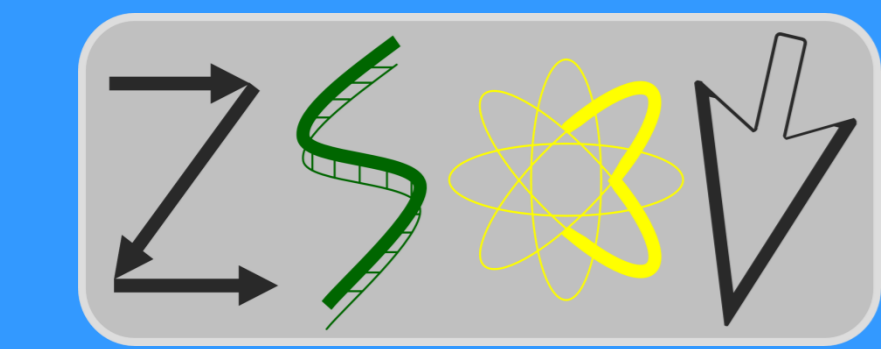
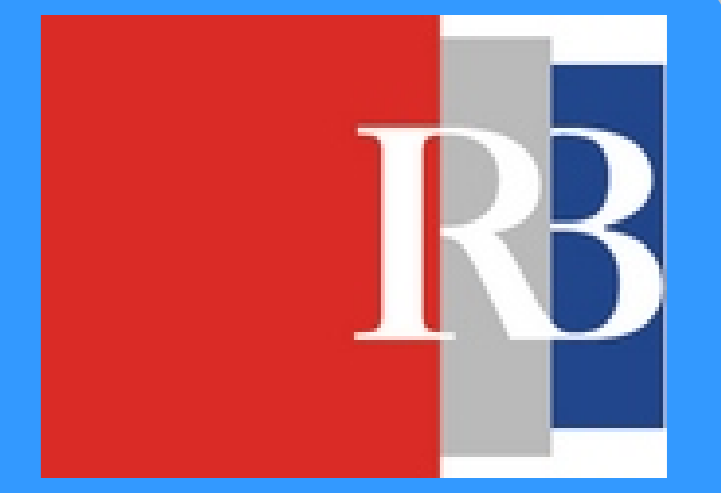


RAZVOJ BIOMARKERA KOD MEDITERANSKE DAGNJE *Mytilus galloprovincialis* ZA PROCJENU ANTROPOGENOG UTJECAJA NA MORSKI EKOSUSTAV

A. Baričević¹, E. Durmišić², M. Korlević¹, B. Treursić²



MORE IS MORE

¹ Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Laboratorij za morsku molekularnu biologiju, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj
² Sveučilište Jurja Dobrile u Puli, Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru, Preradovićeve 1, 52100 Pula

UVOD:

Prisutnost zagađivala u moru kod organizama izaziva promjene na molekularnoj i staničnoj razini te se u takvim stresnim uvjetima inducira ekspresija i aktivnost gena kao što su feritin i geni obitelji p53. Opis i analiza navedenih gena te bolje poznavanje njihove ekspresije kod mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis* prvi su koraci u razvoju i primjeni ovih gena kao korisnih biomarkera za procjenu antropogenog utjecaja na morski ekosustav.

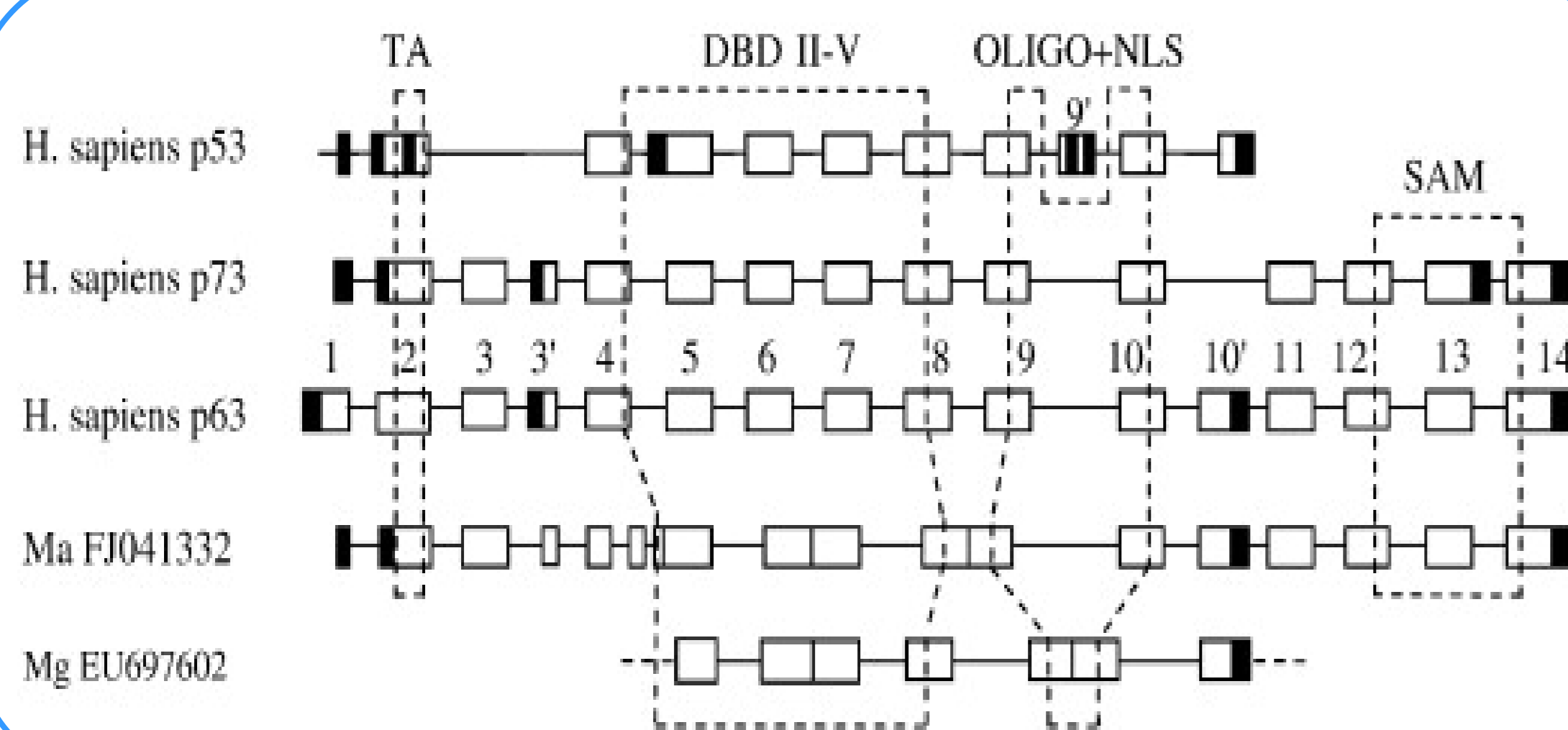


METODE:

- uzorkovanje mediteranske dagnje i izolacija ciljnih tkiva
- ekstrakcija RNA i DNA
- reverzna transkripcija mRNA
- lančana reakcija polimerazom (PCR)
- kloniranje produkata PCR-a
- određivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA
- western analiza

REZULTATI I RASPRAVA:

STRUKTURA GENA

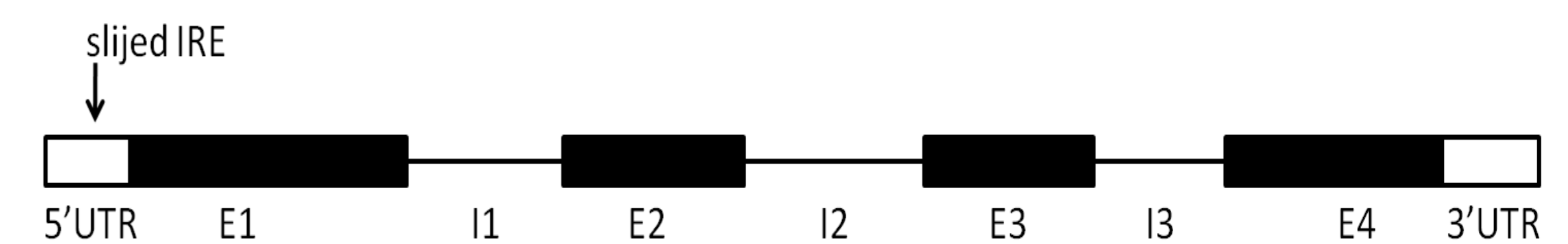


Slika 1. Shematski prikaz sravnjenja gena obitelji p53 kod vrste *Homo sapiens*, *Mya arenaria* i *Mytilus galloprovincialis*. Egzoni su prikazani pravokutnicima (crni pravokutnici odgovaraju netranslatiranim područjima), horizontalne linije označavaju introne. Isprekidanim linijama obuhvaćene su funkcionalne domene: transaktivacijska (TA), DNA vezna (DBD), oligomerizacijska (OLIGO), domena sa sterilnim α -motivom (SAM) (Štifanić i sur., 2009).

Geni obitelji p53 imaju ključnu ulogu u kontroli staničnog ciklusa. Beskralješnjaci imaju samo jedan-ishodišni gen obitelji p53 koji pokazuje najveću sličnost s p63 genom kralješnjaka.

Feritin je multifunkcionalni protein koji je zbog svoje važnosti sveprisutan od arheobakterija, eubakterija, biljaka do životinja. Identičnost sljedova feritinskog gena pojedinih organizama je svega 15 %, no trodimenzionalna struktura proteina strogo je konzervirana. Varijabilni nukleotidni slijed konzerviran je na mjestima važnim za funkciju enzima: ferooksidazni centar kao i slijed IRE.

A



B

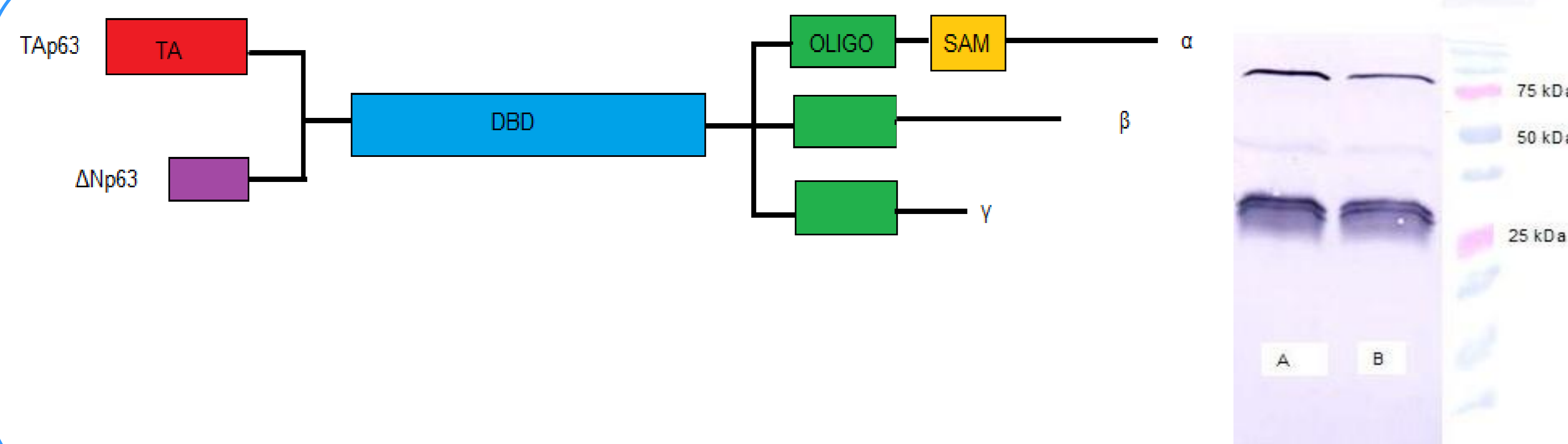
Species	Sequence
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	TGTTCGTCGCTCAGTGAACGTCACGGGCA
<i>Meretrix meretrix</i>	TCTTCGTCGCTCAGTGAACGTCACGGGCA
<i>Pinctada fucata</i>	GCTTCGTCGCTCAGTGAACGTCACGGGCA
<i>Crassostrea gigas GF1</i>	TCTTCGTCGCTCAGTGAACGTCACGGGCA
<i>Crassostrea gigas GF2</i>	TCTTCGTCGCTCAGTGAACGTCACGGGCA
<i>Lymnaea stagnalis</i>	TCTTCGTCGCTCAGTGAACGTCACGGGCA
<i>Drosophila melanogaster</i>	GCCTTCGTCGCTCAGTGAACGTCACGGGCA
<i>Asterias forbesii</i>	TCTTCGTCGCTCAGTGAACGTCACGGGCA
<i>Gallus gallus</i>	TCTTCGTCGCTCAGTGAACGTCACGGGCA
<i>Homo sapiens</i>	TCTTCGTCGCTCAGTGAACGTCACGGGCA

Slika 2. (A) Shematski prikaz strukture feritinskog gena kod životinja. Egzoni su prikazani pravokutnicima (E1, E2, E3, E4), horizontalne linije predstavljaju introne (I1, I2, I3). Bijeli pravokutnici predstavljaju 5' i 3' netranslatirana područja (5'UTR, 3'UTR) (Proudhon i sur., 1996). (B) Stroga konzerviranost slijeda IRE (vezno mjesto za protein IRP-iron response protein) u 5'UTR (Wang i sur., 2009).

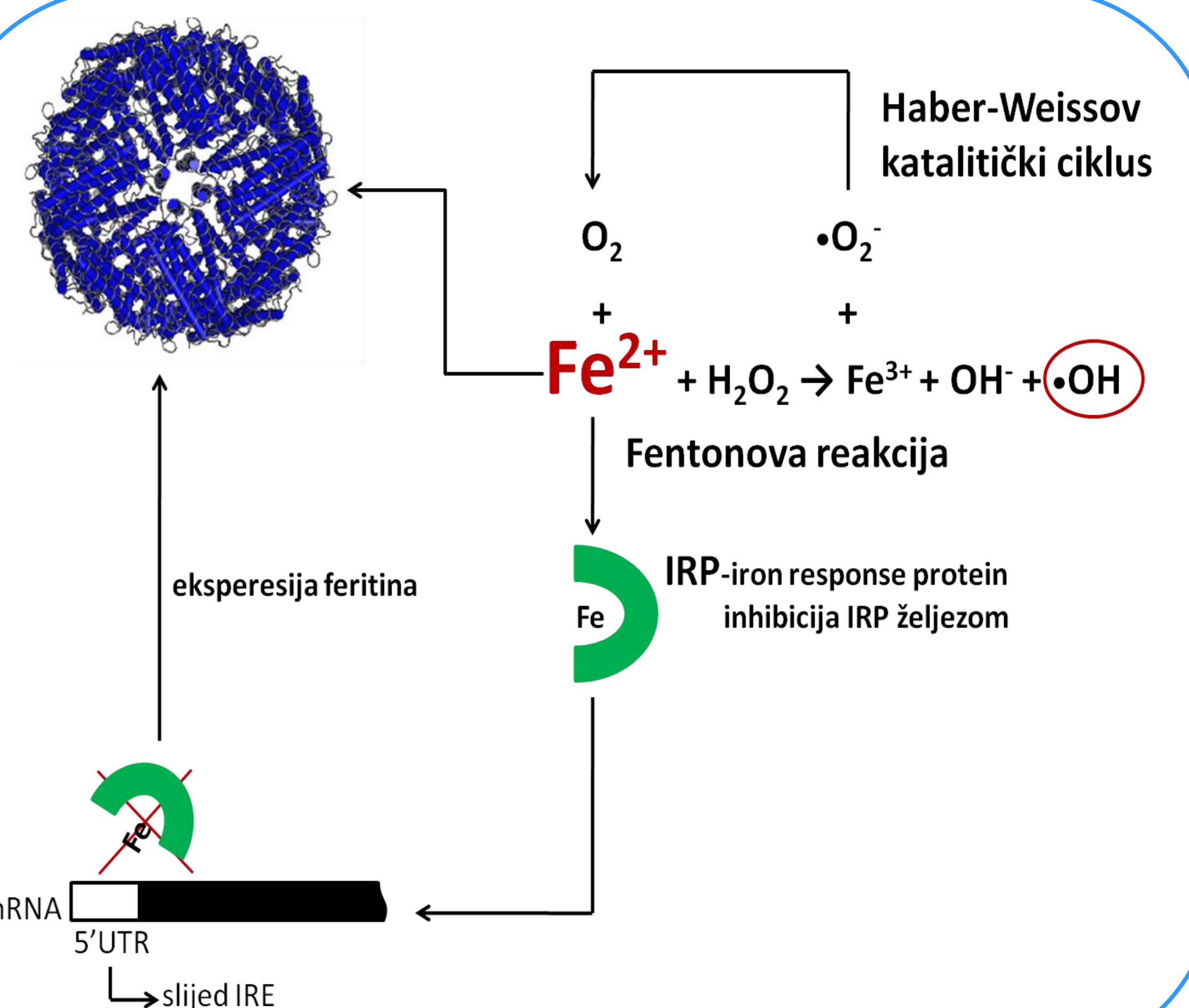
FUNKCIJA GENA

Gen p63 kod kralješnjaka ekspirira najmanje šest različitih mRNA, odnosno proteinskih izoformi koje po dosadašnjim spoznajama očekujemo i kod dagnje. Značajna funkcija gena p63 je "kontrola stanja" staničnog genoma te se u uvjetima koji dovode do oštećenja DNA mijenja ekspresija proteinskih izoformi i njihovi relativni odnosi čija se detekcija može koristiti kao potencijalni biomarker genotoksičnog stresa.

Feritin pohranom željeza u Fe³⁺ obliku onemogućava njegovo katalitičko djelovanje u Fentonovoj reakciji stvaranja radikala. Razine ekspresije feritina mogu se koristiti kao potencijalni biomarker oksidativnog stresa.



Slika 3. Shematski prikaz proteinskih izoformi gena p63 koje nastaju inicijacijom transkripcije s dva različita promotorska mjesta (TAp63 i ΔNp63) i alternativnim izrezivanjem mRNA (α, β, γ) te detekcija različitih proteinskih izoformi specifičnim protutijelom na TA domenu western analizom nakon izloženosti dagnje TBT-u koncentracija 100 µg/l (A) i 33 µg/l (B).



Slika 4. Mehanizam antioksidacijskog djelovanja feritina se temelji na skladištenju željeznih iona kako bi se onemogućilo katalitičko djelovanje Fe²⁺ u Fentonovoj reakciji kojom nastaje hidroksilni radikal (•OH). Fe²⁺ se regenerira u Haber-Weissovom ciklusu. Visoke koncentracije željeznih iona inhibiraju vezanje proteina IRP (iron response protein) na IRE slijed u 5'UTR području što omogućava translaciju feritinske mRNA.

LITERATURA:

- Hintze K.J. i Theil E.C. 2005. DBegley, G. S., Steele, M. E., Walker, C. W., Stephens, R. E., Reinisch, C. L. A new invertebrate member of the p53 gene family is developmentally expressed and responds to polychlorinated biphenyls. *Environ. Health Perspect.* 2002, 110, 377-385.
- Lewin A., Moore G.R., Le Brun N.E. 2005. Formation of protein-coated iron minerals. *Dalton Transactions*, 3597-3610.
- Murray-Zmijewski, F., Lane, D. P., Bourdon, J.-C. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* 2006, 13, 962 – 972.
- Proudhon, D., Wei, J., Briat, J.-F., Theil, E.C. 1996. Ferritin gene organization: differences between plants and animals suggest possible kingdom-specific selective constraints. *Journal of Molecular Evolution* 42, 325-336.
- Štifanić, M., Mičić, M., Ramšak, A., Blašković, S., Ruso, A., Zahn, R.K., Batel, R. 2009. p63 in *Mytilus galloprovincialis* and p53 family members in the phylum Mollusca. *Comp. Biochem. Evol. Part B* 154, 264-273.
- NA and mRNA elements with complementary responses to hemin, antioxidant inducers, and iron control ferritin-L expression. *PNAS* 102, 15048-15052.
- Jessen-Eller, K., Kreiling, J. A., Yang, A.; Kaghad, M., Caput, D., McKeon, F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet.* 2002, 18, 90-95.
- Wang X., Liu B., Xiang J. 2009. Cloning, characterization and expression of ferritin subunit from clam *Meretrix meretrix* in different larval stages. *Comparative Biochemistry and Physiology* 154, 12-16.

ZAHVALA:

Najljepše se zahvaljujemo voditelju laboratorija dr.sc. Renatu Batelu na podršci, mentorima dr.sc. Bojanu Hameru i dr.sc. Mauru Štifaniću na korisnim savjetima i strpljenju te organizatorima na razumijevanju pri prekoračenju dogovorenih rokova. ©

