مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۸
صفحه ۲۲۸-۲۱۷

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 2

تولید اکتوئین در گیاهان با استفاده از مهندسی ژنتیک برای کاهش اثرات منفی تنش‌های غیرزیستی

Production of ectoine in plants using genetic engineering to reduce the negative effects of abiotic stresses

مریم صادقی[۱]، اکرم صادقی[۲*]

Maryam Sadeghi[1], Akram Sadeghi[2*]

۱-کارشناس ارشد بیوشیمی، بانک مولکولی، مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، تهران، ایران
۲-بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

1-Molecular Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran
2-Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aksadeghi@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۱ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۲۱)

چکیده

تغییر در پتانسیل آب محیطی که در اثر خشکی و شوری ایجاد می‌شود، یکی از مهمترین عوامل تنش‌زای غیرزیستی در بسیاری از زیستگاه‌های طبیعی موجودات زنده است. محلول‌های سازگار به عنوان عوامل محافظت کننده، نقش مهمی در افزایش پایداری ملکول‌های زیستی و کل سلول در برابر تنش شوری ایفا می‌کنند. اکتوئین و مشتق آن هیدروکسی اکتوئین به عنوان محلول سازگار به‌طور گسترده‌ای توسط باکتری‌ها و تعداد معدودی از آرکی‌ها و یوکاریوت‌ها در پاسخ به شوری و فشار اسمزی بالا تولید می‌شوند. تولید اکتوئین با استفاده از مهندسی ژنتیک و انتقال ژن‌های *ectA*، *ectB* و *ectC* منجر به افزایش تحمل فشار اسمزی بالا در چند گیاه مدل شده است. در این مقاله مروری، اهمیت کاربردهای فعلی و بالقوه اکتوئین به عنوان محافظت کننده از ماکروملکول‌ها، سلول‌ها و بافت‌ها مورد بحث قرار گرفته است. همچنین، یک تئوری پیشرو در مورد سازوکار و چگونگی محافظت اکتوئین از پروتئین‌ها که شامل کنار رفتن ملکول‌های اکتوئین از سطح ماکروملکول‌ها، کند سازی انتشار آب از اطراف ملکول‌های زیستی و کمک به حفظ حالت طبیعی پروتئین‌ها است شرح داده شده است. داده‌های تجربی دهه‌های گذشته در مورد کاهش تنش خشکی و شوری توسط اکتوئین‌ها و چشم‌انداز استفاده از آن‌ها در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی مدرن از جمله مهندسی ژنتیک در این مقاله مروری خلاصه شده است.

واژه‌های کلیدی

اکتوئین،
تنش اسمزی،
محلول‌های سازگار،
مهندسی ژنتیک

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.9.7]

مقدمه

بی‌شک آب مهمترین شرط حیات روی زمین است و آن را نمی‌توان تنها به عنوان یک حلال در نظر گرفت، چرا که نقشی بسیار ظریف‌تر و پیچیده‌تر دارد. شکل ماکروملکول‌ها بر اساس واکنش‌های آب‌دوست و آب‌گریز تعیین می‌شود و نقش آب به عنوان یک دهنده زوج الکترون (نقش نوکلئوفیلی) در واکنش‌های بیوشیمیایی بسیار تعیین‌کننده است. همچنین ملکول‌های آب به عنوان یک کانال انتقال سریع پروتون در بسیاری از واکنش‌های حیاتی سلول نقش دارند (Ball. 2017). علاوه بر این، حفظ میزان مشخصی از آب در سلول جهت ایجاد فشار تورگور مثبت برای رشد و گسترش سلول ضروری است. با این حال به دلیل نیمه‌تراوا بودن غشاء سیتوپلاسمی و تفاوت در فشار اسمزی بین دو طرف غشاء، این تعادل به آسانی برقرار نمی‌شود. جریان آب ایجاد شده در اثر شیب اسمزی بین دو طرف غشاء می‌تواند باعث متورم شدن و ترکیدن سلول در محیط هیپوتونیک و یا چروکیدگی و کم‌آب‌شدن سلول در محیط هایپرتونیک شود. برای جلوگیری از چنین اثرهای مخربی، سلول‌ها (گیاهی، جانوری و باکتریایی) باید توانایی واکنش و پاسخ‌گویی به این نوع تنش‌های محیطی را داشته باشد. این واکنش‌های تنظیمی را اسمورگیولیشن و یا اسموآداپتیشن می‌نامند (Kempf & Bremer. 1998).

ریزسازواره‌ها دارای منافذ آکواپورین هستند که اجازه عبور ملکول‌های آب را در جهت شیب غلظت فراهم می‌کند. با این وجود به دلیل مقرون به صرفه نبودن مصرف انرژی برای سلول، ریزسازواره‌ها به‌طور فعال آب را به داخل و یا خارج سلول پمپ نکرده (Galinski & Trüper. 1994)، بلکه روش‌های دیگری را برای مقابله با تنش اسمزی به کار می‌گیرند. یکی از این روش‌ها که مخصوص ریزسازواره‌های شدیدا شورپسند است salt-in strategy نام دارد و شامل انباشتن مقادیر زیادی از نمک KCl در سیتوپلاسم سلول است. با این استراتژی اختلاف اسمزی بین دو طرف غشاء از بین می‌رود. این سازوکار نیازمند تغییرات فیزیولوژیکی قابل‌توجهی در سلول است. علاوه بر این در ساختمان پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و اجزاء درون‌سلولی نیز باید تغییرات قابل ملاحظه‌ای ایجاد شود. از جمله این تغییرات می‌توان به وجود مقادیر زیاد اسیدآمینه‌های اسیدی گلوتامات و آسپارتات در مقایسه با اسیدآمینه‌های بازی لایزین و آرژنین در پروتئین‌های این نوع ریزسازواره‌ها اشاره کرد. این پروتئین‌های اسیدی تنها در محیط‌هایی با غلظت بالای نمک می‌توانند پایداری و فعالیت خود را حفظ کنند. در نتیجه این استراتژی تنها برای ریزسازواره‌هایی مانند آرکی‌ها که در محیط‌هایی با غلظت بالایی از نمک زندگی می‌کنند مفید است (Oren. 2013). بیشتر ریزسازواره‌ها در محیط‌هایی زندگی می‌کنند که غلظت نمک در آن‌ها در نوسان است. به‌عنوان مثال باکتری‌هایی که در خاک زندگی می‌کنند مجبورند دوره‌های خشک و بارانی را در طی فصل‌های مختلف سال تحمل کنند. استراتژی که بتواند نیاز ریزسازواره‌ها را در این شرایط متغیر برآورده کند، salt-out strategy نام دارد و شامل ساخت و یا جذب ملکول‌های آلی به نام محلول‌های سازگار (compatible solutes) است. از خصوصیات این مواد می‌توان به کوچک بودن اندازه و حلالیت بالای آن‌ها اشاره کرد. محلول‌های سازگار حتی در غلظت‌های بالا در سوخت و ساز سلولی تداخل ایجاد نمی‌کنند. تمام موجودات مخصوصا گیاهان، باکتری‌ها و پروتیست‌ها در پاسخ به تنش شوری قادر به ساخت یا جذب این مواد هستند. علاوه بر کاهش اثرهای مخرب تنش شوری، تجمع این مواد موجب محافظت آنزیم‌ها و ماکروملکول‌ها در برابر عوامل بازدارنده، غیرفعال‌کننده و دناتوره‌کننده، چه در داخل بدن موجود زنده و چه در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (Lippert *et al*. 1992). مهمترین محلول‌های سازگاری که تاکنون شناسایی شده‌اند، شامل اسیدهای‌آمینه مانند گلایسین بتائین، اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین، قندهایی مانند سوکروز و ترهالوز، فسفودی‌استرها و پلیول‌ها هستند. تجمع محلول‌های سازگار در سیتوپلاسم می‌تواند مزیت‌های دیگری علاوه بر کاهش اثر تنش شوری و کم‌آبی داشته باشد. به‌عنوان مثال این مواد می‌توانند به عنوان مواد غذایی، منبع مناسبی از کربن، نیتروژن و انرژی باشند (Weinisch *et al*. 2019). برخی دیگر از محلول‌های سازگار نقش آنتی‌اکسیدان را بازی می‌کنند. از جمله این مواد می‌توان به اینوزیتول و مانیتول که در بسیاری از گیاهان تحت تنش شوری تجمع پیدا می‌کنند اشاره کرد. این مواد همچنین توانایی جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد تولید شده در این شرایط را نیز

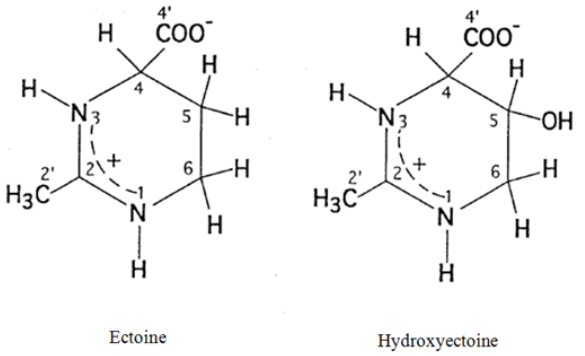
[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.9.7]

دارند. تعداد زیادی از موجودات مقاوم به سرما و یخزدگی کربوهیدرات‌هایی نظیر گلوکز و سوربیتول را در سلول‌های خود ذخیره می‌کنند. این کار موجب پایین آمدن نقطه انجماد در سلول می‌شود. نقش پرولین و ترهالوز در محافظت غشاءسلولی در برابر یخزدگی ثابت شده است (Storey. 1997). برخی محلول‌های سازگار مانند گلایسین بتائین، گلیسرول، پرولین و ترهالوز موجب افزایش پایداری فرم طبیعی پروتئین‌ها شده و به بازگرداندن پلی‌پپتیدهای دناتوره شده به حالت طبیعی کمک می‌کنند، به این مواد چپرون‌های شیمیایی نیز گفته می‌شود (Diamant *et al.* 2001). مطالعات زیادی در زمینه چگونگی سازوکار عمل این مواد انجام شده است. این مواد موجب افزایش انرژی آزاد حالت تا نشده پروتئین‌ها به نفع جمعیت تاشده پروتئین‌ها می‌شوند. بیشترین اثر محلول‌های سازگار روی ستون مهره‌های زنجیره پلی‌پپتیدها است. البته زنجیره‌های جانبی هم در این زمینه نقش دارند، اما نقش اصلی را ستون مهره‌های زنجیره پلی‌پپتیدی بازی می‌کنند. این یافته براساس اندازه‌گیری انرژی‌های آزاد انتقالی ستون مهره‌های زنجیره پلی‌پپتید در محیط آبی و محیطی با غلظت یک مولار محلول‌های سازگار به‌دست آمده است. مشخص شده این میزان انرژی آزاد ستون مهره‌های پلی‌پپتید است که مشخص می‌کند یک محلول سازگار تا چه مقدار می‌تواند موجب پایداری پروتئین شود (Street *et al.* 2006). اکتوئین همانند دیگر محلول‌های سازگار در پاسخ به تنش اسمزی در ریزسازواره‌ها تولید می‌شود. البته در مقایسه با دیگر محلول‌های سازگار، اکتوئین دارای کاربردهای بسیاری در زمینه بیوتکنولوژی و صنعت از جمله تولید دارو و لوازم آرایشی و بهداشتی است. در ادامه به صورت اختصاصی به شرح خواص، مزیت‌ها و سازوکار اکتوئین و مشتق آن هیدروکسی‌اکتوئین پرداخته و مطالعاتی که در زمینه افزایش تحمل سلولی به تنش‌ها با استفاده از اکتوئین خارجی و یا بیان ژن‌های رمز کننده آن انجام شده را مرور می‌کنیم.

اکتوئین

اکتوئین با نام علمی (4S)-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid برای اولین بار در باکتری شدیدا شورپسند *Ectothiorhodospira halochloris* توسط Galinski و همکاران در سال ۱۹۸۵ کشف و گزارش شد (Galinski *et al.* 1985). سه سال بعد از کشف اکتوئین مشتق آن هیدروکسی‌اکتوئین با نام علمی (4S,5S)-2-methyl-5-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid، توسط Inbar و Lapidot از باکتری گرم مثبت خاکزی *Streptomyces parvulus* بدست آمد (Inbar & Lapidot, 1988). اکتوئین و هیدروکسی‌اکتوئین از نظر شیمیایی می‌توانند به عنوان اسیدآمینه‌های هتروسیکلیک و یا به عنوان مشتقات پیریمیدینی که به صورت نسبی هیدروژنه شده‌اند (شکل ۱) طبقه‌بندی شوند (Inbar *et al.* 1993).



شکل ۱- ساختمان مولکولی اکتواین و مشتق هیدروکسیله آن، هیدروکسی اکتواین (Malin & Lapidot. 1996)

Fig 1. Molecular structure of ectoine and its hydroxylated derivative, hydroxyectoine (Malin & Lapidot. 1996)

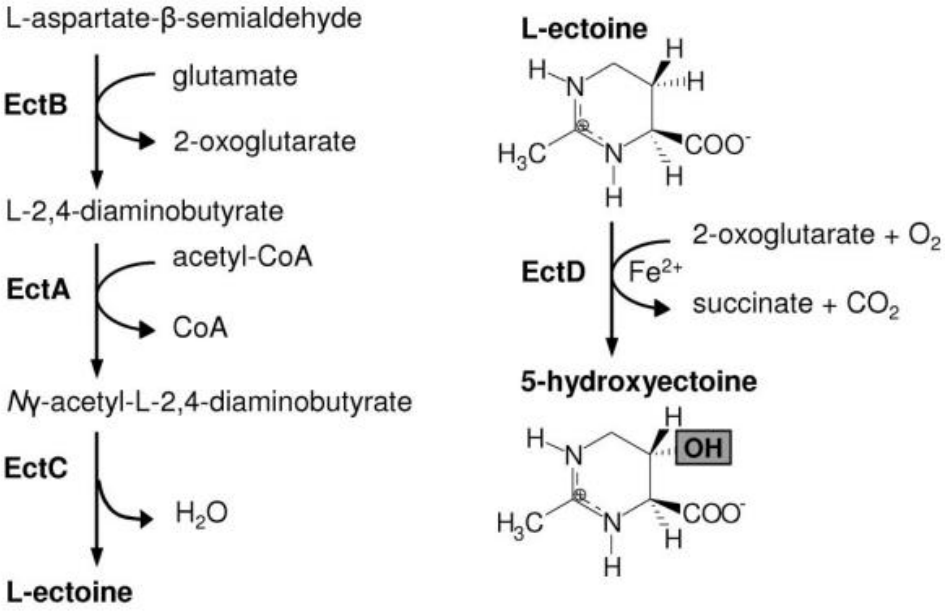
در ابتدا تصور می‌شد که این مواد به ندرت و به میزان بسیار کمی توسط باکتری‌ها ساخته می‌شوند، اما با استفاده از روش‌های تجزیه و تحلیل پیشرفته مانند HPLC و طیف‌سنجی NMR مشخص شد که اکتوئین و هیدروکسی‌اکتوئین به مقدار زیاد توسط باکتری‌ها و در پاسخ به تنش شوری و اسموتیک تولید می‌شوند. گونه‌های میکروبی زیادی قادر به تولید اکتوئین‌ها هستند به طوری که امروزه این مواد به‌عنوان پرکاربردترین محلول‌های سازگار در دنیای میکروبی شناخته می‌شوند.

مسیر بیوسنتز اکتوئین

مطالعات زیادی در زمینه سازماندهی و تنظیم مسیر بیوسنتز اکتوئین در گونه‌های مختلف ریزسازواره‌ها انجام شده است. بیوسنتز اکتوئین یک شاخه در مسیر سنتز اسیدآمینه‌های خانواده

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.9.7]

آسپارتات و شامل سه آنزیم اختصاصی است (شکل ۲).



شکل ۲- مسیر بیوسنتز اکتواین و هیدروکسی اکتواین در *Streptomyces* (Bursy *et al*. 2008)

Fig 2. The ectoine and hydroxyectoine biosynthesis pathway in *Streptomyces* (Bursy *et al*. 2008)

اولین آنزیم diaminobutyric acid (DABA) acetyltransferase با نام اختصاری EctA است، آنزیم بعدی DABA aminotransferase یا EctB و آنزیم سوم ectoine synthase است که با نام EctC نیز شناخته می‌شود. ژن‌های رمزکننده این آنزیم‌ها به طور معمول در خوشه‌های ژنی *ectABC* یا *ectABC-ask* قرار گرفته‌اند (Reshetnikov *et al*. 2011). تولیدکنندگان اکتوئین در بین باکتری‌های مختلف و تعداد کمی از آرکی‌ها شناسایی شده‌اند. ژن‌های بیوسنتز اکتوئین و هیدروکسی‌اکتوئین در برخی یوکاریوت‌های تک‌سلولی که در محیط‌های شور زندگی می‌کنند نیز مشاهده شده است. تعدادی از این پروتیست‌ها مانند *Halocafeteria seosinensis*، *Pharyngomonas kirbyi* و *Schmidingerothrix salinarum* به‌عنوان الگو مورد بررسی قرار گرفته‌اند. این موجودات جهت مقابله با تنش اسمزی علاوه بر اکتوئین مقادیر زیادی گلایسین بتائین و میواینوزیتول نیز تولید و ذخیره می‌کنند. این یوکاریوت‌های تک‌سلولی از باکتری‌های شورپسند محیط اطراف خود تغذیه می‌کنند. مطالعات فیلوژنتیکی ژن‌های بیوسنتز کننده اکتوئین‌ها نشان می‌دهد که این ژن‌ها تنها می‌توانسته‌اند از طریق انتقال ژن جانبی و توسط باکتری‌های خورده شده وارد ژنوم این یوکاریوت‌ها شده باشند (Czech & Bremer. 2018).

توارث و روابط خویشاوندی ژن‌های بیوسنتز اکتوئین

مطالعه مولکولی ژن‌های بیوسنتز کننده اکتواین در طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده است که آنزیم‌های مسئول بیوسنتز اکتوئین معمولا توسط یک کلاستر ژنی به نام *ectABC* که از نظر تکاملی حفاظت شده است، سنتز می‌شود. بیوسنتز اکتواین توسط یک واکنش آنزیمی سه مرحله‌ای و با پیش‌سازی به‌نام L–aspartate –β– semialdehyde که یک ماده حد واسط در فرایند متابولیسم آمینو اسیدها است، شروع می‌شود. L–2,4–diaminobutyrate و Nγ –acetyl –2,4– diaminobutyrate مواد حدواسط این واکنش آنزیمی هستند. توانایی تولید اکتوئین در میان باکتری‌ها شایع است. اما تنها گروهی از این باکتری‌ها توانایی تولید هیدروکسی اکتوئین را دارند. توانایی تولید هیدروکسی اکتوئین توسط میکروارگانیسم‌ها به‌طور ثابت به توانایی تولید اکتواین توسط آن‌ها برمی‌گردد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تولید هیدروکسی اکتوئین یا به‌طور مستقیم از اکتوئین و یا از یکی از مواد حدواسط انجام

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.9.7]

می‌شود. مستقیم‌ترین راه برای تولید هیدروکسی اکتوئین هیدروکسیلاسیون اکتوئین به واسطه عملکرد یک هیدروکسیلاز اختصاصی است (Bursy *et al*. 2007). در مطالعه‌ای که بر روی *Streptomyces coelicolor* انجام گرفت مشخص شد که اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین در نتیجه بیان کلاستر *ectABCD* سنتز می‌شود. همولوژی زیاد ژن‌های بیوسنتز اکتوئین در میکروارگانیسم‌هایی از موقعیت‌های تاکسونومیکی دور از هم و با ویژگی‌های فیزیولوژیکی مختلف، نشان دهنده حفاظت تکاملی این مسیر بیوشیمیایی است (Reshetnikov *et al*. 2011). ژن‌های رمز کننده آنزیم‌های مسیر بیوسنتز اکتوئین در ۵۰ ژنوم باکتریایی و در یک آرکئون (Nitrosopumilusmaritimus) شناسائی شده است. در این ارگانیسم‌ها ژن‌های *ectABC* در اکثر موارد به عنوان یک اپرن مرتب شده‌اند، اما گاهی استثنائاتی نیز وجود دارد (Lo *et al*. 2009). باکتری‌های متیلوتروف با کلاستر ٤ ژنی (*ectABC-ask*) نسبت به باکتری‌های دارای کلاستر ۳ ژنی (*ectABC*) تحمل بیشتری نسبت به شوری دارند و تجمع اکتوئین در آن‌ها بیشتر است. در باکتری‌های متیلوتروف مسیر بیوسنتز اکتوئین از لحاظ تکاملی بسیار حفاظت شده است هرچند تفاوت‌هایی در سازماندهی و تنظیم کلاستر ژنی *ect* مشاهده می‌شود (Khmelenina *et al*. 2010). محققین ژن‌های مسیر بیوسنتز اکتوئین در ٦ گونه هوازی از باکتری‌های نمک دوست استفاده کننده از متان، متانول یا متیل آمین را مشخص کردند. ارتباط فیلوژنتیکی پروتئین‌های ect با وابستگی فیلوژنتیکی استرین‌ها ارتباط ندارد. بنابراین توانایی متیلوتروف‌ها برای تولید اکتوئین نتیجه توارث افقی است (Sadeghi *et al*. 2014). پیش از این نیز محققین با خالص‌سازی و تعیین ویژگی‌های هر کدام از آنزیم‌های درگیر و همچنین مطالعه شرایط لازم برای فعالیت این آنزیم‌ها مسیر بیوسنتز اکتوئین از آسپارتیک بتا سمی آلدئید را در باکتری به شدت نمک دوست *Halomonas elongata* مشخص کرده بودند (Ono *et al*. 1999). این مسیر با فسفریلاسیون L-asparate آغاز می‌شود. پس از تعیین توالی ژنوم کامل (4061296 bp) *H. elongate* DSM 2581T مسیر متابولیسم اکتوئین در این باکتری شناسائی شد. از کاست ژنی تهیه شده از ژنوم این باکتری اغلب برای مطالعات انتقال ژن به گیاهان استفاده می‌شود (Nakayama *et al*. 2000).

سازوکار عملکرد اکتوئین

اکتوئین‌ها نیز همانند دیگر محلول‌های سازگار ترکیباتی با جرم ملکولی کم هستند که به خوبی در آب حل می‌شوند. این خصوصیات به آن‌ها اجازه می‌دهد تا با غلظت‌های در حد مولار در سلول ذخیره شوند. از روش‌های بیوفیزیکی زیادی برای بررسی چگونگی اثر اکتوئین‌ها روی پایداری ماکروملکول‌های زیستی استفاده شده است. این مطالعات منجر به ارائه چندین تئوری شده است. یکی از این تئوری‌ها که بیشترین مقبولیت را دارد مدل حذف ترجیحی (preferential exclusion model) است. این تئوری توضیح می‌دهد که اکتوئین‌ها در حالی‌که سازه‌های آبی قوی در اطراف بیوملکول‌ها می‌سازند، خودشان از اطراف پوسته آبی که ساخته‌اند، کنار می‌روند. در نتیجه پوسته آبی که سطح یک پروتئین را می‌پوشاند پایداری فرم طبیعی پروتئین را بالا می‌برد. به شکلی که فرم‌های دناتوره این پروتئین از نظر ترمودینامیکی ناپایدارتر خواهد بود. اکتوئین‌ها به‌طور مستقیم با سطح بیوملکول‌ها واکنش نمی‌دهند، بلکه با واکنش مستقیم با ملکول‌های آب انتشار و پراکندگی آن‌ها را از اطراف بیوملکول‌ها کند می‌کنند. این پدیده این‌گونه توضیح داده می‌شود که اکتوئین علاوه بر یک گروه کربوکسیلات با بار منفی بوسیله گروه‌های هیدروژن موجود در ساختمان خود قابلیت تشکیل پیوندهای هیدروژنی با هفت تا ده ملکول آب را دارد. خاصیت تشکیل پیوندهای هیدروژنی ملکول اکتوئین با آب حتی در غلظت‌های بالای نمک نیز مختل نمی‌شود. این خصوصیت اکتوئین‌ها باعث تجمع ملکول‌های آب محلی در اطراف بیوملکول‌ها و جلوگیری از پراکندگی آن‌ها می‌شود. بدین‌گونه اکتوئین‌ها بدون واکنش مستقیم با بیوملکول‌ها باعث افزایش پایداری آن‌ها می‌شوند (Harishchandra *et al*. 2010).

حفاظت از ماکرومولکول‌ها توسط اکتوئین

مکانیزم محافظت از پروتئین‌ها و غشاها توسط اکتوئین به خوبی شناسایی شده است. اکتوئین در مقایسه با آب تمایل کمتری برای

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.9.7]

اتصال به سطح بیومولکول‌ها بویژه پروتئین دارد. این تمایل کم موجب توزیع ناهمگون اکتوئین در آب موجود در سلول و ایجاد یک نیروی ترمودینامیکی می‌شود. این نیرو سعی دارد بیشترین تعداد مولکول آب را در اطراف پروتئین حفظ کند که این حالت تنها در صورتی‌که پروتئین تاخوردگی و پیچش صحیح را در ساختارهای دوم و سوم داشته باشد، بدست می‌آید (Barth *et al.* 2000). افزایش پایداری پروتئین‌ها و جلوگیری از دناتوره شدن و یا توده شدن آن‌ها در حضور اکتوئین این نقش را به خوبی توضیح می‌دهد. بنابراین حضور اکتوئین در شرایط استرس، آسیب‌های ناشی از پیچش اشتباه پروتئین را کاهش می‌دهد (Kunte *et al.* 2014). اکتوئین علاوه بر حفظ محتوای آب سلول (به عنوان یک محلول سازگار) در شرایط تنش، موجب پایداری ساختار پروتئین‌ها (بویژه پروتئین‌های غشائی) و در نتیجه حفظ عملکرد صحیح آن‌ها می‌شود. تاثیر اکتوئین در افزایش پایداری آنزیم‌ها در دماهای بالا گزارش شده است. افزودن اکتوئین به آنزیم فیتاز (Phytase) در فرایند گرانوله کردن در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد، موجب افزایش مقاومت آن و حتی افزایش قدرت هیدرولیز آنزیم می‌شود (Zhang *et al.* 2006). حضور اکتوئین تغییراتی را در ساختار DNA القاء می‌کند که در اثر این تغییرات آنزیم‌های اندونوکلئاز قادر به قطعه قطعه کردن آن نخواهند بود (Malin *et al.* 1999). با توجه به این خصوصیت اکتوئین، افزودن آن به بافر (Polymerase chain reaction) باعث افزایش پایداری آنزیم دی‌انآ پلیمراز (DNA polymerase) در دماهای بالا و کاهش دمای ذوب (Melting temperature) در DNA دو رشته‌ای غنی از GC می‌شود (Lapidot *et al.* 1995). تغییر ساختار DNA در حضور اکتوئین اندرکنش آن را با عوامل رونویسی تحت تاثیر قرار می‌دهد. این تغییرات در سطح بیان ژن مشاهده شده است. تغییر در بیان ژن‌های دخیل در سازوکارهای تحمل به تنش‌های غیرزنده و کاهش سطح عوامل موثر در تنش‌های اکسیداتیو گزارش شده است. القاء بیان ژن‌های پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat shock proteins) بواسطه تیمار با اکتوئین در سلول‌هایی که در معرض اشعه UV قرار گرفته‌اند، دیده شده است (Buommino *et al.* 2005). پوشش‌های پروتئینی در علوم زیستی، پزشکی (Wang *et al.* 2020) و صنایع غذایی کاربرد دارند. این پوشش‌ها نسبت به کم آبی بسیار حساس هستند و چنانچه در معرض هوا قرار بگیرند، متحمل تغییرات قابل‌توجه و برگشت ناپذیری می‌شوند. در این شرایط اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین می‌توانند از فعالیت پوشش‌های پروتئینی یک لایه، مخصوصا انواع آنزیمی محافظت کنند. اثر حفاظتی این مواد با مدل حذف ترجیحی قابل توجیه است. اکتوئین یک لایه نازک آب را در اطراف پروتئین به دام انداخته و با حفظ یک محیط آبی مانع از باز شدن پروتئین می‌شود. این خصوصیت اجازه نگهداری طولانی‌تر سطوح پوشیده شده با پروتئین را فراهم می‌کنند، در حالی‌که پروتئین آب خود را حفظ کرده و هنوز فعال است (Killian *et al.* 2018).

محصولات تجاری حاوی اکتوئین

اکتوئین کاربرد زیادی در صنعت داروسازی دارد (www.ectoin.net/EN/anwendung/ [Accessed December 22nd, 2016]). هم‌اکنون محصولات زیادی از اکتوئین به‌صورت تجاری در داروخانه‌ها وجود دارد. به‌عنوان مثال قطره چشم حاوی اکتوئین باعث کاهش علائم حساسیت مانند قرمزی، خارش و التهاب ناشی از حساسیت‌زاهای مختلف مانند گرده گیاهان و ذرات گرد و خاک می‌شود. این محصول به دلیل عدم استفاده از مواد نگهدارنده برای کودکان، افراد حساس و کسانی که از لنزهای تماسی استفاده می‌کنند، مناسب است. استفاده از قطره حاوی اکتوئین باعث نوسازی بافت ملتحمه خشک و تحریک شده چشم می‌شود و همچنین باعث پایدار شدن لایه لیپیدی موجود در لایه محافظت کننده سطح چشم شده و در نتیجه از آسیب‌های بعدی چشم جلوگیری می‌کند (Werkhäuser *et al.* 2014). محصول دیگر، اسپری بینی حاوی یک تا دو درصد اکتوئین است. استفاده از این اسپری، علائم ناشی از حساسیت مانند خارش، عطسه، آبریزش و گرفتگی بینی را کاهش می‌دهد. مطالعات بالینی ثابت کرده که استفاده از اکتوئین موجب افزایش و تقویت مخاط بینی می‌شود، به‌طوری‌که از این محصول می‌توان جهت پیشگیری از عفونت‌های میکروبی نیز استفاده کرد. محلول اکتوئین حاوی مقادیر بیشتری از نمک نسبت به بدن انسان است و اسپری آن به بینی باعث از بین رفتن میکروب‌های بیماری‌زای

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.9.7]

موجود در بینی و سینوس‌ها شده و التهاب ناشی از عوامل عفونت‌زا را از بین می‌برد (Eichel *et al.* 2014). داروی دیگر حاوی اکتوئین یک لایه محافظت کننده و مرطوب کننده روی غشاء مخاطی تحریک شده دهان و گلو تشکیل می‌دهد که ورم گلو و درد در هنگام بلع غذا را تسکین می‌دهد. این دارو همچنین التهاب و تحریک مخاط گلو در اثر سرفه و سرما خوردگی را کاهش می‌دهد. همچنین به‌دلیل این‌که این ماده باعث تثبیت و تقویت لایه مخاطی دهان و گلو می‌شود، خطر حمله باکتری‌های عفونت‌زا نیز کاهش می‌یابد (Müller *et al.* 2016). شرکت‌های داروسازی از اکتوئین در پمادها و کرم‌های درمانی نیز استفاده می‌کنند. از این کرم‌ها برای درمان اگزما، پسوریازیس و دیگر بیماری‌های التهابی پوست استفاده می‌شود. مطالعات بالینی نشان داده که اکتوئین از روند ترمیم پوست پشتیبانی می‌کند و باعث نرم و صاف شدن پوست می‌شود (Marini *et al.* 2014). محلول‌های تنفسی حاوی اکتوئین در درمان برونشیت حاد و سایر عفونت‌های دستگاه تنفسی کاربرد وسیعی دارند (Tran *et al.* 2019). اثر درمانی اکتوئین روی بیماری آلزایمر (Kanapathipillai *et al.* 2005) و سلول های سرطانی ریه (Shaikhpour *et al.* 2019) نیز به اثبات رسیده است.

نقش حفاظتی اکتوئین در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی

مطالعات زیادی در زمینه اثر محافظتی اکتوئین روی موجودات انجام شده است. به عنوان مثال اثر محافظتی اکتوئین روی باکتری حساس به تنش اسمزی *Escherichia coli* مطالعه شده است. در این مطالعات مشخص شد که اکتوئین نیز همانند گلایسین بتائین در صورت اضافه شدن به محیط کشت توانایی ارتقاء رشد این باکتری را در غلظت‌های بالای نمک دارد. باکتری *اشریشیا کولی* قادر به ساخت اکتوئین نیست، ولی در صورت قرار گرفتن در شرایط تنش اسمزی قادر به جذب این ماده از محیط کشت و انباشته کردن آن در داخل سلول است (Talibart *et al.* 1994). تاثیر اکتوئین روی افزایش فعالیت ضدقارچی تعدادی از باکتری‌هایی که به برای کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زا عمل می‌کنند نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. دو باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* و *Microbacterium oleovorans* از عوامل کنترل زیستی قارچ بیماری‌زای *Fusarium verticillioides* هستند. این قارچ یکی از آفت‌های اصلی گیاه ذرت در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است. در این مطالعه ابتدا این دو باکتری را در محیط‌هایی با غلظت بالای نمک کشت کردند. این کار موجب تولید و تجمع مقدار زیادی اکتوئین و گلایسین بتائین داخل سلول‌های این باکتری‌ها می‌شود. بررسی‌های بعدی نشان داد که این باکتری‌ها قادرند شرایط سخت محیطی را بهتر تحمل کنند و همچنین میزان رشد قارچ *F. verticillioides* در حضور این باکتری‌ها به مقدار قابل‌توجهی کاهش پیدا کرده بود (Sartori *et al.* 2012). اثر مثبت اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین بر افزایش مهار ریزسازواره‌های بیماری‌زای گیاهی توسط باکتری‌های آنتاگونیستی که قبلا در معرض تنش شوری و اسموتیک قرار گرفته‌اند، موضوع مطالعات دیگری نیز بوده است (Kamali *et al.* 2016). علاوه بر افزایش اثر مهاری این باکتری‌ها روی عوامل بیماری‌زا، تجمع اکتوئین باعث افزایش مقاومت آن‌ها به تنش‌های شوری، دمایی و افزایش قدرت بقاء آن‌ها در شرایط سخت محیطی نیز می‌شود (Teixidó *et al.* 2005; Cañamás *et al.* 2007). گونه‌هایی از *Streptomyces* به عنوان باکتری‌های کلونیزه کننده ریزوسفر علاوه بر خاصیت زیست کنترلی قارچ‌ها محرک رشد گیاه نیز هستند. تولید اکتوئین توسط این نوع باکتری‌ها و اثر مثبت آن‌ها روی بهبود رشد و تحمل تنش شوری در گندم (Akbari *et al.* 2016) و نعنا فلفلی (Esmaeil Zade *et al.* 2019) گزارش شده است. اگر چه اثر اکتوئین روی تحریک رشد گونه‌های رایزوبیومی در محیط‌هایی با غلظت بالای نمک به اثبات رسیده است، اما اثر اکتوئین روی این نوع باکتری‌ها کمی متفاوت از دیگر محلول‌های سازگار است. این ماده پس از جذب توسط این باکتری‌ها در آن‌ها تجمع پیدا نمی‌کند، بلکه توسط سلول کاتابولیزه می‌شود. پیشنهاد شده که اکتوئین به عنوان فعال‌کننده رونویسی ژن‌هایی که آنزیم‌های بیوسنتز دیگر محلول‌های سازگار را رمز می‌کنند نیز عمل می‌کند. همچنین کاتابولیسم اکتوئین ممکن است تجمع دیگر محلول‌های سازگار را نیز تسهیل کند (Miller & Wood. 1996).

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.9.7]

اکتوئین و افزایش تحمل به خشکی

اثر مستقیم اکتوئین روی گیاهان مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. تاثیر مثبت استفاده از اکتوئین در افزایش جوانه‌زنی دانه‌های کتان (*Linum usitatissimum* L.) در شرایط شوری اثبات شده است. جوانه‌زنی و رشد دانه‌های کتان تحت تاثیر شرایط محیطی مانند دما، رطوبت و میزان شوری خاک قرار دارد. وجود مقادیر بالای نمک (NaCl) موجب کاهش درصد جوانه‌زنی بذر، ماده خشک گیاهچه و بقای کم آن و کاهش عملکرد زیست توده می‌شود. در آزمایشی میزان تاثیر اکتوئین روی جوانه‌زنی دانه‌ها، وزن خشک و تر گیاه و همچنین فعالیت پراکسیدازی و نسبت سدیم به پتاسیم کتان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که تیمار بذر و گیاه کتان با اکتوئین چه به صورت اسپری روی گیاه و چه به صورت افزودن آن به خاک باعث بهبود یا افزایش معنی‌دار تمام پارامترهای فیزیولوژیک به علت اثر اکتوئین در کاهش تجمع سدیم و افزایش میزان پتاسیم در داخل گیاه می‌شود (Elsakhawy *et al*. 2019).

مهندسی ژنتیک برای ساخت اکتوئین در گیاهان

گیاهان در پاسخ به تنش‌های شوری و کم‌آبی قادر به ساخت و تجمع محلول‌های سازگاری مانند گلیسرول، سوربیتول، مانیتول، پرولین، گلایسین بتائین و دیگر متابولیت‌های حفاظتی هستند. انتقال ژن محلول‌های سازگار، تحمل و پاسخ به تنش شوری را در گیاهان افزایش داده است (Sakamoto *et al*. 1998; Tarczynski *et al*. 1993; Zhu *et al*. 1998). در سال ۲۰۰۰ پژوهشگران ژاپنی برای اولین بار ژن‌های رمز کننده آنزیم‌های مسئول سنتز اکتوئین (*ectA*، *ectB* و *ectC*)، بدست آمده از باکتری *Halomonas elongata* را به سلول‌های کشت داده شده گیاه توتون انتقال دادند. این سلول‌های تراریخته قادر به تولید و تجمع اکتوئین در سلول‌های خود بودند و همچنین بهبود قابل ملاحظه‌ای را در تحمل به تنش شوری نشان دادند (Nakayama *et al*. 2000). شش سال بعد گروه دیگری از پژوهشگران ژن‌های مورد نیاز برای رمز کردن اکتوئین را که از باکتری *halophilus Marinococcus* جدا شده بود به کلروپلاست تنباکو انتقال دادند. دلیل انتخاب اندامک کلروپلاست برای بیان این ژن‌ها این بود که مقدار آسپارتات سمی آلدئید (پیش ساز اکتوئین) در این اندامک بیشتر از قسمت‌های دیگر گیاه است. دلیل دوم تمایل پژوهشگران به مطالعه نقش حفاظتی اکتوئین روی آنزیم روبیسکوی موجود در این اندامک بود. فعالیت کربوکسیلازی و اکسیژنازی روبیسکو به تنش‌های غیرزیستی حساس است. این حساسیت زیاد به دلیل افزایش تولید H_2O_2 و دیگر گونه‌های اکسیژن فعال ROS است که باعث تجزیه پروتئین روبیسکو می‌شود. بیان ژن اکتوئین در کلروپلاست گیاه باعث پایداری پروتئین روبیسکو حتی بعد از قرار گرفتن طولانی مدت در معرض تنش‌های شوری و کم آبی شد. همچنین رشد، گلدهی و دانه‌زایی این گیاهان تراریخته در شرایط تنش شوری نسبت به گیاهان شاهد بیشتر بود. از دیگر نتایج بدست آمده می‌توان به تجمع بیشتر پرولین و فنل و افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز و فنیل آمونیا لیاز اشاره کرد که در مجموع به گیاه توانایی مقابله با شرایط تنش‌زای محیطی را می‌دهند. حفظ تمامیت و افزایش فعالیت روبیسکو، افزایش میزان فتوسنتز و پایداری غشاهای سلولی در مقایسه با گیاهان شاهد از دیگر نتایج تولید اکتوئین در کلروپلاست بود (Rai *et al*. 2006). در آزمایش دیگری که روی گیاه توتون انجام شد، ژن‌های بیوسنتز اکتوئین (*ectABC*) از طریق سیستم انتقال ژن *Agrobacterium tumefaciens* در گیاه توتون بیان شدند. سپس گیاهان شاهد و تراریخته تحت تنش شوری قرار گرفتند. کاهش وزن خشک گیاه در گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان شاهد به‌میزان قابل‌توجهی کمتر بود. همچنین کاهش میزان فتوسنتز در گیاهان شاهد نسبت به گیاهان تراریخته مشاهده شد. با کمک روش‌های سادرن بلاتینگ و نوردرن بلاتینگ مشخص شد که بیان ژن‌های بیوسنتز اکتوئین در شرایط تنش شوری در برگ‌ها بیشتر از قسمت‌های دیگر گیاه از جمله ریشه بود. با این حال اکتوئین تولید شده در ریشه تجمع پیدا کرده بود. این نتایج نشان می‌دهد که اکتوئین تولید شده در برگ به ریشه انتقال یافته و سبب بهبود عملکرد ریشه در جذب مداوم آب و انتقال آن به ساقه تحت شرایط تنش شوری شده است (Moghaieb *et al*. 2006). در مطالعه دیگری ژن‌های رمز کننده بیوسنتز اکتوئین به

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.9.7]

گیاه گوجه فرنگی منتقل شد. انتقال ژن با استفاده از کاست ژنی *ect. ABC* که از ژنوم *H. elongata* OUT30018 کلون و در ناحیه T-DNAی ناقل دوگانه pBI-102 آگروباکتریوم تومفاسینس سویه LBA4404 همسانه‌سازی شده بود، انجام شد. سپس گیاهان تراریخته که اکتوئین تولید می‌کردند، تحت تنش شوری قرار داده شدند. با افزایش مقدار نمک میزان اکتوئین تولیدی در گیاه افزایش پیدا کرد. در این آزمایش نیز افزایش وزن خشک گیاه و افزایش میزان فتوسنتز در گیاهان تراریخته نسبت به شاهد مشاهده شد. همچنین افزایش تجمع اکتوئین در ریشه جذب آب و انتقال آن را به ساقه و برگ افزایش داد (Moghaieb *et al*. 2011).

چشم انداز اکتوئین در کشاورزی نوین

پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد که تولید گیاهان تراریخته با قابلیت ساخت و ذخیره سازی اکتوئین می‌تواند راهکار جدیدی در مبحث تولید گیاهان مقاوم به تنش شوری باشد. همچنین می‌توان با تولید اکتوئین و ذخیره شدن این ماده در ریشه خوراکی گیاهانی مانند سیب‌زمینی یا چغندرقند امکان ایجاد صفات جدیدی مانند ماندگاری بالای این محصولات و یا ایجاد خواص دارویی را در این محصولات بررسی کرد.

منابع

Akbari AR, Gharanjik S, Koobaz P, Karimi E, Sadeghi A. 2016. Evaluation of mutual effect of ectoine(s) producing *Streptomyces* and wheat at salt conditions. Crop Biotechnology 13: 57-68.

Ball P. 2017. Water is an active matrix of life for cell and molecular biology. PNAS 114:13327-13335.

Barth S, Huhn M, Matthey B, Klimka A, Galinski EA, Engert A. 2000. Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. Applied and environmental microbiology 66:1572-1579.

Buommino E, Schiraldi C, Baroni A, Paoletti I, Lamberti M, De Rosa M, Tufano MA. 2005. Ectoine from halophilic microorganisms induces the expression of hsp70 and hsp70B' in human keratinocytes modulating the proinflammatory response. Cell Stress Chaperones 10:197-203.

Bursy J, Kuhlmann AU, Pittelkow M, Hartmann H, Jebbar M, Pierik AJ, Bremer E. 2008. Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses. Applied Environmental Microbiology 74: 7286–729.

Bursy J, Pierik AJ, Pica N, Bremer E. 2007. Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. Journal of Biological Chemistry 282: 31147–31155.

Cañamás TP, Viñas I, Usall J, Magan N, Morelló JR, Teixidó N. 2007. Relative importance of amino acids, glycine–betaine and ectoine synthesis in the biocontrol agent Pantoea agglomerans CPA-2 in response to osmotic, acidic and heat stress. Letters in Applied Microbiology 45:6-12.

Czech L, Bremer E. 2018. With a pinch of extra salt—Did predatory protists steal genes from their food? PLOS Biology 16:e2005163.

Diamant S, Eliahu N, Rosenthal D, Goloubinoff P. 2001. Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. The Journal Of Biological Chemistry 276: 39586-39591.

Eichel A, Bilstein A, Werkhäuser N, Mösges R. 2014. Meta-analysis of the efficacy of ectoine nasal spray in patients with allergic rhinoconjunctivitis. Journal of Allergy 2014: 292545.

Elsakhawy TA, Fetyan NAH, Ghazi AA. 2019. The potential use of ectoine produced by a moderately halophilic bacteria *Chromohalobacter salexigens* KT989776 for enhancing germination and primary seedling of flax "*Linum usitatissimum* L." under salinity conditions. Biotechnology Journal International 23:1-12.

Esmaeil Zade NS, Sadeghi A, Moradi P. 2019. *Streptomyces* strains alleviate water stress and increase peppermint (*Mentha piperita*) yield and essential oils. Plant and Soil 434: 441–452.

Galinski EA, Pfeiffer HP, Trüper HG. 1985. 1, 4, 5, 6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid: A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. European Journal of Biochemistry 149:135-139.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.9.7]

Galinski EA, Trüper HG. 1994. Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. FEMS Microbiology Reviews 15: 95-108.

Harishchandra RK, Wulff S, Lentzen G, Neuhaus T, Galla HJ. 2010. The effect of compatible solute ectoines on the structural organization of lipid monolayer and bilayer membranes. Biophysical Chemistry 150:37-46.

Inbar L, Frolow F, Lapidot A. 1993. The Conformation of new Tetrahydropyrimidine derivatives in solution and in the crystal. European Journal of Biochemistry 214: 897-906.

Inbar L, Lapidot A. 1988. The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of 13C-and 15N-labeled L-glutamate and 13C and 15N NMR spectroscopy. The journal of Biological chemistry 263:16014-16022.

Kamaly A, Ahmadzadeh M, Sadeghi A, Karimi E. 2016. Effect of exogenous ectoines on some antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 under salt conditions. Biological Journal of Microorganism 17: 35-48.

Kanapathipillai M, Lentzen G, Sierks M, Park CB. 2005. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β-amyloid. FEBS Letters 579:4775-4780.

Kempf B, Bremer E. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Archives of Microbiology 170: 319-330.

Khmelenina VN, Mustakhimov II, Reshetnikov AS, Kalyuzhnaya MG, Trotsenko A. 2010. Genetic and biochemical aspects of ectoine biosynthesis in moderately halophilic and halotolerant Methylotrophic bacteria. American Journal of Agricultural and Biological Science 4: 446-458.

Killian MS, Taylor AJ, Castner DG . 2018. Stabilization of dry protein coatings with compatible solutes. Biointerphases 13: 06E401-2.

Kunte HJ, Lentzen G, Galinski E. 2014. Industrial production of the cell protectant ectoine: protection mechanisms, processes, and products. Current Biotechnology 3: 10-25.

Lapidot A, Ben-Asher E, Eisenstein M. 1995. Tetrahydropyrimidine derivatives inhibit binding of a Tat-like, arginine-containing peptide, to HIV TAR RNA in vitro. FEBS letters 367:33-38.

Lippert K, Galinski EA. 1992. Enzyme stabilization be ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. Appllied Microbiology and Biotechnology 37: 61-65.

Lo CC, Bonner CA, Xie G, D'Souza M, Jensen RA. 2009. Cohesion group approach for evolutionary analysis of aspartokinase, an enzyme that feeds a branched network of many biochemical pathways. Microbiology and Molecular Biology Reviews 73:594-551.

Malin G, Iakobashvili R, Lapidot A. 1999. Effect of tetrahydropyrimidine derivatives on protein-nucleic acids interaction Type II Restriction endonucleases as a model system. The Journal of biological chemistry 274:6920-6929.

Malin G, Lapidot A. 1996. Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on Escherichia coli in response to osmotic and heat stress. Journal of Bacteriology 178: 385–395.

Marini A, Reinelt K, Krutmann J, Bilstein A. 2014. Ectoine-containing cream in the treatment of mild to moderate atopic dermatitis: a randomised, comparator-controlled, intra-individual double-blind, multi-center trial. Skin Pharmacology and Physiology 27: 57-65.

Miller KJ. 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. Annual Review of Microbiology 50:101-136.

Moghaieb REA, Nakamura A, Saneoka H, Fujita K. 2011. Evaluation of salt tolerance in ectoine-transgenic tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in terms of photosynthesis, osmotic adjustment, and carbon partitioning. GM Crops 2: 58-65.

Moghaieb REA, Tanaka N, Saneoka H, Murooka Y, Ono H, Morikawa H, Nakamura A, Nguyen N T, Suwa R, Fujita K. 2006. Characterization of salt tolerance in ectoine-transformed tobacco plants (*Nicotiana tabaccum*): photosynthesis, osmotic adjustment, and nitrogen partitioning. Plant Cell and Environment 29: 173-182.

Müller D, Lindemann T, Shah-Hosseini K, Scherner O, Knop M, Bilstein A, Mösges R. 2016. Efficacy and tolerability of an ectoine mouth and throat spray compared with those of saline lozenges in the treatment of acute pharyngitis and/or laryngitis: a prospective, controlled, observational clinical trial. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology 273: 2591-2597.

Nakayama H, Yoshida K, Ono H, Murooka Y, Shinmyo A. 2000. Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. Plant Physiology 122: 1239-1248.

Ono H, Sawada K, Khunajakr N, Tao T, Yamamoto M, Hiramoto M, Shinmyo A, Takano M, Murooka Y. 1999. Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic Eubacterium, *Halomonas elongata*. Journal of Bacteriology 181: 91-99.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.9.7]

Oren A. 2013. Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. Frontiers in Microbiology 4: 315.

Rai M, Pal M, Sumesh K, Jain V, Sankaranarayanan A. 2006. Engineering for biosynthesis of ectoine (2-methyl 4-carboxy tetrahydro pyrimidine) in tobacco chloroplasts leads to accumulation of ectoine and enhanced salinity tolerance. Plant Science 170: 291-306.

Reshetnikov AS, Khmelenina VN, Mustakhimov II, Kalyuzhnaya M, Lidstrom M, Trotsenko YA. 2011. Diversity and phylogeny of the ectoine biosynthesis genes in aerobic, moderately halophilic methylotrophic bacteria. Extremophiles 15: 653-663.

Sadeghi A, Soltani BM, Salehi Jouzani G, Hadavand H, Khayam Nekouei M, Sadeghizadeh M. 2014. Diversity of the ectoines biosynthesis genes in salt tolerant *Streptomyces* and evidence for inductive effect of ectoines on their accumulation. Microbiological Research 169: 699-708.

Sakamoto A, Alia A, Murata N. 1998. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. Plant Molecular Biology 38: 1011-1019.

Sartori M, Nesci A, Magan N, Etcheverry M. 2012. Accumulation of the betaine and ectoine in osmotic stress adaptation of biocontrol agents against *Fusarium verticillioides* in maize. Agricultural Sciences 3: 83-89.

Shaikhpour M, Sadeghi A, Yazdian F, Mansoori A, Movafagh A. 2019. Anticancer and apoptotic effects of ectoine and hydroxyectoine on non-small cell lung cancer cells: An in-vitro investigation. Multidisciplinary Cancer Investigation 3:14-19.

Storey KB. 1997. Organic solutes in freezing tolerance. Comparative Biochemistry and Physiology 117: 319-326.

Street TO, Bolen DW, Rose GD. 2006. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. PNAS 103: 13997-14002.

Talibart R, Jebbar M, Gouesbet G, Himdi-Kabbab S, Wroblewski H, Blanco C, Bernard T. 1994. Osmoadaptation in rhizobia: ectoine-induced salt tolerance. Journal of Bacreriology 176: 5210-5217.

Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ. 1993. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. Science 259: 508-510.

Teixidó N, Cañamás TP, Usall J, Torres R, Magan N, Viñas I. 2005. Accumulation of the compatible solutes, glycine–betaine and ectoine, in osmotic stress adaptation and heat shock cross-protection in the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. Letters in Applied Microbiology 41: 248-252.

Tran BH, Dao VA, Bilstein A, Unfried K, Shah-Hosseini K, Mösges R. 2019. Ectoine-containing inhalation solution versus saline inhalation solution in the treatment of acute bronchitis and acute respiratory infections: a prospective, controlled, observational study. BioMed Research International 2019: 7945091.

Wang Y, Lan H, Yin T, Zhang X, Huang J, Fu H, Huang J, McGinty S, Gao H, Wang G, Wang Z. 2020. Covalent immobilization of biomolecules on stent materials through mussel adhesive protein coating to form biofunctional films. Materials Science and Engineering: C 106: 110187.

Weinisch L, Kirchner I, Grimm M, Kühner S, Pierik AJ, Rosselló-Móra R, Filker S. 2019. Glycine betaine and ectoine are the major compatible solutes used by four different halophilic heterotrophic ciliates. Microbial Ecology 77: 317-331.

Werkhäuser N, Bilstein A, Sonnemann U. 2014. Treatment of allergic rhinitis with ectoine containing nasal spray and eye drops in comparison with azelastine containing nasal spray and eye drops or with cromoglycic acid containing nasal spray. Journal of Allergy 2014: 176597.

Zhang L, Wang Y, Zhang C, Wang Y, Zhu D, Wang C, Nagata S. 2006. Supplementation effect of ectoine on thermostability of phytase. Journal of Bioscience and Bioengineering 102:560-563.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.9.7]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 2

Production of ectoine in plants using genetic engineering to reduce the negative effects of abiotic stresses

Maryam Sadeghi[1], Akram Sadeghi[2]*

1-Molecular Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran
2-Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

*Corresponding Author, Email: aksadeghi@abrii.ac.ir

ABSTRACT

Fluctuations in environmental water potential caused by drought and salinity are the most important abiotic stress factors in many natural habitats of organisms. Compatible solutes stabilize biomolecules and whole cells and play as stress-protective agents. Ectoine and its derivative 5-hydroxyectoine as compatible solutes are synthesized widely by the members of the bacteria, a few archaea, and eukarya in response to high salinity and osmolarity. Previously reported that the genetically engineered ectoine synthesis using ectA, ectB or ectC has resulted in increased hyperosmotic tolerance of model plants. In this review, the importance of current and potential applications of ectoines as protecting agents for macromolecules, cells, and tissues, are discussed. Besides, the leading theory for the protection mechanism of ectoines including the exclusion of ectoines molecules from the protein surface, slows the diffusion of water molecules and preserve the native state of the protein were explained. The experimental data of the past decades concerning alleviating drought and salinity stresses by ectoines and the prospects for their use in different fields of modern biotechnology, including genetic engineering techniques, have been summarized in this review article.

Key words: Compatible solutes, Ectoines, Genetic engineering, Osmotic stress

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.9.7]