

Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

*Analiza ekspresije i funkcija
metalotioneina tipa 3 heljde
(Fagopyrum esculentum Moench)*

Doktorska disertacija

Jelena Samardžić

2010

Ovaj rad je urađen u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka, u 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 Dunderski, naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu

Vesi hvala na savetima, sugestijama i pomoći tokom eksperimenata, pisanja radova i teze. Hvala što je imala razumevanja i podržala moju želju da se bavim metalotioneinima. Svetlani hvala što je uvek tu za sva naša pitanja i nedoumice naučne i administrativne prirode.

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

Veliku zahvalnost dugujem Gagi sa kojom sa delila sve probleme i radosti tokom rada na metalotioneinu heljde. Zahvaljujem se svim članovima laboratorije 08 i kolegama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo koji su mi pomagali proteklih godina.

Hvala mojoj porodici na strpljenju i ljubavi koja mi je uvek bila podstrek.

Универзитет у Београду
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА ФИЗИОЛОГИЈУ И БИОХЕМИЈУ
БИБЛИОТЕКА
Инв. бр. 50077
БЕОГРАД

Apstrakt

Iz biblioteke cDNK semena heljde u razviću, izolovana su dva kloni cDNK - *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- 65 bp za klon *FeMT3.5* i 229 bp za klon *FeMT3.10*. Uočeno je i postojanje razlika u nukleotidnim sekvencama u okviru 5' UTR, kodirajućeg regiona i 3' UTR od 3, 5 i 3 bazne zamene. Oba klona kodiraju protein dužine 62 aa, sa razlikama u tri aminokiseline (serin/fenilalanin, na poziciji 11; izoleucin/treonin na poziciji 28 i alanin/valin na poziciji 32). Poređenjem na nivou izvedenih aminokiselinskih sekvenci pokazan je kako visok stepen međusobne homologije (95%), tako i sa metalotioneinima tipa 3 različitih biljnih vrsta, naročito u metal-vezujućim domenima. Određena je i sekundarna struktura FeMT3 polipeptida korišćenjem programskog paketa PSIPRED koja odgovara modelu „gimnastičkog tega“.

U cilju ispitivanja ekspresije gena za FeMT3 urađene su analize prisustva iRNK ovog gena u organima heljde u normalnim fiziološkim stanjima, kao i u listovima heljde u uslovima delovanja različitih faktora stresa. Korišćene su metode RT PCR, Real-time PCR i *in situ* RNK/RNK hibridizacija uz upotrebu proba i prajmera specifičnih za dati gen. Pokazano je da se *FeMT3* eksprimira tokom različitih faza razvića semena (sa maksimumom ekspresije 9-19 dana nakon cvetanja), kao i u listu, cvetu, stablu i korenu. Transkripti gena za MT3 heljde lokalizovani su u sprovodnom sistemu korena; stominim ćelijama, mezofilu i sprovodnim elementima lista; kao i u ćelijama embriona iz srednje faze semena u razviću. Praćeno je takođe, povećanje nivoa transkripcije *FeMT3* u listovima heljde kod biljaka izlaganih suši, oksidativnom stresu, mraku i mehaničkim povredama. Pad u nivou ekspresije registrovan je nakon tretmana UV zračenjem, dok abscisinska i salicilna kiselina ne utiču značajno na ekspresiju ispitivanog gena.

U *in vivo* esejima, u kojima je korišćen *cup1Δ*- mutant kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, koji eksprimira MT3 heljde, dokazana je njegova sposobnost da vezuje jone metala i učestvuje u odbrani ćelija od oksidativnih oštećenja.

Abstract

Two cDNA clones for metallothionein type 3 (MT3), *FeMT3.5* (Gene bank acc. No. DQ681063) i *FeMT3.10* (Gene bank acc. No. DQ681064) were isolated from developing buckwheat seed cDNA library. Both of them were comprised of 61bp long 5'UTR and 189 bp coding region, as well as 3'UTRs with 164 bp region length difference. Deduced amino acid sequences of *FeMT3.5/FeMT3.10* discovered three amino acids substitutions (serine/phenylalanine on position 11, isoleucine/threonine on position 28 and alanine/valine on position 32). The most remarkable difference between clones was in 3'UTR length: 65 bp for *FeMT3.5* and 229 bp for *FeMT3.10*. Amino acid sequence comparison revealed high level of mutual homology (95%), as well as homology with MT3 of various plant species. This homology was the highest in metal-binding domains of the protein. Secondary protein structure of FeMT3, was also determined supporting "dumbbell" structure model.

In the aim of expression analysis of FeMT3 gene, RT PCR, Real-time PCR and *in situ* RNA/RNA hybridization were employed. *FeMT3* was found to be expressed in developing seeds, leaves, flowers, stem and root. Buckwheat MT3 mRNA was localized in root and leaf vascular system, stomata guard cells, mesophyll, as well as mid-maturation seed embryo cells.

In vivo yeast functional complementation assays in *cup1Δ Saccharomyces cerevisiae* strains expressing FeMT3, proved its metal-binding and ROS scavenging ability.

Skraćenice

ABA – abscisinska kiselina

ak – amino kiselina

AP – aspartične proteinaze

BCIP – 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat

bp – bazni par

BPB – bromophenol blue (bromfenol plavo)

BSA – bovine serum albumin (albumin goveđeg seruma)

CAT - katalaza

cDNK – komplementarna cDNK

CHO - Chinese hamster ovary

CND41 – chloroplast nucleoid DNA binding protein

CTAB – cetil trimetilamonijum bromid

DAF – days after flowering (dani nakon cvetanja)

DMSO – dimetilsulfoksid

DNK – dezoksiribo nukleinska kiselina

DTT – ditioneitol

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid (etilendiamintetrasirćetna kiselina)

GSH/GSSG – glutation/glutation disulfid

HRP – horseradish peroxidase

IPTG – izopropiltio- β -D-galaktozid

iRNK – informaciona RNK

kDa – kilodalton

MT - metalotionein

NBT – nitroblue tetrazolium

PBS – phosphate-buffered saline

PC - fitoheletin

PCR – polymerase chain reaction (reakcija lančanog umnožavanja segmanata DNK)

PRP – pathogenesis-related protein (protein vezan za patogenezu)

PVDF – polivinil diflorid
PVP – polivinilpirolidon
RACE – rapid amplification of cDNA ends
RP – rezervni protein
RNK – ribonukleinska kiselina
ROS – (reactive oxygen species) reaktivne kiseonične vrste
rRNK – ribozomalna RNK
RT – reverzna transkripcija
SA – salicylic acid (salicilna kiselina)
SOD – superoksid dismutaza
TF – transkripcioni faktor
TBS – Tris-buffered saline
TEMED – N,N,N',N'-tetrametilendiamin phenol blue
TGB – Tris-glycine buffer
Tris – tris (hidroksimetil) aminometan
tRNK – transportna RNK
UTR – untranslated region (netranslirajući region)
UV – ultra violet

1. UVOD	1
1.1. Metalotioneini	1
1.1.1. Opšte osobine MT	1
1.1.2. Nomenklatura MT	2
1.1.3. Klasifikacija MT	2
1.2. MT sisara	4
1.2.1. Struktura i biohemijska svojstva	4
1.2.2. Ekspresija i lokalizacija sisarskih MT	6
1.2.2.1. Regulacija ekspresije	7
1.2.2.2. Posttranskripciona regulaciji ekspresije	9
1.2.2.3. Biološke funkcije sisarskih MT	10
1.3. MT kod kvasaca, gljiva i invertebrata	13
1.4. Metali u biljkama	15
1.4.1. Transporteri metala	16
1.4.2. Fitohelatini	16
1.5. MT biljaka	17
1.5.1. Klasifikacija biljnih MT	17
1.5.2. Struktura i biohemijska svojstva	19
1.5.3. Ekspresija gena za MT biljaka	22
1.5.3.1. Regulacija ekspresije MT kod biljaka	23
1.5.3.2. Promena nivoa ekspresije MT gena kod biljaka	25
1.5.3.3. Komplementacija funkcije nedostajućeg CUP1 u ćelijama kvasca heterolognim MT	27
1.5.4. Funkcije biljnih MT	28
1.5.5. Evolucija biljnih MT i genska organizacija	33
1.6. MT heljde (<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench)	34
2. CILJ RADA	36
3. MATERIJAL I METODE	37
3.1. Biljni materijal i tretmani	37
3.2. Procedure za gajenje i transformaciju bakterija	39
3.3. Procedure za gajenje i transformaciju kvasaca	41
3.3.1. Medijumi za gajenje kvasaca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
3.3.2. Priprema kompetentnih ćelija kvasaca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> za transformaciju	42
3.3.3. Transformacija kvasaca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
3.4. Osnovne procedure rada sa DNK	43
3.4.1. Izolovanje plazmida iz bakterija	43

3.8.2. Testiranje uloge FeMT3 u toleranciji na ROS	61
4. REZULTATI.....	62
4.1. Izolovanje i karakterizacija članova genske familije MT3 heljde.....	62
4.2. Analiza ekspresije FeMT3.....	70
4.2.1. Analiza ekspresije FeMT3 u različitim organima heljde metodom RT PCR ...	70
4.2.2. Analiza lokalizacije transkripata FeMT3 metodom RNK-RNK hibridizacije..	71
4.2.3. Analiza ekspresije FeMT3 u uslovima stresa metodom Real-time PCR	73
4.2.3.1. Uticaj produženog trajanja mraka na transkripciju gena za MT3 heljde	74
4.2.3.2. Uticaj UV zračenja na transkripciju gena za MT3 heljde	74
4.2.3.3. Uticaj mehaničkog povređivanja kao imitacije napada patogena na transkripciju gena za MT3 heljde	75
4.2.3.4. Promena nivoa transkripcije gena za MT3 u uslovima suše	76
4.2.3.5. Ekspresija gena za MT3 heljde tokom oksidativnog stresa	77
4.2.3.6. Uticaj abscisinske i salicilne kiseline na ekspresiju gena za MT3 heljde ..	77
4.3. Esej komplementacije funkcije u kvascu <i>cup1Δ S. cerevisiae</i>	78
4.3.1. Testiranje metal- vezujućih svojstava FeMT3	78
4.4. Testiranje uloge FeMT3 u toleranciji na ROS	79
5. DISKUSIJA.....	81
5.1. Analiza sekvenci FeMT3.5 i FeMT3.10	81
5.2. Analiza ekspresije gena za MT3 heljde.....	85
5.2.1. Tkivna lokalizacija ekspresije	85
5.2.2. Analiza ekspresije MT3 tokom delovanja faktora abiotičkog stresa	90
5.3. Uloga FeMT3 u oksidativnom stresu.	94
6. ZAKLJUČCI	96
7. REFERENCE	98

1. UVOD

1.1. Metalotioneini

Metaloproteini čine 30% svih poznatih proteina, i imaju različite funkcije u ćelijama. U ovu grupu spadaju metaloenzimi, proteini zaduženi za transport i skladištenje metala i proteini koji učestvuju u prenošenju ćelijskih signala. Metalni joni u ovim proteinima su obično koordinisani preko atoma azota, koseonika ili sumpora, koji su sadržani u aminokiselinama proteinskog lanca ili preko makrocikličnih liganada ugrađenih u protein. Prisustvo metala omogućava metaloproteinima da obavljaju različite funkcije, kao što su redoks reakcije, koje je nemoguće ostvariti samo preko ograničenog broja funkcionalnih grupa aminokiselina (Atkins, 1999). U ovu grupu strukturno i funkcionalno veoma raznorodnih proteina spadaju i metalotioneini (MT) koji se mogu grubo definisati kao transporteri i rezervoari metala.

1.1.1. Opšte osobine MT

Superfamilija MT obuhvata veliki broj proteina male molekulske mase (3.5-14 kDa), različite strukturne organizacije, sa zajedničkom osobinom da heliraju jone metala. Naziv metalotionein prvi put je upotrebljen 1957. godine za protein izolovan iz bubrega konja. Protein sačinjava jedan polipeptidni lanac od 61 aminokiseline i karakteriše ga visok sadržaj cisteina i vezanog kadmijuma (Moriguchi et al., 1998). Od otkrića, tokom narednih pet decenija istraživanja, otkriveno je da su ovi proteini prisutni ne samo kod sisara, nego u čitavom životinjskom i biljnom carstvu uključujući gljive i neke Procaryota (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Danas (15.04.2010), NCBI Database sadrži 5924 nukleotidne, 2412

proteinske sekvence MT, a objavljene su 8983 naučne publikacije na temu MT. Zbog izuzetne rasprostranjenosti, sposobnosti da vezuju metale, neuobičajene strukture i evolutivne konzervisanosti unutar klase, MT su predmet proučavanja mnogih istraživačkih grupa širom sveta. Pored sve većeg broja podataka o fiziko-hemijskim i biološkim svojstvima MT ovi proteini, naročito predstavnici biljnog porekla, u funkcionalnom smislu još uvek predstavljaju enigm i veliki izazov za istraživanja.

1.1.2. Nomenklatura MT

Na plenumu prvog međunarodnog sastanka posvećenog MT (*The First International Meeting on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metal-Binding Proteins*) 1978. godine ustanovljena je prva nomenklatura MT-a, koja je usvojena 1985. od strane Komiteta za nomenklaturu MT tokom *The Second International Meeting on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metal-Binding Proteins* (Kojima et al., 1999).

Karakteristike prvog MT izolovanog iz bubrežnog korteksa konja bile su sledeće: niska molekulska masa, visok sadržaj metal, visok sadržaj i jedinstven raspored cisteina unutar proteina, odsustvo aromatičnih aminokiselina i histidina i prisustvo metaltiolatnog klastera. Na osnovu ovih osobina Komitet 1985. postulira definiciju MT kao:

“Polypeptids resembling equine renal metallothionein in several their features can be designated as “metallothionein”” (Kojima et al., 1999).

1.1.3. Klasifikacija MT

Superfamilija MT obuhvata veliki broj proteina čija se klasifikacija zasniva na njihovoj primarnoj strukturi, u prvom redu na rasporedu cisteinskih ostataka u polipeptidnom lancu (Cherian et al., 1993). Sledeći ovakav kriterijum svi MT se dele na tri klase:

1. MT klase I sadrže 20 visoko konzervisanih cisteinskih aminokiselinskih ostataka i karakterični su za sisare i druge kičmenjake. Tipični sisarski MT klase I se sastoji od dva

cisteinom bogata domena (od 9 i 11 Cys), razdvojenih sa nekoliko aminokiselina među kojima nema aromatičnih aminokiselina kao ni histidina. Na osnovu prisustva i rasporeda Cys-Cys, Cys-Xaa-Cys i Cys-Xaa-Yaa-Cys motiva predstavnici ove klase MT se dalje dele na četiri tipa.

2. U MT klase II spadaju proteini koji nemaju striktan raspored cisteina kao klasa I, i ona uključuje MT biljaka, gljiva i beskičmenjaka.

3. Po ovom klasifikacionom sistemu, MT klase III čine metalopoliozopeptidi: fitohelatini i drugi kratki metal- vezujući peptidi, derivati glutationa, čija je opšta struktura γ -(Glu-Cys)_n-Gly (n=2-5).

Ovaj, u neku ruku, nekonzistentan sistem klasifikacije, po kojoj strukturno, biohemijski i biosintetski različiti fitohelatini, spadaju u grupu MT zadržan je samo zbog obilja literature koja se na njega poziva.

Postojanje velikog broja nukleotidnih, izvedenih aminokiselinskih kao i proteinskih sekvenci iskorišćeno je za softverske analize na bazi višestrukog poređenja sekvenci MT. Na taj način kreirana su filogenetska stabla i definisan nivo srodnosti između različitih organizama. Na osnovu evoluciono- taksonomskih podataka Binz i Kagi su dali detaljniju klasifikacionu šemu po kojoj se MT grupišu u 15 familija (Klassen, 1999). Predstavnici unutar svake od familija MT su evolutivno srodni i dele određen set sekvencno-zavisnih svojstava. Kategorije ispod familije su definisane na osnovu specifičnijih svojstava sekvenci gena kao što su raspored nekodirajućih regiona- subfamilije, ili prisustva konzerviranih repetitivnih sekvenci- subgrupe, kao i na osnovu, species-specifičnih pozicija na hromozomu i prisustva posttranslacionih modifikacija proteina- izoforme i alelske forme. MT biljaka čine 15-u familiju (Klassen, 1999).

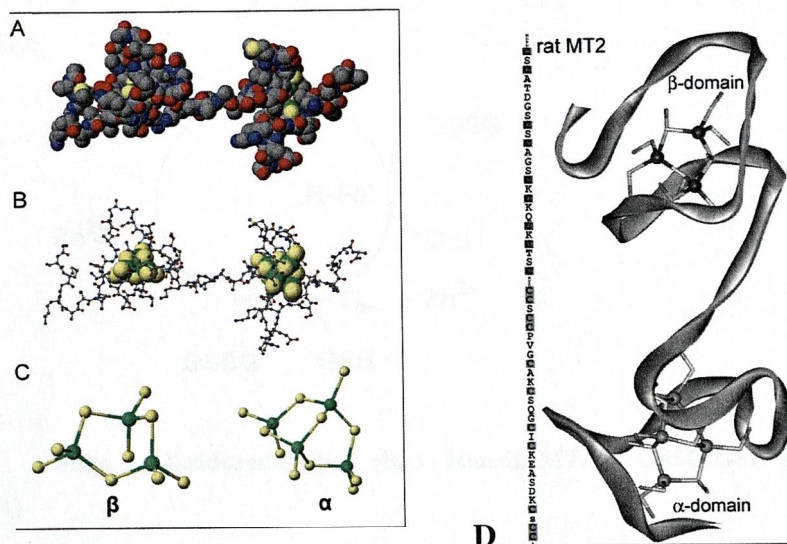
Postojanje velikog broja nukleotidnih, izvedenih aminokiselinskih kao i proteinskih sekvenci iskorišćeno je za softverske analize na bazi višestrukog poređenja sekvenci MT. Na taj način kreirana su filogenetska stabla i definisan nivo srodnosti između različitih organizama. Na osnovu evoluciono- taksonomskih podataka Binz i Kagi su dali detaljniju klasifikacionu šemu po kojoj se MT grupišu u 15 familija (Klassen, 1999). Predstavnici unutar svake od familija MT su evolutivno srodni i dele određen set sekvencno-zavisnih svojstava. Kategorije ispod familije su definisane na osnovu specifičnijih svojstava sekvenci gena kao što su raspored nekodirajućih regiona- subfamilije, ili prisustva konzerviranih repetitivnih sekvenci- subgrupe, kao i na osnovu, species-specifičnih pozicija na hromozomu i prisustva posttranslacionih modifikacija proteina- izoforme i alelske forme. MT biljaka čine 15-u familiju (Klassen, 1999).

1.2. MT sisara

1.2.1. Struktura i biohemijska svojstva

Najveći broj podataka o strukturi i biohemijskim svojstvima MT dobijen je hemijskim i spektroskopskim metodama na MT sisara. Sisarski MT pripadaju klasi I, tj. familiji 1 (Klassen, 1999) izgrađeni su od 60- 68 aminokiselina sa 18-23 visokokonzerviranih Cys od kojih svi vezuju metale, i nemaju aromatične aminokiseline ili histidin. Okosnicu proteina čini apoprotein koji vezivanjem jona metala trpi konformacione promene, savijajući polipeptid u strukturu izgrađenu od dva domena. Cela struktura, koja nema slobodnih tiola, u velikoj meri liči na gimnastički teg (**Slika 1.**). N-terminalni segment tipičnog sisarskog MT sadrži 9 Cys (uglavnom grupisanih u Cys-Xaa-Cys motive), koji koordinativno vezuju tri dvovalentna jona metala (M^{++}) gradeći kompleks Me_3S_9 . Šest Cys je u tako nastalom klasteru sa metalima terminalno postavljeno, a 3 su premošćavajuća, tako da je svaki Cys zauzet i ne formira disulfidne veze sa drugim cisteinima. N-terminalni domen je reaktivniji i u literaturi se često označava kao β domen, nasuprot stabilnijem α domenu na C-terminusu (Maret et al., 1997; Ngu and Stillman, 2009). Jedanaest Cys α domena (6 terminalnog i 5 premošćavajućeg tipa), od kojih su neki grupisani u Cys-Cys motive, vezuje 4 M^{++} , gradeći Me_4S_{11} kompleks (Nielson and Winge, 1985; Stillman et al., 1987; Schultze et al., 1988; Zangger et al., 1999).

Podela MT proteina na dva domena može biti funkcionalna adaptacija, u kojoj α domen vezuje slobodne jone teških metala i time ih neutrališe, a β domen ostaje otvoren za slobodnu izmenu (pre svega fiziološki značajnih jona) sa drugim metaloproteinima. Osim dvovalentnih, sisarski MT vezuju i jednovalentne katjone (do 12 gram-atoma). Od 18 različitih metala, koliko vezuju sisarski MT u in vitro uslovima, sa najvećom stabilnošću se vezuju Cu^+ ($K_d = 10^{-17}$ - 10^{-19}), Cd^{++} ($K_d = 10^{-15}$ - 10^{-17}) i Zn^{++} ($K_d = 10^{-11}$ - 10^{-14}) (Coyle et al, 2002). Samo Cu^+ , Cd^{++} , Pb^{++} , Ag^+ , Hg^{++} i Bi^{++} mogu istisnuti vezani Zn^{++} (Kagi and Schaffer, 1988). Cu^{++} se ne vezuje za MT (Coyle et al., 2002). Vezivanje za svaki domen je nezavisno, što ilustruje različit afinitet za pojedine jone.

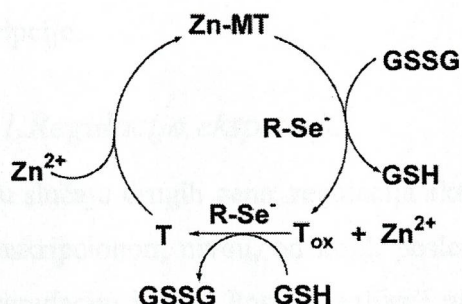


Slika 1 Modelovanje sisarskog MT uz poštovanje principa minimalne energije:

(A) trodimenzionalni model; (B) i (C) stereo model štapici- proteinska okosnica, loptice joni metala (D) trakasta struktura MT pacova sa metal (Cd) tiolatinim klasterima (Freisinger et al 2008)

MT sisara mogu da formiraju dva tipa dimera. Stvaranjem intermolekulske disulfidne veze između dva α domena, stvaraju se oksidativni dimeri. Proces dimerizacije ne utiče na konformaciju i razmenu jona metala (Zangger et al., 1999). Interakcijom β domena, u višku Cd^{++} i fosfata, nastaju neoksidativni, metalima premošćeni dimeri (Palumaa et al., 1992). Nizak redoks potencijal i struktura MT omogućavaju oksidaciju blagim oksidantima kao što je glutation-disulfid (GSSG) i transfer Zn^{++} na druge proteine sa mnogo nižim afinitetom za cink (Maret et al., 1997; Maret and Vallee, 1998). Oksidacijom se otpuštaju metalni joni i stvaraju intra- i intermolekulske disulfidne veze (Savas et al., 1993). Oksidovana forma MT, tionein, se redukuje u prisustvu GSH do tioneina, koji je sada sposoban da opet veže metalne jone (**Slika 2**). Prisustvo tioneina je potvrđeno i *in vivo* (Thornalley and Vasak, 1985). Oksidacija MT do stupnja disulfida se dešava i u prisustvu super-oksidnog anjona i hidroksilnog radikala (Thornalley and Vasak, 1985), dok H_2O_2 oksiduje MT do stupnjeva viših od disulfida (Quesada et al., 1996). Na taj način su pored enzima (glutation-peroksidaza, katalaza, superoksiddismutaza) i malih organskih molekula (askorbinska kiselina i tokoferol), u proces redukcije opasnih reaktivnih kiseoničnih vrsta uključeni i MT. Pošto jedinjenja selen katalizuju reakciju oksidacije MT disulfidima čak i u redukujućim uslovima, verovatno se ovaj proces odvija i

u ćelijskim uslovima, gde je uobičajeni odnos GSH:GSSG preko 50:1 (Chen and Maret, 2001).



Slika 2. Oksidoredukujući ciklus između MT/T i GSSG/GSH parova. (Prema Chen i Maret, 2001)

Novija istraživanja pokazuju da joni metala nisu jedini ligandi koji se vezuju za metalotioneine. Sa sigurnošću se može tvrditi da MT vezuju i GSH (Brouwer et al., 1993) i fosfatne jone (Robbins et al., 1991) dok su podaci o formiranju kompleksa ATP-MT (Maret et al., 2002), pri čemu se olakšava otpuštanje cinka zbog promene konformacije, prilično kontroverzni, jer ih negiraju eksperimenti drugih autora. GSH olakšava otpuštanje cinka, tako da se umesto jednog, otpušta 4 jona cinka (Zangger et al., 1999).

1.2.2. Ekspresija i lokalizacija sisarskih MT

Put ka otkrivanju funkcija nekog gena/proteina, obično vodi preko analize njegove ekspresije i lokalizacije kako transkriptata tako i samog proteina. Ekspresija sisarskih MT je dobro proučena i rezultati govore da postoje velike razlike u ekspresiji među prisutne četiri izoforme sisarskih MT. MT-1 i MT-2 su eksprimirani u svim ćelijama sisara a najviši nivo ekspresije uočen je u ćelijama jetre. Ekspresija MT-3 i MT-4 je više ograničena na određena tkiva i ćelije. Transkripti MT-3 se predominantno nalaze u ćelijama nervnog tkiva i ovaj protein je u novije vreme je označen kao inhibitor rasta neuronalnih ćelija. manjoj meri su prisutni u intestinumu i pankreasu. (Koumura et al., 2009). Produkti transkripcije MT-4 gena detektovani su u skvamoznom epitelu kože i jezika. Što se tiče ćelijske lokalizacije samog proteina, saznanja o tome su malobrojna i govore o citoplazmatskoj kao i nuklearnog poziciji MT. Nije poznat način na koji MT ulaze u jedro,

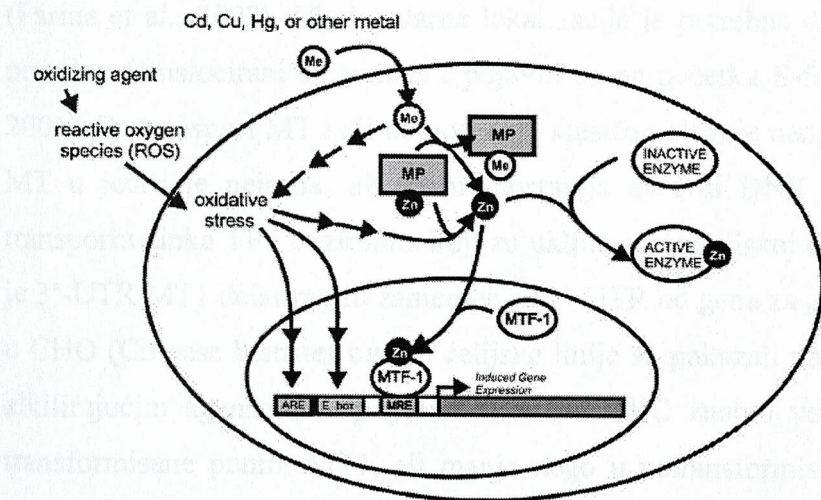
ali se pretpostavlja da je razlog ovakve lokalizacije zaštitna uloga MT u slučaju eventualnih oštećenja DNK kao i uloga reverzibilnog depoa cinka značajanog za procese transkripcije.

1.2.2.1.Regulacija ekspresije

Kao i u slučaju drugih gena, regulacija ekspresije MT se dešava na transkripcionom ili na postranskripcionom nivou, od kojih poslednji uključuje ćelijsku lokalizaciju transkripata i/ili degradaciju iRNK. Postoji razlika i na nivou regulacije ekspresije različitih izoformi sisarskih MT, tako da je utvrđeno da se MT-3 i MT-4 konstitutivno eksprimiraju u navedenim tkivima, dok je ekspresija MT-1 i MT-2 inducibilna. Razliku između ova dva para MT pravi i činjenica da faktori koji indukuju ekspresiju MT-1 i MT-2 ne utiču na povećanje nivoa ekspresije preostale dva člana familije sisarskih MT. Induceri transkripcije MT gena kod sisara najviše su proučavani na genima za MT-1 i MT-2 miša i MT-2 čoveka (Haq et al., 2003). Uočeno je da su ovi geni pozitivno regulisani metalima, hormonima, faktorima rasta, citokinima, ROS i pri različitim biotičkim i abiotičkim stresovima (Coyle et al., 2002; Haq et al., 2003). Postoji i veliki broj publikacija na temu analize promotora, *cis*- i *trans*- aktivirajućih faktora koji učestvuju u regulaciji transkripcije gena za MT sisara. Iako se geni za MT smatraju najboljim primerom transkripcionih jedinica regulisanih metalom, ovaj način regulacije još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Metali kao što je Zn^{++} , Cu^{++} , Cd^{++} , Hg^{++} , Au^{+} i Bi^{+++} mogu indukovati MT, Zn^{++} je primarni fiziološki induktor budući da, sa izuzetkom bakra, ostali metali predstavljaju sredinske toksikante. Za ostvarivanje bazalnog nivoa transkripcije MT je pored TATA sekvence potreban i MRE *cis*-aktivirajući element. Ovaj element deluje u konjunkciji sa MTF-1 koji je Zn-zavisan, Zn-responsive faktor transkripcije, neophodan za ostvarivanje kako bazalnog nivoa transkripcije tako i u slučaju indukovane transkripcije. MTF-1 je značajan u regulaciji brojnih gena koji imaju ulogu u ćelijskom odgovoru na različite stresore (Lichtlen and Schaffner, 2001). Pretpostavlja se da MTF-1, TF sa 6 cinkanih prstića, reguliše slobodnu koncentraciju Zn^{++} kontrolisanjem ekspresije MT. (Slika 3) (Haq et al., 2003). Za aktivaciju transkripcije MT je neophodno da MTF-1 bude transportovan u nukleus, da se veže za DNK i tek onda aktivira transkripciju. Transport u nukleus mogu indukovati različiti stimulansi (metali, ROS, toplotni šok), a za Zn^{++} je

pokazano da se on, kada je prisutan u visokoj koncentraciji, vezuje za niskoafinitetne, Zn-sensing, cinkane prstiće i time inicira transport u nukleus. S druge strane, cinkani prstići koji sa visokim afinitetom vezuju Zn^{++} su odgovorni za vezivanje za DNK i njeno savijanje, čime pokreću transkripciju gena. Dalje, cink aktivira MTF-1 otklanjanjem Zn-senzitivnog inhibitora, čija je osnovna funkcija da sprečava vezivanje MTF-1 za MREs u promotorskom regionu i time reguliše bazalnu ekspresiju gena (Palmiter, 1994). MREs su prisutne i multiplim kopijama u promotorskom regionu MT (npr, kod čoveka 7 od kojih samo 4 reaguju sa MTF-1 (Koizumi et al., 1999).

F. Haq et al. / Mutation Research 533 (2003) 211–226



Slika. 3. Šematski prikaz regulacije ekspresije gena za MT sisara. MP: metaloprotein (MT), ARE antioxidant response element, **MRE** metal responsive element, **MTF-1** metal response element binding transkripcioni faktor, **Me** joni metala

Nukleotidne sekvence drugačije od MREs su nađene u promotorskom regionu MT i odgovaraju na glukokortikoide (GRE), IL-6, H_2O_2 , transkripcioni faktor Sp1 (Plisov et al., 1994). ROS generisane tokom inflamatornog odgovora verovatno mogu indukovati MT preko različitih signalnih puteva, uključujući direktnu stimulaciju preko ARE ili USF /ARE (Dalton et al., 1994).

1.2.2.2. Posttranskripciona regulaciji ekspresije

Subćelijska lokalizacija transkripata i proteina je važna ekonomska strategija ćelije koja u kratkom roku obezbeđuje proteine tamo gde su i kada su potrebni. Mehanizmi za sortiranje iRNK generalno uključuju njihov transport i/ili usidranje asocijacijom sa citoskeletnim komponentama. Neke iRNK se transportuju do periferije ćelije, dok se druge, uključujući one koje kodiraju transkripcione faktore i MT1 pacova, nalaze kao deo polizomalne frakcije koja je vezana za citoskelet u okolojedarnoj citoplazmi (Hesketh, 1996). Lokalizacija iRNK zavisi od signala prisutnih u 3'-UTR za koje se vezuju proteini, čime se formiraju ribonukleoproteinski kompleksi i možda RNK-transportne granule (Farina et al., 2003). Okolojedarna lokalizacija je potrebna da bi novosintetisani MT bili pravilno translocirani u nukleus i pojavili se na početku S-faze (Levadoux-Martin et al., 2001). Za transport MT koji ne poseduje klasičan NLS je neophodna Ran GTP-aza. Uloga MT u jedru je nejasna, ali se pretpostavlja da štiti DNK od oštećenja i učestvuje u transportu cinka TF i enzima koji su uključeni u ćelijskoj deobi. Eksperimenti u kojima je 3'-UTR MT1 deletiran ili zamenjen sa 3'-UTR od gena za glutationperoksidazu i ubačen u CHO (Chinese hamster ovary) ćelijske linije su pokazali da su oštećenja DNK izazvana alkilirajućim agensom i apoptoza izazvana UVC znatno veći nego u ćelijama koje su transformisane punim MT1, ali manja nego u netransformisanim ćelijama, kod kojih je inače ekspresija MT veoma niska i verovatno nedovoljna za zaštitu (Levadoux-Martin et al., 2001). Postojanje različitih izoformi MT omogućava specijalizaciju funkcije MT. Tako, kod ljudi barem 10 od 17 gena (hromozom 16) kodira multiple izoforme MT1 i jednu izoformu MT2a. Heterogenost izoformi je rezultat posttranslacionih acetilacija i/ili varijacija u kompoziciji metala (metaloforme). Mada su generalna fizičko-hemijska svojstva izoformi slična, postoji specijalizacija funkcije (Hamer, 1986). Izoforme mogu biti distribuirane u različitim odnosima u pojedinim tkivima i imati različite brzine degradacije. Brzina degradacije MT zavisi od identiteta metala koji je vezan za protein. Tako, poluživoti za Cd-, Zn- i Cu-MT u jetri su procenjeni na 80, 20 i 17 h. MT se degraduju i u lizozomalnim i nelizozomalnim kompartmanima (Bremner, 1987). *In vitro*, na kiselom pH katepsini najbrže razgrađuju apoMT.

1.2.2.3. Biološke funkcije sisarskih MT

In vitro analize, upotreba ćelijskih linija, različitih mutanata, i konačno „knockout” i transgenih miševa, omogućili su veliki napredak u istraživanju funkcije MT. Mada daleko od jasnog razumevanja njihove funkcije, sve bogatija baza podataka o biohemijским svojstvima, regulaciji, indukciji, mestu i vremenu ekspresije sve više upotpunjuje sliku o njihovoj ulozi u biološkim sistemima.

Uloga MT u detoksifikaciji

Visok afinitet MT za metale doveden je u vezu sa mogućom ulogom u neutralizaciji viška metala, što je posebno važno u slučaju toksičnih, teških metala. Međutim, iako su knockout miševi za MT1 i MT2 znatno osetljiviji od divljih sojeva miševa na dejstvo toksičnih metala, postoji značajna varijabilnost zavisno od sredinskih uslova, tj. koncentracije metala i pola. Time se unekoliko potvrđuje stav da su MT pre slučajni nego evolutivno determinisani „čistači” toksičnih metala (Palmiter, 1994) i da se mogu smatrati drugom linijom odbrane, nakon brzog efluksa metala iz ćelije pomoću transportera. U slučaju nekih metala kao što je Cd^{++} , za koje ne postoji dovoljno efikasan sistem efluksa (Palmiter, 1998), zaštita pomoću MT i dalje ostaje relevantna i funkcionalno veoma značajna.

MT i drugi metaloproteini

S obzirom na zavisnost velikog broja enzima, njih oko 300, i još većeg broja neenzimskih proteina (npr, p53 i mnogi transkripcioni faktori) od prisustva jona bakra ili cinka, koncentracija ovih jona mora biti strogo regulisana. Na toj relaciji bi MT mogli imati ključnu ulogu u homeostazi cinka, obezbeđujući ga tamo gde je, kada i za šta je potreban. Uloga MT u dinamičkoj intermolekularnoj izmeni je u skladu sa visokom termodinamičkom stabilnošću i velikom labilnošću (u pogledu otpuštanja jona) njihovih mesta vezivanja za metale. Žiža prvobitnih interesovanja za razjašnjenje funkcije MT bila je enzimsko aktivacija pomoću Zn-MT, gde je MT donor Zn^{++} apoenzimima kao što su aldolaza, termolizin, karboanhidraza, piridoksalkinaza i sorbitoldehidrogenaza, ali se u skorije vreme pokazalo da cink može imati i suprotno, inhibirajuće dejstvo.

Mada je za većinu ispitivanih enzima kandidata za modulaciju MT pokazano da u sistemu *in vitro* binarni sistem MT/enzim funkcioniše efikasno, u *in vivo* sistemu se taj proces verovatnije odvija u koncertovanoj reakciji MT, GSH i GSSG, nego u direktnoj

interakciji MT/enzim. Fina regulacija postiže se balansiranjem odnosa GSH/GSSG zavisno od oksidoredukujućih uslova sredine. Tako, u predominantno redukujućim uslovima sredine žive ćelije, u skoro milimolarnim koncentracijama GSH (0.1-10 mM), gde je odnos GSH/GSSG između 30:1 i 100:1 (Hwang et al., 1992), metalotioneini ne mogu transferovati Zn apoenzimima. Pojedine okolnosti, poput lokalnog enzimskog generisanja GSSG ili kompartmentalizacija mogu u značajnoj meri poremetiti ovaj odnos i dovesti do otpuštanja jona cinka. Primer je endoplazmatični retikulum u kome je GSH/GSSG između 3:1 i 1:1, uslovi koji su sasvim slični onima u in vitro sistemima, u kojima se efikasno dešava transfer Zn (Hwang et al., 1992).

Brojni eukariotski enzimi, među kojima su i oni koji ne zahtevaju Zn za aktivnost, inhibiraju se ovim metalom. Primeri su kaspaza-3, fruktozo 1,6-bifosfataza, tirozinfosfataza, gliceraldehid 3-fosfat-dehidrogenaza itd. Iako se pokazalo da tionein, apoprotein MT *in situ* vrlo brzo aktivira enzime inhibirane ovim metalom (Maret and Vallee, 1998). Tionein, po svoj prilici, pravi razliku između aktivnih i inhibitornih mesta na osnovu razlika u konstantama stabilnosti i/ili dostupnosti cinka sa regulatornih mesta enzima. Konstante stabilnosti za inhibitorna mesta su u nanomolarnim, dok one u katalitičkim ili strukturnim mestima enzima su u pikomolarnom opsegu. Tionein sekvstrira Zn^{++} do niskih pikomolarnih koncentracija pri kojima cink više ne inhibira enzime.

Uloga MT u zaštiti od oksidativnih oštećenja

Zapažanja da u toku oksidativnih stresova dolazi do povećanja količine MT sugerišu da bi MT mogli imati značajnu antioksidativnu ulogu. In vitro studije su pokazale da MT reaguje direktno sa reaktivnim vrstama $OH^\cdot$, H_2O_2 i NO. Premda nema dokaza za direktnu interakciju in vivo, farmakološke i genetičke studije su pokazale da MT imaju značajnu ulogu u zaštiti protiv oksidativnog oštećenja DNK, lipida i proteina. U skladu sa antioksidativnom ulogom, količina MT bi se povećavala tokom aktivnosti koje zahtevaju povećanu količinu energije, a čiju proizvodnju u kiseoničnim uslovima prati povećanje količine slobodnih radikala. Bakar je esencijalan element koji služi kao kofaktor brojnim enzimim (Glerum and Tzagoloff, 1997) a među kojima su i citohromoksidaza i SOD (Son et al.). Funkcija bakra je uglavnom vezana za njegovu multiplu valencu (Cu^+ i Cu^{++}) koja ga čini sposobnim da učestvuje u reakcijama redoks ciklusa. Pod aerobnim uslovima Cu^+

može reagovati sa OH[•] molekulskim kiseonikom i dati O₂^{•-}, dok u prisustvu H₂O₂ generiše radikale koji su sposobni da iniciraju oštećenja nukleinskih kiselina, proteina, lipida. Ćelijska sredina bogata askorbatom i tiolima pruža izvanredne redukujuće uslove za konstantno odvijanje ovakvih reakcija i stoga je za zaštitu ćelije neophodna uspešna sekvestracija Cu⁺ čime bi se sprečilo njegovo učešće u slučajnim i nekontrolisanim redoks ciklusima. Iako su opisana dva proteina, Atx1 i Cox17 (Glerum et al., 1997) koja vezuju bakar i transportuju ga do Goldžijevog aparata i mitohondrija, MT bi svojim visokim afinitetom za bakar mogli značajno doprineti u protekciji ćelije. U redukujućim uslovima MT vezuju najviše 12 Cu⁺, pri čemu se njih 8 vezuje veoma jako, dok preostalih 4 slabo, verovatno zbog razlika u vezivanju Cu⁺ od strane β i α domena (Fabisiak et al., 1999). Međutim male količine H₂O₂ se proizvode endogeno i mogu dostići visoke vrednosti u pojedinim stanjima, pa je pravilnije posmatrati funkcionalnost MT u sredini koja može da oksiduje MT i samim tim smanji broj sulfhidrilnih grupa. Oksidacija MT pomoću H₂O₂ menja njihov vezujući kapacitet za Cu⁺ tako da maksimalno 9 mola Cu⁺ može biti vezano po molu MT u prisustvu askorbata. Štaviše, prema navodima nekih autora, u prisustvu H₂O₂ bi se MT mogli ponašati čak i kao prooksidanti (Oikawa et al., 1995; Vasak et al., 2000). Ovo je izgleda posledica oslobađanja bakra sa MT pod oksidujućim uslovima sredine, što potencira stvaranje ROS i oštećenja bioloških molekula. Sposobnost oslobađanja Cu⁺ sa MT takođe može činiti deo intracelularnog transportnog sistema za Cu⁺ (Vasak and Hasler, 2000).

NO nije poznat samo kao agresivni radikal, već i kao molekul koji prenosi signale na susedne ćelije i kao molekul koji, zahvaljujući upravo radikalskim svojstvima, pomaže organizmu da se odbrani od infekcija. S obzirom na ove uloge NO, pretpostavljena je dvoznačna veza između MT i NO, u kojoj bi prvi neutralisali radikalska svojstva potonjih, a NO bi oslobađao metale sa β domena MT (Zangger et al., 1999). Poznato je da NO oslobađa metale sa metalotioneina pri čemu nastaju S-nitrozotiole. Ove SNO grupe zatim formiraju intramolekulske disulfidne veze između cisteina u MT. Oslobađanje metala je izgleda jedan od vrlo važnih mehanizama modulisanja imunog odgovora.

Citoprotektivna uloga MT

U vezi sa ranije pomenutim inhibitornim dejstvom Zn na kaspazu-3, prisustvo MT se može povezati i sa takvim procesima kao što je apoptoza. Među istraživačima vlada

opšte mišljenje da MT imaju stimulatивно dejstvo na proliferaciju, a inhibitorno na apoptozu, mada neki rezultati upućuju i na mogućnost proapoptotičkog efekta. Nedostatak MT u embrionskim ćelijama knockout miševa za MT1 i MT2 je praćen povećanom osetljivošću na apoptozu ((Miles et al., 2000).

Uloga MT u regulaciji genske ekspresije

Mnogi transkripcioni faktori (TF) u svom DNK vezujućem domenu sadrže Zn kao deo cinkanih prstića. Skorije studije efekta MT na interakcije između Zn-TF i DNK ukazuju na ulogu MT u regulaciji ekspresije gena. Inkubacija tioneina sa Zn-finger transkripcionim faktorima Sp1 i TFIIIA inhibira njihovo vezivanje za DNK (Posewitz and Wilcox, 1995; Zhang et al., 2005), sugerišući da bi sekvencijacija Zn tioneinom mogao biti jedan od mehanizama za regulaciju genske ekspresije. Sposobnost MT da funkcionišu kao aktivatori/ inhi-bitori TF zavisi od afiniteta Zn^{++} za MT i TF. Neki TF, kao što je pomenuti Sp1, imaju mali afinitet za Zn^{++} ($K \sim 10^9$ za treći cinkani prstić, (Posewitz and Wilcox, 1995), pa MT zbog visokog afiniteta ($K \sim 2 \times 10^{12} M^{-1}$) preferencijalno vezuju Zn^{++} i inaktiviraju Sp1. Metalotioneini u ovom slučaju ne funkcionišu kao aktivatori. Međutim, ako je odnos afiniteta MT/TF približno jednak jedinici, kao u slučaju TFIIIA ($K \sim 5 \times 10^{11}$), ili receptora za estrogen ($K \sim 9 \times 10^{11}$), onda MT može aktivirati ili inhibirati TF zavisno od uslova koji vladaju u ćeliji. Vezivanje teških metala za neke Zn-finger proteine redukuje afinitet tih TF za vezivanje za DNK (Hanas and Gunn, 1996). Metalotioneini mogu restaurirati funkcije α MT TF u in vitro uslovima kao u slučaju izmene metala između Ni-Sp1-3 i Zn-peptida (Posewitz and Wilcox, 1995).

1.3. MT kod kvasaca, gljiva i invertebrata

Mali, metal vezujući proteini, bogati Cys nađeni su i kod kvasaca i gljiva i svrstani u klasu II. MT ove klase su veoma divergentni po svojoj strukturnoj organizaciji tako da su ih autori Binz i Kagi svrstali u čak 6 familija (8- 13). Familija 8 sadrži MT koji u N-terminusu pokazuju visoku homologiju sa sisarskim MT. Najbolje okarakterisani

predstavnik ove familije je MT *Neurospora grassa* (Kumar et al., 2005). U familiju 9 i 10 spadaju MT-1 i MT-2 *Candida glabrata*, patogena čoveka. Čak tri familije MT poseduju članove poreklom iz *Saccharomyces cerevisiae*, pekarskog kvasca. Ovi predstavnici su i najbolje proučeni, naročito CUP1 i novootkriveni Crs5. CUP1 je izgrađen od 53 aminokiseline sa 20% Cys i preferencijalno vezuje Cu^+ . Proučeni su promotori ovog gena sa ACE1 cis-elementom odgovornim za indukciju metalom. Određena je i kristalna struktura CUP1.

MT invertebrata su veoma raznovrsni ali s obzirom na brojnost nedovoljno izučeni. Najviše saznanja je prikupljeno o MT *Drosophila melanogaster*, čiji genom poseduje 4 gena za MT (MtnA-D). MtnA i B su izgrađeni od 40 i 43 aminokiseline sa 10 i 12 Cys ostataka. Pre svega vezuju Cu i lokalizovani su u digestivnom traktu, pljuvačnim žlezdama i Malpigijevim cevčicama. Kod ovih organizama izolovan je i okarakterisan MTF-1 transkripcioni faktor, veoma sličan sisarskom. MtnC i D imaju manji značaj i verovatno su nastali kao posledica duplikacije gena. MT invertebrata, pre svega onih koji naseljavaju vodena staništa prepoznati su kao biomarkeri zagađenosti voda i kao takvi imaju potencijalnu biotehnološku primenu. Zbog toga istraživanja ovih proteina doživljavaju ekspanziju poslednjih godina. MT mekušaca su svrstani u 2. a MT zglavkara u 3. familiju. Strukturno su dobro okarakterisani, postoje 3 kompletno rešene 3-D strukture za MT poreklom iz kraba, jastoga i morskog ježa. Potvrđeno je vezivanje teških metala, pre svega Cd^{++} , Hg^{++} , Pb^{++} , Bi^{+++} , Co^{++} , Ag^+ , Cu^+ , Zn^{++} . Kod vinogradarskog puža *Helix pomatia* pokazano je prisustvo dva MT proteina, jedan koji vezuje Cd i odgovoran je za detoksifikaciju i MT koji vezuje Cu i pojačano se eksprimira u uslovima stresa (Dallinger et al., 2004).

1.4. Metali u biljkama

Protekli vek je bio period brze industrijalizacije, razvoja tehnologije u svim oblastima ljudskog delovanja uključujući i poljoprivredu. Sve ovo dovelo je do prekomernog zagađivanja životnih staništa, što kao krajnju posledicu ima ugrožavanje zdravlja i opstanka svih živih organizama na zemlji. Pored organskih zagađivača i radioaktivnih polutanata, glavnu opasnost za ekosisteme predstavljaju teški metali. Oni u životnu sredinu dospevaju kao posledica eksploatacije i prerade ruda, kao tečni otpad u industrijskim procesima, aerosoli koje su sastavni deo izduvne emisije automobila, primene ferilizera u poljoprivredi. Metali kao što su Zn, Cu, Mn, Se, Mo, B, Fe, su neophodni za rast i razviće svih živih sistema kada su prisutni u optimalnim koncentracijama, dok u višku mogu imati toksični efekat. Postoje metali za koje nije utvrđena niti jedna fiziološka uloga kod biljaka, to su pre svih kadmijum (Cd) i živa (Hg) (Dalcorsio et al.). Oni su glavni metal-polutanti zemljišta kao posledica antropogenog delovanja. Budući da su biljke sesilni organizmi, razvile su niz adaptacionih mehanizama kojima prevazilaze ili ublažavaju štetne efekte metala. Sposobnost biljaka da usvajaju, transportuju i skladište teške metale pretvarajući ih u neškodljive forme, iskorišćena je u biotehnologiji za remedijaciju zemljišta. Postoji veliki broj studija na temu unapređivanja biljaka u akviziciji i sekvencijaciji teških metala uz primenu bioinženjeringa, pre svega genetičkih manipulacija (Wu et al., ; Eapen and D'Souza, 2005; Gratao et al., 2005), Uloga metala u različitim fiziološkim procesima u biljkama je interesantan fenomen i za fundamentalna istraživanja pre svega zbog pomenute činjenice da 30% svih proteina čine metaloproteini, o kojima se relativno malo zna.

Mesto ulaska metala u biljku predstavlja koren. Metali, prisutni u zemljištu putem korenovih dlačica, tačnije preko receptora na njihovoj površini, ulaze u apoplast korena, pri čemu izvestan deo ostaje u ćelijama korena. Transport se dalje obavlja preko simplasta korena koji metale uvodi u vaskularni sistem stabla, apoplast ksilema. Ksilemski transport je verovatno vođen dejstvom transpiracione pumpe. U ksilemu se metali vezuju za

helatore, organske supstance, u prvom redu aminokiseline, kao što su His ili neke organske kiseline (Eapen and D'Souza, 2005). Translokacija metala u stablu je složen proces koji se obavlja preko katjon-proton antiporta, katjon-ATPaza ili jonskih kanala kao i helatora koji uključuju malat, citrat, histidin i nikotinamin (von Wiren et al., 2000). Iz apoplasta ksilema joni metala prelaze u simplast a odatle u ćelije nadzemnih delova biljke, kao što su izdanci i listovi. Metali prisutni u ćelijama u supraoptimalnim koncentracijama, bilo da su esencijalni ili toksični, bivaju posredstvom specifičnih proteina transportera ili proteina bogatih tiolnim grupama (fitohelatini i metalotioneini) odvođeni i smešteni u subćelijske kompartmane.

1.4.1. Transporteri metala

Kao što je pomenuto odvođenje metala i depozicija u vakuolama je često posredovana metal-transporterima koji su u poslednje vreme intenzivno studirani zbog moguće biotehnoške primene. Treba pomenuti, pre svih, transportere Zn, koji sačinjavaju familiju ZAT 1-4 proteina. Transgene biljke sa povećanom ekspresijom ovih proteina imaju 2 puta veću akumulaciju Zn u korenovima *T. goesingense* (Eapen and D'Souza, 2005). Takođe povećana tolerancija na gvožđe postiže se overekspresijom Nramp1 transportera kao i feroportina u *A. thaliana* (Morrissey et al., 2009).

1.4.2. Fitohelatini

Fitohelatini (PC) su pored MT najvažniji u detoksifikaciji od teških metala, pre svega Cd, u biljnim tkivima. Prisutni su kod biljaka, gljiva i nekih mikroorganizama. Sintetišu se enzimski uz pomoć enzima fitohelatin sintaze, netranslaciono i ovi peptidi imaju tipičnu strukturnu organizaciju tripeptidnih ponovaka u formi (γ -Glu-Cys) $_n$ -Gly gde je $n=2-11$. (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Klasifikovani su u klasu III MT kojima ni po jednom svojstvu ne pripadaju, osim sposobnosti da vezuju metale.

1.5. MT biljaka

Prisustvo MT u biljnom svetu prvi put je potvrđeno 1980. godine, kada je iz klice pšenice izolovana prva iRNK označena kao Ec-1 (Early cysteine-labeled). Translirana sekvenca pokazala je obilje Cys u strukturi novootkrivenog polipeptida, oko 25% raspoređeno u klastere što je nalikovalo poznatoj strukturi MT. Pošto za većinu do danas otkrivenih MT biljaka postoje uglavnom cDNK sekvence i, sa izuzetkom Ec-1, nema izolovanih nativnih proteina, čak postoji veoma malo rekombinantnih proteina, u nomenklaturi biljnih MT često je u upotrebi naziv MT-like protein. Osnovne karakteristike biljnih MT su N i C terminusi bogati Cys između kojih se nalazi oko 40 aminokiselina dug premošćujući region bez Cys koji sadrži aromatične aminokiseline i kod nekih predstavnika His.

1.5.1. Klasifikacija biljnih MT

MT biljaka pripadaju klasi III, familiji 15, i podeljeni su u 4 osnovna tipa (Robinson et al., 1993). Ovu klasifikaciju, zasnovanu na rasporedu aminokiselina (ak), podržava i klasifikacija zasnovana na organizaciji gena za MT, ako se izuzmu male razlike u položaju introna za MT1 u N-terminalnom domenu između mono- i dikotila. **Tabela 1.**

Tip 1 biljnih metalotioneina sadrži ukupno šest Cys-Xaa-Cys motiva koji su ravnomerno raspoređeni u dva domena. Dva Cys bogata domena odvojena su jedan od drugog sa 40-ak ak, koje uključuju aromatične ak. Ovaj veliki most je jedinstvena karakteristika biljnih MT, nasuprot većini drugih MT, gde je on dužine od 3- 10 a.k. Izuzetak čine vrste iz familije *Brassicaceae*, kod kojih je ovaj most daleko kraći.

Tip 2 poseduje Cys-Cys motiv na poziciji 3 i 4, Cys-Gly-Gly-Cys motiv i visoko konzervirane sekvence MSCCGGNCGCS na N-terminusu. Slično prvom tipu, C-terminus MT tipa 2 sadrži tri Cys-Xaa-Cys motiva. Region koji spaja dva domena MT je dužine oko 40 ak, ova dužina je mnogo varijabilnija među vrstama nego kod tipa 1.

Tip 3 se odlikuje prisustvom 4 Cys ostataka na N-terminusu. Prva tri su raspoređena u okviru konsenzus sekvence Cys-Gly-Asn-Cys-Asp-Cys. Četvrti Cys u okviru konsenzus sekvence Gln-Cys-Xaa-Lys-Lys-Gly za razliku od prethodna tri, ne učestvuje u formiranju parova Cys. Šest Cys u S-terminusu je grupisano u tri Cys-Xaa-Cys motiva.

Tip 4 se u odnosu na prethodna tri tipa metalotioneina razlikuje po prisustvu tri cisteinom bogata domena sa po 5 ili 6 konzerviranih cisteinskih aminokiselinskih ostataka. Domeni su premošćeni sa po 10-15 aminokiselinskih ostataka. Većina Cys je deo Cys-Xaa-Cys motiva. Bez obzira na mali broj identifikovanih MT ovog tipa, postojeća baza podataka ukazuje da postoje razlike između dikotila i monokotila. Dikotile imaju 8-10 ak u N-terminalnom domenu pre prvog Cys.

Type 1									
AtMT1a	MADSNCGCGS	SCKCGDSCSC	EKNY.....						
AtMT1c	MAGSNCGCGS	SCKCGDSCSC	EKNY.....						
BnMT1	MAGSNCGCGS	GCKCGDSCSC	EKNY.....						
OsMT1a	MS...CSCGS	SCSCGSCNCSC	GKKYPDLEEK	SSSTKATVVL	GVAPEKKQOF	EAAAESGETA	HGSCSGSSCR	CNP.CNC	
PsMT1	MSG...CGCGS	SCNCGDSCCK	NKRSSGLSYS	EMETTETVIL	GVGPAKIQFE	GAEMSAASED	GGCKCGDNCT	CDP.CNCK	
MsMT1	MSG...CNCGS	SCNCGDNCKC	NSRSSGLGYL	EGETTETVIL	GVGPAKIHFE	GAEMGVAEED	GGCKCGDSCT	CDP.CNCK	
Type 2									
AtMT2a	MSCCGGNCGC	GSCKCGNGC	GGCKMYPDLG	FSGETTTTET	FVLGVAPAMK	NQYEASGESN	NAENDACKCG	SDCKCDPCTC	K
BoMT2	MSCCGGNCGC	GSCKCGNGC	GGCKMYPDLG	FSGELTTTET	FVFGVAPTMK	NQHEASGEV	AEENDACKCG	SDCKCDPCTC	E
AtMT2b	MSCCGGSCGC	GSACKCGNGC	GGCKRYPDL	...ENTATET	LVLGVAPAMN	SQYEASGETF	VAENDACKCG	SDCKCNPCTC	K
PhMT2	MSCCGGNCGC	GSCKCGNGC	GGCKMYPDFS	YT.ESTTTET	LILGVGPEKT	SFGSMEMGES	PAEN.GCKCG	SDCKCDPCTC	SK
SvMT2	MSCCNGNCGC	GSACKCGSGC	GGCKMFPDFA	E..GSSGSAS	LVLGVAP.MA	SYFDAEMEMG	VATENGCKCG	DNCQCNPTC	K
OsMT2	MSCCGGNCGC	GSSCQCGNGC	GGCK.YSEVE	PTTTTTFLAD	ATNKGSGAAS	GGSEMGAENG	SCGNTCKCG	TSCGSCSCNC	N
Type 3									
AtMT3	MSSNCGSCDC	ADKTQCVKKG	TSYTFDIVET	QESYKEAMIM	DVGAEENNAN	CKCKCGSSCS	CVNCTCCPN		
MaMT3	MS.TCGNCDC	VDKSQCVKKG	NSYGIDIVET	EKSYVDEVIV	AAEAAEHDG	.KCKCGAACA	CTDCKCGN		
AdMT3	MSDKCGNCDC	ADSSQCVKKG	NS..IDIVET	DKSYIEDVVM	GVPAAESGG	.KCKCGTSCP	CVNCTCD		
OsMT3	MSDKCGNCDC	ADKSQCVKKG	TSYGVVIVEA	EKSHFEV..	.AAGEENG..	..CKCGTSCS	CTDCKCGK		
GhMT3	MSDRCGNCDC	ADRSQCTK.G	NSNTM.IIET	EKSYINTAVM	DAPAENDG..	.KCKCGTSCS	CTDCTCGH		
PgMT3	MSDRCGNCDC	ADKSQCTKKG	FQID.GIVET	SYEMGHGGD	..VSLEND..	..CKCGPNCQ	CGTCTCHT		
Type 4									
AtMT4a	MADTGKGSV	AGCNDSCGCP	SPCPGGNSCR	CRM..R.EAS	AGDQGHMVCP	CGEHCGCNPC	NCPKTQTQTS	AKG...CTC	GEGCTCASCA T
AtMT4b	MADTGKGSAS	ASCNDRCGCP	SPCPGGESCR	CKM..MSEAS	GGDQEHNTCP	CGEHCGCNPC	NCPKTQTQTS	AKG...CTC	GEGCTCATCA A
PhMT4	MADL.RGSS.	AICDERCGCP	SPCPGGVACR	CASGGAATAG	GGDMEHKKCP	CGEHCGCNPC	TCPKSEGTTA	GSCK.AHCKC	GFGCTCVQCA S
ZmMT4	MG.....	..DDKCGCA	VPCPGGKDCR	CTS...G..S	GGQREHTTCG	CGEHCECSPC	TCGRATMPSG	RENRRANCSC	GASCNCASCA SA
TaMT4	MG.....	..CDDKCGCA	VPCPGGTGCR	CTS...ARS	AAAGEHTTCG	CGEHCGCNPC	ACGREGTPSG	RANRRANCSC	GAACNCASCG SATA
OsMT4	MG.....	..CDDKCGCA	VPCPGGTGCR	CAS...S.AR	SGGDHTTCS	CGDHCGCNPC	RCGRESOPTG	RENRRAGCSC	GDSCTCASCG STTTTAPAT T

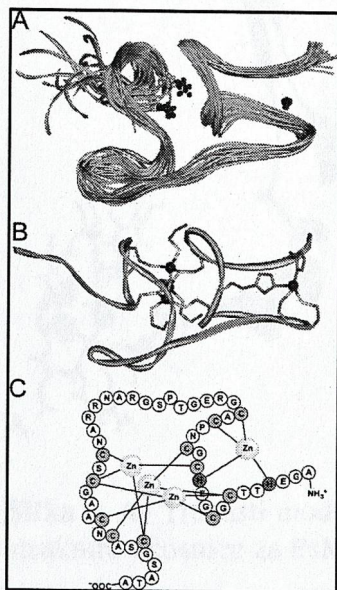
Tabela 1. Primeri sekvenci MT za sva četiri tipa kod biljaka. Cisteinski ostaci su naglašeni tamnijom bojom, a konzervirani cisteini svakog tipa su označeni zvezdicom. Proteinske sekvence su predviđene na osnovu genske sekvence iz sledećih biljaka: *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Pisum sativum* (Ps), *Brassica napus* (Bn), *Brassica oleracea* (Bo), *Silene vulgaris* (Sv), *Musa acuminata* (Ma), *Picea glauca* (Pg), *Zea mays* (Zm), *Triticum aestivum* (Ta), *Actinidia deliciosa* (Ad), *Petunia hybrida* (Ph), *Gossypium hirsutum* (Gh), *Medicago sativa* (Ms).

Do sada je pokazano da većina biljaka ima jedan ili dva tipa MT, mada postoje indicije da ostali tipovi kod tih biljaka nisu otkriveni i da je verovatnije da većina biljaka ima gene za sva 4 tipa. Najviše podataka je dobijeno o MT *A. thaliana*, koja poseduje 4 familije MT, za svaki od 4 tipa po jednu. MT1 familiju čine 3 gena (MT1a, MT1b, i MT1s) sa različitim paternom ekspresije, i moguće, različitom ulogom. MT1a i MT1s su, kao invertovani ponovci smešteni unutar 4 kb na hromozomu 1. MT2a i MT3 su na odvojenim pozicijama na hromozomu 3, MT1b i MT2b su pozicionirani na hromozomu 5, dok su MT4a i MT4b oba smešteni na hromozomu 2, ali nisu blisko povezani. MT1b se izgleda, ne eksprimira i okarakterisan je kao pseudogen (Guo et al., 2003; Guo et al., 2008).

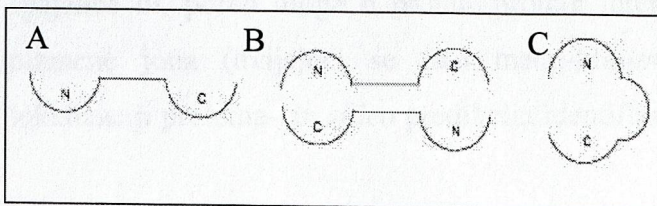
1.5.2.Struktura i biohemijska svojstva

Metalotioneini biljaka su u strukturnom pogledu slabije izučeni, u prvom redu zbog visokog stepena proteolize, podložnosti oksidativnog degradaciji i gubitka jona metala prilikom izolovanja (Kawashima et al., 1992). Sa razvojem metoda za izolovanje rekombinantnih proteina, problem rešavanja strukture ovih proteina je u mnogome olakšan. Iako se istraživanja na ovom polju intenziviraju podaci su malobrojni što ilustruje činjenica da je za samo 9 predstavnika MT iz biljnog carstva određen sadržaj metala. To su MT1 leblebije, graška i pšenice, MT2 leblebije, hrasta plutnjaka, MT3 banane i uljane palme Ec-1 pšenice i susama, kod kojih je pokazano vezivanje Zn^{++} , Cd^{++} i Cu^{+} (Freisinger, 2008). Pretpostavka da se joni metala koordinativno vezuju preko Cys ostataka u formi tetratiolata slično animalnim MT potvrđena je na primeru Ec-1 korišćenjem Co^{++} kao paramagnetne probe (Peroza et al., 2009). Zbog visokog afiniteta za metale, potrebne su niske vrednosti pH da bi se otpustio metal sa proteina. Tipično, joni metala se otpuštaju sa MT pri pH vrednosti od 2.0-4.5. Afinitet vezivanja metala na različitim pH vrednostima izražava se kao pH vrednost na kojoj se 50% vezanog metala oslobodi. Na primer, za CdMT iz jetre pacova ta vrednost iznosi 3.0, a 3.0 i 4.5 za Cd- i Zn-MT iz bubrega konja (Kagi and Schaffer, 1988). Kod biljaka ove vrednosti su za ove jone nešto više i za CdMT kupusa, duvana i PsMTA graška iznose 4.4, 5.0-5.8, i 3.95, a 5.25 i 1.45 za Zn- i Cu-rekombinantni GST-PsMTA (Tommey et al., 1991), što reprezentuje manji afinitet biljnih od MT životinja za vezivanje cinka i kadmijuma, a veći za vezivanje bakra. U koordinaciji

jona metala pored Cys učestvuje i His što je osobenost MT biljaka. On ima slabiji afinitet za vezivanje jona metala ali doprinosi dodatnoj stabilizaciji kompleksa protein-metal (Peroza and Freisinger, 2007). O primarnoj strukturi biljnih MT bilo je govora u poglavlju o klasifikaciji i ona je uglavnom izvedena na osnovu u prevođenja nukleotidnih sekvenci cDNK u aminokiselinske. Odsustvo podataka o trodimenzionalnoj, terciarnoj strukturi ovih proteina može se objasniti poteškoćama u izolovanju nativnih proteina u dovoljnoj količini za NMR spektroskopiju, X-ray kristalografiju. Stoga nije iznenađujuće ni postojanje dileme oko osnovnih strukturnih pitanja, kao npr da li N- i C- metal vezujući domen formiraju jedan ili dva metal- klastera? Samo je kod Ec-1 pšenice potvrđeno prisustvo dva klastera i predložena 3-D struktura proteina. Pored opisanog modela koji podržava strukturni model “gimnastičkog tega” slično sisarskim MT, postoji model “ukosnice” koji je jedini postavljen na osnovu metoda NMR i X-ray kao i analize produkata digestije proteinazom K (Slika 4. i 5.).



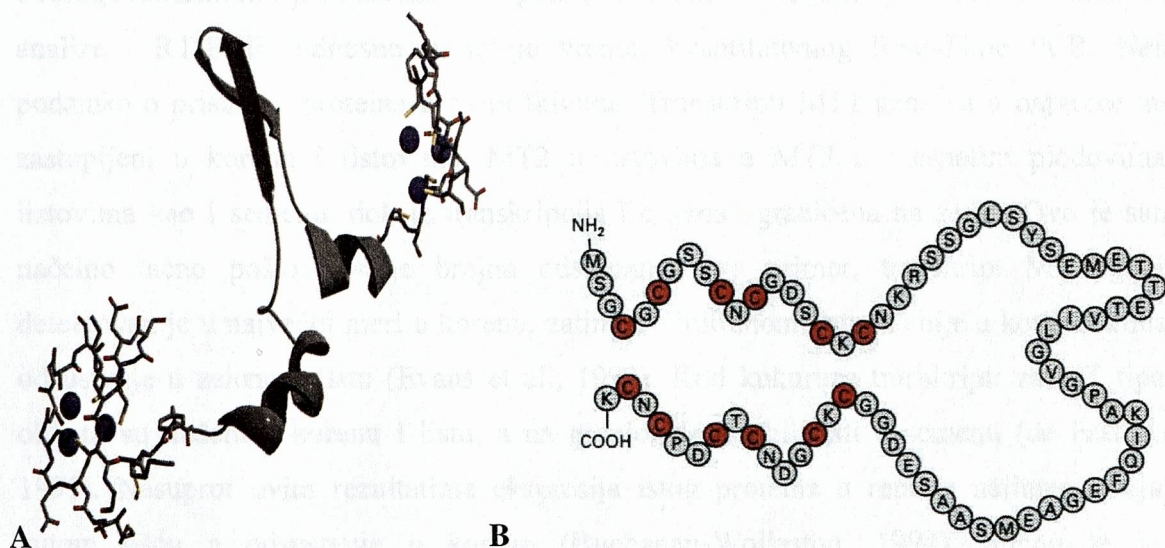
Slika 4. Struktura C-terminalnog i centralnog domena Ec-1 dobijena NMR spektroskopijom. A) Trakasti model proteinske okosnice. Crne tačke predstavljaju jone Zn u Zn₃Cys₉ tiolatnom klasteru. B) Detaljnija struktura Zn₃Cys₉ klastera i klastera sa His. C) Shematski prikaz koji ilustruje metal-ligand veze (Freisinger 2009)



Slika 5 Šematski prikaz predloženih modela strukture MT kod biljaka

A) model gimnastičkog tega B) dimer gimnastičkog tega C) model ukosnice

Na osnovu velikog broja sekvenci cDNA može se kompjuterskom predikcijom zaključiti da MT biljaka u osnovi imaju sekundarnu strukturu sličnu MT životinja— dva domena razdvojena spajalicom, koja je kod biljaka duža i visokokonzervisana (Rauser, 1999). Spajalica je dužine od 40-ak ak i, za razliku od MT životinja, sadrži i aromatične kiseline. Za MT iz *A. thaliana* je, na osnovu sekvenci cDNA predviđena dvodomenska organizacija, slična sisarskim MT. Kompjuterska predikcija strukture dMT iz *T. durum*, i analiza rekombinantnog dMT iz *E. coli* potvrđuju sličnost strukture MT biljaka sa MT životinja (**Slika 6.**) i u izvesnoj meri razjašnjavaju značaj dužeg premošćavajućeg regiona (Bilecen et al., 2005). Naime, veliki broj hidrofobnih ak u regionu spajalice dMT daje mogućnost njenog savijanja ili u strukturu petlje ili, što je najverovatnije slučaj, antiparalelne β -ploče koju ograničavaju sa obe strane dva heliksa, koja bi mogla biti odgovorna za protein-protein ili protein-DNK interakcije. Uostalom, pomenuti protein pokazuje tendenciju oligomerizacije prilikom izolovanja iz *E. coli*.



Slika 6. A- Trakasti model predviđene strukture dMT (Bilecen 2005) i **B** predloženi model strukture ukosnice za PsMTA u asocijaciji sa metalima (Kille 1991)

Suprotno, za QsMT iz *Quercus suber* se predviđa struktura ukosnice, u kojoj je interakcija C i N-terminusa ključna za vezivanje metala (Domenech et al., 2006). Region spajalice bi, pored uloge u protein-protein interakciji mogao imati ulogu u modulaciji razmene jona (uvijajući se oko metal-klastera), stabilnosti i moguće subćelijskoj lokalizaciji proteina— *in silico* predikcija identifikuje 3 fosforilaciona i jedno miristilaciono

mesto u spajalici, posttranslacione modifikacije za koje je široko prihvaćeno da su signali biljnih proteina za usidranje u membranu. Poznato je da asocijacija sa jonima metala štiti proteine od proteolitičke degradacije. Aminokiselinski ostaci 2-21 i 56-75 u PsMTA su otporni na delovanje proteinaze K (Kille et al., 1991). Dva domena bogata cisteinom u PsMTA ostaju asocirani jedan sa drugim čak i posle sečenja regiona spajalice, što ukazuje da su veze protein-metal sposobne za održavanje oba dela molekula u bliskoj vezi. Na osnovu ovog zapažanja Kille je predložio model za asocijaciju sa jonima metala koji je dat na slici 6B i koji podržava model ukosnice.

1.5.3. Ekspresija gena za MT biljaka

Najviše podataka o MT biljaka tiče se analize njihove ekspresije, pre svega prisustva transkripata u određenim tkivima, tokom različitih faza razvića, pod dejstvom stresogenih faktora i jona metala. Ovi podaci su mahom dobijeni upotrebom Northern blot analize i RT-PCR, odnosno u novije vreme, kvantitativnog Real-Time PCR. Nema podataka o prisustvu proteina u ovim tkivima. Transkripti MT1 gena su u najvećoj meri zastupljeni u korenu i listovima, MT2 u listovima a MT3 u mesnatim plodovima i listovima kao i semenu, dok je transkripcija Ec gena ograničena na seme. Ovo je samo načelno tačno pošto postoje brojna odstupanja. Na primer, transkript MT1 graška detektovan je u najvećoj meri u korenu, zatim u etioliranom listu, slabije u kotiledonima a odsustvuje u zelenom listu (Evans et al., 1992). Kod kukuruza transkripti za MT tipa 1 obilato su nađeni u korenu i listu, a na granici detektabilnosti u semenu (de Framond, 1991). Nasuprot ovim rezultatima ekspresija istog proteina u repi je najintenzivnija u žutom lišću a odsustvuje u korenu (Buchanan-Wollaston, 1994). Slično je i sa lokalizacijom transkripcije gena za MT2, koja je u arabidopsisu potvrđena u korenu, mladim i zrelim listovima kao i cvetovima i mahunama. Kod jabuke iRNK za MT2 nema u listovima dok je visoko zastupljena u cvetovima i ranim fazama sazrevanja ploda. MT3 takođe nema strogo lokalizovanu transkripciju. Kod banane transkripti ovog gena nađeni su u kori tokom sazrevanja ploda i listu gde su prisutni u većoj meri nego transkripti MT2 gena (Liu et al., 2002). Zeleni listovi jabuke su mesto najintenzivnije transkripcije MT3, a iz istog organa uljane palme potpuno odsustvuju (Abdullah et al., 2002). Detaljnija analiza

lokalizacije ekspresije koja podrazumeva lokalizaciju transkripata u tkivima i ćelijama RNK/RNK *in situ* analizom urađena je za MT1 i MT2 *Arabidopsis*-a, MT2 graška, hrasta plutnjaka i kukuruza. Utvrđeno je da je MT1a gen kod *Arabidopsis*-a eksprimiran u ćelijama stele i korteksu korena, trihomama i sprovodnom sistemu lista kao i svim delovima cveta (Garcia-Hernandez et al., 1998). U grašku su nađeni transkripti MT2 u trihomama lista (Foley and Singh, 1994). Lokalizacija transkripta u hrastu plutnjaku pomogla je rasvetljavanju funkcije MT2 čije su iRNK detektovane u lignifikovanim vlaknima kore i sprovodnom sistemu stabla, što je povezano sa ulogom MT2 u snabdevanju tkiva jonima bakra uključenih u procese lignifikacije (Mir et al., 2004). Tip 2 MT kukuruza eksprimiran je u mikrosporima za razliku od MT1 čija je ekspresija lokalizovana u Bundle sheat cells lista (Furumoto et al., 2000).

Istovremena ekspresija različitih tipova MT gena u istom tkivu, ako i činjenica da ekspresija jednog tipa MT nije ograničena na određeni organ/tkivo govori o preklapajućim i višeznačnim funkcijama ovih proteina o kojima se još uvek malo zna.

1.5.3.1. Regulacija ekspresije MT kod biljaka

Regulacije ekspresije MT kod biljaka je nedovoljno ispitana i predmet je intenzivnih istraživanja molekularnih biologa. Za analizu promotorskih regiona neophodno je izolovati genomske klonove koji sadrže 5'-regulatorne regione gena. Najčešće korišćene *in vitro* metode za analizu regulatornih sekvenci gena su kompjuterska predikcija, EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), DNase protection esej, kao i *in vivo* analize fuzija sa reporterskim genom u homolognim i heterolognim transgenim biljkama. Kompjuterska predikcija ukazuje na prisustvo brojnih potencijalnih cis-regulatornih elemenata. Promotor MT3 gena heljde jedini je analiziran i EMSA i "DNase protection" esejima (Brkljacic et al., 2004). Promotori biljaka poseduju karakteristike tipičnih eukariotskih promotora. Bazalnu aktivnost bi mogao obezbeđivati TATA blok koji se nalazi 25-30 n.t. uzvodno od starta transkripcije. Međutim, funkcionalnost ove sekvence kao i eventualno prisustvo inicijatorske sekvence Inr, DPE (Downstream Promoter Element) ili BRE (TFIIB Response Element) nisu analizirani ni strukturnim ni funkcionalnim analizama. U promotorskim regionima pojedinih MT gena nađene su sekvence sposobne da vode tkivno specifičnu ekspresiju reporterskog gena u homolognim

i heterologim transgenim biljkama. Postoji samo jedna studija u kojoj je dokazana funkcionalnost cis regulatornog elementa mutacionom analizom (Tsuwamoto and Harada) 2010). 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. Tako, promotorski region cgMT1 *Casuarina glauca* sadrži motive koji učestvuju u regulaciji tkivno specifične ekspresije u korenskim kvržicama nekih gena (Andersen et al., 2007), što je i eksperimentalno potvrđeno - aktivan je u korenovima i azotofiksatorskim kvržicama transgenih biljaka iz familije *Casuarinaceae* (Laplaze et al., 2002). Histohemijsko GUS bojenje u *A. thaliana*, koje su transformisane konstruktom promotor PsMTA : GUS-kodirajući region, najintenzivnije signale daje u korenu, dok je u listovima bojenje ograničeno na hidatode. Ovaj patern ekspresije identičan je onom koji je zapažen za transkripte PsMTA u samom grašku (Evans et al., 1992; Fordham-Skelton et al., 1997). Promotorski region PsMTA sadrži u svom distalnom delu RSE (Root Specific Element), motiv koji je odgovoran za koren specifičnu ekspresiju GRP1.8 gena pasulja. Paradoksalno, delecija regiona sa RSE sekvencom ne dovodi do smanjenja nivoa ekspresije gena GUS u korenu transgenog *A. thaliana*. S druge strane, delecija regiona koji sadrži 3 kopije potencijalnog ERE (Etilene Responsive Element) imala je za rezultat gubitak specifične GUS aktivnosti u korenu, ali upotreba inhibitora i aktivatora etilena ne ostavlja značajan efekat na ekspresiju GUS vođenu PsMTA promotorom. Potencijalne ABRE (ABA Responsive Element) , sekvence koje preko kojih ABA ostvaruje svoje regulatorno dejstvo, nađene su i u genima za MT. Primer je gen za Ec pšenice, koji se povećano eksprimira pod uticajem ABA (Kawashima et al., 1992). Suprotno očekivanjima, potencijalni MRE je uočen u svega nekoliko biljnih promotora. Promotorski region PsMTA dužine 285 b.p. od ATG kodona, koji sadrži jednu kopiju MRE, sposoban je da vodi ekspresiju GUS slabog intenziteta u listovima transgenog *A. thaliana*. Međutim, izlaganje povećanim koncentracijama Cu^{++} i Fe^{+++} nije praćeno povećanjem ekspresije GUS. Akumulacija transkripata PmMTa u semenima i klijancima Daglasove jele se povećava pod uticajem jona metala, ali delecija promotorskog regiona koji sadrži MRE nije praćena značajnijom promenom ekspresije reporterskog gena u tranzijentno transformisanim somatskim i zigotskim embrionima Daglasove jele, kao ni u transgenim klijancima duvana (Chatthai et al., 1997). S druge strane, prisustvo

potencijalnih MRE sekvenci nije uočeno u promotorima MT1a, MT2a, MT2b i MT3 gena *A. thaliana*, mada je pokazan uticaj Cu^{++} na ekspresiju reporterskog gena vođenu kloniranim fragmentima promotora MT (Guo et al., 2008). Jedino je u promotoru ricMT pirinča uočena inducibilnost jonima metala u predikovanoj potencijalnoj sekvenci MRE (Lu et al., 2007). Delecionom analizom je pokazano da je region dužine 37bp (-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.

Interesantna je činjenica da ne postoje literaturni podaci o promotorima biljnog MT koji bi vodio Cd^{++} indukovanu ekspresiju.

Uzevši u obzir navedene podatke, nije isključeno prisustvo novih, biljno specifičnih sekvenci odgovornih za regulaciju metalima, čija identifikacija tek predstoji. U skladu sa ulogom MT u oksidativnom stresu, nađene su sekvence koje potencijalno odgovaraju na ROS. Tako, promotor gena cgMT1 sadrži potencijalni ARE u svom promotorskom regionu (Laplaze et al., 2002). Spoljašnji stimulusi prema kojima se biljka upravlja u svom razviću verovatno mogu uticati na ekspresiju MT obezbeđujući koordinisano prisustvo MT sa odgovarajućim procesima u biljci. Potencijalni G-blok, nađen u promotorskim regionima mnogih gena (cgMT1, PsMTA, PmMTa, (Fordham-Skelton et al., 1997; Laplaze et al., 2002; Chatthai et al., 2004) bi u interakciji sa drugim cis-elementima mogao biti deo LRE (Light Responsive Element) kompleksa (Chattopadhyay et al., 1998), ali i odgovarati na ABA i druge sredinske ili endogene stimuluse (Menkens et al., 1995). 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*.

1.5.3.2. Promena nivoa ekspresije MT gena kod biljaka

Podaci dobijeni analizom ekspresije biljnih gena za MT nisu dovoljni za potpuno rasvetljavanje njihove uloge u različitim procesima u biljkama. U novije vreme u ovu svrhu koriste se transgene biljke sa izmenjenim nivoom ekspresije gena za MT. Geni za

MT biljaka su mnogobrojni i sačinjavaju familije gena čiji predstavnici neretko poseduju visok stepen homologije na nivou sekvenci (i do 99%). Ovaj podatak navodi na zaključak da su funkcije ovih proteina u velikom broju slučajeva preklapajuće. (de Miranda et al., 1990). Sličnost na nivou sekvenci i postojanje izoformi čini ove gene lošim kandidatima za „knock-out“ metodologiju ukidanja genske funkcije, zato što funkciju deletiranih gena mogu preuzeti njihovi homolozi. Zato se koristi drugi pristup u pokušaju otkrivanja funkcije MT, a to je konstruisanje 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 od nedavno 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.

Studije „overekspresije“ MT su ukazale da MT vezuju jone metala u biljnim ćelijama i smanjuju njihovu dostupnost drugim ćelijskim komponentama. Osim uloge u odbrani od teških metala pokazana je promena tolerancije transgenih biljaka sa "overekspimiranim" MT u drugim abiotičkim ili biotičkim stresovima i potvrđena pretpostavka da i biljni metalotioneini učestvuju u uklanjanju reaktivnih kiseoničnih vrsta u ćelijama (Lee et al., 2004). Tranzijentna ekspresija MT 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. Tehnika utišavanja gena korišćenjem RNKi konstrukta upotrebljena je za upoznavanje funkcije *MT1a Arabidopsis*-a u studiji (Zimeri et al., 2005). Potvrđeno utišavanje svih gena ove familije na manje od 5-10% od nivoa transkripata prisutnih u netransformisanim biljkama, dovelo je do značajno usporenog rasta na podlozi sa kadmijumom u poređenju sa netransformisanim biljkama, smanjene akumulacije teških metala u izdancima ovih transgenih RNAi linija, što sugeriše važnu ulogu MT1 u translokaciji metalnih jona.

Jedna od pretpostavljenih uloga MT je uklanjanje ROS u biljnim ćelijama, što je i pokazano u eksperimentu "overekspresije" *GhMT3a* iz pamuka. Pokazano je da ovaj biljni

MT ima sposobnost da uklanja ROS u ćelijama i povećava toleranciju na abiotičke stresove (Xue et al., 2009). Rast transgeničkih linija bio je 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. Geni za MT fuzionisani sa fluorescentnim proteinom pod dejstvom nekog jakog promotora, i uvedeni u biljnu ćeliju korišćeni su za utvrđivanje ćelijske lokalizacije proteina. Kodirajući regioni gena *AtMT2a*, *AtMT3*, *OsMT2b* i *BjMT2* fuzionisani su sa fluorescentnim proteinom GFP čime je utvrđena njihova citosolna lokalizacija (Nikolic et al., ; Lee et al., 2004; Wong et al., 2004; Zhigang et al., 2006).

Upotreba transgenih biljaka sa izmenjenim nivoom metalotioneina napravila je ogroman pomak u razumevanju funkcija MT u biljkama. Dalji razvoj ove tehnologije ide u pravci praktične biotehnoške primene ovih biljaka pre svega u procesima fitoremedijacije (Qi et al., 2007).

1.5.3.3. Komplementacija funkcije nedostajućeg *CUP1* u ćelijama kvasca heterolognim MT

Genetičke manipulacije na nivou ekspresije gena kompleksnih eukariotskih organizama je veoma mukotrpan posao na sadašnjem nivou razvoja biotehnologije. Biljke, zbog kompleksnosti genoma i prisustva poliploidije su naročito nepogodne za ovu svrhu. Indirektan način da se odrede funkcije MT je izvođenje eksperimenata komplementacije u organizmima kod kojih je manipulacija genetičkim materijalom lakše izvodljiva. Jedan takav model- organizam je pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, koji ima dve kopije gena *CUP1* iz grupe MT. Delecijom ovog gena dobijeni su $\Delta cup1$ null mutanti koji su široko korišćeni u eksperimentima komplementacije funkcije heterolognim MT. Granica toksičnosti za ovaj soj je $75\mu\text{M}$ CuSO_4 . Kvasci su dobar sistem za testiranje funkcionalnosti MT jer se u jednom *in vivo* eukariotskom sistemu, bez upotrebe proteinskog taga (što je uobičajeno u *in vitro* eksperimentima), mogu testirati metal-vezujuća ali i druga svojstva MT, kao što su uklanjanje ROS (Xue et al., 2009). Na ovaj način je potvrđena sposobnost $\Delta cup1$ ćelija da prevaziđu toksičnost povećane koncentracije Cu^{++} i Cd^{++} kada je u njima overekspimiran *SvMT2b* iz lista *Silene vulgaris*. Komplementacijom mutacije *cup1* pekarskog kvasca sa MT1 i MT2 iz *A. thaliana*

transformisane ćelije postaju rezistentne na visoke koncentracije CuSO_4 , koje su inače toksične za Δcup1 -kvasce (Zhou and Goldsbrough, 1994; Zhou et al., 2005). Eksperiment sa istim mutantima se može koristiti i za dokazivanje funkcionalne specijalizacije, jer MT2 *A. thaliana* čini kvasac tolerantnijim na Cd^{++} nego što je to slučaj sa MT1 iz istog organizma. Metal- vezujuće svojstvo je na ovaj način pokazano i kod MT2 plutnjaka, *E. pšenice*, kao i kod sva 4 tipa MT *Arabidopsis*-a (Mir et al., 2004; Bilecen et al., 2005; Guo et al., 2008).

1.5.4.Funkcije biljnih MT

Strukturna raznovrsnost, veliki broj izoformi, kompleksna prostorno i vremenski regulisana ekspresija, indukcija ekspresije različitim faktorima, ne samo metalima nedvosmisleno govore o važnim i distinktnim funkcijama biljnih MT. Visok stepen proteolitičke degradacije, kome doprinosi postojanje dugog premošćavajućeg regiona koji ne učestvuje u vezivanju metala, u velikoj meri otežava izolovanje i biohemijsku karakterizaciju biljnih MT. Pomenutom analizom ekspresije biljnih MT, analizom različitih ekotipova iste ili srodnih vrsta, komplementacijom mutacija u heterologim sistemima i generisanjem različitih konstrukata, dobijaju se dragoceni podaci iz kojih se mogu izvući pretežno posredni zaključci, pa je pravilnije govoriti o pretpostavljenim funkcijama MT. Svakako, najprecizniji rezultati bi se dobili analizom uticaja prekomerne ekspresije i/ili utišavanja gena na pojedine aspekte fenotipa biljaka, ali je takvih analiza malo iz prethodno objašnjenih, objektivnih razloga. U daljem tekstu biće razmatrane dve osnovne funkcije MT biljaka koje su sadržane, pojedinačno ili udružene, u svakoj specifičnoj fiziološkoj ulozi u biljnoj ćeliji i to su **vezivanje metala i uklanjanje ROS**.

Uloga u detoksifikaciji od teških metala

Prva pretpostavljena funkcija MT analogno sisarkim MT, bila je detoksifikacija od teških metala. Poređenjem ekspresije MT različitih ekotipova utvrđeno je da populacije hiperakumulatora teških metala imaju značajno viši nivo MT transkripata od populacija senzitivnih na prisustvo teških metala (van Hoof et al., 2001; Roosens et al., 2005). Metalotionein SvMT2b iz lista *Silene vulgaris*, koja prirodno naseljava staništa bogata

teškim metalima (npr, rudnici bakra) uspešno komplementira mutante kvasca. Kako u biljkama Cd-detoksifikatorsku funkciju primarno obavljaju fitohelatini, uloga MT je verovatno značajna samo za zaštitu od Cu^+ prema kome fitohelatini imaju slab i afinitet za vezivanje. Nakon što je pokazano da su transkripti MT2 iz *V. faba* i MT2a iz *A. thaliana* lokalizovani u trihomama lista (Foley and Singh, 1994; Garcia-Hernandez et al., 1998), predložena je dvojaka funkcija MT vezana za Cu^+ . Prva bi bila detoksifikacija, jer ćelije trihoma, s obzirom na svoju veličinu, mogu prihvatati i odlagati toksične metale. Druga pretpostavljena uloga bio bi transport Cu^+ do enzima koji učestvuju u odbrambenim mehanizmima koji zahtevaju bakar za svoju aktivnost (Foley and Singh, 1994; Garcia-Hernandez et al., 1998). Dokaz, u prilog ovoj tvrdnji, je da posle mehaničke povrede različitih tkiva raste ekspresija MT, a moguće objašnjenje je potreba za Cu^+ od strane enzima koji učestvuju u biosintezi lignina (Snowden et al., 1995; Cho et al., 2006).

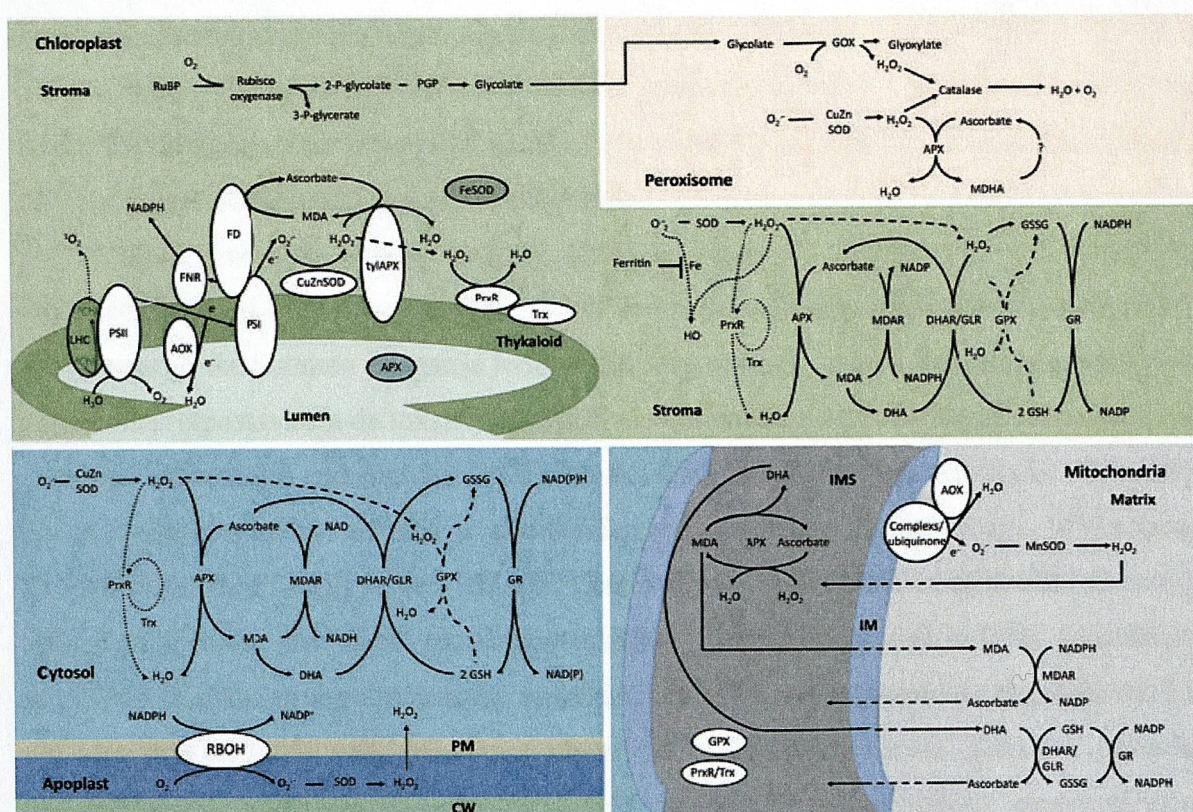
Uloga biljnih MT u uklanjanju ROS

U biljkama se reaktivne kiseonične vrste (ROS), kao što su superoksid ($\text{O}_2^{\cdot-}$), vodonikperoksid (H_2O_2) i hidroksil radikal ($\text{OH}^{\cdot}$), stvaraju konstantno kao sporedni produkti u metabolizmu kiseonika, u različitim ćelijskim kompartmanima. Pod fiziološkim, "steady-state" uslovima, ovi molekuli se uklanjaju tokom antioksidativnih procesa. Balans između produkcije i uklanjanja ROS može biti poremećen posredstvom različitih sredinskih faktora, kako biotičkih tako i abiotičkih. Kao rezultat poremećaja ove ravnoteže koncentracija ROS naglo raste i nastaje oksidativni stres. Štetni efekti ovih visokoreaktivnih molekula na nivou ćelije su: oštećenje DNK, oksidacija polinezasićenih masnih kiselina i lipida, oksidacija aminokiselina u proteinima, inaktivacija enzima preko oksidacije kofaktora. Ćelije su razvile sofisticirane strategije za uklanjanje ROS. Postoje dve osnovne grupe molekula koje uklanjaju ROS, to su enzimi i neenzimski antioksidansi. U prvu grupu spadaju superoksid dismutaza SOD, askorbar peroksidaza APX, glutation peroksidaza GPX, katalaza CAT. SOD predstavlja prvu liniju odbrane i katalizuje dismutaciju superoksida u H_2O_2 . SOD se u biljkama nalaze u više izoformi i specifične su za određene kompartmane, (hloroplaste, mitohondrije, peroksizome, apoplast ili citosol).

HALF-LIFE AND DIFFUSION DISTANCES
FOR PROMINENT ROS SIGNALS THAT ARE
OF BIOLOGICAL SIGNIFICANCE

ROS	Half-life	Diffusion distance
1O_2	1.4 μ sec	0.8 μ m
O_2^-	1 sec	8 mm
H_2O_2	∞	—
$\bullet OH$	1 – 0.01 μ sec	0.5 μ m

➤ mogu da difunduju u ćeliji



Slika 7. Lokalizacija stvaranja ROS i mehanizmi njihovog uklanjanja u različitim ćelijskim odeljcima (hloroplasti, mitohondrije, peroksizomi, citosol, apoplast).

APX- askorbat peroksidaza, AOX- alternativna oksidaza, CAT- katalaza, DHA-dehidroaskorbat, DHAR, DHA- reduktaza, FD- feredoksin, FNR- feredoksin NADPH reduktaza, GLR- glutaredoksin, GR- glutation reduktaza, GOX- gliklate oksidaza, GSH/GSSH- redukovani/oksidovani glutation, IM- unutrašnja membrana, IMS, IM- prostor, MDA- monodehidroaskorbat, MDAR, MDA- reduktaza; PGP- fosfoglikolat fosfataza, PM- plazma membrana, PSI i PSII- fotosistem I i II, RuBP- ribulozo-1,5-bisfosfat, Rubisko, RuBP karboksilaza oksigenaza, Trx- tioredoksin, tyl- tilakoid, FeSOD- gvožđe superoksid dismutaza, CuZnSOD, PrxR- peroksiredoksin, GPX- glutathione peroxidase, Chl- hlorofil, CW- ćelijski zid (Preuzeto od (Pitzschke et al., 2006)

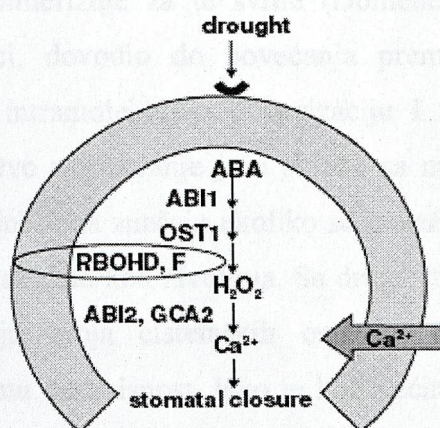
U ćelijske antioksidante spadaju mali molekuli sposobni da smanjuju štetno dejstvo ROS, i najpoznatiji su askorbat (vitamin C), tokoferol (vitamin E), glutation, kao i neka polifenolna jedinjenja.

Pored štetnih efekata koje izazivaju ROS igraju centralnu ulogu u mnogim signalnim putevima kod biljaka kao što su: percepcija stresa, regulacija fotosinteze, odgovor na patogene, programirana ćelijska smrt, rast i razviće. Mehanizam delovanja ROS u ovim procesima još uvek je nedovoljno proučen (Pitzschke et al., 2006).

Kao što je pomenuto ranije kod sisarskih MT, ovi proteini mogu imati važnu ulogu u odbrani od oksidativnog stresa ali takođe mogu biti i fini regulatori koncentracije ROS kada oni učestvuju u prenošenju signala. Pretpostavlja se da ovu ulogu obavljaju na dva načina, preko vezivanja tranzijentnih metala, generatora ROS i direktnim uklanjanjem ROS. Na biljkama postoji sve više studija koje obrađuju tzv. "ROS scavenging" svojstva MT u mnogim stresnim i fiziološkim uslovima.

Eksperimenti u kojima su geni AtMT2a i AtMT3 tranzijentno eksprimirani u stominim ćelijama *V. faba* su pokazali da MT mogu smanjiti degradaciju hloroplasta, kao i koncentraciju ROS nakon izlaganja jonima Cd^{++} (Lee et al., 2004). Takva zapažanja su u skladu sa pretpostavkom da toksičnost teških metala potiče od oksidativnog stresa koji oni izazivaju (Watanabe and Suzuki, 2002), pa detoksifikacija pored sekvestracije metala iz citosola fitohelatinima zahteva i antioksidativno delovanje kakvo imaju MT sisara. Rekombinantni MT2 čiji je gen (*CLMT2*) izolovan iz divlje lubenice (*Citrullus lanatus*) sposoban je da in vitro spreči oksidaciju salicilne kiseline i degradaciju DNK (Akashi et al., 2004). Time je prvi put pokazano za neki biljni MT da je sposoban da redukuje ROS i da učestvuje u zaštiti ćelijskih komponenti od oksidativnog stresa. Dodatna potvrda antioksidativne uloge dobijena je u živim ćelijama koje su transformisane genom pirinča *OsMT2b* (Wong et al., 2004). Prekomerna ekspresija ovog gena smanjuje nivo H_2O_2 koji je indukovao patogenim elicitorom, dok je utišavanje bilo praćeno povećanjem nivoa H_2O_2 . U vezi sa protektivnom funkcijom MT od ROS treba podsetiti na uspešnu detoksifikaciju od Cu^+ , čije je prisustvo, kao što je pomenuto, praćeno povećanjem nivoa $\text{O}_2^{\cdot-}$ $\text{OH}^{\cdot}$ i H_2O_2 u kiseoničnim uslovima. Indirektno, biljni MT bi mogli imati ulogu u regulaciji ćelijske smrti. Tako, ekspresija pojedinih MT se jako povećava tokom senescencije. Nivo *MT1a* u senescentnom listu *A. thaliana* raste (Garcia-Hernandez et al.,

1998), što je verovatno u vezi sa regulacijom ekspresije gena vezanih za senescenciju i/ili transportom metala iz senescentnih delova u druge delove biljke (Novabpour 2003). Ekspresija *OsMT2b* opada pod uticajem *OsRac* (Wong et al., 2004), GTP-aze koja predstavlja induktor oksidativnog šoka i hipersenzitivnog odgovora na infekciju patogenima. Povećanje ROS pokreće mehanizme koje rezultuju smrću zaraženih ćelija, čime se sprečava širenje infekcije. Smanjenje *OsMT2b* je neophodno jer bi on sprečavao ćelijsku smrt u patološkim uslovima smanjenjem ROS. 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. Eksperimenti povećane ekspresije graškovo *PsMT_{AI}* gena u heterolognom sistemu, topoli, dovode do snižavanja koncentracije ROS i smanjenja oštećenja DNK koja nastaju izlaganjem ćelija teškim metalima. Takođe, uočena je i povećana otpornost na fotooksidativni stres. Biljke u kojima su MT „overekspimirani“ pokazuju povećanu otpornost na abiotički stres (Xue et al., 2009). Transgeni duvan u kome je „overekspimiran“ MT iz pamuka, je ispoljavao toleranciju na osmotski, stres solima i sušu, što je praćeno i padom endogenog peroksida. Suša izaziva zatvaranje stoma, što je pod direktnom kontrolom ABA, koja je okidač produkcije ROS. Oni sa svoje strane aktiviraju jonske kanale na plazma membrani pokrećući influks Ca^{++} što za krajnju posledicu ima zatvaranje stoma. Ovde ROS molekuli imaju ulogu posrednika u prenošenju signala (Pitzschke et al., 2006).



Slika 8. Shema zatvaranja stoma posredstvom ABA (Pitzschke and Hirt 2006)

ROS učestvuju u procesima rasta i razvika. Vodonik-peroksid odlaže prelazak iz G₁ u S fazu ćelijskog ciklusa usporavajući mitoze (Reichheld et al., 1999), ali je neophodan transducer signala u somatskoj embriogenezi i gravitropizmu korena, kao i izduživanju lista. Prisustvo MT u ovim tkivima može ukazivati na njegovu ulogu u finoj regulaciji koncentracije ROS, koja ako prelazi fiziološku granicu, ROS gubi signalnu ulogu i postaje toksični molekul.

1.5.5. Evolucija biljnih MT i genska organizacija

Prisustvo MT kroz čitavo životinjsko i biljno carstvo kao i kod nekih Procaryota (npr, *Synechococcus*) sugeriraju njihovu veoma ranu pojavu u toku evolucije, koja traje više od 600 miliona godina. Smatra se da je potreba za eliminacijom teških metala nastala u Prekambijском moru koje je zbog čestih vulkanskih erupcija obilovalo metalima, sumpornim jedinjenjima i reaktivnim kiseoničnim vrstama. Smatra se da su prvo nastali MT sa afinitetom za Cd i Cu jer su prisutni kod nižih organizama, dok su ZnMT karakteristika kičmenjaka (Coyle et al., 2002). Cu-MT gljiva su najkraći poznati MT, sa svega 25 ak, od kojih su 7 Cys (Lerch, 1980). U nekim studijama oni čine polazište za teorijsku pretpostavku o evolucionim tokovima gena za MT koji za rezultat imaju povećanje broja Cys ostataka i samim tim uvećanje domena koji su bogati Cys. Pošto C18 fragment QsMT (*Quercus suber*) nije sposoban da sa svojih 6 Cys veže jone bakra, već mora da dimerizuje za te svrhe (Domenech et al., 2006), evolucioni pritisak bi, po pretpostavci, dovodio do povećanja premošćavajućeg regiona, koji bi na taj način omogućio intramolekulsku dimerizaciju i funkcionalno iskorišćavanje i C-terminalnog domena. Ovo razmatranje je u skladu sa modelom strukture MT koja liči na ukosnicu i moglo bi dobiti na značaju ukoliko se pokaže da je struktura ukosnice pravilo kod biljaka, a ne izuzetak, kao kod životinja. Sa druge strane, kod sisara bi evolucionarna strategija bila u povećavanju broja cisteinskih ostataka u oba domena što bi omogućilo njihovu funkcionalnu nezavisnost. Iako je kod većine biljnih vrsta pronađen po jedan ili dva tipa MT, smatra se da je evolucija tipova prethodila razdvajanju monokotiledonih i dikotiledonih biljaka i da najverovatnije sve cvetnice sadrže sva 4 tipa (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Jedna forma MT je pronađena kod *Gymnospermae* i algi (*Fucus*

vesiculatus). Geni za MT kod većine biljaka nisu striktno grupisani u klastere kao kod sisara (kod kojih je izgleda evolucija tekla kroz serije tandemskih duplikacija i gubitaka), mada postoje i takvi slučajevi. Broj i dužina introna u do sada okarakterisanim MT genima biljaka variraju, tako da neki geni uopšte nemaju introne, drugi imaju jedan, a ima i takvih koji imaju dva introna. Dužine introna se, bar na osnovu dosadašnjih podataka, kreću od 78 bp pa sve do 1.1 kb. Većina analiziranih gena za MT sadrži intron lociran pri kraju genske sekvence za N-terminalni domen. Jedan intron u genima za MT1 monokotila razara kodon posle poslednjeg kodona za cistein u N-terminalnom domenu. Kod dikotila, međutim, prvi od dva introna MT1 i MT4 leži u kodonu koji prethodi poslednjem cisteinskom kodonu ovog domena, a isti položaj zauzima i jedini intron MT2 *A. thaliana* i prvi od dva introna pirinča. Metalotioneini tipa 3 uvek sadrže 2 introna, od kojih prvi zauzima relativno istu poziciju posle kraja sekvenci za N-terminalni domen (Brkljacic et al., 2004; Guo et al., 2008).

1.6. MT heljde (Fagopyrum esculentum Moench)

Metalotioneini heljde se izučavaju u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka poslednjih 15 godina. Do sada je iz biblioteke cDNK semena heljde u srednjoj fazi sazrevanja izolovan je klon cDNK za metalotionein. Izvedena aminokiselinska sekvenca dužine 59 amino kiselina, pokazala je visoku homologiju sa drugim biljnim metalotioneinima i klasifikovana u tip MT3 (Brkljacic et al., 1999). Sekvenca cDNK je poslužila da se dizajniraju prajmeri za konstruisanje subgenomske biblioteke obogaćene klonovima koji potencijalno sadrže sekvence za MT. Iz ove biblioteke izolovano je nekoliko klonova koji sadrže sekvence slične MT (Brkljacic, 2003). Klon gFeMT4.1 (Acc. No. AY361956) je detaljnije analiziran. Genomski fragment gFeMT4.1 nosi deo gena za MT heljde. Gen za MT heljde najverovatnije sadrži dva introna, budući da je malo verovatno da se poslednji, nepotpuno izolovan kodirajući region, prekida još jednim intronom. Start transkripcije se nalazi 71 b.p. uzvodno od ATG kodona, a potencijalni

TATA blok se nalazi na poziciji -29 od starta trans-kripcije (+1). Na osnovu kompjuterske predikcije za deo promotorskog regiona -163 do -43, a korišćenjem PLACE baze podataka, utvrđeno je postojanje 3 motiva-kandidata za vezivanje Dof1 TF, 2 potencijalna vezivna mesta za NtBBF1, koji takođe pripada familiji Dof TF, dva potencijalna mesta vezivanja za Athb-1 koji pripada familiji HD-Zip I TF i po jedno potencijalno vezivno mesto za GT1 i MYB. Inkubacijom navedenog promotorskog fragmenta sa Dof i/ili HD-Zip, prečišćenim rekombinantnim TF, je pokazano da odgovarajuće sekvence vezuju date TF, ali sa različitim afinitetima. Funkcionalna analiza promotorskog regiona je vršena korišćenjem GUS eseja. Minimalni promotor, odnosno region koji sadrži elemente neophodne i dovoljne za bazalnu aktivnost promotora, obuhvaćen je najkraćim analiziranim fragmentom, dužine 250 b.p. distalno od ATG kodona. Puna dužina izolovanog promotorskog regiona, kao i delecione varijante istog, dužine 503 i 250 b.p. distalno od ATG kodona, sposobni su da vode ekspresiju GUS gena u transformisanom duvanu i *A. thaliana* sa nekoliko puta većim intenzitetom nego u negativnoj kontroli (netransformisane biljke) i manjim intenzitetom u odnosu na pozitivnu kontrolu (35S : GUS konstrukt). (Majić, magistarski rad, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjer-stvo, 2005). Ekspresija MT3 heljde u zelenom listu se povećava pod uticajem Cu^{++} , Zn^{++} , NaCl i H_2O_2 , koji svoje stimulatorno dejstvo na MT verovatno ostvaruju preko ROS. U senescentnom listu ovi faktori ne povećavaju ekspresiju, verovatno zbog toga što je produkcija MT toliko povećana zbog visoke koncentracije ROS da dodatni tretmani nemaju efekta. Inače, neki autori zagovaraju mišljenje da je produkcija MT u toku senescencije indukovana povećanjem ROS i da u tom kontekstu MT nemaju neposrednu ulogu u regulaciji ćelijske smrti, ali oni mogu transportovati bakar i cink iz senescentnog lišća i akumulirati ga u drugim tkivima. MT3 heljde se eksprimiraju u ranim i srednjim fazama sazrevanja semena. Njihova ekspresija se povećava pod uticajem Zn^{++} u ranoj fazi sazrevanja semena.

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada je izolovanje i karakterizacija (u formi cDNK) članova familije metalotioneina heljde; analiza ekspresije ovih gena u različitim tkivima, fiziološkim stanjima i u uslovima različitih faktora abiotičkog i biotičkog stresa kao i eseji, koji dokazuju njegova metal-vezujuća svojstva i ulogu ovog proteina u zaštiti od oksidativnih oštećenja.

Ispitivanje ekspresije gena za metalotionein tipa 3 pod različitim stresogenima i po različitim tkivima, polazna je tačka za određivanje funkcija ovog proteina za koje se pretpostavlja da su brojne i važne, ali do sada nisu nedvosmisleno potvrđene.

Očekivani rezultati predstavljaju originalni doprinos istraživanju biljnih metalotioneina i unaprediti poznavanje procesa vezanih za odgovor biljnih ćelija na biotički i abiotički stres.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal i tretmani

3.1.1. Biljni materijal

Heljda (*Fagopyrum esculentum* Moench, cv. Darja) je uzgajana u stakleniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

Period od pojave cveta do zrelog semena kod heljde traje oko 30 dana. Seme u razviću klasifikovano je prema morfološkim karakteristikama: veličina i masa svežeg semena, boja semenjače, veličina kotiledona i konzistencija endiosperma. Faze u sazrevanju označene su kao 9, 11, 14, 17, 19, 21, 23, 25 i 28 DAF (DAF *od engl.* "Days After Flowering"), kao što je uobičajeno u literaturi. Semena, listovi, cvetovi, stabla i korenovi heljde su sakupljani, zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80°C za kasnije izolovanje RNK i proteina. Semena su sakupljana iz različitih faza sazrevanja: <9 DAF; 9-11 DAF; 11-14 DAF; 14-17 DAF; 17-19 DAF; 19-21 DAF; 21-23 DAF; 23-25 DAF i 25-28 DAF, a listovi u tri faze: mladi list, zeleni list i žuti list u kome su znakovi senescencije bili vidljivi.

3.1.2. Tretmani biljaka

U svrhu izazivanja **senescencije mrakom** biljke su neprekidno držane u mraku u provetrenom prostoru i redovno su zalivane. Potpuno razvijeni listovi su sakupljani sa većeg broja biljaka heljde nakon 1, 2, 3, 5, 7, 9 i 11 dana. **Stres sušom** je indukovao izostavljanjem navodnjavanja kompletno razvijenih biljaka starih 4 nedelje tokom 15 dana. Listovi su sakupljani sa većeg broja biljaka i grupisani u tri grupe: donji, senescentni listovi; listovi sa središnjeg dela biljke, zeleni i potouno formirani, kod kojih su uočljivi

znaci sušenja i mladi svetlozeleni listovi bez vidljivih znakova sušenja. Suša je takođe izazivana i na dugi način: nezalivanjem potpuno razvijenih biljaka u fazi pupljenja cveta, u periodu od 15. Uzorkovani su mešoviti uzorci listova 3, 5, 9, i 15 dana od početka tretmana. **Mehaničko povređivanje** listova izvođeno je bušenjem nekoliko rupa po listu (oko 10) pomoću sterilne igle ($\varnothing$ 0.45 x 12mm, 26G x 1/2"). Povređeni listovi su sakupljeni nakon 1, 2 i 3 dana po "ranjavanju". Za UV eksperimente biljke su tretirane tako što su izlagane UV zračenju (radijacija 290-320 nm) tokom 1, 2 i 24 sata, korišćenjem UV lampe (HPQ 100 W Philips) koja je bila instalirana na udaljenosti od 30 cm u odnosu na biljke. **Oksidativni stres** je izazivan na isečenim listovima heljde koji su potapani u 10 mM vodenom rastvoru H_2O_2 , i uzorkovani nakon 4.5h i 24h. Kontrolni listovi su držani isto vreme u dH_2O . Tretman **ABA hormonom** je urađen na odsečenim listovima i oljuštenim epidermisima heljde potapanim u vodeni rastvor 100 μ M ABA u trajanju od 2, 5, 7, 8, i 24h. Listovi iste starosti sa istih biljaka su potapani u dH_2O i služili su kao kontrole eksperimenta. Tretman biljaka **salicilnom kiselinom** je izveden prema (Wen, 2005) uz manje modifikacije. Listovi heljde su sečeni u male kvadratne komadiće površine oko 1 cm² koji su odmah bili potapani u medijum za ekvilibrisanje (50 mM Mes-Tris (pH 5.5), 1 mM EDTA, 5 mM askorbinska kiselina, 5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$ i 200 mM manitol) tokom 30 min. Nakon ekvilibrisanja 5 g lisnih isečaka je prebačeno u Petri šolju sa 20 ml inkubacionog pufera koji je sadržavao pufer za ekvilibrisanje i 200 μ M SA. Kao kontrola korišćeni su ekvilibrisani listovi iste težine inkubirani u istom puferu koji je umesto SA sadržavao destilovanu vodu. Petri šolje su blago mućkane na 25°C i odvojeno je po 1 g listova iz SA incubacionog pufera, kao i iz kontrolnog pufera nakon 1, 3 i 5 časova, zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80°C za izolovanje RNK.

Nakon tretmana, sa ovih biljaka sakupljeni su listovi u već naznačenim fazama, zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80°C za izolovanje RNK.

3.2. Procedure za gajenje i transformaciju bakterija

3.2.1. Medijumi za gajenje bakterija

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).

Bogati medijum sa glukozom

Za 1 l: 10 g triptona, 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl, 2 g glukoze

SOC

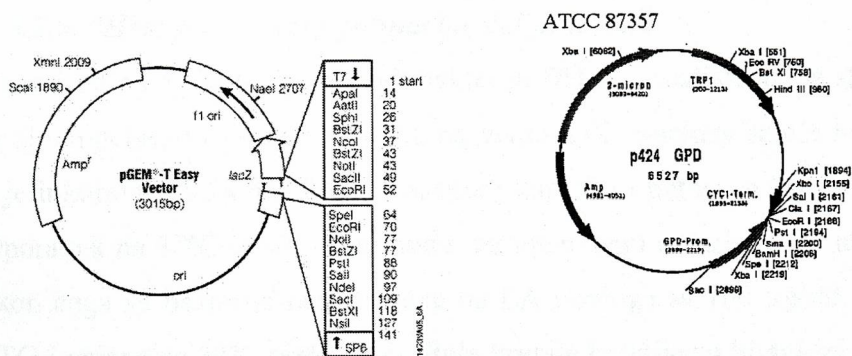
2% (w/v) tripton; 0,5% (w/v) ekstrakt kvasca; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glukoza (Hanahan 1983).

Čvrsti medijumi su pravljeni dodavanjem 1,5% w/v agara, IPTG u finalnoj koncentraciji 1 µg/ml i X-gal u finalnoj koncentraciji 40 µg/ml u LB medijum. Na ovakvim podlogama je moguća selekcija rekombinantnih bakterijskih sojeva plavo/belom selekcijom (α-komplementacija) (Sambrook et al., 1989). U LB medijum za uzgajanje *E. coli* dodavan je antibiotik ampicilin u koncentraciji 100 µg/mL.

3.2.2. Bakterije i plazmidi

Korišćen je soj DH5α *E. coli* bakterija (F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-).

Plazmid korišćen u eksperimentima za kloniranje PCR produkata pri sintezi cDNK bio je pGEM-T Easy vektor (Promega). Ovaj vektor kao selektivni marker poseduju gen rezistenciju na ampicilin. Za transformaciju kvasaca korišćen je p424 vektor, koji je takozvani "shuttle vector", tako da se može propagirati i u ćelijama kvasaca i *E. coli*. Posедуje Amp rezistenciju, gen za sinezu triptofana, GPD promotor i CYC1 terminator kvasca. Za potrebe kloniranja inserta iz pGEM u p424 plazmid korišćen je prelazni pGEX vektor. Shematski prikazi korišćenih vektora se nalaze na **Slici 1**.



Slika 1 Shematski prikaz plazmidnih vektora korišćenih u ovom radu

3.2.3. Uzgajanje i održavanje bakterija

Kulture transformanata *E. coli* DH5a za potrebe kloniranja su uzgajane preko noći na 37°C na čvrstom ili tečnom LB medijumu uz dodatak ampicilina. Petri šolje sa bakterijama su čuvane na +4°C i obnavljane na četiri do šest nedelja, a za dugoročnu upotrebu kulture bakterija su zamrzavane na -80°C u 15% (v/v) glicerolu. U čvrst medijum dodavan je X-Gal u koncentraciji 80 µg/ml i 0.5 mM IPTG kako bi se obezbedila plavo-bela selekcija bakterijskih kolonija.

3.2.4. 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 $OD_{600}=0,3-0,4$. 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 $CaCl_2$ 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 $CaCl_2$, 15% glicerol, pH 6,8) i inkubirane na ledu 15 min, nakon čega su razdeljene u alikvote od po 50 µl. Ovako pripremljene ćelije su brzo smrznute u tečnom azotu i čuvane najmanje 6 meseci na -70°C.

3.2.5. "Heat shock" transformacija ćelija *E. coli*

Alikvoti od po 50 μ l kompetentnih bakterija DH5 α , skladištenih na -80°C, su otopljeni na sobnoj temperaturi i inkubirani sa 50 ng vektora ili ligacione smeše na ledu 30 min-1h. 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, nakon čega su bakterije razmazivane na LA podloge sa 100 μ g/ml ampicilinom i X-Gal/IPTG i gajene na 37°C preko noći. Bele krupne kolinije su birane za proveru prisustva rekombinantnog plazmida.

3.3. Procedure za gajenje i transformaciju kvasaca

3.3.1. Medijumi za gajenje kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*

SC Drop Out Medium (Trp⁻, Ura⁻), selektivni medijum bez triptofana i uracila

Yeast Nitrogene Base (bez dodatih aminokiselina kao izvora azota) 6.7g/l; L-glukoza 20g/l; aminokiseline: L-His, L-Arg, L-Met (20mg/l); adenin sulfat 20mg/l, L-Ile, L-Tyr, L-Lys-Hcl (30mg/l); L-Phe (50mg/l); L-Leu (60mg/l)L-Glu, L-Asp (100mg/l)L-Val (150mg/l), L-Thr, (200mg/l); L-Ser (400mg/l); voda do zapremine 1l. Za pravljenje čvrstih podloga se dodavalo je 20g agara. Podloge su sterilisane autoklaviranjem 121°C/15 min.

YPD (bogat, neselektivni medijum)

Ekstrakt kvasca 10 g/l, pepton 20g/l, podesiti pH do 5.8 sa oko 50 μ l 12 N HCl i dH₂O 1 l. Medijum je autoklaviran 121°/30 min, ohlađen do 65°C i potom mu je dodato 50ml 40% sterilnog rastvora L- glukoze. Za čvrst YPD dodavano je 20g/l agara pre sterilizacije.

3.3.2. Priprema kompetentnih ćelija kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* za transformaciju

S.c. EasyCompTM Transformation Kit je korišćen za produkciju kompetentnih ćelija kvasaca i njihovu transformaciju odgovarajućim vektorom. Efikasnost transformacije kod upotrebe ovog kita je obično veća od 1000 transformanata po μg plazmidne DNK koja se koristi za transformaciju. Pre transformacije ćelijske zidove kvasaca je potrebno učiniti propustljivim za prolazak strane DNK. 10 ml YPD medijuma za gajenje kvasaca inokuliran je jednom kolonijom *S. cerevisiae* i inkubirano preko noći na 28-30 °C uz mešanje na rotirajućoj platformi pri brzini 250-300rpm. Rast prekonoćne kulture prekinut je kada je OD₆₀₀ imao vrednost između 3.0 i 5.0. Ćelije su razblažene do OD₆₀₀ 0.2-0.4 u ukupnoj zapremini od 10 ml YPD. Zatim su ćelije gajene još 3 do 6h do OD₆₀₀ 0.6-1.0, i istaložene centrifugiranjem na 500 x g u trajanju od 5 min na sobnoj temperaturi. Po centrifugiranju tečna faza je odtranjena i na talog dodato 10 ml Solution I. Ponovljeno je centrifugiranje pri istim uslovima. Zatim je tako dobijen talog rastvoren u 1 ml Solution II. Ćelije u alikvotima (50-200 μl) su zamrzavane postepeno u skrew-cap mikrotubama u stiroporskim kutijama. Čuvane su na -80°C.

3.3.3. Transformacija kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*

Alikvot (50 μl) kompetentnih ćelija kvasaca je otopljen na sobnoj temperaturi i u njega je dodato 1 μg vektora rastvorenog u najviše 5 μl vode. U smešu vektor- kvasac dodato je 500 μl Solution III i promešano "lupkanjem" mikrotube. Smeša je inkubirana na 30 °C/ 1 h, uz mešanje "lupkanjem" na svakih 15 minuta, nakon čega je po 100 μl utrljano sterilnim staklenim štapićem u čvrste selektivne SC D-out podloge. Petri šolje su držane 2-4 dana na 30 °C.

3.4. Osnovne procedure rada sa DNK

3.4.1. 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.

Plazmidi su direktno iz kolonija izolovani tako što su pojedinačne kolonije prenošene u ependorf epruvete u kojima se nalazilo 25 μ l 10 mM EDTA, pH 8,0. Dodavano je 25 μ l litičkog pufera (200 mM NaOH; 0,5% SDS; 20% saharoza). Smeša je resuspendovana snažnim mućkanjem i inkubirana 10 min na 70°C. Posle hlađenja do sobne temperature, smeši je dodavan 1,5 μ l 4 M KCl i inkubirana je 5 min na ledu. Nakon centrifugiranja (3 min na 13000 obr/min na 4°C), supernatanti koji su sadržavali izolovane plazmide, analizirani su elektroforetski.

Plazmidi su iz tečne kulture izolovani po brznoj proceduri na sledeći način: 1,5 ml prekonoćne bakterijske kulture je kratko centrifugiran u mikrocentrifugi, a talog resuspendovan u 300 μ l 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 μ l 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 μ l bidestilovane vode.

Za preparativne svrhe korišćen je QiaMini Prep Kit (Qiagen), po uputstvu proizvođača. 1,5 ml prekonoćne kulture je kratko centrifugiran u mikrocentrifugi i bakterijski talog je resuspendovan u 250 μ l pufera P1 koji obezbeđuje alkalne uslove za liziranje bakterija. Nakon dodavanja 250 μ l pufera P2 i 350 μ l 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. 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 koji bi inhibirali enzimske reakcije na prečišćenim plazmidima. DNK je eluirana sa kolonica sa 50 μ l vode. Ovako prečišćeni plazmidi su korišćeni za sekvenciranje.

3.4.2. 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 μ g/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).

3.4.3. 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 od SeaKem GTG agaroze (FMC BioProducts), koja ne inhibira enzimske reakcije. Nakon elektroforeze, fragmenti DNK od interesa su isecani i inkubirani u 3 zapremine QX1 pufera u odnosu na zapreminu gela (100 mg u 300 μ l), a zatim je smeši dodavano 10 μ l 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 μ l 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 μ l 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 enzimске reakcije. Talog je sušen na vazduhu sve dok nije postao bele boje, a zatim je rastvaran u 20 μ l 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.

3.4.4. Digestija DNK restrikcionim enzimima

Digestija DNK restrikcionim enzimima je vršena komercijalnim preparatima enzima i pufera po uputstvu proizvođača. Digestija plazmida radi izbacivanja inserta trajala je 3 do 4 sata, a parcijalna digestija genomske DNK je trajala 5 sati. Koncentracija korišćenih restrikcionih enzima je varirala, uobičajeno je bila za plazmide oko 5 U/ μ g DNK, osim za genomsku DNK gde je korišćeno 10 U/ μ g DNK, ali je vođeno računa da finalna koncentracija glicerola u reakcionoj smeši ne bude preko 10%. Digestije su inkubirane na temperaturi preporučenoj od strane proizvođača (za većinu enzima 37°C) i po isteku vremena su prekidane inkubacijom na 65°C.

3.4.5. Ligacija DNK sa Marathon adapterima

Za svrhu ligacije cDNK sa Marathon cDNK adapterima (Clontech) 1 μ g ukupne RNK je ligirano sa 20 pmola adaptera ($\approx$ 200 puta molarni višak) u 50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 1 mM ATP i 5% (w/v) polietilen glikolu, pomoću 1 U T4 DNK ligaze (Promega), u zapremini od 10 μ l. Reakcija je ostavljena preko noći na 16°C, posle čega je inkubirana 5 min na 70°C u cilju inaktivacije ligaze. Tako dobijena cDNK je taložena etanolom, rastvarana u vodi, puštana na 1% agarozni gel, sa koga je eluirana radi oslobađanja od neligiranih adaptera. Ovako prečišćena DNK je korišćena za umnožavanje u Marathon PCR reakciji.

3.4.6. Ligacija DNK sa plazmidnim vektorima

Ligacija cDNK je vršena sa 50 ng pGEM-T Easy plazmidnim vektorom i 3 puta molarnim viškom inserta u prisustvu 3 U T4 DNK ligaze u 1X Rapid Ligation puferu, preko noći na 4°C. Ligacija je inaktivirana zagrevanjem smeše na 65°C i DNK istaložena etanolom kao što je opisano u Odeljku 3.3.8. Sve komponente potrebne za ligaciju su iz pGEM-T Easy Vector Systems kita (Promega). Kvasci su transformisani p424 vektorom koji je sadržavao kodirajući region *FeMT3* cDNK ubačenu u polilinker mesto na pozicijama sečenja BamHI/SmaI restrikcioni endonukleaza. P424 je takozvani “shuttle vector”, tako da se može propagirati i u ćelijama kvasaca i *E. coli*. Da bi se obezbedili BamHI/SmaI “lepljivi” krajevi *FeMT3* cDNK je umožena PCR reakcijom uz upotrebu prajmera p424/pGEX2 (Tabela 1.) koji u sekvenci sadrže mesta prepoznavanja navedenih endonukleaza. Dobijeni umnošci ligirani su u pGEM-T Easy plazmid koji je zatim sečen setom nukleaza BamHI/SmaI u Tango Yalow Universal Buffer (Fermentas) 4 h. Produkt sečenja eluiran je na gelu i ligiran u p424, (obrađen BamHI/SmaI restrikcionim enzimima), uz upotrebu 5U T4 ligaze (Fermentas) i odgovarajućeg pufera.

3.4.7. Taloženje DNK etanolom

Taloženje DNK je vršeno dodavanjem 1/10 volumena 3 M Na-acetata i 2,5 volumena hladnog 99% etanola. Nakon prekonozne 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.

3.4.8. Metoda po Southern-u (Neradioaktivno obeležavanje probe metodom dopunjavanja DNK (oligo labelling))

DNK proba za hibridizaciju po Southern-u je predstavljala insert klona *pBM290* tj. cDNK za metalotionein tipa 3 heljde. Sve probe su pre obeležavanja prečišćene na agaroznom gelu. Obeležavanje je vršeno uz pomoć kita BioPrime DNA Labeling System

(Gibco BRL), po uputstvu proizvođača. 100 ng DNK rastvarano je u 20 μ l vode i na ledu je dodavano 20 μ l smeše prajmera. Nakon denaturacije na 100°C 5 min, na ledu je dodavano 5 μ l smeše nukleotida (koja sadrži i biotinom obeleženi dCTP), 4 μ l vode i 1 μ l Klenovljevog enzima. Nakon mešanja, reakciona smeša je inkubirana 1 h na 37°C i prekidana dodavanjem 5 μ l stop pufera. Reakciona smeša je zatim dva puta taložena etanolom, rastvarana i pre dodavanja u pufer za hibridizaciju proba je denaturisana kuvanjem u ključalom vodenom kupatilu 5 minuta.

3.4.8.1. Prenos DNK sa gela na membranu

Po završenoj elektroforezi DNK u agaroznim gelovima sa 0,5 μ g/ml etidijum bromidom, DNK je analizirana metodom po Southern-u. Isecana je ivica gela koja sadrži elektroforetski razdvojen standard dužina DNK, i fotografisana sa prislonjenim fluorescentnim lenjirom. Ostatak gela je potapan u rastvor za depurinaciju (0,25 M HCl) 10 min, kratko ispiran u destilovanoj vodi, prenošen u rastvor za denaturaciju (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) i blago mućkan 30 min, pa inkubiran u rastvoru za neutralizaciju (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl, pH 7,2; 0,001 M EDTA, pH 8,0) 2 puta po 15 min na sobnoj temperaturi uz lagano mućkanje. Tokom depurinacije i denaturacije gela membrana Biotodyne A (Gibco BRL) i 5 listova Whatman 3MM hromatografskog papira je isecano na dimenzije gela i potapano u rastvor za transfer DNK (10X SSC pufer – 3 M NaCl; 0,3 M Na₃-citrata). Isecana je i potapana i traka 3 MM papira tako da je širina trake odgovarala širini gela, dok je dužina bila nekoliko puta veća od dužine gela. Isecani su i papirni ubrusi dimenzije gela, naslagani na gomilu visine oko 10 cm. Nakon završene neutralizacije, gel je takođe potapan u rastvor za transfer. Na podlogu dimenzije gela, potopljen u rastvor za transfer slagano je redom: duža traka 3 MM papira (tako da su krajevi potopljene u rastvor za transfer), 2 trake 3 MM papira dimenzije gela, gel, membrana, 3 trake 3 MM papira dimenzije gela, papirni ubrusi. Prilikom slaganja treba voditi računa da se ne stvore mehuri vazduha koji bi sprečili transfer DNK, a ukoliko do toga dođe treba ih pažljivo odstraniti kotrljanjem staklenog štapića. Nakon slaganja, preko papirnih ubrusa stavljan je teret sa ravnomerno raspoređenom težinom preko čitavog gela i kapilarni transfer je vršen preko noći. Po završenom transferu, DNK na membrani je fiksirana pečenjem u vakuum pećnici

na 80°C u trajanju od dva sata. Membrana je ili odmah korišćena za hibridizaciju ili zatvarana u plastičnu kesu i ostavljena na 4°C do upotrebe.

3.4.8.2. Hibridizacija i detekcija neradioaktivnih hibridizacionih signala

DNK preneti na najlonsku membranu je hibridizovana sa obeleženom DNK probom. Čitav postupak hibridizacije se sastojao od tri faze: prehibridizacije i denaturacije probe, hibridizacije i posthibridizacionih pranja. Prehibridizacija je vršena u puferu za hibridizaciju (5xSSC; 0,1% N-laurilsarkozin; 0,02% SDS; 1% kazein) 1 sat na 65°C, nakon čega je ovaj pufer odlivan i dodavan svež hibridizacioni pufer koji je sadržavao denaturisanu neradioaktivno obeleženu probu (Odeljak 3.6.1.). Hibridizacija je trajala preko noći na 65°C uz blago mućkanje, posle čega je membrana podvrgnuta seriji pranja: 2 puta po 3 min na sobnoj temperaturi u rastvoru 1 (2xSSC; 0,1% SDS); 2 puta po 3 min na sobnoj temperaturi u rastvoru 2 (0,2xSSC; 0,1% SDS); 2 puta po 15 min na 60°C u rastvoru 3 (0,16xSSC; 0,1% SDS) i konačno kratko u 2xSSC (Sambrook *et al.*, 1989). Detekcija hibridizacionog signala je vršena uz pomoć BluGene Nonradioactive Nucleic Acid Detection System (Gibco BRL) po uputstvu proizvođača. Membrana je prvo kratko ispirana u puferu 1 (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl), a zatim inkubirana u rastvoru za blokiranje (3% BSA u puferu 1) 1 sat na 65°C i rastvoru za vezivanje (1 µg/ml konjugata streptavidin-alkalna fosfataza u puferu 1) 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon ove inkubacije, membrana je ispirana 2 puta po 15 min na sobnoj temperaturi u puferu 1 i 10 min u puferu 3 (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂). Membrana je zatim zatapana u plastičnu kesu sa dodatkom supstrata za alkalnu fosfatazu (44 µl NBT - nitroblue tetrazolium (75 mg/ml); 33 µl BCIP - 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat (50 mg/ml) u 10 ml pufera 3) i stavljana u mrak dok se ne postigne željeni intenzitet signala. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 20 mM Tris, pH 7,5; 0,5 mM EDTA, a zatim je membrana sušena, zatapana u plastičnu kesu i fotografisana.

3.4.9. Sekvenciranje DNK

Sekvenciranje DNK je rađeno na kapilarnom sekvenceru ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems) na Univerzitetu u Padovi, Italija (<http://www.bmr-genomics.it>).

3.4.10. Kompjuterska analiza sekvenci

Za poređenje sekvenci sa sekvencama iz GenBank baze podataka korišćen je BLAST search program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Konstrukcija filogenetskog stabla je obavljena upotrebom programskog paketa PHYLIP. Analiza sekundarne strukture proteina sekvence je rađena u okviru programskog paketa ExPASy (<http://www.expasy.org>) program PSIPRED . (<http://bioinf4.cs.ucl.ac.uk:3000/psipred>). Za denzitometrijska određivanja količine DNK korišćen je program ("NIH Image za Macintosh", Wane Rasband, National institutes of Health, USA, modifikovanog za Windows, Scion Corporation, 1997)

3.5. Reakcija lančanog umnožavanja segmenata DNK (PCR)

3.5.1. Umnožavanje fragmenata DNK

Umnožavanje fragmenata DNK vršeno je u 0,5 ml epruvetama tako što su pomešani matrica DNK, 0,2 mM dNTP smeša, 0,2 μ M prajmeri i pufer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 0,1% Triton X-100; 2,5 mM MgCl₂). Reakcije PCR (*od engl. Polymerase Chain Reaction*) su rađene u 25-50 μ L reakcionim smešama sa 10-20 ng matrice i 2,5 U enzima Taq polimeraze (Promega). Profil reakcije zavisio je od konkretne aplikacije, ali se sastojao od inicijalne denaturacije, za kojom je sledio odgovarajući broj ciklusa denaturacije, vezivanja prajmera i ekstenzije, i finalne produžene ekstenzije. Nazivi i sekvence korišćenih prajmera, kao i profili PCR reakcija i svrha upotrebe prikazani su tabelarno (**Tabela 1**), dok su PCR profili i svrha korišćenja pojedinačnih parova prajmera prikazani u **Tabeli 2**.

naziv	sekvenca prajmera (3'-5')	naziv	sekvenca prajmera (3'-5')
IS1	gcaaaatcactcttacttctca	5'CDS	ttctagaattcagcgggccgc(t) ₃₀ -N ₁ N (N ₁ -G, A or C, N is G, A, C or T
IS2	attgcacttgccatcgctc	AP2	actcactatagggctcgagcggc
MT10f	ggggctcgtgtgaaactaatgataggtc	p424	cgcggatccgcgtatgtcgtc
MT10r	gaacatacacagagaagggggaagg	pGEX2	ataccggggtcaatggcaac
MT150f	gacatcggtgagaccgacaactttg	H3f	gaaattcgcaagtaccagaagag
MT150r	tgtccacatagttgaataaaggttgactg	H3r	ccaacaaggtatgcctcagc
26Sf	atteccaaacaacccgactc	26Sr	gccgtccgaattgtagtctg

Tabela 1. Spisak i sekvence prajmera korišćenih u ovom radu

Korišćeni prajmeri	PCR profil	Upotreba	Matrica
p424/pGEX2	95°C/5min (95°C/5min, 58°C/30s, 72/30s)26x 72°C/10min	Uvođenje BamHI/SmaI restrikcionih mesta u insert	pFeMT3.10
IS1/IS2	95°C/5min (95°C/5min, 59°C/30s, 68°C/1min)28x 72°C/10min	Priprema probe za Southern hibridizaciju	pBM290
IS1/5'CDS	95°C/5min (95°C/5min, 59°C/30s, 68°C/1min)28x 72°C/10min	Sinteza drugog lanca cDNK	cDNK
MT10f/MT10r H3f/H3r 26Sf/26Sr	95°C/5min (95°C/5min, 60°C/30s, 68°C/1min)26x 72°C/10min	Sinteza drugog lanca cDNK	cDNK

Tabela 2. Spisak parova prajmera i PCR programa korišćenih u ovom radu

3.5.2. 5' RACE (*Rapid Amplification of cDNA ends*)

Ova metoda predstavlja modifikaciju metode opisane od strane Chenchik *et al.*, 1995. i prvenstveno je korišćena za umnožavanje krajeva cDNK. Drugi prajmer u reakciji PCR nije specifičan, već je komplementaran delu sekvence Marathon adaptera. Adapteri su parcijalno dvolančani oligonukleotidi, koji prelaze u dvolančane nakon što polimerizacija koja otpočne sa gen- specifičnog prajmera popuni jednolančani region adaptera i na taj način napravi mesto za vezivanje adapterskog prajmera. Upotrebom ovakvog sistema postiže se povećanje specifičnosti PCR reakcije. Reakcija zapremine 50 μ l je sadržavala 100 ng matrice cDNK sa ligiranim adapterom, 10 pmol gen-specifičnog prajmera IS1 (**Tabela 1**), 10 pmol Marathon adapter cDNA synthesis prajmera, 0,2 mM dNTP smešu, 40 mM Tricin-KOH, 15 mM KOAc, 3,5 mM Mg(OAc)₂, 3,75 μ g/ml BSA, 0,005% Tween-20, 0,005% Nonidet-P40 i 1X smešu Advantage2 polimeraze (Clontech). Ova smeša sadrži AdvanTaq polimerazu, malu količinu enzima sa editorskom funkcijom (3'-5' egzonukleaza) koja smanjuje učestalost ugradnje pogrešnog nukleotida i TaqStart antitelo koje obezbeđuje automatski hot start i time povećava efikasnost i specifičnost PCR amplifikacije. Na isti način dobijene su cDNK sekvence koje potencijalno kodiraju *FeMT3* gen. Profil Marathon PCR umnožavanja ("touch down" PCR) bio je: inkubacija 3 min na 94°C, 5 ciklusa inkubacije 30 s na 94°C i 4 min na 72°C, 5 ciklusa inkubacije 30 s na 94°C i 4 min na 70°C, 20 ciklusa inkubacije 30 s na 94°C i 4 min na 68°C. Po završenoj reakciji 10 μ l proizvoda razdvajano je na gelu od agaroze. Ovakav profil PCR reakcije omogućava obogaćivanje smeše specifičnom matricom u toku prvih pet ciklusa, kada se aniling odigrava na povišenoj temperaturi koja ne dozvoljava vezivanje za nespecifičnu matricu. Obzirom da primarni PCR ni u jednom slučaju nije davao jasno razdvojenu traku ili trake od interesa, pristupalo se sekundarnom PCR umnožavanju pomoću "nested" Marathon adapter AP2 prajmera i IS1 prajmera (**Tabela 1**). 1 μ l 10 puta razblažene smeše primarnog PCR predstavljalo je matricu za sekundarni PCR, a umnožavanje je vršeno po sledećem profilu: inkubacija 3 min na 94°C i 25 ciklusa inkubacije na 30 s na 94°C i 4 min na 68°C i završna ekstenzija 10 min na 72°C. Dobijeni proizvodi sekundarne PCR reakcije analizirani su na gelu od agaroze.

3.5.3. Real-time PCR

Uzorci cDNA dobijeni kao što je opisano u Odeljku 3.5.4. su rastvoreni u odnosu 1:20 u „nuclease-free” vodi. Isti alikvoti cDNK uzoraka su korišćeni za Real-time PCR sa prajmerima dizajniranim i za *FeMT3* (MT10r/MT10f i MT150r/MT150f) i za histon 3 (H3f/H3r) koji je predstavljao referentni gen (**Tabela 1**). Reakcije su izvođene u zapremini od 25 μ l i sadržavale su 500 nM svakog od prajmera i 1x SYBER Green PCR master mix (Applied Biosystems). 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 predstavljeni su kao 2^{-dCt} , gde je dCt razlika između Ct vrednosti *FeMT3* i referentnog gena.

3.6. Osnovne procedure rada sa RNK

3.6.1. Izolovanje ukupne RNK (Taylor & Powell, 1982)

Za izolovanje ukupne RNK iz biljnih tkiva korišćena je metoda koju su opisali Taylor i Powell, 1982 i ovako dobijena RNK upotrebljavana je za sintezu cDNK. Ukupna RNK izolovana je iz 0,5-5 g tkiva heljde. Da bi se inaktivirala RNaza, svi rastvori su pre upotrebe sterilisani 40 min, pod pritiskom od 2 bara, a stakleni i keramički sudovi pečenjem na 180°C preko noći. Plastični sudovi i epruvete od polipropilena sterilisani su potapanjem u 3% H₂O₂ 30 min.

Tkivo je zamrzavano u tečnom azotu i mleveno u fini prah. Dodavana su tri volumena ključalog ekstrakcionog pufera (2% CTAB; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM

EDTA; 1,4 M NaCl; 2% β -merkaptetanol) i smeša je ostavljena u vodenom kupatilu na 55°C dok temperatura ekstrakcione smeše ne dostigne datu temperaturu. Zatim je dodavan isti volumen smeše SEVAG i vršeno je blago mućkanje da bi se izmešale organska i vodena faza. Centrifugirano je 10 min na 9000 obr/min u SS34 rotoru na sobnoj temperaturi. U vodenu fazu je dodavano 1/10 volumena 10% CTAB i ponavljana je ekstrakcija smešom SEVAG. Nakon centrifugiranja ponovo je odvajana vodena faza iz koje su nukleinske kiseline taložene dodavanjem oko 1-2 volumena precipitacionog pufera (1% CTAB; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 1% β -merkaptetanol). Dodavanje precipitacionog pufera vršeno je lagano, sve dok vodena faza ne postane mutna, nakon čega je inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi. Precipitaciona smeša je centrifugirana 5 min na 9000 obr/min u SS34 rotoru. Talog je rastvaran u 3 ml 1 M CsCl, i ovaj rastvor je naslojavan na 2 ml 5,7 M CsCl u polipropilenskim epruvetama za SW 50.1 rotor, nakon čega je vršeno centrifugiranje 20 sati na 35000 obr/min pri temperaturi od 20°C. Tokom centrifugiranja RNK pada kao talog na dno epruvete.

Prečišćavanje RNK od CsCl rađeno je po protokolu iz laboratorijskog priručnika Sambrook *et al.*, 1989. Talog RNK ispiran je u 70% etanolu i sušen na sobnoj temperaturi, a zatim rastvaran u 100 μ l TE pufera, pH 7,6 (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA) koji sadrži 0,1% SDS. Zatim je dodavano 200 μ l TE pufera, pH 7,6 i precipitirano sa 1/10 volumena CH₃COONa, pH 5,2 i tri volumena hladnog 96% etanola, 30 min na ledu. Smeša je centrifugirana 15 min pri 12000 g, talog je ispiran 70% etanolom i sušen na sobnoj temperaturi. RNK je rastvarana u vodi, a koncentracija je određivana spektrofotometrijski, merenjem apsorbancije na 260 nm, pri čemu jedna optička jedinica odgovara koncentraciji RNK od 40 μ g/ml. Prinos RNK po gramu tkiva iznosio je 100-300 μ g za semena različitih faza sazrevanja i oko 100 μ g za list. Kvalitet izolovane RNK proveravan je elektroforezom na denaturišućem gelu od agaroze. RNK je čuvana na -70°C.

3.6.2. Izolovanje ukupne RNK modifikovanom CTAB mini prep metodom (Doyle and Doyle, 1987)

Po ovoj metodi, 0,5-1 g tkiva je zamrzavano u tečnom azotu i mleveno u fini prah. Tri volumena preinkubiranog CTAB pufera (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA, pH 8,0; 100 mM TRIS, pH 8,0; 2% PVP-40; 10 μ l/ml β -merkaptotanol) na 65°C je dodavano u samleveni materijal i smeša inkubirana 5-10 min na 65°C uz povremeno mešanje. Prečišćavanje nukleinskih kiselina je vršeno dodavanjem 1 volumena smeše SEVAG-a (hloroform:izoamilakohol u odnosu 1:1). Smeša je dobro mućkana da se izmešaju vodena i organska faza i zatim centrifugirana 10 min na 9000 obr/min u SS34 rotoru u Sorval centrifugi. Vodena faza koja sadrži nukleinske kiseline je prenošena u novu epruvetu i ponovo je ekstrahovana smešom SEVAG u odnosu 1:1. DNK i RNK iz vodene faze su taložene hladnim izopropil alkoholom na ledu 30 min i ispirane 70% etanolom. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi talog je rastvaran u odgovarajućoj zapremini vode u zavisnosti od veličine taloga (od 50 do 200 μ l). Taloženje ukupne RNK vršeno je sa 2 M LiCl na -80°C, 1 sat. Nakon centrifugiranja na 13400 obr/min. Dobijeni talog rastvaran je u RLT puferu iz QIA RNeasy kita i dalje je prečišćavanje vršeno po uputstvu proizvođača. RNK je rastvarana u vodi i koncentracija određivana spektrofotometrijski, merenjem absorbancije na 260 nm. Ova modifikovana metoda, iako nije davala veliki prinos iRNK, bila je brža te je primenjivana za dobijanje RNK koja je prevođena u cDNK u cilju praćenja ekspresije *FeMT3* gena u različitim uslovima metodom RT PCR. Uklanjanje DNK iz RNK izolata vršena je pomoću DNA-free DNase Treatment and Removal kit (Ambion), prema uputstvu proizvođača. U ~45 μ l izolovane RNK, dodavano je 5 μ l 10X DNase I pufera i 1 μ l DNase I i smeša je inkubirana na 37°C 30 min. DNaza I je inaktivirana inkubiranjem sa 5 μ l Dnase Inactivation reagensa na sobnoj temperaturi 2 min. Nakon centrifugiranja na 10000 g 90 s, supernatant sa prečišćenom RNK je prebacivan u čistu tubu.

3.6.3. 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% agaroz, 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.

3.6.4. Izolovanje poli(A) RNK

Poli(A)RNK je izolovana iz ukupne RNK uz pomoć komercijalnog kita Straight A's mRNA Isolation System (Invitrogen), po uputstvu proizvođača. Izolovanje je vršeno iz 100 µg ukupne RNK, rastvorene u koncentraciji 1 mg/ml. Metoda se sastoji u vezivanju iRNK preko poliA kraja za Magnetight™ Oligo (dT) kuglice koje sadrže oligo(dT). Ostali tipovi RNK ostaju u rastvoru i odbacuju se. Procedura se sastoji od niza pranja u različitim puferima: Lysis, Washing buffer, koji obezbeđuju lizu i odstranjivanje svega što se ne vezuje specifično za kuglice. Sastav ovih pufera je nepoznat i zaštićen patentom od strane proizvođača. Elucija iRNK sa kuglica se vrši u bidestilovanoj vodi inkubiranjem na temperaturi od 50-70°C, 2 min. Ovako dobijena iRNK se precipitira izopropanolom u prisustvu 0,3 M natrijum acetata, ispira 70% etanolom i rastvara u vodi. Do upotrebe se čuva na -70°C.

3.6.5. Sinteza cDNK

Za sintezu prvog lanca korišćen je 1 μ g poli(A)RNK. Sinteza je izvršena korišćenjem reverzne transkriptaze M-MuLV (BioLabs) i odgovarajućeg pufera preporučenog od strane istog proizvođača, u reakcionoj zapremini od 10 μ l. 1 μ g poli(A)RNK inkubiran je sa 10 μ M „cDNA synthesis“ prajmerom (5'-TTCTAGAATTCAGCGGCCGC(T)30-N-1N-3' gde je N-1= G, A ili C, a N= G, A, C ili T) (Clontech) ili „random hexamer“ prajmera (Applied Biosystem), 2 min na 70°C u finalnoj zapremini od 5 μ l. Smeša je zatim prebacivana na led 2 min i potom kratko centrifugirana. Dodat je 10X M-MuVL pufer pH 8,3 (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ 50 mM ditiotritol) (Biolabs), 10 mM dNTP smeša i 200 U M-MuLV reverzne transkriptaze (Biolabs). Reakcija je tekla 1h na temperaturi od 37°C, a potom je zaustavljena inkubiranjem na ledu 5 min.

Drugi lanac cDNK, nakon reakcije reverzne transkripcije, sintetisan je modifikovanom metodom po Chenchik *et al.*, 1995, na sledeći način: u 10 μ l ukupne reakcione smeše, koja sadrži hibridne RNK/DNK molekule, dodato je 24 U *E.coli* DNA polimeraze I; 4.8 U T4 ligaze i 1 U RNazeH; 8 μ l 10 X Second Strand Synthesis Buffer (Promega); 1,6 μ l 10mM dNTP mix. Zapremina je podešena do finalnih 80 μ l ddH₂O, i reakciona smeša je inkubirana na 16°C 90 min. Inkubacija na istoj temperaturi je nastavljena još 45 min pošto je dodato 10 U T4 DNA polimeraze. U cilju prečišćavanja cDNK od enzima, DNK je ekstrahovana dodavanjem 1 volumena smeše fenol:SEVAG u odnosu 1:1, dobro promešana i centrifugirana 10 min na 13000 obr/min u mikrocetrifiugi. Vodena faza koja sadrži DNK je prenošena u novu epruvetu i ponovo je ekstrahovana smešom SEVAG u odnosu 1:1. DNK iz vodene faze je taložena etanolom uz upotrebu 2M CH₃COONH₄. cDNK je rastvorena u 10 μ l ddH₂O.

3.7. In situ RNK-RNK hibridizacija

3.7.1. Fiksiranje i dehidratacija tkiva

Različita tkiva heljde su sakupljana i smesta potapana u rastvor za fiksiranje (4% paraformaldehid; 4% DMSO u 1xPBS puferu) koji je predhodno preinkubiran na ledu. Fiksacija je vršena uz primenu vakuuma od 10^3 Pa u eksikatoru sve do pojave mehurića, nakon čega je vakuum održavan konstantnim dodatnih 15 min. Postupak je ponavljan sve dok tkiva heljde nisu počinjala da tonu u rastvor fiksativa. Fiksativ je zamenjen i uzorci su blago mučkani preko noći na 4° C. Nakon fiksacije tkiva su ispirana dva puta po 30 min na 4° C u PBS. Dehidratacija tkiva vršena je blagim mućkanjem na ledu u 30% etanolu 60 min, a potom na sobnoj temperaturi u 50% etanolu 60 min, 70% etanolu 60 min, 85% etanolu 60 min i 95% etanolu sa 0,1% eozinom preko noći. Usledile su četiri izmene 100% etanola u kome su tkiva blago mućkana dva puta po 30 min i dva puta po 60 min. Nakon toga tkiva su blago mućkana u rastvorima "histoclear"-a u etanolu čija koncentracija je sukcesivno rasla: 25% "histoclear", 75% etanol, 90 min; 50% "histoclear", 50% etanol, 90 min; 75% "histoclear", 25% etanol, 90 min; dva puta 100% "histoclear" 90 min i finalno 100% "histoclear" + 1/4 volumena "histovax" ljuspica preko noći.

3.7.2. Kalupljenje tkiva

Vosak za kalupljenje "Histovax" (Histolab Products) je potpuno otopljen na 42° C i dodata mu je 1/4 rastvarača "Histoclear" (Histolab Products). Tkiva su inkubirana u ovoj smeši nekoliko sati na 55° C, a zatim je smeša zamenjena sveže otopljenim voskom i usledila je inkubacija preko noći na 55° C. Tokom naredna tri dana vršene su po dve izmene svežim voskom, a zatim su tkiva zajedno sa voskom smeštena u modle i dalje čuvana na +4° C.

3.7.3. Sečenje mikrotomom i priprema mikroskopskih pločica

Za pravljenje preseka tkiva heljde debljine 8 μ m korišćen je mikrotom (Leica). Mikroskopske pločice ProbeOn Plus (Fisher Biotechnology) su zagrevane na +42° C i na njih je nakapavano po nekoliko kapljica DEPC vode. Tanke tračice isečenog tkiva stavljane su na kapljice vode tako da plutaju, a potom su pločice inkubirane na +42° C. Inkubacija je trajala nekoliko minuta, sve dok voda nije isparila i preseki tkiva bili zalepljeni za površinu pločica. Pločice sa presecima čuvane su do 3 nedelje na +4° C.

3.7.4. Priprema RNK probe-in vitro transkripcija

Konstruisan je plasmid pFeMT3 tako što je kompletna FeMT3 cDNK umnožena prajmerima ISH1/ISH2 (**Tabela 1. i 2.**) i uklonirana u pGEM-T Easy vektor. Plazmid je linearizovan korišćenjem restrikcionog enzima *ScaI*. Kako bi se plazmidna DNK oslobodila od prisustva RNaze ili bilo kakve druge kontaminacije, vršena je fenol/hloroformska ekstrakcija koja je praćena etanolskom precipitacijom. *In vitro* transkripcija je izvođena korišćenjem In vitro transcription kita (Roche). Reakcije su izvođene u 20 μ l i sadržavale su 4 μ l (1 μ g) linearizovanog plazmida; 2 μ l 10xATP/GTP/CTP/UTP-dig smeše; 2 μ l 10x pufera za transkripciju; 2 μ l RNaznog inhibitora i 2 μ l SP6 ili T7 RNK polimeraze. Orjentacija FeMT3 inserta u vektoru je bila takva da se sinteza antisens lanca, t.j. probe vodi sa SP6 promotora, dok je sinteza sens lanca, t.j. negativne kontrole, vođena sa T7 promotora. Reakcija je izvođena 2 sata na 37°C, a zatim je dodato 20 U DNaze i smeša je inkubirana 15 min na 37°C kako bi se eliminisala DNK kontaminacija. Reakcija je stopirana 10 min na 65°C. Ponovljena je etanolaska precipitacija, kao što je opisano u Odeljku 3.3.8. U cilju efikasnijeg ulaska u ćelije RNK proba kao i negativna kontrola su skraćene, t.j., nespecifično hidrolizovane do komadića od oko 400-500 bp. Hidroliza je vršena u karbonatnom puferu (40 mM NaHCO₃; 60 mM Na₂CO₃). Vreme inkubacije od 12 min, izračunato je na osnovu formule: $Vreme = (Li - Lf) / (K \times Li \times Lf)$, gde je Li-inicijalna dužina probe (1.5 kb), Lf-finalna dužina probe (0.5 kb) i K-0,11 kb⁻¹min⁻¹.

3.7.5. In situ pretretman preseka tkiva

Preseci na mikroskopskim pločicama su deparafinizovani u "HistoClear" rastvaraču (2X15 min), a zatim rehidratirani u rastvorima etanola razblaženja koje je postepeno povećavano: 100% (2X1-2 min), 95% (1-2 min), 90% (2 min), 80% (2 min), 60% (2 min) i 30% (2 min). Pločice sa presecima su prebačene 2 min u DEPC H₂O, a zatim su inkubirane u 1xPBS 20 min. Sledio je tretman proteinazom K (1 µg/ml) u 100 mM Tris pH 8; 50mM EDTA, 30 min, na 37°C, a zatim inkubacija u 2 mg/ml glicina u PBS, 2 min. Pločice su ispirane 2x 2 min u PBS, a potom inkubirane u 10 min u 4% paraformaldehidu/PBS i oprane 2x5min u PBS. Dodatno je vršena acetilacija, 10 min 0,1M trietanolaminom i acetanhidridom da bi se izbegao nespecifični signal koji može nastati vezivanjem probe za pozitivne aminokiselinske grupe. Sledilo je ispiranje u PBS 2x5 min na sobnoj temperaturi. Pločice su ponovo dehidratirane držanjem po 30 sekundi u 30%, 60%, 80%, 90% i 95% etanolu, a zatim 2x30 sekundi u 100% etanolu.

3.7.6. In situ hibridizacija

Za svaki slajd pripremljeno je po 30 µl (100 ng) probe koja je pomešana sa formamidom iste zapremine, nakon čega je smeša inkubirana 2 min na +80° C. Smeša je potom prebačena na led i dodavano je 240 µl hibridizacionog rastvora (10x *in situ* so; dejonizovani formamid; dekstran sulfat; Denhartov rastvor; tRNK) koji je preinkubiran na +53°C. Proba u hibridizacionom rastvoru nanošena je na preseke na pločicama, koje su prekrivane pokrovnim stakalcima za hibridizaciju (Sigma). Slajdovi su raspoređeni u vatrostalnu posudu u kojoj se nalazila papirna vata natopljena 0,2 M SSC (NaCl; Na-citrat, pH 7). Nakon hibridizacije na 60°C, preko noći vršeno je ispiranje 2x60 min u 0,2 M SSC na 60° C, a zatim su slajdovi prebacivani u PBS 1 min. Sledila je inkubacija 45 min u 1% Boeringer-ovom rastvoru za blokiranje i 30 min u 1% BSA u 100 mM Tris pH7,5; 0,3% Triton X-100.

3.7.7. Detekcija signala

Anti-dig antitela (Roche) su rastvorena u 1% BSA u 100 mM Tris pH 7,5; 0,3% Triton X-100, u odnosu 1:500. Rastvor antitela je nanošen na pločice koje su potom inkubirane 2 sata na sobnoj temperaturi. Sledila su 4 pranja u rastvoru BSA/Tris/Triton, a potom inkubacija u AP puferu (100 mM Tris pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂, 10 min). Slajdovi su prekriveni sa po 300 µl rastvora za razvijanje signala (2 % NBT/BCIP u AP puferu) i držani u mraku preko noći. Slajdovi su ispirani u vodi kako bi se stopirala reakcija, a zatim minimalno dehidratirani (10 sekundi 70% etanol, 10 sekundi 100% etanol), obzirom da je obojeni proizvod reakcije od koga potiče signal rastvorljiv u alkoholu. Pločice su zatim osušene i prekrivene 50% glicerolom i pokrovnom ljupticom.

3.8. Esej komplementacije funkcije u kvascu *cup1Δ S. cerevisiae*

3.8.1. Testiranje metal- vezujućih svojstava *FeMT3*

U ovom eseju korišćen je soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji ne poseduje ni jednu kopiju *Cup1* gena, metalotioneina kvasaca. Označen je kao *cup1^Δ*, a zaštićeno ime je DTY4, sa karakteristikama (*MATa*, *leu2-3*, *112his3D1*, *trp1-1*, *ura3-50*, *gal1 cup1::URA3*), (Longo et al., 1996). Vektor p424-*FeMT3* sadrži kodirajući region *FeMT3* gena pod transkripcionom kontrolom kvašćevog GPD (glyceraldehyde-3-fosfat dehidrogenaza) promotora koji spada u jake, neinducibilne promotore. p424 vektor takođe sadrži i *CYC1* (citohrom oksidaza) terminator i selektivni marker, gen za sintezu triptofana. Konstrukti p424-*FeMT3* kao i prazan p424 vektor, kao negativna kontrola, su uvedeni u DTY4 ćelije kvasaca uz upotrebu *S. c.* EasyComp. Transformation Kit (Invitrogen), i selektovane na prisustvo plazmida na SC Trp⁻ Ura⁻ podlogama. U svrhu testiranja komplementacije nedostajuće funkcije kvašćevog metalotioneina, heterolognim

FeMT3, kulture cup1^{Δ} (DTY4) ćelija sa p424 ili su gajene na SC Trp⁻ Ura⁻ medijumu na 30 °C / 220 opm, do OD₆₀₀=0.5. Napravljena su po tri serijska 10x razblaženja (za negativnu kontrolu i p424-FeMT3) i svako je potom, u zapremini od po 3 μl , u vidu blago razmazanih kapi, namošeno na SC čvrste podloge sa 75 μM CuSO₄ i 3.5 μM CdCl₂, kao i podloge bez metala kao kontrola rasta kvasaca. Petri šolje su inkubirane 3 dana na 30 °C i zatim fotografisane.

3.8.2. Testiranje uloge FeMT3 u toleranciji na ROS

Za testiranje ROS uklanjajuće aktivnosti korišćen je isti soj kvasca DTY4 transformisan p424-FeMT3 kao i prazanim p424 vektorom, kao što je opisano u prethodnom poglavlju. Kontrolni i transgeni kvasac, koji su prethodno gajeni u SC medijumu do srednje log faze rasta, zasejavani u su po 10 ml SC Trp⁻ Ura⁻ tečnog medijuma tako da je postignuta optička gustina merena na 600nm oko 0.02. Nakon 5 h preinkubacije u kulture je dodavan 2, 3 i 5 mM H₂O₂. Kao kontrola eksperimenta cup1^{Δ} p424 and cup1^{Δ} p424-FeMT3 ćelije su gajene u istom medijumu, pod istim uslovima ali bez H₂O₂. Pre spektrofotometrijske provere rasta na OD₆₀₀ kvasci su gajeni 22 h na 30 °C/220 opm.

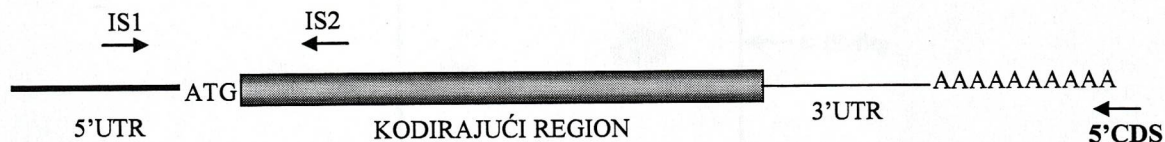
4. REZULTATI

Kako je veliki deo prethodnih istraživanja u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka bio vezan za rezervne proteine semena heljde, čija je genska ekspresija karakteristika srednje faze sazrevanja semena, na matrici populacije iRNK iz ove faze konstruisana je biblioteka cDNK. Analizom date biblioteke pokazano je da je pored cDNK za rezervne proteine koje su najzastupljenije, značajan broj transkripata pripada metalotioneinima tipa 3 (MT3). Identifikovana je i okarakterisana cDNK ovog tipa: BM290 (AF056203) (Brkljačić 2004). Pošto je za metalotioneine karakteristično postojanje genskih familija, postojala je mogućnost da se u semenu heljde eksprimira još neka izoforma MT tipa 3. S obzirom na brojne pretpostavljene funkcije, među kojima je i moguća uloga u sprečavanju prevremene degradacije rezervnih proteina, kao i zaštita od oksidativnog oštećenja ćelija, istraživanje i karakterizacija MT je od izuzetnog fundamentalnog značaja.

4.1. Izolovanje i karakterizacija članova genske familije MT3 heljde

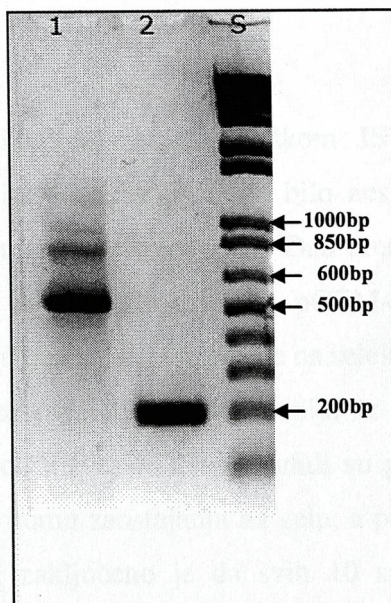
Sinteza cDNK izvedena je na iRNK, prethodno izolovanoj iz ukupne RNK semena heljde u srednjoj fazi razvića, pa su dobijene cDNK predstavljale komplement kolekcije svih iRNK ove faze. Da bi se iz ovakve kolekcije izolovale samo cDNK iz familije gena MT3, urađen je PCR na datoj matrici sa prajmerom (IS1) specifičnim za BM290 i prajmerom korišćenim za sintezu cDNK (5'CDS). Za dizajniranje prajmera korišćen je

prethodno izolovan klon pBM290 koji se sastoji od 5'UTR i dela kodirajuće sekvence **Shema 1.**



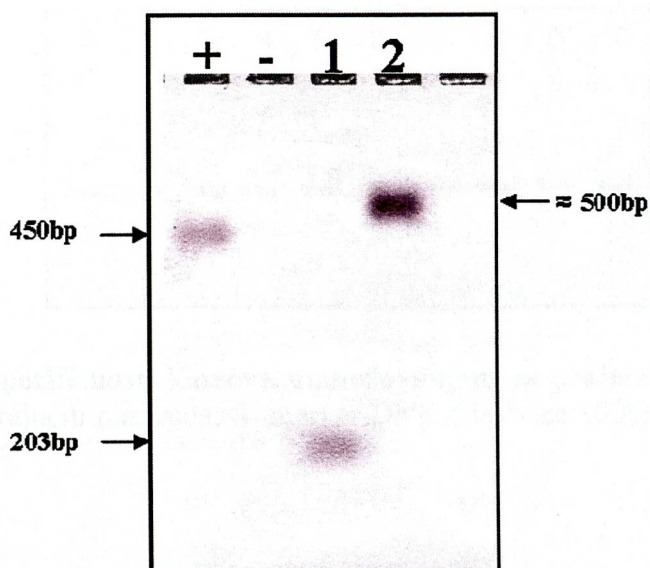
Shema 1. PRIKAZ cDNK BM290 SA POZICIJAMA PRAJMERIA

Kao rezultat umnožavanja dobijena su dva proizvoda procenjene dužine od oko 500 bp i 700 bp, kao i slabije uočljivi fragmenti oko 1000 bp (**Slika 1.**). Smeša ovih fragmenata upotrebljena je kao matrica za kontrolno umnožavanje sa prajmerima IS1/IS2. Dobijen je produkt očekivane dužine od 203 bp.



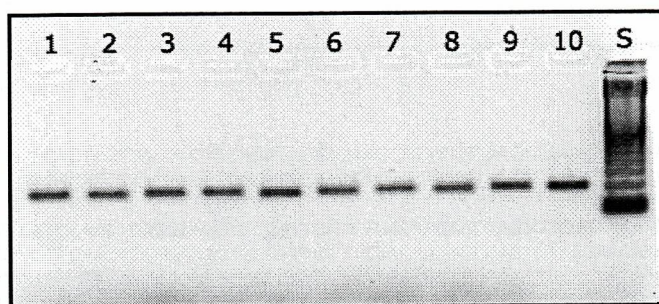
Slika 1. Umnošci dobijeni prajmerima IS1/5'CDS (1) i IS1/IS2 (2); S- DNK marker sa oznakama dužina fragmenata. Analiza je urađena na 2% agaroznom gelu.

U cilju potvrde specifičnosti umnožavanja i izbora fragmenata za kloniranje i dalju analizu, urađena je DNK/DNK hibridizacija po Southern-u. Kao proba korišćen je biotinom obeležen insert iz klona pBM290, koji je neobebežen iskorišćen kao pozitivna kontrola, dok je negativna kontrola bio fragment cDNK za 13S legumin (**Slika 2.**).



Slika 2. Southern hibridizacija PCR proizvoda. + pozitivna kontrola (BM290), - negativna kontrola (13S legumin), 1. produkt IS1/IS2 umnožavanja na matrici IS1/5'CDS 2. IS1/5'CDS umnožak na cDNK

Uočena je hibridizacija probe sa umnoškom IS1/IS2, kao i sa produktom umnožavanja IS1/5'CDS dužine oko 500bp. Nije bilo nespecifične hibridizacije, što je potvrđeno odsustvom signala u negativnoj kontroli. Dati umnožak je prečišćen elucijom iz agaroznog gela i insertovan u plazmidni vektor pGEM-T Easy. Ovim vektorom su transformisane kompetentne ćelije *E. coli*, i zasejane na selektivnu podlogu sa plavo-belom selekcijom. Nasumično je izabrano 10 belih kolonija iz kojih su izolovani plazmidi, potencijalni članovi familije cDNK za MT3. Plazmidi su proveravani elektroforetski na gelu od 1% agaroze. Po kriterijumu zaostajanja na gelu, a poredeći ispitivane plazmide sa praznim vektorom pGEM-T, zaključeno je da svih 10 sadrže insert. U cilju provere specifičnosti inserta na plazmidima je urađeno kontrolno umnožavanje sa prajmerima IS1/IS2. Amplifikacija je dobijena u svim reakcijama uz odgovarajuću dužinu fragmenata od 203 bp (Slika 3).



Slika 3. Provera specifičnosti klonova umnožavanjem sa prajmerima IS1/IS2. 1-10 umnošci sa odgovarajućih plazmida, S- marker DNK (lestvica 100bp). Provera vršena na 2% agaroznom gelu.

U daljoj karakterizaciji klonova određene su primarne nukleotidne strukture odgovarajućih inserata. Analiza rezultata uz primenu NCBI BLASTtx softverskog paketa su pokazali da svaki od navedenih 10 klonova sadrži insert čija sekvenca pokazuje visok stepen homologije sa MT tipa 3, u prvom redu sa BM290 heljde. Uočene su dve grupe sekvenci koje su se, pre svega, razlikovale po dužini 3'UTR. Klonovi arbitrarno označeni kao pFeMT3.1 i pFeMT3.5 su se u odnosu na drugih 8 izdvajali po kraćem 3'UTR i nekoliko razlika u nukleotidima kodirajućeg regiona. U daljem tekstu biće razmatrane samo sekvence klonova pFeMT3.5 i pFeMT3.10 kao predstavnika ove dve grupe, koji su i pohranjeni u Blast Gene Bank pod šiframa DQ681063 i DQ681064. Razike u nivou nukleotidnih i iz njih izvedenih aminokiselinskih sekvenci prikazane su na Slici 4.

A	
FeMT3.5	GCAAAATCACTTCTTACTTCTTCACATACAAGAACCTCTTTGTAACCTCAAGCTCATTAAAC 60
FeMT3.10	GCAAAATCACTTCTTACTTCTTCACATGCAAGAACCTCTTTGTAACCTCAAGCTCATTAAAC 60

FeMT3.5	CATGTCGTCCAAGTGCAGGAGCTGCGATTGCTCTGACAAGAGCCAGTGTGGGAAGAAGGG 120
FeMT3.10	CATGTCGTCCAAGTGCAGGAGCTGCGATTGTTTGTACAAGAGCCAGTGTGGGAAGAAGGG 120

FeMT3.5	ATACACCTTTGACATCGTTGAGATCGACAACCTTTGCCGACACCATGGTGATGAACGCCTC 180
FeMT3.10	ATACACCTTTGACATCGTTGAGACCGACAACCTTTGTTGACACCATGGTGATGAACGCCTC 180

FeMT3.5	TGAGAACGATGGCAAGTGCAAATGCGGAAGCAGCTGCGGGTGCACCAACTGCTCATGCGG 240
FeMT3.10	TGAGAACGATGGCAAGTGCAAATGCGGAAGCAGCTGCGGGTGCACCAACTGCTCATGCGG 240

FeMT3.5	TTGCCATTGAGCAGTCAACCTTTATTCCAATATGTGGACAAAAATGGGGGTCGTGTGAA 300
FeMT3.10	TTGCCATTGAGCAGTCAACCTTTATTCCAATATGTGGACAAAAATGGGGGTCGTGTGAA 300

FeMT3.5	ACTAATGATGTTTCTA----- 316
FeMT3.10	ACTAATGATAGGTCTTTGCTAAATAAGAAGGCGGTGTTTCGCCCTTTGTGCTTTGTGT 360

FeMT3.5	-----
FeMT3.10	TGTGTCTGTTTCTGTGTTTGTTCAGTTCGTTTCATAGAAGCCATGCCCATGGCTTCCCC 420

FeMT3.5	-----
FeMT3.10	TTCCCCCTTCTCTGTGTATGTTTCACATAATTTATTGGACTAATGATGTTTCTATTGTACA 480
B	
FeMT3.5	MSSNCGSCDCSDKSQCGKKGYTFDIVEIDNFADTMVMNASENDGKCKCGSSCGCTNCSCG 60
FeMT3.10	MSSNCGSCDCFDKSQLCGKKGYTFDIVETDNFVDTMVMNASENDGKCKCGSSCGCTNCSCG 60

FeMT3.5	CH 62
FeMT3.10	CH 62
**	

Slika 4. Poređenje nukleotidnih sekvenci inserata klonova pFeMT3.5 i pFeMT3.10 i njihovih izvedenih aminokiselinskih sekvenci. Poređenje je urađeno upotrebom ClustalW software. **A.** Nukleotidne sekvence. Sekvence prikazane nepodebljanim slovima pripadaju 5'-UTR-ima; podebljana slova u sekvencama deo su kodirajućeg regiona, a zakošenim slovima su prikazane baze iz 3'UTR. **B.** Izvedena aminokiselinska sekvenca. Zvezdice označavaju identične nukleotide i aminokiseline.

Dužine pojedinih regiona cDNK i polipeptida kao i detalji razlika između njih rezimirani su i prikazani u **Tabeli 1.**

NAZIV KLONA	NUKLEOTIDNA SEKVENCA						A.K. SEKVENCA			
	5'UTR		KODIRAJUĆI REGION		3'UTR		DUŽINA KODIRAJUĆEG REGIONA (a.k)	A.K. ZAMENA i njena pozicija u polipeptidu		
	DUŽINA (n)	RAZLIKE (n)	DUŽINA (n)	RAZLIKE (n)	DUŽINA (n)	RAZLIKE (n)				
FeMT3.5	61	3	186	5	65	3	62	S ₁₁	I ₂₈	A ₃₂
FeMT3.10	61		186		229		62	F ₁₁	T ₂₈	V ₃₂

Tabela 1. Razlike na nivou nukleotidne i izvedene a.k. sekvence između klonova FeMT3.5 i FeMT3.10

Radi utvrđivanja nivoa homologije sa MT3 prisutnim u drugim biljnim vrstama, aminokiselinske sekvence FeMT3 su analizirane u programu BLASTP. Rezultati ove analize su predstavljeni na **Slici 5**.

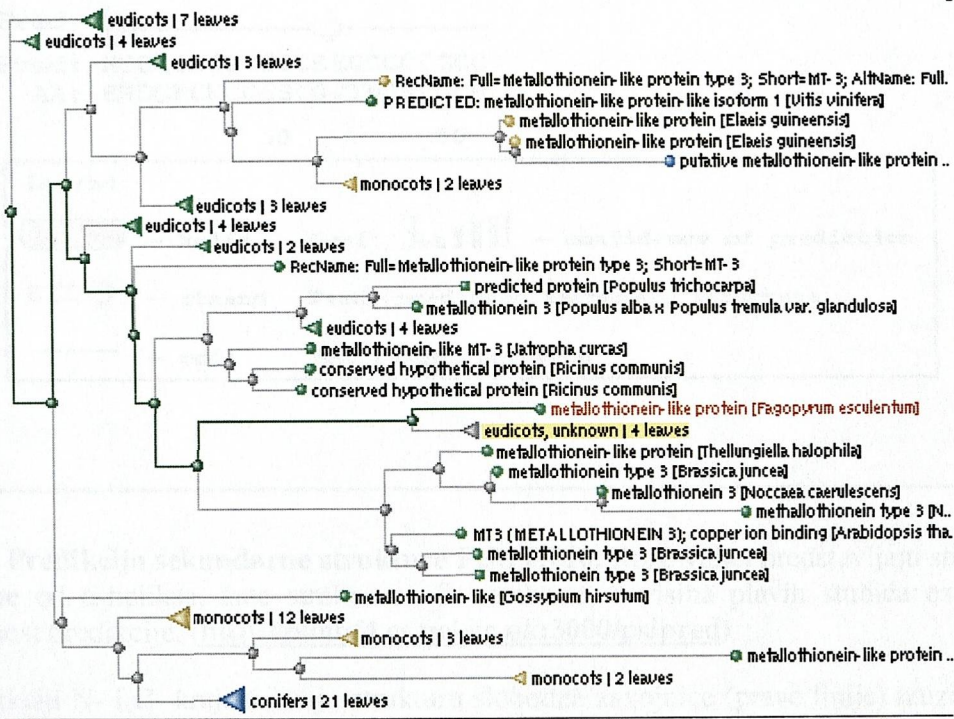


VRSTA	IDENTIČNE A.K. (%)	SLIČNE A.K. (%)	GAPS (%)
<i>F. esculentum</i> klon 5	100	100	-
<i>F. esculentum</i> klon 10	95	95	-
<i>Carica papaya</i>	62	76	6
<i>Ricinus communis</i>	61	78	7
<i>Rubus idaeus</i>	61	74	3
<i>Arabidopsis thaliana</i>	62	77	10
<i>Gossypium hirsutum</i>	55	74	1
<i>Thlaspi caerulescens</i>	55	72	5

Slika 5. Poređenje izvedenih aminokiselinskih sekvenci klonova FeMT3 sa predstavnicima MT3 iz drugih biljnih vrsta u BLASTP i ClustalW programu [GeneBank codes: *F. esculentum* klon 5 (DQ681063), *Carica papaya* (YO8322), *Ricinus communis* (EQ973975), *Rubus idaeus* (AJ224146), *Arabidopsis thaliana* (AF013959), *Gossypium hirsutum* (AY857933), *Fragaria x ananassa*(AAW52725), *Fragaria vesca* (CAA04766), *Brassica juncea*(BAB85601), *Elaeis guineae*(CAB52585), *Oryza sativa*(NP_001054885O), *Picea sitchensis*(ABK21034), *Picea abies*(Q40854). Konzervisani cisteini su obeleženi crvenom bojom, identične aminokiseline su obeležene zvezdicama, dvotačkama su označene slične ili identične ak prisutne u bar 10/14 poređenih MT3, tačkama slične ak prisutne u 7/14 poređenih MT3.

Osim navedenog izvedena je evoluciona studija koja je uključivala konstruisanje filogenetskog stabla u cilju pozicioniranja FeMT3 u odnosu na druge predstavnike MT3. Protein blast analizom upoređene su proteinske sekvence FeMT3 sa MT3 koji su do 19.05.2010. pohranjeni u bazu podataka GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) i

utvrđene su sekvence koje pokazuju najveći stepen sličnosti (homologije) sa FeMT3 koji je utvrđen na osnovu E vrednosti. MT3 sekvence sa najnižim E vrednostima su iskorišćene za konstruisanje preliminarog stabla u kojem su se nalazile klade sa različitim rasponom statističke značajnosti izraženim kroz bootstrap vrednosti. Za konstruisanje striktnog konsenzus stabla, iskorišćeni su MT3 koji su se nalazili u kladama sa najvišim bootstrap vrednostima. Korišćenjem Kimurinog modela evolucije proteinskih sekvenci u striktnom konsenzus stablu utvrđeno je da je FeMT3 evolutivno najbliži MT3 iz familije *Brassicaceae* (Slika 6).



Slika 6. Filogram koji pokazuje pozicije FeMT3 u odnosu na MT3 kod predstavnika različitih biljnih vrsta

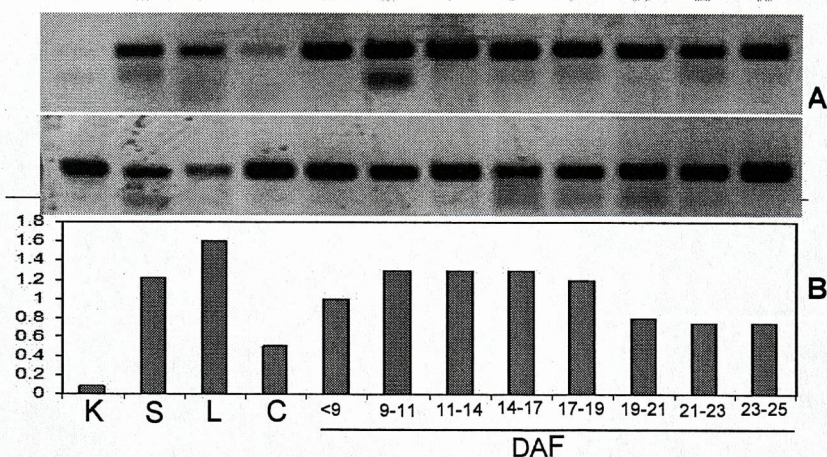
Određena je i sekundarna struktura FeMT3 polipeptida korišćenjem programskog paketa PSIPRED (<http://bioinf4.cs.ucl.ac.uk:3000/psipred>) (Slika 7). Na ovaj način je procenjena molekulska masa polipeptida FeMT3 (6558.2 Da) kao i njegova izoelektrična tačka (pI) 4.65. Razlike u aminokiselinama prisutnim u proteinima FeMT3.5 i FeMT3.10

4.2. Analiza ekspresije *FeMT3*

4.2.1. Analiza ekspresije *FeMT3* u različitim organima heljde metodom RT PCR

Imajući u vidu da je prethodna analiza sekvenci *FeMT3* cDNK pokazala da međusobno postoji velika homologija, kao i da se može očekivati još dodatnih predstavnika ove familije u genomu heljde, umesto analize ekspresije Northern - metodom korišćen je RT PCR kao metoda koja ima veću specifičnost. Za ovu svrhu dizajnirani su prajmeri koji omogućavaju umnožavanje oba predstavnika (*FeMT3.5* i *FeMT3.10*). Prajmeri dizajnirani na osnovu sekvence 26S RNK- gena duvana su korišćeni kao unutrašnja kontrola amplifikacije. Analiza RT PCR potvrdila je prisustvo transkripta *FeMT3* u svim analiziranim organima: korenu, stablu, listu, cvetovima i semenu u razviću (Slika 8A). Transkripcija ovog gena je najintenzivnija u listu i stablu, nešto niža u cvetu , dok je u korenu na granici detektabilnosti ovom metodom (Slika 8B).

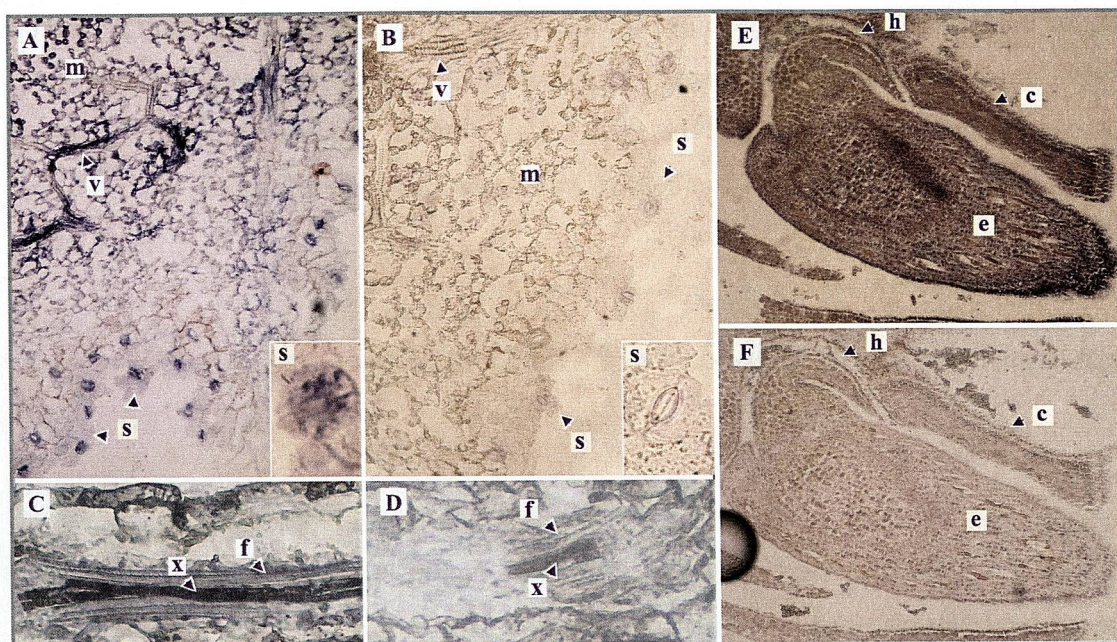
Profil ekspresije tokom sazrevanja semena analiziran je detaljnije kroz veći broj faza sazrevanja i to određivanjem relativne ekspresije gena za *FeMT3* u odnosu na nivo referentnog gena. Analiza je vršena korišćenjem denzitometrijskog programa ("NIH Image za Macintosh", Wane Rasband, National institutes of Health, USA, modifikovanog za Windows, Scion Corporation, 1997) (Slika 8B). Dobijeni histogram ukazuje da je ekspresija najintenzivnija u periodu 9-19DAF. Takođe, ekspresija je detektovana u semenima već u fazi 9 DAF, kao i u zrelim semenima heljde (25DAF).



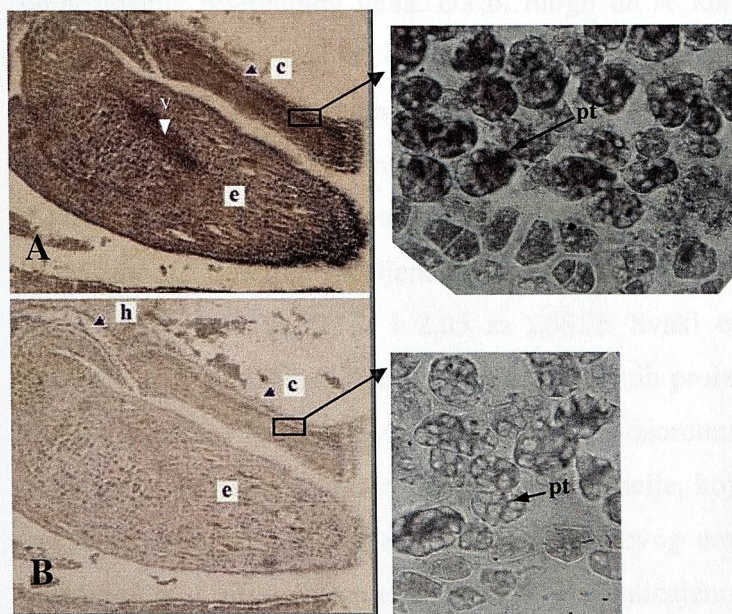
Slika 8. Analiza ekspresije *FeMT3.10* u različitim organima i različitim fazama sazrevanja semena heljde metodom RT-PCR (gornji panel *FeMT3*, donji panel 26S RNK)(A). Relativna ekspresija *FeMT3.10* određena denzitometrijskom metodom (K-koren, S-stablo, L-list, C-cvet, seme u razviću 9-25DAF (B).

4.2.2. Analiza lokalizacije transkripata *FeMT3* metodom RNK-RNK hibridizacije

U cilju preciznije lokalizacije transkripata *FeMT3.10* urađena je *in situ* RNK/RNK hibridizacija na uzdužnim presecima različitih tkiva heljde: korena, lista i embriona. Kao proba korišćen je digoksigeninom obeležen insert klona cDNK *FeMT3.10* pune dužine u „antisense“ orijentaciji (Slika 9.). Kao negativna kontrola upotrebljena je obeležena istovetna proba u „sense“ orijentaciji. Radi boljeg poređenja rezultata hibridizacije „antisense“ i „sense“ probom, korišćeni su sukcesivni preseki tkiva.



Slika 9. *In situ* RNK/RNK hibridizacija na uzdužnim presecima: A i B- lista; C i D korena; E i F embriona, hibridizovani „antisense“ A, C, E i „sense“ B, D, F probama. M- mezofil, v- lisna vena, s- stoma, x- ksilem, f- floem, h- hipokotil, e- embrion, c- kotiledon.



Slika 9a. *In situ* RNK/RNK hibridizacija na uzdužnim presecima embriona hibridizovanih A. “antisense” B. “sense” probama. Desno: odgovarajuće 100x uveličanje u nivou kotiledona sa naznačenim proteinskim telima (pt).

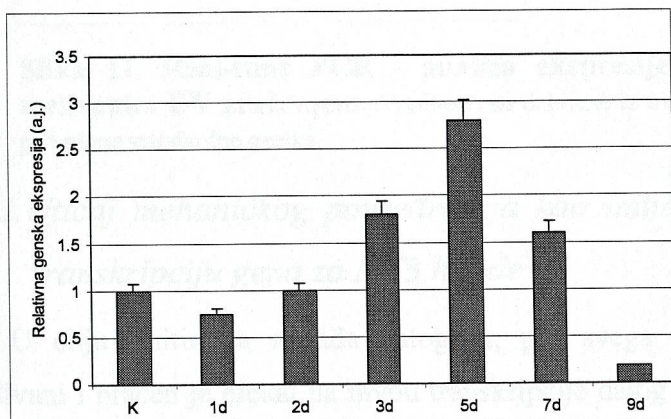
Signali su uočeni u mezofilu, sprovodnom sistemu i stomama lista, a odsustvuju u ćelijama epidermisa. U korenu je signal lokalizovan u ćelijama sprovodnog sistema, pre svega u floemu. „Antisense“ proba je hibridizovala u svim tkivima torpedo-embriona, sa najvećim intezitetom u okolini proteinskih tela tkiva kotiledona i začetaka vaskularnog sistema (Slika 9a).

4.2.3. Analiza ekspresije FeMT3 u uslovima stresa metodom Real-time PCR

U cilju utvrđivanja uloge MT3 heljde u abiotičkom stresu, praćen je nivo ekspresije ovog gena tokom izlaganja biljaka delovanju različitih stresora: H_2O_2 , UV, mrak, mehaničko povređivanje i suša. Biljke korišćene u analizi bile su u fazi cvetanja, gajene u stakleniku, normalno zalivane i prethodno nisu podvrgavane nikakvim tretmanima. Korišćena je tehnologija „Real-time PCR SYBR Green“ kojom je utvrđivan relativni odnos količine iRNK gena od interesa u odnosu na referentni, konstitutivno eksprimiran gen za histon 3. Prethodno je testiran veći broj gen-specifičnih prajmera, kao i prajmera za umnožavanje referentnog gena. Da bi mogli da se koriste u istoj reakciji umnožavanja, prajmeri su izabrani tako da daju umnoške približno istih dužina i iste tačke topljenja, što je i provereno na agaroznom gelu (podaci nisu prikazani). Zatim je određivana efikasnost reakcija Real-Time PCR konstruisanjem standardne krive. Standardna kriva je dobijena na osnovu rezultata gde su kao matrice korišćena sukcesivna razblaženja cDNK (5x, 10x, 20x, 40x i 80x razblaženja). Dobijene vrednosti efikasnosti reakcija za parove prajmera su 1,85 za MT10f/r, 1,92 za H3f/r i 2,05 za 26Sf/r. Svaki od parova prajmera je imao jasno umnožavanje na željenoj dužini, bez nespecifičnih proizvoda, a Real-time PCR je pokazao stabilnost njihovog umnožavanja u različitim uzorcima i samo jedan jasan pik na krivi disocijacije. Pored prethodno izložene optimizacije, koja je podrazumevala pravilan izbor sekvenci endogenih kontrola u kontekstu njihovog umnožavanja tokom Real-time PCR, ispitivan je i nivo njihove ekspresije pod uticajem različitih stresova. Utvrđeno da pomenuti faktori spoljašnje sredine nemaju uticaja na promenu ekspresije histona 3 i 26S RNK. iRNK korišćena u ovoj analizi je poreklom iz lista.

4.2.3.1. Uticaj produženog trajanja mraka na transkripciju gena za MT3 heljde

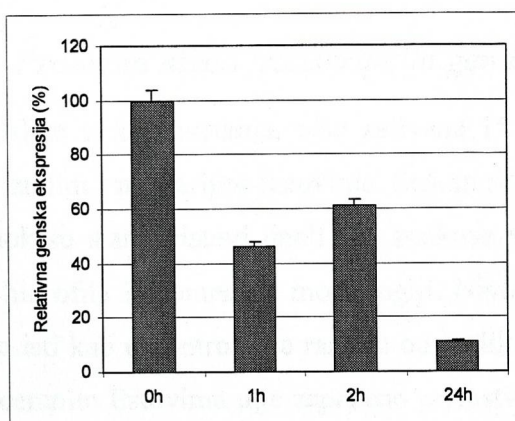
Analizom rezultata promene nivoa ekspresije gena za FeMT3.10 u listovima heljde držane u mraku, koji izaziva senescenciju, pokazano je da prvog i drugog dana transkripcija gena ostaje nepromenjena a zatim postepeno raste. Petog dana dostiže povećanje od oko 3 puta u odnosu na kontrolu, a zatim pada, da bi devetog dana bila skoro ugašena **Slika 10**.



Slika 10. Real-time PCR - analiza ekspresije *FeMT3* u listovima heljde nakon držanja biljaka u mraku Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i na stubićima su prikazane standardne greške.

4.2.3.2. Uticaj UV zračenja na transkripciju gena za MT3 heljde

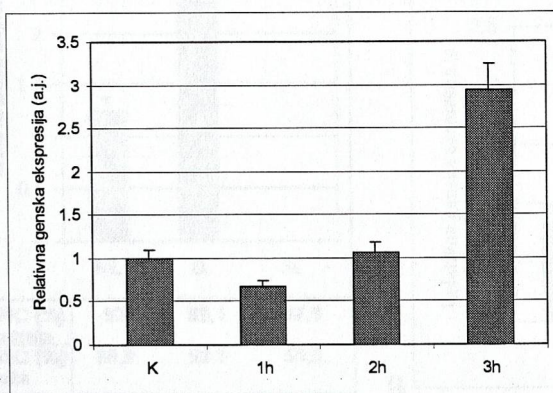
Tretman UV zračenjem u trajanju od 1h dovodi do obaranja nivoa ekspresije ispitivanog gena na 46% od vrednosti u kontrolnim, netretiranim biljkama uzorkovanim u nultom satu. Nakon 2h od početka tretmana ekspresija predstavlja 60% od nivoa ekspresije pre početka tretmana, da bi posle 24h količina iRNK za MT3 u tretiranim biljkama činila samo 11% u odnosu na kontrolu **Slika 11**.



Slika 11. Real-time PCR - analiza ekspresije *FeMT3* u listovima heljde tretiranim UV zračenjem. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i na stubićima su prikazane standardne greške.

4.2.3.3. Uticaj mehaničkog povređivanja kao imitacije napada patogena na transkripciju gena za *MT3* heljde

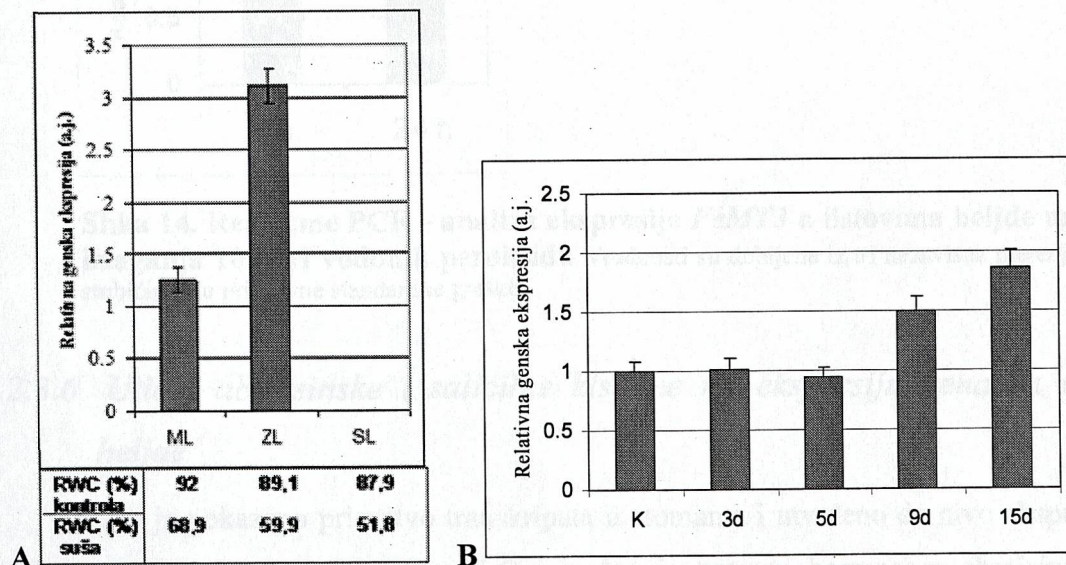
U cilju imitiranja napada patogena, pre svega isekata, listovi su mehanički povređivani i praćen je efekat na nivou transkripcije datog gena. Suprotno delovanju UV, zapažena je indukcija transkripcije, koja je nakon 3h od povređivanja bila oko 3 puta veća u poređenju sa kontrolom (Slika 12).



Slika 12. Real-time PCR - analiza ekspresije *FeMT3* u listovima heljde e nakon mehaničkog povređivanja. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i na stubićima su prikazane standardne greške.

4.2.3.4. Promena nivoa transkripcije gena za MT3 u uslovima suše

Biljke u fazi cvetanja, nisu zalivane 15 dana i praćena je promena ekspresije u mladim, zrelim i najstarijim listovima. Sušom su najmanje bili pogođeni najmlađi, pa zreli listovi dok su stariji listovi imali sve znakove senescencije, od niskog sadržaja vode do gubitka hlorofila i promene u morfologiji. Nivo transkripcije MT3 je kod mladih listova približno isti kao u kontroli, za razliku od zrelih listova gde je 3 puta povećan **Slika 13A**. U senescentnim listovima nije zapaženo prisustvo transkripata ni MT3, ni histonskih gena (podaci nisu prikazani). Fiziološki parametar suše je smanjenje sadržaja vode u listovima. Relativan sadržaj vode RWC vrednost (Relative Water Content) određena je za svaku grupu listova uključujući i kontrole i prikazana na **Slici 13A**. U eksperimentu gde su biljke isušivane 3, 5, 9, 15 dana najveći porast ekspresije zapažen je posle 15 dana **Slika 13B**. Upotrebljena iRNK je izolovana iz mešovitoz zbirnog uzorka mladih i potpuno razvijenih listova.

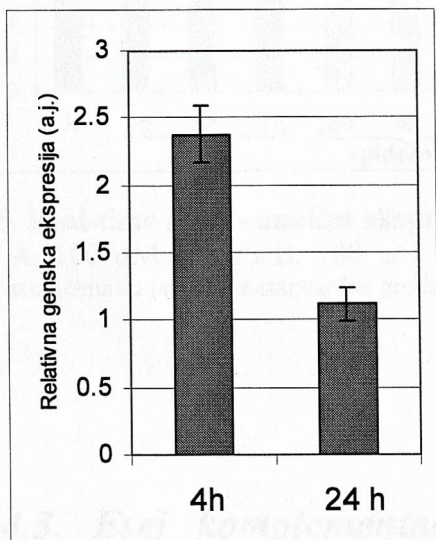


Slika 13. Real-time PCR - analiza ekspresije *FeMT3* u listovima heljde:

A. različite starosti, nakon 15 dana isušivanja (ML-mladi listovi, ZL- zeleni, potpuno razvijeni listovi, SL- senescentni, najstariji listovi); kontrole su normalno zalivane biljke i imaju RGE=1a.j. **B.** iz mešovitoz uzorka ML i ZL, uzorkovanim nakon 3, 5, 9, 11 dana isušivanja. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i na stubićima su prikazane standardne greške.

4.2.3.5. Ekspresija gena za MT3 heljde tokom oksidativnog stres

Pratilac svih abiotičkih stresova je produkcija reaktivnih kiseonocnih vrsta (ROS). Da bi se utvrdio uticaj ROS, na transkripciju ispitivanog gena, listovi su potapani u vodeni rastvor 10 mM H₂O₂ i držani 4 i 24 sata. Kao rezultat dobijeno je povećanje transkripcije 2,4 puta u odnosu na kontrolu nakon 4h, ali je delovanje peroksida tokom dužeg vremenskog perioda (1 dan) dovelo do pada količine transkripata blizu vrednosti u kontrolnim netretiranim biljkama **Slika 14**.



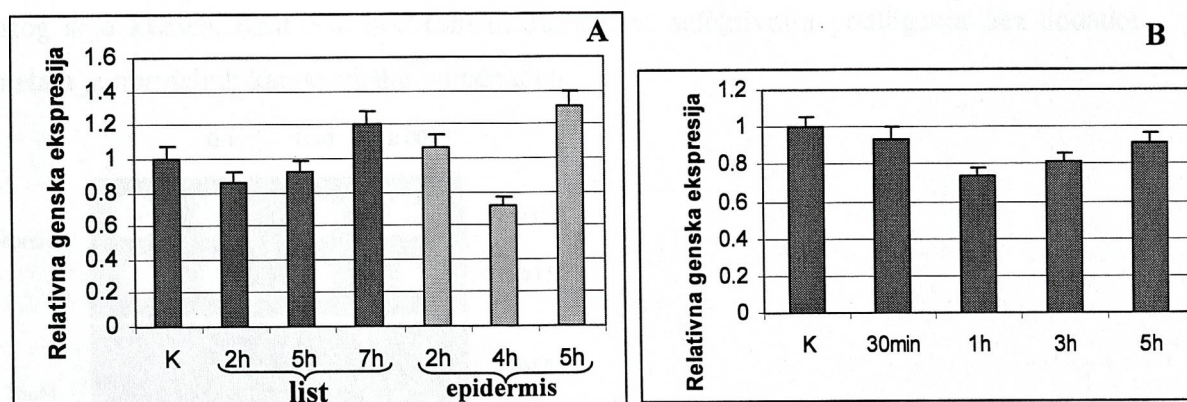
Slika 14. Real-time PCR - analiza ekspresije *FeMT3* u listovima heljde nakon izlaganja 10 mM vodonik peroksidu Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i na stubićima su prikazane standardne greške.

4.2.3.6. Uticaj abscisinske i salicilne kiseline na ekspresiju gena za MT3 heljde

Pošto je pokazano prisustvo transkripata u stomama i utvrđeno da nivo ekspresije MT3 raste tokom suše i delovanja H₂O₂, urađen je tretman hormonom abscisinskom kiselinom (ABA). Korišćen je rastvor 100 μM ABA kojom su tretirani kako celi listovi, tako i izolovani epidermisi sa stomama. Ni u jednom tkivu nije zapažena značajnija promena na nivou transkripcije *FeMT3* nakon njihovog izlaganja delovanju ABA (**Slika 15A**).

Takođe, nije utvrđen nikakav uticaj salicilne kiseline (SA) na profil ekspresije *FeMT3*. Otkinuti listovi heljde su iseckani na komadiće, a zatim direktno smešteni u

medijum koji je sadržavao 200 μ M SA. Listovi su zamrzavani nakon 30, 60, 180 i 300 min od početka tretmana. Uključene su i kontrole za svaku vremensku tačku eksperimenta su u cilju eliminacije mogućeg uticaja osmotskog stresa (Slika 15B).



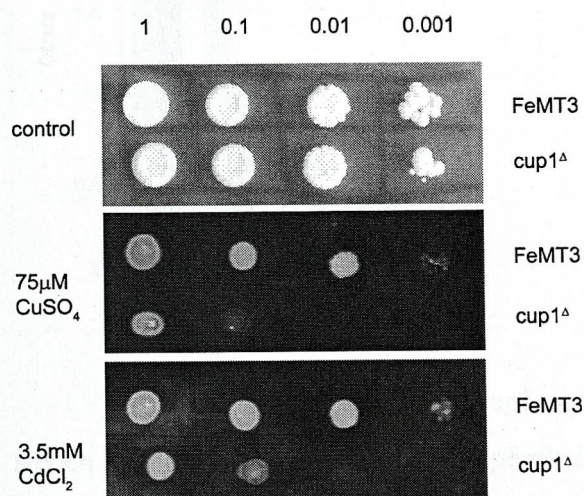
Slika 15. Real-time PCR - analiza ekspresije *FeMT3* u listovima heljde pod uticajem:
A. 100 μ M ABA i B. 200 μ M SA Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i na stubićima su prikazane standardne greške.

4.3. Esej komplementacije funkcije u kvascu *cup1 Δ S. cerevisiae*

4.3.1. Testiranje metal- vezujućih svojstava *FeMT3*

Detekcija iRNK za MT3 u različitim organima heljde, pri različitim fiziološkim uslovima i delovanju faktora spoljašnje sredine dokaz su aktivnosti datog gena. Zbog sklonosti ka oksidativnoj degradaciji bilo je nemoguće detektovati prisustvo proteina u tkivima, stoga se podaci o funkcionalnosti proteina MT3 dobijaju posredno. Čelije kvasca *S. cerevisiae*, mutanti za sopstveni MT CUP1-null (*cup1 Δ*), transformisane su kontrolnim p424 i vektorom p424-FeMT3 koji je sadržavao *FeMT3* cDNK i gajene do srednje- log faze rasta. Zatim su napravljena 10 puta serijska razblaženja i po 3 μ l od svakog je zasejavano na SC čvrsti medijum sa, ili bez metala. Šolje su inkubirane na 30°C 3 dana.

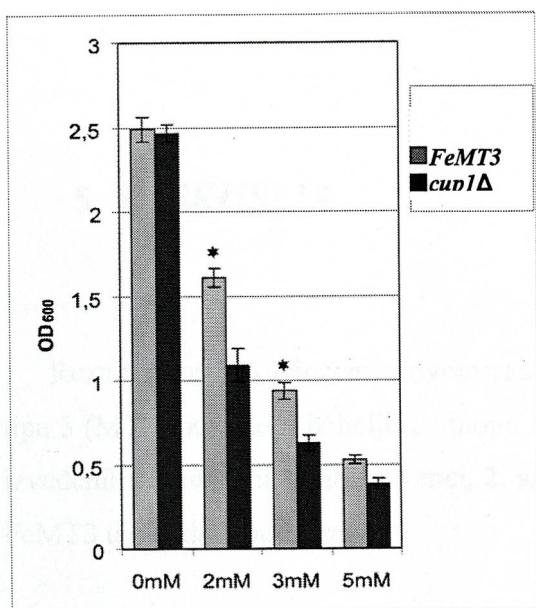
Praćen je njihov rast na selektivnim podlogama sa i bez metala (Cu i Cd) Slika 16. p424-FeMT3 transformanti *cup1Δ S. cerevisiae* rastu na podlogama sa toksičnim koncentracijama metala, kako bakra tako i kadmijuma, za razliku od p424 transformanata istog soja kvasca. Rast oba tipa transformanata na selektivnim podlogama bez dodatka metala je normalnih karakteristika i ujednačen.



Slika 16. Test komplementacije funkcije vezivanja metala u ćelijama *cup1Δ S. cerevisiae*. 10x serijska razblaženja kontrolnih i transformisanih ćelija kvasaca gajena su na SC medijumu sa dodatkom CuSO₄ i CdCl₂ u naznačenim koncentracijama.

4.4. Testiranje uloge FeMT3 u toleranciji na ROS

Za testiranje ove uloge metalotioneina heljde upotrebljen je isti kvašćev sistem. Mutantni sojevi *cup1Δ S. cerevisiae*, gajeni su u tečnom SC Drop Out medijumu koji je sadržavao različite koncentracije H₂O₂ (2 mM, 3 mM i 5 mM). Kvasci transformisani vektorima p424 i p424-FeMT3, gajeni su u ovim medijumima, kao i u medijumu bez peroksida (kontrola). Razlike u OD₆₀₀, nakon 22h rasta, reflektuju razlike u preživljavanju ovih transformanata.



Slika 17. Testiranje uloge FeMT3 u toleranciji cup1Δ *S. Cerevisiae* na H₂O₂

Historam reprezentuje rast dve transgene linije cup1Δ u SC medijumu sa 2, 3 i 5 mM H₂O₂. (Crni stubići su - p424 transformanti, sivi stubići- p424-FeMT3 vektorom transformisani cup1Δ kvasci). Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost izmerenih OD₆₀₀ u tri ponovljena eksperimenta, sa naznačenim SEM.

Sa histograma na **Slici 17**.se uočava da p424-FeMT3 transformanti pokazuju veći stepen tolerancije na 2 mM i 3 mM peroksid u odnosu na cup1Δ transformisane praznim p424 vektorom, dok je koncentracija od 5 mM toksična za obe linije cup1Δ. Transformanti sa i bez MT3 pokazuju normalan i u međusobnom poređenju ujednačen rast u selektivnom medijumu bez dodatog peroksida.

5. DISKUSIJA

Rezultati koji su izloženi u ovom radu odnose se na dva predstavnika metalotioneina tipa 3 (MT3) poreklom iz heljde, i mogu se grupisati u tematske celine: **1.** analiza cDNK i izvedenih aminokiselinskih sekvenci, **2.** analiza ekspresije *FeMT3.5* i *FeMT3.10* i **3.** uloga *FeMT3* u oksidativnom stresu.

5.1. Analiza sekvenci *FeMT3.5* i *FeMT3.10*

Poređenjem nukleotidnih sekvenci cDNK *FeMT3.5* i *FeMT3.10* pokazano je da postoje razlike u sva tri regiona (**Slika 4.** i **Tabela 1.**). Otkriće dveju različitih sekvenci cDNA za MT3 ukazuje da heljda ima bar dva člana familije MT gena tipa 3. Međusobna sličnost na nivou aminokiselinskih sekvenci je 95% i nema promene u rasporedu Cys, koji su odgovorni za koordinaciono vezivanje jona metala. Obe sekvence sadrže 11 Cys raspoređenih po konsenzusu za tip 3 MT. U kodirajućem regionu postoji 5 nukleotidnih zamena, od kojih su dve na kraju, a 3 u sredini kodona. Sve pomenute mutacije su tipa tranzicije, tj. zamene jednog pirimidinskog ili purinskog nukleotida drugim pirimidinskim odnosno purinskim nukleotidom. Kao posledica mutacija u sredini kodona javljaju se i male razlike u aminokiselinskoj sekvenci. Aminokiselina fenilalanin (jedanaesta u sekvenci MT), *FeMT3.5* je u *FeMT3.10* zamenjena serinom. Dakle, jedna aromatična i hidrofobna aminokiselina je zamenjena polarnom aminokiselinom. Činjenica da se ova zamena nalazi odmah posle cisteinom bogatog domena na N-kraju ukazuje na mogućnost da aminokiselina na datoj poziciji nije od značaja za 3D strukturu proteina. Međutim, takva zamena i te kako može omogućiti funkcionalnu specijalizaciju. Sa druge strane, polarna

aminokiselina treonin (28. u nizu) u premošćavajućem regionu, je zamenjena hidrofobnim izoleucinom. Zamena valina alaninom nije od značaja, jer se u oba slučaja radi o malim hidrofobnim aminokiselinama. Treba naglasiti da se sve tri zamene nalaze u premošćavajućem regionu, tako da metal-vezujući delovi MT nisu pogođeni promenama. Razlike u premošćavajućem regionu mogu omogućiti funkcionalnu specijalizaciju i verovatno je to razlog zašto u toku evolucije jedna od genskih sekvenci nije pretvorena u pseudogen. Drugi mogući razlog poslednje konstatacije je da su dve sekvence nastale relativno skoro udvajanjem gena pretka i da nije bilo dovoljno vremena za neutralisanje jednog gena. Zapravo, bilo kakve tvrdnje bez analize promotorskog regiona genomskih klonova i bez funkcionalnih analiza su na ovom nivou znanja samo u domenu spekulacija. Najupadljivija i za dalja istraživanja najintrigantnija je razlika u dužinama 3'UTR između ova dva predstavnika MT3 heljde. *FeMT3.5* poseduje 65 n dug 3'UTR koji se od *FeMT3.10* razlikuje u 164 n, što može biti u vezi sa različitom unutarćelijskom lokalizacijom ili različitim vremenom degradacije iRNK unutar ćelije. Netranslirajući regioni biljnih gena su malo proučeni, tj. ne postoji baza sekvenci kao ni softveri za *in silico* predikciju potencijalnih regulatornih sekvenci koje bi sadržavali ovi regioni. Izvestan proboj na ovom polju učinjen je poslednjih godina kada su objavljene studije na temu alternativne poliadenilacije i obrade transkripata kod biljnih gena. Naime, kanonski heksamerni AAUAAA koji kod sisara predstavlja signal za poliadenilaciju u genomu *Arabidopsis* je prisutan u samo oko 10% transkripata, ali su pronađeni tzv. CE (Cleavage Elements) koji se sastoje od dva U- bogata regiona sa obe strane mesta sečenja u okviru 3'UTR iRNK (Loke et al., 2005). U 3'UTR MT3 heljde nisu nađeni kanonski poliadenilacioni signali, ali na samom kraju 3'UTR *FeMT3.5* i par nukleotida nizvodno od tog mesta u *FeMT3.10* nalaze se dva regiona bogata U koji bi odgovarali CE elementima nađenim u *Arabidopsis*u. Rezultati pretraživanja upotrebom UTRScan programa ukazuju i na postojanje ARE (AU Rich Elements) u dužem UTR što verovatno ovaj transkript čini nestabilnijim u odnosu na kraću varijantu- *FeMT3.5*. Ovo je veoma važno sa stanovišta posttranskripcione regulacije ekspresije MT3 gena, i navodi na zaključak da su razlike u 3 aminokiseline u okviru kodirajućeg regiona ipak značajne u opredeljivanju distinktnih funkcija *FeMT3.5* i *FeMT3.10* proteina. O uticaju 3'UTR na lokalizaciju MT1 pacova najviše podataka je dobijeno analizom lokalizacije transkripata u transformisanim jajnim

ćelijama kineskog hrčka, koje prirodno veoma malo eksprimiraju MT (Levadoux-Martin et al., 2001). Upotrebom antisens oligonukleotida i *in situ* hibridizacijom sa iRNK za MT1 čiji su različiti delovi 3'UTR deletirani, zaključeno je da ceo 3'UTR nije neophodan za okolojedarnu lokalizaciju transkripata. Da li razlike u 3'UTR MT3 transkripata heljde utiču na njihovu lokalizaciju, stabilnost ili sadrže neke regulatorne elemente koji utiču na ekspresiju ovih gena je interesantno polazište za buduća istraživanja.

Poređenje FeMT3 sa drugim sekvencama za MT3 iz različitih biljnih vrsta uočen je visok stepen homologije, pre svega u broju i rasporedu Cys (**Slika 5**) u okviru N- i C-terminusa, odgovornih za vezivanje metala. Pored Cys u ovim visoko konzervisanim regionima su uglavnom prisutne identične ili po tipu slične aminokiseline. Najveće odstupanje u broju i sastavu aminokiselina uočeno je u premošćavajućem regionu koji je odgovoran za specijaciju funkcija metalotioneina (Domenech et al., 2006).

Poređenje FeMT3 sa drugim sekvencama za MT3 iz različitih biljnih vrsta uočen je visok stepen homologije, pre svega u broju i rasporedu Cys (**Slika 5**) u okviru N- i C-terminusa, odgovornih za vezivanje metala. Pored Cys u ovim visoko konzervisanim regionima su uglavnom prisutne identične ili po tipu slične aminokiseline. Visoka konzervisanost sekvenci MT tipa 3 u filogenetski udaljenim vrstama govori da su ovi proteini nastali veoma rano u evoluciji kod zajedničkog pretka, pre razdvajanja monokotila i dikotila i da je osnovni strukturni "patern" nastao još u golosemenicama. Interesantno je da je veći stepen homologije sekvenci prisutan u okviru istog tipa kod veoma udaljenih vrsta nego između različitih tipova MT iste vrste (Cobbett and Goldsbrough, 2002), i stoga se pretpostavlja da je selektivni pritisak uslovljen sredinskim faktorima održao ove proteine malo izmenjenim skoro 200 miliona godina (Zimeri et al., 2005). U prilog tome govore i evolutivni odnosi FeMT3 utvrđeni u ovom radu, pošto je najveća srodnost dobijena između FeMT3 i MT3 predstavnika familije *Brassicaceae*. U dendrogramu predstavljenom na **Slici 6**, ova klada je podržana vrlo visokom značajnošću.

Sa druge strane, najveće odstupanje u broju i sastavu aminokiselina MT3 uočeno je u premošćavajućem regionu koji je odgovoran za specijaciju funkcija metalotioneina (Domenech et al., 2006). Varijabilnost je prisutna u regionu koji spaja dva metal-vezujuća domena i kao što je već rečeno, verovatno određuje lokalizaciju, protein- protein

interakcije MT i zaslužan je za konformaciju proteina, što govori da je funkcija vezivanja i uklanjanja metala bila primarna, a da su druge nastale kao adaptacija tokom evolucije.

Razmatrajući sekundarnu strukturu proteina, (**Slika 7.**) uočava se da protein u svojim N- i C- terminusima bogatim Cys ima formu slobodne zavojnice, što mu omogućava veću fleksibilnost prilikom vezivanja metala u različitom molarnom odnosu. U regionu spojnice prisutne su dve β - strukture i dva α -heliksa na početku i kraju regiona, što odgovara modelu „gimnastičkog tega“ dMT koji je dao Bilecen (Bilecen et al., 2005) (videti Uvod **Sliku 6.**). Prisustvo proteina u malim količinama u ćelijama i njegova nestabilnost u sredini sa kiseonikom čini izolovanje nativnog proteina, a samim tim i strukturnu analizu (NMR, kristalografiju) izuzetno otežanom, o čemu govori i mali broj razrešenih struktura biljnih MT (Freisinger, 2008).

5.2. Analiza ekspresije gena za MT3 heljde

5.2.1. Tkivna lokalizacija ekspresije

Prethodno objavljeni rezultati analize ekspresije MT3 heljde urađeni DNK/RNK hibridizacijom pokazali su da se *BM290* eksprimira u zelenim i senescentnim listovima kao i u semenu u razviću sa pikom u ranim fazama sazrevanja. Da bi proširili podatke o tkivnoj ekspresiji MT3, a ujedno analizu učinili specifičnijom korišćen je RT-PCR. Ova metoda ima prednost jer su korišćeni prajmeri specifični za dati gen, dok se upotrebom radioaktivnih proba iz šireg regiona cDNK mogu dobiti signali koji odgovaraju visokohomolognim delovima npr N- i C-terminusa MT poreklom iz metalotioneina drugih tipova. Paralelnom upotrebom endogenih kontrola u RT-PCR mogu se dobiti i relativni odnosi ekspresije target gena i endogena. U ovom radu korišćeni su prajmeri dizajnirani na osnovu sekvence *FeMT3.10* i rezultati pokazuju da se njegova transkripcija odvija u korenu, stablu, listu i cvetu, kao i u svim fazama razvića semena (Slika 8.). U korenu je transkripcija jedva merljiva, i upućuje na zaključak da MT3 heljde u normalnim fiziološkim uslovima nemaju potrebu za većom produkcijom MT i da je ovaj bazalni nivo dovoljan za transport esencijalnih metala. Bilo bi interesantno pratiti ekspresiju MT3 u korenu kada je biljka gajena u zemljištu sa povećanim sadržajem metala. U stablu je transkripcija *FeMT3* veoma intenzivna i verovatno u vezi sa ulogom ovih proteina u transportu metala. List kao metabolički- fotosintetski najaktivniji organ biljke, i deo biljke koji je izložen dejstvu stresogena iz spoljnje sredine, karakteriše se visokim nivoom transkripcije gena za MT3. Postoje brojni literaturni podaci o ekspresiji MT3 u listovima biljaka, pre svega onih vrsta koje nemaju mesnate plodove, kao što su arabidopsis, *Thlaspi* (kravlja trava) i grašak (Guo et al., 2003; Lee et al., 2004; Hassinen et al., 2009). Slaba ekspresija uočena je u cvetovima sa potpuno razvijenim cvetnim delovima, anterama i

tučkovima kao i kruničnim i čašičnim listićima. Iako, iz tehničkih razloga (nemogućnosti održavanja preparata na pločicama) nismo bili u mogućnosti da uradimo *in situ* RNA/RNA hibridizaciju na presecima cveta i utvrdimo lokalizaciju transkripata, pretpostavka je da je ekspresija u cvetu lokalizovana u anterama. Razlozi za ovakvo mišljenje leže u prethodnim rezultatima analize promotora *FeMT4.1* u kom su po predikciji otkriveni PSE (Pollen Specific Elements). Funkcionalna analiza ovog promotora u fuziji sa GUS reporterom pokazala je aktivnost u anterama (Bratić et al., 2009), koja je potvrđena i u polenovim zrnima transformisanim fragmentom promotora za *FeMT3* (Bratić et al 2010). Seme u razviću se takođe karakteriše visokim nivoom transkripcije *FeMT3* koji dostiže maksimum u ranim i srednjim fazama u sazrevanju a zatim blago pada, ali ostaje značajno prisutan i tokom kasnih faza razvića. O mogućoj ulozi *MT3* u sazrevanju semena heljde biće diskutovano kasnije.

Prethodno diskutovana RT-PCR analiza po tkivima predstavljala je samo "skreening"metod i dala opštu predstavu o lokalizaciji transkripcije gena od interesa. Detaljnija analiza uključivala je RNK/RNK hibridizaciju na presecima raznih tkiva heljde (Slika 9 i 9a). Suština ove metode je da se na fiksiranim tkivima, ukalupljenim u parafinske smole naprave preseci od 8 do 10 µm pri čemu morfologija tkiva treba da ostane očuvana. Preseci se zatim lepe na pločice koje dalje prolaze kroz razne tretmane od kojih su neki veoma agresivni (hibridizacija na 55°C) i doprinose gubljenju materijala. Naročito su osetljiva tkiva bogata saharidnim materijama (semena i cvetovi). Zbog ovih razloga *in situ* lokalizacija transkripata odrađena je na listovima, korenu i embrionima semena srednje faze u razviću. Kao proba korišćen je 489 bp duga cDNK *FeMT3.10*, obeležena digoksinom. Digoksin je prisutan samo u biljkama roda *Digitalis* tako da je izbegnuto javljanje lažno pozitivnih signala u tkivima heljde. Proba je pre hibridizacije podvrgnuta kontrolisanoj karbonatnoj lizi do fragmenata dužine 150bp, da bi se obezbedila bolja penetrabilnost u biljna tkiva koja poseduju ćelijske zidove. U korenu heljde uočeno je prisustvo transkripata u elementima floema, dela sprovodnog sistema biljke kojim ona vraća hranljive materije iz lista u mesta njihove potrošnje ili skladištenja. Moguće je da su metalotioneini u ovim ćelijama u ulozi depoa i/ili isporučioca jona metala. Signal koji označava prisustvo *FeMT3* u listovima heljde je lokalizovan u ćelijama mezofila, sprovodnom sistemu i stomama. Odustvuje samo u epidermalnim ćelijama.

Prisustvo MT3 u sprovodnom sistemu lista može se objasniti ulogom koju on ima u sličnim strukturama korena, kao depo jona metala, pre svega bakra koji je neophodan i u procesima lignifikacije elemenata kako ksilema tako i floema (Garcia-Hernandez et al., 1998). Takođe, višak potencijalno toksičnih metala putem sprovodnog sistema odvodi se do mesta deponovanja. Da FeMT3 vezuje jone metala, bakra i kadmijuma pokazano je u eseju komplementacije funkcije u kvascu *cup1Δ S. cerevisiae* (Slika 16). Čelije mezofila su metabolički najaktivnije i predstavljaju glavna mesta odigravanja fotosinteze. Tokom procesa fotosinteze dolazi do intenzivne generacije ROS koji bivaju simultano uklanjani od strane antioksidativnih enzima prisutnih u tilakoidima i stromi hloroplasta (De Gara et al.). Jedan od najzastupljenijih enzima te vrste je Cu,ZnSOD koji u svom katalitičkom centru ima jone metala. Uloga metalotioneina bi mogla biti dvojaka, kao molekula koji ima direktnu antioksidativnu ulogu ili kao isporučilac jona metala za enzime koji imaju veću efikasnost u uklanjanju ROS.

Najintrigantnija je potencijalna uloga MT3 u stominim ćelijama, u kojima je veoma izraženo prisustvo transkripata ovog gena. Naši rezultati, po prvi put pokazuju veoma jaku ekspresiju metalotioneina u ćelijama zatvaračicama stoma. Stome su specijalizovani otvori epidermisa lista, važni regulatori transpiracije i razmene gasova između biljaka i atmosfere. Otvaranjem stoma omogućava se isparavanje vodene pare sa površine lista u nezasićenu spoljašnju atmosferu, dok se zatvaranjem stoma, pri suši, otežava stomatalna transpiracija i voda zadržava u biljci. Kroz stome se odvija i razmena gasova CO_2 i O_2 u procesima fotosinteze i disanja. Otvor stome ograničen je ćelijama zatvaračicama od kojih zavisi mehanizam otvaranja i zatvaranja stoma. Naime, kada je vodni potencijal u ćelijama zatvaračicama niži u odnosu na vodni potencijal okolnih ćelija, u uslovima kada biljka ne oskudeva u vlazi, voda ulazi u ćelije zatvaračice, povećava turgor i izaziva otvaranje stome. Za razliku od ostalih ćelija epidermisa, ćelije zatvaračice su metabolički veoma aktivne, sadrže hloroplaste i vrše fotosintezu. Kao rezultat toga, u ovim ćelijama se stvara šećer što rezultira povećanjem osmotskog potencijala u njima, što uzrokuje ulaženje vode iz okolnih ćelija u ćelije zatvaračice i otvaranje stoma. (Sirichandra et al., 2009). Suprotno, do zatvaranja stoma dolazi usled nedostatka vode u biljci, što spada u adaptacione mehanizme biljaka. Kada koren registruje deficit vode u zemljištu, oslobađa se hormon ABA, koji ulazi u ćelije zatvaračice i pokreće niz reakcija u ovim ćelijama. Dolazi do

lokalnog povećanja pH u citosolu što, sa druge strane, uzrokuje povećanje koncentracije slobodnog Ca^{++} , i efluks jona Cl (Cl^-). Istovremeno, dolazi do inhibicije ulaska i gubitka K^+ . Sve ovo za posledicu ima pad turgora, redukciju osmotskog pritiska i zatvaranje ćelija stominog aparata. Ovo je sažeti prikaz jednog složenog i visoko- regulisanog procesa.

Jedan od prvih, u kaskadi događaja koji slede nakon ulaska ABA u ćeliju, a koji prethodi zatvaranju stoma, je tranzijentni porast koncentracije ROS posredstvom NADPH oksidaze. U ovom slučaju ROS su medijatori u prenošenju signala, ako su prisutni u odgovarajućoj koncentraciji. (Kolla et al., 2007) (videti shemu u Uvodu poglavlje 1.7.4). Nije pokazano direktno učešće metala (Zn, Cu) u procesima vezanim za pokrete stoma. Pretpostavljena funkcija MT3 u ovim ćelijama, stoga nije vezana za njihova metal-vezujuća svojstva, već za sposobnost ovog proteina da uklanja ROS. Pokazano je, u ovom radu, da ABA kao ključni pokretač zatvaranja stoma, nema uticaja na transkripciju MT3 (Slika 15 A.). Eksperiment je više puta ponovljen, kako na celim listovima, tako i na izolovanim epidermisima sa stomnim ćelijama. Moguće je da je okidač za transkripciju *FeMT3* neki drugi faktor uključen u mehanizam otvaranja/zatvaranja stoma, koji je u vezi sa produkcijom ROS. MT3 heljde ovde može biti uključen u finu kontrolu koncentracije ROS, koji su važni činiooci u prenošenju ćelijskih signala, na šta ukazuje i povećanje ekspresije *FeMT3* u oksidativnom stresu (Slika 14), kao i pokazan uticaj proteina *FeMT3* na povećanu toleranciju *cup1Δ* kvasaca na H_2O_2 (Slika 17). S obzirom na to da su stome u neposrednom kontaktu sa polutantima vazduha i ozonom, koji stvaraju velike količine ROS, ne treba isključiti ni ulogu MT3 u odbrani ovih ćelija od oksidativnih oštećenja.

Pošto seme heljde obiluje skrobnim materijama, ni uz upotrebu specifičnih fiksativa nisu dobijeni rezultati RNA/RNA hibridizacije koji bi uključivali sve strukture semena, tako da su oni ograničeni samo na tkiva embriona. Hibridizacioni signali detektovani su u celom embrionu, a naročito su intenzivni u regionima koji pripadaju vaskularnom tkivu, u oblasti koje će dati budući koren i u ćelijama kotiledona. Preseci su pravljeni na embrionima iz srednje faze semena u razviću oko 19 DAF kada je transkripcija *FeMT3* najveća. Na ovom stupnju kasnog torpeda ćelijske deobe nisu intenzivne, već se uglavnom dešavaju procesi rasta ćelija, koji podrazumevaju sintezu i deponovanje rezervnih materija. Rezervne materije se, kod dikotila, kojima pripada i heljda, deponuju u celom embrionu, a rezervni proteini se odlažu u proteinskim telima kotiledona. Uloga MT u razviću semena

razmatrana je i ranije (Brkljacic et al., 2004; Oracz et al., 2007). Pretpostavljeno je da u ranoj fazi razvoja semena oni transportuju cink u jedro, gde je potreban u povećanim količinama tokom ćelijske deobe. U srednjoj fazi sazrevanja semena (kada je proces embriogeneze već završen) MT3 bi mogao obavljati funkciju helatora jona Zn^{++} u cilju zaštite rezervnih proteina od prevremene degradacije u proteinskim telima, što potvrđuje lokalizacija MT3 transkripata uz proteinska tela (Slika 9a). U skladu sa pretpostavkom da MT interaguje sa GSSG i produkujući GSH obnavljaju redukcionu potencijal ćelije, pad ekspresije MT3 u kasnijim fazama sazrevanja semena može biti uslov za smanjeni odnos GSH/GSSG. Smanjenje odnosa GSH/GSSG preko povećanja GSSG je neophodno da bi se omogućila tiolacija proteina semena – formiranje mešanih disulfida. Tiolacijom se štite proteini od degradacije i sprečava klijanje pre imbibicije u vodi, kada se proteini detioliraju i počinje klijanje. U novije vreme ispitivana je uloga ROS, pre svega H_2O_2 u procesima dormancije semena. Utvrđeno je da u kasnim fazama sazrevanja semena kada je završeno punjenje rezervnim materijama dolazi do nakupljanja H_2O_2 u ćelijama embriona. Ovaj proces može dovesti do prekida dormancije i klijanja semena kada uslovi u spoljašnjoj sredini nisu odgovarajući. Produkcija peroksida dovodi do karbonilacije određenih proteina što vodi njihovoj inaktivaciji ili degradaciji (Oracz et al., 2007). U ovom slučaju visok nivo ekspresije *MT3* u zrelom embrionu heljde predstavlja preventivnu reakciju, da ukoliko dođe do povećanja ROS ćelija može za kratko vreme da sintetiše protein koji će ih ukloniti i sprečiti prevremenu germinaciju. U uslovima koji pogoduju klijanju, ROS predstavljaju važan signalni molekul i doprinose razgradnji rezervnih proteina u cilju mobilizacije azota i aktiviraju germinaciju. Ovo je u skladu sa prethodnim rezultatima (Brkljacic, 2003) gde se transkripti za MT3 u klijancima nađeni u maloj količini.

5.2.2. Analiza ekspresije MT3 tokom delovanja faktora abiotičkog stresa

Biljke su neprekidno izložene delovanju različitih abiotičkih faktora stresa. Kao rezultat klimatskih i drugih promena u životnoj sredini, ovi faktori, koji ih prate, glavni su uzročnici smanjenja prinosa gajenih biljaka. Zato postoji veliki interes za izučavanjem procesa uključenih u odbranu biljaka od stresa, u cilju stvaranja otpornih varijeteta. U osnovi mnogih abiotičkih stresova, kao što su: suša, poplave, visoke i niske temperature, stres solima i delovanje teških metala kao posledica narušavanja metaboličke ravnoteže ćelija javlja se povećanje ROS. (Miller et al., 2009). Produkcija i prisustvo ROS u ćelijama dugo je smatrano sporednim, štetnim produktom koji se javlja tokom stresa ili kao posledica aerobnog metabolizma. Tokom evolucije biljke su razvile niz adaptacionih mehanizama u cilju prevazilaženja štetnog uticaja ROS, i počele su da koriste neke od ovih molekula kao posrednike u transdukciji signala (Miller et al., 2008). Novija istraživanja govore o dvostrukoj ulozi ROS, kao toksičnih molekula sa jedne strane, i kao ključnih regulatora mnogih bioloških procesa kao što su rast, ćelijski ciklus, programirana ćelijska smrt, "hormon- signaling", odgovor na stres (Buchanan-Wollaston et al., 2005; Foyer and Noctor, 2005), sa druge strane.

Senescencija kod biljaka je visoko regulisan proces tokom koga cela biljka ili neki njeni delovi podležu odumiranju. Tokom senescencije dolazi do pada metaboličkih aktivnosti i ćelijskog propadanja. Ćelijska degradacija uključuje razgradnju njenih elemenata i redistribuciju produkata degradacije u delove biljke koji ne podležu senescenciji. Pošto je prirodna senescencija listova, na kojima se senescencija najčešće izučava, proces koji nije sinhronizovan u biljci, čak su prisutna odstupanja na ćelijskom nivou unutar jednog lista, u eksperimentima se koristi **mrakom izazvana senescencija** kao model. Iako se na ovaj način dobija ujednačen odgovor biljke na stres, senescencija izazvana mrakom je povezana sa "gladovanjem" biljke usled odsustva fotosinteze, koja je u prirodnoj senescenciji donekle očuvana. Da bi prezivele period bez svetlosti biljke obezbeđuju energiju na račun lipolize, što se dešava oko trećeg dana držanja biljke u

mraku, kada se uočava i prvi skok u ekspresiji MT3. U ovom periodu pored lipolize dešavaju se i drugi katabolički procesi praćeni porastom ROS, MT3 bi u ovom procesu imao ulogu antioksidativnog molekula u pokušaju da se spreče oštećenja tkiva. Maksimum ekspresije MT3 uočen je petog dana, kada započinju intenzivniji procesi razgradnje unutar ćelija. Tokom degradacije ćelija dolazi i do oslobađanja jona esencijalnih metala koji bi mogli biti uklanjani i redistribuirani u druga tkiva posredstvom MT3 (Buchanan-Wollaston et al., 2005).

Pored toga što je svetlost izvor energije tokom fotosinteze i aktivni morfogenetski signal kod biljaka, svetlost velike jačine, tačnije UV deo spektra, je glavni izvor oštećenja biljnih ćelija. Na nivou cele biljke posledice delovanja ovog stresa se ogledaju u padu intenziteta fotosinteze i promenama u metabolizmu ugljenika i azota. Mesto gde se dešavaju najveća oštećenja fotooksidativne prirode jesu hloroplasti, ali i drugi ćelijski kompartmani, kao mitohondrije, trpe oštećenja. Da bi održale normalno funkcionisanje ćelija tokom **UV stresa**, biljke su razvile niz fotoprotektivnih mehanizama koji uključuju: sprečavanje stvaranja ROS, njegovo uklanjanje i popravku oštećenja koja su eventualno nastala u ćelijama. Učesnici u ovim procesima su proteini, antioksidativni enzimi kao i neenzimatski molekuli kao što su karotenoidi, tokoferol, antocijanini i flavonoidi (Kreft et al., 2002; Jovanovic et al., 2006). Jedan od flavonoida kvercetinog tipa, koji se sintetiše u listovima heljde kao odgovor na povećano UV zračenje je rutin. Njegova sinteza u listovima se tokom izlaganja pojačanom UV zračenju povećava dva puta u odnosu na kontrolne biljke koje su rasle u uslovima normalne osvetljenosti (Kreft et al., 2002). Ovaj porast sadržaja rutina se dešava brzo i možda predstavlja razlog pada ekspresije MT3 u listovima heljde tokom UV stresa. Naime, tokom UV stresa pada fotosintetska aktivnost, pa ćelija, obarajući transkripciju gena za MT, štedi energiju, a povećava sintezu rutina koji je efikasniji u odbrani od ovakvog stresa (Kreft et al., 2002; Rozema et al., 2002).

Mehaničke povrede biljaka dešavaju se usled napada patogena, pre svega insekata ili kao posledica delovanja nekih faktora spoljašnje sredine: vetar, herbivorne životinje itd. Pratilac mehaničkih povreda je nagli skok koncentracije vodonik-peroksida u ćelijama oko mesta povrede. Vodonik-peroksid ima signalnu i efektorsku ulogu u ovom stresu i time se može objasniti početni pad u ekspresiji gena za MT3 koji ima sposobnost da ga uklanja iz ćelije (**Slika 12**) (Mika et al.).

Sinteza MT3 kasni da bi dozvolila peroksidu da obavi svoju dvojaku funkciju, kao deo signalnog puta vezanog za jasmonat, i kao toksično jedinjenje u direktnoj odbrani od napadača (insekata). Međutim, delovanje vodonik-peroksida u dužem vremenskom periodu i u povećanoj koncentraciji postaje štetno, i potrebno ga je ukloniti čime se objašnjava nagli porast ekspresije MT3 posle 3 h od povređivanja. Da MT3 ima ulogu tokom mehaničkog stresa ukazuju i rezultati kompjuterske analize promotora za *FeMT3* (PLACE) u kome su pronađeni WAR (wounding activating region) elementi, SRE (stress response element) kao i JERE (jasmonat elicitor response element) (Nikolić neobjavljeni podaci). Salicilna kiselina (SA), pored jasmonata, je ključni hormon u odbrani biljaka od napada patogena koji uključuje i mehaničke povrede. U eksperimentima analize ekspresije *FeMT3* pod uticajem SA nije dobijena statistički značajna promena u nivou ekspresije (**Slika 15 B**). Podatak o ulozi jasmonata, kao važnog hormona u odgovoru na mehanička oštećenja biljke, na ekspresiju MT3 heljde i funkcionalna analiza promotora gena za MT3 razjasniće mesto i tačnu ulogu ovog proteina u datom stresu.

Globalne klimatske promene koje uključuju porast temperature vazduha i produžavanje godišnjih sušnih perioda u umerenim klimatskim zonama, predstavljaju glavni limitirajući faktor u savremenoj poljoprivredi. Zato postoji veliki interes za stvaranje i pronalaženje otpornih varijeteta kao i rasvetljavanje fundamentalnih procesa vezanih za **sušu** kao abiotički stres. Aklimacija biljaka na promenjene uslove spoljašnje sredine predstavlja promenu ćelijske homeostaze koja se postiže preko delikatnog balansa između višestrukih biohemijskih procesa smeštenih u posebnim kompartmanima ćelije. Suša predstavlja kompleksni abiotički stres u čijoj osnovi je pad vodnog potencijala u ćelijama biljaka i produkcija ROS. Prvi fiziološki odgovor biljke na smanjeni sadržaj vode u zemljištu je zatvaranje stoma. Kao i u većini abiotičkih stresova akumulacija ROS u ćelijama zavisi od finog balansa između njegove produkcije i uklanjanja posredstvom različitih mehanizama (enzimskih i neenzimskih) (Pitzschke et al., 2006). Uloga ROS u suši je takođe dvojna, aktivno generisane ROS predstavljaju činioce oksidativnog stresa, a sa druge strane metabolički imbalance u ćelijama stvara ROS koji služe kao signalni molekuli u aklimaciji i odbrambenim mehanizmima protiv oksidativnog stresa (Miller et al., 2009). Glavni akteri u regulisanju ove ravnoteže su enzimi (superoksid dismutaze, katalaze, askorbat peroksidaze, glutathion peroksidaze) i neenzimski antioksidansi kao

askorbinska kiselina, tokoferol, glutation (Apel and Hirt, 2004; Mittler et al., 2004). U ovom radu ispitivan je uticaj suše na ekspresiju gena za MT3 u listovima heljde. Postavljena su dva ogleda, pri čemu je u prvom uzorkovanje listova vršeno nakon 15 dana od prestanka zalivanja i ekspresija je praćena u mladim, zrelim i starim listovima (**Slika 13 A**) dok je u drugom eksperimentu uzorkovanje vršeno nakon 3, 5, 9 i 15 dana i analizirani su samo mladi i zreli listovi (**Slika 13 B**). U oba slučaja detektovan je značajan skok ekspresije nakon 15 dana od početka tretmana (**Slika 13 A i B**). Najveći porast u ekspresiji zapažen je 15 dana u zrelim listovima (3.1 puta u odnosu na zalivane kontrolne biljke). Ovo je u skladu i sa relativnim sadržajem vode (RWC) izmerenim u svakoj grupi listova koji je fiziološki pokazatelj stresa, gde su zreli listovi imali veći gubitak vode u odnosu na mlade listove. U starim listovima sa niskim sadržajem vode, zaustavljena je transkripcija svih gena, kako konstitutivno eksprimiranih histona, tako i metalotioneina. Uloga MT3 u ovom stresu je istovetna ulozi MT u drugim abiotičkim stresovima povezanim sa oksidativnim disbalansom- kao „odstranjivač“ ROS, regulišući njihovu koncentraciju u ćeliji (Mir et al., 2004; Gorinova et al., 2007; Berta et al., 2009). MT3 bi takođe mogao biti učesnik u „peroksid sensing-u“ (Linder and Hazegh-Azam, 1996; van Montfort et al., 2003) koji je otkriven kod humanog proteina tirozin fosfataze, koji učestvuje u percepciji H_2O_2 putem oksidacije tiolnih grupa cisteina u aktivnom mestu, pri čemu se enzim inaktivira i izostaje njegova efektorska uloga. Proces inaktivacije je reverzibilan a u procesu aktivacije/redukcije tiolnih grupa učestvuje glutation i metalotionein. Ulogu u regulaciji aktivnosti proteina preko redoks regulacije FeMT3 bi mogao da ima i u ćelijama mezofila lista, a u vezi sa redukcijom proteina respiratornog lanca PSI, koji su pod dejstvom ROS oksidovani i parcijalno ili potpuno inaktivirani. Takođe, u ćelijama stoma, slično humanoj tirozin fosfatazi, GCA2 (guard cell associated protein 2) učestvuje u percepciji H_2O_2 koji nastaje usled delovanja ABA i pada vodnog potencijala u ovim ćelijama. Ovaj protein je deo signalne kaskade koja se završava aktivacijom Ca^{++} kanala na membrani stominih ćelija, što kao krajnju konsekvencu ima zatvaranje stoma. Pošto je *in situ* hibridizacijom pokazano prisustvo MT3 transkripta u ćelijama zatvaračicama stoma (**Slika 9**), moguća uloga ovog proteina, pored njegove sposobnosti da uklanja ROS bila bi i redukcija proteina uključenih u signaling preko oksidoredukujućeg ciklusa MT/T-GSH/GSSG. (videti Uvod sliku 2).

5.3. Uloga FeMT3 u oksidativnom stresu.

Već je pomenuto i diskutovano da je pratilac abiotičkih i biotičkih stresova oksidativni stres koji uključuje produkciju ROS u ćelijama. U biljkama se reaktivne kiseonične vrste (ROS), kao što su superoksid ($O_2^{\cdot-}$), vodonikperoksid (H_2O_2) i hidroksil radikal ($OH^{\cdot}$), stvaraju konstantno kao sporedni produkti u metabolizmu kiseonika, u različitim ćelijskim kompartmanima. Pod fiziološkim, “steady-state” uslovima, ovi molekuli se uklanjaju tokom antioksidativnih procesa. Balans između produkcije i uklanjanja ROS može biti poremećen posredstvom različitih sredinskih faktora. Kao rezultat poremećaja ove ravnoteže koncentracija ROS naglo raste i nastaje **oksidativni stres**. Štetni efekti ovih visokoreaktivnih molekula na nivou ćelije su: oštećenje DNK, oksidacija polinezasićenih masnih kiselina i lipida, oksidacija aminokiselina u proteinima, inaktivacija enzima preko oksidacije kofaktora. Ćelije su razvile sofisticirane strategije za uklanjanje ROS. Postoje dva osnovne grupe molekula koje uklanjaju ROS, to su enzimi i neenzimski antioksidansi. U ovom radu pokazana je da se gen za MT3 heljde pojačano eksprimira pod dejstvom oksidativnog stresa (**Slika 14.**). Nakon 4h od potapanja listova u rastvor vodonik-peroksida uočava se porast transkripcije od 2.4 puta u odnosu na kontrolu, dok se nakon 24h delovanja ekspresija vraća na nivo kontrole. Ovo se može objasniti toksičnim delovanjem peroksida tokom dužeg vremenskog perioda. Pored uticaja na nivo ekspresije gena za MT3 heljde, u ovom radu je pokazano da FeMT3 sintetisan u ćelijama kvasaca *S. cerevisiae*, mutiranim za sopstveni MT (*cup1*), povećava toleranciju na vodonik-peroksid (**Slika 16.**). Najveća razlika u preživljavanju između kontrolnih i tretiranih *cup1Δ* kvasaca uočena je pri koncentracijama H_2O_2 od 2mM i 3mM, dok je 5mM H_2O_2 toksičan za oba soja. Ovo je direktan dokaz da FeMT3 u *in vivo* sistemu funkcioniše kao “odstranjivač” ROS. Takođe, u istom kvašćevom sistemu pokazana je i sposobnost FeMT3 da vezuje jone metala, bakra i kadmijuma (**Slika 16**). Ova sposobnost FeMT3 je za biljke važna kako sa stanovišta homeostaze metala kao mikronutrijenata tako i u kontekstu

zaštite od oksidativnog stresa. U skladu sa antioksidativnom ulogom, količina MT3 bi se povećavala tokom aktivnosti koje zahtevaju povećanu produkciju slobodnih radikala. Bakar je esencijalan element koji služi kao kofaktor brojnim enzimima među kojima su i citohromoksidaza i SOD (Linder and Hazegh-Azam, 1996). Funkcija bakra je uglavnom vezana za njegovu multiplu valencu (Cu^+ i Cu^{++}) koja ga čini sposobnim da učestvuje u reakcijama redoks ciklusa. Pod aerobnim uslovima Cu^+ može reagovati sa OH^- molekulskim kiseonikom i dati O_2^- , dok u prisustvu H_2O_2 generiše radikale koji su sposobni da iniciraju oštećenja nukleinskih kiselina, proteina, lipida. Ćelijska sredina bogata askorbatom i tiolima pruža izvanredne redukujuće uslove za konstantno odvijanje ovakvih reakcija i stoga je za zaštitu ćelije neophodna uspešna sekvestracija Cu^+ čime bi se sprečilo njegovo učešće u slučajnim i nekontrolisanim redoks ciklusima. Na biljkama postoji sve više studija koje obrađuju tzv. "ROS scavenging" svojstva MT u mnogim stresnim i fiziološkim uslovima (Mir et al., 2004; Domenech et al., 2007; Xue et al., 2009).

Opšti zaključak, autora pomenutih radova, kao i ove studije, je da MT biljaka mogu imati važnu ulogu u odbrani od oksidativnog stresa, ali da takođe mogu biti i fini regulatori koncentracije ROS kada oni učestvuju u prenošenju signala. Pretpostavlja se da ovu ulogu obavljaju na dva načina, preko vezivanja tranzijentnih metala, generatora ROS i direktnim uklanjanjem ROS.

6. ZAKLJUČCI

1. Iz biblioteke cDNK semena heljde u razviću, izolovana su dva klona cDNK *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. 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 razlikama u tri aminokiseline (serin/fenilalanin, na poziciji 11; izoleucin/treonin na poziciji 28 i alanin/valin na poziciji 32). Najznačajnija je razlika u dužini 3'UTR između dva klona koja iznosi 65 bp za klon *FeMT3.5* i 229 bp za klon *FeMT3.10*.
2. Poređenjem na nivou izvedenih aminokiselinskih sekvenci pokazan je visok stepen kako međusobne homologije (95%), tako i sa metalotioneinima tipa 3 različitih biljnih vrsta uključujući golosemenice i monokotile, naročito u metal-vezujućim domenima. Konzervisanost strukture u filogenetski udaljenim taksonima, govori da su MT3 nastali rano u evoluciji, kod zajedničkog pretka. Analiza evolutivnih odnosa ove klase proteina, pokazala je najveću srodnost između *FeMT3* i predstavnika MT3 poreklom iz familije *Brassicaceae*.
3. Korišćenjem kompjuterske predikcije određena je sekundarna struktura *FeMT3* polipeptida koja odgovara modelu „gimnastičkog tega“.
4. Pokazano je da se *FeMT3* eksprimira tokom različitih faza razvića semena (sa maksimumom ekspresije 9-19 dana nakon cvetanja), kao i u listu, cvetu, stablu i korenu. Transkripti gena za MT3 heljde lokalizovani su u sprovodnom sistemu

korena; stominim ćelijama, mezofilu i sprovodnim elementima lista, kao i u ćelijama embriona iz srednje faze semena u razviću.

5. Utvrđeno je povećanje nivoa transkripcije *FeMT3* u listovima heljde kod biljaka izlaganih suši, oksidativnom stresu, mraku i mehaničkim povredama. Pad u nivou ekspresije registrovan je nakon tretmana UV zračenjem, dok abscisinska i salicilna kiselina ne utiču značajno na ekspresiju ispitivanog gena.
6. U *in vivo* esejima u kojima su korišćeni *cup1Δ* mutanti kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji ekspimiraju *FeMT3*, dokazana je njegova sposobnost da vezuje jone bakra i kadmijuma i učestvuje u odbrani ćelija od oksidativnih oštećenja.

7. REFERENCE

- Abdullah SNA, Cheah SC, Denis JM. Isolation and characterisation of two divergent type 3 metallothioneins from oil palm, *Elaeis guineensis*. 2002;40:255-263.
- Akashi K, Nishimura N, Ishida Y, Yokota A. **Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon.** Biochem Biophys Res Commun, 2004;323:72-8
- Andersen SU, Algreen-Petersen RG, Hoedl M, Jurkiewicz A, Cvitanich C, Braunschweig U, Schauser L, Oh SA, Twell D, Jensen EO. **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, 2007;58:3657-70
- Apel K, Hirt H. **Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction.** Annu Rev Plant Biol, 2004;55:373-99
- Atkins S. Inorganic Chemistry. - 1999;Fourth edition:-.
- Berta M, Giovannelli A, Potenza E, Traversi ML, Racchi ML. **Type 3 metallothioneins respond to water deficit in leaf and in the cambial zone of white poplar (*Populus alba*).** J Plant Physiol, 2009;166:521-30
- Bilecen K, Ozturk UH, Duru AD, Sutlu T, Petoukhov MV, Svergun DI, Koch MH, Sezerman UO, Cakmak I, Sayers Z. **Triticum durum metallothionein. Isolation of the gene and structural characterization of the protein using solution scattering and molecular modeling.** J Biol Chem, 2005;280:13701-11 OD - 2005/01/06
- Bratic AM, Majic DB, Samardzic JT, Maksimovic VR. **Functional analysis of the buckwheat metallothionein promoter: tissue specificity pattern and up-regulation under complex stress stimuli.** J Plant Physiol, 2009;166:996-1000
- Bremner I. **Nutritional and physiological significance of metallothionein.** Experientia Suppl, 1987;52:81-107

- Brkljacic J. Kloniranje i analiza regulacije ekspresije gena za metalotionein heljde (*Fagopyrum esculentum* Moench). 2003;
- Brkljacic JM, Maksimovic VR, Radovic SR, P. S, A. **Isolation of metallothionein-like cDNA clone from buckwheat.** J Plant Physiol, 1999;154:802-804
- Brkljacic JM, Samardzic JT, Timotijevic GS, Maksimovic VR. **Expression analysis of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) metallothionein-like gene (MT3) under different stress and physiological conditions.** J Plant Physiol, 2004;161:741-6
- Brouwer M, Hoexum-Brouwer T, Cashion RE. **A putative glutathione-binding site in CdZn-metallothionein identified by equilibrium binding and molecular-modelling studies.** Biochem J, 1993;294 (Pt 1):219-25 OD - 1993/08/15
- Buchanan-Wollaston V. **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, 1994;105:839-46 OD - 1994/07/01
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ. **Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*.** Plant J, 2005;42:567-85
- Chatthai M, Kaukinen KH, Tranbarger TJ, Gupta PK, Misra S. **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, 1997;34:243-54 OD - 1997/05/01
- Chatthai M, Osusky M, Osuska L, Yevtushenko D, Misra S. **Functional analysis of a Douglas-fir metallothionein-like gene promoter: transient assays in zygotic and somatic embryos and stable transformation in transgenic tobacco.** Planta, 2004;220:118-28 OD - 2004/09/07
- Chattopadhyay S, Puente P, Deng XW, Wei N. **Combinatorial interaction of light-responsive elements plays a critical role in determining the response characteristics of light-regulated promoters in *Arabidopsis*.** Plant J, 1998;15:69-77 OD - 1998/09/23
- Chen Y, Maret W. **Catalytic selenols couple the redox cycles of metallothionein and glutathione.** Eur J Biochem, 2001;268:3346-53

- Cherian MG, Huang PC, Klaassen CD, Liu YP, Longfellow DG, Waalkes MP. **National Cancer Institute workshop on the possible roles of metallothionein in carcinogenesis.** Cancer Res, 1993;53:922-5 OD - 1993/02/15
- Cho SH, Hoang QT, Kim YY, Shin HY, Ok SH, Bae JM, Shin JS. **Proteome analysis of gametophores identified a metallothionein involved in various abiotic stress responses in *Physcomitrella patens*.** Plant Cell Rep, 2006;25:475-88
- Cobbett C, Goldsbrough P. **Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis.** Annu Rev Plant Biol, 2002;53:159-82
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. **Metallothionein: the multipurpose protein.** Cell Mol Life Sci, 2002;59:627-47
- Dalcorso G, Farinati S, Furini A. **Regulatory networks of cadmium stress in plants.** Plant Signal Behav, 5:
- Dallinger R, Chabicovsky M, Lagg B, Schipflinger R, Weirich HG, Berger B. **Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. II. A differential biomarker approach under laboratory and field conditions.** Environ Toxicol Chem, 2004;23:902-10
- Dalton T, Palmiter RD, Andrews GK. **Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factor/antioxidant response element and metal response promoter elements.** Nucleic Acids Res, 1994;22:5016-23
- de Framond AJ. **A metallothionein-like gene from maize (*Zea mays*). Cloning and characterization.** FEBS Lett, 1991;290:103-106
- De Gara L, Locato V, Dipierro S, de Pinto MC. **Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production.** Respir Physiol Neurobiol,
- de Miranda JR, Thomas MA, Thurman DA, Tomsett AB. **Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*.** FEBS Lett, 1990;260:277-80 OD - 1990/01/29
- Domenech J, Mir G, Huguet G, Capdevila M, Molinas M, Atrian S. **Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding.** Biochimie, 2006;88:583-93
- Domenech J, Orihuela R, Mir G, Molinas M, Atrian S, Capdevila M. **The Cd(II)-binding abilities of recombinant *Quercus suber* metallothionein: bridging the gap between phytochelatin and metallothioneins.** J Biol Inorg Chem, 2007;12:867-82 OD - 2007/05/16

- Doyle JJ, Doyle JL. **A rapid RNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue.** Phytochem. Bull, 1987;19:11-15
- Eapen S, D'Souza SF. **Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals.** Biotechnol Adv, 2005;23:97-114
- Evans KM, Gatehouse JA, Lindsay WP, Shi J, Tommey AM, Robinson NJ. **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, 1992;20:1019-28 OD - 1992/12/01
- Fabisiak JP, Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Korotaeva A, Pitt BR, Lazo JS, Kagan VE. **Redox regulation of copper-metallothionein.** Arch Biochem Biophys, 1999;363:171-81
- Farina KL, Huttelmaier S, Musunuru K, Darnell R, Singer RH. **Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment.** J Cell Biol, 2003;160:77-87
- Foley RC, Singh KB. **Isolation of a Vicia faba metallothionein-like gene: expression in foliar trichomes.** Plant Mol Biol, 1994;26:435-44
- Fordham-Skelton AP, Lilley C, Urwin PE, Robinson NJ. **GUS expression in Arabidopsis directed by 5' regions of the pea metallothionein-like gene PsMTA.** Plant Mol Biol, 1997;34:659-68 OD - 1997/07/01
- Foyer CH, Noctor G. **Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses.** Plant Cell, 2005;17:1866-75
- Freisinger E. **Plant MTs-long neglected members of the metallothionein superfamily.** Dalton Trans, 2008;6663-75 OD - 2009/01/21
- Furumoto T, Hata S, Izui K. **Isolation and characterization of cDNAs for differentially accumulated transcripts between mesophyll cells and bundle sheath strands of maize leaves.** Plant Cell Physiol, 2000;41:1200-9
- Garcia-Hernandez M, Murphy A, Taiz L. **Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in Arabidopsis.** Plant Physiol, 1998;118:387-97
- Glerum DM, Muroff I, Jin C, Tzagoloff A. **COX15 codes for a mitochondrial protein essential for the assembly of yeast cytochrome oxidase.** J Biol Chem, 1997;272:19088-94

- Glerum DM, Tzagoloff A. **Submitochondrial distributions and stabilities of subunits 4, 5, and 6 of yeast cytochrome oxidase in assembly defective mutants.** FEBS Lett, 1997;412:410-4
- Gorinova N, Nedkovska M, Todorovska E, Simova-Stoilova L, Stoyanova Z, Georgieva K, Demirevska-Kepova K, Atanasov A, Herzig R. **Improved phytoaccumulation of cadmium by genetically modified tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Physiological and biochemical response of the transformants to cadmium toxicity.** Environ Pollut, 2007;145:161-70
- Gratao PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA. **Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier.** Functional Plant Biology, 2005;32:481-494
- Guo WJ, Meetam M, Goldsbrough PB. **Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance.** Plant Physiol, 2008;146:1697-706 OD - 2008/02/22
- Guo W-J, Bundithya W, Goldsbrough PB. **Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper.** New Phytologist, 2003;159:369-381
- Hamer DH. **Metallothionein.** Annu Rev Biochem, 1986;55:913-51
- Hanas JS, Gunn CG. **Inhibition of transcription factor IIIA-DNA interactions by xenobiotic metal ions.** Nucleic Acids Res, 1996;24:924-30
- Haq F, Mahoney M, Koropatnick J. **Signaling events for metallothionein induction.** Mutat Res, 2003;533:211-26 OD - 2003/12/04
- Hassinen VH, Tuomainen M, Peraniemi S, Schat H, Karenlampi SO, Tervahauta AI. **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, 2009;60:187-96
- Hesketh JE. **mRNA targeting: signals in the 3'-untranslated sequences for sorting of some mRNAs.** Biochem Soc Trans, 1996;24:521-7
- Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF. **Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum.** Science, 1992;257:1496-502
- Jovanovic ZS, Milosevic JD, Radovic SR. **Antioxidative enzymes in the response of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* moench) to ultraviolet B radiation.** J Agric Food Chem, 2006;54:9472-8
- Kagi JH, Schaffer A. **Biochemistry of metallothionein.** Biochemistry, 1988;27:8509-15

- Kawashima I, Kennedy TD, Chino M, Lane BG. **Wheat Ec metallothionein genes. Like mammalian Zn²⁺ metallothionein genes, wheat Zn²⁺ metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis.** Eur J Biochem, 1992;209:971-6
- Kille P, Winge DR, Harwood JL, Kay J. **A plant metallothionein produced in E. coli.** FEBS Lett, 1991;295:171-5 OD - 1991/12/16
- Klassen CD. Metallothionein IV. Basel 1999;
- Koizumi S, Suzuki K, Ogra Y, Yamada H, Otsuka F. **Transcriptional activity and regulatory protein binding of metal-responsive elements of the human metallothionein-IIA gene.** Eur J Biochem, 1999;259:635-42
- Kojima Y, Binz PA, K  agi JHR. Metallothionein IV. Basel 1999;
- Kolla VA, Vavasseur A, Raghavendra AS. **Hydrogen peroxide production is an early event during bicarbonate induced stomatal closure in abaxial epidermis of Arabidopsis.** Planta, 2007;225:1421-9
- Koumura A, Kakefuda K, Honda A, Ito Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Uchida Y, Hozumi I, Satoh M, Inuzuka T, Hara H. **Metallothionein-3 deficient mice exhibit abnormalities of psychological behaviors.** Neurosci Lett, 2009;467:11-4
- Kreft S, Strukelj B, Gaberscik A, Kreft I. **Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method.** J Exp Bot, 2002;53:1801-4
- Kumar KS, Dayananda S, Subramanyam C. **Copper alone, but not oxidative stress, induces copper-metallothionein gene in Neurospora crassa.** FEMS Microbiol Lett, 2005;242:45-50
- Laplaze L, Gherbi H, Duhoux E, Pawlowski K, Auguy F, Guermache F, Franche C, Bogusz D. **Symbiotic and non-symbiotic expression of cgMT1, a metallothionein-like gene from the actinorhizal tree Casuarina glauca.** Plant Mol Biol, 2002;49:81-92
- Lee J, Shim D, Song WY, Hwang I, Lee Y. **Arabidopsis metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in Vicia faba guard cells.** Plant Mol Biol, 2004;54:805-15
- Lerch K. **Copper metallothionein, a copper-binding protein from Neurospora crassa.** Nature, 1980;284:368-70
- Levadoux-Martin M, Hesketh JE, Beattie JH, Wallace HM. **Influence of metallothionein-1 localization on its function.** Biochem J, 2001;355:473-9 OD - 2001/04/04

- Lichtlen P, Schaffner W. **The "metal transcription factor" MTF-1: biological facts and medical implications.** Swiss Med Wkly, 2001;131:647-52
- Linder MC, Hazegh-Azam M. **Copper biochemistry and molecular biology.** Am J Clin Nutr, 1996;63:797S-811S
- Liu P, Goh CJ, Loh CS, Pua EC. **Differential expression and characterization of three metallothionein-like genes in Cavendish banana (*Musa acuminata*).** Physiol Plant, 2002;114:241-250 OD - 2002/03/21
- Loke JC, Stahlberg EA, Strenski DG, Haas BJ, Wood PC, Li QQ. **Compilation of mRNA polyadenylation signals in Arabidopsis revealed a new signal element and potential secondary structures.** Plant Physiol, 2005;138:1457-68
- Lu S, Gu H, Yuan X, Wang X, Wu AM, Qu L, Liu JY. **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, 2007;16:177-91
- Maret W, Larsen KS, Vallee BL. **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, 1997;94:2233-7 OD - 1997/03/18
- Maret W, Vallee BL. **Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters.** Proc Natl Acad Sci U S A, 1998;95:3478-82
- Maret W, Heffron G, Hill HA, Djuricic D, Jiang LJ, Vallee BL. **The ATP/metallothionein interaction: NMR and STM.** Biochemistry, 2002;41:1689-94
- Menkens AE, Schindler U, Cashmore AR. **The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins.** Trends Biochem Sci, 1995;20:506-10 OD - 1995/12/01
- Mika A, Boenisch MJ, Hopff D, Luthje S. **Membrane-bound guaiacol peroxidases from maize (*Zea mays* L.) roots are regulated by methyl jasmonate, salicylic acid, and pathogen elicitors.** J Exp Bot, 61:831-41
- Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V. **Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins.** Crit Rev Biochem Mol Biol, 2000;35:35-70
- Miller G, Shulaev V, Mittler R. **Reactive oxygen signaling and abiotic stress.** Physiol Plant, 2008;133:481-9

- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. **Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses.** Plant Cell Environ, 2009;
- Mir G, Domenech J, Huguet G, Guo WJ, Goldsbrough P, Atrian S, Molinas M. **A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress.** J Exp Bot, 2004;55:2483-93
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. **Reactive oxygen gene network of plants.** Trends Plant Sci, 2004;9:490-8
- Moriguchi T, Kita M, Hisada S, Endo-Inagaki T, Omura M. **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, 1998;211:221-7 OD - 1998/06/18
- Morrissey J, Baxter IR, Lee J, Li L, Lahner B, Grotz N, Kaplan J, Salt DE, Guerinot ML. **The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in Arabidopsis.** Plant Cell, 2009;21:3326-38
- Ngu TT, Stillman MJ. **Metalation of metallothioneins.** IUBMB Life, 2009;61:438-46 OD - 2009/03/26
- Nielson KB, Winge DR. **Independence of the domains of metallothionein in metal binding.** J Biol Chem, 1985;260:8698-701 OD - 1985/07/25
- Nikolic DB, Samardzic JT, Bratic AM, Radin IP, Gavrilovic SP, Rausch T, Maksimovic VR. **Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) FeMT3 Gene in Heavy Metal Stress: Protective Role of the Protein and Inducibility of the Promoter Region under Cu(2+) and Cd(2+) Treatments.** J Agric Food Chem,
- Obertello M, Wall L, Laplaze L, Nicole M, Auguy F, Gherbi H, Bogusz D, Franche C. **Functional analysis of the metallothionein gene cgMT1 isolated from the actinorhizal tree *Casuarina glauca*.** Mol Plant Microbe Interact, 2007;20:1231-40 OD - 2007/10/09
- Oikawa S, Kurasaki M, Kojima Y, Kawanishi S. **Oxidative and nonoxidative mechanisms of site-specific DNA cleavage induced by copper-containing metallothioneins.** Biochemistry, 1995;34:8763-70
- Oracz K, El-Maarouf Bouteau H, Farrant JM, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau F, Bailly C. **ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation.** Plant J, 2007;50:452-65
- Palmiter RD. **Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1.** Proc Natl Acad Sci U S A, 1994;91:1219-23

- Palmiter RD. **The elusive function of metallothioneins.** Proc Natl Acad Sci U S A, 1998;95:8428-30
- Palumaa P, Mackay EA, Vasak M. **Nonoxidative cadmium-dependent dimerization of Cd7-metallothionein from rabbit liver.** Biochemistry, 1992;31:2181-6
- Peroza EA, Freisinger E. **Metal ion binding properties of Triticum [corrected] aestivum Ec-1 metallothionein: evidence supporting two separate metal thiolate clusters.** J Biol Inorg Chem, 2007;12:377-91 OD - 2007/01/11
- Peroza EA, Kaabi AA, Meyer-Klaucke W, Wellenreuther G, Freisinger E. **The two distinctive metal ion binding domains of the wheat metallothionein Ec-1.** J Inorg Biochem, 2009;103:342-53 OD - 2008/12/30
- Pitzschke A, Forzani C, Hirt H. **Reactive oxygen species signaling in plants.** Antioxid Redox Signal, 2006;8:1757-64
- Plisov S, Merkulova TI, Shkapenko AL. **[Detection of a short segment of DNA, responsible for glucocorticoid regulation, in the 5'-flanking region on the murine metallothionein I gene].** Mol Biol (Mosk), 1994;28:407-12
- Posewitz MC, Wilcox DE. **Properties of the Sp1 zinc finger 3 peptide: coordination chemistry, redox reactions, and metal binding competition with metallothionein.** Chem Res Toxicol, 1995;8:1020-8
- Qi X, Zhang Y, Chai T. **Characterization of a novel plant promoter specifically induced by heavy metal and identification of the promoter regions conferring heavy metal responsiveness.** Plant Physiol, 2007;143:50-9 OD - 2006/07/25
- Quesada AR, Byrnes RW, Krezoski SO, Petering DH. **Direct reaction of H₂O₂ with sulfhydryl groups in HL-60 cells: zinc-metallothionein and other sites.** Arch Biochem Biophys, 1996;334:241-50
- Rausser WE. **Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins.** Cell Biochem Biophys, 1999;31:19-48
- Reichheld JH, Katz E, Banner BF, Szymanski IO, Saltzman JR, Bonkovsky HL. **The value of intravenous heme-albumin and plasmapheresis in reducing postoperative complications of orthotopic liver transplantation for erythropoietic protoporphyria.** Transplantation, 1999;67:922-8
- Robbins AH, McRee DE, Williamson M, Collett SA, Xuong NH, Furey WF, Wang BC, Stout CD. **Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution.** J Mol Biol, 1991;221:1269-93 OD - 1991/10/20

- Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ. **Plant metallothioneins**. *Biochem J*, 1993;295 (Pt 1):1-10
- Roosens NH, Leplae R, Bernard C, Verbruggen N. **Variations in plant metallothioneins: the heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as a study case**. *Planta*, 2005;222:716-29
- Rozema J, Bjorn LO, Bornman JF, Gaberscik A, Hader DP, Trost T, Germ M, Klisch M, Groniger A, Sinha RP, Lebert M, He YY, Buffoni-Hall R, de Bakker NV, van de Staaij J, Meijkamp BB. **The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems--an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds**. *J Photochem Photobiol B*, 2002;66:2-12
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. NY 1989;
- Savas MM, Shaw CF, 3rd, Petering DH. **The oxidation of rabbit liver metallothionein-II by 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and glutathione disulfide**. *J Inorg Biochem*, 1993;52:235-49
- Schultze P, Worgotter E, Braun W, Wagner G, Vasak M, Kagi JH, Wuthrich K. **Conformation of [Cd7]-metallothionein-2 from rat liver in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy**. *J Mol Biol*, 1988;203:251-68 OD - 1988/09/05
- Sirichandra C, Wasilewska A, Vlad F, Valon C, Leung J. **The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action**. *J Exp Bot*, 2009;60:1439-63
- Snowden KC, Richards KD, Gardner RC. **Aluminum-Induced Genes (Induction by Toxic Metals, Low Calcium, and Wounding and Pattern of Expression in Root Tips)**. *Plant Physiol*, 1995;107:341-348 OD - 1995/02/01
- Son YJ, Bae JY, Chong SH, Lee HS, Mo SH, Kim TY, Choe H. **Expression, High Cell Density Culture and Purification of Recombinant EC-SOD in *Escherichia coli***. *Appl Biochem Biotechnol*,
- Stillman MJ, Cai W, Zelazowski AJ. **Cadmium binding to metallothioneins. Domain specificity in reactions of alpha and beta fragments, apometallothionein, and zinc metallothionein with Cd²⁺**. *J Biol Chem*, 1987;262:4538-48 OD - 1987/04/05
- Thornalley PJ, Vasak M. **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*, 1985;827:36-44

- Tommey AM, Shi J, Lindsay WP, Urwin PE, Robinson NJ. **Expression of the pea gene PSMTA in E. coli. Metal-binding properties of the expressed protein.** FEBS Lett, 1991;292:48-52
- 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, 51:80-90
- van Hoof NA, Hassinen VH, Hakvoort HW, Ballintijn KF, Schat H, Verkleij JA, Ernst WH, Karenlampi SO, Tervahauta AI. **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, 2001;126:1519-26 OD - 2001/08/14
- van Montfort RL, Congreve M, Tisi D, Carr R, Jhoti H. **Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B.** Nature, 2003;423:773-7
- Vasak M, Hasler DW. **Metallothioneins: new functional and structural insights.** Curr Opin Chem Biol, 2000;4:177-83
- Vasak M, Hasler DW, Faller P. **Metal-thiolate clusters in neuronal growth inhibitory factor (GIF).** J Inorg Biochem, 2000;79:7-10
- von Wiren N, Khodr H, Hider RC. **Hydroxylated phytosiderophore species possess an enhanced chelate stability and affinity for iron(III).** Plant Physiol, 2000;124:1149-58
- Watanabe M, Suzuki T. **Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in *Euglena gracilis*.** Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2002;131:491-500
- Wen. **salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry.** Plant Sci, 2005;169:928-934
- Wong HL, Sakamoto T, Kawasaki T, Umemura K, Shimamoto K. **Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice.** Plant Physiol, 2004;135:1447-56
- Wu J, Zhang H, He PJ, Yao Q, Shao LM. **Cr(VI) removal from aqueous solution by dried activated sludge biomass.** J Hazard Mater, 176:697-703
- Xue T, Li X, Zhu W, Wu C, Yang G, Zheng C. **Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast.** J Exp Bot, 2009;60:339-49

- Zangger K, Oz G, Otvos JD, Armitage IM. **Three-dimensional solution structure of mouse [Cd7]-metallothionein-1 by homonuclear and heteronuclear NMR spectroscopy.** Protein Sci, 1999;8:2630-8 OD - 2000/01/13
- Zhang H, Jiang Y, He Z, Ma M. **Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*).** J Plant Physiol, 2005;162:977-84
- Zhigang A, Cuijie L, Yuangang Z, Yejie D, Wachter A, Gromes R, Rausch T. **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, 2006;57:3575-82
- Zhou GK, Xu YF, Liu JY. **Characterization of a rice class II metallothionein gene: tissue expression patterns and induction in response to abiotic factors.** J Plant Physiol, 2005;162:686-96
- Zhou J, Goldsbrough PB. **Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*.** Plant Cell, 1994;6:875-84 OD - 1994/06/01
- Zimeri AM, Dhankher OP, McCaig B, Meagher RB. **The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmiums and are required for cadmium tolerance and accumulation.** Plant Mol Biol, 2005;58:839-55

Универзитет у Београду
 БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
 ИНСТИТУТ ЗА ФИЗИОЛОГИЈУ И БИОХЕМИЈУ
 БИБЛИОТЕКА
 Инв. бр. 60077
 БЕОГРАД

