

**UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET**

**Regulacija ekspresije gena za metalotionein
tipa 3 heljde I uloga proteina MT3
u odbrani biljnih tkiva od stresa
izazvanog teškim metalima**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Dragana Nikolić

Beograd, 2010.

2016

Up 270/14543

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Regulacija ekspresije gena za metalotionein tipa 3 heljde i
uloga proteina MT3 u odbrani biljnih tkiva
od stresa izazvanog teškim metalima

Doktorska disertacija

Dragana Nikolić

Beograd, 2010

Учреждение
"СВ" И. Бр. 161876



Ovaj rad je urađen u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka, na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu, pod rukovodstvom dr Vesne Maksimović.

Mentori i članovi komisije za pregled i ocenu rada su bili

dr Vesna Maksimović, naučni savetnik Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu

dr Svetlana Radović, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Jadranka Dundeški, naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu

Vesi i Svetlani, koje su moj eksperimentalni rad vodile ne samo tokom izrade doktorata već i magistarskog i diplomskog rada, zajedno sa Jelenom Brkljačić, zahvaljujem na usmeravanju, pomoći, iskusnim savetima i sugestijama.

Jadranci Dundeški se zahvaljujem što je prihvatila da bude u komisiji za ocenu mog rada i na kritičkom čitanju teze.

Profesoru Tomasu Raušu se zahvaljujem jer mi je omogućio da boravim u Laboratoriji za molekularnu fiziologiju biljaka na institutu HIP u Hajdelbergu. Profesoru i svim članovima ove laboratorije se zahvaljujem na svemu što su me naučili.

Veliku zahvalnost dugujem Ani Bratić i Jeleni Samardžić sa kojima sam zajedno radila na problematici metalotioneina heljde, i bez kojih mnogi rezultati ne bi bili postignuti.

Zahvaljujem se svim članovima laboratorije 08 i Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo koji su mi pomagali proteklih godina.

Ovog rada ne bi bilo da nije bilo velike pomoći i podrške od strane mojih kolega i porodice.

Apstrakt

Iz biblioteke cDNK semena heljde u srednjoj fazi sazrevanja prethodno su izolovana dva klona cDNK koja kodiraju metalotioneinu-sličan protein. Izolovan je i odgovarajući genomski klon koji obuhvata deo kodirajućeg regiona kao i 71 bp 5'UTR i 569 bp promotorskog regiona.

U ovom radu, izolovani promotorski region gena *FeMT3*, kao i dve njegove 5' delecione varijante, funkcionalno su analizirani u stabilno transformisanom duvanu. Histohepijskim esejem GUS je detektovana intenzivna aktivnost promotorskih fragmenata u vaskulatnim elementima lista i u polenu, a slabija aktivnost uočena je i u tkivu korena. Kvantitativnim esejem GUS je pokazano značajno povećanje aktivnosti sva tri promotorska fragmenta (proporcionalno njihovim dužinama) u odgovoru na uslove kompleksnog stresa, odnosno u listovima potopljenim u MS medijum sa saharozom. Jaka indukcija promotorske aktivnosti je uočena i pod dejstvom jona Cu^{2+} i Cd^{2+} . Navedeni rezultati sugerišu postojanje kompleksne transkripcione regulacije gena *FeMT3* i učešće većeg broja različitih faktora. Povećanje nivoa transkripta *FeMT3* u listu heljde pod uticajem jona Cu^{2+} i Cd^{2+} potvrđeno je metodom "Real-time RT-PCR".

U cilju približavanja ulozi koju *FeMT3* ima u biljnom tkivu, testirane su protektivne sposobnosti proteina kodiranog ovim genom u živim sistemima izloženim dejstvu teških metala. Odbrambene sposobnosti *FeMT3* su potvrđene u prokariotskom sistemu *E. coli* i u tranzijentno transformisanim listovima duvana *N. debneyii*. Izlaganje visokim koncentracijama CdCl_2 ili CuSO_4 , izazivalo je značajno sporiji razvoj oštećenja u tkivu koje je ekspimiralo *FeMT3* u poređenju sa kontrolom.

Unutarćelijska lokalizacija *FeMT3* je praćena u fuziji sa fluorescentnim proteinom (YFP) u transformisanim ćelijama duvana. Proteinska fuzija YFP-*FeMT3* je uočena u citoplazmi, a odsustvovala je u vakuoli i hloroplastima. Lokalizacija se nije promenila ni nakon tretmana teškim metalima, što sugeriše drugačiji mehanizam odbrambenog delovanja metalotioneina u odnosu na fitohelatine.

Svojstva promotora *FeMT3* i proteina kodiranog ovim genom koja su pokazana u ovom radu, ukazuju na potencijal gena *FeMT3* za primenu u fitoremedijaciji.

UVOD.....	1
1.1 Metali u biljkama.....	1
1.1.1 Mehanizmi usvajanja i akumulacije jona metala.....	2
1.1.2 Poremećaj u redoks homeostazi i oksidativni stres izazvani teškim metalima	4
1.1.3 Promene u signalnim putevima u biljkama izloženim teškim metalima	8
1.1.4 Metalom indukovana ekspresija biljnih gena	8
1.2 Metalotioneini.....	9
1.2.1 Struktura i biohemijska svojstva.....	9
1.2.2 Regulacija ekspresije	11
1.2.3 Subćelijska lokalizacija	11
1.3 Metalotioneini biljaka.....	12
1.3.1 Klasifikacija.....	12
1.3.2 Promotori gena za metalotioneine biljaka	13
1.3.2.1 Tkivna distribucija aktivnosti promotora gena za biljne metalotioneine	14
1.3.2.2 Inducibilna aktivnost promotora gena za biljne metalotioneine.....	15
a) Joni metala.....	15
b) Ostali sredinski stimulusi.....	17
c) Biljni hormoni.....	17
1.3.3 Ekspresija biljnih MT	19
1.3.4 Proteini kodirani genima za biljne metalotioneine - struktura i biohemijska svojstva.....	21
1.3.5 Transgene biljke sa izmenjenim nivoom ekspresije metalotioneina – put ka razjašnjanju funkcije MT gena.....	25
1.3.5.1 Detoksifikacija od teških metala i uloga u homeostazi esencijalnih metala	26
1.3.5.2 Uloga biljnih MT u odbrani od biotičkih i abiotičkih stresova	29
1.4 Metalotionein heljde	31
CILJ RADA.....	33
MATERIJAL I METODE.....	34
3.1 Rad sa bakterijama.....	34
3.1.1 Medijumi	34

Za uzgajanje bakterija korišćen je medijum LB, a SOC za oporavak bakterija nakon transformacije elektroporacijom.	34
3.1.2 Bakterijski sojevi	35
3.1.3 Uzgajanje i održavanje bakterija	35
3.1.4 Priprema kompetentnih ćelija <i>E. coli</i> za "Heat shock" transformaciju ..	35
3.1.5 "Heat shock" transformacija bakterija <i>E. coli</i>	36
3.1.6 Priprema kompetentnih ćelija <i>Agrobacterium tumefaciens</i> za elektroporaciju	36
3.1.7 Elektroporacija ćelija <i>Agrobacterium</i> -a.....	37
3.2 Osnovne procedure rada sa DNK	37
3.2.1 Izolovanje plazmida iz bakterija.....	37
3.2.2 Izolovanje plazmida direktno iz bakterijskih kolonija	37
3.2.3 Izolovanje plazmida iz tečne kulture u analitičke svrhe	38
3.2.4 Izolacija plazmida u preparativne svrhe	38
3.2.5 Elektroforeza DNK na gelu od agaroze.....	39
3.2.6 Prečišćavanje fragmenata DNK sa gela od agaroze	39
3.2.7 Taloženje DNK etanolom.....	40
3.2.8 Sekvenciranje DNK.....	40
3.2.9 Kompjuterska analiza sekvenci	40
3.3 Kloniranje korišćenjem Gateway tehnologije	40
3.3.1 BP reakcije i dobijanje "Entry" vektora.....	42
3.3.2 LR reakcije i dobijanje "Expression" vektora.....	43
3.3.3 PCR reakcije za uvođenje attB mesta na krajeve fragmenata od interesa..	47
3.4 Osnovne procedure rada sa RNK	50
3.4.1 Izolovanje ukupne RNK	50
3.4.2 Elektroforeza RNK na denaturišućem gelu od agaroze.....	51
3.4.3 Uklanjanje DNK iz uzoraka RNK	51
3.4.4 Sinteza cDNK	51
3.5 "Reverse Transcriptase" PCR	52
3.5.1 RT-PCR i provera kvaliteta cDNK.....	52
3.5.2 Real-time PCR.....	53
3.6 Osnovne procedure rada sa proteinima	54
3.6.1 Određivanje koncentracije proteina.....	54

3.6.2	Ekspresija rekombinantnog proteina	54
3.6.3	SDS-PAGE	55
3.6.4	„ Western blot“ analiza.....	56
3.6.5	Test tolerancije <i>E.coli</i> sa eksprimiranim rekombinantnim proteinima na CdCl ₂	57
3.7	Biljni materijal i tretmani	58
3.7.1	Biljni materijal.....	58
3.7.2	Tretmani biljaka.....	58
3.7.3	Tranzijentna ekspresija <i>FeMT3</i> u listovima <i>Nicotiana debneyii</i>	59
3.8	Ostale metode	59
3.8.1	Kvalitativni GUS esej.....	59
3.8.2	Kvantitativni (fluorescentni) GUS esej	60
3.8.3	Određivanje nivoa lipidne peroksidacije	61
3.8.4	Određivanje nivoa ukupnog hlorofila.....	61
3.8.5	Konfokalna mikroskopija	61
3.8.6	Statistička obrada podataka	62
REZULTATI		63
4.1	Funkcionalna analiza aktivnosti promotora gena <i>FeMT3</i> u transgenom duvanu	63
4.1.1	Tkivna distribucija aktivnosti promotora gena <i>FeMT3</i>	63
4.1.2	Funkcionalna analiza aktivnosti promotora <i>FeMT3</i> u odgovoru na kompleksni stres	66
4.1.3	Funkcionalna analiza aktivnosti promotora <i>FeMT3</i> u odgovoru na jone metala	67
4.2	Analiza ekspresije <i>FeMT3</i> pod uticajem povišenih koncentracija jona metala..	69
4.2.1	Optimizacija uslova Real-time PCR.....	69
4.2.2	Analiza ekspresije <i>FeMT3</i> pod uticajem povišenih koncentracija jona Cd ²⁺ i Cu ²⁺ metodom Real-time RT-PCR	71
4.3	Ekspresija rekombinantnog <i>FeMT3</i> u <i>E.coli</i>	72
4.3.1	Test tolerancije <i>E.coli</i> sa eksprimiranim rekombinantnim proteinima na stres izazvan CdCl ₂	74
4.4	Uticaj pojačane ekspresije <i>FeMT3</i> na toleranciju biljaka duvana na stres izazvan teškim metalima	75

4.5	Unutarćelijska lokalizacija <i>FeMT3</i> u fuziji sa fluorescentnim proteinom	80
<i>DISKUSIJA</i>		83
5.1	Regulacija ekspresije gena <i>FeMT3</i>	83
5.1.1.	Tkivna distribucija aktivnosti promotora gena <i>FeMT3</i>	84
5.1.2	Regulacija aktivnosti promotora u uslovima kompleksnog stresa	85
5.1.3	Regulacija aktivnosti promotora jona metala.....	87
5.2	Ekspresija gena <i>FeMT3</i> pod uticajem jona metala.....	89
5.3	Odbrambena svojstva proteina kodiranog genom <i>FeMT3</i> u živim sistemima	91
5.3.1	Uticaj <i>FeMT3</i> na toleranciju prokariotskih ćelija na stres izazvan teškim metalima	91
5.3.2	Uticaj <i>FeMT3</i> na toleranciju biljnih tkiva na stres izazvan teškim metalima i njegova unutarćelijska lokalizacija.....	92
5.4	Promotorski region i protein kodiran genom <i>FeMT3</i> kao kandidati za primenu u biotehnologiji.....	97
<i>ZAKLJUČCI</i>		99
<i>LITERATURA</i>		101

UVOD

1.1 Metali u biljkama

Biljke se kao i ostali živi organizmi susreću sa velikim fluktuacijama u uslovima koji vladaju u životnoj sredini. Zbog svog sesilnog načina života one su morale razviti moćne adaptivne mehanizme koji su im omogućili opstanak u najrazličitijim klimatskim uslovima i na zemljištima najrazličitijeg sastava. Koncentracija i dostupnost jona metala, koje takođe veoma variraju, izuzetno su bitni za rast i razvoj biljaka. Esencijalni metali kao što su cink, bakar i gvožđe ulaze u sastav mnogih enzima i omogućavaju njihovo pravilno funkcionisanje. Mnogi transkripcioni faktori za svoju aktivnost zahtevaju prisustvo jona Zn^{2+} , što znači da ovi joni utiču i na ekspresiju gena. U slučaju smanjene dostupnosti mikroelemenata biljke su razvile mehanizme za njihovo efikasnije usvajanje. Sa druge strane, usled antropogenih uticaja, sve veće površine zemljišta su zagađene teškim metalima. Biljne vrste koje rastu na takvim zemljištima su razvile značajne adaptacije. Ipak, kontaminacija zemljišta metalnim polutantima predstavlja jedan od najvećih problema sa kojima se susreće industrijalizovani svet, jer dovodi do velikih gubitaka u prinosu poljoprivredno značajnih kultura. Ne treba zanemariti ni ulazak teških metala u lanac ishrane, što se nepovoljno odražava ne samo na biljni i životinjski svet već i na zdravlje ljudi. Jedan od najefikasnijih načina za uklanjanje teških metala iz zemljišta je fitoremedijacija, odnosno korišćenje biljaka hiperakumulatora teških metala. Biljke koje su prirodni hiperakumulatori imaju niz adaptivnih svojstava koja su im omogućila veću toleranciju kao i veću sposobnost akumulacije metala u tkivima, ali imaju malu biomasu što ih čini nedovoljno pogodnim za svrhe fitoremedijacije. Proučavanje molekularnih mehanizama usvajanja, transporta, akumulacije i tolerancije metala omogućiće primenu genetičkog inženjeringa u cilju stvaranja biljaka sa velikom biomasom i hiperakumulatorskim svojstvima.

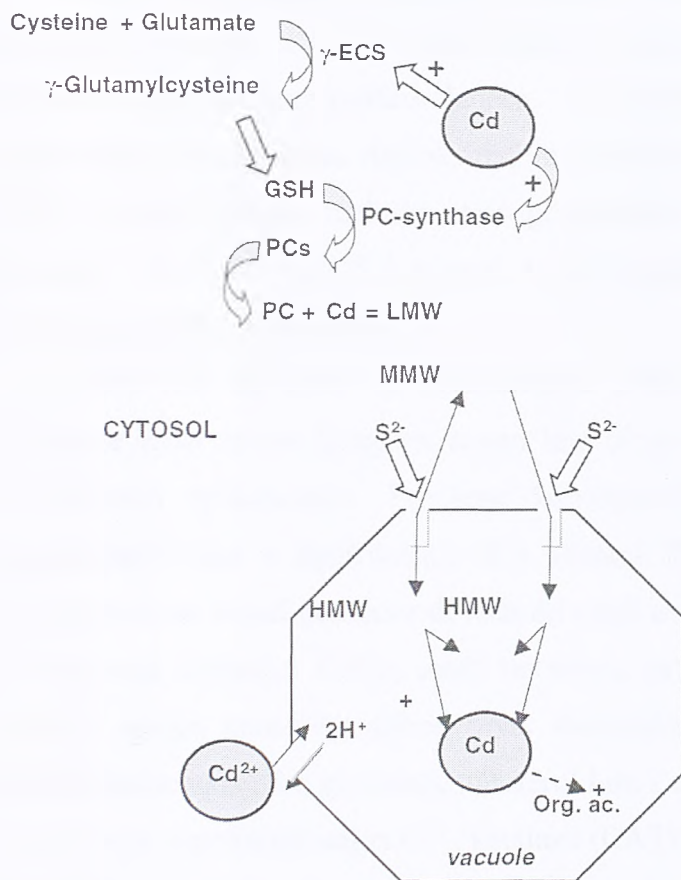
1.1.1 Mehanizmi usvajanja i akumulacije jona metala

Joni metala dospevaju u biljku putem korena, odnosno korenskih dlačica koje su specijalizovane za usvajanje vode i nutrijenata iz zemljišta. Dostupnost metala za biljku ne zavisi samo od njihove koncentracije već i od sastava zemljišta i njegove kiselosti. Kisela zemljišta olakšavaju ulazak metala u koren, tako da njihova kontaminacija teškim metalima predstavlja još veći problem. Sa druge strane biljke koje žive na zemljištima sa niskim sadržajem metala povećavaju njihovu dostupnost otpuštanjem organskih kiselina koje zakišeljavaju zemljište. Ove kiseline, kao i neke druge supstance mogu služiti i kao helatori metala i tako povećati njihovu solubilnost. Biljke zagađenih zemljišta koriste drugačije taktike, odnosno ispuštaju jedinjenja koja formiraju komplekse sa metalima koji se ne mogu uneti u biljku (Eapen & D'Souza, 2005). Na efikasnost usvajanja mikronutrijenata iz zemljišta značajno utiču i mikorize, simbioze gljiva sa korenom biljke.

Metali prvo dospevaju u apoplast korena. Jedan deo unetih metala ulazi u simplast korena, a jedan deo ostaje vezan za ćelijske zidove. Metali se iz simplasta prenose u apoplast ksilema radom metal-transportera (Marschner, 1995). Organske kiseline kao npr. citrat ili aminokiselina histidin u ksilemu vezuju jone i omogućavaju njihov transport u nadzemne organe (Kramer, 1996; Salt et al., 1999). U izdancima metali prelaze u simplast zahvaljujući metal-transporterima u membranama ćelija lista. U ćelijama metali moraju biti smešteni u ćelijske kompartmane u kojima neće narušavati životne procese. Nekada se višak usvojenih metala skladišti u specijalizovanim ćelijama lista, trihomama. Vakuole predstavljaju najvažnije ćelijske kompartmane u kojima se odlaze višak jona, koji po potrebi može biti ponovo vraćen u citosol i ostale delove ćelije. Joni mogu biti transportovani u vakuole pomoću specijalnih transportera, odnosno katjon-proton antiportera na tonoplastu, nakon čega ostaju u vakuoli u kompleksu sa organskim kiselinama.

Važnu ulogu u uklanjanju povišenih koncentracija metala, posebno kadmijuma, igraju fitohelatini, polipeptidi sastavljeni od glutamatskih, cisteinskih i glicinskih ostataka ((γ -GluCys) $_n$ -Gly). Njihovu sintezu katalizuje enzim fitohelatin sintaza, korišćenjem glutationa kao prekursora. Nakon izlaganja kadmijumu, primećeno je povećanje sinteze fitohelatina koji ulaze u kompleks niske molekulske mase ("low molecular weight – LMW") sa jonima Cd^{2+} (Vogeli-Lange & Wagner, 1990). U nivou

tonoplasta ovim kompleksima se pridružuju joni S^{2-} formirajući tako komplekse visokih molekularskih težina ("high molecular weight – HMW") koji imaju veći afinitet za vezivanje jona Cd^{2+} . U vakuoli HMW kompleksi disociraju a otpušteni joni se vezuju za organske kiseline (Sl. 1.1).

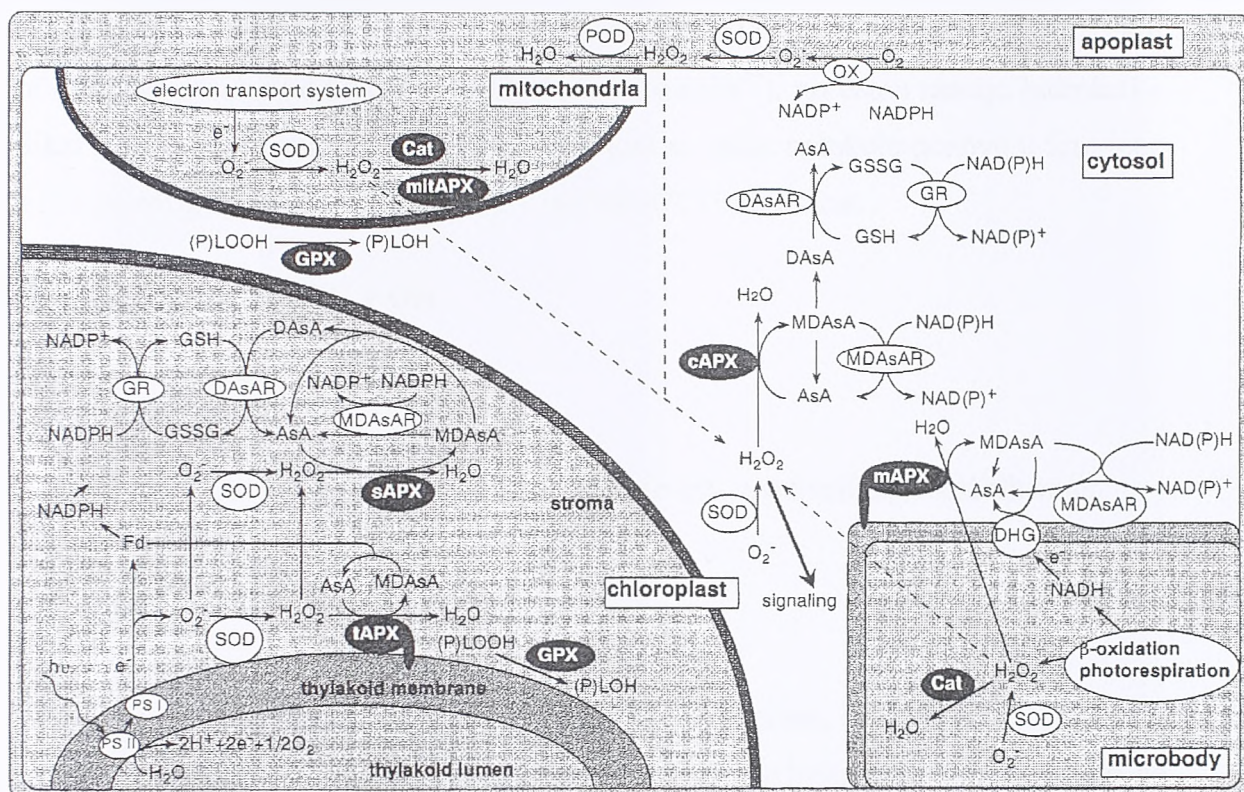


Slika 1.1 Mehanizam detoksifikacije i skladištenja kadmijuma i uloga fitohelatina. γ -ECS - γ -glutamilcistein sintetaza; GSH – glutation; LMW - "low molecular weight" kompleks; MMW -"medium molecular weight" kompleks; HMW - "high molecular weight" kompleks; Org.ac. – organske kiseline; PC – fitohelatin. Preuzeto iz (Gratao et al., 2005).

1.1.2 Poremećaj u redoks homeostazi i oksidativni stres izazvani teškim metalima

Reaktivne kiseonične vrste (ROS) nastaju u manjim količinama i tokom normalnih fizioloških procesa u ćeliji. One nastaju u mitohondrijama i hloroplastima usled aktivnosti elektron transportnih lanaca, i u peroksizomima kao posledica njihovog oksidativnog metabolizma. Antioksidativni sistem ćelije drži koncentraciju tako nastalih ROS na niskom nivou, međutim stresogeni faktori mogu narušiti ekvilibrijum između stvaranja i eliminacije ROS i dovesti do karbonilacije proteina, peroksidacije lipida i oštećenja na DNK molekulima.

Treba reći da ROS ne predstavljaju uvek neželjenu posledicu. Tranzijentno povećanje ROS nakon izlaganja stresu ima ulogu u transdukciji signala i pokretanje odbrambenih mehanizama. Povišene koncentracije ROS učestvuju i u razviću i diferencijaciji (npr. u lignifikaciji) ili u odbrani. Tako, oksidativni prasak koji nastaje kao odgovor na napad patogena dovodi do smrti zaraženih ćelija i lokalizacije, odnosno zaustavljanja infekcije. Ćelije, znači ne smeju potpuno da eliminišu ROS, ali je vrlo bitno da strogo konrolišu njihov nivo. Antioksidativni sistem obuhvata neenzimske antioksidanse: askorbat, glutation, tokoferol i dr. i enzime: superoksid dismutazu (SOD) koja uklanja superoksid anjon O_2^- , katalazu (CAT) i peroksidaze koje uklanjaju H_2O_2 i perokside. Postojanje glutation – askorbatnog ciklusa je veoma bitno, a omogućeno je enzimima APX (askorbat peroksidaza), MDAsAR (monodehidroaskorbat reduktaza), DAsAR (dehidroaskorbat reduktaza) i GR (glutation reduktaza). Na Slici 1.2, dat je shematski prikaz delovanja antioksidativnog sistema (Shigeoka et al., 2002).



Slika 1.2 Antioksidativnog sistem kod viših biljaka. Preuzeto iz Shigeoka et al., 2002.

PS I i PS II – fotosistemi I i II; GSH – glutation; GSSG – glutation disulfid; AsA askorbat; MDAsA – monodehidroaskorbat; DAsA - dehidroaskorbat; Cat – katalaza; APX - askorbat peroksidaza (tAPX – tilakoidna, sAPX – stromalna, mitAPX – mitohondrijalna, cAPX – citosolna; mAPX – membranski vezana forma APX) , MDAsAR - monodehidroaskorbat reduktaza; DAsAR - dehidroaskorbat reduktaza; GR - glutation reduktaza; GPX – glutation peroksidaza; POD – peroksidaza; OX – NADPH oksidaza; (P)LOOH – lipidni hidroperoksidi

Kao što je rečeno, biljke su razvile niz strategija kako bi omogućile usvajanje optimalnih koncentracija jona metala, kao i skladištenje viška usvojenih jona. Kada je koncentracija jona toliko visoka da prevazilazi adaptivni potencijal biljaka, dolazi do oštećenja ćelijskih komponenti. Prelazni metali kao što su Fe, Cu, Co, Cr i V su redoks – aktivni i dovode do stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), što ima za posledicu oksidativni stres u ćelijama. Reakcijom sa molekularnim kiseonikom dovode do stvaranja superoksid anjon radikala:



Vodonik-peroksid, nastao iz superoksid anjon radikala, u Fentonovoj reakciji reaguje sa jonima prelaznih metala (najčešće Fe²⁺ i Cu⁺) dajući hidroksil radikal. Fero joni (Fe²⁺) se oksiduju u prisustvu H₂O₂ do feri jona (Fe³⁺), pri čemu nastaju hidroksil – radikal (OH·) i hidroksil – anjon (OH⁻). Feri joni se zatim redukuju ponovo u fero jone a od H₂O₂ ovoga puta nastaju peroksid – radikal (OOH·) i proton:



Na sličan način Cu⁺ učestvuje u stvaranju ·OH i drugih reaktivnih kiseoničnih vrsta.

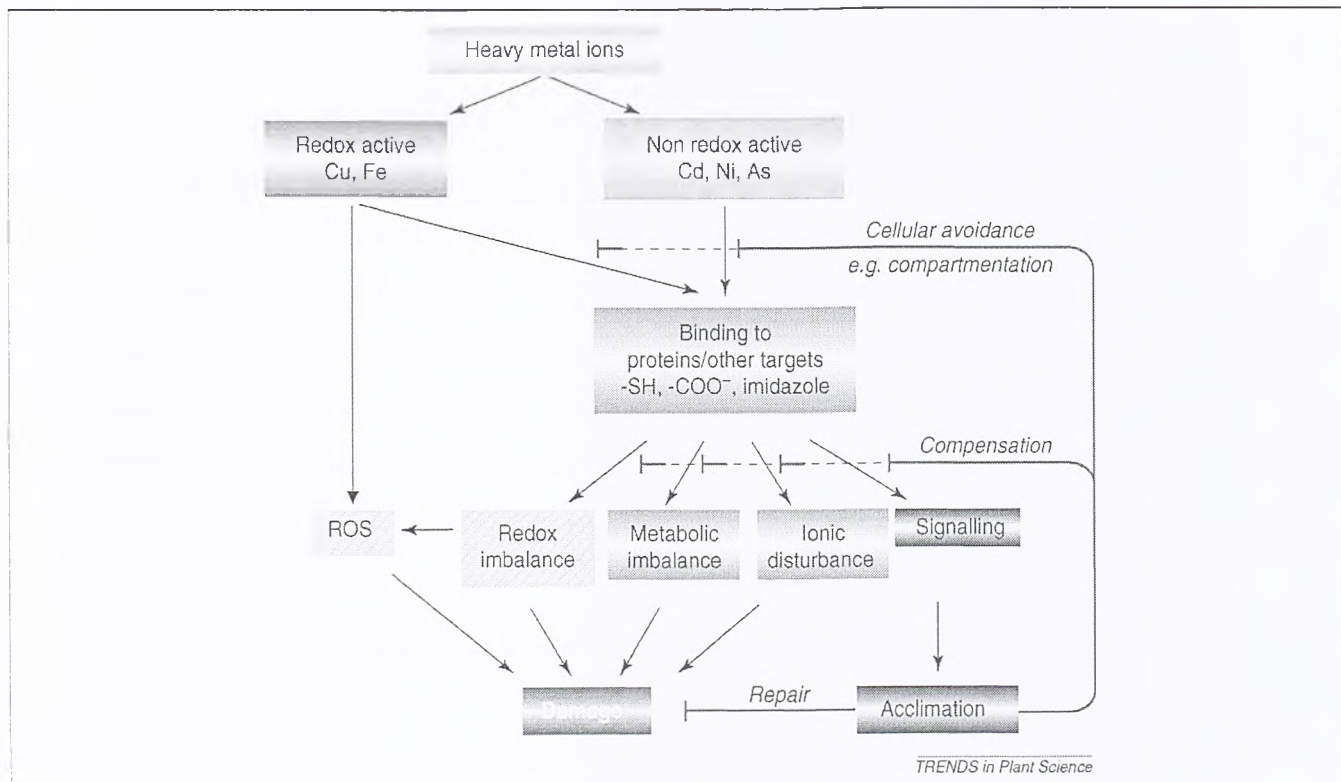


Ovde, dakle, joni metala služe kao katalizator procesa, a od vodonik peroksida nastaju slobodni radikali. Naročito je opasno stvaranje hidroksilnog radikala pošto ne postoji enzimski mehanizam za njegovo uklanjanje.

Metali koji nisu redoks-aktivni, kao što je kadmijum, mogu narušiti strukturu i funkciju proteina. Oni mogu direktno interagovati sa tiolnim, histidilnim ili karboksilnim grupama ili istisnuti esencijalne jone iz specifičnih mesta u proteinu, npr. iz katalitičkog centra enzima. Tako npr. Cd²⁺ izbacuje Ca²⁺ iz reaktivnog centra fotosistema II inhibirajući njegovu fotoaktivaciju. Iako ovi joni nisu redoks-aktivni, oni takođe dovode do oksidativnog stresa, odnosno lipidne peroksidacije i akumulacije vodonik peroksida (Schutzendubel & Polle, 2002).

Prisustvo jona Cd²⁺ u ćeliji intenzivira produkciju fitohelatina (PC) koji ih heliraju i skladište u vakuoli. Kako se PC sintetiše od glutaciona, ovo ima za posledicu veliki pad u sadržaju GSH u ćeliji. Glutacion predstavlja veoma važan deo antioksidativnog sistema (Sl. 1.2) i njegov nedostatak se vrlo brzo odražava na redoks homeostazu. Istovremeno Cd²⁺ inhibira glutation reduktazu, peroksidaze i katalazu. Antioksidativni sistem ćelije postaje nesposoban da kontroliše nivo ROS i dolazi do oksidativnog stresa. Postoje i podaci koji ukazuju da Cd²⁺ indukuje akumulaciju H₂O₂ i stvaranje oksidativnog praska sličnog onom koji se dešava nakon napada patogena. H₂O₂ bi u tom slučaju dalje delovao kao signalni molekul i pokrenuo očvršćavanje i lignifikaciju ćelijskih zidova, rezultujući konačno u smrti ćelija korena. Zaista, jedno od najuočljivijih dejstava Cd je usporavanje rasta korenova. Ova adaptivna reakcija

smanjuje kapacitet korena za usvajanje minerala iz zemljišta, pa se smanjuje i usvajanje štetnog kadmijuma. Naravno, to se negativno odražava na usvajanje nutrijenata, što ima za posledicu usporen rast cele biljke, manju biomasu i prinos (Schutzendubel & Polle, 2002).



Slika 1.3. Nastanak oksidativnog stresa u biljkama nakon izlaganja teškim metalima kod senzitivnih biljaka i mehanizmi odbrane i aklimatizacije kod tolerantnijih vrsta. Preuzeto iz (Sharma & Dietz, 2009).

Izlaganje teškim metalima može, u zavisnosti od biljne vrste i tkiva kao i koncentracije i dužine delovanja stresa, dovesti do različitih promena u aktivnosti antioksidativnog sistema, od stimulacije do supresije. U tolerantnim vrstama i varijetetima postoji konstitutivno visok nivo antioksidativnih enzima, za razliku od senzitivnih vrsta kod kojih se, nakon izlaganja teškim metalima, razvija mnogo snažniji oksidativni stres (Sharma & Dietz, 2009). Važno je napomenuti da superoksidni anjon i hidroksilni radikal koji nastaju u prisustvu redoks – aktivnih metala mogu dovesti i do inhibicije nekih antioksidativnih enzima. O_2^- inhibira katalazu, a $\cdot OH$ superoksid dismutazu (Casano et al., 1997; Kono & Fridovich, 1982). Zato je osim antioksidativnog sistema bitno i delovanje metal-helirajućih proteina kao što su

fitohelatini i metalotioneini koji su značajni učesnici u zaštiti ćelije od stresa izazvanog metalima.

1.1.3 Promene u signalnim putevima u biljakama izloženim teškim metalima

Teški metali interferiraju sa ćelijskim signalnim putevima u koje su uključene MAPK (mitogenom aktivirane protein kinaze), što se značajno odražava na mnoge ćelijske procese, ali dovodi i do aktiviranja gena uključenih u odbranu. U transdukciji signala nakon izlaganja jonima Cd^{2+} učestvuje i NADPH oksidaza koja produkuje superoksid anjon kao i lipoksigenaze koje vrše lipidnu peroksidaciju. Lipidni peroksidi su prekursori u sintezi jasmonske kiseline i drugih signalnih molekula. Primećen je porast i hormona etilena i salicilne kiseline (Sharma & Dietz, 2009).

1.1.4 Metalom indukovana ekspresija biljnih gena

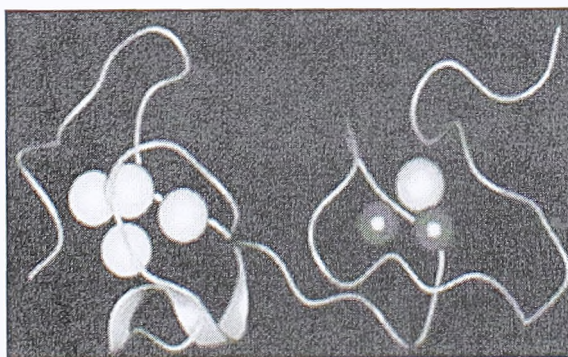
Metalom indukovana ekspresija biljnih gena slabo je proučena. Opisano je svega nekoliko cis regulatornih elemenata: element prisutan u promotorima gena duvana *parA* i soje GH2/4 sličan *as1* elementu virusnih promotora (Kusaba et al., 1996; Ellis et al., 1993), CuRE (copper response element) identifikovan u promotorima gena *CPXI* i *CYC6* zelene alge *Chlamydomonas reinhardtii*, za koji se vezuje CRR1 transkripcioni regulator i dovodi do smanjenja ekspresije ovih gena u odgovoru na jone bakra (Quinn & Merchant, 1995; Quinn et al., 2000) i HMRE ("heavy metal-responsive element") koji je neophodan za snažnu indukciju metalima promotora *PvSR2* gena pasulja (Qi et al., 2007). Sekvence nalik na MRE ("metal-responsive element") koji su najbolje proučeni cis elementi koji učestvuju u indukciji ekspresije sisarskih gena metalima, nađene su u nekoliko biljnih gena ali je funkcionalnost ovog elementa potvrđena samo u promotoru gena *PvSR2* (Qi et al., 2007).

1.2 Metalotioneini

Metalotioneini (MT) su proteini male molekulske težine, sa visokim sadržajem cisteina što omogućava ovim proteinima visoko afinitetno ali i reverzibilno vezivanje jona metala. MT spadaju u najznačajnije helatore metalnih jona u ćelijama i široko su rasprostranjeni od nekih prokariotskih i jednoćelijskih eukariotskih organizama do biljaka i viših kičmenjaka. Obavljaju važne funkcije u detoksifikaciji od teških metala i održavanju homeostaze jona esencijalnih metala, a sve je veći broj studija o njihovom učešću u odbrani organizma od različitih abiotičkih i biotičkih stresova, održavanju redoks homeostaze i regulaciji životnih procesa. Većina podataka o strukturi i biohemijским svojstvima MT je dobijena proučavanjem sisarskih MT, dok je na tom polju za biljne MT nešto učinjeno tek poslednjih par godina.

1.2.1 Struktura i biohemijška svojstva

Prvi metalotionein je izolovan iz bubrega konja 1957. (Margoshes & Vallee, 1957). Karakteristike ovog kao i ostalih, naknadno okarakterisanih životinjskih MT, jesu mala molekulska težina, visok sadržaj i jedinstven raspored cisteina unutar proteina, visok sadržaj vezanih jona metala i odsustvo aromatičnih aminokiselina i histidina.

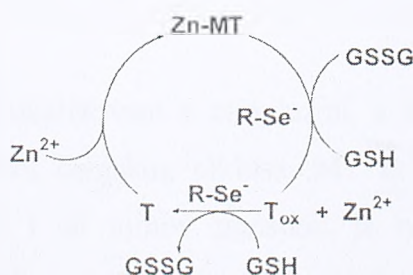


Slika 1.4. Model strukture metalotioneina sisara dobijen na osnovu kristalografske analize. Žutom bojom su prikazani joni Zn^{2+} a crvenom joni Cd^{2+} vezani za Cys – bogate domene.

Cisteini sisarskih MT organizovani su u dva domena razdvojena kratkim „spacer“ ("linker") regionim (Sl. 1.4). Cisteinski domeni vezuju jone metala među kojima Cu^+ , Cd^{2+} i Zn^{2+} sa najvećim afinitetom. N-terminalni ili β domen je reaktivniji i sadrži devet ostataka Cys koji koordinantno vezuju tri dvovalentna jona metala (Maret et al., 1997; Ngu & Stillman, 2009). C-terminalni α domen sadrži jedanaest Cys koji vezuju četiri dvovalentna jona (Nielson & Winge, 1985; Stillman et al., 1987; Schultze et al., 1988; Zangger et al., 1999). Budući da je stabilniji, α domen verovatno služi za vezivanje slobodnih jona teških metala, dok se reaktivnijem β domenu pripisuje uloga u vezivanju i razmeni jona esencijalnih metala sa drugim metaloproteinima.

Osim jona metala potvrđeno je i vezivanje za GSH (glutation) (Brouwer et al., 1993), fosfatni jon (Robbins et al., 1991) i sulfidni jon (Capdevila et al., 2005). Uočeno je takođe i formiranje oksidativnih dimera stvaranjem intermolekulske disulfidne veze kao i neoksidativnih dimera premošćenih jonima metala.

Struktura metalotioneina i mali redoks potencijal omogućavaju njihovu oksidaciju blagim oksidantima (u koje spada i GSSG - glutation disulfid). Oksidacija MT dovodi do stvaranja intra i intermolekulske disulfidne veze i otpuštanja metalnih jona. Oksidovana forma koja se naziva tionin (T) redukuje se u prisustvu GSH do tioneina koji zatim ponovo vezuje metalne jone. Ovaj oksidoredukcioni ciklus između MT/T i GSSG/GSH parova (prikazan na Slici 1.5.), od velikog je značaja za ćeliju. On utiče na redoks homeostazu, a prelazak jona metala sa MT na apoenzime ili transkripcione faktore, ili obrnuto, dovodi do njihove aktivacije ili inhibicije, što može imati veliki uticaj na opšti status i funkcionisanje ćelije.



Slika 1.5. Oksido-redukcioni ciklus između MT/T i GSSG/GSH parova

Oksidacija MT do stupnja disulfida dešava se i u prisustvu superoksidnog anjona i hidroksilnog radikala (Thornalley & Vasák, 1985), a vodonik peroksid oksiduje MT do

stupnjeva viših od disulfida (Quesada et al., 1996). Na ovaj način dolazi do redukcije opasnih reaktivnih jedinjenja kiseonika (ROS), čime se sprečava degradacija važnih ćelijskih komponenti u uslovima oksidativnog stresa.

1.2.2 Regulacija ekspresije

Iako metalotioneini sisara predstavljaju najbolje okarakterisane gene regulisane jonima metala, tačan mehanizam regulacije njihove ekspresije nije još uvek u potpunosti razjašnjen. Ekspresija sisarskih MT raste nakon izlaganja metalima, faktorima rasta, citokinima, hormonima, ROS i različitim biotičkim i abiotičkim stresovima.

MRE ("metal responsive element") koji je prisutan u više kopija u svim promotorima gena za metalotioneine sisara, u interakciji sa transkripcionim faktorom MTF1 ostvaruje njihovu bazalnu i metalima indukovanu ekspresiju. MRE obuhvataju visoko – konzervirani heptanukleotidni kor: 5`-TGCRCNC-3`; R – je A ili G, a N može biti bilo koji nukleotid. MTF1 je transkripcioni faktor koji sadrži 6 Zn prstića. Nakon indukcije metalima ili drugim stimulusima MTF1 se translocira u nukleus, vezuje se za DNK i pokreće ekspresiju gena (Haq et al., 2003).

1.2.3 Subćelijska lokalizacija

Metalotioneini sisara su lokalizovani u citoplazmi, a transportuju se u nukleus tokom prelaska iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa. MT ne poseduju klasičan NLS ("nucleus localization signal") i za njihov transport je neophodna Ran GTP-aza (Nagano et al., 2000). Za ovu translokaciju MT proteina bitna je perinuklearna lokalizacija njihove mRNK koja je zavisna od signala u 3' UTR. Pretpostavlja se da MT u jedru štiti DNK od oštećenja i da učestvuje u dopremanju Zn²⁺ enzimima i transkripcionim faktorima (Levadoux et al., 1999; Levadoux-Martin et al., 2001). Primećeno je i prisustvo MT u intermembranskom prostoru mitohondrija jetre, gde je



važna njegova uloga u puferovanju jona Zn^{2+} koji imaju inhibitorno dejstvo na respiraciju (Ye et al., 2001).

1.3 Metalotioneini biljaka

Iako otkriće metalotioneina datira još od pedesetih godina prošlog veka, prvi biljni metalotionein izolovan je tek četvrt veka kasnije. I danas istraživanja na biljnim MT kaskaju daleko iza saznanja dostupnih za sisarske gene, naročito u oblasti poznavanja strukture i biohemijskih svojstava. Kako je do sada izolovano svega nekoliko proteina kodiranih ovim genima iz biljnih tkiva, aminokiselinske sekvence ostalih biljnih MT izvedene su na osnovu mRNK, tj. cDNK sekvenci. Zato se za biljne MT često koristi naziv "metallothionein-like" odnosno metalotioneinu-slični proteini. Sa druge strane sve je veći broj izolovanih genomskih i cDNK sekvenci iz biljnih tkiva, homolognih genima za metalotioneine. Osim značajnih sličnosti sa sisarskim, biljni MT pokazuju i neke samo njima svojstvene osobine. Poslednjih nekoliko godina raste interes za njihovo izučavanje i učinjeni su značajni pomaci u otkrivanju njihovih strukturnih svojstava i mogućih funkcija. Ipak, slika o biljnim metalotioneinima još uvek je daleko od kompletne.

1.3.1 Klasifikacija

Prva klasifikacija gena za metalotioneine je bila zasnovana na primarnoj strukturi njima kodiranih proteina, odnosno rasporedu cisteinskih ostataka i obuhvatala je tri klase. Klasu I su činili MT sisara i svi MT slične strukture i rasporeda cisteina. Klasu II su činili MT koji se po rasporedu cisteina razlikuju od sisarskih MT. Tu su spadali MT biljaka, gljiva i beskičmenjaka. Po ovoj klasifikaciji III klasu su činili fitohelatini koji se zapravo ne mogu svrstati u metalotioneine zbog svoje potpuno različite strukture i načina sinteze. Ovi polipeptidi se zapravo sintetišu enzimskim putem od glutaciona.

Nov klasifikacioni sistem je izvršio podelu svih metalotioneina na osnovu evoluciono – taksonomskih podataka. Po ovom sistemu postoji 15 familija, a biljni MT su svrstani u petnaestu familiju (Kojima et al., 1999).

Metalotioneini biljaka dalje su podeljeni na osnovu konzerviranih cisteinskih motiva u četiri tipa. MT tipa 1, 2 i 3 odlikuju se prisustvom dva cisteinom bogata domena razdvojena „linker“ regionom dužine oko 40 aminokiselina u kome su prisutne i aromatične aminokiseline. Ova tri tipa međusobno se razlikuju po strukturi cisteinskih motiva kao i po paternu ekspresije.

MT tipa 1 sadrže šest C-X-C motiva raspoređenih u dva domena (gde C predstavlja cistein, a X bilo koju drugu aminokiselinu). Karakteriše ih visoka ekspresija u korenu.

MT tipa 2 odlikuju C-C, C-X-C motivi i konzervisana sekvenca MSCCGNCGCG na N-terminusu. Pretežno su eksprimirani u listu.

MT tipa 3 sadrže visoko konzervisane sekvence CGNCDC i QCVKKG na N-terminusu i tri C-X-C motiva u C-terminalnom regionu. Karakteriše ih najviši nivo ekspresije u plodovima u sazrevanju, a detektovani su i u semenu tokom razvića, kod biljaka koje nemaju mesnate plodove.

MT tipa 4 se odlikuju prisustvom tri domena bogata cisteinom, razdvojena sa po deset do petnaest aminokiselina. Njihova ekspresija specifična je za seme.

1.3.2 *Promotori gena za metalotioneine biljaka*

Klonirani 5' regulatorni regioni biljnih MT gena su uglavnom analizirani poređenjem sa sekvencama drugih biljnih promotora ili sisarskih MT promotora. Mali broj promotora funkcionalno je analiziran u fuziji sa reporterskim genom GUS u homolognim ili heterolognim transgenim biljkama, a promotor MT3 gena heljde jedini je analiziran i EMSA i "DNase protection" esejima (Brkljačić, 2003).

Osnovne karakteristike biljnih MT promotora odgovaraju opštim karakteristikama biljnih i eukariotskih promotora. Fragmenti promotora koji obezbeđuju bazalnu aktivnost obuhvataju TATA blok koji se nalazi 25 - 30 bp uzvodno od starta transkripcije. Funkcionalnost ove sekvence, nije potvrđeno ni strukturnom ni funkcionalnom analizom; vršena su samo poređenja sa sekvencama nađenim u drugim

biljnim promotorima. Mesta starta transkripcije određena su "primer extension" analizom u svega nekoliko MT promotora (Brkljačić, 2003; Butt et al., 1998; Chatthai et al., 2004).

Kompjuterska predikcija ukazuje na obilje potencijalnih cis regulatornih elemenata u sekvencama biljnih promotora. Međutim, mali je broj studija u kojima su detaljnije analizirani regioni odgovorni za regulaciju ekspresije. Postoji samo jedna studija u kojoj je dokazana funkcionalnost cis regulatornog elementa mutacionom analizom (Tsuwamoto & Harada). Analiza promotora ostalih do sada ispitivanih biljnih MT gena, bila je svedena na delecione analize u kojima su identifikovani veći regioni promotora uključeni u regulaciju ekspresije. Ova istraživanja uglavnom su bila usmerena na određivanje tkivnog paternog promotorske aktivnosti, dok je na manjem broju promotora uočen uticaj različitih biotičkih ili abiotičkih faktora. Kako MT geni imaju veoma karakteristične paterne ekspresije i regulisani su kako razvojnim procesima tako i sredinskim faktorima, dalje analize sigurno će potvrditi prisustvo različitih cis regulatornih sekvenci.

1.3.2.1 Tkivna distribucija aktivnosti promotora gena za biljne metalotioneine

Opisano je nekoliko biljnih MT promotora čija se aktivnost razlikovala u različitim biljnim tkivima i ćelijama. Promotorski region *cgMT1* gena *Casuarina glauca* bio je sposoban da specifično vodi ekspresiju reporterskog gena u korenu i azotofiksatorskim kvržicama transgenih biljaka (Laplaze et al., 2002). Ovi rezultati ukazali su na moguću funkcionalnost potencijalnih odgovarajućih tkivno-specifičnih cis elemenata identifikovanih *in silico* u promotoru *cgMT1*, ali je potrebna potvrda njihove aktivnosti delecionim i mutacionim analizama. Aktivnost ovog promotora detektovana je i u određenim ćelijama u nadzemnim delovima biljke, naročito u stomama, trihomama i hidatodama (Obertello et al., 2007), kao i u vaskularnom tkivu i polenu (Ahmadi et al., 2003), mada nisu uočeni odgovarajući cis elementi.

Promotor gena *PsMT_A* iz graška, koji u svom distalnom delu sadrži potencijalni RSE (root specific element) najveću aktivnost pokazao je u korenu. Međutim delecija promotorskog regiona *PsMT_A* koji obuhvata ovaj element nije dovela do smanjenja nivoa ekspresije reporterskog gena u korenu transgenog *A. thaliana*. Uklanjanje regiona

koji sadrži tri kopije potencijalnog ERE ("etilen responsive element") dovela je do gubitka specifične GUS aktivnosti u korenu. Sa druge strane ERE elementi nisu omogućili regulaciju ovog promotora etilenom. RSE sekvenca nađena je i u 5' regulatornom regionu MTL gena kukuruza (de Framond, 1991) i MT3-B gena uljane palme (Abdullah et al., 2002) čiji su transkripti zastupljeni u korenu, ali funkcionalnost ovog elementa nije potvrđena ni u tim slučajevima.

Aktivnost promotora gena *ricMT* iz pirinča detektovana je u klijancima i različitim delovima cveta (Lu et al., 2007). Delecionom analizom utvrđeno je da je distalni region ovog promotora odgovoran za specifičnu kontrolu ekspresije u kotiledonima i hipokotilu, kao i da se u njemu nalaze elementi koji sprečavaju ekspresiju u korenu. Nizvodno od ovog regiona lociran je deo promotora koji obezbeđuje specifičnu aktivnost u određenim delovima reproduktivnih organa.

Histohemijskim esejom GUS uočene su podudarnosti, ali i razlike u paternima ekspresije promotora različitih gena za metalotioneine *Arabidopsis*-a. Tako su *MT1a* i *MT2b* bili aktivni u floemu svih biljnih organa, dok su *MT2a* i *MT3* uglavnom bili rasprostranjeni u mezofilnim ćelijama (Guo et al., 2003). U promotoru *MT2b* gena *Arabidopsis*-a, mutacionom analizom je pokazano prisustvo EEr (evening element-related) koji je bio neophodan za specifičnu ekspresiju u ćelijama pratilecama u floemu (Tsuwamoto & Harada).

1.3.2.2 *Inducibilna aktivnost promotora gena za biljne metalotioneine*

a) *Joni metala*

Geni za metalotioneine sisara su najintenzivnije proučavane transkripcione jedinice regulisane jonima metala. Poznato je da je njihova ekspresija regulisana sekvencama MRE ("metal reseponsive element") za koje se vezuje "Zn finger" transkripcioni factor MTF-1 koji detektuje pre svega jone Zn^{2+} . Ekspresija mnogih biljnih MT menja se pod uticajem jona metala, međutim potencijalni cis regulatorni elementi MRE odsustvuju u većini sekvenciranih biljnih MT promotora. Inducibilnost pod uticajem jona metala je registrovana za svega nekoliko biljnih MT promotora, a cis regulatorni elementi koji je kontrolišu još uvek nisu pouzdano identifikovani.

Jedna kopija MRE prisutna je u proksimalnom regionu promotora *PsMT_A* gena graška (Fordham-Skelton et al., 1997). Promotorski fragment koji obuhvata pomenuti MRE je bio sposoban da vodi ekspresiju reporterskog gena slabog intenziteta u listovima transgenog *A. thaliana*. Međutim izlaganje povećanim koncentracijama Cu^{2+} i Fe^{3+} jona nije dovelo do povećanja promotorske aktivnosti.

In silico analiza promotora gena za metalotionein daglasove jele *PmMTa* otkrila je motiv sličan sisarskim MRE (Chatthai et al., 2004). Akumulacija transkripta ovog gena se povećava pod uticajem jona metala u semenima i klijancima daglasove jele (Chatthai et al., 1997). Ipak, delecija promotorskog regiona koji sadrži MRE nije dovela do značajne razlike u ekspresiji reporterskog gena u tranzijentno transformisanim somatskim i zigotskim embrionima daglasove jele kao ni u transgenim klijancima duvana.

Potencijalna sekvenca MRE uočena je u promotoru gena za MT paradajza *LeMT_B* (Whitelaw et al., 1997), ali njena funkcionalnost nije ispitivana delecionim analizama, niti je analiziran uticaj jona metala na aktivnost kloniranih sekvenci promotora.

Promotori *MT1a*, *MT2a*, *MT2b* i *MT3* gena *A. thaliana* povećavaju i menjaju tkivnu distribuciju svoje aktivnosti nakon izlaganja jonima Cu^{2+} (Guo et al., 2003). Kako potencijalne MRE sekvence nisu uočene u ovim promotorima moguće je da se ova regulacija ostvaruje preko još nedefinisanih cis regulatornih elemenata koji su možda specifični za biljke.

Jedini promotor biljnog MT u kome je prepoznata potencijalna sekvenca MRE, a za koji je uočena inducibilnost jonima metala je *ricMT* iz pirinča (Lu et al., 2007). Delecionom analizom je pokazano da je region dužine 37 bp (-331 do -194 uzvodno od starta transkripcije) neophodan za povećanje aktivnosti promotora pod uticajem jona Cu^{2+} i Zn^{2+} . Kako ovaj region obuhvata i potencijalnu sekvencu MRE moguće je da je ovaj cis element zaista funkcionalan. Definitivnu potvrdu ove pretpostavke može dati samo mutaciona analiza.

Interesantno je da do sada nije prijavljen ni jedan promotor biljnog MT koji je inducibilan pod uticajem jona Cd^{2+} .

Uzimajući u obzir i metalima regulisanu ekspresiju mnogih biljnih MT gena čiji promotori još nisu klonirani, u budućim funkcionalnim analizama može se očekivati potvrda funkcionalnosti nekih od MRE sekvenci ili pak identifikacija novih, biljno-specifičnih sekvenci odgovornih za regulaciju metalima. Metalom-indukovani

promotori takođe mogu biti od velike koristi u poboljšanju svojstava biljaka hiperakumulatora, ali i za biomonitoring zagađivača sredine (Qi et al., 2007).

b) *Ostali sredinski stimulusi*

Regulacija biljnih MT promotora različitim abiotičkim i biotičkim stimulusima je analizirana za mali broj gena. Uočeni su i potencijalni regulatorni elementi koji mogu biti uključeni u odgovore na različite sredinske stimuluse, ali njihova funkcionalnost nije ispitana.

Potencijalni G-blok uočen je u promotorima gena *cgMT1*, *LeMT_B*, *PsMT_A* i *PmMTa* (Chatthai et al., 2004; Fordham-Skelton et al., 1997; Laplaze et al., 2002; Whitelaw et al., 1997). U interakciji sa nekim drugim cis elementima G-blok može biti deo LRE kompleksa ("light responsive elements") (Chattopadhyay et al., 1998), ali i odgovarati na abscisinsku kiselinu ili na druge endogene ili sredinske stimuluse (Menkens et al., 1995).

Promotor gena *cgMT1* sadrži i potencijalni ARE ("antioxidant responsive element") što je u saglasnosti sa inducibilnošću ovog promotora pod uticajem H₂O₂. Uočeno je i povećanje aktivnosti promotora *cgMT1* nakon povrede listova, za šta su najverovatnije zaduženi potencijalni W i WUN elementi koji se nalaze u njemu (Obertello et al., 2007). Ovaj promotor je inducibilan i nakon infekcije patogenom *Xanthomonas campestris*.

Osim inducibilnosti na bakar i cink, promotor gena *ricMT* povećava svoju aktivnost i na povrede i osmotski stres, a delecionom analizom su suženi odgovorni delovi promotora (Lu et al., 2007).

c) *Biljni hormoni*

Hormonska regulacija promotorske aktivnosti uočena je u slučaju dva MT iz pirinča: *OsMT2b* čija se aktivnost smanjuje pod uticajem citokinina (Yuan et al., 2008) i *ricMT* koji je pozitivno regulisan abscisinskom kiselinom (Lu et al., 2007).

U regulatornom regionu *OsMT2b* nalazi se pet elemenata ARR1AT ("AAR1 (Arabidopsis response regulator 1) – binding elements") koji mogu biti uključeni u

regulaciju citokininom, hormonom koji je važan za pravilno razviće biljnih organa. Vrlo je interesantna obostrana međusobna regulacija citokinina i ovog metalotioneina i dalja analiza promotora *OsMT2b* mogla bi dati neke važne odgovore u razjašnjavanju ove sprege i njenog uticaja na procese razvića.

Delecija distalnog regiona promotora gena *ricMT* koji sadrži potencijalni cis element ABRE ("ABA responsive element") dovela je do ukidanja pozitivnog efekta abscisinske kiseline na aktivnost ovog promotora. ABA (abscisinska kiselina) važan je biljni hormon koji učestvuje u regulaciji dormacije i razvića semena, kao i u odgovoru na isušivanje, osmotski i druge stresove. Potencijalni ABRE nađen je i u promotoru *Ec* gena pšenice, čija se ekspresija takođe povećava pod dejstvom abscisinske kiseline (Kawashima et al., 1992), kao i u promotoru *OsMT-II-1a*, još jednog MT iz pirinča, koji još uvek nije funkcionalno analiziran (Zhou et al., 2005).

ERE ("ethylene responsive element") je nađen u nekim promotorima biljnih MT. Vezivanjem ERF transkripcionih faktora za ERE sekvence ostvaruje se odgovor biljnih ćelija i tkiva na etilen, značajan biljni hormon uključen u regulaciju klijanja, rasta stabla i korena, senescenciju, sazrevanje ploda, kao i u odgovore na biotičke i abiotičke stresove. Delecija promotorskog regiona *PmMTa* gena daglasove jele koji sadrži dve kopije ERE sekvence, imala je za posledicu značajno smanjenje ekspresije reporterskog gena u tranzijentno transformisanim zigotskim i somatskim embrionima daglasove jele kao i u transformisanim klijancima duvana (Chatthai et al., 2004). Ovaj region sadrži tkđ. i sekvencu bogatu AT baznim parovima za koju je pretpostavljena uloga opšteg enhensera ekspresije (Stalberg et al., 1996), kao i potencijalni E-blok koji može biti odgovoran za seme-specifičnu ekspresiju (Ellerstrom et al., 1996). Delecija treće, distalno postavljene kopije ERE u *PmMTa* promotoru nije se međutim značajno odrazila na ekspresiju reporterskog gena.

Dakle, funkcionalnost potencijalnih regulatornih elemenata vezanih za hormonsku regulaciju, uočenih u sekvencama biljnih MT promotora još uvek nije potvrđena. Nova istraživanja na ovom polju razjasniće u kojoj meri biljni hormoni utiču na ekspresiju MT i da li je ovaj uticaj direktan ili se izvodi posredstvom signalnih molekula.

1.3.3 Ekspresija biljnih MT

Transkripti gena za metalotioneine spadaju u najzastupljenije u cDNK-bibliotekama izolovanih iz različitih tkiva velikog broja biljnih vrsta (Moriguchi et al., 1998; Clendennen & May, 1997). Metalotioneini su eksprimirani u skoro svim biljnim tkivima i stadijumima razvića, i regulisani su prostorno i vremenski. Tkivna distribucija je karakteristična za određeni tip MT ali postoje i izuzeci. Često ekspresija MT nije ograničena na samo jedno tkivo ili tip ćelija, što zaključivanje o njihovim mogućim funkcijama čini još težim.

Tkivno specifična ekspresija detaljnije je analizirana u svega nekoliko studija *in situ* hibridizacijom i ograničena je na MT tipa 1 i 2. Za gene *MT1a* i *MT2b Arabidopsis*-a, kao i za gen *MT2* *Vicia faba*, uočena je ekspresija u trihomama lista (Foley & Singh, 1994; Garcia-Hernandez et al., 1998). Kako su trihome velike ćelije koje mogu služiti za odlaganje viška jona teških metala, MT bi imali ulogu helatora i detoksifikatora. S druge strane veliki broj enzima koji učestvuju u odbrambenim mehanizmima odlaže se upravo u trihomama, a kako većina ovih enzima zahteva prisustvo jona Cu^+ ili Zn^{2+} , MT bi igrali ulogu u homeostazi i dopremanju ovih jona.

Gen *MT1a Arabidopsis*-a je osim u trihomama eksprimiran i u sprovodnim tkivima lista, korena i cveta. Vaskularna lokalizacija je primećena i za *MT2a Arabidopsis*-a i *MT2* hrasta (Garcia-Hernandez et al., 1998; Mir et al., 2004). Pretpostavljeno je da MT mogu biti važni za homeostazu i transport jona metala kroz floem. U ksilemu bi MT mogli služiti kao depo jona Cu^{2+} koji su potrebni tokom procesa lignifikacije (Guo et al., 2008). Potencijalna uloga MT u procesu lignifikacije pretpostavljena je i na osnovu lokalizacije *MT2* hrasta u lignifikovanim vlaknima kore (Mir et al., 2004).

CgMT1 iz *C.glauca* je eksprimiran u azotofiksatorskim kvržicama. Kako su kvržice mesto velike produkcije ROS, pretpostavljena je uloga *CgMT1* u regulaciji njihove koncentracije (Obertello et al., 2007).

MT2 hrasta i MT pšenice (*WAL11*) eksprimirani su u visoko-proliferišućim tkivima. Reaktivne kiseonične vrste su veoma važan regulator procesa u ovim tkivima, pa je sugerisano da MT učestvuju u regulaciji njihove homeostaze (Mir et al., 2004; Snowden et al., 1995).

MT iz kukuruza je specifično eksprimiran u ćelijama koje okružuju sprovodne snopiće lista ("bundle sheath") (Furumoto et al., 2000). Kako je u ovim ćelijama nađena povećana ekspresija i drugih gena uključenih u odbrambene procese, pretpostavljeno je da ove ćelije predstavljaju mesto primarnog odgovora na stres.

MT tipa 2 iz kukuruza je visoko eksprimiran tokom mikrosporogeneze (Charbonnel-Campaa et al., 2000). Veliki sadržaj jona Zn^{2+} u polenovim zrnima ukazuje na moguću funkciju MT.

Nivo transkripata MT menja se tokom razvića biljnih organa. Detektovane su promene tokom razvića cveta i sazrevanja ploda (Clendennen & May, 1997; Nam et al., 1999) i semena (Kawashima et al., 1992) kao i tokom senescencije listova (Garcia-Hernandez et al., 1998; Buchanan-Wollaston, 1994; Liu et al., 2002). Uloga MT u ovim procesima bilo bi dopremanje jona Zn i drugih esencijalnih metala neophodnih za procese razvića. Tokom senescencije, pretpostavljeno je da MT vezuje jone i učestvuje u njihovom transportu iz umirućeg tkiva u ostale delove biljke.

Ekspresija biljnih gena za metalotioneine regulisana je i različitim egzogenim stimulusima. Najviše podataka postoji o uticaju jona metala na nivo MT transkripata. Izlaganje povećanim koncentracijama jona bakra u većini slučajeva je dovelo do povećanja ekspresije (Snowden et al., 1995; Xue et al., 2009; Zhou & Goldsbrough, 1994; Murphy et al., 1997). Inducibilnost ekspresije nekog gena za MT jonima bakra može se razlikovati u različitim tkivima (Zhou & Goldsbrough, 1994).

Stimulativno dejstvo na ekspresiju biljnih gena za MT uočeno je i za jone Cd^{2+} , Al^{3+} i Zn^{2+} (Xue et al., 2009; Yang et al., 2009; Snowden & Gardner, 1993; Snowden et al., 1995; Giritich et al., 1998).

U nekoliko studija uočeno je inhibitorno dejstvo jona Cu^{2+} , Zn^{2+} i Cd^{2+} na nivo transkripta gena za MT u nekim tkivima pirinča i *Mimulus guttatus* (de Miranda et al., 1990; Hsieh et al., 1995; Yu et al., 1998). U nekim slučajevima joni metala nisu imali uticaja na nivo ekspresije (Moriguchi et al., 1998; Kawashima et al., 1992).

Različiti tipovi stresnih uslova, kao što su suša, svetlosni stres, visok salinitet, oksidativni stres, kao i infekcija patogenima ili mehanička povreda takođe mogu da utiču na nivo ekspresije biljnih MT. GhMT3a je pozitivno regulisan osmotskim stresom, niskom temperaturom i solima (Xue et al., 2009). Uočena je i povećana ekspresija MT gena tokom perioda suše (Berta et al., 2009; Brosche et al., 2005). Oksidativni stres izazvan vodonik peroksidom ili parakvatom povećao je nivo transkripta *OsMT-II-1a*, kao i toplotni stres i niska temperatura (Zhou et al., 2005).

Biljni hormoni takođe mogu uticati na nivo ekspresije biljnih MT. Porast ekspresije biljnih MT je uočen nakon delovanja abscisinske kiseline i etilena (Chatthai et al., 1997; Clendennen & May, 1997; Kawashima et al., 1992; Xue et al., 2009; Coupe et al., 1995). *OsMT-II-1a* je indukovano abscisinskom kiselinom, salicilnom kiselinom, etilenom kao i azot monoksidom (Zhou et al., 2005). Smanjenje nivoa transkripta *OsMT2b* uočeno je pod dejstvom citokinina (Yang et al., 2009).

1.3.4 Proteini kodirani genima za biljne metalotioneine - struktura i biohemijska svojstva

Usled velikih teškoća u izolaciji proteina direktno iz biljnih tkiva, do sada su izolovani samo Ec protein ("Early Cys-labeled protein" - MT tipa 4) iz pšenice i MT1 i MT2 iz *Arabidopsis-a* (Hanley-Bowdoin & Lane, 1983; Murphy et al., 1997). Ec je analiziran strukturno i biohemijski, kao i osam rekombinantnih MT izolovanih nakon ekspresije u heterolognom sistemu *E.coli*. Podaci koji su dobijeni daleko su oskudniji od onih na sisarskim MT, ali uočene karakteristike svojstvene samo biljnim MT čine ove proteine veoma interesantnim za dalje proučavanje.

Kao i kičmenjački MT, biljni MT su proteini malih molekularnih težina (5-10 kDa), sa visokim sadržajem cisteinskih aminokiselinskih ostataka, mada je broj Cys kod biljnih daleko manji: 12-17 u poređenju sa 20 koji se nalaze kod kičmenjačkih MT. Prve tri subfamilije (tip 1, 2 i 3) imaju Cys organizovane u okviru dva domena, ali je "linker" region koji ih razdvaja mnogo duži od onog kod sisarskih MT (35 do 40 AK). Prisustvo aromatičnih AK i histidina takođe je svojstveno samo biljnim MT. Ec proteini, odnosno pripadnici tipa 4, imaju Cys ostatke organizovane u okviru tri domena koji su međusobno razdvojeni sa dva "linker" regiona od po 12-14 AK, i uglavnom ne sadrže aromatične AK.

Usled manjeg sadržaja Cys, biljni MT vezuju i manje jona metala po molekulu proteina. Kao i kod sisarskih MT, joni metala se vezuju koordinantnim vezama za tiolne grupe cisteina. Divalentni joni (Zn^{2+} , Cd^{2+}) se vezuju za četiri SH grupe u tetraedarskom rasporedu, ali zahvaljujući formiranju klastera jedan Cys, odnosno njegova SH grupa može učestvovati u vezivanju dva jona. Novije studije ukazuju na to da ostaci histidina u biljnim MT mogu takođe učestvovati u vezivanju jona metala i tako

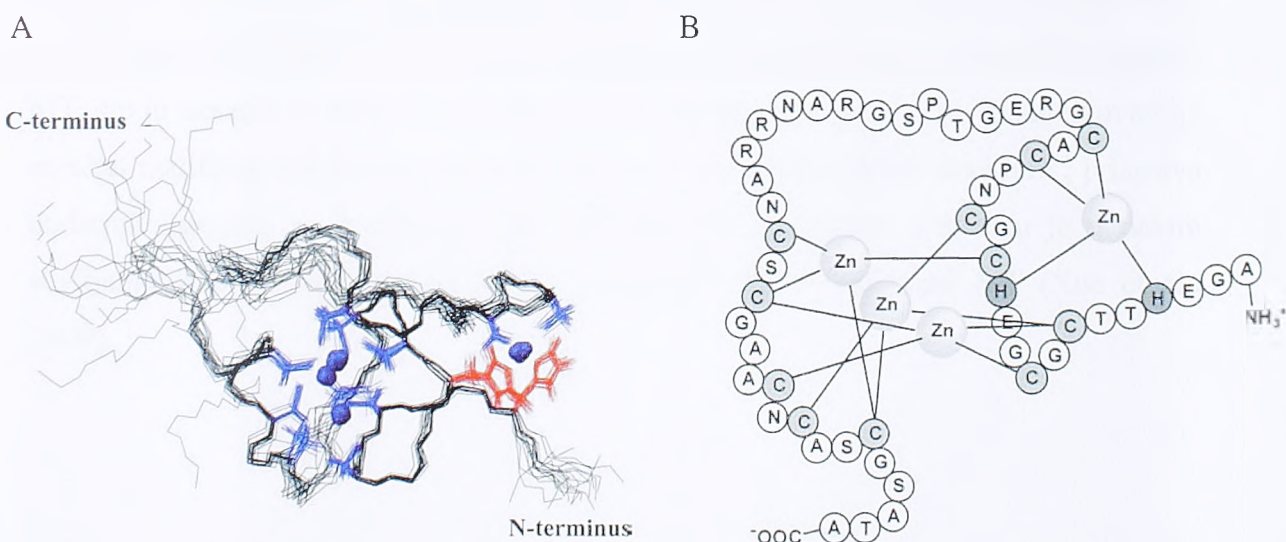
povećati broj jona po molekulu proteina. Interesantno je i da bi His mogli smanjiti afinitet MT za vezivanje Cd^{2+} a povećati afinitet za Zn^{2+} , što bi se odrazilo i na funkciju MT koja bi onda bila više usmerena ka održavanju homeostaze jona Zn^{2+} a manje ka detoksifikaciji od štetnih metala (Freisinger, 2008).

Vrednosti pKa, koje označavaju pH na kojoj je polovina metalnih jona otpuštena iz proteina, su veće kod biljnih MT što znači da je stabilnost njihovih metal-tiolatnih klastera manja nego sisarskih MT na niskim pH.

Informacije o trodimenzionalnoj strukturi biljnih MT su vrlo ograničene zbog teškoća u izolaciji i prečišćavanju proteina u dovoljnoj količini za NMR i spektroskopiju X zracima. Postoje podaci o sekundarnim strukturama dobijeni korišćenjem IR ("infra red") i CD ("circular dichroism") spektroskopija. Najinteresantnija karakteristika biljnih MT koja ih odvaja od sisarskih MT je postojanje dugačkog linker regiona između cisteinom bogatih N i C krajeva. Analize aminokiselinskih sekvenci softverima za predikciju kao i empirijski podaci ukazuju da se jedino u tom "linker" regionu može očekivati postojanje sekundarnih struktura i to pre svega β ploče i β okreti, dok kod Cys-bogatih regiona odsustvuje regularna sekundarna struktura ("random coil" tj. nasumično klupko) (Schicht & Freisinger, 2009). Funkcija "linker" regiona je još uvek nerazjašnjena. Postoje pretpostavke da on može služiti za usmeravanje proteina ka određenom delu ćelije, učestvovati u protein-protein i protein-DNK interakcijama ili olakšavati zauzimanje određene konformacije proteina i formiranje metal-tiolatnih klastera (Freisinger, 2008; Bilecen et al., 2005). Značajno pitanje o kome se raspravlja u stručnoj literaturi, tiče se metal-tiolatnih klastera, odnosno da li su oni organizovani u vidu jednog ili dva domena u tercijarnoj strukturi. Neke *in silico* analize predviđaju postojanje dva odvojena domena (Bilecen et al., 2005). Treba reći da je ova predikcija kao polaznu osnovu uzela pretpostavku da se metal-tiolatni klasteri formiraju odvojeno, bez eksperimentalne potvrde. Nasuprot tome, postoje podaci koji ukazuju da bi upravo "linker" region i njegova struktura mogli služiti za dovođenje N- i C- Cys bogatih delova proteina u bliski kontakt, a rezultat bi bilo formiranje samo jednog metal-vezujućeg domena. Takva struktura bi imala prednost jer bi omogućila vezivanje većeg broja metalnih jona nego dva odvojena domena (Freisinger, 2008). Ovoj pretpostavci u prilog govore proteolitički eksperimenti na Cd^{2+} -MT1 iz graška i Cd^{2+} -MT2 iz leblebije (Kille et al., 1991; Wan & Freisinger, 2009). Na postojanje jednog zajedničkog domena upućuje i broj vezanih jona po molekulu proteina. Nađeno je da MT1 iz leblebije može formirati komplekse sa četiri

ali i sa pet jona Zn^{2+} ili Cd^{2+} (Schicht & Freisinger, 2009). Uzimajući u obzir prirodu vezivanja dvovalentnih jona za SH grupe, dva odvojena domena ovog proteina mogla bi vezati samo četiri jona. Vezivanje pet jona bi se moglo objasniti samo postojanjem jednog zajedničkog metal-vezujućeg domena. Slično se može zaključiti i razmatranjem Zn^{2+} i Cd^{2+} – vezanih kompleksa koje formira rekombinantni MT3 iz banane (Freisinger, 2008).

Analize MT tipa 4 pokazale su da Cys ostaci koji su u primarnoj strukturi odnosno aminokiselinskoj sekvenci raspoređeni u okviru tri regiona, zapravo formiraju dva metal-vezujuća domena. Proteolitička digestija je pokazala da pšenični Ec sa vezanih šest jona Cd^{2+} ima dva domena, od kojih jedan obuhvata N-terminalni Cys-bogati region i dva vezana jona Cd^{2+} , a drugi obuhvata centralni i C-terminalni region i vezuje četiri jona (Peroza & Freisinger, 2007). Struktura ovog drugog, većeg domena vezanog za četiri jona Zn^{2+} , analizirana je i NMR spektroskopijom (Peroza et al., 2009). Četiri Cys centralnog regiona zajedno sa svih pet Cys C-terminalnog regiona vezuju četiri jona Zn^{2+} , dok ostala dva Cys centralnog regiona sa dva His vezuju još jedan jon. Ovim je potvrđeno i učešće His ostataka biljnih MT u vezivanju jona metala (Sl. 1.6).



Slika 1.6. Trodimenzionalna struktura metal-vezujućeg domena formiranog od C-terminalnog i centralnog Cys-bogatog regiona. A) Prva NMR analiza strukture dela biljnog metalotioneina. Dodatno su prikazani ostaci cisteina – plavo, i histidina – crveno. Joni Zn^{2+} su prikazani kao plave loptice. B) Shematski prikaz: C – aminokiselina Cys, H - aminokiselina His. Preuzeto iz Peroza et al., 2009. i Freisinger, 2008.

Rekombinantni MT biljaka eksprimirani i izolovani iz *E.coli* poslužili su da se potvrdi ne samo vezivanje jona metala već i pretpostavljene antioksidativne sposobnosti ovih proteina, kao što je već pokazano za sisarske MT. U studiji (Akashi et al., 2004), pokazano je da je rekombinantni protein kodiran genom *CLMT2*, za metalotionein tipa 2 divlje lubenice, sposoban da spreči oksidaciju salicilne kiseline hidroksilnim radikalima, *in vitro*. U istoj studiji rekombinantni CLMT2 značajno je umanjio degradaciju DNK u prisustvu hidroksilnih radikala. Time je prvi put pokazano za neki biljni MT protein da je sposoban da redukuje reaktivna jedinjenja kiseonika i da učestvuje u zaštiti ćelijskih komponenti od oksidativnog stresa. Na sličan način potvrđene su antioksidativne sposobnosti GhMT1 iz pamuka (Xue et al., 2009).

Sposobnost rekombinantnih biljnih MT da vezuju metale pokazana je i u eukariotskom sistemu kvasca. U nekoliko studija korišćen je kvasac *S.cerevisiae* sa mutiranim genom za metalotionein CUP1. Usled nedostatka svog metalotioneina ovaj soj kvasca je osetljiv na prisustvo teških metala. Biljni metalotioneini MT2 iz hrasta i MT svih tipova iz *Arabidopsis*-a bili su sposobni da komplementiraju ovu mutaciju i povrate sposobnost kvasca da raste na podlogama sa visokim koncentracijama Cu^+ , Zn^{2+} i Cd^{2+} (Domenech et al., 2006; Domenech et al., 2007; Zhou & Goldsbrough, 1994; Guo et al., 2008). Step komplementacije se razlikovao za različite izoforme MT, što je ukazalo na njihove različite afinitete za različite metale, što je najverovatnije rezultat različitog sadržaja i rasporeda ostataka Cys, kao i različite strukture i prisustva dodatnih liganada za vezivanje, npr. ostataka His. Ekspresija u kvascu je u nekim studijama iskorišćena i za ispitivanje antioksidativnih sposobnosti MT (Xue et al., 2009).

1.3.5 Transgene biljke sa izmenjenim nivoom ekspresije metalotioneina – put ka razjašnjavanju funkcije MT gena

Proučavanje biljnih metalotioneina dugo se svodilo samo na praćenje tkivne distribucije i promena ekspresije gena pod uticajem različitih faktora. Zaključci koji su mogli proizaći iz ovih studija bili su oskudni i indirektni. Veći pomak u rasvetljavanju funkcija koje MT obavljaju u biljnim ćelijama učinjen je tek u skorije vreme korišćenjem transgenih biljaka sa izmenjenim nivoom ekspresije metalotioneina.

U genomu viših biljaka geni za metalotioneine biljaka često su zastupljeni u većem broju, raspoređeni u okviru nekoliko genskih familija. Različite izoforme MT gena imaju izvesne razlike u sekvencama kako kodirajućeg tako i regulatornih regiona, koje dovode do manjih ili većih razlika u njihovim paternima ekspresije, strukturi i ulogama koje obavljaju. Ipak, geni u okviru iste familije neretko su veoma sličnih sekvenci, čak i do 99% (de Miranda et al., 1990), što ukazuje na moguće preklapanje funkcija ovih gena u biljnim ćelijama. Stoga se može očekivati da isključivanje pojedinačnih MT gena tehnikom "knock out" (dobijene npr. insercionom mutagenezom) neće uvek rezultovati u vidljivoj promeni fenotipa. Osim toga, okarakterisani insercioni mutanti sa potpuno isključenim određenim genima postoje samo za mali broj biljnih vrsta; najveća ovakva kolekcija obezbeđena je za *Arabidopsis* koji je zbog svog izuzetno malog genoma u širokoj upotrebi kao model organizam. Proučavanju uloga metalotioneina biljaka zato se češće pristupa konstruisanjem transgenih biljaka u kojima je ekspresija određenog gena značajno povećana ("overexpressing") ili utišana ("silencing" ili "RNA interference - RNAi"). Utišavanje gena od interesa rezultira u smanjenju ekspresije svih njemu visoko-sličnih gena. Ova dva pristupa su u praksi tek odnedavno i studije u kojima su one upotrebljene dale su značajan doprinos rasvetljavanju uloga metalotioneina. Prekomerna ekspresija ili utišavanje gena mogu se u zavisnosti od upotrebljenog promotora izvoditi konstitutivno ili u određenim tkivima, stadijumima razvića ili pod dejstvom određenih faktora. Utišavanje gena od interesa se postiže transformacijom biljaka "hairpin" konstruktom u kome je iza promotora dva puta uklonirana ista sekvenca gena ali u suprotnim orijentacijama. Između ovih sekvenci obično se umeće intron. Rezultujući transkript zauzima formu ukosnice, a

nakon isecanja introna nastaje dvolančana RNK koja pokreće mehanizam utišavanja ("silencing") kojim se redukuje ekspresija željenog gena.

1.3.5.1 Detoksifikacija od teških metala i uloga u homeostazi esencijalnih metala

Prva od pretpostavljenih funkcija za biljne metalotioneine bila je detoksifikacija od teških metala. Kao što je već navedeno ekspresija mnogih gena za metalotioneine povećava se nakon izlaganja većim koncentracijama jona metala. Primećeno je i da populacije hiperakumulatora teških metala, imaju značajno veći nivo ekspresije MT od populacija senzitivnih na prisustvo teških metala (van Hoof et al., 2001; Roosens et al., 2004). Overekspresija biljnih metalotioneina u hipersenzitivnim sojevima kvasca ili *E. coli* omogućava njihov rast na visokim koncentracijama jona metala (Evans et al., 1992) (Evans et al., 1992; Zhou & Goldsbrough, 1994) što takođe potvrđuje ovu funkciju.

Kako je u mnogim studijama već pokazano da primarnu ulogu u detoksifikaciji od teških metala predstavlja fitohelatin, potentni helator jona Cd^{2+} , Ag^{+} , Hg^{2+} i drugih, predložena je uloga MT u održavanju homeostaze esencijalnih jona metala, kao što su Cu^{+} i Zn^{2+} . Pomenuta lokalizacija ekspresije nekih MT u trihomama ili u sprovodnom tkivu govorila je u prilog ovoj pretpostavci.

Potvrda da biljni metalotioneini vezuju jone metala u biljnim tkivima i na taj način učestvuju u obe pomenute uloge dobijena je korišćenjem transgenih biljaka sa izmenjenim nivoom ekspresije MT gena. Gajenje transgenih biljaka u optimalnim uslovima nije pokazalo nikakve razlike u fenotipu. Nakon izlaganja teškim metalima biljke sa većim sadržajem metalotioneina duže su pokazivale znake tolerancije ili akumulirale veće količine metala u svojim organima. Sa druge strane, u nekim studijama gajenje na medijumu sa normalnom, fiziološkom koncentracijom esencijalnih metala dovodilo je do zastoja u razvoju biljaka sa povećanom ekspresijom MT gena. Ove studije su ukazale da MT vezuju jone metala u biljnim ćelijama i smanjuju njihovu dostupnost drugim ćelijskim komponentama.

Geni *AtMT2a* i *AtMT3* su bili prvi koji su pojačano eksprimirani u hetrolognom biljnom sistemu čime je dokazana njihova sposobnost detoksifikacije ćelija od teških metala (Lee et al., 2004). Tranzijentna ekspresija ovih gena u stominim ćelijama *V. Faba* dovela je do značajnog smanjenja koncentracije reaktivnih jedinjenja kiseonika i

smanjene degradacije hloroplasta nakon izlaganja jonima Cd^{2+} . Navedeni rezultati takođe su ukazali na antioksidativnu ulogu MT.

Za ispitivanje uloge MT *Arabidopsis*-a korišćeni su dostupni insercioni mutanti za gene *MT1a* i *MT2b*, kao i utišavanje *MT1a* (Guo et al., 2008). Ove transgene biljke nisu imale izmenjen fenotip kada su gajene u normalnim uslovima. Nakon izlaganja jonima bakra transgeni sa mutiranim *MT1a* akumulirali su manje bakra u korenu nego nemutirane biljke. Utišavanje ovog gena, koje je najverovatnije dovelo i do utišavanja *MT1c* (koji ima 94% poklapanja u sekvenci sa *MT1a*), rezultovalo je u još većem smanjenju akumulacije metala. U odsustvu *MT1*, bakar može da se vezuje za druge ligande, uključujući ostale metalotioneine. Ipak kapacitet za akumulaciju jona metala *MT1a*-deficijentnih korenova bio je značajno smanjen, što je moglo da dovede i do snižavanja ekspresije transportera jona Cu^{2+} i smanjenja daljeg usvajanja ovih jona iz rizosfere. Iako *MT2b* ima sličan patern ekspresije kao *MT1a* (Guo et al., 2003), njegovo isključivanje nije imalo efekta na akumulaciju bakra u korenu. Oba ova gena eksprimirana su i u listovima (Garcia-Hernandez et al., 1998; Guo et al., 2003), ali je izostao efekat njihove mutacije na akumulaciju bakra u listovima. Isključivanje ovih gena, čak i istovremeno (u duplom mutantu) nije uticalo na toleranciju biljaka na bakar i kadmijum. Njihov nedostatak bio je maskiran prisustvom fitohelatina koji su glavni učesnici u odbrani biljnih ćelija od stresa izazvanog teškim metalima. Samo u biljkama sa isključenim genom za fitohelatin sintazu uticaj metalotioneina na toleranciju na teške metale došao je do izražaja. U odsustvu fitohelatina biljke sa mutiranim *MT1a* i *MT2b* imale su više inhibiran rast korena i veći gubitak biomase nego biljke sa normalnim nivoom *MT1a* i *MT2b*. Ovim istraživanjem je pokazano da metalotioneini mogu imati preklapajuće funkcije sa fitohelatinima, za koje je od ranije poznato da učestvuju u transportu jona bakra u ksilemu i floemu.

Funkcija gena *MT1a Arabidopsis*-a proučena je i u studiji (Zimeri et al., 2005), gde je korišćena tehnika utišavanja gena korišćenjem RNAi konstrukta. Konstrukt je napravljen korišćenjem sekvence *MT1a* ali je potvrđeno utišavanje svih gena ove familije na manje od 5-10% od nivoa transkripata prisutnih u netransformisanim biljkama. Za razliku od prethodno pomenute studije (Guo et al., 2008) gde je isključen samo jedan gen familije *MT1* što nije imalo za posledicu smanjenje tolerancije na bakar i kadmijum, utišavanje svih MT tipa 1 dovelo je do značajno usporenog rasta na podlozi sa kadmijumom u poređenju sa netransformisanim biljkama. Takođe je uočena i smanjena akumulacija teških metala u izdancima ovih transgenih RNAi linija, što

sugeriše važnu ulogu MT1 u translokaciji metalnih jona. Ovi efekti su izostali u "knockout" mutantu *MT1a* najverovatnije zato što je u njemu ostao očuvan drugi značajan gen ove familije – *MT1c*. Moguće je takođe da je ekspresija *MT1c* čak bila povećana u odsustvu *MT1a* pri izlaganju jonima Cd^{2+} , potpuno kompenzirajući ovu mutaciju. Autori rada nisu analizirali nivo ekspresije *MT1c* u mutantu za *MT1a*, tako da ovo moguće objašnjenje ostaje samo na nivou pretpostavke.

Pojačana ekspresija *BjMT2* iz *Brassica juncea* u *Arabidopsis*-u različito se odrazila na rast korenova i izdanaka (Zhigang et al., 2006). U izdancima je transgen povećao otpornost na bakar i kadmijum, što je određeno rastom izdnaka i sadržajem hlorofila. S druge strane rast korenova transformisanih biljaka bio je usporen u odsustvu teških metala, dok se nakon izlaganja velikim koncentracijama bakra rast korenova transgenih i netransformisanih biljaka izjednačio. Ovi rezultati navode na pretpostavku da prekomerno prisustvo metalotioneina može dovesti do disbalansa homeostaze esencijalnih metala, ukoliko ovi metali i sami nisu prisutni u višku.

Metalotionein iz hiperakumulatora *S.vulgaris* je iskorišćen za povećanje akumulacije metala u duvanu (Gorinova et al., 2007). Pokazana je povećana sposobnost akumulacije kadmijuma i u korenu i u izdancima transgenog duvana sa pojačanom ekspresijom ovog MT. Iako je sadržaj usvojenog metala u transgenim tkivima bio veći, nisu uočene veće razlike u osetljivosti biljaka i aktivnosti antioksidativnih enzima.

Transgene biljke pirinča sa pojačanom ekspresijom *OsMT1a* akumulirale su značajno više cinka nego netransformisane, čime je pokazana sposobnost ovog metalotioneina da vezuje jone Zn^{2+} u biljnim ćelijama (Yang et al., 2009). Kako je u ovim transgenim biljkama značajno povećana ekspresija nekoliko transkripcionih faktora sa Zn prstićima, sugerisana je uloga *OsMT1a* u homeostazi jona Zn^{2+} .

Za neke MT ipak nije uočeno da povećavaju akumulaciju metala ili toleranciju na njih. To je slučaj sa *cgMT1* iz *C.glauca* i sa *TcMT2a* i *TcMT3* iz hiperakumulatora *T. caerulescens* (Hassinen et al., 2009; Obertello et al., 2007).

Nova saznanja o biljnim MT otvaraju i put za njihovu primenu u biotehnologiji. Pojačana produkcija proteina sa metal-helirajućim svojstvima može značajno povećati kapacitet za akumulaciju metala u biljkama koje se koriste u fitoremedijaciji.

1.3.5.2 Uloga biljnih MT u odbrani od biotičkih i abiotičkih stresova

Povećanje ekspresije mnogih MT gena u biljkama nakon izlaganja različitim stresogenim faktorima kao što su suša, osmotski stres, niska temperatura ili mehaničke povrede (Berta et al., 2009; Xue et al., 2009; Zhou et al., 2005) ukazalo je da odbrambene uloge metalotioneina najverovatnije nisu ograničene samo na stres izazvan teškim metalima.

Jedna od najvažnijih posledica svih abiotičkih i biotičkih stresova sa kojima se biljke susreću, uključujući i teške metale, je zapravo oksidativni stres. Kao što je već rečeno, sve je više studija u kojima je detektovana ne samo metal-vezujuća nego i antioksidativna sposobnost rekombinantnih proteina kodiranih MT genima ili MT eksprimiranih u kvascima. Stoga ne iznenađuju studije u kojima je pokazano da biljni MT igraju značajnu odbrambenu ulogu u različitim stresovima. Može se čak reći da su MT važni ne samo za uklanjanje većih koncentracija neželjenih oksidativnih vrsta, već i za finu regulaciju koncentracije ROS koje su uključene u signaling. Tako promene u ekspresiji MT, kako povećanje tako i smanjenje, mogu biti bitne za regulaciju mnogih životnih procesa.

Uticao MT na smanjenje nivoa ROS u biljkama, pokazan je za gen pirinča *OsMT2b* (Wong et al., 2004). Prekomerna ekspresija ovog gena značajno je smanjila nivo vodonik peroksida indukovanog patogenim elicitorom u transformisanim ćelijama. Utišavanje ovog gena imalo je za posledicu povećan nivo H₂O₂. U istoj studiji uočeno je smanjenje ekspresije *OsMT2b* pod uticajem OsRac1, GTPaze koja predstavlja inducer oksidativnog šoka i hipersenzitivnog odgovora na infekciju patogenima. U ovom slučaju povećana koncentracija ROS predstavlja signal koji pokreće odbrambene mehanizme koji rezultuju u smrti zaraženih ćelija, čime se sprečava širenje infekcija, a OsRac1 deluje istovremeno indukujući povećanje koncentracije ROS i smanjujući nivo *OsMT2b*, koji bi ih redukovao. Dakle, *OsMT2b* učestvuje u regulaciji koncentracije ROS, a smanjenje ekspresije ovog metalotioneina neophodno je kako bi se omogućio hipersenzitivni odgovor na patogene, tj. oksidativni prasak ("oxidative burst"). Zbog toga su biljke sa pojačanom ekspresijom ovog metalotioneina bile podložnije razvoju infekcije.

Slično je uočeno u *Arabidopsis*-u u kome je eksprimiran *cgMT1* iz *C. glauca* (Obertello et al., 2007). U ovim transgenim biljkama je bila smanjena koncentracija vodonik peroksida, a podložnost infekciji povećana.

Osim pomenute uloge u homeostazi jona Zn^{2+} , uočena je sposobnost *OsMT1a* da povećava otpornost na sušu (Yang et al., 2009). Interesantno je da je pojačana ekspresija *OsMT1a* dovela i do značajnog povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima katalaze, peroksidaze i askorbatne peroksidaze, kao i ekspresije nekoliko transkripcionih faktora sa Zn prstićima. Autori su sugerisali da *OsMT1a* može učestvovati u odbrani od stresa istovremeno povećavajući antioksidativni kapacitet ćelija i regulišući homeostazu jona Zn^{2+} i ekspresiju relevantnih gena.

Transformacijom topole graškovim *PsMT_{AI}* su dobijene biljke sa povećanom tolerancijom na bakar i fotooksidativni stres (Balestrazzi et al., 2009). Ekspresija *PsMT_{AI}* je smanjila nivo reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) kao i oštećenja na DNK. Ovi rezultati ukazuju na to da metalotionein graška može imati i antioksidativnu ulogu u biljnim ćelijama i učestvovati u zaštiti hromatina i fotosintetičkog aparata.

Pojačana ekspresija *GhMT3a* iz pamuka je pokazala njegovu sposobnost da uklanja ROS u biljnim ćelijama i povećava toleranciju na abiotičke stresove (Xue et al., 2009). Rast transgenih linija duvana je bio izrazito bolji u odnosu na netransformisane biljke nakon izlaganja osmotskom stresu, solima i niskoj temperaturi. Nivo vodonik peroksida je bio takođe značajno niži u transformisanim biljkama u ovim stresnim uslovima.

Da biljni metalotioneini mogu učestvovati i u regulaciji procesa razvića koji su pod hormonalnom kontrolom, pokazala je studija u kojoj su korišćeni transgeni i sa utišanim i sa prekomerno ekspimiranim *OsMT2b* (Yuan et al., 2008). Posledica utišavanja *OsMT2b* bili su ozbiljni poremećaji u rastu biljaka i formiranju korenova, dok je prekomerna ekspresija *OsMT2b* rezultovala u patuljastom rastu i formiranju velikog broja adventivnih i velikih bočnih korenova. Nađeno je da je za ove promene bio odgovoran nivo biljnog hormona citokinina koji je bio povećan u slučaju RNAi, a smanjen u biljkama sa "overekspimiranim" *OsMT2b*. Ovim je pokazana važna uloga MT kao regulatora nivoa citokinina, a indirektno i njegov značaj za procese razvića.

Transgene biljke su iskorišćene i za detekciju unutarćelijske lokalizacije biljnih metalotioneina. Kodirajući regioni gena *AtMT2a*, *AtMT3*, *OsMT2b* i *BjMT2* su fuzionisani sa fluorescentnim proteinom GFP čime je utvrđena njihova citosolna lokalizacija (Lee et al., 2004; Wong et al., 2004; Zhigang et al., 2006).

Sve pomenute studije u kojima su korišćene transgene biljke sa izmenjenim nivoom metalotioneina učinile su veliki korak napred u rasvetljavanju funkcija metalotioneina u biljkama. U njima su integrisani rezultati različitih pristupa, odnosno

analize kako regulacije ekspresije, tako i svojstava proteina, kao i funkcionalni eseji u ćelijama. Sada je jasno da biljni metalotioneini nisu samo detoksifikatori od teških metala, već i da mogu igrati važne uloge u odbrani od različitih stresova, ali i u razvojnim procesima.

1.4 *Metalotionein heljde*

Biblioteka cDNK semena heljde u srednjoj fazi sazrevanja poslužila je za izolaciju cDNK klona za metalotionein heljde, pBM290 (acc.no. AF056203). Izvedena aminokiselinska sekvenca dužine 59 aminokiselina, pokazala je visoku homologiju sa drugim biljnim metalotioneinima i klasifikovana u tip MT3 (Brkljačić et al., 1999).

Korišćenjem ovog cDNK klona konstruisana je subgenomska biblioteka heljde obogaćena genima koji kodiraju metalotioneine. Iz ove biblioteke izolovano je nekoliko klonova koji su sadržali MT slične sekvence, a klon *gFeMT 4.1* detaljnije je analiziran.

Genomski fragment klona *gFeMT 4.1* (acc.no. AY361956), dužine 979 bp, obuhvatao je deo potencijalnog promotorskog regiona i skoro ceo kodirajući region MT3 gena heljde (dva introna, prva dva egzona u celosti i deo trećeg egzona). Korišćenjem iRNK semena u srednjoj fazi sazrevanja određen je start transkripcije 71 bp uzvodno od ATG kodona (Brkljačić, 2003). Kompjuterskom predikcijom je uočeno prisustvo brojnih potencijalnih elemenata u 5' regulatornom regionu *gFeMT 4.1*, uključenih u odgovore na različite stimulse spoljašnje sredine.

EMSA ("*Electrophoretic Mobility shift assay*") i „DNAseI protection" esejima analizirana je interakcija proksimalnog regiona promotora sa prečišćenim transkripcionim faktorima tj. njihovim domenima Dof Δ C i HD-Zip-1, čime je potvrđena specifičnost potencijalnih Dof1- i Athb-1 – vezivnih mesta. Simultanim vezivanjem nuklearnih proteina i prečišćenog faktora Dof Δ C pokazano je takođe i da postoji kompeticija za ova vezivna mesta čime je nagovešteno postojanje Dof- sličnih faktora u nuklearnim ekstraktima listova heljde.

EMSA esejima analizirano je i vezivanje nuklearnih proteina za proksimalni kao i za distalni region promotora. Interakcija sa proksimalnim regionom rezultovala je u formiranju jednog visokomolekularnog kompleksa, dok je interakcija sa distalnim regionom bila složenija i pokazala formiranje pet kompleksa. Ovi rezultati ukazuju na kompleksnu regulaciju ekspresije u kojoj učestvuju brojni transkripcioni faktori koji se

vezuju za neke od potencijalnih regulatornih elemenata pretpostavljenih kompjuterskom analizom (Brkljačić, 2003).

Northern blot analizom ispitivana je tkivno specifična i inducibilna ekspresija. MT3 iRNK detektovana je u korenu, listu i semenu heljde (Brkljačić et al., 1999). U semenu su MT3 transkripti detektovani u značajnoj količini još u ranoj fazi sazrevanja, maksimum ekspresije detektovan je u srednjoj fazi, nakon čega količina transkripta opada. Visok nivo ekspresije detektovan je u zelenom listu i nešto slabiji u senescentnom. Ispitivan je i uticaj različitih stresnih uslova na nivo ekspresije. Izlaganje jonima Zn^{2+} i Cu^{2+} dovelo je do značajnog povećanja ekspresije u zelenom listu. Joni Zn^{2+} imali su stimulatívni efekat i na ekspresiju MT3 u semenu u ranoj fazi sazrevanja, ali nije uočen značajniji efekat u ostalim fazama sazrevanja. Izlaganje visokim koncentracijama H_2O_2 rezultovalo je u povećanju ekspresije u srednjoj fazi sazrevanja semena, ali je isti tretman doveo do smanjenja količine transkripta u zelenom listu. Na osnovu navedenih rezultata pretpostavljena je uloga MT3 heljde u procesima detoksifikacije od teških metala, održavanja homeostaze metalnih jona, kao i odbrane od oksidativnog stresa (Brkljačić et al., 2004).

5' regulatorni region genomskog klona gFeMT4.1, dužine 569 bp (od ATG kodona) kao i njegove 5' delecione varijante dužina 416 i 163 bp su funkcionalno analizirane u stabilno transformisanom *Arabidopsis*-u i duvanu. Sva tri testirana promotorska fragmenta su bila sposobna da vode ekspresiju reporterskog gena GUS u normalnim, neindukovanim uslovima, kako u biljkama gajenim u kulturi, tako i u aklimatizovanim biljkama T0 i T1 generacije gajenim u staklari. Aktivnosti različitih delova promotora nisu se međusobno statistički značajno razlikovale u neindukovanim uslovima.

Iz cDNK biblioteke semena u razviću, izolovana su još dva cDNK klona *FeMT3.5* (Gene bank acc. no. DQ681063) i *FeMT3.10* (Gene bank acc. no. DQ681064). Oba klona su sadržavala 61 bp 5' UTR i 189 bp kodirajućeg regiona, ali su im se dužine 3' UTR regiona značajno razlikovale - 62 bp i 229 bp. Uočeno je i postojanje razlika u nukleotidnim sekvencama od 3, 5 i 3 bazne zamene u okviru 5' UTR, kodirajućeg regiona i 3' UTR. Oba klona kodiraju protein dužine 62 AK, sa razlikom u tri AK (serin u fenilalanin, na poziciji 11; izoleucin u treonin na poziciji 28 i alanin u valin na poziciji 32).

CILJ RADA

Istraživanja na biljnim metalotioneinima još uvek su daleko iza saznanja dostupnih za sisarske metalotioneine, kako u oblasti poznavanja strukture i biohemijskih svojstava, tako i u razumevanju regulacije ekspresije i mogućih bioloških funkcija. Osim značajnih sličnosti sa sisarskim, biljni MT pokazuju i neke samo njima svojstvene osobine, što izaziva rastući interes za njihovo izučavanje.

U prethodnom periodu, pokazana je funkcionalnost izolovanog promotorskog regiona gena za MT tipa 3 heljde (*FeMT3*) u transgenim biljkama duvana u neindukovanim uslovima. Kako je, *in silico* analizom, uočen veliki broj potencijalnih *cis*-regulatornih elemenata, jedan od ciljeva ovog rada je ispitivanje regulacije aktivnosti ovog promotora pod uticajem odredjenih stresogenih faktora, kao i analiza promene nivoa transkripta *FeMT3* u listovima heljde pod uticajem jona metala.

Cilj ovog rada je i ispitivanje mogućih odbrambenih svojstava proteina kodiranog ovim genom u živim sistemima koji su izloženi visokim koncentracijama teških metala. Osim analize u prokariotskom sistemu *E.coli*, potrebno je potvrditi odbrambena svojstva *FeMT3* i u biljnom tkivu, odnosno u transgenim biljkama sa povišenim nivoom ekspresije ovog gena.

Ove analize bi trebalo da daju doprinos boljem razumevanju regulacije genske ekspresije i funkcija metalotioneina biljaka, a posebno njihovog mesta u odbrani biljnog tkiva od stresa izazvanog teškim metalima.

MATERIJAL I METODE

3.1 Rad sa bakterijama

3.1.1 Medijumi

Za uzgajanje bakterija korišćen je medijum LB, a SOC za oporavak bakterija nakon transformacije elektroporacijom.

LB 1% (w/v) tripton; 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) ekstrakt kvasca, pH podešen na 7,5 sa 2 M NaOH (Sambrook et al., 1989).

SOC 2% (w/v) tripton; 0,5% (w/v) ekstrakt kvasca; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glukoza (Hanahan, 1983).

Čvrsti medijumi su pravljani dodavanjem 1,5% w/v agara. U LB medijum za uzgajanje klonova *E. coli* sojeva DH5 α i BL21 transformisanih vektorima pETG-30A, pETG-20A i pGEX dodavan je antibiotik ampicilin u finalnoj koncentraciji 100 μ g/mL. Za gajenje BL21(DE3)pLysS dodavan je i hloramfenikol 34,5 μ g/mL. Za uzgajanje klonova *E. coli* soja DH5 α transformisanih vektorom pDONR201 dodavan je kanamicin 50 μ g/mL.

Netransformisani *A. tumefaciens* soja C58C1 gajen je u medijumima sa karbenicilinom 50 μ g/mL i rifampicinom 100 μ g/mL. Za selekciju i gajenje klonova ovog soja transformisanih vektorima pB2GW7,0 i pB7WGY2,0 dodavan je i spektinomicin u koncentraciji od 100 μ g/mL.

3.1.2 Bakterijski sojevi

Za kloniranje konstrukata korišćene su *E. coli* soja DH5 α TM:
 ϕ 80 Δ lacZ Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrAB*, *thi-1*, *hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺), *supE44*, *relA1*, *deoR*,
 Δ (*lacZYA-argF*) U169, *phoA*

Za ekspresiju rekombinantnih proteina GST i FeMT3-GST korišćene su *E. coli* soja
BL21 (DE3)pLysS (Promega): F⁻, *ompT*, *hsdSB* (rB⁻, mB⁻), *dcm*, *gal*, λ (DE3), pLysS,
Cam^r

Za transformaciju listova *Nicotiana debneyii* korišćen je *Agrobacterium tumefaciens*
soja C58C1.

3.1.3 Uzgajanje i održavanje bakterija

Bakterijski sojevi *E. coli* gajeni su u medijumu LB uz dodatak odgovarajućih
antibiotika na 37°C oko 16 h, uz mućkanje 180 obr/min ili na čvrstoj podlozi LB. Soj *A.*
tumefaciens-a C58C1 je gajen u LB medijumu sa odgovarajućim antibioticima na 28-
30°C oko 20 h. Petri šolje sa bakterijama su čuvane na +4°C i obnavljane na tri do četiri
nedelje, a za dugoročnu upotrebu, kulture bakterija su zamrzavane na -80°C u 15% (v/v)
glicerolu.

3.1.4 Priprema kompetentnih ćelija *E. coli* za "Heat shock" transformaciju

LB medijum (100 ml) je inokulisan sa kolonijama poraslim na čvrstoj podlozi.
Bakterije su gajene na 37°C uz intenzivnu aeraciju (180 obrt/min) do postizanja
OD₆₀₀=0,3-0,4. Rast bakterijske kulture zaustavljan je premeštanjem na led i
inkubiranjem 10-15 min. Od ovog momenta sve je rađeno na ledu, hladnim nastavcima i
rastvorima. Bakterije su centrifugirane 15 min na 6000 obrt/min u SS34 rotoru. Talog
ćelija je resuspendovan u 100 ml hladnog 0,1 M CaCl₂ i inkubiran na ledu 15 min i
centrifugiran 15 min na 6000 obrt/min u SS34 rotoru. Ćelije su resuspendovane u 8 ml

hladnog RF2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% glicerol, pH 6,8) i inkubirane na ledu 15 min, nakon čega su razdeljene u alikvotne od po 50 µl. Ovako pripremljene ćelije su brzo smrznute u tečnom azotu i čuvane na -70°C.

3.1.5 "Heat shock" transformacija bakterija *E.coli*

Alikvoti od po 50 µl kompetentnih bakterija, skladištenih na -70°C, su otopljeni na sobnoj temperaturi i inkubirani sa 50 ng vektora ili ligacione smeše na ledu 1h i mešani lupkanjem svakih 10 min. Smeša je inkubirana 90 s na 42°C u vodenom kupatilu i potom je brzo prebačena na led 5 min. Oporavak na 37°C u SOC medijumu, uz intenzivnu aeraciju (220 obrt/min), trajao je 1h 30 min, nakon čega su bakterije razmazivane na LA podloge sa 100 µg/ml ampicilinom i gajene na 37°C preko noći.

3.1.6 Priprema kompetentnih ćelija *Agrobacterium tumefaciens* za elektroporaciju

U 500 mL LB medijuma dodavano je 5 mL sveže prekonoćne kulture bakterija. Bakterije su gajene na 28°C uz mućkanje do postizanja OD₆₀₀ 0,3. Rast bakterijske kulture zaustavljan je premeštanjem na led i inkubiranjem od 15-30 minuta. Od ovog momenta sve je rađeno na ledu, hladnim nastavcima nastavcima i rastvorima. Bakterije su centrifugirane 15 minuta na 5000 obr/min u ohladjenom GSA rotoru. Talog ćelija je resuspendovan u 50 mL hladnog 1 mM HEPES-a, pH 7 i centrifugiran 15 minuta na 5000 obr./min u GSA rotoru. Ovaj korak je ponavljan još dva puta. Zatim su ćelije resuspendovane u 5 mL hladnog 10% glicerola i razdeljivane u porcije od po 40 µL u prethodno ohlađene ependorf tube. Ovako pripremljene ćelije su smrzavane u tečnom azotu i čuvane na -70°C, što je omogućilo njihovo korišćenje još narednih 6 – 12 meseci.

3.1.7 Elektroporacija ćelija *Agrobacterium-a*

Efikasnost elektroporacije je za nekoliko redova veličine veća od svih do sada poznatih hemijskih metoda za transformaciju i moguće je dobiti 10^9 - 10^{10} transformanata/ μg DNK. Stoga je ova metoda korišćena za transformaciju *Agrobacterium-a* koji se teže transformiše od *E.coli*.

Prethodno pripremljene kompetentne ćelije (aliquot od 40 μL) su otapane na sobnoj temperaturi, a zatim su prebacivane na led. U smešu kompetentnih ćelija ubacivan je odgovarajući vektor (100 – 200 ng) korišćenjem ohlađenih nastavaka, nakon čega je sledila inkubacija 5 min na ledu. Zatim je ova smeša prebacivana u hladne 0.2 cm kivete za elektroporaciju. Uslovi elektroporacije za “Gene pulser” Bio-Rad aparat su bili: 25 μF , 200 Ω i 2,5 kV. Po završenoj elektroporaciji u kivetu je brzo dodavan 1 ml SOC medijuma i ćelije su oporavljane 2-4 sata na 28°C, uz snažno mućkanje 225 obr/min. Zatim su različite količine transformacione smeše razmazivane na selektivnu podlogu i inkubirane dva dana na 28°C.

3.2 Osnovne procedure rada sa DNK

3.2.1 Izolovanje plazmida iz bakterija

Za izolovanje plazmidne DNK korišćeno je nekoliko metoda, u zavisnosti od toga da li je svrha bila analiza dobijenih klonova ili priprema plazmida za reakcije koje slede. Za analitičku svrhu korišćene su brze procedure za izolovanje plazmida iz tečne kulture ili direktno iz kolonija.

3.2.2 Izolovanje plazmida direktno iz bakterijskih kolonija

Pojedinačne kolonije prenošene su u ependorf epruvetu u kojoj se nalazi 25 μl 10 mM EDTA, pH 8,0. Dodavano je 25 μl 2 \times pufera (200 mM NaOH, 0,5% SDS, 20% saharoza). Smeša je resuspendovana snažnim mućkanjem i inkubirana 10 minuta na

70°C. Posle hlađenja do sobne temperature, smeši je dodavan 1,5 µL 4 M KCl i ostavljeno da stoji 5 minuta na ledu. Nakon centrifugiranja 3 minuta/13000 obr/min na 4°C, dobijeni supernatant koji je predstavljao izolat plazmida, analiziran je elektroforetski (na 1% agaroznom gelu).

3.2.3 Izolovanje plazmida iz tečne kulture u analitičke svrhe

Plazmidi su iz tečne kulture izolovani po brzjoj proceduri na sledeći način: 1,5 ml prekonoćne bakterijske kulture je kratko centrifugiran u mikrocentrifugi, a talog resuspendovan u 300 µl TENS pufera (1 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 M EDTA, pH 8,0; 10 M NaOH; 20% SDS). Potom je smeši dodavano 150 µl 3 M Na-acetata pH 5,2, smeša je promućkana i kratko centrifugirana 2 min. Supernatantu je dodavano 1 ml hladnog 96% etanola. Talog dobijen centrifugiranjem (10 min na 13000 obr/min) je ispiran 70% etanolom, sušen i rastvaran u 20 µl bidestilovane vode.

3.2.4 Izolacija plazmida u preparativne svrhe

Za preparativne svrhe korišćen je QiaMini Prep Kit (Qiagen), po uputstvu proizvođača. 1.5 ml prekonoćne kulture je kratko centrifugirano u minicentrifugi a bakterijski talog je resuspendovan u 250 µl pufera P1 koji obezbeđuje alkalne uslove za liziranje bakterija. Nakon dodavanja 250 µl pufera P2 i 350 µl pufera N3 koji obezbeđuju visoku koncentraciju soli za precipitaciju genomske DNK i vezivanje plazmidne DNK za silika kolonice, smeša je centrifugirana na 13000 obrt/min 10 min. Supernatant je nanošen na QIAprep Spin kolonice koje su potom centrifugirane na 13000 obrt/min 1 min. Kolona je zatim ispirana centrifugiranjem 60 s/13000 obr/min sa 500 µL pufera PB koji je uklanjao eventualnu nukleaznu aktivnost i time obezbeđivao veći prinos nedegradovane plazmidne DNK. Nakon toga, kolonice su ispirane puferom PE koji efikasno uklanja soli i centrifugirane na 13000 obrt/min 1 min. Dodatnim centrifugiranjem pod istim uslovima, eliminišu se tragovi etanola iz pufera PE, koji bi inhibirali enzimske reakcije na prečišćenim plazmidima. DNK je eluirana sa kolonica sa 50 µl vode. Ovako prečišćeni plazmidi su korišćeni za sekvenciranje i reakcija kloniranja. Sastavi pufera P1, P2, N3, PB i PE zaštićeni su od strane proizvođača.

3.2.5 Elektroforeza DNK na gelu od agaroze

Fragmenti DNK razdvajani su elektroforezom na gelu od agaroze (ultrapure electrophoresis grade: Gibco BRL, Life Technologies Ltd) koncentracije između 0,8 i 2% (w/v) u TAE puferu (0,04 M Tris-acetate; 1 mM EDTA), kao što je opisano u Sambrook *et al.*, 1989. U gel je dodavan etidijum bromid u koncentraciji 0,5 µg/ml. Raspon napona je bio od 5-10 V/cm gela. Posle završene elektroforeze, DNK je vizualizovana na UV transiluminatoru na talasnoj dužini od 266 nm. DNK marker, korišćen kao standard u svim elektroforetskim analizama je bio „1 kb+ ladder“ (Invitrogen).

3.2.6 Prečišćavanje fragmenata DNK sa gela od agaroze

Za prečišćavanje DNK sa agaroznog gela korišćen je QIAEXII Gel Extraction Kit (Qiagen). DNK je razdvajana elektroforezom na 1,5% gelu. Nakon elektroforeze, fragmenti DNK od interesa su isecani i inkubirani u 3 zapremine QX1 pufera u odnosu na zapreminu gela (100 mg u 300 µl), a zatim je smeši dodavano 10 µl QIAEX II partikula. Nakon ovog postupka sledila je inkubacija na 50°C, 10 min i za to vreme smeša je dodatno mućkana svaka 2-3 min radi boljeg rastvaranja gela. Uzorak je centrifugiran 1 min na 13000 obrtaja/min i pažljivo je uklanjana tečna faza. Talog je mućkanjem rastvoren u 500 µl QX1 pufera, a zatim je sledilo centrifugiranje 1 min na 13000 obrtaja/min. Tečna faza je pažljivo uklonjena čime je uzorak oslobođen ostataka agaroze. Talog je ponovo rastvoren mućkanjem u 500 µl PE pufera koji sadrži etanol, a zatim je uzorak centrifugiran 1 min na 13000 obrtaja/min. Poslednji korak je ponovljen, pri čemu su ovim postupkom iz uzorka uklonjeni ostaci soli. Tečna faza je pažljivo uklanjana automatskom pipetom, do poslednje kapi, kako bi se uzorak oslobodio viška etanola koji bi inhibirao enzimske reakcije. Talog je sušen na vazduhu sve dok nije postao bele boje, a zatim je rastvaran u 20 µl 10 mM Tris, pH 8,0 ili u H₂O i inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi da bi se DNK eluirala sa QIAEXII partikula. Nakon centrifugiranja 1 min na 13000 obrtaja/min, supernatant koji je sadržavao prečišćenu DNK je prebacivan u čistu plastičnu tubu.

3.2.7 Taloženje DNK etanolom

Taloženje DNK je vršeno dodavanjem 1/10 volumena 3 M Na-acetata i 2,5 volumena hladnog 99% etanola. Nakon prekoćne precipitacije na -20°C, rastvor je centrifugiran 30 min na 13000 obr/min u mikrocentrifugi na 4°C. Višak soli je odstranjivan ispiranjem taloga DNK hladnim 70% etanolom, a zatim je DNK sušena pod vakuumom i resuspendovana u bidestilovanoj vodi.

3.2.8 Sekvenciranje DNK

Svi klonovi u "Expression" vektorima su provereni sekvenciranjem DNK, koje je rađeno na kapilarnom sekvenceru ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems) na Univerzitetu u Padovi, Italija (<http://www.bmr-genomics.it>).

3.2.9 Kompjuterska analiza sekvenci

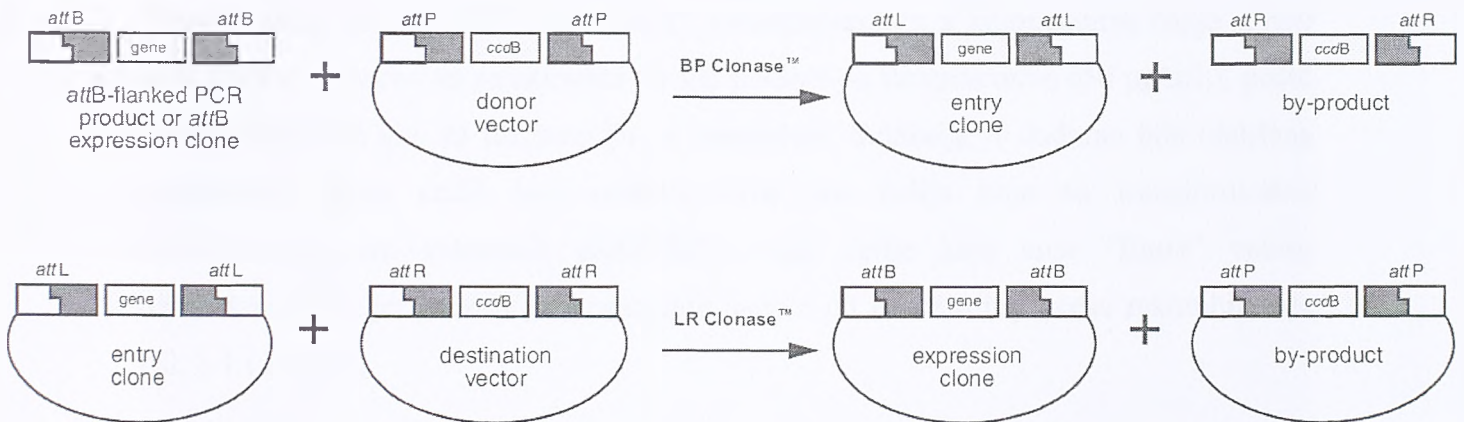
Za poređenje sekvenci sa sekvencama iz GenBank baze podataka korišćen je BLAST search program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Za predviđanje regulatornih elemenata promotora korišćene su tri baze podataka: MatInspector professional (<http://www.genomatix.de>), PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp>) i PlantCARE (<http://sphinx.rug.ac.be:8080>).

3.3 Kloniranje korišćenjem Gateway tehnologije

Kloniranje konstrukata u odgovarajuće vektore za ekspresiju rekombinantnog proteina u *E.coli* i transformaciju biljaka cDNK klonovima FeMT3.10 i FeMT3.5 urađeno je korišćenjem Gateway sistema (Invitrogen).

Ova tehnologija se zasniva na mesto-specifičnim rekombinacijama koje obavljaju enzimi uključeni u integraciju lambda bakteriofaga u hromozom *E.coli* i prelazak iz lizogenog u litički ciklus i obrnuto.

Za rekombinaciju je neophodno postojanje specifičnih sekvenci (*att*) na molekulima DNK koji se rekombinuju. Postoje četiri *att* sekvence: *attB*, *attP*, *attL* i *attR*. Enzimi "BP Clonase mix" (Integraza λ faga i Integration Host Factor iz *E. coli*) omogućavaju rekombinaciju *attB* i *attP* dajući nove konstrukte sa mestima *attL* i *attR*. Enzimi "LR Clonase mix" (Integraza i ekscizionaza λ faga i Integration Host Factor iz *E. coli*) omogućavaju rekombinaciju *attL* i *attR* dajući nove konstrukte sa mestima *attB* i *attP* (Sl. 3.1)

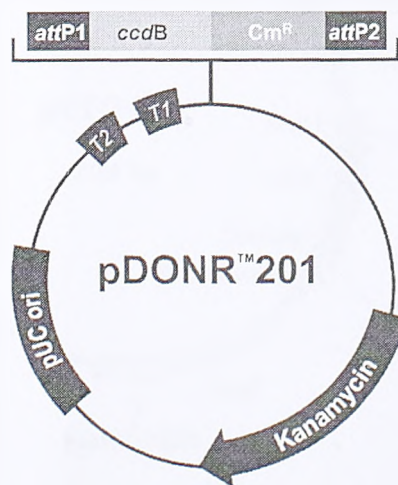


Slika 3.1 Princip Gateway tehnologije kloniranja.

Prvi korak u kloniranju predstavljalo je umnožavanje željenog fragmenta pomoću prajmera kojima se na krajeve PCR produkta uvodi *attB* sekvenca. Ovako pripremljeni fragmenti rekombinovani su sa donor-vektorom pDONR201 koji sadrži *attP* sekvence. Na ovaj način stvarani su "Entry" vektori koji su sadržavali fragmente od interesa oivičene *attL* sekvencama. U sledećoj reakciji "Entry" vektori su rekombinovani sa željenim "Destination" vektorima koji su sadržavali *attR* sekvence, a rezultat su bili različiti "Expression" vektori. Prednost ovog načina kloniranja je što se jedan "Entry" vektor može rekombinovati sa više različitih "Destination" vektora, tako da se jedan isti genski fragment može uklonirati u vektore koji će omogućiti njegovu ekspresiju u *E. coli*, kvascima ili u biljnom tkivu u fuziji sa različitim tagovima.

3.3.1 BP reakcije i dobijanje "Entry" vektora

Nakon PCR umnožavanja u kojima su na krajeve fragmenata uvedena attB mesta, PCR proizvodi su razdvajani na 2% agaroznom gelu i prečišćavani iz gela korišćenjem kita QIAEXII Gel Extraction Kit (Qiagen). BP reakcija je sadržavala 100 ng vektora pDONR201, 1-2 μ l prečišćenog PCR proizvoda sa attB sekvencama na krajevima, 1 μ l 5x "BP clonase reaction" pufera i 1 μ l "BP Clonase" enzimskog miksa u ukupnoj zapremini od 5 μ l (količine vektora pDONR201 i PCR proizvoda su bile približno ekvimolarne). Nakon inkubacije od 1h na 25°C reakcija je stopirana dodavanjem 0.5 μ l proteinaze K (2 μ g/ μ l) i držanjem 10 min na 37°C. Ovako dobijeni "Entry" vektori su ubačeni "heat shock" transformacijom u kompetentne ćelije *E.coli* soja DH5 α a klonovi su selektovani na LB podlozi sa kanamicinom (50 μ g/mL), pošto pDONR201 nosi gen za rezistenciju na kanamicin. Selekcija je dodatno bila olakšana postojanjem gena *ccdB* koji onemogućava rast ćelija koje su transformisane nerekombinovanim vektorom pDONR201, dok ćelije koje nose "Entry" vektor neometano rastu jer je ovaj gen zamenjen genom od interesa u procesu rekombinacije (Sl. 3.1 i Sl. 3.2).



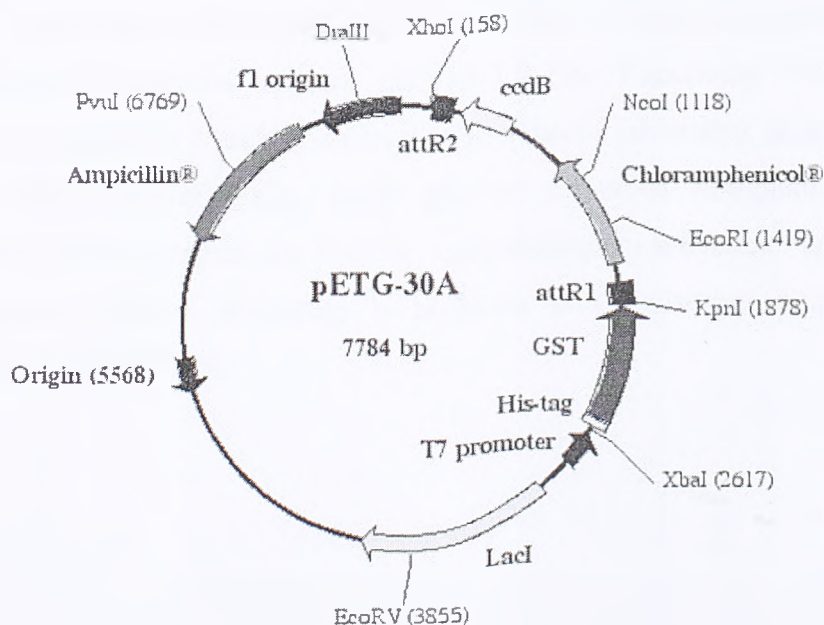
Slika 3.2 Shematski prikaz vektora pDONR201 (Invitrogen).

3.3.2 LR reakcije i dobijanje "Expression" vektora

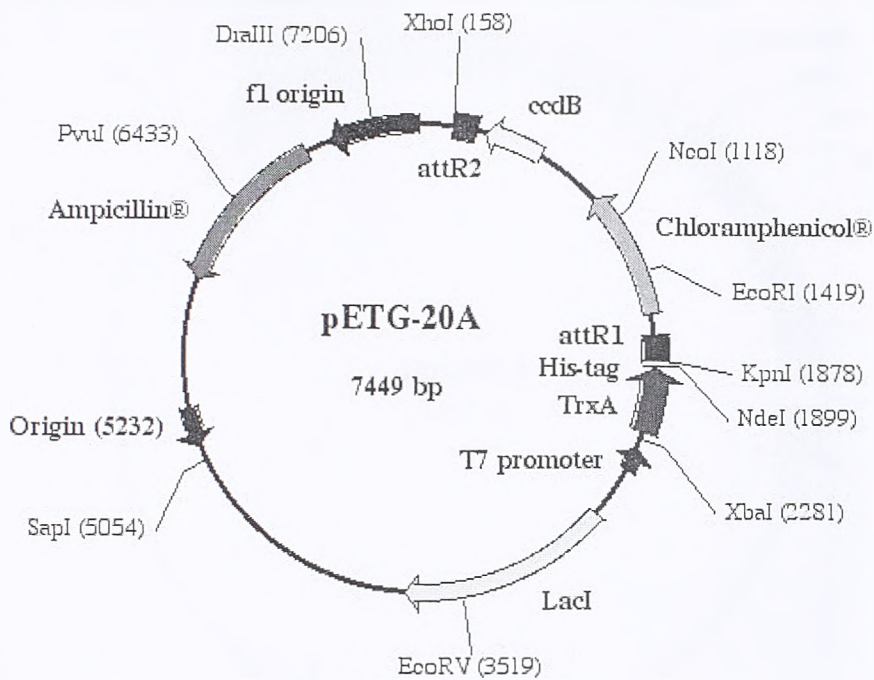
LR reakcije su sprovedene na sličan način kao BP reakcije, korišćenjem približno iste količine "Entry" i "Destination" vektora, 1 μ l "LR Clonase" enzimskog miksa i 1 μ l LR pufera u ukupnom volumenu od 5 μ l. *E. coli* su transformisane "heat shock" procedurom, a klonovi su selektovani na čvrstim LB podlogama sa odgovarajućim antibioticima (u zavisnosti od "Destination" vektora).

Za ekspresiju rekombinantnog FeMT3 u fuziji sa His i GST (glutation S transferaza) tagom, u *E. coli* BL21, korišćen je "Destination" vektor pETG-30A (sl. 3.3), a za ekspresiju FeMT3 u fuziji sa His i TRX (tiodoksins) tagom vektor pETG-20A (sl. 3.4).

Oba vektora imaju gen za rezistenciju na ampicilin, te je ovaj antibiotik korišćen za selekciju klonova. Nakon rekombinacije gen za rezistenciju na hloramfenikol i *ccdB* za negativnu selekciju, koji su se nalazili između dva mesta *attR*, su bili izbačeni, a na njihovo mesto je bila ubačena kodirajuća sekvenca *FeMT3*, u istom okviru čitanja kao tagovi koji se nalaze uzvodno od nje.

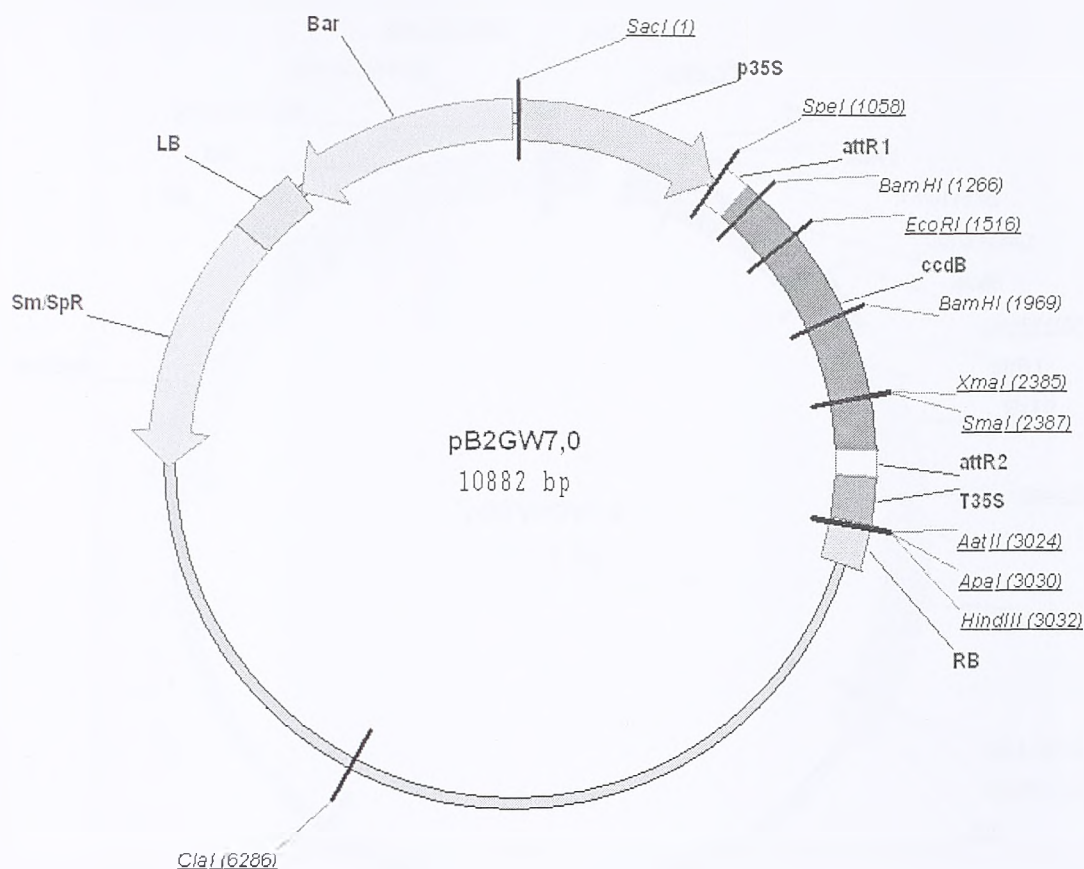


Slika 3.3 Shematski prikaz vektora pETG-30A



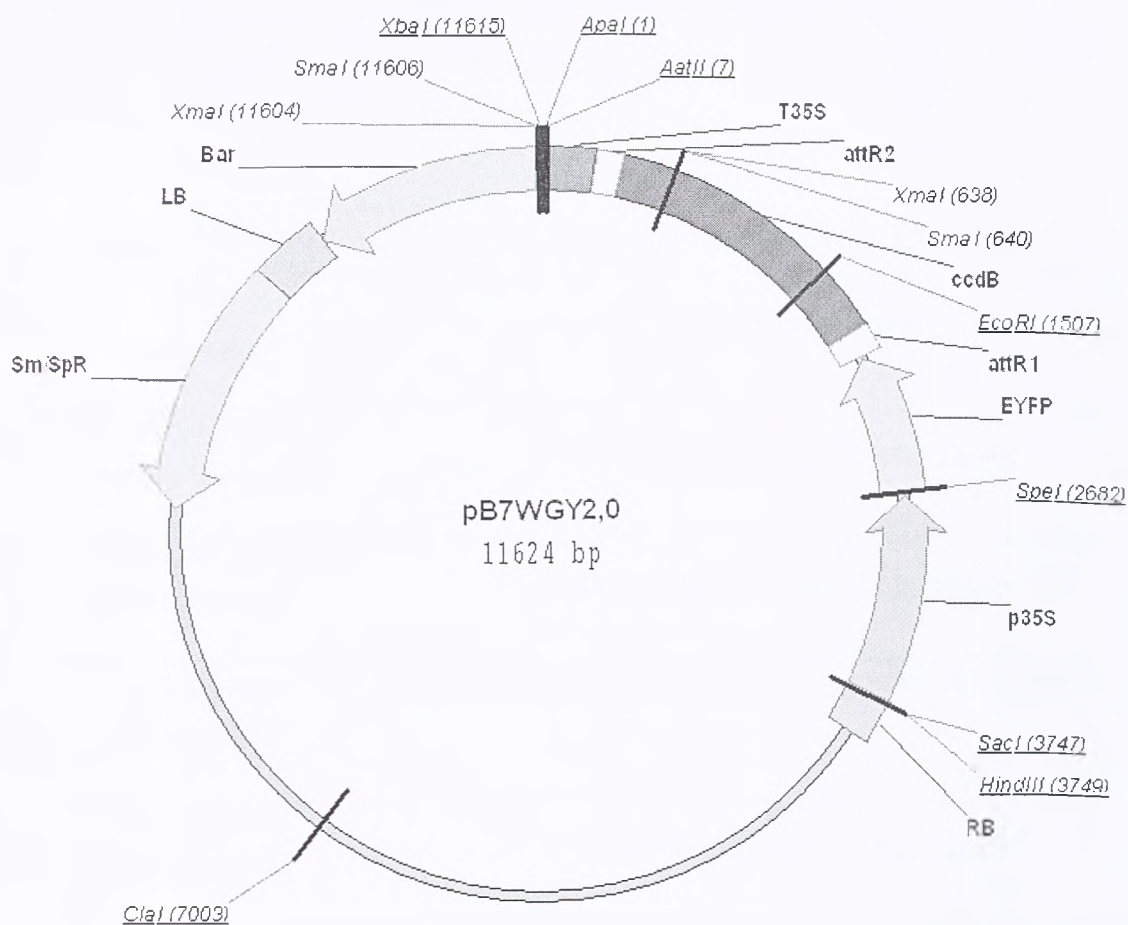
Slika 3.4 Shematski prikaz vektora pETG-20A

Za pojačanu ekspresiju FeMT3 u duvanu *N. debneyii*, korišćen je konstrukt u "Destination" binarnom vektoru pB2GW7,0 (the Functional Genomics unit of the Department of Plant Systems Biology (VIB-Ghent University), (Karimi et al., 2002) (sl. 3.5). Nakon rekombinacije, *ccdB* gen je zamenjen kompletnim cDNK klonom FeMT3.10 (obuhvatajući ceo 5' UTR, celu kodirajuću sekvencu i ceo 3' UTR), čime je omogućena njegova ekspresija u biljkama pod vođstvom konstitutivno aktivnog promotora PCaMV35S.



Slika 3.5 Shematski prikaz "Destination" vektora pB2GW7,0. LB, RB - "left border", "right border" (sekvence koje ograničavaju T-DNK koja se u procesu transformacije prenosi u biljne ćelije); p35S – konstitutivni promotor gena CaMV35S; T35S – terminator transkripcije iz gena CaMV35S; Bar – gen za rezistenciju na herbicid Basta; Sm/SpR – gen za rezistenciju na streptomycin/spektinomycin, za selekciju u bakterijama.

Za praćenje unutarćelijske lokalizacije FeMT3 u duvanu *N. debneyii*, korišćen je konstrukt u "Destination" binomnom vektoru pB7WGY2,0 (the Functional Genomics unit of the Department of Plant Systems Biology (VIB-Ghent University) (sl. 3.6). Nakon rekombinacije, ccdB gen je zamenjen cDNK klonom FeMT3.10 ili FeMT3.5 (obuhvatajući cele kodirajuće sekvence i cele 3' UTR), čime je omogućena njihova ekspresija u biljkama u fuziji sa fluorescentnim proteinom EYFP ("enhanced yellow fluorescent protein") pod vođstvom konstitutivno aktivnog promotora PCaMV35S.



Slika 3.6 Shematski prikaz "Destination" vektora pB7WGY2,0. LB, RB - "left border", "right border" (sekvence koje ograničavaju T-DNK koja se u procesu transformacije prenosi u biljne ćelije); p35S – konstitutivni promotor gena CaMV35S; T35S – terminator transkripcije iz gena CaMV35S; EYFP - "enhanced yellow fluorescent protein"; Bar – gen za rezistenciju na herbicid Basta; Sm/SpR – gen za rezistenciju na streptomycin/spektinomycin, za selekciju u bakterijama.

Konstrukti u binarnim vektorima pB2GW7,0-FeMT3.10, pB7WGY2,0-FeMT3.10 i pB7WGY2,0-FeMT3.5 prvo su umnožavani u *E.coli* DH5 α , a zatim prebacivani u *A. tumefaciens* C58C1 kojim su transformisani listovi duvana. Selekcija bakterijskih klonova je izvođena na LB podlogama sa 100 μ g/mL spektinomicina.

3.3.3 PCR reakcije za uvođenje attB mesta na krajeve fragmenata od interesa

Prajmeri i njihovo korišćenje u kloniranju dati su u tabelama 3.1 i 3.2.

Naziv	Mesto vezivanja	Sekvenca prajmera
DM1	Kodirajući region FeMT3 "forward"	5'-tattttcagggcatgtcgtccaactgcggaag-3'
DM2	Kodirajući region FeMT3 "reverse"	5'- <u>agaaagctgggtctcaatggcaaccgcatgagcag</u> -3'
DM3	Sekv. uvedena prajmerom DM1	5'-ggggacaagttgtacaaaaagcaggctctgagaatctttatttcagggc-3'
DM4	Sekv. uvedena prajmerom DM2	5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggt-3'
DM5	5'UTR klona FeMT3.10	5'- <u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggctgaacatcaaagcaaatcacttcttacttc</u> -3'
DM6	3'UTR klona FeMT3.10	5'- <u>ggggaccactttgtacaagaaagctgggtgtacaatagaaacatcattagtcc</u> -3'
DM7	Kodirajući region FeMT3 "forward"	5'- <u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggctcaat</u> gtcgtccaactgcggaag-3'
DM8	3'UTR klona FeMT3.5	5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtagaaacatcattagttcacacgac-3'

Tabela 3.1. Prajmeri korišćeni za kloniranje Gateway sistemom. Podvučene sekvence su attB mesta. Masnim slovima su označeni start i stop kodoni.

Par prajmera	Umnoženi region	Konstrukti u "Expression"vektorima	Svrha
DM1/DM2 i DM3/DM4	Kodirajući region <i>FeMT3.10</i> (acc.no._DQ681064)	pETG-30A-FeMT3 i pETG-20A-FeMT3	Ekspresija rekombinantnog proteina FeMT3 u fuziji sa tagovima His i GST ili TRX
DM5/DM6	Kompletan cDNK klon <i>FeMT3.10</i>	pB2GW7,0-FeMT3.10	Prekomerna ekspresija FeMT3 u listovima <i>N. debneyii</i>
DM6/DM7	Kodirajući i 3'UTR klona <i>FeMT3.10</i>	pB7WGY2,0-FeMT3.10	Ekspresija fuzije EYFP- <i>FeMT3.10</i> u listovima <i>N. debneyii</i> , u cilju praćenja unutarćelijske lokalizacije
DM7/DM8	Kodirajući i 3'UTR klona <i>FeMT3.5</i> (acc.no._DQ681063)	pB7WGY2,0-FeMT3.5	Ekspresija fuzije EYFP- <i>FeMT3.5</i> u listovima <i>N. debneyii</i> , u cilju praćenja unutarćelijske lokalizacije

Tabela 3.2. Upotreba parova prajmera.

PCR reakciona smeša je u slučaju umnožavanja parova prajmera DM5/DM6, DM6/DM7 i DM7/DM8 sadržavala: 0,5µM svakog prajmera, dNTP miks (0,2 mM svaki), HF pufer (koji obezbeđuje finalnu koncentraciju MgCl₂ 1.5 mM u reakciji) i 0,02 u/µL Phusion High-Fidelity polimeraze (BioLabs).

Uslovi PCR reakcije za ove parove prajmera su bili:

inicijalna denaturacija na 98°C/1 min

denaturacija	98°C/ 15 s	}	5X
aniling	50°C/ 45 s		
ekstenzija	72°C/ 15 s		

denaturacija	98°C/ 15 s	}	20X
aniling	66°C/ 30 s		
ekstenzija	72°C/ 15 s		

finalna ekstenzija 72°C/ 10 min

Za kloniranje pETG-30A-FeMT3 i pETG-20A-FeMT3 umesto jednog korišćena su dva para prajmera u dvostepenoj PCR reakciji, jer bi u suprotnom "forward" prajmer bio previše dugačak, i kloniranje problematično.

Prva reakcija (ukupnog volumena 25 µl) je sadržavala po 0,2 µM svakog od prajmera DM1 i DM2, matricu cDNK klon FeMT3.10 (10 ng), dNTP miks (0,2 mM svakog), 1x HF pufer (koji obezbeđuje finalnu koncentraciju MgCl₂ 1.5 mM u reakciji) i 0,02 u/µL Phusion High-Fidelity polimeraze (BioLabs).

Uslovi 1. reakcije su bili:

inicijalna denaturacija na 98°C/1 min

denaturacija	98°C/ 15 s	}	5X
aniling	57°C/ 45 s		
ekstenzija	72°C/ 15 s		

denaturacija	98°C/ 15 s	}	5X
aniling	64°C/ 30 s		
ekstenzija	72°C/ 15 s		

Druga reakcija je sadržavala po 0,8 µM svakog od prajmera DM3 i DM4, 5 µl PCR proizvoda prve reakcije, a ostale komponente su bile u istim finalnim koncentracijama kao za prvu reakciju.

Uslovi 2. reakcije su bili:

inicijalna denaturacija na 98°C/1 min

denaturacija	98°C/ 15 s	}	5X
aniling	45°C/ 45 s		
ekstenzija	72°C/ 15 s		

denaturacija	98°C/ 15 s	}	25X
aniling	52°C/ 45 s		
ekstenzija	72°C/ 15 s		

finalna ekstenzija 72°C/ 10 min

3.4 Osnovne procedure rada sa RNK

3.4.1 Izolovanje ukupne RNK

RNK iz listova heljde i duvana je izolovana korišćenem kita QIA Rneasy (Qiagen). 100 mg lista je zamrzavano u tečnom azotu i mleveno u fini prah, a zatim pre nego što se otopi rastvarano u 450 μ L RLT pufera (sa dodatim 4,5 μ L β -merkaptoetanolu). Nakon kratkog zagrevanja na 56°C/2 min suspenzija je prebacivana u Qia shreder kolonice i centrifugirana 2 min/13000 obr/min u cilju homogenizacije tkiva. Supernatant je u novoj tubici mešan sa 250 μ L etanola u cilju precipitacije RNK, a zatim prebacivan u Qia kolonice i centrifugiran kratko, da bi se RNK vezala za kolonicu. Vezana RNK je ispirana centrifugiranjem u puferu RW1 (700 μ L) i dva puta u puferu RPE koji sadrži etanol (2x500 μ L). Višak etanola je uklanjan centrifugiranjem u novim tubicama 1 min. RNK ja eluirana u 50 μ L "nuclease free" vode. Sastavi pufera RLT, RW1 i RPE su zaštićeni od strane proizvođača.

Koncentracija RNK je određivana spektrofotometrijski, merenjem apsorbancije na 260 nm, pri čemu jedna optička jedinica odgovara koncentraciji RNK od 40 μ g/ml. Kvalitet izolovane RNK proveravan je elektroforezom na denaturišućem gelu od agaroze. RNK je čuvana na -70°C.

3.4.2 Elektroforeza RNK na denaturišućem gelu od agaroze

Zbog sekundarne strukture RNK koja utiče na njenu pokretljivost, elektroforeza se mora vršiti u denaturišućim uslovima. Sastav gela je: 1% agarosa, 1x MOPS pufer, 3,7% formaldehid. Elektroforeza je vršena u 1x MOPS puferu (20 mM MOPS; 1 mM EDTA; 5 mM NaOAc, pH 7,0). Uzorci za elektroforezu dobijani su mešanjem RNK resuspendovane u vodi sa puferom za uzorak (73% formamid; 14,5% MOPS puffer; 12,5% formaldehid) u odnosu 1:3 i denaturacijom u trajanju od 5 min na 65°C. Uzorci su zatim stavljeni na led i dodavana je boja BPB (0,25% bromfenol plava boja; 40% saharoza) i 1 µl etidijum bromida (0,5 mg/ml). Za elektroforezu RNK upotrebljavan je napon od 5 V/cm, a po završenoj elektroforezi gelovi su fotografisani na UV transiluminatoru. Kvalitet izolovane RNK proveravan je na osnovu odnosa intenziteta traka koje odgovaraju 26S i 18S biljnih rRNK, koji bi trebalo da bude 2:1. U slučaju izolata RNK iz lista pojavljuju se i rRNK hloroplasta – 23S i 16S.

3.4.3 Uklanjanje DNK iz uzoraka RNK

Kitom RNAeasy (Qiagen) izoluje se samo RNK, ali je česta pojava zaostatka malih količina genomske DNK. Stoga je pre cDNK sinteze kontaminacija gDNA uklanjana iz RNK uzoraka upotrebom kita DNA-free Dnase Treatment and Removal Reagents (Ambion). U potpunosti je poštovano uputstvo proizvođača.

3.4.4 Sinteza cDNK

Za sintezu prvog lanca korišćen je 1µg RNK. Sinteza je izvršena korišćenjem reverzne transkriptaze M-MuLV (BioLabs) i odgovarajućeg pufera preporučenog od strane istog proizvođača. 1µg RNK inkubirano je sa 10 µM „random hexamer“ prajmera (Applied Biosystems), 2 min na 70°C. Smeša je zatim prebacivana na led 2 min i potom kratko centrifugirana. Dodat je 1µL 10X M-MuVL pufera pH 8,3 (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ 50 mM ditiotritol) (BioLabs), 1µL 10 mM dNTP smeše i 200 U M-MuLV reverzne transkriptaze (Biolabs), i "nuclease free" voda po potrebi do finalne zapremine od 10 µL. Reakcija je tekla 1h 30 min na temperaturi od 37°C, a potom je zaustavljena inkubiranjem na 75°C/ 10 min.

3.5 "Reverse Transcriptase" PCR

3.5.1 RT-PCR i provera kvaliteta cDNK

Pre izvođenja Real-time PCR analize sve dobijene cDNK prvo su proveravane običnom RT-PCR metodom. Uzorci cDNA dobijeni kao što je opisano u odeljku 3.4.4 su razblaženi 5 puta u „nuclease-free” vodi. Reakciona smeša PCR (25 μ L) sadržavala je: 1 μ l razblažene cDNK, 0,4 μ M svakog od prajmera, 0,2 mM dNTP smeše (0,2 mM svakog dNTP), 2,5 mM MgCl₂, pufer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,08% Nonidet P40) i 0,04 U/ μ L enzima Taq polimeraze (Fermentas).

Parovi prajmera specifični za gene za aktin (5'-ggtaacattgtgctcagtggtgg-3' i 5'-ctcggccttgagatccacatc-3'), histon H3 (H3F 5'-gaaatcgcaagtaccagaagag-3' i H3R 5'-ccaacaaggtatgcctcagc-3') i 26S rRNK (26Sf: 5'-attcccaacaacccgactc-3'; 26Sr: 5'-gccgtccgaattgtagtctg-3') su testirani kako bi se utvrdilo da li su pogodni kao endogena kontrola. Sekvence prajmera za aktin su preuzeti iz rada (Ha et al., 1999). Prajmeri za histon su dizajnirani na osnovu sekvence gena za H3 duvana, uzimajući regione koji su najviše konzervirani, tj. pokazuju najveću homologiju sa genima iz ostalih biljnih vrsta.

Prajmeri korišćeni za utvrđivanje prisustva transkripta gena *FeMT3* su bili: "forward" MT10F (5'-ggggctgtgtgaaactaatgataggtc-3') FeMT3.10 i "reverse" MT10R (5'-gaacatacacagagaagggggaagg-3') koji se vezuju za 3'UTR klona FeMT3.10 (acc.no. DQ681064) i specifični su za njega (ne umnožavaju klon FeMT3.5). Dizajnirani su tako da umnožavaju region od oko 150 bp kao i prajmeri za histon H3 i 26S rRNK koji su bili izabrani za endogenu kontrolu.

Profil reakcije je bio sledeći:

inicijalna denaturacija na 95°C/3 min	
denaturacija 95°C/ 20 s	} 30X
aniling 60°C/ 30 s	
ekstenzija 72°C/ 1 min	
finalna ekstenzija 72°C/ 10 min	

cDNK su proveravane i na eventualno prisustvo genomske DNK, koja ne treba da se nalazi u uzorku. Provera je vršena korišćenjem prajmera koji umnožavaju gen za

aspartičnu proteinazu (Timotijević, 2009) P284 3`-agtttgacgggatacttgggcttg-5` i P952 3`- tgcattcctggctcactacacc-5`.

Budući da se mesta vezivanja ovih prajmera nalaze na različitim egzonima ovog gena, na genomskoj DNK se dobija umnožak od 1412 bp, a na cDNK 399 bp, tako da su za dalji rad uzimane cDNK u kojima nije bilo umnožavanja na dužini od 1412 bp. Uslovi reakcije su bili kao za prajmere MT10F/MT10R osim što je korak elongacije bio produžen na 1min 30sec zbog dužine eventualnog umnoška na genomskoj.

cDNK u kojima je primećen zaostatak genomske DNK nisu korišćene, nego je na istim uzorcima RNK ponovljen proces uklanjanja kitom DNase Treatment and Removal (Ambion), i cDNK sintetisana ponovo.

3.5.2 Real-time PCR

Uzorci cDNA su rastvoreni u odnosu 1:25 u „nuclease-free” vodi. Isti alikvoti cDNK uzoraka su korišćeni za Real-time PCR sa prajmerima dizajniranim i za *FeMT3* (prajmeri MT10F/ MT10R) i za histon 3 (H3F/H3R) koji je predstavljao referentni gen (odeljak 3.5.1). Heljdina 26S rRNA je takođe korišćena kao dodatni referentni gen u RT Real-time PCR eksperimentima. Reakcije su izvođene u zapremini od 25 μ L i sadržavale su 0,4 μ M svakog od prajmera, 1x SYBER Green PCR master mix (Applied Biosystems) i 5 μ L 25x razblažene cDNK matrice. 26S rRNA prjmeri su korišćeni u koncentraciji od of 50 nM. Real-time PCR je izvođen na aparatu ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem) i to pri parametrima preporučenim od strane proizvođača (2 minuta na 50°C, 10 minuta na 95°C i 40 ciklusa 95°C 15 sekundi i 60°C 1 min). Svaka PCR reakcija je rađena u triplikatu, a u eksperiment su kao negativne kontrole bile uključene reakcije koje nisu sadržavale matricu. Rezultati su analizirani pomoću 7500 System Software (Applied Biosystems) programa i normalizovani su kao $2^{-\Delta Ct}$, gde je ΔCt razlika između Ct vrednosti *FeMT3* i referentnog gena. Na graficima u Rezultatima su prikazan odnos između normalizovanog nivoa *FeMT3* u tretmanu u odnosu na kontrolu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Serijska razblaženja cDNK po dva puta korišćena su za standardnu krivupri čemu je izračunata efikasnost za MT10F/R prajmere bila 1.85, za H3F/R prajmere 1,92, a za 26Sf/r 2,05 (2 odgovara efikasnosti 100%). Specifičnost svake reakcije proveravana je analizom krive topljenja.

3.6 Osnovne procedure rada sa proteinima

3.6.1 Određivanje koncentracije proteina

Određivanje koncentracije proteina rađeno je po (Bradford, 1976). 5-10 μL proteinskog ekstrakta mešano je sa 790 - 795 μL vode i 200 μL Bradford reagensa (Bio-Rad). Koncentracija proteina određivana je merenjem apsorbancije A_{595} na spektrofotometru Amersham Biosciences Ultrospec 3300 pro.

3.6.2 Ekspresija rekombinantnog proteina

Za ekspresiju rekombinantnih GST-FeMT3, Trx-FeMT3 i GST proteina korišćene su *E.coli* soja BL21pLysS transformisane vektorima pETG-30A- FeMT3, pETG-20A- FeMT3 i pGEX. LB medijum koji je sadržavao ampicilin 100 $\mu\text{g/ml}$ i hloramfenikol 34.5 $\mu\text{g/ml}$ je inokulisan sa prekonoćnom kulturom (1:10) i intezivno mućkan na 37°C do postizanja OD_{600} od 0,5. Ekspresija je bila indukovana dodavanjem IPTG do finalne koncentracije od 1 mM. Kulture su inkubirane na 30°C/220obr/min/ 3 h. Čelije su sakupljene centrifugiranjem u minicentrifugi na 13000 obr/min/ 15 min.

Za prvi skrining i odabir klonova koji imaju najveću produkciju rekombinantnog proteina, dobijeni talozi su rastvarani u denaturišućem puferu B, pH8 (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 8M urea) a lizati (15 μL) su razdvajani na SDS PAGE.

Za utvrđivanje da li se eksprimirani protein nalazi u solubilnoj frakciji ili precipitiran u inkluzionim telima, ekspresija proteina je indukovana po istoj proceduri u odabranim klonovima ali je nakom centrifugiranja talog rastvoren u nativnom puferu, pH8 (50mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol) i sonifikovan tri puta po 10 s na ledu. Nakon centrifugiranja 13000obr/min/20 min, supernatant (rastvoreni proteini) je odvojen, a talog u kome se nalaze precipitirani proteini je rastvoren u denaturišućem puferu B. Supernatant i rastvoreni talog (po 20 μL) su razdvajani na SDS PAGE.

Kako se veliki deo eksprimiranog proteina nalazio u solubilnoj frakciji, protein u cilju izolacije i prečišćavanja eksprimiran po sledećoj proceduri:

50 mL LB medijuma (ampicilin 100 $\mu\text{g/ml}$, hloramfenikol 34.5 $\mu\text{g/ml}$) je inokulisan sa 5 mL prekonoćne kulture (1:10) i intezivno mućkan na 37°C do postizanja OD_{600} od 0,5. Ekspresija je bila indukovana dodavanjem IPTG do finalne koncentracije

od 1 mM. Kulture su inkubirane na 30°C/220obr/min/ 3 h. Čelije su sakupljene centrifugiranjem na 5000 x g na sobnoj temperaturi 15 min. Istaložene bakterije su rastvarane u puferu PBS pH 7,3 (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) uz dodavanje 1 mM DTT koji stvara redukujuće uslove i sprečava degradaciju metalotioneina koji su osetljivi na oksidaciju, kao i koktela proteinaznih inhibitora. Nakon razbijanja ćelija sonifikacijom (3x10s), usledilo je obaranje ostataka ćelija na 5000 g/15 min/RT. Supernatant je držan na ledu.

Rekombinantni GST-FeMT3 je prečišćen na rezinama sa vezanim glutationom (GE Healthcare), zahvaljujući GST tagu koji vezuje GSH. Rezine su pripremljene po uputstvu proizvođača ispiranjem 1x u etanolu i 3x u puferu PBS pH 7,3. Na talog rezina nanošen je supernatant proteina i inkubiran mešanjem na +4°C preko noći. Nakon centrifugiranja (500g/5 min), talog sa vezanim rekombinantnim proteinom je ispiran u 5 puta većem volumenu pufera PBS (mešanje, centrifugiranje 500g/5 min, odlivanje supernatanta), tri puta. Elucija proteina je vršena elucionim puferom pH8 (50 mM Tris-HCl, 10 mM redukobani GSH) mešanjem 20 min na sobnoj temperaturi.

Prečišćeni protein GST-FeMT3 je proveravan na SDS gelu, a njegova specifičnost potvrđena Western blott analizom korišćenjem anti-His antitela, pošto se ovaj tag takođe nalazi u rekombinantnom proteinu (sl. 3.3).

3.6.3 SDS-PAGE

Proteinski ekstrakti vizuelizovani su SDS-PAGE metodom koja je vršena u diskontinuiranom sistemu gelova (modifikacija metode po (Laemmli, 1970)). U ovim eksperimentima korišćena je Biometra aparatura za vertikalnu elektroforezu. Proteinski uzorci su pripremani tako što su rastvarani u puferu za uzorak, sledećeg sastava: 125 mM Tris, pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 0,025% boja bromfenol plavo. Ovako pripremljeni uzorci su kuvani 3 min na 100° C.

Gel za koncentrovanje je sadržavao 125 mM Tris, pH 6,8; 0,1% SDS i 5% akrilamid. Smeša akrilamida i bisakrilamida za gelove pripremana je kao 30% rastvor (odnos akrilamida i bisakrilamida 29:1). Gel za razdvajanje sadržavao je 375 mM Tris, pH 8,8; 0,1% SDS i 12% akrilamid. Kao inicijator polimerizacije dodavan je 10% amonijum persulfat. Gelovi su nalivani između ploča tako da gel za razdvajanje

predstavlja 1/4 celog gela. Dimenzije gelova su bile 8 x 5 cm, dok je njihova debljina bila 1 mm.

Elektroforeza je vršena u TGB puferu, sastava: 25 mM Tris; 250 mM glicin, pH 8,3 i 0,1% SDS, pri konstantnoj struji od 20 mA.

Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini u gelovima su fiksirani i bojani rastvorom 0,025% Coomassie brilliant blue R-250 u 45% metanolu i 10% sirćetnoj kiselini. Obezbojavanje je vršeno difuzijom u 45% metanolu i 10% sirćetnoj kiselini (Sambrook et al., 1989).

3.6.4 „Western blot“ analiza

U imunoblot esejima korišćena su komercijalna Anti-Penta-His antitela konjugovana sa HRP ("Horseradish peroxidase") i ostale komponente kita (QIAexpress Anti-His Conjugate Kit, Qiagen).

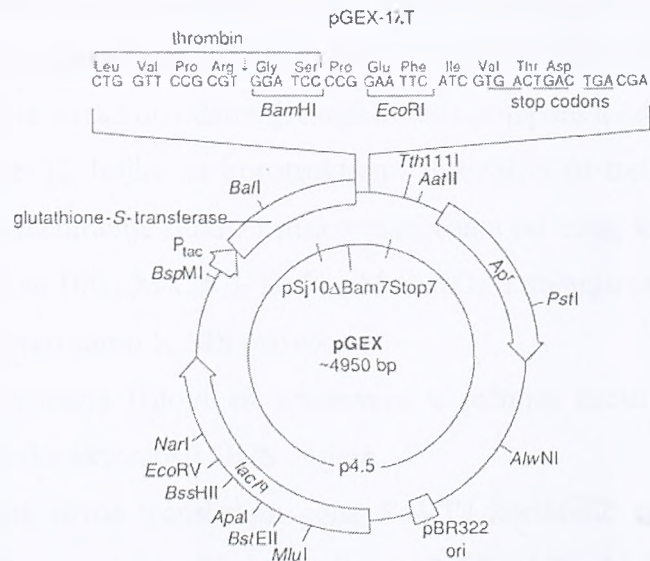
Rekombinantni His-GST-FeMT3 je nakon elektroforeze na SDS-PAGE transferovan na PVDF membranu (Millipore) u Fastblot B43 transfer system (Biometra), po uputstvu proizvođača. Nakon elektroforeze, gel je inkubiran u katodnom puferu (25 mM Tris-HCl, pH10,4, 40 mM glicin, 20% (v/v) metanol) 5 min. PVDF membrana je pripremljena za transfer tako što je kratko potopljena u metanol, isprana u vodi 5 min i inkubirana u anodnom puferu 2 (25 mM Tris-HCl, pH 10,4, 20% (v/v) metanol) 5 min. Anoda je nakvašena anodnim puferom 1 (300 mM Tris-HCl, pH 10,4, 20% (v/v) metanol) i na nju su slagani redom: 2 sloja 3MM papira nakvašena anodnim puferom 1, 1 sloj 3MM papira nakvašen anodnim puferom 2, PVDF membrana, gel i 3 sloja 3MM papira nakvašena katodnim puferom). Transfer je trajao 35 do 40 min pri struji od 4,5 mA po 1 cm² membrane. Nakon transfera, svi dalji koraci rađeni su na sobnoj temperaturi.

Membrane su oprane dva puta po 10 min, u TBS puferu (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) i inkubirane 1h u bloking puferu (0,5% bloking reagens i 0,1 % Tween 20 u bloking-reagens puferu, koji su obezbeđeni u kitu). Membrane su zatim ispirane dva puta po 10 min u TBS-Tween puferu i još jednom u TBS puferu, a onda inkubirane sa Anti-His-HRP konjugatom (1:1000 razblaženje) u bloking puferu tokom 1 h. Nakon toga, Membrane su prane u TBST puferu, 2 puta po 10 min i u TBS puferu jednom 10 min.

Hemiluminescenta detekcija je vršena korišćenjem ECL-Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) i bazirana je na reakciji oksidacije cikličnog diacilhidrazida luminola u prisustvu HRP i peroksida. Membrane su prekrivane smešom reagensa A i B (40:1) 5 min na sobnoj temperaturi, a zatim izlagane X-ray filmovima (Kodak) u trajanju od 5 s.

3.6.5 Test tolerancije *E.coli* sa eksprimiranim rekombinantnim proteinima na $CdCl_2$

E.coli klonovi u kojima je potvrđena ekspresija GST-FeMT3 ili samog GST (sa pGEX vektora, Sl. 3.7) kao i netransformisane ćelije istog soja, testirani su na toleranciju na prisustvo $CdCl_2$, po proceduri preuzetoj iz (Bilecen et al., 2005). Prekonoćne kulture su razblažene 100 puta u 20 mL LB sa odgovarajućim antibioticima i razdeljene u po dva erlen-maer suda. Nakon gajenja 3h/37°C ekspresija je indukovana dodavanjem 1 mM IPTG. U po jedan sud je dodavan i 300 μ M $CdCl_2$, i inkubacija je nastavljena na 30°C 220obr/min. OD₆₀₀ je meren 3 h, 5 h, 7 h i 9 h od zasejavanja.



Slika 3.7 Shematski prikaz vektora pGEX.

3.7 Biljni materijal i tretmani

3.7.1 Biljni materijal

Heljda (*Fagopyrum esculentum* Moench, cv. Darja), duvan *Nicotiana tabacum* Havana i *Nicotiana debneyii* su uzgajani u stakleniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Za promotorsku analizu korišćeno je deset različitih transgenih T2 linija duvana *Nicotiana tabacum* Havana koje su transformisane odnosno promotorskim konstruktom D1P0::GUS (-569::GUS), čija je transformacija, selekcija i provera transformisanosti opisana u magistarskoj tezi, Majić, 2005.

3.7.2 Tretmani biljaka

Za promotorsku analizu transformisane i netransformisane biljke duvana *Nicotiana tabacum* Havana gajene u kulturi su stavljane u rastvor MS (Murashige & Skoog, 1962) sa 2% saharozom. Za analizu su uzimani listovi potopljeni u rastvor MS (kompleksni stres), a kao kontrola su služili nepotopljeni listovi.

Za tretmane metalima korišćeni su nadzemni delovi biljaka duvana i heljde. Donji delovi stabla su nakon odstranjivanja korena potapani u odgovarajuće rastvore.

Transgene T2 biljke sa konstruktom -569::GUS su tretirane rastvorom ½ MS (upola manje koncentracije mikro i makronutrijenata od onog koji se koristi za gajenje biljaka u kulturi) sa 100 µM CdCl₂ ili 50 µM CuSO₄ u trajanju od 1 ili 2 dana. Kontrolni tretman je sadržavao samo ½ MS rastvor.

Nakon tretmana listovi su smrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80°C za analizu promotorske aktivnosti GUS esejem.

Za analizu nivoa transkripta gena *FeMT3* korišćene su biljke heljde koje su tretirane u ½ MS rastvoru bez ili sa metalima: 10, 50, i 100 µM CuSO₄ u trajanju od 5 h ili 100 µM i 300 µM CdCl₂ u trajanju od 5 h ili 1 dan. Nakon tretmana, sa ovih biljaka sakupljani su listovi u već naznačenim fazama, zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80°C za izolovanje RNK.

Listovi *Nicotiana debneyii* u kojima su tranzijentno eksprimirani FeMT3.10 ili FeMT3.5 su odsecani tri dana nakon transformacije, manji delovi listova su odvajani za proveru uspešnosti transformacije RT-PCR metodom, a zatim su tretirani potapanjem

drške u $\frac{1}{2}$ MS rastvor bez ili sa 50 μM i 100 μM CuSO_4 ili 300 μM CdCl_2 . Tretmani su trajali 2 ili 3 dana posle čega su listovi slikani, a delovi listova isecani i korišćeni za analizu nivoa hlorofila i lipidne peroksidacije.

3.7.3 Tranzijentna ekspresija FeMT3 u listovima *Nicotiana debneyii*

Za tranzijentnu "overekspresiju" FeMT3 i testiranje sposobnosti ovog proteina da obezbedi veću toleranciju biljnog tkiva na metale upotrebljeni su listovi *Nicotiana debneyii* zbog njihove veličine i čvrstine. Leve polovine listova su transformisane infiltracijom *Agrobacterium*-om soja C58C1 sa konstruktom pB2GW7,0-FeMT3, a desne koje su služile kao negativne kontrole, praznim *Agrobacterium*-om soja C58C1. Prekonoćne kulture *Agrobacterium*-a su rasle na 28°C do OD₆₀₀ 1. Bakterije su obarane na 3000 obr/min/25 min na sobnoj temperaturi, rastvarane u bidestilovanoj vodi do OD₆₀₀ 0,2 i infiltrirani u listove. Infiltracija je vršena špricom bez igle pritiskanjem na abaksijalnu površinu lista (kutikula je prethodno 3-4 puta lagano izbušena tankom iglom na delovima lista na koje je delovano špricom). Tri dana nakon infiltracije manji delovi listova su isecani za izolaciju RNK i proveru transformisanosti RT-PCR-om, a celi listovi su odsecani sa biljaka i korišćeni za tretmane, kao što je opisano.

3.8 Ostale metode

3.8.1 Kvalitativni GUS esej

Kvalitativni esej GUS je izveden po metodi opisanoj u (Hiei et al., 1994). Biljni organi su inkubirani u puferu (50 mM natrijum fosfatni pufer, pH 6,8+ 1% Triton X-100) na 37°C/1h. Pufer je zatim uklonjen, a dodat je svež pufer sa 20% metanolom i 1 mM X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid prethodno rastvoren u DMF-u). Nakon inkubiranja 5 min, pod vakuumom od 10^3 Pa, tkiva u puferu su držana u mraku na 37°C, preko noći. Nakon toga pufer je uklanjan, a uzorci ispirani u 99% metanolu.

Hidrolizom supstrata X-gluc od strane enzima β -glukuronidaze, dobija se jedinjenje koje se u prisustvu kiseonika boji u plavo usled čega je i transformisano biljno tkivo dobilo plavu boju.

3.8.2 Kvantitativni (fluorescentni) GUS esej

Kvantitativni GUS esej je urađen po metodi (Jefferson et al., 1987)

Ekstrakcija proteina iz biljnog tkiva

Oko 1 g biljnog tkiva (u slučaju biljaka iz kulture uzimani su delovi različitih pupoljaka jedne transgene linije) smrzavan je u tečnom azotu i mleven do praha, a zatim pomešano sa 1500 μ L ekstrakcionog pufera (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{PO}_4$, pH 7.0, 10 mM Na_2EDTA , 10 mM β -merkaptioetanol, 0.1 % w/v SDS, 0.1 % v/v Triton X-100). Nakon centrifugiranja 15 min/13000 rpm/+4°C, supernatant je prenošen u novu mikrocentrifušku tubu. Centrifugiranje je ponavljano dok nije dobijen bistar supernatant. Koncentracija proteina je određivana po (Bradford, 1976).

GUS esej

U 500 μ L pufera za fluorescentni esej (ekstrakcioni pufera u koji je dodat supstrat MUG (4-metil-umbeliferil- β -D-glukuronid) u finalnoj koncentraciji 1 mM) dodavano je 50 μ L proteinskog ekstrakta. Nakon inkubacije na 37°C/ 24 h reakcija je stopirana dodavanjem 200 μ L reakcione smeše u 1800 μ L stop pufera (0.2 M Na_2CO_3) na sobnoj temperaturi. Delovanjem enzima β -glukuronidaze, koji je kodiran genom GUS, supstrat MUG se prevodi u fluorescentni proizvod MU (4-metil-umbeliferon). Merenjem fluorescencije na fluorimetru Bio-Rad VersaFluorTM (ekscitacioni filter: EX/0360/40 talasnih dužina 340-380 nm; emisioni filter: EM/0450/10 talasnih dužina: 455-465 nm) određivana je koncentracija proizvoda MU, a preko nje i aktivnost gena GUS, tj jačina promotora koji je ukloniran uz vodno od njega.

Jednačina za izračunavanje GUS-aktivnosti u reakcionoj smeši:

$$\frac{\text{koncentracija (4-MU u reakciji)} \times 10 \times 550 \mu\text{L}}{50 \mu\text{L} \times \text{vreme inkubacije} \times \text{koncentracija proteina u ekstraktu}}$$

3.8.3 Određivanje nivoa lipidne peroksidacije

Nivo lipidne peroksidacije je određivan merenjem količine malondialdehida (Heath & Packer, 1968).

80 mg lista mleveno je u tečnim azotu u avanu i rastvarano u 800 μ L 20% TCA (trihlor sirćetna kiselina), vorteksovano i ohlađeno na ledu. Talog je obaran na 13000 obr/min/20 min/+4°C u hladnog minicentrifugi. 800 μ L supernatanta je pomešano sa istim volumenom 0,5 % TBA (tiobarbituratna kiselina) u 20% TCA. Rastvor je inkubiran u probušenim tubicama na 95°C/30 min, brzo ohlađen na ledu, centrifugiran na 13000 obr/min/15 min/+4°C. Absorbancija supernatanta je merana na A_{532} od čega je oduzimana nespecifična absorbancija na A_{600} .

3.8.4 Određivanje nivoa ukupnog hlorofila

0,5 g listova je mleveno u avanu sa tečnim azotom i rastvarano brzo u metanolu u mraku. Ekstrakti su nakon inkubacije u mraku, centrifugirani na 13000 obr/min/15 min/+4°C. Absorbancija je merena na A_{632} , A_{652} , A_{665} i A_{696} , a koncentracija ukupnog hlorofila je računata po formuli $28,6473 \times A_{632} + 12,9405 \times A_{652} + 0,6845 \times A_{665} + 5,223 \times A_{696}$ (Ritchie, 2006).

3.8.5 Konfokalna mikroskopija

Praćenje unutarćelijske lokalizacije fuzije FeMT3-EYFP korišćeni su listovi duvana *N. debneyii* tranzijentno transformisani *Agrobacterium*-om sa konstruktom pB7WGY2,0-FeMT3.10 ili pB7WGY2,0-FeMT3.5. Tri dana nakon transformacije listovi su odsecani i stavljeni na tretman metalima ili kontrolni tretman, kao što je opisano u odeljku 3.7.2, ili su metali (50 μ M CuSO₄ or 50 μ M CdCl₂) infiltrirani istovremeno sa *Agrobacterium*-om. Unutarćelijska lokalizacija fuzije je detektovana na konfokalnom laser scening mikroskopu Zeiss, Jena (Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu) sa sledećim podešavanjima: ekscitacija na 488 nm i emisija na 505-530 nm band pass za EYFP-FeMT3, a ekscitacija na 543 nm i emisija na 560 nm long pass za autofluorescenciju hloroplasta.

3.8.6 Statistička obrada podataka

Kako dobijene vrednosti za GUS aktivnost različitih uzoraka istog konstrukta nisu bile u normalnoj raspodeli, za statističku obradu podataka korišćen je neparametarski statistički test Mann-Whitney. Određivane su i poređene medijana vrednosti za različite konstrukte. Za statističku obradu podataka ostalih eksperimenata je korišćen Studentov t test, srednje vrednosti i standardne devijacije.

Statistička obrada podataka urađena je u SPSS programskom paketu, a za nivo statističke značajnosti je uzimana vrednost $p < 0,05$.

REZULTATI

4.1 Funkcionalna analiza aktivnosti promotora gena *FeMT3* u transgenom duvanu

Za funkcionalnu analizu promotora gena *FeMT3*, korišćene su biljke duvana *N. tabacum*, transformisane konstruktima -569::GUS, -416::GUS i -163::GUS. U konstruktima -569::GUS, reporterski gen GUS je vođen celokupnim promotorskim regionom gena MT3 heljde, koji je obuhvaćen genomskim klonom *gFeMT4.1*, dok su konstrukti -416::GUS i -163::GUS sadržavali 5' delecione verzije promotorskog regiona. Kloniranje ovih konstrukata, kao i transformacija, selekcija i potvrda transformisanosti transgenih linija duvana opisana je u magistarskom radu (Majić, 2005).

In silico analiza promotorskog regiona gena *FeMT3* je pokazala prisustvo velikog broja potencijalnih *cis*-regulatornih sekvenci, među kojima su elementi koji učestvuju u odgovoru na različite egzogene stresne stimuluse (joni metala, svetlosni stres, toplotni stres, povrede), ali i elementi uključeni u regulaciju ekspresije pod uticajem biljnih hormona ili tokom razvića, kao i pri tkivno specifičnoj ekspresiji (Bratić et al., 2009; Brkljačić, 2003). U Tabeli 4.1 je dat spisak potencijalnih *cis*-elemenata koji su relevantni za ovaj rad.

4.1.1 Tkivna distribucija aktivnosti promotora gena *FeMT3*

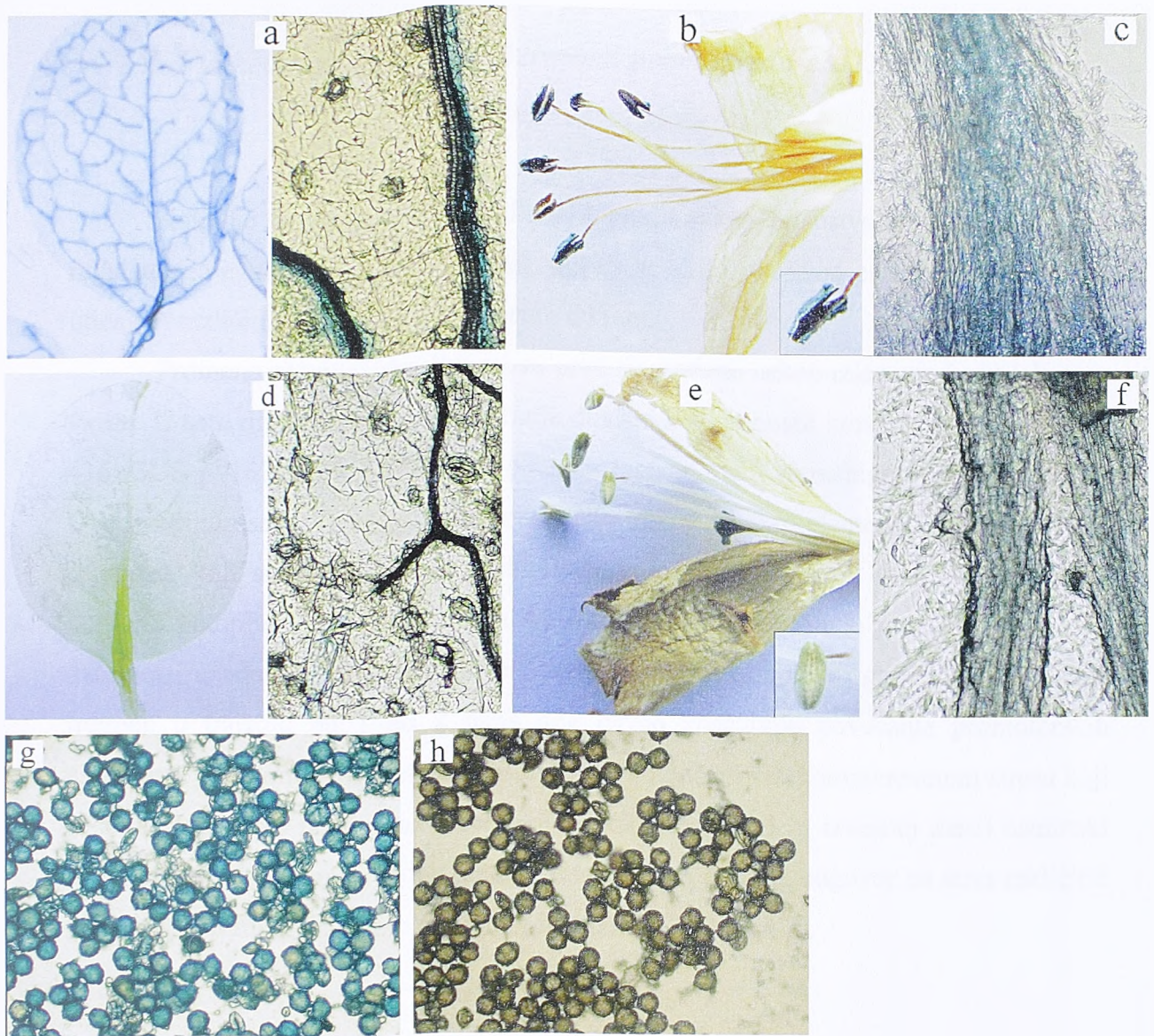
U cilju detekcije specifičnih tkiva i ćelija u kojima je promotor gena *FeMT3* aktivan urađen je kvalitativni GUS esej na T1 generaciji transgenih biljaka koje nose konstrukte -569::GUS, -416::GUS i -163::GUS. Sva tri promotorska konstrukta pokazala su isti patern GUS bojenja, te su prikazane samo slike dobijene za transgene linije sa konstruktom -569::GUS (Sl. 4.1).

Intenzivni signali su uočeni u vaskularnom tkivu lista. Osim u ćelijama vaskularnih elemenata, promotorska aktivnost nije detektovana u ostalim ćelijama lista.

Veoma jaki signali su uočeni u anterama, tačnije u polenovim zrnima, a odsustvovali su u ostalim tkivima cveta. Bojenje u korenu je bilo slabijeg intenziteta.

Naziv elementa	Pozicija u promotoru <i>FeMT3</i>	Komentar
COREOSCORE ("coordinate regulatory element for antioxidant defense")	-514 do -496 i -133 do -106	elementi nađeni u genima uključenim u antioksidativnu odbranu kod pirinča
POLLEN1LELAT52	-508 do -504, -474 to -470 i -293 do -289	element odgovoran za polen-specifičnu ekspresiju
MRE "metal-responsive element"	-489 do -483, -455 do -449, -441 do -435 i -425 do -419	elementi zaduženi za regulaciju ekspresije sisarskih metalotioneina pod uticajem jona metala
CuRE - "copper-response element"	-485 do -482 i -451 do -448	uloga u aktivaciji gena kao odgovor na nedostatak jona Cu ²⁺ ; učešće u aktivaciji promotora u uslovima hipoksije
"anaerobicciszmgapc4"	-216 do -208	identifikovan u promotoru kukuruznog gena GapC4 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 4), uključen u odgovor na nedostatak kiseonika
ANAERO1CONSENSUS	-153 do -147	identifikovan u promotorima gena uključenih u odgovor na nedostatak kiseonika, tj. gena za enzime fermentativnog puta
RSEPVGRP18 (RSE) - "root specific element"	-158 do -138	može kontrolisati ekspresiju u korenu i vaskularnim elementima u nadzemnim delovima biljke
SUREAHVISO1 "sugar-responsive elements"	-160 do -138 i -88 do -70	indukuje promotorsku aktivnost gena za izoamilazu 1 ovsu u prisustvu saharoze
pollen- specific element	-139 do -123	element odgovoran za polen-specifičnu ekspresiju

Tabela 4.1 Potencijalni *cis*-regulatorni elementi predikovani u promotorskom regionu gena *FeMT3*



Slika 4.1 Kvalitativni GUS esej na biljkama duvana *N. tabacum*: a, b, c, g – transgene biljke transformisane konstruktom -569::GUS; d, e, f, h netransformisana kontrola. a) i d) listovi (levo – mlada biljka, desno - tkivo lista pod mikroskopom; b) i e) cvet (dole desno je uvećana jedna antera); c) i f) tkivo korena pod mikroskopom; g) i h) polenova zrna pod mikroskopom

4.1.2 Funkcionalna analiza aktivnosti promotora *FeMT3* u odgovoru na kompleksni stres

Kako je u promotoru gena *FeMT3* predikovano prisustvo mnogobrojnih *cis*-regulatornih elemenata, moglo se očekivati da se aktivnost ovog promotora menja pod uticajem različitih egzogenih i endogenih faktora.

Promene promotorske aktivnosti prvo su praćene nakon izlaganja kompleksnom stresu. U tu svrhu listovi transgenih linija duvana koji su nosili konstrukte -569::GUS, -416::GUS i -163::GUS bili su potopljeni u rastvor MS (Murashige & Skoog, 1962). Ovaj medijum sadrži optimalne koncentracije makro i mikro elemenata, vitamine i 2% saharozu, koji su neophodni za rast biljaka u kulturi. Međutim, kada su listovi bili potpuno potopljeni u ovaj medijum 4 do 10 dana, zabeležen je porast promotorske aktivnosti u odnosu na nepotopljene listove istih biljaka koje su gajene u kulturi. Isti tretman u trajanju od 1 do 2 dana nije davao značajnije povećanje promotorskih aktivnosti. Prilikom ovog tretmana listovi su bili izloženi višekomponentnom stresu koji je obuhvatao kako nedostatak kiseonika (hipoksiju), tako i (u izvesnoj meri) osmotski stres i prisustvo saharoze i jona metala. Interesantno je da je odgovor na stres različitih promotorskih fragmenata bio različitog intenziteta (Tabela 4.2).

Promotorski konstrukt	Povećanje aktivnosti
-569::GUS	11,5 puta *
-416::GUS	8,5 puta **
-163::GUS	4,8 puta **
netransformisana kontrola	1,2 puta

Tabela 4.2 Povećanje medijane aktivnosti u tretiranim (potapanje u kompletnom MS medijumu 10 dana) u odnosu na netretirane listove istih promotorskih konstrukata. Prikazani su rezultati merenja na 4 nedelja starim transgenim T1 biljkama, koji su ponovljeni tri puta na pet do deset nezavisnih transgenih linija, za svaki konstrukt. * - Statistički značajna razlika $p < 0,005$; ** - $p < 0,001$, po Mann-Whitney statističkom testu. Slični rezultati su dobijeni potapanjem listova u isti medijum 4 dana.

Budući da je najizrazitija komponenta ovog kompleksnog stresa bila hipoksija, odnosno otežana difuzija gasova i nedostatak kiseonika, listovi istih transgenih linija bili su podvrgnuti stresu potapanjem u čistoj vodi ili u rastvoru koji je sadržavao samo mikro i makro elemente MS-medijuma bez saharoze. U oba slučaja promotorske aktivnosti nisu mogle biti praćene u onom trajanju koje je bilo primenjeno u slučaju potapanja sa saharozom, jer je već nakon drugog dana tkivo listova venulo i dezintegrisalo se. Vrednosti aktivnosti GUS u toku prva dva dana ovog stresa nisu bile povećane u odnosu na bazalni nivo.

4.1.3 Funkcionalna analiza aktivnosti promotora *FeMT3* u odgovoru na jone metala

Kao što je prikazano na Slici 4.1, u okviru promotorskog regiona gena *FeMT3* nalaze se 4 potencijalna *cis*-elementa MRE ("Metal responsive element"), sa manjim odstupanjima od konsenzus sekvence (Tabela 4.3).

Lanac i pozicija potencijalnog MRE ^a	sekvenca
- -489 do -483	tagtACACtctgtctt
- -455 do -449	tagtACACtctgtctt
- -441 do -435	gtcaGCGCccaaaat
+ -425 do -419	gccgGCGCccagatt
Konsenzus MRE	syylGCRcncggccy

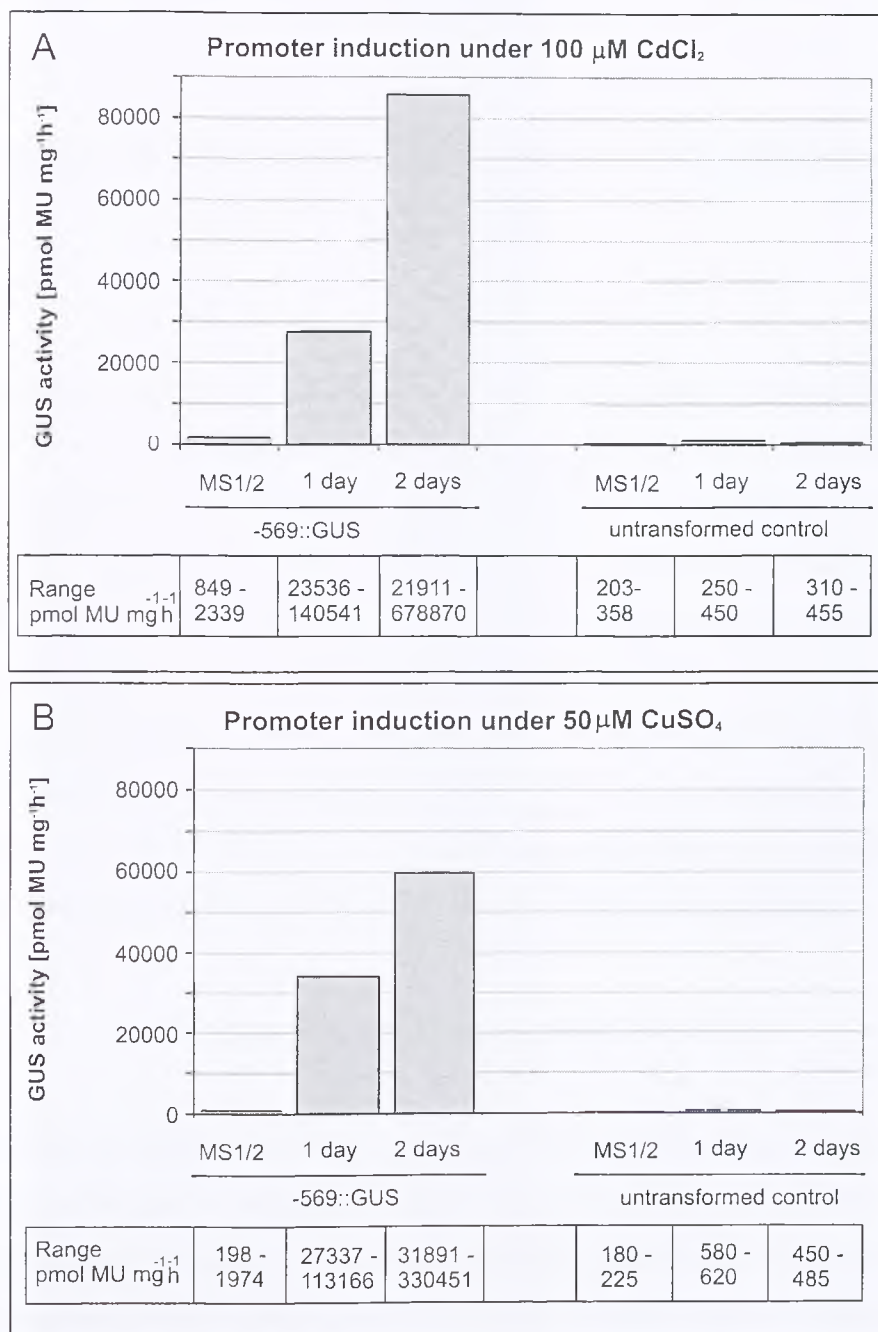
Tabela 4.3 Sekvence potencijalnih MRE elemenata predikovanih *in silico* u promotoru *FeMT3*. Crvenim slovima su obeležena slaganja sa konsenzus sekvencom, a crnim odstupanja. U konsenzus sekvenci je uokviren kor elementa. Date pozicije su udaljenost kora elementa od starta transkripcije.

Za testiranje uticaja jona metala na aktivnost promotora *FeMT3*, korišćene su četiri nedelja stare transgene biljke duvana *N. tabacum* Havana, T2 generacije sa konstruktom -569::GUS. Tretiran je samo nadzemni deo biljaka, kao što je opisano u odeljku Materijal i metode, potapanjem u 1/2 MS rastvor sa različitim koncentracijama CdCl₂ i CuSO₄.

Na osnovu Mann-Whitney testa, utvrđeno je da se GUS aktivnosti izmerene u transgenim biljkama koje su tretirane metalima statistički značajno razlikuju od vrednosti dobijenih u biljkama istih transgenih linija koje su držane samo u kontrolnom rastvoru 1/2 MS bez metala, sa stepenom značajnosti p<0,05. Medijana vrednosti GUS,

kod biljaka tretiranih sa 100 μM CdCl_2 bile su veće 16,8 puta nakon jednog dana, a 51,7 puta nakon dva dana tretmana od mediane određene za biljke u kontrolnim uslovima (Sl. 4.2 A).

Slično tome, transgene biljke tretirane rastvorom 50 μM CuSO_4 pokazale su 36,8 i 64,5 puta veću GUS aktivnost od kontrole, nakon jednog ili dva dana tretmana (Sl. 4.2 B).



Slika 4.2 Fluorimetrijski GUS esej na listovima T2 transgenih -569::GUS linija duvana nakon izlaganja: A) 100 μM CdCl_2 B) 50 μM CuSO_4 . Prikazane vrednosti su mediane dobijene merenjem u različitim transgenim linijama.

Sa druge strane, netransformisane biljke nisu pokazivale statistički značajan porast GUS aktivnosti nakon izlaganja istim rastvorima metala. Osim toga, kod netransformisanih biljaka vrednost GUS je bila na granici detektabilnosti. Ova niska vrednost dobijena za netransformisane biljke je zapravo nespecifična i uzima se kao "background" vrednost.

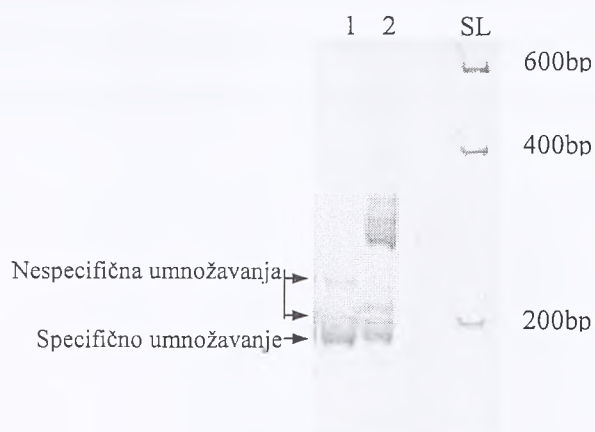
Navedeni rezultati su ukazali da promotorski konstrukt -569::GUS ima aktivnost koja je inducibilna, odnosno povećava se značajno u odgovoru na metale.

4.2 Analiza ekspresije FeMT3 pod uticajem povišenih koncentracija jona metala

Ekspresija gena *FeMT3* u biljkama izloženim povišenim koncentracijama jona metala, ispitana je korišćenjem metode Real-time RT PCR. Ovom metodom se prati umnožavanje sekvence od interesa "u stvarnom vremenu", odnosno detekcija nastalog proizvoda se vrši tokom cele reakcije umnožavanja metodom PCR. Zahvaljujući tome moguće je kvantifikovati količinu cDNK određenog gena koja je prisutna u uzorku. Vrednost dobijena za gen od interesa se normalizuje vrednošću dobijenom za "house keeping" gen čija se ekspresija ne menja tokom tretmana, i koji služi kao endogena kontrola. U analizama funkcionalnosti *FeMT3* prekomernom ekspresijom u biljkama, upotrebljen je klon FeMT3.10, stoga je analizirana ekspresija ove specifične cDNK, korišćenjem prajmera MTklon10F/R koji se vezuju za 3'UTR ovog klona.

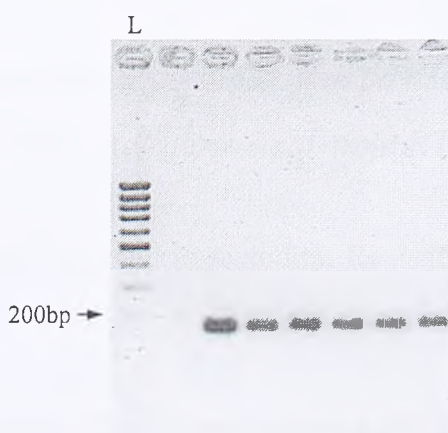
4.2.1 Optimizacija uslova Real-time PCR

Testirano je nekoliko različitih gena koji bi mogli služiti kao endogena kontrola. Prvi kandidat je bio gen za aktin koji je često korišćen u literaturi. Test umnožavanje na cDNK iz listova heljde dalo je produkte na očekivanoj dužini za izabrane prajmere, ali i nespecifična umnožavanja veće dužine (Sl. 4.3). Osim toga uočeno je da aktinski geni nemaju potpuno konstitutivnu ekspresiju, tj. mogu u izvesnoj meri menjati svoj nivo ekspresije pod uticajem nekih stresnih faktora (TAIR). Stoga je ovaj gen odbačen kao endogena kontrola.



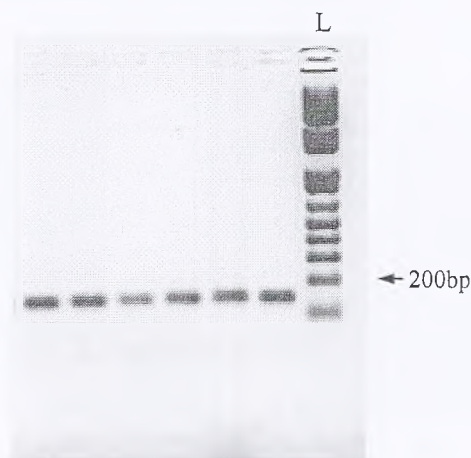
Slika 4.3 Umnožavanje aktinskim prajmerima na cDNK iz listova 1) heljde, 2) *Arabidopsis-a*. SL – lestvica "Smart Ladder" (Eurogentec)

Za endogenu kontrolu su razmatrani i geni za histon H3 i 26S rRNK. Oba gena odnosno parovi prajmera su imali jasno umnožavanje na željenoj dužini, bez nespecifičnih proizvoda (Sl. 4.4), a testiranje metodom Real-time PCR je pokazalo stabilnost njihovog umnožavanja u različitim uzorcima i samo jedan jasan pik na krivi disocijacije. Zato su ovi geni korišćeni kao endogene kontrole. Normalizacija nivoa transkripta *FeMT3* je u oba slučaja davala slične rezultate pa su prikazani samo rezultati dobijeni nakon normalizacije sa prajmerima H3f/H3r za histon H3.



Slika 4.4 Umnožavanje prajmerima za histon H3 H3f/H3r na različitim cDNK iz listova heljde. L – lestvica "MassRuler" (Fermentas)

Na sličan način testirani su i prajmeri MTklon10F/R koji se vezuju za 3'UTR klona FeMT3.10. Oni su takođe davali jasno umnožavanje bez nespecifičnih proizvoda (Sl. 4.5), što je potvrđeno i krivom disocijacije na Real-time PCR.



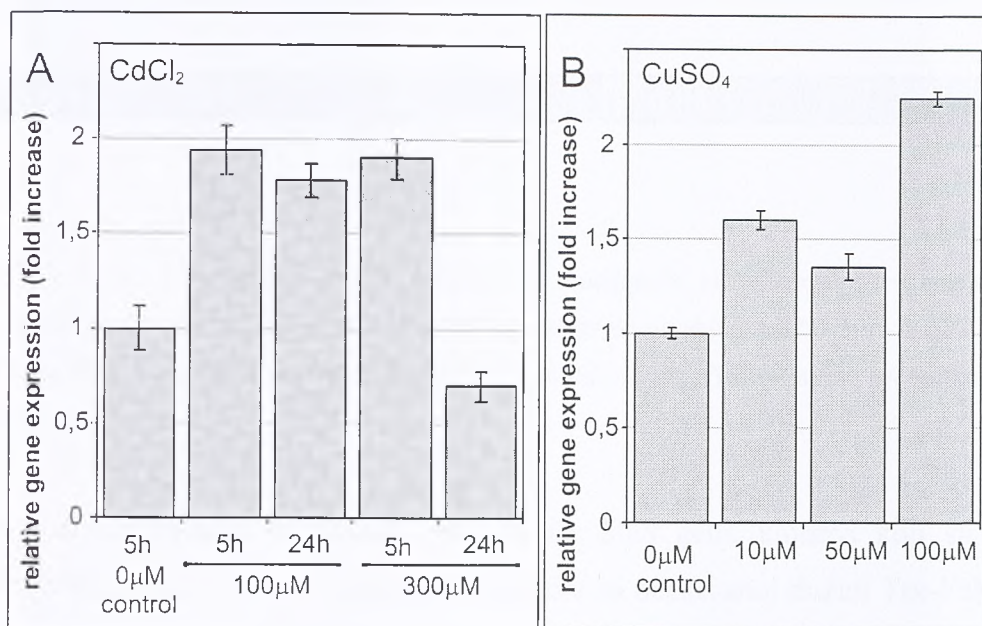
Slika 4.5 Umnožavanje prajmerima za FeMT3.10, MT10F/R, na različitim cDNK iz listova heljde. L – lestvica "1Kb" (Invitrogen)

Kako je u Real-time PCR eksperimentima korišćena SYBR Green boja koja detektuje svaku dvolančanu DNK, prajmeri su morali ispunjavati uslov da umnožavaju samo jedan specifični proizvod, ali i da dužine tih proizvoda budu slične za endogenu kontrolu i za target gen. Sva tri izabrana para prajmera davali su umnožavanja na dužini od oko 150 bp (Sl. 4.4 i 4.5). Standardne krive su takođe pokazale dobre efikasnosti umnožavanja ovih gena (1,85 za MT10F/R, 1,92 za H3F/R i 2,05 za 26Sf/r).

4.2.2 Analiza ekspresije *FeMT3* pod uticajem povišenih koncentracija jona Cd^{2+} i Cu^{2+} metodom Real-time RT-PCR

Nivo transkripta *FeMT3* praćen je metodom Real-time PCR u 4 nedelje starim biljkama heljde gajenim u staklari. Biljke su tretirane rastvorima $CdCl_2$ i $CuSO_4$ kao što je opisano u odeljku 3.7.2.

Tretman biljaka u rastvoru $CdCl_2$ koncentracija 100 i 300 μM , u trajanju od 5 h, rezultovao je u povećanju ekspresije *FeMT3* od 1,94 i 1,9 puta. Produženi tretman u trajanju od jednog dana zadržao je povišen nivo *FeMT3* pri nižoj koncentraciji, dok je tretman u 300 μM $CdCl_2$ doveo do pada ekspresije na 69% od kontrolnog (Sl. 4.6 A).



Slika 4.6 Real-time PCR analiza ekspresije gena *FeMT3* u listovima heljde tretiranim A) CdCl₂ B) CuSO₄. Prikazane su srednje vrednosti tri nezavisna merenja, a na stubićima su označene standardne greške.

Nakon tretiranja biljaka rastvorima od 10, 50, i 100 μM CuSO₄ u trajanju od 5 h, uočeno je značajno povećanje nivoa ekspresije ovog gena od 1,6, 1,35 i 2,24 puta (Sl. 4.6 B).

4.3 Ekspresija rekombinantnog *FeMT3* u *E.coli*

Za ekspresiju rekombinantnog *FeMT3* u fuziji sa tagovima GST (glutation S transferaza) i Trx (tiorredoksin) korišćene su *E.coli* soja BL21pLysS transformisane vektorima pETG-30A-*FeMT3*, pETG-20A-*FeMT3*. Tagovi su dodati kako bi se obezbedila veća solubilnost i stabilnost rekombinantnog *FeMT3*. Na Slici 4.7 shematski su prikazani konstrukti korišćeni za ekspresiju.

A

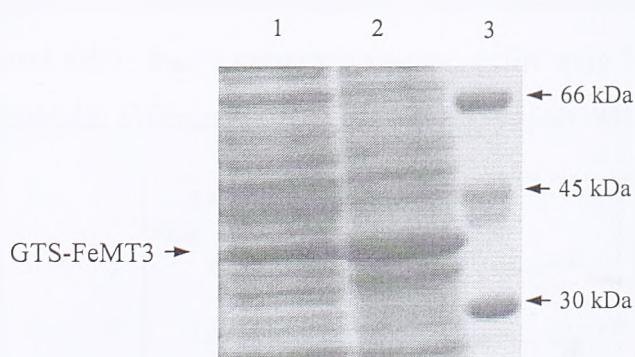


B

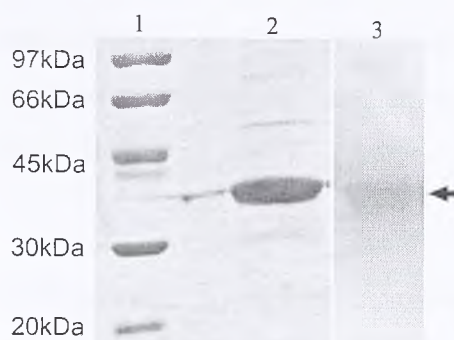


Slika 4.7 Shematski prikaz konstruktata korišćenih za ekspresiju rekombinantnog FeMT3. A) konstrukt u vektoru pETG-20A- FeMT3; B) konstrukt u vektoru pETG-30A- FeMT3; Trx – tag tioredoksin; GST - tag glutation S transferaza; His – histidinski tag; TEV – mesto prepoznavanja za TEV proteinazu.

Nakon razdvajanja izolovanih proteina na SDS gelu, klonovi koji su nosili vektor pETG-20A-FeMT3 su imali proteinsku traku na očekivanoj dužini Trx-FeMT3 u indukovanim kulturama, ali i u neindukovanoj kontroli, tako da ovi klonovi nisu dalje korišćeni. Sa druge strane ekspresija rekombinantnog fuzionog proteina GST-FeMT3 je uspešno indukovana u nekoliko klonova. Oni su dalje iskorišćeni za utvrđivanje lokalizacije odnosno solubilnosti eksprimiranih proteina. Odvojeni su solubilni proteini koji su bili rastvorljivi u nativnom puferu, a precipitirani proteini su rastvoreni u denaturišućem puferu (Mat. i metode 3.6.2). Obe frakcije su analizirane na 12% SDS gelu. Kao što se može uočiti na Slici 4.8 rekombinantni protein je prisutan i u solubilnoj frakciji i u nesolubilnim inkluzionim telima.



Slika 4.8 Ekspresija GTS-FeMT3. Coomassie brilliant blue bojenje 12 % SDS gela sa 1) solubilnom i 2) nesolubilnom frakcijom proteinskog ekstrakta transformisanog soja BL21pLysS. 3) proteinski marker.

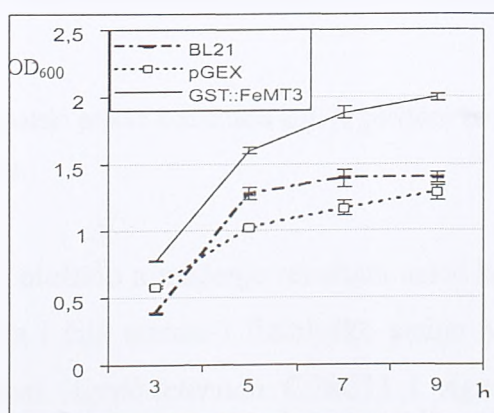


Slika 4.9 Rekombinantni GST-FeMT3 nakon prečišćavanja na rezinama sa vezanim GSH. 1 – proteinska marker lestvica, 2 – prečišćeni GST-FeMT3, 12% SDS gel, bojenje Coomassie brilliant blue, 3 – Western blot detekcija GST-FeMT3 Anti-His antitelima.

Rekombinantni GST-FeMT3 je prečišćen na rezinama sa vezanim glutationom (GE Healthcare), zahvaljujući GST tagu koji vezuje GSH. Identitet rekombinantnog proteina je potvrđen i analizom Western blot korišćenjem antitela Anti-His pošto se u okviru eksprimiranog proteina nalazio i His tag (Sl. 4.7 i Sl. 4.9).

4.3.1 Test tolerancije *E.coli* sa eksprimiranim rekombinantnim proteinima na stres izazvan $CdCl_2$

Klonovi *E.coli* u kojima je potvrđena ekspresija GST-FeMT3 testirani su na toleranciju na prisustvo $CdCl_2$. Čelije transformisane vektorom pGEX koje eksprimiraju sam rekombinantni GST, kao i netransformisane ćelije soja BL21pLysS, su korišćene kao negativna kontrola. Tolerancija je određena praćenjem rasta ovih sojeva.



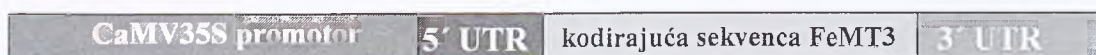
Slika 4.10 Tolerancija na $CdCl_2$ *E.coli* soja BL21pLysS, netransformisanog ili sojeva koji eksprimiraju GST-FeMT3 ili GST. Prikazane su krive rasta u prisustvu $300\mu M$ $CdCl_2$.

Prisustvo rekombinantnog GST-FeMT3 je omogućilo brži rast ćelijama *E.coli* u prisustvu 300 μM CdCl_2 u poređenju sa onima koje su ekspimirale sam GST ili sa netransformisanim ćelijama (Sl. 4.10).

4.4 Uticaj pojačane ekspresije *FeMT3* na toleranciju biljaka duvana na stres izazvan teškim metalima

Kako bi se utvrdilo da li *FeMT3* ima uticaja na toleranciju biljnih tkiva na stres izazvan teškim metalima, ovaj gen je prekomerno ekspimiran u heterolognom biljnom sistemu, u duvanu *N. debneyii*. Pošto je *FeMT3* visoko ekspimiran u listovima heljde, a jako nisko u korenu i cvetu (Brkljačić et al., 1999), efekat prekomerne ekspresija je praćen samo u listovima.

Tranzijentna pojačana ekspresija je postignuta infiltracijom listova suspenzijom *Agrobacterium*-a koji je nosio vektor pB2GW7,0-FeMT3.10. U konstrukt ovog vektora nalazi se celokupna cDNK sekvenca klona FeMT3.10 (5'UTR, kodirajući region i 3'UTR), (Sl. 4.11). U genima za sisarske metalotioneine uočeno je da se u okviru 3'UTR sekvence nalaze važni elementi od kojih zavisi unutarćelijska lokalizacija i funkcija proteina, što je bio razlog za uvođenje nekodirajućih regulatornih regiona u ovaj konstrukt. Ekspresija je bila vođena snažnim konstitutivnim promotorom pCaMV35S.



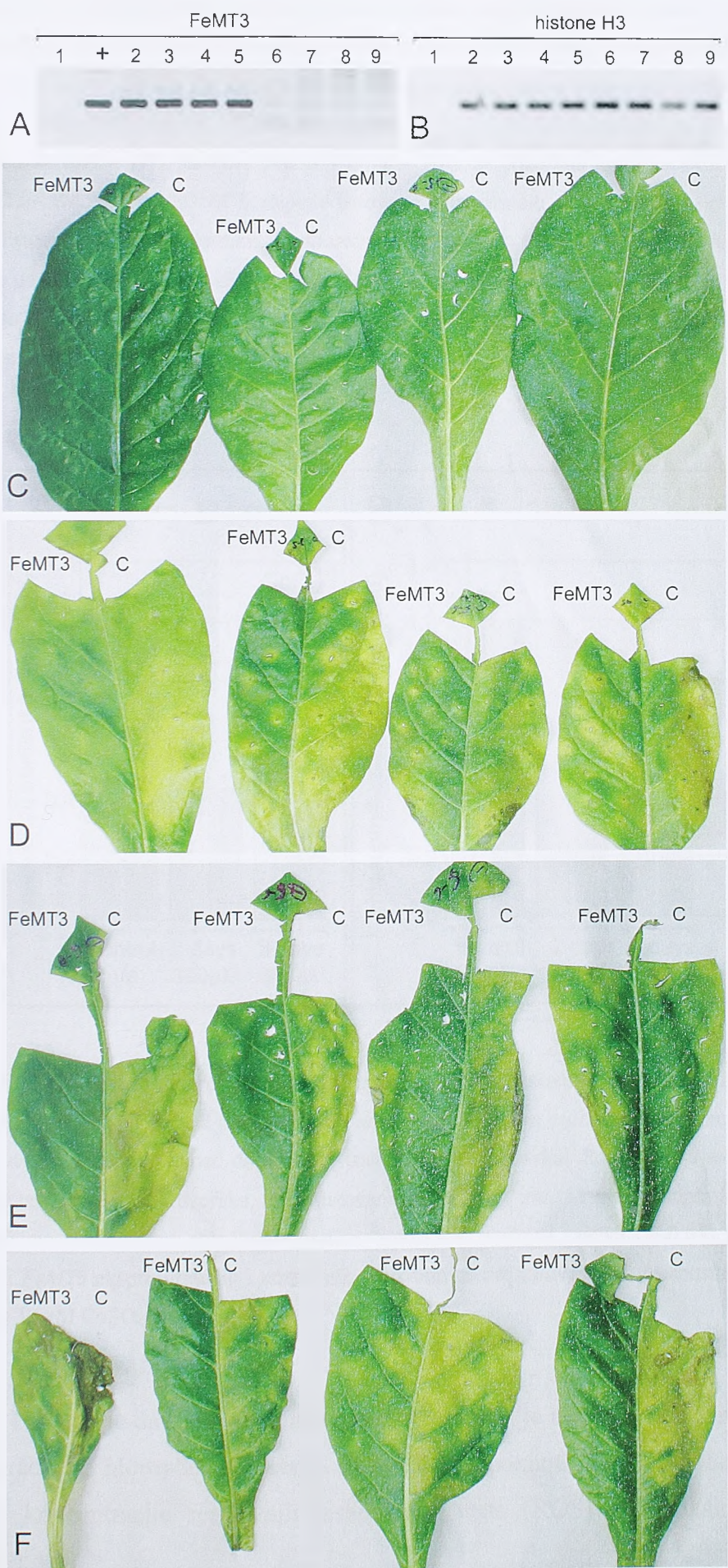
Slika 4.11 Shematski prikaz konstrukta koji je korišćen za prekomernu ekspresiju FeMT3 u heterolognom biljnom sistemu.

Kako bi se izbeglo otežano tumačenje rezultata usled korišćenja različitih listova koji su sa različitih biljaka i čija starost i fiziološko stanje ne mogu biti potpuno isti, negativna kontrola (prazan *Agrobacterium* C58C1) i *Agrobacterium* sa vektorom pB2GW7,0-FeMT3.10 su infiltrirani u iste listove, samo u različite polovine.

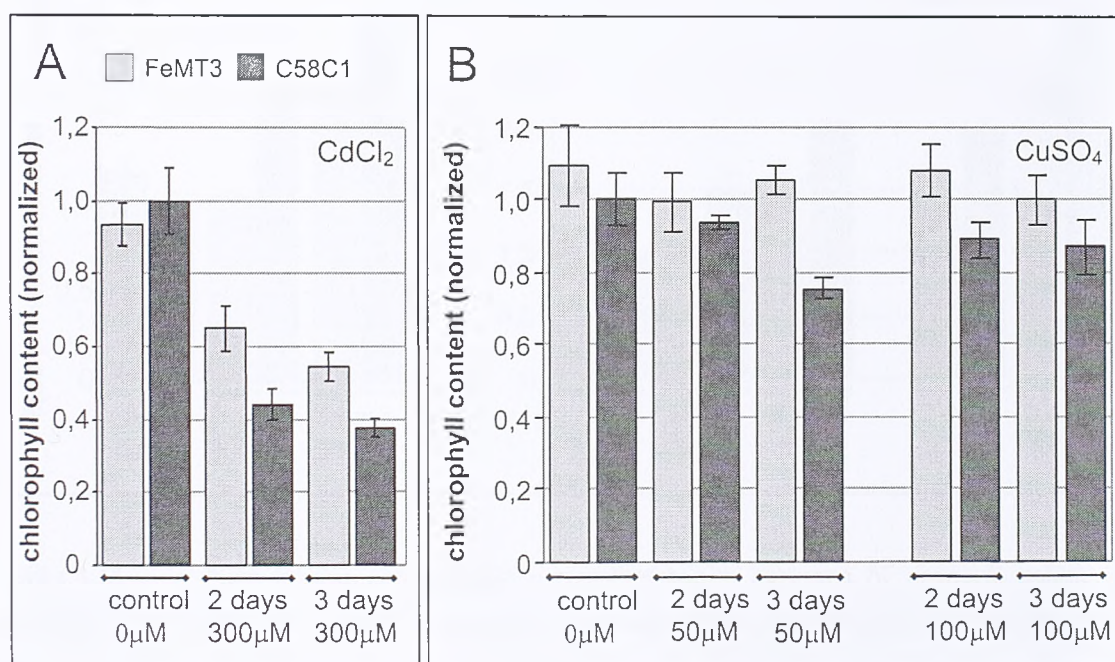
Tri dana nakon infiltracije, uspešnost transformacije je proveravana RT-PCR metodom, na matrici cDNK koja je dobijena na osnovu RNK izolovane iz delova

transformisanih regiona listova. Korišćeni su prajmeri MT10F/R specifični za klon FeMT3.10, i H3f/r za histon H3, koji je služio kao endogena kontrola, (Materijal i metode 3.5.1 i 3.5.2). Kao što je prikazano na Sl. 4.12 A, intenzivno specifično umnožavanje prajmerima MT10F/R detektovano je za polovine listova transformisane vektorom pB2GW7,0-FeMT3.10, a izostalo za polovine listova transformisane praznim sojem *A. tumefaciens*-a. Efikasnost tranzijentne ekspresije je potvrđena i Real-time PCR metodom, pri čemu je nivo ekspresije *FeMT3* bio 4,9 do 18,4 puta veći od ekspresije endogenog gena za histon. Nasuprot tome, u kontrolnim polovinama listova nije detektovano umnožavanje specifično za *FeMT3*.

Nakon 3 dana tretmana 300 μM CdCl_2 ili 50 μM ili 100 μM CuSO_4 , delovi listova sa eksprimiranim FeMT3 pokazali su značajno veću sposobnost da podnesu stres (Sl. 4.12). Kontrolne polovine su mnogo brže žutele, a brži gubitak hlorofila je potvrđen i merenjem sadržaja ukupnog hlorofila (Sl. 4.13).



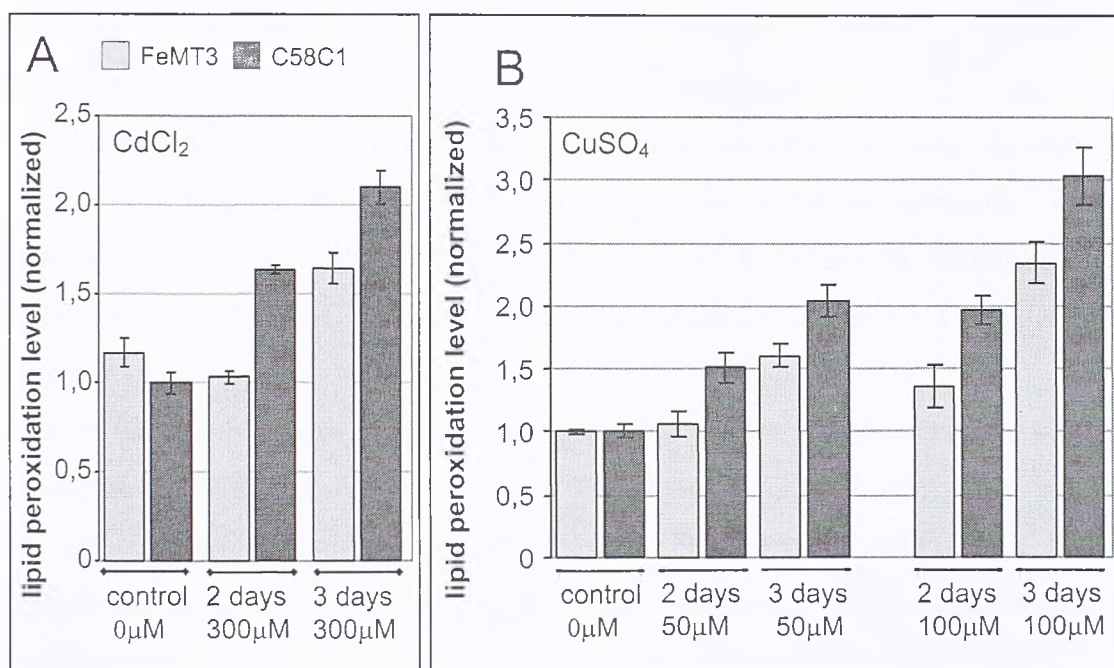
Slika 4.12 Efekat stresa izazvanog teškim metalima na transformisane listove duvana *N. debneyii*. U levim polovinama listova prekomerno je ekspimiran *FeMT3*, dok su desne transformisane praznim *Agrobacterium*-om C58C1. Tri dana nakon infiltracije manji delovi listova su isečeni i iskorišćeni za izolaciju RNK, cDNK sintezu i RT-PCR prajmerima: A) MT10F/R (specifični za *FeMT3*) i B) H3F/R (specifični za histon H3). Brojevi pod A i B: 1 – H₂O; + pozitivna kontrola PCR, izolovani vektor pB2GW7,0-*FeMT3*; 2-5 - cDNK iz regiona listova transformisanih sa *FeMT3*; 6-9 - cDNK iz kontrolnih regiona listova, infiltriranih praznim *Agrobacterium*-om C58C1. C - F – Listovi *N. debneyii* nakon 3 dana tretmana u rastvorima : C) ½ MS (kontrola); D) ½ MS sa 300 µM CdCl₂; E) ½ MS sa 50 µM CuSO₄; F) ½ MS sa 100 µM CuSO₄. Eksperimenti su ponovljeni tri puta na većem broju listova sa sličnim rezultatom.



Slika 4.13 Sadržaj ukupnog hlorofila u transformisanim listovima *N. debneyii*, nakon tretmana A) CdCl₂, B) CuSO₄. Sivi stubići predstavljaju vrednosti dobijene za polovine listova koje su ekspimirale *FeMT3*, a crni stubići vrednosti dobijene za transformisane polovine. Prikazane su srednje vrednosti tri ponavljanja grupno uzetih uzoraka, normalizovane na vrednost transformisane kontrole držane u ½ MS. Na stubićima su označene standardne greške. Statistički značajna razlika ($p < 0.05$) je uočena između vrednosti *FeMT3* ekspimirajućih i kontrolnih polovina, za sve uslove osim u kontrolnom tretmanu (1/2 MS) i na 50 µM CuSO₄/2 dana.

Poznato je da u biljkama izloženim stresu koji je izazvan teškim metalima dolazi do degradacije hloroplasta i ostalih ćelijskih komponenti. Takođe dolazi i do velikog porasta koncentracije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i do oksidativnog stresa (Uvod, 1.1.2).

Jedan od najjasnijih pokazatelja oksidativnog stresa je porast sadržaja lipidnih peroksida, koji nastaju delovanjem ROS na lipidne komponente membrana ćelija. Stoga je kao drugi pokazatelj intenziteta oštećenja, a sa druge strane pokazatelj tolerancije prisustva teških metala u biljnom tkivu, uzet nivo lipidne peroksidacije. Ova merenja su takođe potvrdila veću otpornost biljnog tkiva u kome je eksprimiran FeMT3 (Sl. 4.14).



Slika 4.14 Nivo lipidne peroksidacije u transformisanim listovima *N. debneyii*, nakon tretmana A) CdCl_2 , B) CuSO_4 . Sivi stubići predstavljaju vrednosti dobijene za polovine listova koje su eksprimirale *FeMT3*, a crni stubići vrednosti dobijene za polovine transformisane praznim *Agrobacterium*-om. Prikazane su srednje vrednosti tri ponavljanja grupno uzetih uzoraka, normalizovane na vrednost kontrolnih polovina listova držanih u $\frac{1}{2}$ MS. Na stubićima su označene standardne greške. Statistički značajna razlika ($p < 0.05$) je uočena između vrednosti *FeMT3* eksprimirajućih i kontrolnih polovina, za sve uslove osim u kontrolnom tretmanu ($\frac{1}{2}$ MS).

4.5 Unutarćelijska lokalizacija *FeMT3* u fuziji sa fluorescentnim proteinom

Kao što je već rečeno (Uvod 1.4) iz biblioteke cDNK iz semena u razviću, izolovana su dva klonova cDNK čiji su se 3'UTR regioni značajno razlikovali u dužini: 62 bp u klonu *FeMT3.5* i 229 bp u klonu *FeMT3.10*. Proksimalni deo 3'UTRa dužine 62 bp, bio je skoro potpuno identičan, sa razlikom u samo 3 nukleotida.

Za sisarske MT gene je uočeno da se u 3'UTR sekvencama mogu nalaziti elementi bitni za unutarćelijsku lokalizaciju transkripta, što se takođe odražava i na lokalizaciju samog proteina. Stoga su konstrukti koji su korišćeni za određivanje unutarćelijske lokalizacije *FeMT3* napravljeni tako da sadrže celokupne 3'UTR regione cDNK klonova.

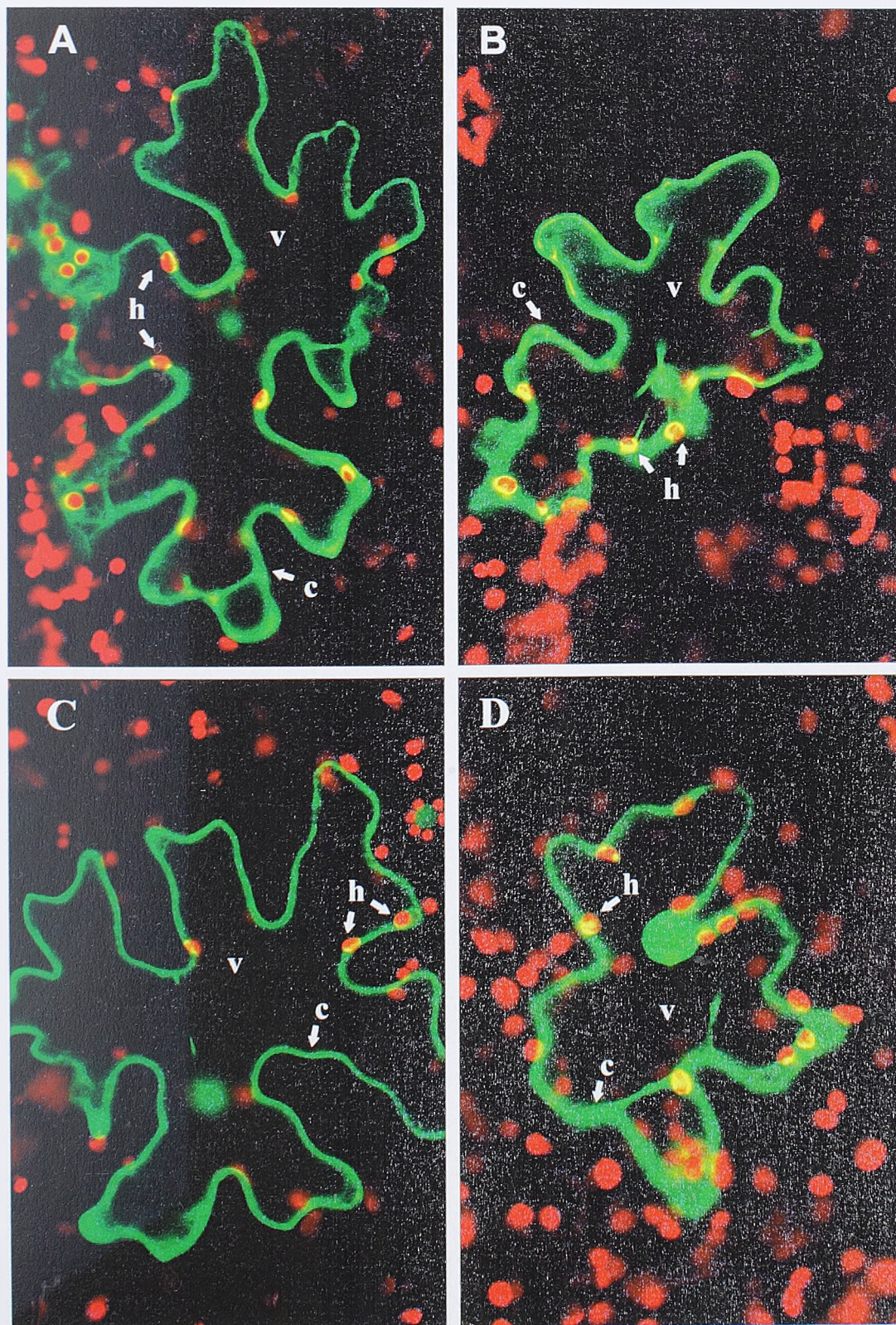
Listovi duvana *N. debneyii* su transformisani klonovima *Agrobacterium*-a koji su nosili vektore pB7WGY2,0-*FeMT3.10* i pB7WGY2,0-*FeMT3.5*. U ovim vektorima konstrukti su obezbedili ekspresiju cDNK klonova *FeMT3.10* i *FeMT3.5* u N-terminalnoj fuziji sa fluorescentnim proteinom EYFP ("enhanced yellow fluorescent protein"). (Sl. 4.15)



Slika 4.15 Shematski prikaz konstrukata korišćenih za praćenje unutarćelijske lokalizacije *FeMT3* u heterolognom biljnom sistemu, u fuziji sa fluorescentnim proteinom EYFP. A) konstrukt vektora pB7WGY2,0-*FeMT3.10*; B) konstrukt vektora pB7WGY2,0-*FeMT3.5*.

U slučaju oba konstrukta uočena je citoplazmatična lokalizacija fuzionog proteina (Sl. 4.16 A i C). Signali koji se uočavaju u jedru nisu specifični, jer kako je poznato GFP protein i njegove varijante mogu dislocirati neke citoplazmatične proteine sa kojima su u fuziji u nukleus (Chan et al., 2007). Prisustvo fuzija nije uočeno u vakuolama niti u hloroplastima. Kako je za fitohelatine koji učestvuju u detoksifikaciji

teških metala uočeno da u kompleksu sa jonima metala prelaze u vakuolu, u ovom radu je praćena unutarćelijska lokalizacija fuzija EYFP-FeMT3 u biljnim ćelijama nakon izlaganja CdCl_2 i CuSO_4 . Bez obzira na 3'UTR konstrukta, EYFP-FeMT3 je ostajao isključivo u citoplazmi (Sl. 4.16 B i D).



Slika 4.16 Unutarćelijska lokalizacija FeMT3 u fuziji sa fluorescentnim proteinom EYFP (tranzijentna ekspresija u listovima *N. debneyii*). Usled filtera koji su korišćeni, fluorescencija EYFP-FeMT3 se vidi kao zelena, u citoplazmi. Prikazana je transformisana epidermalna ćelija lista, čiji najveći deo ispunjava vakuola, u kojoj nema signala. Crveni signali potiču od autofluorescencije hloroplasta koji su vidljivi kako u transformisanoj, tako i u okolnim netransformisanim ćelijama. Nije uočeno preklapanje signala EYFP i hloroplasta, što znači da EYFP-FeMT3 ne ulazi u hloroplaste. A) i B) transformacija vektorom pB7WGY2,0-FeMT3.10 u listu koji je tretiran: A) kontrolnim rastvorom $\frac{1}{2}$ MS; B) rastvorom $\frac{1}{2}$ MS sa 300 μ M CdCl₂. C) i D) transformacija vektorom pB7WGY2,0-FeMT3.5 u listu koji je tretiran: C) kontrolnim rastvorom $\frac{1}{2}$ MS; D) rastvorom $\frac{1}{2}$ MS sa 300 μ M CdCl₂.

DISKUSIJA

Saznanja o strukturi, regulaciji i funkcijama biljnih metalotioneina još uvek su daleko iza saznanja dostupnih za sisarske MT. Biljni MT pokazuju značajne sličnosti sa sisarskim, ali poseduju i neke samo njima svojstvene osobine, zbog čega interes za njihovo izučavanje raste.

U pokušaju da se učini korak napred u razumevanju regulacije i funkcionisanja biljnih gena za metalotioneine u ovom radu analizirana je sa jedne strane promotorska aktivnost i ekspresija gena za metalotionein tipa 3 heljde, a sa druge moguća odbrambena svojstva proteina kodiranog ovim genom u živim sistemima koji su izloženi visokim koncentracijama teških metala.

5.1 Regulacija ekspresije gena *FeMT3*

U više radova je pokazano da je ekspresija gena za metalotioneine biljaka zavisna od tkiva, stadijuma razvicia, i da se menja se pod uticajem različitih endogenih ili stresnih egzogenih stimulusa (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Zhou et al., 2005). Sa druge strane, regulacija ekspresije ovih gena je slabo proučena. U poslednjih nekoliko godina porastao je broj prijavljenih sekvenci promotorskih regiona, ali je malo njih funkcionalno okarakterisano.

U ovom radu analizirana je tkivna zavisnost i inducibilnost promotora gena za metalotionein tipa 3 heljde *FeMT3*. Korišćeni su konstrukti celokupnog izolovanog promotorskog regiona (-569) kao i njegovih 5' delecionijskih varijanti (-416 i -163) uz upotrebu reporterskog gena GUS u transgenom duvanu. Kako je ranije određeno (Majić, magistarska teza, 2005), ova tri promotorska fragmenta su bila funkcionalna u neindukovanim uslovima, a njihove aktivnosti se nisu međusobno statistički značajno razlikovale.

5.1.1. Tkivna distribucija aktivnosti promotora gena *FeMT3*

Kvalitativnim GUS esejem je detektovana jaka promotorska aktivnost sva tri promotorska fragmenta u ćelijama vaskularnih elemenata lista i polenovim zrnima. Aktivnost promotora potpuno je izostala u ostalim ćelijama lista i cveta, dok su slabi signali uočeni u tkivu korena (Sl. 4.1).

Poredjenje ovih eksperimentalnih podataka sa informacijama o potencijalnim *cis*-regulatornim elementima (Tabela 4.1) predstavlja putokaz za dalja istraživanja regulacije genske ekspresije, otvara mogućnost potvrde funkcionalnosti nekih predikovanih elemenata i identifikacije novih.

Jedna kopija potencijalnog RSEPVGRP18 (RSE - "root specific element") je predikovana u proksimalnom regionu promotora *FeMT3*. Ovaj element može kontrolisati ekspresiju u korenu, ali i u vaskularnim elementima u nadzemnim delovima biljke (PLACE <http://www.dna.affrc.go.jp>), što upravo odgovara paternu aktivnosti promotora *FeMT3*. Osim gena analiziranog u ovom radu, promotorska aktivnost u vaskularnim elementima lista i tkivu korena uočena je za još neke biljne MT gene (Guo et al., 2003; Mir et al., 2004; Yuan et al., 2008), a detektovano je i prisustvo transkripata nekih MT-gena u vaskularnom tkivu (Garcia-Hernandez et al., 1998; Mir et al., 2004). Pretpostavljeno je da metalotioneini mogu imati važnu ulogu u održavanju homeostaze jona Cu^{2+} i olakšavati njihov transport u floemu, dok u ksilemu MT mogu služiti kao rezervoar jona Cu^{2+} koji su potrebni za procese lignifikacije (Guo et al., 2003). Uočeno povećanje promotorske aktivnosti kao i nivoa samog transkripta gena *FeMT3* u odgovoru na jone bakra govore u prilog ovim pretpostavkama.

Sva tri promotorska konstrukta bila su sposobna da vode intenzivnu ekspresiju reporterskog gena u polenovim zrnima. Nekoliko potencijalnih regulatornih elemenata koji su zaduženi za specifičnu ekspresiju u polenu su nađeni u promotoru *FeMT3*, a jedan od njih je lociran u okviru najkraćeg analiziranog promotorskog konstrukta - 163::GUS. Dalje delecione i mutacione analize mogle bi potvrditi funkcionalnost ovih elemenata. Potencijalni *cis*-elementi za specifičnu ekspresiju u polenu su uočeni još i u genu *OsMT-II-1a* iz pirinča, ali još uvek nije zabeležena aktivnost promotora ovog gena u polenu (Zhou et al., 2005). Sa druge strane u promotorima gena za *MT2b* iz *Arabidopsis*-a i MT1 iz *C. glauca* koji su aktivni u polenu nisu nađeni ovakvi *cis*-regulatorni elementi (Ahmadi et al., 2003; Guo et al., 2003). Zbog ovako oskudnih

podataka, nepoznato je koja bi mogla biti uloga metalotioneina u polenu. Kako su joni Zn^{2+} neophodni za morfogenezu i fertilnost polenovih zrna može se pretpostaviti da bi metalotioneini mogli služiti kao rezervoar i regulator koncentracije ovih jona. U prilog ovoj pretpostavci govori i prisustvo cisteinom bogatih motiva, nalik na one u MT, u genu TSO1 iz *A. thaliana*, a za koje je pokazano da vezuju jone Zn^{2+} i da su neophodni za pravilno razviće polena (Andersen et al., 2007).

Svi pomenuti potencijalni elementi su za sada samo predikcija, a njihova funkcionalnost bi trebalo da bude potvrđena mutacionim analizama. Takođe treba napomenuti i da je u ovom radu analiziran samo jedan deo promotorskog regiona, a da se u genomu haljde najverovatnije nalaze dodatni regulatorni elementi u uzvodnim i nizvodnim regionima, a moguće je i postojanje regulacije na posttranskripcionom nivou, pa se uočeni patern aktivnosti promotorskog fragmenta ne može direktno preslikati na patern ekspresije samog gena u tkivima haljde. Zaista, značajno različit tkivni patern detektovan je metodom *in situ* RNK-RNK hibridizacije (Samardžić et al.), tako da promotorsku analizu izvedenu u ovom radu treba pre svega posmatrati kao analizu regulatornog regiona koja otvara mogućnost za identifikaciju *cis*-elemenata i dalje detaljnije proučavanje regulacije transkripcije ovog gena.

5.1.2 Regulacija aktivnosti promotora u uslovima kompleksnog stresa

In silico analizom promotora gena *FeMT3* je predikovano prisustvo mnogobrojnih *cis*-regulatornih elemenata, te se moglo očekivati da se aktivnost ovog promotora menja pod uticajem različitih egzogenih i endogenih faktora. Visoka inducibilnost tri promotorska fragmenta je uočena nakon izlaganja listova transgenih linija duvana kompleksnom stresu koji je podrazumevao potapanje listova u kompletnom medijumu MS sa saharozom, četiri do deset dana (Tabela 4.2). Odgovor na stres različitih promotorskih fragmenata je bio različitog intenziteta, što ukazuje na kompleksnu regulaciju i postojanje više *cis*-regulatornih elemenata koji regulišu ovaj odgovor. Kompjuterskom predikcijom je prepoznato nekoliko potencijalnih elemenata koji bi mogli učestvovati u povećanju promotorske aktivnosti u ovim uslovima, a koji se nalaze raspoređeni i u proksimalnom i u distalnom delu promotora.

Navedeni tretman je obuhvatao više stresnih faktora koji ne predstavljaju normalne fiziološke uslove u kojima se listovi nalaze u prirodi. Potopljeni listovi su imali vrlo redukovanu mogućnost difuzije i razmene gasova. Ovaj tretman, se na neki način može smatrati simulacijom poplave koje se dešavaju usled klimatskih nepogoda i predstavljaju jedan od vodećih problema poljoprivrede na svetskom nivou, jer značajno smanjuju prinos useva. Najveći stres sa kojim se biljke u poplavljenim područjima susreću je upravo hipoksija, odnosno nedostatak kiseonika. Biljke pogođene ovim stresom razvijaju niz adaptacija na morfološkom, fiziološkom i biohemijskom nivou kako bi opstale u tim uslovima, što naravno podrazumeva i modulaciju genske ekspresije. Biljni MT do sada nisu bili povezivani sa ovim stresom, ali je pokazana protektivna uloga sisarskih MT u tkivima pod hipoksijom (Tanji et al., 2003). U promotoru *FeMT3* se nalaze dva potencijalna *cis*-elementa koja mogu biti uključena u aktivaciju promotora u nedostatku kiseonika. To su "anaerolconsensus" uključen u odgovor na nedostatak kiseonika u promotorima gena za enzime fermentativnog puta (Mohanty et al., 2005) i "anaerobicciszmgapc4", iz promotora kukuruznog gena GapC4 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 4) (Geffers et al., 2000). U distalnom delu promotora prisutna su i dva potencijalna CuRE ("coper-responsive element") koji imaju ulogu u aktivaciji gena kao odgovor na nedostatak jona Cu^{2+} , ali za koje je uočeno da učestvuju i u aktivaciji promotora u uslovima hipoksije (Quinn et al., 2002).

U cilju testiranja hipoksije kao odvojenog faktora stresa, biljke istih transgenih linija su bile potopljene u čistu vodu, međutim promotorske aktivnosti nisu mogle biti praćene u onom trajanju koje je bilo primenjeno u slučaju potapanja sa saharozom, jer je već nakon drugog dana tkivo listova venulo i dezintegrisalo se. Potapanje u trajanju od dva dana nije rezultovalo u porastu aktivnosti. Slični rezultati su dobijeni i nakon potapanja u MS medijum bez saharoze. Dakle do povećanja promotorske aktivnosti dolazilo je samo nakon prolongiranog stresa koji je bio omogućen u prisustvu saharoze. U ovim uslovima biljne ćelije su koristile hidrolizu saharoze iz okolnog medijuma za dobijanje energije umesto oksidativne fosforilacije. Katabolizam je bio intenziviran, ali je nedostajao finalni akceptor elektrona – kiseonik, što je moglo rezultovati u povećanoj produkciji ROS i oksidativnom stresu. Sve je više podataka o uključenosti i životinjskih i biljnih metalotioneina u antioksidativne mehanizme ćelije (Balestrazzi et al., 2009; Quesada et al., 1996; Thornalley & Vasák, 1985; Wong et al., 2004; Xue et al., 2009). U promotoru *FeMT3* nalaze se i dva potencijalna elementa COREOS CORE ("coordinate regulatory element for antioxidant defense") nađene u genima uključenim

u antioksidativnu odbranu kod pirinča (PLACE), te je jedna od pretpostavki da je oksidativni stres mogao biti pokretač promotorskog odgovora.

U promotorskom regionu se nalaze i dva potencijalna SUREAHVISO1 elementa (SURE - "sugar-responsive elements") koji indukuju promotorsku aktivnost gena za izoamilazu 1 ovsa u prisustvu saharoze (Grierson et al., 1994). Postojanje ovih potencijalnih elemenata u proksimalnom regionu promotora moglo bi objasniti intenzivnu aktivaciju svih promotorskih fragmenata. Prisustvo saharoze u medijumu oko ćelija nije situacija sa kojom se susreće tkivo lista u prirodi. Saharozna je tokom tretmana mogla odigrati ulogu signala, ili je omogućila opstanak biljnog tkiva u uslovima kompleksnog stresa koji je doveo do porasta aktivnosti promotora.

5.1.3 Regulacija aktivnosti promotora jonima metala

Regulacija transkripcije jonima metala najviše je proučavana na genima za metalotioneine sisara. Ekspresija ovih gena je regulisana sekvencama MRE ("metal-responsive element") koje su prisutne u promotorskim regionima. Za ove regulatorne *cis*-elemente vezuje se transkripcioni faktor MTF-1 ("metal-responsive transcription factor-1") koji sadrži 6 Zn prstića. Nakon indukcije metalima ili drugim stimulusima MTF-1 se translocira u nukleus, vezuje za DNK i pokreće ekspresiju gena (Haq et al., 2003). Joni metala povećavaju ekspresiju mnogih biljnih MT, međutim regulacija aktivnosti biljnih MT promotora pod tim uslovima je jako slabo proučena.

Za tretmane biljaka u cilju kako analize promotorske aktivnosti, tako i promena nivoa transkripta i ispitivanja mogućih odbrambenih svojstava FeMT3 u ćelijama izabrani su joni Cd^{2+} i Cu^{2+} . Kadmijum je uzet kao predstavnik grupe toksičnih teških metala koji nemaju poznatu fiziološku ulogu u biljnim ćelijama. Štetno dejstvo Cd^{2+} se ogleda u istiskivanju esencijalnih jona iz katalitičkih centara enzima ili u vezivanju i blokiranju funkcionalnih grupa važnih ćelijskih proteina. Druga posledica prisustva ovih jona je i nastanak oksidativnog stresa usled disbalansa antioksidativnog mehanizma ćelije. S druge strane, bakar spada u esencijalne mineralne elemente, pošto ulazi u sastav mnogih bitnih enzima i proteina. Ipak, izlaganje ćelija jonima Cu^{2+} u koncentracijama koje su veće od optimalnih, dovodi do oksidativnog stresa, koji nastaje kao posledica redoks aktivnosti ovih jona.

Veoma jako povećanje aktivnosti promotorskog regiona gena *FeMT3* je uočeno u listovima transgenih biljaka nakon izlaganja visokim koncentracijama CdCl_2 i CuSO_4 (Sl.4.2). Postojanje četiri potencijalne sekvence MRE u ovom promotorskom regionu sugeriše da bi možda neke od njih ili sve, mogle biti uključene u ovu regulaciju. Ove sekvence imaju i izvesna odstupanja od konsenzusa koji je ustanovljen na sisarskim elementima (Tabela 4.3). U svakom slučaju njihova funkcionalnost bi morala biti potvrđena mutacionim analizama.

Postoji svega nekoliko biljnih MT promotora za koje je uočena pozitivna regulacija metalima. Međutim, potencijalne MRE sekvence uglavnom nisu prepoznate u ovim promotorima, kao što je slučaj sa genima *MT1a*, *MT2a*, *MT2b* i *MT3* iz *A. thaliana* (Guo et al., 2003). Dalja istraživanja na ovim promotorima mogla bi rezultovati u otkriću novih *cis*-regulatornih elemenata koji su možda specifični za biljke.

Sa druge strane, u sekvencama nekoliko biljnih MT promotora su uočeni potencijalni MRE, ali regioni u kojima se oni nalaze nisu bili inducibilni pod dejstvom jona metala (Chatthai et al., 2004; Fordham-Skelton et al., 1997; Whitelaw et al., 1997).

Do sada je osim *FeMT3*, uočen još samo jedan promotor biljnog MT u kome je prepoznata potencijalna sekvenca MRE (u jednoj kopiji), a koji je inducibilan pod uticajem jona metala. Aktivnost promotora *ricMT* iz pirinča (Lu et al, 2007) umereno se povećava pod dejstvom jona cinka i bakra, a delecijom analizom je sužen region odgovoran za ovu regulaciju na svega 37 bp. U okviru ovog regiona se nalazi i pomenuta sekvenca MRE, što sugeriše njenu funkcionalnost. Treba reći da promotorski region gena *ricMT* koji obuhvata ovu sekvencu dovodi do povećanja aktivnosti svega oko dva puta pod dejstvom jona Cu^{2+} , a čak i manje od toga u slučaju jona Zn^{2+} . Nasuprot tome, aktivnost promotora *FeMT3* povećava se i do 64,5 puta nakon dejstva jona bakra. U analizama ova dva promotora korišćeni su različiti heterologni sistemi (*A. thaliana* za *ricMT* i duvan za *FeMT3*), i različiti uslovi tretmana (150 μM CuSO_4 /6h za *ricMT* i 50 μM / 1 ili 2 dana za *FeMT3*) pa se ne može praviti egzaktno poređenje, ali se možda može pretpostaviti da je veći broj MRE elemenata u promotoru *FeMT3* mogao dovesti do njegove mnogo jače inducibilnosti. Naravno, funkcionalnost ni jedne od potencijalnih MRE još uvek nije potvrđena i sve pomenute pretpostavke morale bi biti potkrepljene odgovarajućim mutacionim analizama.

Interesantno je i prisustvo dve potencijalne sekvence CuRE ("coper-responsive element") koje se delimično preklapaju sa dve distalne kopije MRE. Za ovaj element,

koji je identifikovan u promotorima gena *CPX1* i *CYC6* zelene alge *Chlamydomonas reinhardtii*, vezuje se transkripcioni regulator CRR1 i dovodi do smanjenja ekspresije u odgovoru na jone bakra (Quinn et al., 2000; Quinn & Merchant, 1995), odnosno do indukcije ekspresije u nedostatku ovih jona. Kako je za promotor gena *FeMT3* uočeno povećanje a ne smanjenje aktivnosti u odgovoru na bakar, potencijalne CuRE sekvence možda nisu funkcionalne. Poznato je, sa druge strane, da sekvence koje okružuju neki *cis*-element mogu značajno da utiču na prirodu njegovog funkcionisanja, tako da postoji mogućnost da ovi elementi koji se preklapaju delom sa potencijalnim MRE sekvencama funkcionišu na drugačiji način nego što je to uočeno kod gena *CPX1* i *CYC6* *C.reinhardtii*.

Treba napomenuti i da je promotor gena *FeMT3* prvi promotor biljnog MT gena za koji je ustanovljena pozitivna regulacija jonima kadmijuma. Jaka indukcija jonima Cd^{2+} i Cu^{2+} kao i postojanje četiri potencijalna MRE daju značaj promotoru *FeMT3*, koji može poslužiti za detaljnije istraživanje transkripcione regulacije metalima, ali i kao dobar kandidat za primenu u biotehnologiji.

5.2 Ekspresija gena *FeMT3* pod uticajem jona metala

Kao što je već rečeno, na osnovu promotorske analize ne može se sa sigurnošću zaključivati o ekspresiji samog gena. Zato je bilo potrebno ispitati nivo transkripta *FeMT3* u listovima heljde i utvrditi da li se menja pod uticajem jona metala.

Kako je ranije utvrđeno analizom Northern blot, nivo transkripta gena za metalotionein tipa 3 heljde povećava se u listu nakon izlaganja jonima bakra i cinka, dok joni aluminijuma nisu imali efekta (Brkljačić et al., 2004). U ovim eksperimentima korišćen je pristup hibridizacije ukupne RNK lista delom cDNK klona pBM290 (acc.no. AF056203), koji je obuhvatao ceo 3'UTR i deo kodirajuće sekvence *MT3* heljde. Geni za metalotioneine u biljnim genomima su često prisutni u vidu multigenskih familija, pri čemu različiti geni u okviru iste familije mogu imati veoma slične sekvence, čak i do 99% (de Miranda et al., 1990.). Sudeći po analizi različitih klonova izolovanih iz subgenomske biblioteke heljde obogaćene genima za metalotioneine to može biti slučaj

i sa genima za MT tipa 3 heljde (Brkljačić, 2003; Majić, 2002). Tako je pomenutom analizom Northern blot mogla biti detektovana ukupna promena svih veoma sličnih MT gena.

Kako je u daljim analizama funkcionalnosti *FeMT3* prekomernom ekspresijom u biljkama, korišćen klon FeMT3.10 ukazala se potreba za analizom ekspresije ove specifične cDNK, pod uticajem jona bakra. Stoga je u ovom radu korišćeno specifično umnožavanje izabranog klona FeMT3.10, korišćenjem prajmera MT10F/MT10R koji se vezuju za 3'UTR ovog klona.

Sa druge strane, do sada nije analiziran uticaj jona kadmijuma na nivo ekspresije gena za metalotionein tipa 3 heljde, pa je to učinjeno u ovom radu.

Za određivanje nivoa ekspresije gena *FeMT3* korišćena je metoda Real-time PCR, koja omogućava specifičnost i kvantifikaciju određene cDNK u uzorku. Nakon izlaganja jonima Cu^{2+} i Cd^{2+} uočen je porast nivoa mRNK gena *FeMT3* (Sl. 4.6). Ovo povećanje bilo je umereno, odnosno mnogo manje izraženo nego povećanje promotorske aktivnosti pod uticajem istih jona metala, što se može objasniti postojanjem represornih *cis*-regulatornih elemenata uzvodno od izolovanog promotora ili nizvodno od gena, ili je modulacija ekspresije izvršena na nivou posttranskripcione regulacije. Na osnovu iznetih podataka ne može se ništa tvrditi o postojanju samog proteina kodiranog genom *FeMT3* niti o promenama na proteinskom nivou tokom stresa izazvanog teškim metalima. Odgovore na ova pitanja mogla bi dati analiza "Western blot". Uočeni porast transkripcije pod uticajem jona metala ipak predstavlja značajan pokazatelj učešća *FeMT3* u odbrani tkiva heljde od stresa jona metala.

5.3 Odbrambena svojstva proteina kodiranog genom *FeMT3* u živim sistemima

Zaključci koji proizilaze iz analiza promotorske aktivnosti i ekspresije gena samo indirektno mogu ukazivati i na moguće biološke funkcije. Veći pomak u rasvetljavanju funkcija koje MT obavljaju može se učiniti analizom funkcionalnosti biljnih metalotioneina u živim organizmima. U tu svrhu koriste se prokariotski sistemi, jednoćelijski eukariotski sistemi, a najvrednije informacije se dobijaju korišćenjem transgenih biljaka sa izmenjenim nivoom ekspresije gena koji se ispituje.

5.3.1 Uticaj *FeMT3* na toleranciju prokariotskih ćelija na stres izazvan teškim metalima

Sposobnost proteina kodiranog genom *FeMT3* da štiti žive ćelije od toksičnog dejstva jona teških metala prvo je testirana u prokariotskom sistemu *E.coli*. Ovo svojstvo je pokazano za nekoliko biljnih metalotioneina kada je testirana sposobnost ovih proteina da vezuju jone metala *in vivo* i da obezbeđuju ćelijama veću toleranciju na stres izazvan teškim metalima. U najvećem broju slučajeva biljni metalotioneini su eksprimirani u fuziji sa tagom GST (glutation S transferaza) u *E.coli* soja BL21 (Akashi et al., 2004; Bilecen et al., 2005; Mir et al., 2004; Jordan et al., 2005; Usha et al., 2009), a BjMT2 je eksprimiran u fuziji sa tagom Trx (tioeredoksin) u *E.coli* soja *Rosetta gami* (Zhigang et al., 2006). Upotrebljeni tagovi su omogućili eksprimiranje rekombinantnih proteina u solubilnoj formi. Za BjMT2 iz *B.juncea* i dMT iz pšenice je pokazano da povećavaju toleranciju ćelija *E.coli* na visoke koncentracije jona metala (Zhigang et al., 2006; Bilecen et al., 2005). U nekim studijama ekspresija rekombinantnih metalotioneina u bakterijama je iskorišćena za analizu afiniteta za vezivanje jona metala. Tako je napr. za različite tipove metalotioneina iz *Prosopis juliflora* pokazano da imaju različite afinitete za vezivanje jona Cu^{2+} , Cd^{2+} i Zn^{2+} (Usha et al., 2009).

Rekombinantni protein FeMT3 je eksprimiran u ćelijama *E. coli* soja BL21pLysS, u fuziji sa tagovima GST i Trx. Kako je u neindukovanoj kontroli ćelija koje su nosile konstrukt *Trx-FeMT3* uočena proteinska traka iste molekulske težine kao u indukovanim ćelijama, za dalji rad je izabran konstrukt *GST-FeMT3*. Fuzija GST-FeMT3 je uspešno eksprimirana u soju BL21, pri čemu je rekombinantni protein bio prisutan i u solubilnoj i u istaloženoj frakciji. Prisustvo rekombinantnog proteina u solubilnoj formi bilo je potrebno da bi se testirala njegova zaštitna svojstva u ćelijama koje ga eksprimiraju, u prisustvu jona teških metala. Identitet rekombinantnog GST-FeMT3 je potvrđen prečišćavanjem odgovarajućom afinitetnom hromatografijom i analizom "Western blot", korišćenjem antitela na His-tag, koji se takođe nalazio u okviru eksprimiranog proteina (Sl. 4.7, 4.8 i 4.9).

Ćelije soja BL21 koje su eksprimirale rekombinantni protein GST-FeMT3 su bile značajno tolerantnije na prisustvo jona Cd^{2+} u odnosu na netransformisane ćelije istog soja ili ćelije koje su eksprimirale sam tag GST (Sl. 4.10). Ovim je potvrđeno da FeMT3 može učestvovati u odbrani ćelija od stresa izazvanog teškim metalima.

5.3.2 Uticaj FeMT3 na toleranciju biljnih tkiva na stres izazvan teškim metalima i njegova unutarćelijska lokalizacija

Prethodno uočena zaštitna svojstva FeMT3 u prokariotskom sistemu *E. coli*, bilo je potrebno potvrditi i u biljnom tkivu. Kao što je pokazano, FeMT3 je zaista bio sposoban da obezbedi veću toleranciju na stres izazvan teškim metalima u tranzijentno transformisanim listovima duvana *N. debneyii*. Nakon izlaganja visokim koncentracijama $CdCl_2$ i $CuSO_4$ delovi listova u kojima je FeMT3 prekomerno eksprimiran su mnogo sporije žuteli, u odnosu na kontrolne delove listova koji su transformisani praznim *Agrobacterium*-om istog soja (Sl. 4.12). Veća tolerancija na stres pokazana je i merenjem ukupnog nivoa hlorofila i lipidne peroksidacije (Sl. 4.13 i 4.14). Povećanje lipidne peroksidacije i gubitak hlorofila, koji predstavljaju važne markere oksidativnog stresa i ćelijske smrti, zabeleženi su kod različitih biljnih vrsta nakon izlaganja teškim metalima (Rahoui et al.; Gallego et al., 1996; Sandalio et al., 2001; Schutzendubel & Polle, 2002; Schutzendubel et al., 2001). Bakar koji spada u prelazne metale katalizuje Fentonovu reakciju kojom se stvara hidroksil-radikal i

peroksid-radikali. Oksidativni stres, bez obzira na način nastanka, ima za posledicu oštećenje važnih ćelijskih komponenti, među kojima su i hloroplasti i membranski lipidi. Joni bakra mogu inhibirati fotosintezu i tako što izmeštaju jone magnezijuma iz hlorofila (Kupper et al., 2003). Kadmijum nije prelazni metal, ali dovodi do stvaranja ROS i oksidativnog stresa na drugi način. Joni kadmijuma interaguju sa funkcionalnim grupama proteina i tako ih blokiraju, ili izmeštaju esencijalne jone iz njihovih mesta u katalitičkim centrima enzima. Da bi se sprečilo ovo toksično dejstvo, joni Cd^{2+} se uklanjaju pre svega vezivanjem za fitohelatine i otpremanjem u vakuolu. Međutim, povećanje sinteze fitohelatina dovodi do velikog pada u koncentraciji njihovog prekursora, glutationa. Kako je glutation neophodan deo antioksidativnog sistema ćelije, njegov nedostatak dovodi do disbalansa u redoks-homeostazi ćelije. Osim toga, joni kadmijuma inhibiraju superoksid dismutazu, glutation reduktazu, peroksidaze i katalazu, što sve rezultuje u pojavi oksidativnog stresa (Sandalo et al., 2001; Schutzendubel i Polle, 2001). Postoje i podaci koji ukazuju da joni Cd^{2+} aktiviraju lipoksigenaze i produkciju lipidnih peroksida, a takođe indukuju i akumulaciju H_2O_2 i stvaranje oksidativnog praska sličnog onom koji se dešava nakon napada patogena (Schutzendubel i Polle, 2001). Hloroplasti su ekstremno osetljivi na prisustvo kadmijuma. Iako u hloroplaste ulazi svega 1% od ukupne količine usvojenog kadmijuma u listu (Krupa, 1999; Gorinova et al., 2007), to je dovoljno da izazove degradaciju hlorofila i karotenoida i inhibiciju njihove sinteze (Bazzaz et al., 1992). Joni Cd^{2+} izbacuju jone Ca^{2+} iz reaktivnog centra fotosistema II inhibirajući njegovu fotoaktivaciju (Schutzendubel i Polle, 2001). To sve ima za posledicu poremećaj u elektron-transportnim lancima i produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta. Procesi degradacije membranskih lipida i hloroplasta se međusobno aktiviraju i pojačavaju. Reaktivne kiseonične vrste, nastale u oštećenim hloroplastima, narušavaju integritet membrane interagujući sa membranskim lipidima i stvarajući lipidne peroksidi. Sa druge strane, lipidni peroksidi pojačavaju degradaciju hlorofila (Sornashekaraiyah et al., 1992).

Osim heljdinog metalotioneina tipa 3, za nekoliko drugih biljnih metalotioneina je uočeno da smanjuju gubitak hlorofila i nivo oksidativnog stresa izazvan dejstvom teških metala. Pojačana ekspresija *AtMT2a* i *AtMT3* u stominim ćelijama *V. faba* povećala je njihovu toleranciju na prisustvo jona Cd^{2+} . U ćelijama sa eksprimiranim *Arabidopsis*-nim metalotioneinima broj hloroplasta je bio značajno veći, a koncentracija ROS manja (Lee et al., 2004). Pojačana ekspresija *BjMT2* iz *Brassica*

juncea u *Arabidopsis*-u je povećala otpornost na bakar i kadmijum, što je određeno rastom izdnaka i sadržajem hlorofila (Zhigang et al., 2006). Produkcija vodonik peroksida, superoksid-anjona i lipidnih peroksida usled izlaganja jonima bakra i cinka je bila značajno smanjena u transgenim biljkama topole kada je eksprimiran gen za metalotionein iz graška *PsMT_{A1}* (Balestrazzi et al., 2009).

Na osnovu rezultata ovog rada ne može se zaključivati o mehanizmima dejstva FeMT3 i načinu na koji je on sposoban da zaštiti ćelije nakon izlaganja teškim metalima. On najverovatnije helira jone metala kao što je poznato za druge MT (Freisinger, 2008; Usha et al., 2009) i na taj način sprečava njihovo štetno delovanje. Drugi mehanizam bi bio zasnovan na antioksidativnim sposobnostima FeMT3, odnosno smanjenju ROS nastalog pod dejstvom metala. U ovom radu nisu pokazane sposobnosti heljdinog MT da neutrališe ROS, ali je u okviru druge studije (Samardžić et al, prijavljeno za publikaciju) pokazano da FeMT3 štiti ćelije kvasca od oksidativnog delovanja H₂O₂. Metalotionein heljde značajno je povećao rast kvašćevih ćelija u prisustvu vodonik peroksida. Antioksidativne sposobnosti životinjskih metalotioneina su poznate već duže vreme, a sve je više studija koje isto pokazuju i za biljne MT. Još 80-ih i 90-ih godina prošlog veka je bilo poznato da sisarski MT mogu da redukuju superoksidni anjon, hidroksilni radikal i vodonik peroksid, pri čemu se sami oksiduju (Thornaley & Vasak, 1985; Quesada et al., 1996). CLMT2 iz lubenice je bio prvi biljni metalotionein za koji je pokazano *in vitro* da je sposoban da neutrališe ROS (Akashi et al., 2004). Ovaj metalotionein redukovao je hidroksil radikal za koji ne postoji enzimski mehanizam uklanjanja i koji spada u najopasnije radikale zbog svoje visoke reaktivnosti i učešća u Fentonovoj reakciji. Kasnije je na isti način pokazana sposobnost redukcije ROS metalotioneina GhMT3 iz pamuka (Xue et al., 2009). Za nekoliko biljnih metalotioneina je pokazano antioksidativno dejstvo *in vivo*. Prekomerna ekspresija gena *OsMT2b* iz pirinča značajno je smanjila nivo vodonik peroksida indukovano patogenim elicitorom u transformisanim ćelijama. Utišavanje ovog gena imalo je za posledicu povećan nivo H₂O₂ (Wong et al., 2004). Slično je uočeno u *Arabidopsis*-u u kome je eksprimiran *cgMT1* iz *C. glauca* (Obertello et al., 2007). Uticaj MT na smanjenje nivoa H₂O₂ u biljkama, je pokazan i za gen *GhMT3a* iz pamuka čija je ekspresija u transgenim biljkama rezultovala u smanjenju nivoa ROS, nakon izlaganja različitim abiotičkim stresovima (Xue et al., 2009). Kako su u ovim slučajevima MT smanjivali nivo ROS u odsustvu povišenih koncentracija jona metala, mehanizam njihovog delovanja nije bio vezan za njihova metal-helirajuća, već antioksidativna

svojstva. U slučaju stresa izazvanog teškim metalima oba mehanizma bi mogla igrati važnu ulogu.

U razjašnjavanju funkcija jednog proteina veoma je važno odrediti njegovu unutarćelijsku lokalizaciju. To je veoma težak zadatak u slučaju metalotioneina pošto ćelijska frakcionacija uništava ove proteina koji se degraduju u prisustvu kiseonika. Iz istog razloga veoma je teško izvesti imunocitološku analizu, naročito u slučaju biljnih MT. Postoji oskudan broj studija gde je imunocitološki pokazana lokalizacija sisarskih MT, koji su detektovani u citosolu, ali i u mitohondrijama i nukleusu gde je pretpostavljeno da održavaju homeostazu jona cinka (Cherian & Apostolova, 2000; Ye et al., 2001). MT ne poseduju NLS ("nucleus localization signal") a ni druge signalne peptide, te nije potpuno razjašnjen mehanizam ulaska MT u ove organele. Sisarski MT se transportuju u nukleus tokom prelaska iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa, za šta je bitna perinuklearna lokalizacija njihove mRNK koja zavisi od signala u 3' UTR. Pretpostavlja se da MT u jedru štiti DNK od oštećenja i da učestvuje u dopremanju Zn^{2+} enzimima i transkripcionim faktorima (Levadoux et al., 1999; Levadoux-Martin et al., 2001). Prisustvo MT u intermembranskom prostoru mitohondrija ukazuje na ulogu u puferovanju jona Zn^{2+} koji imaju inhibitorno dejstvo na respiraciju (Ye et al., 2001).

Za određivanje unutarćelijske lokalizacije biljnih MT koristi posredan način, praćenjem lokalizacije rekombinantnih MT u fuziji sa fluorescentnim proteinima (napr. GFP – "green fluorescent protein"). Ovaj pristup može dati veoma vredne podatke, ali ima i ozbiljna ograničenja. Primećeno je da GFP i njegove varijante mogu odvući u jedro fuziju sa proteinima koji inače nemaju nukleusnu lokalizaciju. Zato se na ovaj način ne može proveriti da li i biljni MT ulaze u jedro u nekim fazama ćelijskog ciklusa, kao što je uočeno za sisarske.

Unutarćelijska lokalizacija FeMT3 je praćena u N-terminalnoj fuziji sa YFP ("yellow fluorescent protein"), koji je varijanta GFP. Ispitivana je lokalizacija dva različita klona cDNK koji se razlikuju u dužinama 3'UTR (Sl. 4.15), zbog mogućnosti da se u ovim nekodirajućim regionima nalaze signali za lokalizaciju transkripta koja bi mogla uticati i na lokalizaciju samih proteina, kako je uočeno u slučaju sisarskih MT. Bez obzira na dužinu 3'UTR dobijena je citoplazmatična lokalizacija, što se nije promenilo ni prilikom tretmana jonima kadmijuma i bakra. Uočeni su i signali u jedru, ali kao što je već rečeno zbog prirode proteina YFP (varijante GFP), ne može se ništa zaključivati o eventualnoj nukleusnoj lokalizaciji samog FeMT3. Fuzije YFP-FeMT3.5 i YFP-FeMT3.10 su odsustvovala iz hloroplasta i vakuola, kako u neindukovanim

uslovima tako i nakon izlaganja jonima Cu^{2+} i Cd^{2+} (Sl. 4.16). Odsustvo FeMT3 iz vakuole, što je uočeno i za neke druge biljne MT (Zhigang et al., 2006; Lee et al., 2004) ukazuje na to da ovi metalotioneini ostvaruju svoju zaštitnu ulogu drugačije od fitohelatina. Poznato je da fitohelatini u citosolu stvaraju komplekse sa jonima metala, koji se zatim transportuju u vakuolu. U vakuoli ovi kompleksi disociraju; oslobođeni fitohelatini se vraćaju u citosol, a joni metala se vezuju za organske kiseline i tako ostaju van citoplazme čime se sprečava njihovo štetno dejstvo. Nasuprot tome, izgleda da metalotioneini deluju tako što heliraju jone u citosolu sprečavajući njihovu slobodnu interakciju sa komponentama citoplazme i ulazak u organele. Na ovaj način FeMT3 je mogao zaštititi i hloroplaste iako nije bio prisutan u njima. Takođe jedan od odbrambenih mehanizama metalotioneina je najverovatnije i antioksidativno dejstvo, odnosno uklanjanje ROS koji su nastali dejstvom metala u citoplazmi.

Prethodne studije koje su razmatrale zaštitnu ulogu biljnih metalotioneina u uslovima različitih stresova bile su fokusirane uglavnom na metalotioneina tipa 1 i 2 (Wong et al., 2004; Obertello et al., 2007; Balestrazzi et al., 2009; Zhigang et al., 2006). Samo u jednoj studiji pokazana su odbrambena svojstva MT tipa 3 u biljnom tkivu nakon izlaganja jonima metala i to u tranzijentno transformisanim pojedinačnim stominim ćelijama (Lee et al., 2004). U drugoj studiji uočeno je učešće MT3 iz pamuka u odbrani transgenih biljaka duvana nakon izlaganja nekim abiotičkim stresovima, pri čemu nije analiziran stres izazvan teškim metalima (Xue et al., 2009). Rezultati dobijeni u ovom radu zato predstavljaju značajan doprinos razumevanju uloga metalotioneina tipa 3 u biljnom tkivu izloženom dejstvu teških metala.

5.4 Promotorski region i protein kodiran genom *FeMT3* kao kandidati za primenu u biotehnologiji

Sposobnost *FeMT3* da štiti prokariotske ćelije i biljno tkivo od stresa izazvanog teškim metalima, kao i inducibilnost promotora i povećanje ekspresije ovog gena pod uticajem jona Cd^{2+} i Cu^{2+} govore o važnoj ulozi gena za metalotionein u toleranciji heljde na prisustvo teških metala. Osim toga, izneti rezultati ukazuju na potencijal *FeMT3* za primenu u fitoremedijaciji. Zagađenje životne sredine teškim metalima predstavlja veoma ozbiljan problem savremenog sveta. Industrijalizacija je dovela do kontaminacije metalima zemljišta koja se nalaze u povoljnim klimastkim zonama i koja bi inače bila pogodna za gajenje useva. Značajna su i zagađenja vode i vazduha, što sve ostavlja velike negativne posledice na poljoprivredu i ljudsko zdravlje. Fitoremedijacija predstavlja veoma efikasan i ekonomičan način za dekontaminaciju zagađenih oblasti (Pilon-Smits, 2005; Lombi et al., 2001; Vangronsveld et al., 2009; Vassilev et al., 2004). Ovaj pristup podrazumeva korišćenje biljaka koje su sposobne da usvajaju, akumuliraju i tolerišu visoke koncentracije polutanata. Prirodni hiperakumulatori, kao što su napr. *T. caerulescens* iako poseduju sve ove osobine ne mogu biti pogodne za fitoremedijaciju zbog svoje male biomase. Zbog toga se sve više ulaže u stvaranje genetički modifikovanih biljaka koje bi posedovale sve potrebne osobine (Cherian & Oliveira, 2005). To podrazumeva pre svega pojačanu produkciju metal-helirajućih molekula među kojima su i metalotioneini. Duvan, čija je jedna vrsta korišćena u ovom radu, se smatra veoma pogodnim za fitoremedijaciju zbog svoje velike biomase, dobre transformabilnosti i činjenice da veliki deo usvojenih metala akumulira u listovima, dakle u nadzemnim delovima biljke koji se lako mogu sakupljati.

Metalom-indukovani promotori mogu biti od velike koristi za biomonitoring zagađivača sredine, kao i u poboljšanju svojstava biljaka hiperakumulatora (Qi et al., 2007). Promotor gena *FeMT3* poseduje veliki potencijal za konstruisanje biosenzorskog sistema u kojem bi vodio metalom-indukovanu ekspresiju reporterskog gena. Ovakvi konstrukti predstavljaju jednostavne i ekonomične sisteme koji omogućavaju blagovremenu detekciju prisustva metalnih polutanata, što može sprečiti ozbiljniju kontaminaciju ispitivanog područja. Jaka indukcija jonima metala u okviru

samo 569 bp je još jedna prednost promotora *FeMT3* zato što mali promotori pojednostavljaju konstrukciju ekspresione kasete i favorizuju multiplu integraciju u domaćinske hromozome (Park et al., 2007).

Druga biotehnološka primena promotora *FeMT3* bila bi regulacija ekspresije gena za helatore metala ili druge učesnike u akumulaciji jona metala u biljkama hiperakumulatorima. Inducibilni promotori u ovim slučajevima su mnogo bolji izbor od jakih, konstitutivno aktivnih promotora, kao što je napr. CaMV35S, koji uzrokuju stalno prisustvo intenzivno eksprimiranog transgena što može imati loše posledice. Činjenica da je promotor *FeMT3* mnogo jače aktivan u listovima nego u korenu, takođe može biti prednost s obzirom da su nadzemni delovi biljke pogodni za sakupljanje u procesu fitoremedijacije.

ZAKLJUČCI

1. Funkcionalnom promotorskom analizom u transformisanim biljkama duvana T1 generacije uočena je tkivna distribucija aktivnosti izolovanog promotorskog fragmenta gena *FeMT3*, koji obuhvata region od 569 bp uzvodno od starta transkripcije. Kvalitativnim GUS - esejem je pokazano da su promotorski fragment -569 i njegove 5' delcione varijante (-416 i -163) aktivni u ćelijama vaskularnog tkiva lista, dok je njihova aktivnost izostala u ostalim ćelijama lista. Veoma jaki signali su uočeni u polenovim zrnima, a odsustvovali su u ostalim tkivima cveta. Uočena aktivnost u korenu je bila slabijeg intenziteta.

2. Kvantitativnim esejem GUS je utvrđena inducibilnost aktivnosti promotora *FeMT3* u uslovima kompleksnog stresa. Potapanje listova transgenih biljaka gajenih u kulturi u kompletni medijum MS, dovelo je do značajnog povećanja aktivnosti promotorskih fragmenata (-569, -416 i -163) i to u saglasnosti sa duzinom ispitivanog promotorskog regiona: 11,5; 8,5 i 4,8 puta u odnosu na netretirane listove istih transgenih linija.

3. Tretman visokim koncentracijama metala doveo je do snažnog povećanja aktivnosti najvećeg ispitivanog promotorskog fragmenta (-569). Promotorska aktivnost povećala se 16,8 puta nakon jednog dana, a 51,7 puta nakon dva dana tretmana sa 100 μM CdCl_2 . Tretman sa 50 μM CuSO_4 doveo je do povećanja aktivnosti 36,8 i 64,5 puta nakon jednog, odnosno dva dana.

4. Nivo transkripta gena *FeMT3* u listovima heljde takođe se povećao pod dejstvom visokih koncentracija CdCl_2 i CuSO_4 . Real-time RT-PCR metodom su uočena povećanja koja su bila statistički značajna, ali dosta manja od povećanja aktivnosti promotora, što može biti objašnjeno prisustvom negativnih regulatora transkripcije uzvodno od izolovanog promotorskog regiona, ili postojanjem drugih vidova regulacije nivoa transkripta.

5. Rekombinantni protein FeMT3 uspešno je eksprimiran u fuziji sa GST i His tagovima u ćelijama *E.coli* soja BL21pLysS. Proteinska fuzija je bila prisutna i u solubilnoj i u precipitiranoj frakciji. Rekombinantni GST-His-FeMT3 je prečišćen afinitetnom hromatografijom, a identitet rekombinantnog proteina je potvrđen analizom Western blot sa antitelima Anti-His.

6. Prisustvo rekombinantnog GST-His-FeMT3 je omogućilo brži rast ćelijama *E.coli* u prisustvu 300 μM CdCl_2 u poređenju sa onima u kojima je eksprimiran sam GST ili sa netransformisanim ćelijama istog soja. Ovaj rezultat je ukazao da je rekombinantni FeMT3 sposoban da zaštiti ćelije *E.coli* od stresa izazvanog visokom koncentracijom jona Cd^{2+} .

7. Kako bi se utvrdilo da li *FeMT3* ima uticaja na toleranciju biljnih tkiva na stres izazvan teškim metalima, ovaj gen je tranzijentno prekomerno eksprimiran u heterolognom biljnom sistemu- duvanu *N. debneyii*. Nakon 3 dana tretmana visokim koncentracijama CdCl_2 ili CuSO_4 , delovi listova sa eksprimiranim FeMT3 su pokazali značajno veću sposobnost da podnesu stres. Kontrolne polovine listova su mnogo brže žutele, a brži gubitak hlorofila je potvrđen i merenjem sadržaja ukupnog hlorofila. Nivo lipidne peroksidacije je bio, takođe, značajno veći u kontrolnom tkivu lista u poređenju sa tkivom koje je eksprimiralo FeMT3. Ovi rezultati su ukazali na sposobnost metalotioneina heljde da učestvuje u odbrani biljnog tkiva od stresa izazvanog teškim metalima.

8. Ispitana je unutarćelijska lokalizacija proteina FeMT3 kodiranog sa dva različita cDNK klona *FeMT3.10* i *FeMT3.5*, koji imaju različite dužine 3'UTR regiona. Za praćenje unutarćelijske lokalizacije, korišćene su N-terminalne fuzije sa fluorescentnim proteinom YFP, tranzijentno eksprimirane u listovima duvana *N. debneyii*. Bez obzira na 3'UTR, FeMT3 je bio lokalizovan u citoplazmi, a signali su odsustvovali u vakuoli i hloroplastima. Nakon izlaganja jonima Cd^{2+} i Cu^{2+} , YFP-FeMT3 je ostao isključivo u citoplazmi. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da FeMT3, slično drugim biljnim metalotioneinima čija je lokalizacija ispitana, obavlja svoju zaštitnu ulogu na drugačiji način od fitohelatina koji vrše detoksifikaciju od teških metala tako što ulaze u komplekse sa jonima i translociraju ih u vakuolu.

LITERATURA

- Abdullah SNA, Cheah SC, Denis JM (2002). Isolation and characterisation of two divergent type 3 metallothioneins from oil palm, *Elaeis guineensis*. *Plant Physiol Biochem* 40: 255-263
- Ahmadi N, Dellerme S, Laplaze L, Guermache F, Auguy F, Duhoux E, Bogusz D, Guiderdoni E, Franche C (2003). The promoter of a metallothionein-like gene from the tropical tree *Casuarina glauca* is active in both annual dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Transgenic Res* 12(3): 271-281
- Akashi K, Nishimura N, Ishida Y, Yokota A (2004). Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochem Biophys Res Commun* 323(1): 72-78
- Andersen SU, Algreen-Petersen RG, Hoedl M, Jurkiewicz A, Cvitanich C, Braunschweig U, Schauser L, Oh SA, Twell D, Jensen EO (2007). The conserved cysteine-rich domain of a tesmin/TSO1-like protein binds zinc in vitro and TSO1 is required for both male and female fertility in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 58(13): 3657-3670
- Balestrazzi A, Botti S, Zelasco S, Biondi S, Franchin C, Calligari P, Racchi M, Turchi A, Lingua G, Berta G, Carbonera D (2009). Expression of the PsMTA1 gene in white poplar engineered with the MAT system is associated with heavy metal tolerance and protection against 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated-DNA damage. *Plant Cell Rep* 28(8): 1179-1192
- Bazzaz FA, Rolfe GL, Carlson RW (1992). Effect of cadmium on photosynthesis and transpiration of excised corn and sunflower. *Physiol Plant* 32: 373-377
- Berta M, Giovannelli A, Potenza E, Traversi ML, Racchi ML (2009). Type 3 metallothioneins respond to water deficit in leaf and in the cambial zone of white poplar (*Populus alba*). *J Plant Physiol* 166(5): 521-530
- Bilecen K, Ozturk UH, Duru AD, Sutlu T, Petoukhov MV, Svergun DI, Koch MH, Sezerman UO, Cakmak I, Sayers Z (2005). *Triticum durum* metallothionein. Isolation of the gene and structural characterization of the protein using solution scattering and molecular modeling. *J Biol Chem* 280(14): 13701-13711

- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Bratić AM, Majić DB, Samardžić JT, Maksimović VR (2009). Functional analysis of the buckwheat metallothionein promoter: tissue specificity pattern and up-regulation under complex stress stimuli. *J Plant Physiol* 166(9): 996-1000
- Brkljačić J (2003). Kloniranje i analiza regulacije ekspresije gena za metalotionein heljde (*Fagopyrum esculentum* Moench). Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu.
- Brkljačić JM, Maksimović VR, Radović SR, P. SA (1999). Isolation of metallothionein-like cDNA clone from buckwheat. *J Plant Physiol* 154: 802-804
- Brkljačić JM, Samardžić JT, Timotijević GS, Maksimović VR (2004). Expression analysis of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) metallothionein-like gene (MT3) under different stress and physiological conditions. *J Plant Physiol* 161(6): 741-746
- Brosche M, Vinocur B, Alatalo ER, Lamminmaki A, Teichmann T, Ottow EA, Djilianov D, Afif D, Bogeat-Triboulot MB, Altman A, Polle A, Dreyer E, Rudd S, Paulin L, Auvinen P, Kangasjarvi J (2005). Gene expression and metabolite profiling of *Populus euphratica* growing in the Negev desert. *Genome Biol* 6(12): R101
- Brouwer M, Hoexum-Brouwer T, Cashon RE (1993). A putative glutathione-binding site in CdZn-metallothionein identified by equilibrium binding and molecular-modelling studies. *Biochem J* 294 (Pt 1): 219-225
- Buchanan-Wollaston V (1994). Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein. *Plant Physiol* 105(3): 839-846
- Butt A, Mousley C, Morris K, Beynon J, Can C, Holub E, Greenberg JT, Buchanan-Wollaston V (1998). Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant J* 16(2): 209-221
- Capdevila M, Domenech J, Pagani A, Tio L, Villarreal L, Atrian S (2005). Zn- and Cd-metallothionein recombinant species from the most diverse phyla may contain sulfide (S²⁻) ligands. *Angew Chem Int Ed Engl* 44(29): 4618-4622

- Casano LM, Gomez LD, Lascano HR, Gonzalez CA, Trippi VS (1997). Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Cell Physiol* 38(4): 433-440
- Chan WM, Shaw PC, Chan HY (2007). A green fluorescent protein-based reporter for protein nuclear import studies in *Drosophila* cells. *Fly (Austin)* 1(6): 340-342
- Charbonnel-Campaa L, Lauga B, Combes D (2000). Isolation of a type 2 metallothionein-like gene preferentially expressed in the tapetum in *Zea mays*. *Gene* 254(1-2): 199-208
- Chatthai M, Kaukinen KH, Tranbarger TJ, Gupta PK, Misra S (1997). The isolation of a novel metallothionein-related cDNA expressed in somatic and zygotic embryos of Douglas-fir: regulation by ABA, osmoticum, and metal ions. *Plant Mol Biol* 34(2): 243-254
- Chatthai M, Osusky M, Osuska L, Yevtushenko D, Misra S (2004). Functional analysis of a Douglas-fir metallothionein-like gene promoter: transient assays in zygotic and somatic embryos and stable transformation in transgenic tobacco. *Planta* 220(1): 118-128
- Chattopadhyay S, Puente P, Deng XW, Wei N (1998). Combinatorial interaction of light-responsive elements plays a critical role in determining the response characteristics of light-regulated promoters in *Arabidopsis*. *Plant J* 15(1): 69-77
- Cherian MG, Apostolova MD (2000). Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46(2): 347-356
- Cherian S, Oliveira MM (2005). Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environ Sci Technol* 39(24): 9377-9390
- Clendennen SK, May GD (1997). Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiol* 115(2): 463-469
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 159-182
- Coupe SA, Taylor JE, Roberts JA (1995). Characterisation of an mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during ethylene-promoted abscission of *Sambucus nigra* L. leaflets. *Planta* 197(3): 442-447

- de Framond AJ (1991). A metallothionein-like gene from maize (*Zea mays*). Cloning and characterization. FEBS Lett 290: 103-106
- de Miranda JR, Thomas MA, Thurman DA, Tomsett AB (1990). Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*. FEBS Lett 260(2): 277-280
- Domenech J, Mir G, Huguet G, Capdevila M, Molinas M, Atrian S (2006). Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding. Biochimie 88(6): 583-593
- Domenech J, Orihuela R, Mir G, Molinas M, Atrian S, Capdevila M (2007). The Cd(II)-binding abilities of recombinant *Quercus suber* metallothionein: bridging the gap between phytochelatins and metallothioneins. J Biol Inorg Chem 12(6): 867-882
- Eapen S, D'Souza SF (2005). Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. Biotechnol Adv 23(2): 97-114
- Ellerstrom M, Stalberg K, Ezcurra I, Rask L (1996). Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. Plant Mol Biol 32(6): 1019-1027
- Ellis JG, Tokuhisa JG, Llewellyn DJ, Bouchez D, Singh K, Dennis ES, Peacock WJ (1993). Does the ocs-element occur as a functional component of the promoters of plant genes? . Plant Journal 4: 433-443
- Evans KM, Gatehouse JA, Lindsay WP, Shi J, Tommey AM, Robinson NJ (1992). Expression of the pea metallothionein-like gene PsMTA in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for PsMTA function. Plant Mol Biol 20(6): 1019-1028
- Foley RC, Singh KB (1994). Isolation of a *Vicia faba* metallothionein-like gene: expression in foliar trichomes. Plant Mol Biol 26(1): 435-444
- Fordham-Skelton AP, Lilley C, Urwin PE, Robinson NJ (1997). GUS expression in *Arabidopsis* directed by 5' regions of the pea metallothionein-like gene PsMTA. Plant Mol Biol 34(4): 659-668
- Freisinger E (2008). Plant MTs-long neglected members of the metallothionein superfamily. Dalton Trans(47): 6663-6675
- Furumoto T, Hata S, Izui K (2000). Isolation and characterization of cDNAs for differentially accumulated transcripts between mesophyll cells and

- bundle sheath strands of maize leaves. *Plant Cell Physiol* 41(11): 1200-1209
- Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML (1996). Effects of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidences for involvement of oxidative stress. *Plant Science* 121: 151-159
- Garcia-Hernandez M, Murphy A, Taiz L (1998). Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 118(2): 387-397
- Geffers R, Cerff R, Hehl R (2000). Anaerobiosis-specific interaction of tobacco nuclear factors with cis-regulatory sequences in the maize GapC4 promoter. *Plant Mol Biol* 43(1): 11-21
- Giritch A, Ganai M, Stephan UW, Baumlein H (1998). Structure, expression and chromosomal localisation of the metallothionein-like gene family of tomato. *Plant Mol Biol* 37(4): 701-714
- Gorinova N, Nedkovska M, Todorovska E, Simova-Stoilova L, Stoyanova Z, Georgieva K, Demirevska-Kepova K, Atanassov A, Herzig R (2007). Improved phytoaccumulation of cadmium by genetically modified tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Physiological and biochemical response of the transformants to cadmium toxicity. *Environ Pollut* 145(1): 161-170
- Gratao PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32: 481-494
- Grierson C, Du JS, de Torres Zabala M, Beggs K, Smith C, Holdsworth M, Bevan M (1994). Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant J* 5(6): 815-826
- Guo W-J, Bundithya W, Goldsbrough PB (2003). Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytologist* 159(2): 369-381
- Guo WJ, Meenam M, Goldsbrough PB (2008). Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiol* 146(4): 1697-1706
- Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS (1999). Phytochelatin synthase genes

- from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11(6): 1153-1164
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4): 557-580
- Hanley-Bowdoin L, Lane BG (1983). A novel protein programmed by the mRNA conserved in dry wheat embryos. The principal site of cysteine incorporation during early germination. *Eur J Biochem* 135(1): 9-15
- Haq F, Mahoney M, Koropatnick J (2003). Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res* 533(1-2): 211-226
- Hassinen VH, Tuomainen M, Peraniemi S, Schat H, Karenlampi SO, Tervahauta AI (2009). Metallothioneins 2 and 3 contribute to the metal-adapted phenotype but are not directly linked to Zn accumulation in the metal hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot* 60(1): 187-196
- Heath RL, Packer L (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125(1): 189-198
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6(2): 271-282
- Hsieh HM, Liu WK, Huang PC (1995). A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol Biol* 28(3): 381-389
- Jefferson R, Kavanagh T, Bevan M (1987). GUS fusions: Beta-glucuronidase activity as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907
- Jordan RH, Turley RB, Defauw SL, Steele M (2005). Characterization of a cDNA encoding metallothionein 3 from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *DNA Seq* 16(2): 96-102
- Karimi M, Inze D, Depicker A (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7(5): 193-195
- Kawashima I, Kennedy TD, Chino M, Lane BG (1992). Wheat Ec metallothionein genes. Like mammalian Zn²⁺ metallothionein genes, wheat Zn²⁺ metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis. *Eur J Biochem* 209(3): 971-976

- Kille P, Winge DR, Harwood JL, Kay J (1991). A plant metallothionein produced in *E. coli*. *FEBS Lett* 295(1-3): 171-175
- Kojima Y, Binz PA, K"agi JHR (1999). *Metallothionein IV*, 1st edn. C. Klaassen, Birkh"auser Verlag, Basel
- Kono Y, Fridovich I (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257(10): 5751-5754
- Kramer C-H, Charnock, Baker, Smith (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379 635- 638
- Krupa Z (1999). Cadmium against higher plant photosynthesis - a variety of effects and where do they possibly come from? *Zeitschrift Naturforschung* 54c: 723-729
- Kupper H, Setlik I, Setlikova E, Ferimazova N, Spiller M, Kupper FC (2003). Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda*. *Funct Plant Biol* 30: 1187-1196
- Kusaba M, Takahashi Y, Nagata T (1996). A multiple-stimuli-responsive as-1-related element of *parA* gene confers responsiveness to cadmium but not to copper. *Plant Physiol* 111(4): 1161-1167
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685
- Laplaze L, Gherbi H, Duhoux E, Pawlowski K, Auguy F, Guermache F, Franche C, Bogusz D (2002). Symbiotic and non-symbiotic expression of *cgMT1*, a metallothionein-like gene from the actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *Plant Mol Biol* 49(1): 81-92
- Lee J, Shim D, Song WY, Hwang I, Lee Y (2004). Arabidopsis metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. *Plant Mol Biol* 54(6): 805-815
- Levadoux-Martin M, Hesketh JE, Beattie JH, Wallace HM (2001). Influence of metallothionein-1 localization on its function. *Biochem J* 355(Pt 2): 473-479
- Levadoux M, Mahon C, Beattie JH, Wallace HM, Hesketh JE (1999). Nuclear import of metallothionein requires its mRNA to be associated with the perinuclear cytoskeleton. *J Biol Chem* 274(49): 34961-34966

- Liu P, Goh CJ, Loh CS, Pua EC (2002). Differential expression and characterization of three metallothionein-like genes in Cavendish banana (*Musa acuminata*). *Physiol Plant* 114(2): 241-250
- Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP (2001). Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *J Environ Qual* 30(6): 1919-1926
- Lu S, Gu H, Yuan X, Wang X, Wu AM, Qu L, Liu JY (2007). The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of a rice metallothionein gene reveals different regulatory regions responsible for tissue-specific and inducible expression in transgenic *Arabidopsis*. *Transgenic Res* 16(2): 177-191
- Majić BD (2002). Analiza klonova specijalizovane subgenomske biblioteke heljde. Diplomski rad. Univerzitet u Beogradu.
- Majić BD (2005). Analiza promotorskih svojstava regulatornog regiona gena za metalotionein heljde u transformisanom duvanu. Magistarska teza. Univerzitet u Beogradu.
- Maret W, Larsen KS, Vallee BL (1997). Coordination dynamics of biological zinc "clusters" in metallothioneins and in the DNA-binding domain of the transcription factor Gal4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2233-2237
- Margoshes M, Vallee BL (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of American Chemical Society* 79: 4813-4814
- Marschner (1995). Mineral nutrition of higher plants, Academic Press, London
- Menkens AE, Schindler U, Cashmore AR (1995). The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem Sci* 20(12): 506-510
- Mir G, Domenech J, Huguet G, Guo WJ, Goldsbrough P, Atrian S, Molinas M (2004). A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. *J Exp Bot* 55(408): 2483-2493
- Mohanty B, Krishnan SP, Swarup S, Bajic VB (2005). Detection and preliminary analysis of motifs in promoters of anaerobically induced genes of different plant species. *Ann Bot* 96(4): 669-681
- Moriguchi T, Kita M, Hisada S, Endo-Inagaki T, Omura M (1998). Characterization of gene repertoires at mature stage of citrus fruits

through random sequencing and analysis of redundant metallothionein-like genes expressed during fruit development. *Gene* 211(2): 221-227

- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Murphy A, Zhou J, Goldsbrough PB, Taiz L (1997). Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 113(4): 1293-1301
- Nagano T, Itoh N, Ebisutani C, Takatani T, Miyoshi T, Nakanishi T, Tanaka K (2000). The transport mechanism of metallothionein is different from that of classical NLS-bearing protein. *J Cell Physiol* 185(3): 440-446
- Nam YW, Tichit L, Leperlier M, Cuerq B, Marty I, Lelievre JM (1999). Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits. *Plant Mol Biol* 39(3): 629-636
- Ngu TT, Stillman MJ (2009). Metalation of metallothioneins. *IUBMB Life* 61(4): 438-446
- Nielson KB, Winge DR (1985). Independence of the domains of metallothionein in metal binding. *J Biol Chem* 260(15): 8698-8701
- Obertello M, Wall L, Laplaze L, Nicole M, Auguy F, Gherbi H, Bogusz D, Franche C (2007). Functional analysis of the metallothionein gene *cgMT1* isolated from the actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *Mol Plant Microbe Interact* 20(10): 1231-1240
- Park JN, Sohn MJ, Oh DB, Kwon O, Rhee SK, Hur CG, Lee SY, Gellissen G, Kang HA (2007). Identification of the cadmium-inducible *Hansenula polymorpha* SEO1 gene promoter by transcriptome analysis and its application to whole-cell heavy-metal detection systems. *Appl Environ Microbiol* 73(19): 5990-6000
- Peroza EA, Freisinger E (2007). Metal ion binding properties of *Triticum [corrected] aestivum* Ec-1 metallothionein: evidence supporting two separate metal thiolate clusters. *J Biol Inorg Chem* 12(3): 377-391
- Peroza EA, Kaabi AA, Meyer-Klaucke W, Wellenreuther G, Freisinger E (2009). The two distinctive metal ion binding domains of the wheat metallothionein Ec-1. *J Inorg Biochem* 103(3): 342-353
- Pilon-Smits E (2005). Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* 56: 15-39

- Qi X, Zhang Y, Chai T (2007). Characterization of a novel plant promoter specifically induced by heavy metal and identification of the promoter regions conferring heavy metal responsiveness. *Plant Physiol* 143(1): 50-59
- Quesada AR, Byrnes RW, Krezoski SO, Petering DH (1996). Direct reaction of H₂O₂ with sulfhydryl groups in HL-60 cells: zinc-metallothionein and other sites. *Arch Biochem Biophys* 334(2): 241-250
- Quinn JM, Barraco P, Eriksson M, Merchant S (2000). Coordinate copper- and oxygen-responsive Cyc6 and Cpx1 expression in *Chlamydomonas* is mediated by the same element. *J Biol Chem* 275(9): 6080-6089
- Quinn JM, Eriksson M, Moseley JL, Merchant S (2002). Oxygen deficiency responsive gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* through a copper-sensing signal transduction pathway. *Plant Physiol* 128(2): 463-471
- Quinn JM, Merchant S (1995). Two copper-responsive elements associated with the *Chlamydomonas* Cyc6 gene function as targets for transcriptional activators. *Plant Cell* 7(5): 623-628
- Rahoui S, Chaoui A, El Ferjani E Membrane damage and solute leakage from germinating pea seed under cadmium stress. *J Hazard Mater* 178(1-3): 1128-1131
- Ritchie RJ (2006). Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth Res* 89(1): 27-41
- Robbins AH, McRee DE, Williamson M, Collett SA, Xuong NH, Furey WF, Wang BC, Stout CD (1991). Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* 221(4): 1269-1293
- Roesens NH, Bernard C, Leplae R, Verbruggen N (2004). Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Lett* 577(1-2): 9-16
- Salt DE, Prince RC, Baker AJM, Raskin I, Pickering IJ (1999). Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. *Environ Sci Technol* 33 713- 717
- Samardžić JT, Nikolić DB, Timotijević GS, Jovanović ŽS, Maksimović VR Tissue expression analysis of *FeMT3*, a drought and oxidative stress related metallothionein gene from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). submitted for publication

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, del Rio LA (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot* 52(364): 2115-2126
- Schicht O, Freisinger E (2009). Spectroscopic characterization of Cicer arietinum metallothionein 1. *Inorg Chim Acta* 362: 714-724
- Schultze P, Worgotter E, Braun W, Wagner G, Vasak M, Kagi JH, Wuthrich K (1988). Conformation of [Cd7]-metallothionein-2 from rat liver in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Mol Biol* 203(1): 251-268
- Schutzendubel A, Polle A (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53(372): 1351-1365
- Schutzendubel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A (2001). Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol* 127(3): 887-898
- Sharma SS, Dietz KJ (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci* 14(1): 43-50
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53(372): 1305-1319
- Snowden KC, Gardner RC (1993). Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol* 103(3): 855-861
- Snowden KC, Richards KD, Gardner RC (1995). Aluminum-Induced Genes (Induction by Toxic Metals, Low Calcium, and Wounding and Pattern of Expression in Root Tips). *Plant Physiol* 107(2): 341-348
- Sornashekaraiyah BV, Padmaja K, Prasad ARK (1992). Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiologia Plantarum* 85 85-89
- Stalberg K, Ellerstom M, Ezcurra I, Ablöv S, Rask L (1996). Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic Brassica napus seeds. *Planta* 199(4): 515-519

- Stillman MJ, Cai W, Zelazowski AJ (1987). Cadmium binding to metallothioneins. Domain specificity in reactions of alpha and beta fragments, apometallothionein, and zinc metallothionein with Cd²⁺. *J Biol Chem* 262(10): 4538-4548
- Tanji K, Irie Y, Uchida Y, Mori F, Satoh K, Mizushima Y, Wakabayashi K (2003). Expression of metallothionein-III induced by hypoxia attenuates hypoxia-induced cell death in vitro. *Brain Res* 976(1): 125-129
- Thornalley PJ, Vasák M (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta* 827: 36-44
- Timotijević G (2009). Molekularno kloniranje i analiza gena za aspartičnu proteinazu heljde (*Fagopyrum esculentum* Moench). Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu.
- Tsuwamoto R, Harada T Identification of a cis-regulatory element that acts in companion cell-specific expression of AtMT2B promoter through the use of Brassica vasculature and gene-gun-mediated transient assay. *Plant Cell Physiol* 51(1): 80-90
- Usha B, Venkataraman G, Parida A (2009). Heavy metal and abiotic stress inducible metallothionein isoforms from *Prosopis juliflora* (SW) D.C. show differences in binding to heavy metals in vitro. *Mol Genet Genomics* 281(1): 99-108
- van Hoof NA, Hassinen VH, Hakvoort HW, Ballintijn KF, Schat H, Verkleij JA, Ernst WH, Karenlampi SO, Tervahauta AI (2001). Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiol* 126(4): 1519-1526
- Vangronsveld J, Herzig R, Weyens N, Boulet J, Adriaensen K, Ruttens A, Thewys T, Vassilev A, Meers E, Nehnevajova E, van der Lelie D, Mench M (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ Sci Pollut Res Int*
- Vassilev A, Schwitzguebel JP, Thewys T, Van Der Lelie D, Vangronsveld J (2004). The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *ScientificWorldJournal* 4: 9-34
- Vogeli-Lange R, Wagner GJ (1990). Subcellular Localization of Cadmium and Cadmium-Binding Peptides in Tobacco Leaves : Implication of a

Transport Function for Cadmium-Binding Peptides. *Plant Physiol* 92(4): 1086-1093

- Wan X, Freisinger E (2009). The plant metallothionein 2 from *Cicer arietinum* forms a single metal-thiolate cluster. *Metallomics* 6: 489-500
- Whitelaw CA, Le Huquet JA, Thurman DA, Tomsett AB (1997). The isolation and characterization of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Mol Biol* 33(3): 503-511
- Wong HL, Sakamoto T, Kawasaki T, Umemura K, Shimamoto K (2004). Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiol* 135(3): 1447-1456
- Xue T, Li X, Zhu W, Wu C, Yang G, Zheng C (2009). Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. *J Exp Bot* 60(1): 339-349
- Yang Z, Wu Y, Li Y, Ling HQ, Chu C (2009). OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. *Plant Mol Biol* 70(1-2): 219-229
- Ye B, Maret W, Vallee BL (2001). Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5): 2317-2322
- Yu LH, Umeda M, Liu JY, Zhao NM, Uchimiya H (1998). A novel MT gene of rice plants is strongly expressed in the node portion of the stem. *Gene* 206(1): 29-35
- Yuan J, Chen D, Ren Y, Zhang X, Zhao J (2008). Characteristic and expression analysis of a metallothionein gene, OsMT2b, down-regulated by cytokinin suggests functions in root development and seed embryo germination of rice. *Plant Physiol* 146(4): 1637-1650
- Zangger K, Oz G, Otvos JD, Armitage IM (1999). Three-dimensional solution structure of mouse [Cd7]-metallothionein-1 by homonuclear and heteronuclear NMR spectroscopy. *Protein Sci* 8(12): 2630-2638
- Zhigang A, Cuijie L, Yuangang Z, Yejie D, Wachter A, Gromes R, Rausch T (2006). Expression of BjMT2, a metallothionein 2 from *Brassica juncea*, increases copper and cadmium tolerance in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but inhibits root elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J Exp Bot* 57(14): 3575-3582

- Zhou GK, Xu YF, Liu JY (2005). Characterization of a rice class II metallothionein gene: tissue expression patterns and induction in response to abiotic factors. *J Plant Physiol* 162(6): 686-696
- Zhou J, Goldsbrough PB (1994). Functional homologs of fungal metallothionein genes from Arabidopsis. *Plant Cell* 6(6): 875-884
- Zimeri AM, Dhankher OP, McCaig B, Meagher RB (2005). The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmiums and are required for cadmium tolerance and accumulation. *Plant Mol Biol* 58(6): 839-855





РД 20716



300161876

СОBISS ©