

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion		Laitos — Institution	
Matemaattis-luonnont. osasto		Kasvitieteen laitos	
Tekijä — Författare			
Heta K. Pukki			
Työn nimi — Arbets titel			
Schizophyllum communen (Basidiomycetes) $\alpha$ -tubuliinigeenin, tub-1A:n, rakenne ja fylogeneettinen vertailu			
Oppiaine — Läroämne			
Fysiologinen kasvitiede			
Työn laji — Arbets art		Aika — Datum	Sivumäärä — Sidoantal
pro gradu -tutkielma		toukokuu 1994	84 + vii
Tiivistelmä — Referat			
<p>Työn tavoitteena oli varmistaa kahden <math>\alpha</math>-tubuliinigeenin olemassaolo <i>S. communella</i>, kloonata ja sekvensoida niistä toinen, ja päätellä siitä <math>\alpha</math>-tubuliinin aminohapposekvenssi. Sekvenssien perusteella pyrittiin analysoimaan eri sienilajien <math>\alpha</math>-tubuliinigeenin samankaltaisuutta ja sukulaisuussuhteita muiden eliöryhmien kanssa. Korkeampien sienten <math>\alpha</math>-tubuliinigeenejä ei ole aikaisemmin sekvensoitu. Lisäksi haluttiin paikantaa 5'-alueelta mahdollisia <math>\alpha</math>-tubuliinigeenin säätelyyn osallistuvia sekvenssejä. <math>\alpha</math>-tubuliinigeenit yritettiin myös paikantaa kromosomien elektroforeettisen erottelun (CHEF) ja hybridisaation avulla tiettyyn kromosomiin.</p> <p>Työssä lähdettiin liikkeelle kuudesta EMBL 4 -faagikannasta, jotka sisälsivät heterologisen koettimen (kanan aivojen <math>\alpha</math>-tubuliini) kanssa hybridisoituvia fragmentteja. Faagi-DNA eristettiin ja sen pilkkoutumista eri restriktioensyymeillä tutkittiin. Fragmenttien pilkkoutumisen ja hybridisaatioiden perusteella tunnistettiin kaksi <math>\alpha</math>-tubuliinigeeniä, joita alettiin kutsua nimillä <i>tub-1A</i> ja <i>tub-1B</i> <math>\beta</math>-tubuliinilla aloitetun nimeämiskäytännön mukaisesti.</p> <p><i>tub-1A</i>:n sekvensointi tehtiin Sangerin dideoksymentelmällä käyttäen <sup>35</sup>S -leimattua adenosiniina merkkiaineena. Sekvensointi aloitettiin kahdesta suuresta fragmentista (1,4 kb ja 1,0 kb), jotka kloonattiin käyttäen vektorina <i>E. coli</i>n Bluescript-plasmidia. Subkloonauksella tuotettiin sopivan kokoisia fragmentteja sekvensoitavaksi. Yksi juoste sekvensoitiin käyttäen hyväksi Bluescript-vektorille komplementaarisia alukkeita T3 ja T7, ja toisen juosteen sekvensoimiseksi teetettiin alukkeita, joilla voitiin sekvensoida restriktiokohtien yli. <math>\alpha</math>-tubuliinigeenin todettiin sijaitsevan suhteellisen lähellä toisiaan siten, että yksi faagikanta (<math>\alpha</math>4Da) sisälsi osan molemmista geeneistä, ja toinen kanta (<math>\alpha</math>5Ba) sisälsi koko <i>tub-1A</i> -geenin.</p> <p><i>tub-1A</i>:n koodaavat alueet pääteltiin käyttäen homologiaa tunnettujen <math>\alpha</math>-tubuliinisekvenssien kanssa ja intronien päissä esiintyviä konsensussekvenssejä. Päätellyn koodaavan alueen kodoninkäyttö osoittautui suhteellisen samanlaiseksi kuin <i>S. communen</i> <math>\beta</math>-tubuliinigeenillä (<i>tub-2</i>). Koodaavasta alueesta johdettua polypeptidiä (<i>TUB-1A</i>) verrattiin <i>A. nidulansin</i> <math>\alpha</math>-tubuliineihin sekä osittaiseen <i>tub-1B</i> -geenin tuotteeseen (<i>TUB-1B</i>), ja siitä tehtiin sekundäärirakenteen analyysi GCG:n peptidestructure-ohjelmalla. Tulokset viittaavat siihen, että kyseessä on ekspressoitava <math>\alpha</math>-tubuliinigeeni. <i>tub-1A</i>:n 5'-alueella havaittiin kaksi sienten transkription aloituskohdille tyypillistä motiivia, sekä useita lyhyitä avoimia lukukehyksiä jotka saattavat osallistua translaation säätelyyn.</p> <p>Sienten ja muiden eliöryhmien <math>\alpha</math>-tubuliinien välisiä evolutiivisia etäisyyksiä pyrittiin arvioimaan aminohapposekvenssien samankaltaisuuden perusteella (GCG:n Pileup-ohjelmalla). Tulokset olivat ristiriitaisia, joten vertailussa käytetyistä sekvensseistä tehtiin lisäksi alustava fylogeneettinen analyysi Paup -ohjelmalla. Tulosten mukaan sienten ja eläinten <math>\alpha</math>-tubuliinit ovat keskenään läheisempää sukua kuin sienten ja kasvien <math>\alpha</math>-tubuliinit.</p> <p>Kromosomien elektroforeettisessa erottelussa <i>S. communen</i> dikaryoottisen kannan (684x1792-114-10) kromosomit saatiin eroteltua kahdeksaksi juovaksi, jotka olivat tunnistettavissa aikaisempien <i>S. communen</i> kromosomierottelujen perusteella. Ainakin yksi juovista muodostuu useista kromosomeista. <math>\alpha</math>-tubuliinigeenejä ei voitu paikantaa hybridisatiolla tiettyyn kromosomiin, sillä hybridisaatiosignaali oli useasta kromosomista muodostuvan juovan kohdalla.</p>			
Avisansat — Nyckelord			
$\alpha$ -tubuliinigeeni, sekvensointi, translaatio, säätely			
SÄilytyspaikka — Förvaringsställe			
Kasvitieteen laitoksen kirjasto			
Muuta tietoja — Övriga uppgifter			