Utjecaj proteina ASR1 na solni i osmotski stres kod biljaka

Rogić, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2010

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:082294

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Utjecaj proteina ASR1 na solni i osmotski stres kod biljaka
The effects of ASR1 protein on salt and osmotic stress in plants

SEMINARSKI RAD

Tea Rogić
Preddiplomski studij Molekularne biologije
Mentor: doc.dr.sc. Biljana Balen
Zagreb, 2010.

SADRŽAJ

1 Uvod 4

2 Evolucijska prošlost porodice gena *asr* 7

2.1 Teorije o načinu divergencije genske porodice *asr* 7

2.2 Dokazi da su se *asr* geni razvili iz jedne porodice a ne jednog gena 7

2.3 Porodica gena *asr* u rajčici 8

2.4 Razvoj gena *asr1* 8

3 Struktura i funkcija proteina ASR1 10

3.1 Lokalizacija 10

3.2 ASR1 ima sposobnost vezanja na DNA 11

3.3 Jezgreni i citosolni oblici proteina 11

4 Abiotski stres – utjecaj na biljke 13

4.1 Odgovor biljaka na visok salinitet 13

4.1.1 Solni stres 13

5 Razina i regulacija ekspresije ASR1 nakon izlaganja biljke abiotskom stresu 14

5.1 ASR1 smanjuje neto nakupljanje Na^+ u stanicama 14

5.2 Prolin i peroksidaze 14

5.3 ASR1 je transkripcijski faktor 15

5.4 Uloga ASR1 kao hidrofilina 15

6 Sažetak 17

7 Summary 18

8 Literatura 19

POPIS KRATICA

ABA	abscizinska kiselina
AOS	aktivni kisikovi radikali
ASR1	abscizic acid stress ripening
NaCl	natrijev klorid
PEG	polietilen glikol
LEA	late embriogenesys abundant
Zn^{2+}	cink

1 Uvod

Biljke se suočavaju sa abiotičkim stresom na dnevnoj razini, što uključuje ekstremne varijacije u temperaturi, zračenju te neoptimalne razine minerala i vode. Salinitet i suša glavni su čimbenici abiotičkog stresa koji utječu na rast i produktivnost biljaka diljem svijeta, i vrlo često djeluju skupa. Biljke su, kao rezultat rasta u stresnim uvjetima koje im okoliš nameće, razvile spospobnost ispoljavanja širokog spektra odgovora na abiotički stres (kako bi preživjele uvjete stresa), što uključuje veliki broj fizioloških, biokemijskih i molekularnih promjena. Na primjer, izlaganje biljke solnom ili osmotskom stresu rezultira velikim promjenama u profilu genske ekspresije (Bray 1997, Hasegawa i sur. 2000, Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki 2000) koja je kontrolirana kroz mnoge stanične puteve, od kojih su neki ovisni o npr. biljnom hormonu abscizinskoj kiselini (ABA) (Bray 1997, Neill i Burnett 1999, Rock 2000, Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki 2000).

Geni regulirani stresom su osnova kontrole biljnog odgovora na stres. Stoga se znanost posvetila proučavanju biološke uloge genskih produkata, kako direktnim pristupom, tako i pomoću zaključivanja o funkciji tih produkata preko homologije njihovih sekvenci sa sekvencama prethodno istraživanih proteina (biljnog i ne-biljnog podrijetla). Ovako reguliran abiotički stres djeluje u gotovo svim apektima funkcije i metabolizma biljaka, uključujući provođenje signala, ionsku homeostazu, metabolizam ugljikohidrata i dušika, fotosintezu, rast i razvoj (Kalifa i sur. 2004b).

Uz proučavanje puteva prijenosa signala koji su inducirani stresom (Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki 2000; Xiong i Zhu 2001), u zadnje vrijeme posvećen je poseban interes enzimima koji kataliziraju sintezu osmolita (organske molekule niske molekulske mase koje se akumuliraju u odgovoru na stres) (Hare, Cress i Van Staden 1998; Bohnert i Shen, 1999), zaštitnim proteinima (Hasegawa i sur. 2000), enzimima uključenim u razgradnju aktivnih kisikovih radikala (AOS) koji se nakupljaju nakon izlaganja biljke stresu (Bohnert i Sheveleva 1998), te sustavima za transport iona i vode (Blumwald 2000; Johansson i sur. 2000)

Značajan broj gena koji su regulirani solnim stresom (gotovo pola), kodira za proteine čija se funkcija ne može predvidjeti iz njihove primarne strukture (aminokiselinske sekvence) (Aubourg i Rouze 2001; Bohnert, Ayoubi i sur. 2001), stoga se biološka uloga tih proteina tek treba utvrditi (Ingram i Bartels 1996; Bray 1997; Hasegawa i sur. 2000). Dešifriranje puteva u kojima ti, stresom regulirani proteini, djeluju pomoći će u razvoju transgeničnih biljaka koje imaju povećanu toleranciju na salinitet i sušu.

Gen *asr1* (*abscizic acid stress ripening*) je jedan od biljno-specifičnih gena reguliranih stresom čija se uloga ne može zaključiti iz homologije njegove sekvence sa sekvencama prethodno proučavanih proteina. U rajčici, ASR1 spada u malenu gensku porodicu (Iusem i sur. 1993; Amitai-Zeigerson 1994; Rossi i sur. 1996). Njegovi homolozi izolirani su kod biljnih vrsta gimnospremi (Padmanabhan i sur. 1997), monokota (Wang i sur. 1998; Vaidyanathan i sur. 1999) te dikota (Canel i sur. 1995; Silhavy i sur. 1995; Mbeguie i sur. 1997).

Prema Amitai-Zeigerson (1995), niske razine mRNA i proteina ASR1 detektirane su u korjenju i izdancima navodnjavanih biljaka rajčice. Nakon tretmana natrijevim kloridom (NaCl), polietilen glikolom (PEG) ili ABA-om, te su razine bile znatno povišene (Amitai-Zeigerson, i sur. 1995). Također je opažena prolazna ekspresija homologa proteina ASR1 u korjenju biljaka kukuruza izloženih solnom stresu (Wang i sur. 2003), kao i njegovog homologa u riži koji je, nakon trosatnog i šesterostanog izlaganja suvišku soli, pokazao visoku ekspresiju mRNA gena *asr1* kod dvije sorte s različitom tolerancijom na solni stres (Kawasaki i sur. 2001).

Čini se da je ekspresija proteina ASR1 također i razvojno regulirana, na način da se razina ekspresije njegove mRNA povećava tijekom zoridbe voća (Iusem i sur. 1993).

Prema Kalifa (2004b), protein ASR1 je lokaliziran i u citosolu i u jezgri, gdje je vezan na kromatin. Moguće ga je ekstrahirati puferom visoke ionske jakosti, ali ne i ne-ionskim detergentom. Studije *in vitro* pokazuju da ASR1 ima sekvencno-specifičnu DNA-veznu aktivnost koja ovisi o prisutstvu cinka (Zn^{2+}). Nadalje, konstrukti koji su imali prekomjernu ekspresiju proteina ASR1 pokazali su dramatično povećanu toleranciju na solni stres. Dok su te biljke bile izložene solnom stresu, nakupljale su manje natrija (Na^{+}) i prolina te posjedovale veće

razine stresom-reguliranih gena u ne-stresnim uvjetima rasta. Njihovi rezultati ukazuju na to da je proteinska klasa ASR1 uključena u modulaciju genske aktivnosti biljaka kao dio njihovog odgovora na stres (Kalifa i sur. 2004b).

2 Evolucijska prošlost porodice gena *asr*

2.1 Teorije o načinu divergencije genske porodice *asr*

Kod većine genskih porodica članovi divergiraju (u aspektima sekvence i funkcije) mnogo prije pojave kladogeneze (evolucijski događaj - rezultat adaptivne evolucije, koji uzrokuje diferencijaciju jedne vrste u nekoliko zasebnih, sestrinskih linija, obično nakon geografske izolacije jednog dijela početne vrste (1 n.d.), što rezultira ortologijom između gena različitih vrsta) (Alba i sur. 2000).

Proteini ASR pokazuju veliku identičnost sekvence unutar biljnih skupina dikota (*Solanaceae*) i gimnospermi (*Pinus*), dok homologija sekvenci između ovih skupina pada i ispod 50%. Takav uzorak homologije unutar skupina može se objasniti ili procesom usklađene evolucije (proces kojim su članovi neke porodice gena evoluirali usklađeno unutar svake vrste tj. međusobno su u bližem srodstvu ako se nalaze u jednoj vrsti nego sa članovima iste porodice gena koji se nalaze u nekoj drugoj vrsti (2 n.d.)), ili modelom rođenja i umiranja gena, iako oba modela upućuju na to da su se današnji oblici razvili iz jedne ishodišne porodice gena *asr* (Frankel i sur. 2006).

Drugo moguće objašnjenje velike sličnosti unutar porodice gena *asr* jest da su se nakon divergencije glavnih skupina pojavile nezavisne duplikacije gena, što pak upućuje na to da su svi danas poznati oblici tih gena potekli od jednog drevnog *asr* gena (Frankel i sur. 2006).

2.2 Dokazi da su se *asr* geni razvili iz jedne porodice a ne jednog gena

Kod rajčice su identificirana četiri gena porodice: *asr1, asr2, asr3 i asr4*. Nedostatak homologa *asr3* (iz rajčice) kod krumpira i *asr4* kod duhana (Dóczi i sur. 2005), kao i način postanka homologa *asr3* i *asr4* kod riže (nedavnom duplikacijom gena), idu u korist hipoteze o povijesno dinamičnoj genskoj porodici kao prethodniku današnjih gena *asr*, radije nego jednom ishodišnom genu iz kojeg su divergirale današnje skupine. Prisutnost samo jednog gena *asr* u grožđu i odsutnost cijele porodice kod duhana upućuju na isti zaključak.

Nasuprot tome, nedostatak pseudogena kod riže upućuje na model rođenja i smrti gena, iako ovo opažanje treba tumačiti s oprezom jer prisutstvo pseudogena u genomu zna biti kratko (Frankel i sur. 2006).

2.3 Porodica gena *asr* u rajčici

U rajčici je sličnost između četiri gena iz porodice *asr* zapanjujuće slična - ta četiri proteina sadrže mnogo blokova visokokonzerviranih aminokiselinskih slijedova, zbog čega i formiraju konzistentan skup u filogenetskim stablima (nasuprot ostalim biljnih vrstama i skupinama) (Frankel i sur. 2006).

Jedan od njih, *asr4*, pokazuje neupitnu ortologiju sa genom iz riže, *asr6*, iako *asr4* sada više sliči ostalim članovima porodice *asr* iz rajčice (različiti statistički testovi upućuju na nedavnu konverziju gena između *asr4* i *asr3*, iako ovi rezultati zahtjevaju daljnje proučavanje). Ortologija s genom iz druge vrste na jednoj strani, te konzerviranost sekvenci unutar gena porodice iste vrste na drugoj strani upućuju na to da je porodica *asr* u prošlosti prošla kroz nekoliko evolucijskih procesa, a ne samo jedan od predloženih modela. U prilog ovoj hipotezi ide i homologija gena unutar porodice *asr* iz bora. Nadalje, divergentnost i raštrkanost gena *asr* kod riže također upućuju na različite selektivne sile koje su djelovale na porodicu *asr* (Frankel i sur. 2006).

2.4 Razvoj gena *asr1*

Sekvenca proteina ASR1 je u potpunosti očuvana unutar roda *Lycopersicon* (porodica *Solanaceae*, angiosperme), čiji je glavni predstavnik rajčica, *Lycopersicon esculantum*. Ova iznenađujuća očuvanost sekvence jednog transkripcijskog faktora vjerojatno potječe od njegove sveprisutne ekspresije i istovremenog postojanja nekoliko njegovih promotorskih meta – ako bi došlo do bilo kakvih promjena u proteinu ASR1, mogla bi se narušiti bilo koja od nekoliko njegovih veznih aktivnosti (Frankel i sur. 2006).

Gen *asr1* eksprimiran je, u normalnim uvjetima, u voću, cvijeću, listovima, korjenju, stabljici i sjemenkama, i ponaša se kao „housekeeping“ gen (konstitutivni geni koji su potrebni

za održavanje bazalne razine stanične funkcije (3 n.d.)). Za razliku od njega, ostali članovi porodice *asr* ne pokazuju takav jako rasprostranjen uzorak ekspresije pod normalnim fiziološkim uvjetima, niti su rasprostranjeni diljem biljke (pokazuju specifičnost ekspresije za pojedine organe) (Maskin i sur. 2001).

Ekspresija ASR1 je znatno povećana (u odnosu na ostatak biljke) u cvijetu i kod zoridbe voća rajčice. K tome, razina njegove ekspresije nadaleko nadmašuje razinu ekspresije ostala tri člana porodice. Pitanje je da li je upravo takav uzorak ekspresije (u svim dijelovima biljke) uzrok niske razine sinonimnih supstitucija (mutacije u kodonima koje ipak kodiraju za istu aminokiselinu) unutar gena *asr1*, naspram obrnute situacije kod ostala tri člana koja pokazuju visok stupanj ovakvih supstitucijskih događaja (Frankel i sur. 2006).

Kada bi sva sinonimna mjesta (kodoni) bila selektivno neutralna, razina evolucijskih događaja bila bi kod sva četiri gena jednaka. No, kao što je već spomenuto, evolucija je puno rjeđe pogađala protein *asr1* (jer ima drastično nižu stopu sinonimnih supstitucija od ostatka porodice). Jedno moguće objašnjenje ove pojave je da sinonimni kodoni proteina *asr1* nisu selektivno jednaki kodonima ostalih članova, zbog čega evolucija sinonimnih mjesta balansira između selekcije i genetičkog drifta, radije nego da djeluje samo preko drifta (Ohta 1973).

Sinonimni kodoni za neku aminokiselinu ne pojavljuju se jednakim frekvencijama jer utječu na fitness organizma. Tako su selektivno favorizirani upravo oni kodoni koji odgovaraju tRNA koje ima najviše (Akashi 2001), i njih sadrže proteini sa širokom paletom ekspresije (kao npr ASR1.) Postojanje višestrukih meta i potreba za učinkovitom i točnom translacijom najvjerojatniji su uzrok vrlo spore evolucije gena *asr1* (Akashi i Eyre-Walker 1998).

Iako je kodirajuća sekvenca za ASR1 visoko konzervirana u svim vrstama *Lycopersicon*, njegova indukcija nakon izlaganja osmotskom stresu nije filogenetički konzervirana i razlikuje se od vrste do vrste. Ove razlike mogu se objasniti promjenama unutar promotorskih regija gena *asr1*, nastalih djelovanjem vodenog stresa ili faktora koji aktiviraju ekspresiju gena *asr1*, iako uzroke diferencijalne ekspresije među vrstama tek treba početi detaljnije proučavati (Frankel i sur. 2006; Maskin i sur. 2001; Dóczi i sur. 2005).

3 Struktura i funkcija proteina ASR1

Aminokiselinski sastav ovog malenog (13 kDa), visoko-nabijenog proteina je neobičan: 62 od 115 aminokiselina koje ga grade su nabijene (54% - 23 kisele, 21 bazična i 18 histidina). Kako su njegovi homolozi pronađeni samo u carstvu biljaka, njegova biološka uloga ne može se zaključiti iz homologije njegove sekvence sa sekvencama proteina ne-biljnog podrijetla. Nadalje, on čak ne nosi nikakve proteinske potpise koji bi mogli uputiti na neku određenu funkciju (Kalifa i sur. 2004b).

3.1 Lokalizacija

Substanična lokalizacija ASR1 pokazuje da je on jednom trećinom eksprimiran u jezgri, dok je većina raspršena u citoplazmi. Ovo ne čudi, jer je većina jezgrenih proteina također detektirana u citoplazmi (Yoneda 2000). Translokacija takvih proteina između ova dva stanična odjeljka je vjerojatno jedan od načina regulacije aktivnosti tih proteina, ili možda u različitim staničnim odjeljcima takvi proteini pokazuju različitu aktivnost (Houde i sur. 1995). Slično njemu, i proteini ASR iz grožđa (Cakir i sur. 2003), bora i ljiljana (Wang i sur. 2002) također pokazuju znakove lokalizacije unutar jezgre.

Pokazano je da tvari molekule mase do 40-60 kDa mogu pasivno difundirati kroz pore jezgre niz koncentracijski gradijent, dok se ostale prenose oblikom aktivnog transporta korištenjem jezgrenih lokalizacijskih signala (kratki aminokiselinski slijedovi sastavljeni većinom od bazičnih rezidua,) koje prepoznaju i vežu receptorske molekule skupa sa svojim teretom (tvari veće od 60 kDa). Iako ASR1 bez problema prolazi kroz pore jezgre, zahvaljujući svojoj veličini, on ipak sadrži navodnu jezgrenu lokalizacijsku sekvencu blizu svog karboksi-kraja (Kalifa i sur. 2004a).

3.2 ASR1 ima sposobnost vezanja na DNA

ASR1 je protein vezan na kromatin (ne otapa se u detegrentu ali ga se može ekstrahirati 1M NaCl-om), što je u skladu s njegovom lokalizacijom u jezgi i upućuje na to da je povezan s DNA ili direktno ili preko protein-protein interakcija s ostalim proteinima koji se vežu na kromatin. Pokazalo se da je njegova DNA-vezna aktivnost ovisna o Zn^{2+} (direktna), i jasno se razlikuje od nespecifičnih interakcija koje sliče izmjeni iona. Izračunato je da je njegova izoelektrična točka 7.3, što je u skladu sa opažanjima pojave optimalne, Zn^{2+}-ovisne razine vezanja na DNA pri pH 7.5 ali ne i u puferima nižih pH vrijednosti koji odvajaju Zn^{2+} ione od proteina. Da je riječ o generalnom tipu vezanja na DNA, preko izmjene iona, protein ne bi pokazivao specifičnost za određeni metalni ion ili pufer (Kalifa i sur. 2004b).

Pokazano je da je DNA-vezno mjesto proteina ASR1 unutar karboksi-kraja, dok se dva vezna mjesta za Zn^{2+} nalaze na amino-kraju proteina (Rom i sur. 2006).

Na njegovom amino-kraju postoji pet aminokiselina histidina. Zna se da takav histidinski privjesak pokazuje visok afinitet za metalne ione poput nikla (Ni) ili Zn^{2+} (Christianson 1991), zbog čega je moguće pročistiti ovaj protein običnom kolonom napunjenom agarozom Ni-NTA, budući da ona također nosi histidinski privjesak na koji se veže protein koji sadrži metalni ion (Crowe i sur. 1994). Nativni ASR1 ima velik afinitet za metale i može ga se vrlo učinkovito pročistiti pomoću agaroze obogaćene Ni, ali vezanje Zn^{2+} na njega uvelike poboljšava njegovu sposobnost vezanja na DNA (za razliku od iona kalcija ili magnezija koji nisu uspjeli inducirati ovu aktivnost), iako on ne posjeduje „zinc-finger“ (Laity i sur. 2001) - motiv koji je uobičajen među većinom proteina koji se vežu na DNA. Štoviše, analize njegove sekvence pokazuju da ne sadrži niti jedan drugi, prethodno opisani ili poznati Zn^{2+}-vezni motiv (Vallee i Auld 1992).

3.3 Jezgreni i citosolni oblici proteina

Pretpostavlja se da je nedostatak strukturne homologije s ostalim DNA-veznim proteinima rezultat toga što ASR1 nije smotan u nativnom stanju (Uversky i sur. 2000; Tompa 2002; Fink 2005; Uversky 2006). Prema novijim istraživanjim, pretpostavlja se da je oko 30% eukariotskih proteina ili u potpunosti ili djelomično neuređeno (Fink 2005), i pretpostavka je da je upravo

smatanje takvih proteina način regulacije njihove aktivnosti. Smatanje može biti inducirano vezanjem kofaktora ili protein-protein interakcijama (Dyson i Wright 2002). Uočeno je da su mnogi proteini koji sudjeluju u raznim odgovorima na stres ovako strukturirani.

Protein ASR1 prelazi u smotano stanje nakon vezanja cinkovih iona, koji induciraju njegov prijelaz iz monomernog u dimerni oblik uz stvaranje cross-linkova. Ovu tezu potvrđuje i njegova visoka osjetljivost na proteaze, koja proizlazi iz njegovog nesmatanja u nativnim uvjetima i smanjuje se nakon vezanja Zn^{2+} iona. Također, kada je u kompleksu sa Zn^{2+}, ASR1 pokazuje stupanj denaturacije nakon 76°C (dokaz strukturne uređenosti), dok u odsutnosti Zn^{2+} nisu vidljive nikakve promjene u fazi što upućuje na nedostatak konformacije (Goldgur i sur. 2006).

Dakle, točan lokus i stehiometriju vezanja Zn^{2+} liganada, kao i povezanost stanične lokalizacije sa smatanjem u sekundarnu i tercijarnu strukturu, tek treba rasvijetliti, zajedno sa njegovom ulogom u zaštiti kromatina ili prijenosu signala pod utjecajem raznolikih okoliša koji induciraju stresne uvjete (Goldgur i sur. 2006).

4 Abiotski stres – utjecaj na biljke

4.1 Odgovor biljaka na visok salinitet

Prošla su dva desetljeća od kada su počela proučavanja biologije solnog stresa i biljnih odgovora na visok salinitet. Prikupilo se mnogo informacija o staničnim, metaboličkim, molekularnim i genetskim procesima uključenim u odgovor biljaka na stresne uvjete, od kojih neki zasigurno utječu na razinu tolerancije biljke na stres. Znanje o tome kako biljka ponovno ostvari osmotsku i ionsku homeostazu nakon izlaganja stresu, i još k tome održava fiziološke i biokemijske komponente u bazalnom odnosu, neophodnom za normalan rast i razvoj u novom okolišu, ključni su za razumijevanje procesa tolerancije biljke na stres (Hasegawa, i sur. 2000).

Tijekom prošlog desetljeća, poseban je interes posvećen identifikaciji mehanizama održavanja ionske i osmotske homeostaze na razini stanice, kao procesa esencijalnih za determinaciju tolerancije. Ustanovljno je da je zapravo integrirana hijerarhija funkcioniranja različitih vrsta stanica, tkiva i organa temeljni preduvjet za toleranciju biljaka na solni stres (Hasegawa, i sur. 2000).

4.1.1 Solni stres

Visok salinitet uzrokuje hiperionske i hiperosmotske efekte čija posljedica može biti smrt biljke. Najčešće je solni stres uzrokovan visokim koncentracijama iona Na^+ i Cl^- u zemlji. Promijenjeni status uzimanja vode najvjerojatnije, u samom početku djelovanja stresnih faktora, dovodi do smanjenja rasta, iako točni mehanizmi inhibicije staničnih dioba nizu poznati. Smanjenje organizacije membrana, pojava AOS, toksičnost otpadnih metabolita, inhibicija fotosinteze i smanjen unos nutrijenata samo su neki od procesa koji, nakon djelovanja stresnih faktora, uzrokuju događaje više katastrofičnih razmjera (Hasegawa, i sur. 2000).

5 Razina i regulacija ekspresije ASR1 nakon izlaganja biljke abiotskom stresu

U prijašnjim studijama (Amitai-Zeigerson i sur.1995) detektirana su prolazna povećanja razine ekspresije proteina i mRNA ASR1 nakon izlaganja biljaka solnom i osmotskom stresu, i zaključeno je da je nekoliko puteva prijenosa signala uključeno u aktivaciju gena reguliranih solnim i osmotskim stresom. Neki su ovisni o ABA-i, neki ne. Ovakva indukcija ekspresije jezgrenih proteina djelovanjem abiotskog stresa već je ranije opisana (Godoy i sur. 1994; Kovacs i sur. 1998; Ascenzi i Gantt 1999; Munnik i sur. 1999; Castillo i sur. 2000; Scippa i sur. 2000).

5.1 ASR1 smanjuje neto nakupljanje Na^+ u stanicama

Kod transgeničnih biljaka duhana koje prekomjerno eksprimiraju protein ASR1 detektirana je poboljšana spremnost na uvjete stresa. Listovi transgeničnih biljaka pokazali su manji gubitak vode nakon izlaganja stresnim uvjetima od listova uzetih od biljaka divljeg tipa. Također, ove biljke su pokazale smanjenu akumulaciju iona Na^+ nakon djelovanja stresa, što upućuje na to da prekomjerna ekspresija ASR1 utječe na neto uzimanje Na^+ iz okoliša, i to povećanom sekrecijom tih iona iz vakuole zbog povećavanja količine vakuolarnog izmjenjivača Na^+/H^+. Kako ovim putem razine K^+ i Ca^{2+} nisu poremećene, izgleda da prekomjerna ekspresija ASR1 uzrokuje efekt specifičan u promjeni koncentracije Na^+ u stanici (Kalifa i sur. 2004b).

5.2 Prolin i peroksidaze

Prolin je osmolit koji se nakuplja u većini biljnih vrsta nakon izlaganja stresnim uvjetima kao što su salinitet i suša (Delauney i Verma 1993). Smatra se da on ima ulogu u zaštiti proteina (Serrano i Gaxiola 1994) i da služi za raspad AOS-a (Smirnoff i Cumbes 1989). Transgenične biljke koje prekomjerno eksprimiraju ASR1 nakupljaju manje prolina od biljaka divljeg tipa. Pretpostavlja se da je razlog tome smanjeni utjecaj stresa zbog smanjenja neto uzimanja Na^+ iz okoliša (Kalifa i sur. 2004b).

Nadalje, prekomjerna ekspresija proteina ASR1 poboljšava rezultate klijanja kada su prisutni uvjeti solnog stresa. Naime, klijanje sjemenke počinje reapsorpcijom vode i rekonstitucijom enzimske aktivnosti proteina koji su u procesu stvaranja sjemenke izgubili vodu (Bewley 1997). Povećanjem ekspresije proteina ASR1 povećava se razina peroksidaze, jednog od proteina bubrenja sjemenke za kojeg je dokazano da poboljšava klijanje u uvjetima osmotskog stresa (Kalifa i sur. 2004b).

5.3 ASR1 je transkripcijski faktor

ASR1 nema samo direktnu ulogu u borbi biljke protiv solnog stresa. On također uzrokuje povećanje ekspresije nekih drugih gena, bez obzira jesu li ili nisu uključeni u odgovor na stres. Izolirano je 12 gena iz transgeničnih biljaka (s prekomjernom ekspresijom ASR1) koji su pokazali višu razinu ekspresije mRNA (u odnosu na biljke divljeg tipa) nakon izlaganja biljke prekomjernim koncentracijama soli (Kalifa i sur. 2004b). Pokazalo se da je dvije trećine ovih gena uključeno u mehanizme borbe protiv solnog šoka, uključujući malat dehidrogenazu, proteine bogate prolinom ili peroksidazu. Zna se i da je prijenos lipida potaknut izlaganjem biljke osmotskom stresu (Yamada 1992; Ouvrard i sur. 1996; Smart i sur. 2000), kao i da su aldolazni geni plastida potaknuti svijetlom (Yamada i sur. 2000) te da na njihovu ekspresiju utječe koncentracija raspoloživog NaCl-a.

Sve u svemu, prekomjerna ekspresija stresom–reguliranih transkripcijskih faktora u ne-stresnim uvjetima (u transgeničnim biljkama) rezultira povećanjem bazalne razine transkripcije mRNA gena koje ti transkripcijski faktori reguliraju (Jaglo-Ottosen i sur. 1998; Kasuga i sur. 1999).

5.4 Uloga ASR1 kao hidrofilina

Hidrofilini su proteini koje definira visok indeks hidrofiličnosti i visok udio glicina u aminokilselinskom sastavu (> 1.0 i > 6%). Oni se nalaze prvenstveno u biljkama, bakterijama i kvascima, i predstavljaju malenu frakciju (<0.2%) genoma. Smatra se da imaju funkciju predviđanja odgovora na hiperosmozu (Garay-Arroyo i sur. 2000).

ASR1 odgovara kriterijima hidrofiilna prema tome što 7% njegovih aminokiselina čine glicini, dok mu je prosječni indeks hidrofiličnosti 1,17 (Goldgur i sur. 2006).

Proteini LEA (*late embriogenesys abundant*) sačinjavaju najveću skupinu hidrofilina. Iako ASR1 nije LEA protein, jer mu nedostaju LEA potpisi, ipak dijeli neke sličnosti s njima: npr. ekspresija i LEA i ASR1 pod djelovanjem osmotskog stresa je povećana. Nadalje, neki LEA proteini (koji pripadaju nekoj od podskupina 1a, 2a, 3b i 6) su DNA-vezni proteini (Wise i Tunnacliffe 2004).

Na kraju, iako je cjelokupno povećana tolerancija biljke na solni i osmotski stres uzrokovana povećanom ekspresijom proteina ASR1, koji najvjerojatnije djeluje na povećanje tolerancije upravo pomoću svoje DNA vezne aktivnosti, ne može se isključiti potencijalna funkcija citosolne frakcije proteina ASR1, koja sačinjava oko 2/3 njegove ukupne ekspresije (Kalifa i sur. 2004a). Prolaznost povećanja njegove ekspresije (Amitai-Zeigerson i sur. 1994) upućuje na to da ASR1 sudjeluje u signalnom putu borbe protiv solnog ili osmotskog stresa a ne kao završna komponenta. Znači, ima ulogu transkripcijskog faktora, ali i zaštite DNA od oštećenja (zbog svoje DNA vezne aktivnosti) u najranijim stadijima djelovanja stresa, dok su ostali mehanizmi zaštite još uvijek prespori (Kalifa i sur. 2004b).

6 Sažetak

Biljke su izložene djelovanju abiotičkog stresa na dnevnoj bazi. ASR1 je visoko-nabijeni, biljno-specifični protein male molekulske mase (13 kDa), koji sudjeluje u staničnom odgovoru na stres a lokaliziran je u citoplazmi i jezgri stanice. Posjeduje DNA-veznu aktivnost koja ovisi o prisutstvu cinka – on potiče prijelaz proteina ASR1 iz nesmotane u smotanu konformaciju.

Smatra se da su se današnji oblici gena *asr* razvili iz jedne porodice koja je kroz vrijeme različito divergirala, ovisno o vrstama u kojima su se geni našli tj. smatra se da su pratili model usklađene evolucije. Dokazi tome su nedavne duplikacije gena *asr3* iz *asr4* i homologija između *asr4* iz rajčice i *asr6* iz riže.

Iako se o njemu još uvijek zna vrlo malo, smatra se da jezgreni oblik proteina ima funkciju transkripcijskog faktora koji potiče niz signalnih puteva borbe protiv učinka abiotičkog stresa. Za citosolni, nesmotani oblik se još uvijek ne zna kako pridonosi održavanju homeostaze, ali smatra se da bi prijelaz proteina iz jednog oblika u drugi i iz jednog staničnog odjeljka u drugi mogao biti jedan od načina regulacije aktivnosti ovog proteina.

Sve u svemu, zna se da njegova ekspresija utječe na povećanje otpornosti biljke na solni (smanjenjem neto nakupljanja natrija u stanici) i osmotski (preko uloge hidrofilina) stres, iako tek slijedi razvoj teorija i metoda pomoću kojih će biti lakše shvatiti njegovu pravu ulogu u biljnim stanicama te konstruirati transgenične biljke koje će biti otpornije na naseljevanje novih staništa i tolerantnije na nove uvjete koje će tamo susresti.

7 Summary

Plants are exposed to effects of abiotic stress factors on a daily basis. ASR1 is a small (13 kDa) highly-charged, plant-specific protein, localised in citoplasm and nucleus, which takes part in cell's stress-defending pathways. It has a zinc-dependent DNA-binding activity – zinc enables the protein to transform from unfolded to fully folded form.

It is believed that the *asr* genes, which we know of today, developed from a single gene family, probably through a model of concerned evolution. The evidence for that are gene duplications which took place recently (which state that *asr3* originated from *asr4*) and homology between tomato *asr4* and rice *asr6* genes.

Although we have much to learn about ASR1's functional and biological function, it has become clear that it's nuclear form plays role of a transcription factor, which induces a downstream of genes and signal pathways included in plant's response to abiotic stress. It is not yet known how does the cytosolic form of the protein takes part in homeostasis, but it is thought that it's transformation to folded state and transportation to the nucleus have something to do with the way this protein's activity is regulated.

Nevertheless, we do now know that it's expression induces the plant's ability to tolerate damage which took place after plant's been exposed to stress. It does it so by lowering the net uptake of sodium in the cell (contribution to salt stress tolerance) and through it's role as a hydrophilin. Anyway, we've only just began to realise it's biologycal importance as a mean to construct transgenic plants which will be more tolerant to abiotic stress factors and will grow more sucessfully in new habitats.

8 Literatura

Akashi, H. "Gene expression and molecular evolution." *Curr. Opin. Genet. Dev.,* **11**, 2001: 660-666.

Akashi, H., Eyre-Walker, A. "Translational selection and molecular evolution." *Curr. Opin. Genet. Dev.,* **8**, 1998: 688-693.

Alba, R., Kelmenson, P.M., Cordonnier-Pratt, M.M., Pratt, L.H. "The phytochrome gene family in tomato and the rapid differential evolution of this family in angiosperms." *Mol. Biol. Evol, **17**,* 2000: 362–373.

Amitai-Zeigerson, H., Scolnik, P.A., Bar-Zvi, D. "Tomato Asr1 mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid." *Plant Science,* **110**, 1995: 205-213.

Amitai-Zeigerson, H., Scolnik, P.A., Bar-Zvi, D. "Genomic Nucleotide Sqeuence of tomato Asr2, a second member of the stress/ripening- induced Asr1 gene family." *Plant Physiology,* **106**, 1994: 1699–1700.

Ascenzi, R., Gantt, J.S. "Molecular genetic analysis of the drought-inducible linker histone variant in Arabidopsis thaliana." *Plant Molecular Biology,* **41**, 1999: 159-169.

Aubourg, S., Rouze, P. "Genome annotation." *Plant Physiology and Biochemistry,* **39**, 2001: 181–193.

Bewley, J.D. "Seed germination and dormancy." *Plant Cell,* **9**, 1997: 1055–1066.

Blumwald, E. "Sodium transport and salt tolerance in plants." *Current Opinion in Cell Biology,* **12**, 2000: 431–434.

Bohnert, H.J., Sheveleva, E. "Plant stress adaptations – making metabolism move." *Current Opinion in Plant Biology,* **1**, 1998: 267–274.

Bohnert, H.J., Shen, B. »Transformation and compatible solutes.« *Scientia Horticulturae,* **78**, 1999: 237–260.

Bohnert, H.J., Ayoubi, P., Borchert, C. "A genomics approach towards salt stress tolerance." *Plant Physiology and Biochemistry,* **39**, 2001: 295–311.

Bray, E.A. "Plant responses to water deficit." *Trends in Plant Science,* **2**, 1997: 48-54.

Cakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saumonneau, A., Delrot, S., Atanassova, R. "A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling." *Plant Cell,* **15**, 2003: 2165–2180.

Canel, C., Bailey-Serres, J.N., Roose, M.L. "Pummelo fruit transcript homologous to ripening-induced gene." *Plant Physiology,* **108**, 1995: 1323–1324.

Castillo, J., Rodrigo, I., Marquez, J.A., Zuniga, A., Franco, L. "A pea nuclear protein that is induced by dehydration belongs to the vicilin superfamily." *European Journal of Biochemistry,* **267**, 2000: 2156-2165.

Christianson, D. W. "Structural biology of zinc." *Adv. Protein Chem.,* **42**, 1991: 281-355.

Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stuber, D., Henco, K. "6×His-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification." *Methods Mol. Biol.,* **31**, 1994: 371-387.

Delauney, A.J., Verma, D.P.S. "Proline biosynthesis and osmoregulation in plants." *Plant Journal*, **4**, 1993: 215–223.

Dóczi, R., Kondrak, M., Kovacs, G., Beczner, F., Banfalvi, Z. "Conservation of the drought-inducible DS2 genes and divergences from their ASR paralogues in solanaceous species." *Plant Physiol. Biochem.,* **43**, 2005: 269–276.

Dyson, H.J., Wright, P.E. "Coupling of folding and binding for unstructured proteins." *Curr. Opin. Struct. Biol.,* **12**, 2002: 54–60.

Fink, A.L. "Natively unfolded proteins." *Curr. Opin. Struct. Biol.,* **15**, 2005: 35–41.

Frankel, N., Carrari, F., Hasson, E., Iusem, N. "Evolutionary history of the Asr gene family." *Gene*, 2006: 74-83.

Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garciarrubio, A., Covarrubias, A.A. "Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit." *J. Biol. Chem.,* **275**, 2000: 5668–5674.

Godoy, J.A., Lunar, R., Torres-Schumann, S., Moreno, J., Rodrigo, R.M., Pintor-Toro, J.A. "Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stresses tomato plants." *Plant Molecular Biology*, **26**, 1994: 1921-1934.

Goldgur, Y., Rom, S., Ghirlando, R., Shkolnik, D., Shadrin, N., Konrad, Z. "Desiccation and Zinc Binding Induce Transition of Tomato Abscisic Acid Stress Ripening 1, a Water Stress- and Salt Stress-Regulated Plant-Specific Protein, from Unfolded to Folded State." *Plant Physiology,* **143**, 2006: 617–628.

Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J. "Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress." *Plant, Cell and Environment,* **21**, 1998: 535–553.

Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., Bonhert, H. J.. "Plant cellular and molecular responses to high salinity." *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.,* **51**, 2000: 463-499.

Houde, M., Daniel C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberte, S., Sarhan, F. "Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues." *Plant J.,* **8**, 1995: 583-593.

Ingram, J., Bartels, D. "The molecular basis of dehydration tolerance in plants." *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology,* **47**, 1996: 377–403.

Iusem, N.D., Bartholomew, D.M., Hitz, W.D., Scolnik, P.A. "Tomato (*Lycopersicon esculantum* L.) transcript induced by water deficit and ripening." *Physiologia Plantarum,* **102**, 1993: 1353–1354.

Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., Tomashow, M.F. "Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance." *Science,* **280**, 1998: 104–106.

Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C., Kjellbom P. "The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance." *Biochimica et Biophysica Acta,* **1465**, 2000: 324–342.

Kalifa, Y., Gilad, A., Konrad, Z., Zaccai, M., Scolnik. P.A., Bar-Zvi, D. "The water- and salt-stress-regulated Asr1 (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein." *Biochem. J.,* **381**, 2004a: 373–378.

Kalifa, Y., Perlson, E., Gilad, A., Konrad, Z., Scolnik, P.A., Bar-Zvi, D. "Over-expression of the water and salt stress-regulated Asr1 gene confers an increased salt tolerance." *Plant, Cell and Environment,* **27**, 2004b: 1459–1468.

Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. "Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor." *Nature Biotechnology,* **17**, 1999: 287–291.

Kawasaki, S. "Gene expression profilesduring the initial phase of salt stress in rice." *Plant Cell,* **13**, 2001: 889–905.

Kovacs, I. "Immunolocalization of a novel annexin-like protein encoded by a stress and abscisic acid responsive gene in alfalfa." *Plant Journal,* **15**, 1998: 185–197.

Laity, J. H., Lee, B. M., Wright, P. E. "Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity." *Curr. Opin. Struct. Biol.,* **11**, 2001: 39-46.

Maskin, L. "Differential expression of themembers of the Asr gene family in tomato (Lycopersicon esculentum)." *Plant Sci.,* **161**, 2001: 739–746.

Mbeguie, A., Mbeguie, D., Gomez, R.M., Fils-Lycaon, B.. "Molecular cloning and nucleotide sequence of an abscisic acid-. stress-, ripening-induced ASR-like protein from apricot fruit: Gene expression during fruit ripening." *Plant Physiology,* **115**, 1997: 1288.

Munnik, T. "Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and sever hyper-osmotic stress." *Plant Journal,* **20**, 1999: 381–388.

Neill, S.J., Burnett, E.C. "Regulation of gene expression during water deficit stress." *Plant Growth Regulation,* **29**, 1999: 23-33.

Ohta, T. "Slightly deleterious substitutions in evolution." *Nature,* **246**, 1973: 96-98.

Ouvrard, O. "Identification and expression of water stress- and abscisic acid-regulated genes in a drought water stress- and abscisic acid-regulated genes in a drought." *Plant Molecular Biology,* **31**, 1996: 819–829.

Padmanabhan, V., Dias, D.M.A.L., Newton, R.J. "Expression analysis of a gene family in loblolly pine (Pinus taeda L.) induced by water deficit stress." *Plant Molecular Biology,* **35**, 1997: 801-807.

Rock, C.D. »Pathways to abscisic acid-regulated gene expression.« *New Phytologist,* **148**, 2000: 357-396.

Rom, S. "Mapping the DNA- and zinc-binding domains of ASR1 (abscisic acid stress ripening), an abiotic-stress regulated plant specific protein." *Biochimie,* **88**, 2006: 621-628.

Rossi, M., Lijavetzky, D., Bernacchi, D., Hopp, H.E., Iusem, N. "Asr genes belong to a gene family comprising at least three closely linked loci on chromosome 4 in tomato." *Molecular and General Genetics,* **252**, 252: 489–492.

Scippa, G.S., Griffith, A., Chiatante, D., Bray, E.A. "The H1 histone variant of tomato, H1-S, is targeted to the nucleus and accumulates in chromatin in response to water-deficit stress." *Planta,* **211**, 2000: 173-181.

Serrano, R., Gaxiola, R. "Microbial models and salt stress tolerance in plants." *Critical Reviews in Plant Sciences,* **13**, 1994: 121-138.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. "Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways." *Current Opinion in Plant Biology*, **3**, 2000: 217–223.

Silhavy, D., Hutvagner, G., Barta, E., Banfalvi, Z. "Isolation and characterization of a water-stress inducible cDNA clone from Solanum chacoense." *Plant Molecular Biology,* **27**, 1995: 587–595.

Smart, L.B., Cameron, K.D., Bennett, A.B. "Isolation of genes predominantly expressed in guard cells and epidermal cells of Nicotiana glauca." *Plant Molecular Biology,* **42**, 2000: 857-869.

Smirnoff, N., Cumbes, Q.J. "Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes." *Phytochemistry*, **28**, 1989: 1057-1060.

Tompa, P. "Intrinsically unstructured proteins." *Trends Biochem. Sci.,* **27**, 2002: 527–533.

Uversky, V.N. "Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics." *Protein Sci.,* **11**, 2006: 739–756.

Uversky, V.N., Gillespie, J.R., Fink, A.L.. "Why are ‘‘natively unfolded’’ proteins unstructured under physiologic conditions?" *Proteins. Struc. Funct. Genet.,* **41**, 2000: 415–427.

Vaidyanathan, R., Kuruvilla, S., Thomas, G. "Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice." *Plant Science,* **140**, 1999: 21-30.

Vallee, B. L., Auld, D. S. "Functional zinc-binding motifs in enzymes and DNA-binding proteins." *Faraday Discuss,* **93**, 1992: 47-65.

Wang, C.S., Liau, Y.E., Huang, J.C., Wu, T.D., Su, C.C., Lin, C.H. "Characterization of a desiccation-related protein in lily pollen during development and stress." *Plant and Cell Physiology*, **39**, 1998: 1307–1314.

Wang, H., Miyazaki, S., Kawai, K., Deyholos, M., Galbraith, D.W., Bohnert. H.J. "Temporal progression of gene expression responses to salt shock in maize roots." *Plant Molecular Biology,* **52**, 2003: 873–891.

Wang, J.T., Gould, J.H., Padmanabhan, V., Newton R.J. "Analysis and localization of the water-deficit stress-induced gene (lp3)." *J. Plant Growth Regul.,* **21**, 2002: Growth Regul. 21.

Wise, J.W., Tunnacliffe, A. "POPP the question: what do LEA proteins do?" *Trends. Plant. Sci.,* **9**, 2004: 13-17.

Xiong, L., Zhu, J.K. "Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives." *Physiologia Plantarum,* **112**, 2001: 152-166.

Yamada, M. "Lipid transfer proteins in plants and microorganisms." *Plant and Cell Physiology,* **33**, 1992: 1-6.

Yamada, S., Komori, T., Hashimoto, A., Kuwata, S., Imaseki, H., Kubo, T. "Differential expression of plastidic aldolase genes in Nicotiana plants under salt stress." *Plant Science,* **154**, 2000: 61-69.

Yoneda, Y. "Nucleoplasmic protein traffic and its significance to cell function." *Genes Cells,* **5**, 2000: 777–787.

1. *http://en.wikipedia.org/wiki/Cladogenesis.*

2. *http://www.blackwellpublishing.com/ridley/a-z/Concerted_evolution.asp.*

3. *http://en.wikipedia.org/wiki/Housekeeping_gene.*