lokalizaciju i stabilnost delecijских mutanti gena *BPM1* u uročnjaku.

1. 4. *Arabidopsis thaliana* – modelni organizam

Uročnjak (*Arabidopsis thaliana*, L.) je cvjetnica iz porodice *Brassicaceae*, korovna biljka koja nema agrikulturnu važnost ali je danas najkorišteniji biljni modelni organizam u istraživanjima stanične i molekularne biljne biologije (Koornneef i Meinke 2010). Ima razmjerno kratak životni ciklus duljine šest do osam tjedana (od klijanja do razvoja zrelih sjemenki), jednostavno se uzgaja, malih je dimenzija a velike plodnosti (stvara nekoliko tisuća sjemenki po biljci). Genom joj je sekvenciran 2000. godine i jedan je od najmanjih biljnih genoma (oko 125 Mb). Biljka je samooplodna, ali moguća je i provedba kontroliranih križanja. Relativno jednostavno i efikasno transformira se pomoću *Agrobacterium tumefaciens* metodom *floral dip* (Clough i Bent 1998). Razvijene su brojne mutantne linije, a postoje i brojni ekotipovi, od kojih se ekotip Columbia upotrebljava najčešće, jer je upravo genom tog ekotipa bio sekvenciran 2000. godine (The *Arabidopsis* Information Resource, TAIR). Također su razvijeni različiti genetički alati za rad s ovim modelnim organizmom (Koornneef i Meinke 2010).

1. 5. Cilj istraživanja

Cilj ovoga rada je regenerirati transgenične biljke uročnjaka s pojačanom ekspresijom gena *BPM1-GFP* kojemu je deletiran nuklearni lokalizacijski signal (*delta-3-BPM1-GFP*) te biljke s pojačanom ekspresijom bipartitnog NLS-a iz gena *BPM1* fuzioniranog s genom *GFP* (*NLSbpm1-GFP*). Nakon utvrđivanja prisutnosti transgena *delta-3-BPM1-GFP* i *NLSbpm1-GFP* u genomskoj DNA izoliranoj iz regeneriranih biljaka, istražiti ekspresiju ovih transgena, utvrditi prisutnost fuzijskih rekombinantnih proteina metodom imunodetekcije te provesti analizu sub-stanične lokalizacije i stabilnosti rekombinantnih proteina pomoću fluorescentne mikroskopije.

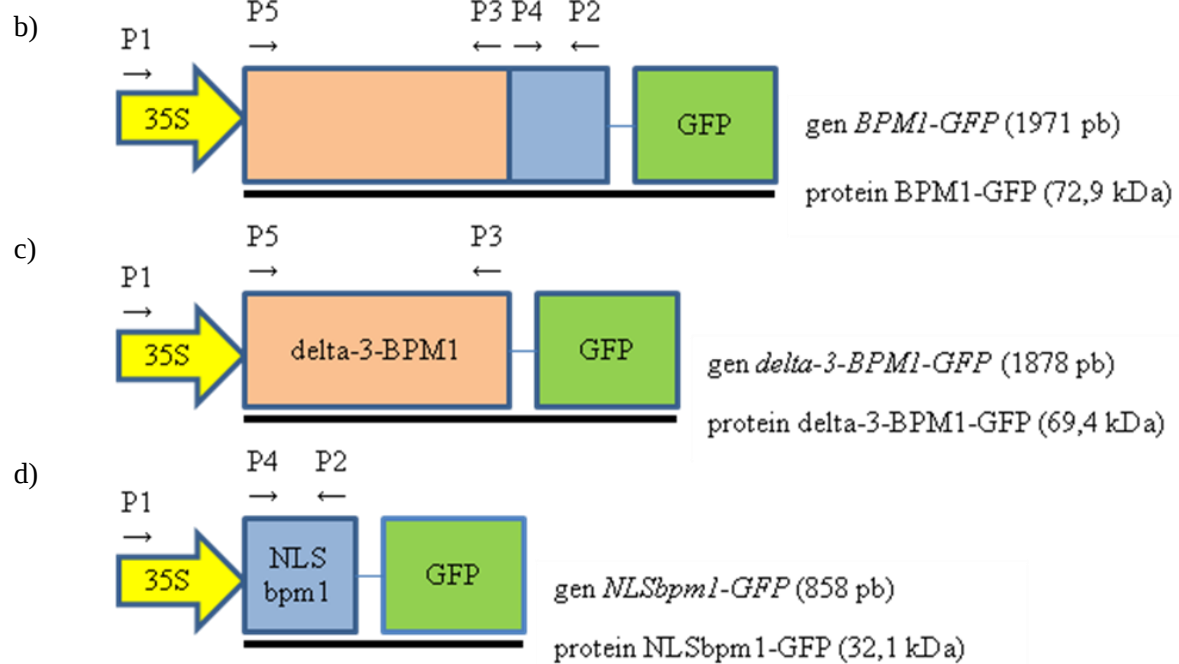
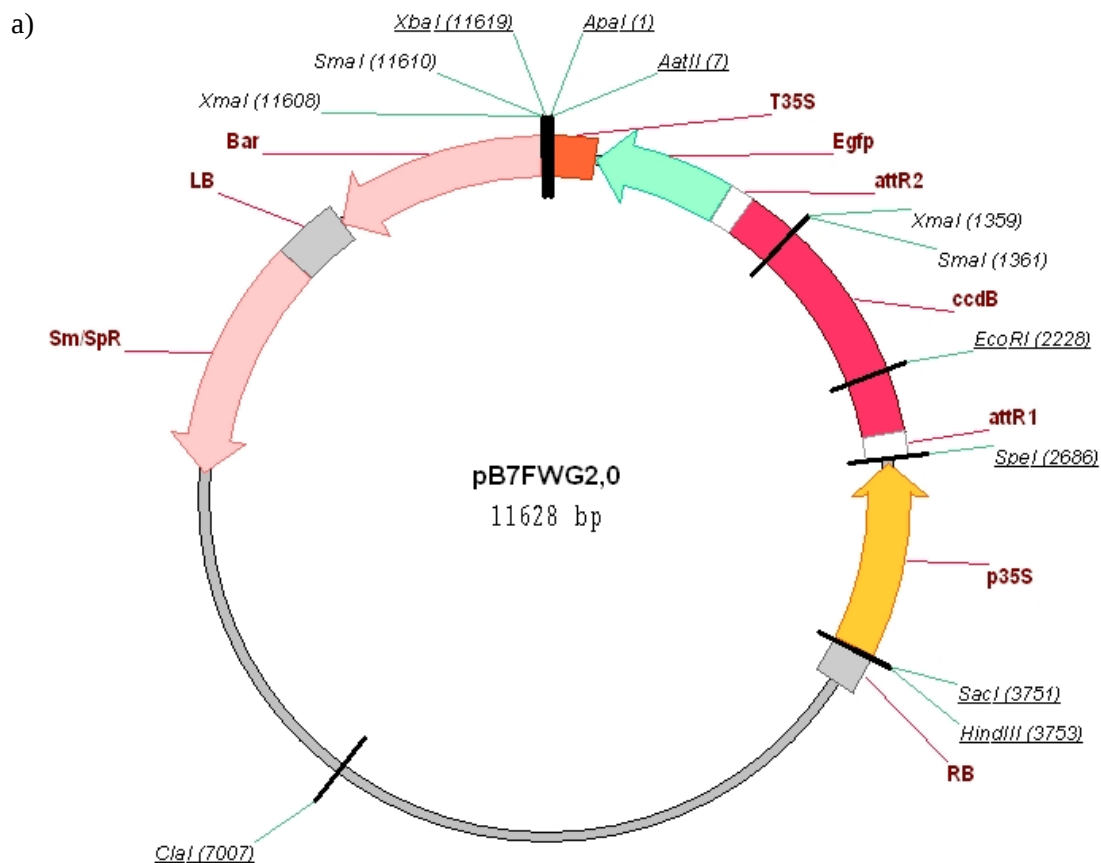
2. MATERIJALI I METODE

2. 1. Materijali

2. 1. 1. Biljni materijali

U ovome radu su korišteni klijanci uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L., ekotip Columbia) divljega tipa te genetički modificirani klijanci uzgojeni iz homozigotnog sjemena linije L104 (koja eksprimira cjeloviti rekombinantni protein BPM1-GFP) i klijanci regenerirani kao prva generacija transformanata koji nose delecije mutante gena *BPM1-GFP*.

Genetički modificirane klijance s delecijским mutantama gena *BPM1-GFP* regenerirala sam iz sjemenki biljaka prethodno podvrgnutih transformaciji metodom *floral dip* pomoću bakterija *Agrobacterium tumefaciens*. Za transformaciju je upotrebljen soj agrobakterija GV3101 (u genomu imaju gen za otpornost na rifampicin), a koji nosi pomoćni plazmid pMP90 sa genom za otpornost na gentamicin. Pored navedenoga, bakterije *Agrobacterium tumefaciens* korištene za transformaciju sadržavale su binarni plazmidni vektor pB7FWG2,0 (Sl. 1. a), u kojega je unijeta, na mjesto gena *ccdB*, sekvenca željenoga transgena – delecije mutante gena *BPM1* – *delta-3-BPM1* (krnji *BPM1* kojemu je deletiran nuklearni lokalizacijski signal, NLS, smješten na samom C-terminalnom kraju, Sl. 1. c) i *NLSbpm1* (bipartitni NLS iz gena *BPM1*, Sl. 1. d). Unutar genskoga konstrukta korištenoga za transformaciju, na 3' kraju sekvence opisanoga transgena nalazi se sekvenca gena *GFP*; transkripcijom i translacijom ovoga transgena trebali bi nastati rekombinantni fuzijski proteini *delta-3-BPM1-GFP* i *NLSbpm1-GFP*. Osim sekvence željenog transgena pod kontrolom promotora 35S, na opisanom plazmidu se između granica LB i RB plazmidne regije T-DNA nalazi i gen za otpornost na herbicid amonijev glufosinat (engl. *Glufosinat Ammonium*, GLA; komercijalni naziv: Basta), koji služi kao selekcijski marker pri regeneraciji transgeničnih klijanaca (gen *Bar* na T-DNA). Na istovjetan način opisanome, ranije je već provedena transformacija uročnjaka u svrhu dobivanja biljaka s pojačanom ekspresijom cjelovitog fuzijskog proteina BPM1-GFP (linija L104, Sl. 1. b), koje su potom uzgajane do dobivanja homozigotnih jedinki, te sam u radu koristila homozigotno sjeme tih biljaka. Navedeni plazmidi s opisanim genskim konstruktima (Sl. 1. a – d) korišteni su kao pozitivni u PCR reakcijama.



Slika 1. Mapa plazmidnog vektora pB7FWG2,0 (a) u koji su *gateway* kloniranjem uneseni transgeni te shema ekspresijske kazete korištenih genetičkih konstrukata (b-d). U navedeni ekspresijski plazmid

se unutar T-DNA, pod kontrolom konstitutivnog promotora 35S, ugrađuje na mjesto gena *ccdB* željena genska sekvenca, pa ekspresijom nastaje fuzijski protein sa C-terminalno fuzioniranim GFP-om. Opisani plazmid sadrži i gen za otpornost na herbicid amonijev glufosinat (gen *Bar*), koji se koristi kao selekcijski biljeg. Linija uročnjaka označena kao L104 ima u genomu ugrađen transgen *BPM1-GFP* (b); linija delta-3-GFP nosi transgen *delta-3-BPM1-GFP* (krnji *BPM1-GFP* kojemu je deletiran nuklearni lokalizacijski signal smješten na samom C-terminalnom kraju, (c)); linija NLS-GFP ima u genomu ugrađeni transgen *NLSbpm1-GFP* (bipartitni NLS iz gena *BPM1* fuzioniran sa sekvencom gena *GFP*, (d)). Oznake P1 do P5 odnose se na početnice koje su korištene u reakcijama umnažanja dijelova opisanih transgena lančanom reakcijom polimerazom, a njihove sekvence i očekivana veličina fragmenata DNA nakon reakcije umnažanja polimerazom navedene su u tablici 3. Slika (a) preuzeta je sa <https://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pB7FWG2/search/index/>.

2. 1. 2. Hranjiva podloga

Regeneracija i selekcija klijanaca uročnjaka provedena je na hranjivoj podlozi MS (Murashige i Skoog 1962). U podloge za selekciju transgeničnih klijanaca dodan je herbicid amonijev glufosinat u konačnoj koncentraciji 20 mg/L medija.

2. 1. 3. Komerциjalni kompleti

Za izolaciju biljne genomske DNA iz regeneriranih biljaka uročnjaka korišten je komercijalni komplet kemikalija *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen). Za izolaciju mRNA iz regeneriranih biljaka upotrebljen je komplet kemikalija *Dynabeads® mRNA Direct™ Micro Kit* (Invitrogen Dynal AS). U polimeraznim reakcijama korištena je sljedeća smjesa nukleotida: dATP, dGTP, dCTP, dTTP (*PCR Nucleotide Mix*, Promega).

2. 1. 4. Puferi i gelovi

U radu su korišteni: pufer TAE, PBS, Laemmli, pufer za izolaciju proteina, elektroforetski pufer i pufer za prijenos. Sastav pufera naveden je tablici 1.

Tablica 1. Namjena i sastav pufera korištenih u radu.

Naziv pufera	Namjena pufera	Sastav pufera
Pufer TAE	Elektroforeza DNA	4,85 g/L Tris; 1,64 g/L natrij acetat; 0,58 g/L EDTA
Pufer za izolaciju proteina	Izolacija topljivih proteina	12,11 g/L Tris (pH 7,5); 8,77 g/L NaCl; 0,2% NP-40 (v/v); 0,174 g/L PMSF
Pufer Laemmli	Denaturacija proteina	60,57 g/L Tris/HCl (pH 6,8); 57,67 g/L SDS (20%-tni); 30% glicerol (v/v); 10% beta-merkaptoetanol (v/v); 0,5% bromfenol plavo (v/v)
Elektroforetski pufer	SDS-PAGE	2,4 g/L Tris; 11,4 g/L glicin; 1 g/L SDS; 6 M HCl do pH 8,3
Pufer za prijenos	Western blotting	3,39 g/L Tris; 14,4 g/L glicin; 10% metanol (v/v); 6 M HCl do pH 8,3
Pufer PBS	Blokiranje membrane/vezanje protutijela/ispiranje protutijela	8 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 1,44 g/L Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g/L KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4

Produkti lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) analizirani su na 1%-tnom agaroznom gelu pripremljenom u puferu TAE (engl. *Tris-Acetate-EDTA*, TAE). Za natrij dodecil sulfat – poliakrilamidnu gel-elektroforezu (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) korišten je 4%-tni poliakrilamidni gel za koncentriranje proteina, a 12%-tni poliakrilamidni gel za razdvajanje istih; njihov je sastav prikazan u tablici 2.

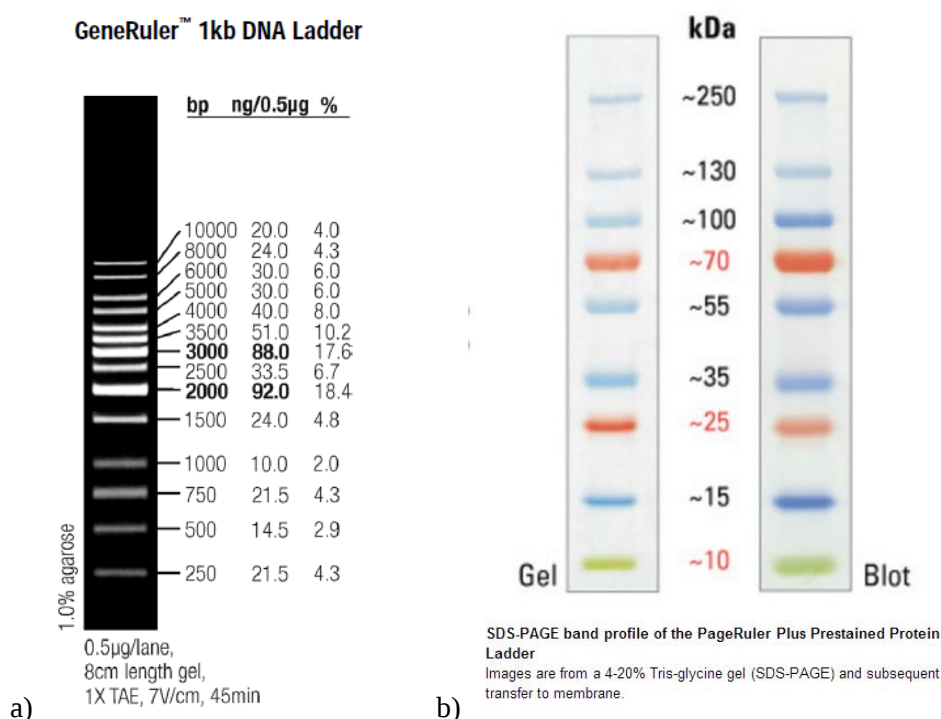
Tablica 2. Sastav gelova korištenih u SDS-PAGE (navedeni su volumeni za pripremu dva gela).

Sastojci	Gel za razdvajanje (12%) V/mL	Gel za koncentriranje (4%) V/mL
redestilirana voda	3,35	1,5
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5	0
0,5 M Tris (pH 6,8)	0	0,625
akrilamid/bisakrilamid (30%)	4	0,333
10% SDS	0,1	0,02
10% APS	0,05	0,018
TEMED	0,005	0,004

2. 1. 5. Boje i standardi

Za vizualizaciju produkata lančane reakcije polimerazom korištena je otopina etidijevog bromida (*Sigma*) u TAE puferu koncentracije 1 mg/L.

Pri utvrđivanju veličine fragmenata DNA u agaroznoj gel-elektroforezi upotrebljen je standard *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Scientific™*), prikazan na slici 2. a. Za određivanje veličine proteina u poliakrilamidnoj gel-elektroforezi korišten je standard *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (*Thermo Scientific™*), prikazan na slici 2. b.



Slika 2. DNA standard (a) i proteinski standard (b) korišteni u pokusima. Preuzeto sa <https://www.thermofisher.com/>.

2. 1.6. Enzimi

Za umnažanje dijelova gena *BPM1* metodom lančane reakcije polimerazom korištena je polimeraza *GoTaq® Hot Start Polymerase* (*Promega*). Prilikom izolacije mRNA korišten je ribonukleazni inhibitor *RNase Inhibitor RiboLock™* (*Thermo Scientific™*). U reakciji utvrđivanja razine ekspresije prisutnih transgena u uzorcima korištena je reverzna transkriptaza *RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase* (*Thermo Scientific™*).

2. 1. 7. Početnice

Za utvrđivanje prisutnosti transgena *NLSbpm1-GFP* u uzorcima genomske DNA izolirane iz regeneriranih klijanaca, umnažanje je provedeno početnicama 35S Fwd i NLS BamHI Rev, a za transgen *delta-3-BPM1-GFP* početnicama 35S Fwd i attB2 BPM1 delta3 Rev, čije sekvence su prikazane u tablici 3. Prilikom umnažanja cDNA, kod utvrđivanja razine ekspresije ispitivanih transgena, korištene su početnice attB1 NLS BPM1 Fwd i NLS BamHI Rev za umnažanje dijela gena *NLSbpm1-GFP*, početnice attB1 BPM1 Fwd i attB2 BPM1 delta3 Rev za umnažanje dijela gena *delta-3-BPM1-GFP* te, za umnažanje dijela aktina (gen *ACT3*), koji se primjenjivao kao kontrola reakcije, početnice Act3 Fwd i Act3 Rev (Tab. 3.).

Tablica 3. Sekvence početnica upotrebljenih u lančanoj reakciji polimerazom prilikom utvrđivanja prisutnosti transgena *delta-3-BPM1-GFP* i *NLSbpm1-GFP* te sekvence početnica u RT-PCR-u prilikom utvrđivanja razine ekspresije prisutnih transgena u uzorcima, kao i očekivana veličina fragmenata DNA nakon reakcije umnažanja polimerazom.

	Naziv početnice	Sekvenca početnice	Veličina fragmenta
P1	35S Fwd	5'-CACTGACGTAAGGGATGACGCAC-3'	337 pb
P2	NLS BamHI Rev	5'-GGTGGATCCTCAGTGCAACCGGGG CTTCAC-3'	
P1	35S Fwd	5'-CACTGACGTAAGGGATGACGCAC-3'	1366 pb
P3	attB2 BPM1 delta3 Rev	5'-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG CTTAGCCTCGCCACATACTGC-3'	
P4	attB1 NLS BPM1 Fwd	5'-ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TCCGGATCCGCAATTAAGCTTATGGC GAGGCTAAGT-3'	150 pb
P2	NLS BamHI Rev	5'-GGTGGATCCTCAGTGCAACCGGGG CTTCAC-3'	
P5	attB1 BPM1 Fwd	5'-CAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTC CATGGGCACAAGTGGTCTG-3'	1065 pb
P3	attB2 BPM1 delta3 Rev	5'-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG CTTAGCCTCGCCACATACTGC-3'	
P6	Act3 Fwd	5'-GATTTGGCATCACACTTTCTACAATG-3'	757 pb (gDNA)
P7	Act3 Rev	5'-GTTCCACCACTGAGCACAATG-3'	655 pb (cDNA)

2. 1. 8. Protutijela

S obzirom da su u pokusima proučavani fuzijski proteini koji na C-terminalnom kraju nose sekvencu gena *GFP*, za dokazivanje prisutnosti tih rekombinantnih proteina u ekstraktu topljivih proteina izoliranih iz ispitivanih biljaka uročnjaka koristila sam primarno protutijelo *Anti-Green Fluorescent Protein Stabilized antibody preparation, Roche*, razrijeđeno u omjeru 1:1000. Kao sekundarno protutijelo (na koje je kovalentno vezana peroksidaza, čiju reakciju se koristi u imunodetekciji) upotrebljeno je *Anti-Mouse IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in goat, Sigma*, razrijeđeno u omjeru 1:3333.

2. 2. Metode

2. 2. 1. Regeneracija transgeničnih biljaka na podlozi sa selekcijskim biljegom

Sjemenke uročnjaka divljeg tipa (*A. thaliana* L., ekotip Columbia) te sjemenke skupljene s transformiranih biljaka prebacila sam u epruvete Eppendorf od 1,5 mL i dodala 1 mL 70%-tnog etanola u svaku epruvetu. Nakon 1 min inkubacije u etanolu, etanol sam uklonila i na sjemenke dodala 1 mL sterilizacijske otopine (1%-tni Izosan G i 0,1%-tni Mucisol otopljeni u destiliranoj vodi) te je uslijedilo 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi uz miješanje, a potom centrifugiranje 1 min pri 13 000 *g* u sterilnim uvjetima (u laminaru). U laminaru sam provela i ispiranje sjemenki destiliranom vodom (1 mL sterilne destilirane vode u svaku epruvetu, uz 1 min miješanja), ukupno ponavljajući postupak ispiranja četiri puta. Nakon ispiranja u svaku epruvetu sa sjemenkama dodala sam oko 300 µL sterilne vode te su potom pohranjene jedan dan na 4 °C da bi se sinkronizirale i počele klijati u isto vrijeme.

Pripremila sam 250 mL hranjive podloge MS, uz dodatak herbicida GLA u podloge za uzgoj transformiranih biljaka. Herbicid sam dodala u poluohlađenu podlogu u sterilnim uvjetima, u konačnoj koncentraciji herbicida 20 mg/L medija. Podloga je razlivena u plastične petrijeve posude, a nakon skrutnjavanja medija, sjemenke sam pažljivo nasadila na pripremljene ploče. Uzgoj je proveden u klima-komori, u uvjetima dugog dana (16 h svjetla) na 22 °C.

2. 2. 2. Izolacija genomske DNA

Da bih utvrdila jesu li regenerirane biljke transgenične, izolirala sam genomsku DNA iz klijanaca otpornih na selekcijski marker pomoću komercijalnog kompleta *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), a prema uputama proizvođača. Za svaki uzorak uzela sam dva listića jednog klijanca i usitnila ih pomoću tučka i tekućeg dušika te prenijela homogenat u plastičnu mikroeprijetu u koju sam dodala pufere iz kompleta kemikalija proizvođača, inkubirala smjesu i centrifugirala ju prema protokolu proizvođača. Lizat sam prenijela na kolonu za odvajanje iz kompleta materijala proizvođača, centrifugirala, tretirala daljnjim puferima prema protokolu, inkubirala pa ponovno centrifugirala te je naposljetku DNA s kolone eluirana u plastičnu mikroeprijetu. Koncentraciju molekula DNA izoliranih iz uzoraka ustvrdila sam mjerenjem apsorbancije pomoću uređaja NanoVue™ (GE Healthcare). Izolirana genomska DNA poslužila je kao kalup za metodu lančane reakcije polimerazom, opisane u poglavlju 2. 2. 4.

2. 2. 3. Izolacija mRNA i reverzna transkripcija transgena

Provjerila sam transkripcijsku aktivnost unesenih transgena u regeneriranim biljkama transformantima. Izolaciju mRNA provela sam pomoću magnetnih kuglica upotrebom komercijalno dostupnog kompleta *Dynabeads® mRNA Direct™ Micro Kit* (Invitrogen Dynal AS). Za svaki uzorak uzela sam dva cvjetića i komadić lista jednog klijanca. Prema protokolu pripremila sam 20 µL suspenzije magnetnih kuglica po uzorku, isprala dvaput kuglice dodatkom pufera *Lysis/binding* i potom ga maknula upotrebom magneta pri čemu su se kuglice odvojile od pufera. Zatim sam usitnila biljno tkivo pomoću tučka i tekućeg dušika, dodala u svaki uzorak 100 µL pufera *Lysis/binding*, centrifugirala te supernatant prenijela na pripremljene magnetne kuglice, pipetiranjem promiješala pa inkubirala uzorke 5 min na sobnoj temperaturi te ih stavila 30 sek na magnet da bih odvojila supernatant. Lagano sam dodala 100 µL pufera *Washing A* na zrnca pa pomoću magneta maknula supernatant te ponovila dodatak pufera *Washing A* i odvajanje supernatanta. Potom sam dodala 100 µL pufera *Washing B* te prenijela sadržaj u novu plastičnu mikroeprijetu, pomoću magneta maknula supernatant, ponovila dodatak pufera *Washing B* i odvajanje supernatanta. Zatim sam magnetne kuglice resuspendirala u 100 µL ledenog Tris-a i 0,8 µL ribonukleaznog inhibitora (*RNase Inhibitor RiboLock™, Thermo Scientific™*), a onda sam pomoću magneta

odvojila Tris i RNazni inhibitor. Nakon izolacije mRNA, uslijedila je sinteza cDNA pomoću reverzne transkriptaze (*RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase*). Najprije sam uzorcima dodala reakcijsku smjesu RT mix 1. (sastav reakcijske smjese 1. za reakciju polimerizacije pomoću reverzne transkriptaze prikazan je u tablici 4.). Uzorke sam inkubirala 5 min na 65 °C. Tijekom tih pet minuta pripremila sam reakcijsku smjesu RT mix 2. (Tab. 5.), a po isteku vremena inkubacije dodala sam ju uzorcima s reakcijskom smjesom RT mix 1. Uvjeti reakcije sinteze cDNA pomoću reverzne transkriptaze prikazani su u tablici 6.

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese RT mix 1. za reakciju sinteze cDNA pomoću reverzne transkriptaze na temelju mRNA izolirane iz regeneriranih klijanaca uročnjaka.

Reagensi	V/ μ L
voda DEPC	10
suspenzija oligo dT (5 mg/mL)	1
smjesa dNTP-ova (10 mM/svaki dNTP)	1

Tablica 5. Sastav reakcijske smjese RT mix 2. za reakciju sinteze cDNA pomoću reverzne transkriptaze na temelju mRNA izolirane iz regeneriranih klijanaca.

Reagensi	V/ μ L
5x pufer za reverznu transkriptazu	4
voda DEPC	2
<i>RNase Inhibitor RiboLock™</i> (40 U/ μ L)	1
<i>RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase</i> (200 U/ μ L)	1

Tablica 6. Uvjeti reakcije sinteze cDNA pomoću reverzne transkriptaze.

Temperatura/°C	Vrijeme/min
42	60
70	15
∞	4

Po završetku sinteze cDNA pomoću reverzne transkriptaze, uslijedilo je umnažanje cDNA PCR-om, kao što je opisano u poglavlju 2. 2. 4.

2. 2. 4. Umnažanje gena metodom PCR

Sekvence početnica za lančanu reakciju polimerazom prikazane su u tablici 3., sastav reakcijske smjese za metodu PCR prikazan je u tablici 7., a uvjeti reakcije u tablici 8.

Tablica 7. Sastav reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom kojom se utvrđivala prisutnost transgena *NLSbpm1-GFP* i *delta-3-BPM1-GFP* u genomskoj DNA izoliranoj iz regeneriranih klijanaca uročnjaka odnosno reakcijske smjese za umnažanje cDNA u PCR reakciji kojom se utvrđivala transkripcijska aktivnost unesenih transgena *NLSbpm1-GFP* i *delta-3-BPM1-GFP* u regeneriranim klijancima.

Reagensi	Reakcijska smjesa V/ μ L
destilirana voda	13,7
<i>5x Green GoTaq® Flexi Buffer</i>	4
smjesa dNTP-ova (10 mM/svaki dNTP)	0,4
početnica Fwd (1 μ M)	0,4
početnica Rev (1 μ M)	0,4
<i>GoTaq® Hot Start Polymerase</i> (5 U/ μ L)	0,08
DNA kalup	1

Tablica 8. Uvjeti reakcije PCR kojom se utvrđivala prisutnost transgena *NLSbpm1-GFP* i *delta-3-BPM1-GFP* u regeneriranim klijancima uročnjaka, kao i uvjeti reakcije PCR kojom se utvrđivala transkripcijska aktivnost istih transgena u regeneriranim klijancima.

	Temperatura/ $^{\circ}$ C	Vrijeme/sek	Broj ciklusa
Zagrijavanje poklopca	105		
Početna denaturacija	95	180	1
Denaturacija	95	45	
Vezanje početnica	58	45	35
Produljivanje lanaca DNA	72	90	
Završno produljivanje lanaca	72	300	1
	4	∞	1

2. 2. 5. DNA elektroforeza

Produkti PCR-a su analizirani u 1%-tnom agaroznom gelu pripremljenom u puferu TAE. Na gel sam nanijela 5 μ L standarda (*GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder*) i 10 μ L svakog PCR uzorka, s bojom za nanošenje (*6x Loading Dye, Thermo Scientific™*). Tijekom elektroforeze primijenjen je napon od 25 V prvih pet minuta, a potom napon od 100 V sljedećih 20 min. Vizualizacija produkata PCR-a na gelu provedena je bojanjem gela u otopini etidijevog bromida (konc. 1 mg/L) te izlaganjem UV svjetlu.

2. 2. 6. Izolacija topljivih proteina i utvrđivanje prisutnosti rekombinantnih proteina metodom imunodetekcije

Da bih utvrdila nakupljaju li se rekombinantni proteini u transgeničnim biljkama uročnjaka, provela sam izolaciju topljivih proteina iz sedam dana starih klijanaca. U puferu za izolaciju proteina (Tab. 1.) homogenizirala sam na ledu, u hladnom tarioniku, klijance uročnjaka pomoću tučka, uz dodatak 300 μ L pufera za izolaciju proteina (približno u omjeru 1:1 – koliko mg tkiva, toliko μ L pufera). Homogenat svakog uzorka prenijela sam u zasebnu plastičnu mikroepruvetu, a onda centrifugirala uzorke 15 min na 4 °C maksimalnom brzinom (16 000 *g*). Time su se istaložili stanični dijelovi i netopljivi proteini, a supernatant s topljivim proteinima prenijela sam u čiste mikroepruvete i pritom približno izmjerila volumen svakoga uzorka. U digestoru sam uzorcima dodala pufer Leammli za denaturaciju proteina (Tab. 1.); volumen dodanog pufera odgovarao je $\frac{1}{4}$ volumena pojedinog uzorka. Potom sam mikroepruvete s uzorcima postavila u termoblok i inkubirala ih 5 min na 80 °C te tako pripremljene zatim pohranila na -20 °C do SDS-poliakrilamidne gel-elektroforeze.

U jažice poliakrilamidnog gela dodano je 30 μ L svakog uzorka i 3 μ L standarda (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*). Elektroforeza se odvijala u 1x elektroforetskom puferu (Tab. 1.); uvjeti su bili 80 V dok uzorci nisu ušli u gel za razdvajanje, a potom 200 V do kraja elektroforeze.

Po završetku SDS-elektroforeze, a prije prijenosa proteina na membranu, gel se ekvilibrirao u puferu za prijenos (Tab. 1.) desetak min. Proteini su potom preneseni na PVDF membranu (*Immobilion-P Transfer Membrane*, 0,45 μ m, *Millipore*), koja je prethodno predtretirana, u 100%-tnom metanolu 1 min, isprana dva puta po 1 min sa redestiliranom vodom te inkubirana u puferu za prijenos 5 min. Prijenos proteina na membranu se odvijao 2 sata pri 200 mA i naponu od 60 do 80 V.

Membrana je nakon prijenosa odvojena od poliakrilamidnog gela i kazete za prijenos te isprana u 1x PBS puferu (Tab. 1.) pa je stavljena u otopinu za blokiranje da se spriječi nespecifično vezanje protutijela. Otopina za blokiranje pripremljena je kao 5%-tna, od nemasnog mlijeka u prahu (*Dukat*) rastopljenog u 1x PBS puferu. Blokiranje je provedeno dva sata na tresilici i pri sobnoj temperaturi. Zatim je pripremljena otopina primarnog protutijela (*Anti-Green Fluorescent Protein Stabilized antibody preparation*, *Roche*) u omjeru 1:1000 u otopini za blokiranje (5%-tnoj, pripremljenoj kako je ranije opisano), u kojoj je

membrana inkubirana preko noći pri 4 °C. Uslijedilo je ispiranje sa 1x PBS puferom, dvaput po 15 min. Napravljena je otopina sekundarnog protutijela (*Anti-Mouse IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in goat, Sigma*) pripremljena u omjeru 1:3333 u otopini za blokiranje (5%-tnoj, pripremljenoj kao i ranije), u kojoj je membrana inkubirana 90 min. Ispiranje otopine sekundarnog protutijela provedeno je s otopinom 1x PBS, dvaput po 10 min, pa je membrana ocijeđena na upijajućem papiru.

Membrana je obojana dodatkom reagensa ECL (*ECL Western Blotting Substrate, Promega*) koji je supstrat za enzim peroksidazu (engl. *Horse Radish Peroxidase, HRP*), vezanu na sekundarno protutijelo. Otopinu s reagensom ECL sam pripremila miješanjem 750 µL peroksida i 750 µL luminola neposredno prije tretiranja membrane. U toj otopini je membrana inkubirana približno 2 min, okrenuta licem prema otopini, a potom je eksponirana na rendgenski (RT) film (*Amersham Hyperfilm, GE Healthcare*) u tamnoj komori. RT film je kasnije skeniran na uređaju HP LaserJet M1120 MFP.

2. 2. 7. Analiza sub-stanične lokalizacije i stabilnosti rekombinativnih proteina fluorescentnom mikroskopijom

Kako bi se promotrla sub-stanična lokalizacija rekombinantnih proteina eksprimiranih u ispitivanim biljkama uročnjaka, provedena je analiza istih fluorescentnim mikroskopom Olympus BX51 (*Olympus Life Science*), a snimke su rađene u DP Controller programu (*Olympus Life Science*) kamerom Olympus DP70 Microscop Digital Camera System. Korišteni su objektivi: 20x/0,5 NA i 10x/0,3 NA, okular: 10x te filter set 4 za slike signala GFP (ekscitacija 450-490 nm, emisija 510-550 nm). Snimljene fotografije obrađene su u programima *Microsoft Office PowerPoint*, *Microsoft Office Picture Manager* i *Paint*.

3. REZULTATI

3. 1. Selekcija transgeničnih biljaka na podlozi s amonijevim glufosinatom

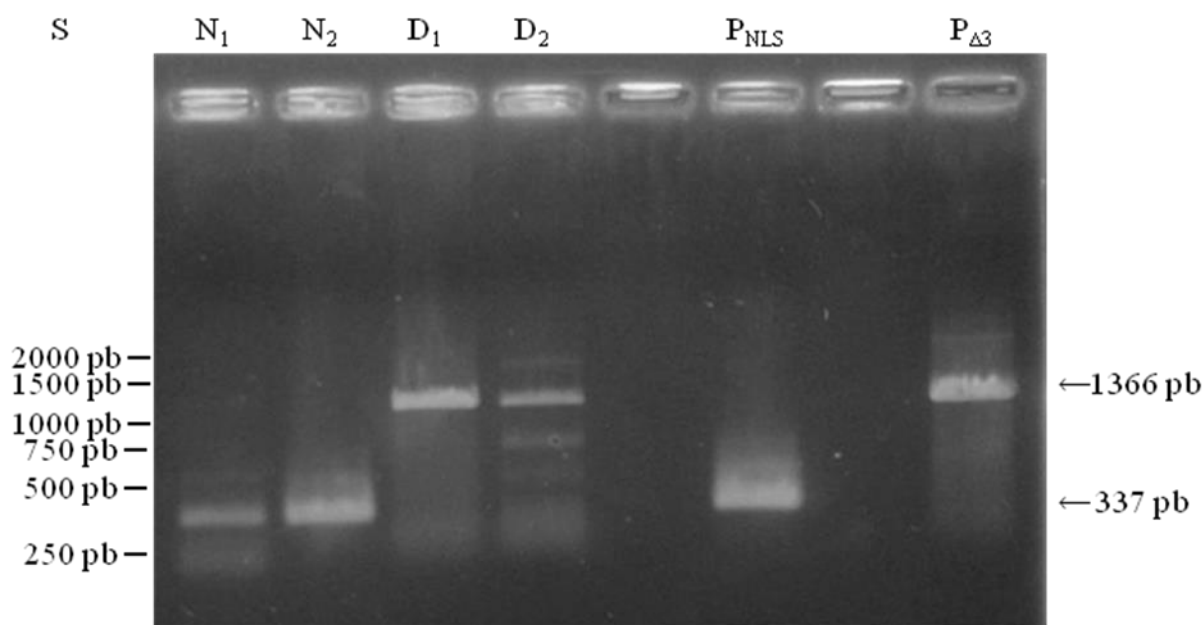
U Laboratoriju za biljnu molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta provedena je transformacija uročnjaka *in planta* metodom *floral dip* (Clough i Bent 1998), pomoću *Agrobacterium tumefaciens* u koje su prethodno uneseni odgovarajući genski konstrukti (Sl. 1. prikazuje plazmidni vektor (a) i genske konstrukte (b-d) koji su korišteni za transformaciju). U ovoj metodi nezreli cvatovi uročnjaka uranjaju se u suspenziju agrobakterija koje posjeduju dva plazmida, binarne vektore, jedan koji nosi regiju virulencije (*vir*) i drugi koji nosi T-DNA. Na T-DNA se nalazi transgen (u ovom slučaju radilo se o delecijским mutantama gena *BPM1-GFP*) kojim se želi transformirati biljne stanice i gen za otpornost koji služi kao selekcijski biljeg (gen *Bar*, za otpornost na herbicid GLA, kodira za enzim fosfotricin acetiltransferazu). Geni regije *vir* omogućuju izrezivanje i prijenos T-DNA u biljne stanice čime se u transformirane stanice unose transgen i selekcijski biljeg. Nakon transformacije biljke se uzgajaju tri tjedna, a potom se sjemenke sakupe.

Sjemenke uročnjaka sakupljene sa biljaka podvrgnutih gore opisanoj transformaciji, homozigotno sjeme linije L104 i sjemenke divljega tipa nasadila sam na hranjivu podlogu MS. Prethodno je u podloge namijenjene selekciji, dodan herbicid GLA koji je korišten kao selekcijski biljeg za probir transgeničnih biljaka. Biljke koje su transformirane tako da je u njih unesen željeni transgen, ujedno su nosile i gen za otpornost na herbicid GLA, te su stoga mogle rasti na opisanoj selekcijskoj podlozi. Naime, herbicid GLA blokira enzim glutamin sintazu pa dolazi do nakupljanja amonijaka u biljkama divljega tipa, što dovodi do usporavanja njihovog rasta i konačno uvenuća tih biljaka. U transgeničnim biljkama gen za otpornost na spomenuti herbicid omogućava nesmetano odvijanje metaboličkih puteva, neovisno o dodatku herbicida GLA u hranjivu podlogu, jer produkt gena *Bar* kodira za enzim kojemu je GLA supstrat te ga modificira u nefunkcionalni inhibitor. Takvi transgenični klijanci razvijaju veći broj listića i imaju razvijeniji korjenski sustav, u usporedbi sa klijancima koji nisu transformirani, i koji konačno na selekcijskoj podlozi ugibaju. Uspješnost transformacije, za sve sjemenke sakupljene sa biljaka podvrgnutih transformaciji a koje su nasađene na selekcijske podloge, bila je između 0,5 do 3%, što je u skladu s očekivanjima u ovoj metodi.

3. 2. Umnažanje transgena *delta-3-BPM1-GFP* i *NLSbpm1-GFP* izoliranih iz regeneriranih klijanaca uročnjaka

Da bih dokazala prisutnost transgena u regeneriranim klijancima i na razini DNA, provela sam izolaciju genomske DNA pomoću komercijalnog kompleta *DNeasy Plant Mini Kit*. Obradila sam četiri uzorka potencijalnih transformanata: dva NLS-GFP i dva delta-3-GFP. S obzirom da svaki primarni transformant predstavlja zasebnu liniju, a sve jedinke nastale samooplodnjom od istog primarnog transformanta čine jednu liniju, navedeni uzorci pripadali su dvjema NLS-GFP i dvjema delta-3-GFP linijama. Koncentracija izolirane DNA izmjerena je pomoću uređaja NanoVue™ i iznosila je 19 – 27 ng/μL.

Metodom PCR, u kojoj sam izoliranu genomsku DNA koristila kao kalup (korišteno je 2 μL izolirane genomske DNA za svaki uzorak), umnožila sam transgene, koristeći početnice 35S Fwd i NLS BamHI Rev za transgen *NLSbpm1-GFP*, a početnice 35S Fwd i attB2 BPM1 delta3 Rev za transgen *delta-3-BPM1-GFP* (sekvence početnica prikazane su u Tab. 3.). Početnice se tako hvataju za DNA kalup da se konačno dobiju produkti veličine: 1366 pb (za transgen *delta-3-BPM1-GFP*) i 337 pb (za transgen *NLSbpm1-GFP*), što odgovara veličini vrpce koje se mogu vidjeti na slici gela (Sl. 3.). Produkte PCR reakcije sam nakon elektroforeze u agaroznom gelu vizualizirala pomoću etidijevog bromida.



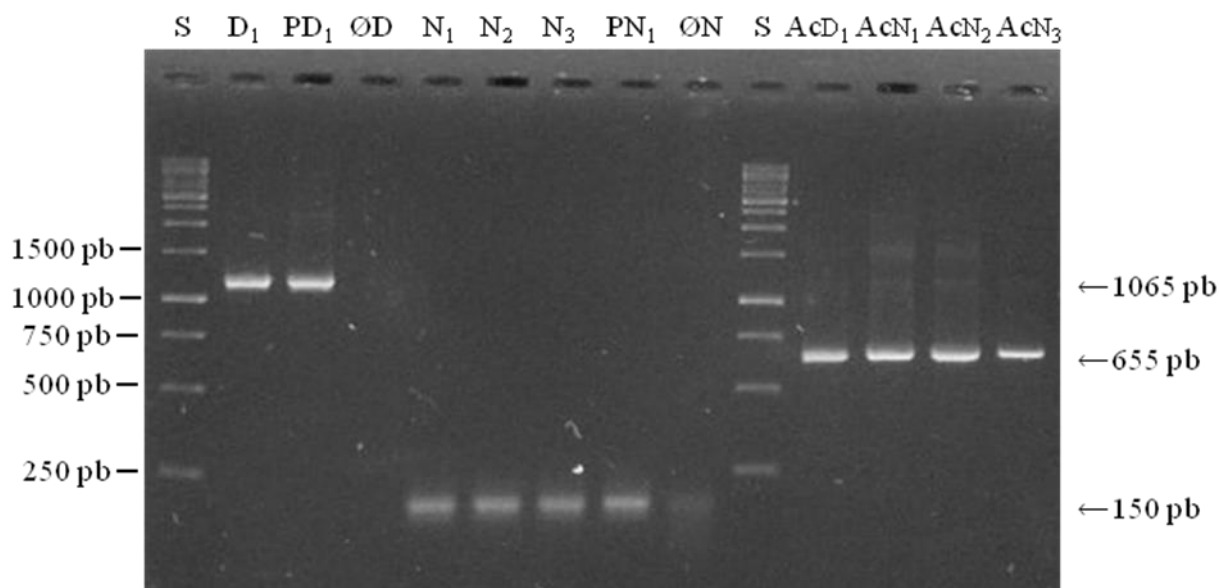
Slika 3. Umnažanje transgena *NLSbpm1-GFP* i *delta-3-BPM1-GFP* PCR-om. Genomska DNA izolirana je iz klijanaca uročnjaka regeneriranih na podlozi MS s dodatkom herbicida GLA. N₁ i N₂:

linije transformanata NLS-GFP. D₁ i D₂: linije transformanata delta-3-GFP. P_{NLS}: pozitivna kontrola za transgen *NLSbpm1-GFP* (plazmidni vektor pB7FWG2,0 s ekspresijskom kazetom koja sadrži transgen *NLSbpm1-GFP*). P_{Δ3}: pozitivna kontrola za transgen *delta-3-BPM1-GFP* (plazmidni vektor pB7FWG2,0 s ekspresijskom kazetom na kojoj se nalazi transgen *delta-3-BPM1-GFP*). S: standard *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder*.

3. 3. Transkripcijska aktivnost transgena *delta-3-BPM1-GFP* i *NLSbpm1-GFP* u regeneriranim klijancima

Provjerila sam transkripcijsku aktivnost unesenih transgena u regeneriranim klijancima uročnjaka koristeći komercijalno dostupni komplet *Dynabeads® mRNA Direct™ Micro Kit* za izolaciju mRNA. mRNA je izolirana iz četiri transgenične linije (tri transformanta NLS-GFP i jednog transformanta delta-3-GFP). Potom je izolirana mRNA poslužila za sintezu cDNA pomoću reverzne transkriptaze (*RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase*), te je uslijedilo umnažanje cDNA pomoću PCR-a.

Kao DNA kalup u PCR reakciji upotrebljena je cDNA dobivena prethodno opisanim postupkom, dok je genomska DNA izolirana iz regeneriranih klijanaca bila pozitivna kontrola. Transgen *delta-3-BPM1-GFP* umnožen je početnicama attB1 BPM1 Fwd i attB2 BPM1 delta3 Rev, transgen *NLSbpm1-GFP* početnicama attB1 NLS BPM1 Fwd i NLS BamHI Rev, a aktin koji je upotrebljen kao kontrola reakcije umnožen je početnicama Act3 Fwd i Act3 Rev (sekvence početnica nalaze se u Tab. 3.). Početnice se tako hvataju za kalup da se konačno dobiju produkti veličine: 1065 pb (za transgen *delta-3-BPM1-GFP*), 150 pb (za transgen *NLSbpm1-GFP*) i 757 pb u genomskoj DNA odnosno 655 pb u cDNA (za gen *ACT3*). Nakon elektroforeze u 1%-tnom agaroznom gelu produkte reakcije sam vizualizirala pomoću etidijevog bromida (Slika 4.). Umnažanje fragmenta veličine 655 pb za gen *ACT3* potvrđuje da izolirana mRNA nije kontaminirana genomskom DNA.

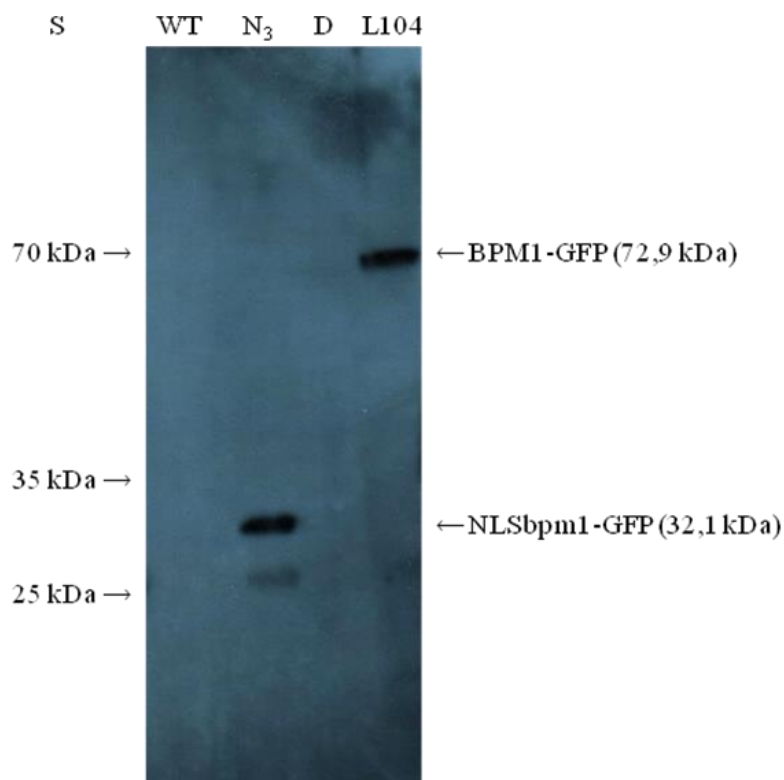


Slika 4. Ekspresija transgena *NLSbpm1-GFP* i *delta-3-BPM1-GFP* u klijancima uročnjaka regeneriranim na podlozi MS s dodatkom herbicida GLA. U PCR reakciji je kao kalup korištena cDNA sintetizirana pomoću reverzne transkriptaze, na temelju mRNA izolirane iz regeneriranih klijanaca. D₁: linija transformanta delta-3-GFP. PD₁: pozitivna kontrola za transformanta delta-3-GFP, genomska DNA izolirana iz klijanaca linije D₁. N₁ – N₃: tri linije transformanata NLS-GFP. PN₁: pozitivna kontrola za transformante NLS-GFP, genomska DNA izolirana iz klijanaca linije N₁. ØD i ØN: negativna kontrola. S: standard *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder*. AcD₁: uzorak cDNA izoliran iz linije D₁ kao kalup za umnažanje gena *ACT3*. AcN₁ – AcN₃: uzorci cDNA izolirani iz linija N₁ – N₃ kao kalup za umnažanje gena *ACT3*.

3. 4. Imunodetekcija rekombinantnih proteina delta-3-BPM1-GFP i NLSbpm1-GFP u proteinskim ekstraktima klijanaca uročnjaka

Da bih utvrdila sintetiziraju li se u regeneriranim biljkama uročnjaka rekombinantni proteini delta-3-BPM1-GFP i NLSbpm1-GFP, napravila sam izolaciju topljivih proteina iz sedam dana starih klijanaca. Ukupno pet uzoraka obuhvaćalo je klijance sljedećih pet linija: divlji tip (engl. *wild type*, wt), L104 (ekspirimira cjeloviti fuzijski protein BPM1-GFP), delta-3-GFP (nosi transgen *delta-3-BPM1-GFP*) te dvije NLS-GFP linije (obje nose transgen *NLSbpm1-GFP*). Proteine sam razdvojila pomoću jednodimenzionalne SDS-PAGE elektroforeze pa sam ih potom prenijela na PVDF membranu koja je tretirana primarnim protutijelom anti-GFP (s obzirom da sam htjela detektirati fuzijske proteine koji sadrže sekvencu proteina GFP) te sekundarnim protutijelom na koje je kovalentno vezana

peroksidaza (ona sudjeluje u imunodetekciji proteina time što izvodi kemiluminiscentnu reakciju tijekom inkubacije membrane u smjesi supstrata koja sadrži peroksid i luminol). Nakon imunodetekcije razvijen je RT film (Sl. 5).



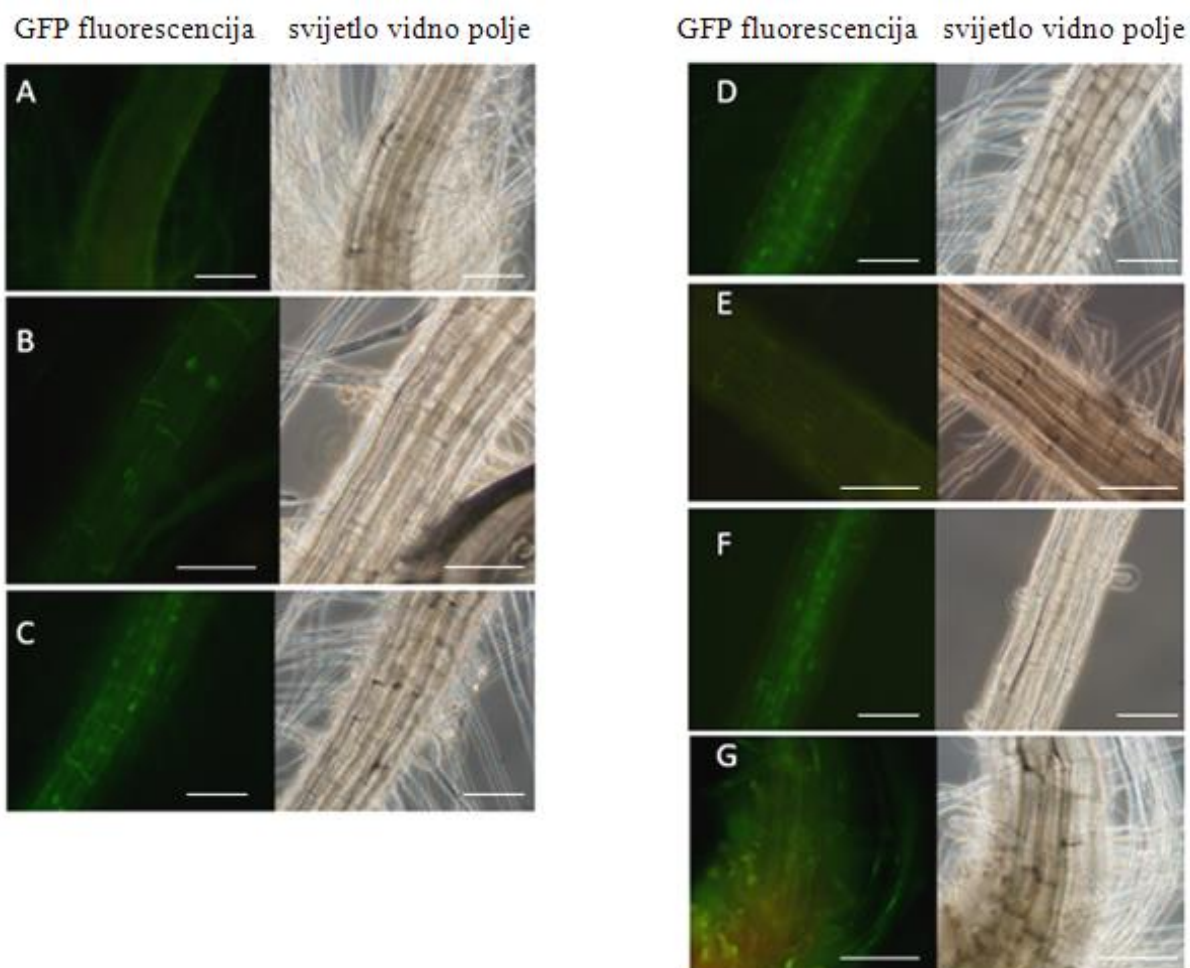
Slika 5. Imunodetekcija topivih rekombinantnih proteina delta-3-BPM1-GFP i NLSbpm1-GFP u proteinskim ekstraktima klijanaca uročnjaka. WT: wild type (proteinski uzorci iz biljaka divljega tipa). N₃: linija transformanta NLS-GFP. D: linija transformanta delta-3-GFP. L104: linija 104 je transformant BPM1-GFP. S: standard *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*.

Očekivana veličina rekombinantnog proteina BPM1-GFP iznosi 72,9 kDa, proteina delta-3-BPM1-GFP 69,4 kDa, a proteina NLSbpm1-GFP 32,1 kDa. Proteini BPM1-GFP i NLSbpm1-GFP su detektirani u transgenim klijancima dok prisutnost proteina delta-3-BPM1-GFP nije potvrđena ovom metodom.

3. 5. Sub-stanična lokalizacija proteina delta-3-BPM1-GFP i NLSbpm1-GFP u transgeničnim biljakama

Prisustvo fluorescentnog signala rekombinantnih proteina delta-3-BPM1-GFP i NLSbpm1-GFP provjereno je fluorescentnom mikroskopijom u regeneriranim klijancima

uročnjaka (Slika 6. e – g). Također su, radi usporedbe, pod mikroskopom promatrani i regenerirani klijanci iz homozigotnog sjemena linije L104 te klijanci divljega tipa (Sl. 6. a – d). U većini transformiranih biljaka koje pokazuju fluorescentni signal, fluorescencija je prisutna na području korijena, i to ponajviše u stanicama vrata korijena. Može se vidjeti da biljke s pojačanom ekspresijom gena *NLSbpm1-GFP*, konkretno biljke linije označene kao NLS3-GFP, pokazuju jaki fluorescentni signal u jezgri svih stanica korijena (Sl. 6. f – g), od vrška prema vratu korijena, a osobito na vratu je jaki signal. Međutim, u biljkama linije označene kao NLS2-GFP, koje također imaju pojačanu ekspresiju gena *NLSbpm1-GFP*, vidljiv je tek slabi fluorescentni signal, u jezgrama samo nekih stanica. U klijancima s pojačanom ekspresijom gena *delta-3-BPM1-GFP* nije uočen fluorescentni signal (Sl. 6. e). Fluorescentni signal u biljkama linije L104, koje pojačano eksprimiraju cjeloviti protein BPM1-GFP, najbolje se vidi u jezgrama stanica vrata korijena (Sl. 6. b), a prema vršku korijena signal se gubi. Također je difuzni signal proteina BPM1-GFP vidljiv i u stanicama epiderme (Sl. 6. c) i u provodnom sustavu korijena nekih klijanaca (Sl. 6. d). Promatrane biljke linije wt, očekivano, ne pokazuju fluorescentni signal, s obzirom da niti ne eksprimiraju rekombinantne proteine čija sekvenca sadrži GFP (Sl. 6. a).



Slika 6. Lokalizacija proteina delta-3-BPM1-GFP i NLSbpm1-GFP u transgeničnim klijancima uročnjaka. Slike su snimljene fluorescentnim mikroskopom Olympus BX51, uz povećanje okulara 10x i objektiva 20x, upotrebom seta filtera za signal proteina GFP, uz koje je radi usporedbe prikazano i odgovarajuće svijetlo vidno polje. Korijen klijanaca linije wt u kojima nedostaje fluorescentni signal (a). Fluorescentni signal u korijenu klijanaca linije L104, u jezgrama stanica vrata korijena (b) te u zoni rasta korijenovih dlačica: u jezgrama stanica epiderme (c) i u provodnom sustavu (d). U korijenu klijanaca linije transformanta delta-3-GFP fluorescentni signal nije uočen (e). Duž korijena klijanaca linije transformanta NLS-GFP prisutan je fluorescentni signal u provodnom sustavu i u jezgrama stanica epiderme (f) kao i u jezgrama korijenovih dlačica (g). Skale prikazuju 100 μ m.

4. RASPRAVA

Kao što su struktura i uloga proteina povezane, jer uloga ovisi i proizlazi iz strukture, tako su također uloga koju protein obavlja i njegova pozicija povezani, jer često protein nije posve funkcionalan dok se ne nađe u odgovarajućem dijelu stanice, ili u jednom staničnom odjeljku ima jednu ulogu a u drugome odjeljku drugu. Slično se može zaključiti i s obzirom na uloge koje se pripisuju proteinima porodice BPM, od kojih je jedna od najvažnijih da su adaptori ubikvitin-ligazi CUL3 (Weber i sur. 2005). Do sada je dokazano da su supstrati proteina BPM uglavnom različiti transkripcijski faktori (Lechner i sur. 2011; Chen i sur. 2013, 2015; Morimoto i sur. 2017), stoga se čini logičnim zaključak da, poradi sudjelovanja u regulaciji degradacije transkripcijskih faktora u jezgri, proteini BPM i lokaliziraju u tom staničnom odjeljku. Prethodna istraživanja, u kojima je istražena stanična lokalizacija proteina BPM provedena su većinom u heterolognom sustavu (Lechner i sur. 2011; Leljak Levanić i sur. 2012; Morimoto i sur. 2017) te je pokazano da protein BPM1 unutar stanice uglavnom lokalizira u jezgri. Pored toga definiran je i bipartitni nuklearni lokalizacijski signal koji se nalazi na C-terminalnom kraju proteina BPM1 (Leljak Levanić i sur. 2012). Pretraživanjem proteinske sekvence te korištenjem programa za predviđanje NLS-a čini se da je taj C-terminalno smješteni NLS jedini takav u proteinu BPM1 (Leljak Levanić i sur. 2012), te prema tome i odgovoran za nuklearnu lokalizaciju proteina BPM1. Kako bi se u homolognom sustavu provjerila funkcionalnost i nužnost opisanog NLS-a, u ovome su radu regenerirane transgenične biljke uročnjaka s pojačanom ekspresijom gena *BPM1-GFP* kojem je deletiran NLS (*delta-3-BPM1-GFP*) te biljke s pojačanom ekspresijom NLS-a iz gena *BPM1* fuzioniranog s genom *GFP* (*NLSbpm1-GFP*). Slični genetički konstrukti korišteni su u spomenutom istraživanju Leljak Levanić i suradnika (2012) te se može reći da se rezultati ovih dvaju radova djelomično podudaraju.

U skladu s očekivanjima, imunodetekcijom pomoću protutijela anti-GFP u proteinskim ekstraktima regeneriranih klijanaca uročnjaka ustanovljeno je prisustvo proteina veličine 32,1 kDa, što je očekivana veličina proteina *NLSbpm1-GFP*, a fluorescentnom mikroskopijom u regeneriranim biljkama linije *NLS3-GFP* ustanovljen je jaki fluorescentni signal spomenutog proteina u jezgri svih stanica korijena. Navedeni rezultat poklapa se s opisanim u istraživanju Leljak Levanić i suradnika (2012) da takav fuzijski protein koji sadrži spomenuti NLS pokazuje apsolutnu lokalizaciju GFP-a u jezgrama transformiranih BY2 stanica, te se može na temelju toga zaključiti da je spomenuti nuklearni lokalizacijski signal

iz gena *BPM1* doista odgovoran i dostatan za lokalizaciju proteina BPM1 u jezgri. Međutim, s obzirom na dosad otkrivene brojne interakcije domene MATH proteina BPM1 s različitim citoplazmatskim i jezgrinim proteinima (Weber i Hellmann 2009; Yang i sur. 2011; Yanhui i sur. 2006; Bernhardt i sur. 2006), može se pretpostaviti da uloge proteina BPM1 u jezgri mogu biti veoma raznolike, premda točne uloge toga proteina tek treba utvrditi. S druge strane, spomenuti nuklearni lokalizacijski signal iz gena *BPM1*, osobito fuzioniran s različitim fluorescentnim proteinima, može poslužiti kao marker jezgre u istraživanjima koja koriste metode fluorescentne mikroskopije.

Suprotno očekivanom, imunodetekcija pomoću protutijela anti-GFP nije potvrdila prisutnost proteina delta-3-BPM1-GFP u proteinskim ekstraktima klijanaca uročnjaka, odnosno prisustvo proteina veličine 69,4 kDa, što je očekivana veličina ovoga rekombinantnog proteina. Nadalje, niti fluorescentnom mikroskopijom nije uočen fluorescentni signal proteina delta-3-BPM1-GFP u regeneriranim klijancima linije delta-3-GFP. Dobiveni rezultati se ne slažu s onima iz rada Leljak Levanić i suradnika (2012), koji su ustanovili da gen *BPM1-GFP* kojemu je deletiran NLS daje proteinski produkt kojeg se može detektirati i da lokalizira u citoplazmi, tvoreći sporadično aglomerate. Kao moguće objašnjenje rezultata u ovome radu može biti da se, zbog određenih problema u translaciji, ovaj rekombinantni protein u uročnjaku niti ne sintetizira. Nadalje, moguće je da do sinteze proteina delta-3-BPM1-GFP ipak dolazi, ali da je taj protein veoma nestabilan te se brzo odvodi u degradaciju i stoga njegovo prisustvo u proteinskim ekstraktima regeneriranih klijanaca linije delta-3-GFP nije utvrđeno. Osim navedenih pretpostavki, treba uzeti u obzir i sklonost proteina delta-3-BPM1-GFP da stvara aglomerate, te činjenicu da je imunodetekciji rekombinantnih proteina prethodila izolacija topljivih proteina iz regeneriranih klijanaca uročnjaka, a ne izolacija ukupnih proteina, pa bi bilo zanimljivo ponoviti imunodetekciju nakon izolacije ukupnih proteina.

Također, poznato je da je za interakciju proteina BMP1 i CUL3 važna domena BTB/POZ koja je smještena na C-terminalnom dijelu proteina BPM1 (Weber i sur. 2005), pa je moguće da uklanjanje NLS-a sa samoga C-terminalnog kraja BPM1 onemogućuje njegovu interakciju s CUL3. Naime, moguće je da ta delecija ima negativni učinak na smatanje proteina BPM1 ili možda narušava strukturu proteina BPM1 a time i njegovu funkciju. Vezano s tim, krnji protein BPM1 koji lokalizira u citoplazmi, ni nema mogućnost interakcije s CUL3 te najvjerojatnije biva brzo eliminiran iz stanice.

U svakom slučaju, za bolje razumijevanje uloga koje protein BPM1 ima u različitim staničnim procesima, nužno je nastaviti s istraživanjima sub-stanične lokalizacije ovoga proteina, kao i ispitivanjima njegovih potencijalnih posttranslacijskih modifikacija koje bi mogle regulirati njegovu prisutnost u različitim dijelovima biljne stanice.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju ranijih istraživanja uloge proteina BPM1 u uročnjaku a poradi važnosti regulacije njegove sub-stanične lokalizacije i stabilnosti, te za razumijevanje njegovih funkcija u biljnim stanicama, napravljeno je ispitivanje sub-stanične lokalizacije i stabilnosti delecijских mutanti gena *BPM1* u uročnjaku.

U regeneriranim klijancima uročnjaka koji imaju u svojem genomu unijet transgen *NLSbpm1-GFP* potvrđeno je da eksprimiraju navedeni transgen, da u njima nastaje rekombinantni protein NLSbpm1-GFP te da taj protein lokalizira u jezgri promatranih stanica korijena klijanaca. Bipartitni nuklearni lokalizacijski signal proteina BPM1 je vrlo snažan signal i regenerirane transgenične biljke odličan su model za sva istraživanja u kojima postoji potreba za praćenjem jezgara. U regeneriranim klijancima uročnjaka koji u genomu imaju unijet transgen *delta-3-BPM1-GFP* potvrđeno je da eksprimiraju uneseni transgen, ali nije utvrđeno prisustvo rekombinantnog proteina delta-3-BPM1-GFP niti je uočen fluorescentni signal istoga proteina fluorescentnom mikroskopijom. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je ispitivani nuklearni lokalizacijski signal iz gena *BPM1* doista važan za lokalizaciju proteina BPM1 u jezgri.

6. LITERATURA

- Bauer, N. C.; Doetsch, P. W.; Corbett, A. H. Mechanisms regulating protein localization. *Traffic* **2015**, *16*, 1039–1061.
- Bernhardt, A.; Lechner, E.; Hano, P.; Schade, V.; Dieterle, M. CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2006**, *47*, 591–603.
- Brandizzi, F.; Hanton, S.; DaSilva, L. L. P.; Boevink, P.; Evans, D.; Oparka, K.; Denecke, J.; Hawes, C. ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants. *Plant J.* **2003**, *34*, 269–281.
- Callis, J. Regulation of protein degradation. *Plant Cell* **1995**, *7*, 845–857.
- Chen, L.; Bernhardt, A.; Lee, J.; Hellmann, H. Identification of *Arabidopsis* MYB56 as a novel substrate for CRL3(BPM) E3 ligases. *Mol. Plant* **2015**, *8*, 242–250.
- Chen, L.; Lee, J. H.; Weber, H.; Tohge, T.; Witt, S.; Roje, S.; Fernie, A.R.; Hellmann, H. *Arabidopsis* BPM proteins function as substrate adaptors to a cullin3-based E3 ligase to affect fatty acid metabolism in plants. *Plant Cell* **2013**, *25*, 2253–2264.
- Clough, S. J.; Bent, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **1998**, *16*, 735–743.
- Cokol, M.; Nair, R.; Rost, B. Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep.* **2000**, 411–415.
- Cooper^a, G. M. Razgradnja proteina. U: Stanica: molekularni pristup. Ur: Cooper, G. M.; Hausman, R. E.; ur. hrv. izdanja: Lauc, G. Medicinska naklada, Zagreb, 2004., 3. izdanje, str. 313–316.
- Cooper^b, G. M. Lizosomi. U: Stanica: molekularni pristup. Ur: Cooper, G. M.; Hausman, R. E.; ur. hrv. izdanja: Lauc, G. Medicinska naklada, Zagreb, 2004., 3. izdanje, str. 389–394.
- Cooper^c, G. M. Jezgra. U: Stanica: molekularni pristup. Ur: Cooper, G. M.; Hausman, R. E.; ur. hrv. izdanja: Lauc, G. Medicinska naklada, Zagreb, 2004., 3. izdanje, str. 323–350.

- Dhawan, R.; Luo, H.; Foerster, A. M.; Abugamar, S.; Du, H. N.; Briggs, S. D.; Mittelsten Scheid, O.; Mengiste, T. Histone monoubiquitination1 interacts with a subunit of the mediator complex and regulates defense against necrotrophic fungal pathogens in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2009**, *21*, 1000–1019.
- Enam, C.; Geffen, Y.; Ravid, T.; Gardner, R. G. Protein quality control degradation in the nucleus. *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87*, 725–749.
- Hershko, A.; Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 425–479.
- Hirosawa, Y.; Ito-Inaba, Y.; Inaba, T. Ubiquitin–proteasome-dependent regulation of bidirectional communication between plastids and the nucleus. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, E310.
- Hofmann, R. M.; Pickart, C. M. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* **1999**, *96*, 645–653.
- Husnjak, K.; Đikić, I. Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 291–322.
- Ikeda, F.; Đikić, I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein modifications: Beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.* **2008**, *9*, 536–642.
- Kinema, M.; Fan, W.; Dong, X. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *Plant Cell* **2000**, *12*, 2339–2350.
- Koornneef, M.; Meinke, D. The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant J.* **2010**, *61*, 909–921.
- Kurepa, J.; Smalle, J. Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie.* **2008**, *90*, 324–335.
- Kurepa, J.; Toh-e, A.; Smalle, J. 26S proteasome regulatory particle mutants have increased oxidative stress tolerance. *Plant J.* **2008**, *53*, 102–114.
- Kurepa, J.; Wang, S.; Li, Y.; Smalle, J. Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. *Plant Signal Behav.* **2009**, *4*, 924–927.

- Lechner, E.; Leonhardt, N.; Eisler, H.; Parmentier, Y.; Alioua, M.; et al. MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling. *Dev. Cell* **2011**, *21*, 1116–1128.
- Lee, D. W.; Jung, C.; Hwang, I. Cytosolic events involved in chloroplast protein targeting. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 245–252.
- Leljak Levanić, D.; Horvat, T.; Martinčić, J.; Bauer, N. A novel bipartite nuclear localization signal guides BPM1 protein to nucleolus suggesting its Cullin3 independent function. *PLoS One* **2012**, *7*, E51184.
- Ling, Q.; Jarvis, P. Functions of plastid protein import and the ubiquitin-proteasome system in plastid development. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *278*, 21323–21326.
- Morimoto, K.; Ohama, N.; Kidokoro, S.; Mizoi, J.; Takahashi, F.; Todaka, D.; Mogami, J.; Sato, H.; Qin, F.; Kim, J.S.; et al. BPM-CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E8528–E8536.
- Mosesson, Y.; Shtiegman, K.; Katz, M.; Zwang, Y.; Vereb, G.; Szollosi, J.; Yarden, Y. Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 21323–21326.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, *15*, 473–497.
- Nelson, C. J.; Li, L.; Millar, A. H. Quantitative analysis of protein turnover in plants. *Proteomics*, **2014**, *14*, 579–592.
- Olinares, P. D. B.; Kim, J.; Van Wijk, K. J. The Clp protease system: a central component of the chloroplast protease network. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1807*, 999–1011.
- Peltier, J. B.; Ripoll, D. R.; Friso, G.; Rudella, A.; Cai, J.; Ytterberg, L.; Giacomelli, L.; Pillardy, J.; Van Wijk, K. J. Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 4768–4781.

- Pogson, B. J.; Woo, N. S.; Förster, B.; Small, I. D. Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci.* **2008**, *13*, 602–609.
- Qin, F.; Sakuma, Y.; Tran, L.-S. P.; Maruyama, K.; Kidokoro, S.; Fujita, Y.; Fujita, M.; Umezawa, T.; Sawano, Y.; Miyazono, K.-i.; Tanokura, M.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **2008**, *20*, 1693–1707.
- Rubinsztein, D. C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* **2006**, *443*, 780–786.
- Serrano, I.; Campos, L.; Rivas, S. Roles of E3 ubiquitin-ligases in nuclear protein homeostasis during plant stress responses. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, E139.
- Skelly, M. J.; Furniss, J. J.; Grey, H. L.; Wong, K.-W.; Spoel, S. H. Dynamic ubiquitination determines transcriptional activity of the plant immune coactivator NPR1. preprint: *bioRxiv*, **2019**, E582296.
- Spoel, S. H.; Mou, Z.; Tada, Y.; Spivey, N. W.; Genschik, P.; Dong, X. Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* **2009**, *137*, 860–872.
- Sun, Z. W.; Allis, C. D. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **2002**, *418*, 104–108.
- Tanaka, K.; Tanahashi, N. The 20S proteasome: subunits and functions. *Adv. Mol. Cell Biol.* **1998**, *27*, 105–128.
- Tang, X.; Miao, M.; Niu, X.; Zhang, D.; Cao, X.; Jin, X.; Zhu, Y.; Fan, Y.; Wang, H.; Liu, Y.; Sui, Y.; Wang, W.; Wang, A.; Xiao, F.; Giovannoni, J.; Liu, Y. Ubiquitin-conjugated degradation of golden 2-like transcription factor is mediated by CUL4-DDB1-based E3 ligase complex in tomato. *New Phytol.* **2016**, *209*, 1028–1039.
- Tokumaru, M.; Adachi, F.; Toda, M.; Ito-Inaba, Y.; Yazu, F.; Hirosawa, Y.; Sakakibara, Y.; Suiko, M.; Kakizaki, T.; Inaba, T. Ubiquitin-proteasome dependent regulation of the GOLDEN2-LIKE 1 transcription factor in response to plastid signals. *Plant Physiol.* **2017**, *173*, 524–535.

- Vallon, U.; Kull, U. Localization of proteasomes in plant cells. *Protoplasma* **1994**, *182*, 15–18.
- Vierstra, R. D. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Mol. Biol.* **1996**, *32*, 275–302.
- Weber, H.; Bernhardt, A.; Dieterle, M.; Hano, P.; Mutlu, A.; Estelle, M.; Genschik, P.; Hellmann, H. *Arabidopsis* AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Phys.* **2005**, *137*, 83–93.
- Weber, H.; Hellmann, H. *Arabidopsis thaliana* BTB/POZ-MATH proteins interacts with members of the ERF/AP2 transcription factor family. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6624–6635.
- Weigel, R. R.; Pfitzner, U. M.; Gatz, C. Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates *PR* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2005**, *17*, 1279–1291.
- Wenzel, T.; Eckerskorn, C.; Lottspeich, F.; Baumeister, W. Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett.* **1994**, *349*, 205–209.
- Xu, P.; Peng, J. Characterization of polyubiquitin chain structure by middle-down mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3438–3444.
- Yang, S. D.; Seo, P. J.; Yoon, H. K.; Park, C. M. The *Arabidopsis* NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the COR/RD genes. *Plant Cell* **2011**, *23*, 2155–2168.
- Yanhui, C.; Xiaoyuan, Y.; Kun, H.; Meihua, L.; Jigang, L. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol. Biol.* **2006**, *60*, 107–124.

<https://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pB7FWG2/search/index/>

<https://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp#res> (The *Arabidopsis* Information Resource, TAIR)

<https://www.thermofisher.com/>

ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Rijeci gdje sam završila osnovnu školu i opću gimnaziju. Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2007. godine, a u rujnu 2015. godine sam ga završila te upisala Diplomski sveučilišni studij molekularne biologije.

Tijekom studija sam imala priliku stjecati stručna znanja i vještine te se izbliza upoznati sa znanstveno-istraživačkim radom kroz višemjesečnu stručnu praksu u Laboratoriju za biljnu molekularnu biologiju Zavoda za molekularnu biologiju. Bila sam studentska predstavica u Vijeću Biološkog odsjeka tijekom dvije akademske godine te urednica dvaju brojeva studentskog časopisa „In vivo“. Više puta sam sudjelovala u pripremi i izvedbi radionica za manifestaciju „Noć biologije“.

U slobodno vrijeme rado kuham i pečem kolače, čitam, šećem i družim se s dragim ljudima.