Glikozilacija proteina u endoplazmatskom retikulumu tijekom diferencijacije stanica hrena (Armoracia lapathifolia Gilib.) u kulturi in vitro

Gospočić, Janko

Master's thesis / Diplomski rad

2008

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:217:094854

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

Janko Gospočić

Glikozilacija proteina u endoplazmatskom retikulumu tijekom diferencijacije stanica hrena (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) u kulturi *in vitro*

Diplomski rad

Zagreb, 2008.

Ovaj rad, izrađen u Zavodu za molekularnu biologiju, pod vodstvom doc. dr. sc. Biljane Balen, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Najljepše se zahvaljujem docentici dr. sc. Biljani Balen na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici da izradim ovaj rad. Posebno Vam hvala na savjetima i podršci tijekom pisanja.

Dipl. ing. Petri Peharec neizmjerno hvala na stručnim savjetima, strpljivosti i razumijevanju.

Svim članovima Zavoda za molekularnu biologiju zahvaljujem na pomoći.

Janko

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Glikozilacija proteina u endoplazmatskom retikulumu tijekom diferencijacije stanica hrena (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) u kulturi *in vitro*

Janko Gospočić

Biološki odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Rooseveltov trg 6, Zagreb, Hrvatska

U ovom radu uspoređivane su transformirane linije hrena (tumorska i teratomska) s kontrolnim tkivom lista u elektroforetskoj slici i glikozilaciji ukupnih staničnih proteina. Poseban naglasak stavljen je na usporedbu navedenih tkiva u strukturi i sastavu N-glikana proteina endoplazmatskog retikuluma.
Osim središnje uloge u metabolizmu, endoplazmatski retikulum je i početno mjesto glikozilacije proteina u eukariotskoj stanici. N-glikozilacija je glavna modifikacija proteina u biljnim stanicama. Prema supstituentima vezanim na šećernu jezgru, biljne N-glikane možemo podijeliti u četri osnovne grupe: visoko manozni tip, složeni tip, paucimanozni tip te hibridni tip N-glikana. Dok je N-glikozilacija relativno dobro opisan proces, O-glikozilacija u biljaka je slabo istražena.
U ovom radu glikoproteini su odvojeni SDS-PAG elektroforezom te preneseni na nitrocelulozu membranu. N-glikozilirani proteini na membranama otkriveni su lektinom Con A. Glikani su dalje analizirani obradom membrana različitim lektinima (GNA, MAA, SNA, PNA, DSA, RCA I i UEA). Rezultati prikaza glikoziliranih proteina lektinima dokazali su da je glikozilacija ukupnih staničnih proteina i proteina endoplazmatskog retikuluma promijenjena tijekom diferencijacije stanica hrena.
Elektronskom mikroskopijom uočene su velike razlike u unutrašnjoj građi stanica tkiva lista, teratoma (organiziranog i neorganiziranog) te tkiva tumora. U svim transformiranim linijama primijećeni su nepravilno građeni plastidi. Velika sličnost u građi stanica uočena je kod tumora i neorganiziranog teratoma. Ova dva tipa tkiva sadrže velike nepravilne jezgre i male plastide. U navedenim tkivima nisu uočene razlike u strukturi endoplazmatskog retikuluma.

(47 stranica, 23 slika, 1 tablica, 38 literaturnih navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u biblioteci na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, Rooseveltov trg 6

Ključne riječi: hren, stanična diferencijacija, glikozilacija, N-glikani, endoplazmatski retikulum, lektini, elektronska mikroskopija

Mentor: dr. sc. Biljana Balen, doc.

Ocjenitelji: dr. sc. Biljana Balen, doc.
dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, prof.
dr. sc. Mirta Tkalec, doc.

Rad prihvaćen: 12.11.2008.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology Graduation Thesis

Glycosylation of proteins in endoplasmic reticulum during horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) cellular differentiation in *in vitro* culture

Janko Gospočić

Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb,
Rooseveltov trg 6, Zagreb, Croatia

In this work different horseradish transformed lines (tumour and teratoma) were compared with control samples of leaf tissue in electrophoretic pattern of total cell proteins and their glycosylation. Emphasis was put on the comparison of these tissues in structure and composition of N-glycans of endoplasmic reticulum proteins.
Despite its central metabolic role, the endoplasmic reticulum is also a starting point of protein glycosylation in eukaryotic cells. Two forms of protein glycosylation are known, N- and O-glycosylation. N-glycosylation is a major modification of proteins in plant cells. Plant N-glycans can be classified into four basic groups: high-mannose-type, complex-type, paucimannosidic-type and hybrid-type. N-glycosylation is a well described process whereas O-glycosylatin is not well characterized.
Glycoproteins were separated on SDS-PAGE and subsequently transferred onto nitrocellulose membrane. Glycosylated proteins were detected with Con A. N-glycans were further characterized by treating the membranes with different lectins (GNA, MAA, SNA, PNA, DSA, RCA I and UEA). The obtained results showed that glycosylation of total cell proteins and proteins of endoplasmic reticulum had been changed during horseradish cellular differentiation.
Electron microscopy showed great differences in cell structure between leaf tissue, teratoma tissue (organized and unorganized) and tumour tissue. In all transformed horseradish lines plastids with irregular structure were noticed. The great similarity between tumour tissue and unorganized teratoma tissue was also observed. These two types of tissues had large abnormal nuclei and small plastids. In all types of tissues no differences in structure of endoplasmic reticulum were noticed.

(47 pages, 23 pictures, 1 table, 40 references, original in Croatian language)

Thesis is deposited in the library at the Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb, Rooseveltov trg 6, Zagreb, Croatia

Keywords: horseradish, cellular differentiation, glycosylation, N-glycans, endoplasmic reticulum, lectins, electron microscopy

Supervisor: Dr. Biljana Balen, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Biljana Balen, Asst. Prof.
Dr. Gordana Lacković-Venturin, Prof.
Dr. Mirta Tkalec, Asst. Prof.

Thesis accepted: 12.11.2008.

Sadržaj:

1. UVOD 9

1.1. Glikozilacija proteina 9

1.2. Lektini 13

1.3. Transformacija biljnih stanica bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* i kultivacija *in vitro* transformiranih linija 14

2. MATERIJALI I METODE 17

2.1. Kultura tkiva 17

2.2. Priprema biljnog tkiva i frakcija koje su obogaćene mikrosomima endoplazmatskog retikuluma za elektronsku mikroskopiju 18

2.3. Priprema ukupnih staničnih i topivih staničnih proteina 19

2.4. Izolacija frakcije obogaćene mikrosomima endoplazmatskog retikuluma 19

2.5. Određivanje koncentracije proteina u ekstraktima biljnog tkiva 20

2.6. Aktivnost enzima koji su primijenjeni kao biljezi frakcija 21

2.6.1 Aktivnost NADPH-Cyt c reduktaze 22

2.6.2 Aktivnost katalaze 22

2.6.3 Aktivnost askorbat peroksidaze 22

2.6.4 Aktivnost pirogalol peroksidaze 22

2.7. Elektroforetska analiza proteina 23

2.8. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu i prikaz lektinima 23

3. REZULTATI 25

3.1. Elektronsko-mikroskopska opažanja staničnih struktura tkiva hrena i frakcija mikrosoma endoplazmatskog retikuluma 25

3.2. Određivanje elektroforetskog uzorka ukupnih staničnih i topivih staničnih proteina 278

3.3. Određivanje sastava glikoproteina u ukupnim staničnim proteinima 29

3.4. Aktivnost enzima koji su primijenjeni kao biljezi frakcija 32

3.4.1. Aktivnost NADPH-Cyt c reduktaze 32

3.4.2. Aktivnost katalaze 33

3.4.3. Aktivnost askorbat peroksidaze 34

3.4.4. Aktivnost pirogalol peroksidaze 34

3.5. Elektroforetska analiza proteina iz frakcija obogaćenih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma 35

3.6. Određivanje sastava glikoproteina iz frakcija obogaćenih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma 36

4. RASPRAVA 39

5. ZAKLJUČAK 43

6. LITERATURA 44

Popis kratica:

APS	amonijev persulfat
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfat
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ER	endoplazmatski retikulum
MS	hranidbena podloga, Murashige i Skoog 1962
NBT	4-nitro plavo tetrazolium klorid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
PAGE	poliakrilamid-gel elektroforeza
PVP	polivinilpirolidon
SDS	natrijev dodecil sulfat
T-DNA	dio Ti-plazmida koji se ugrađuje u DNA biljne stanice
TEMED	N,N,N,N -tetrametil-etilendiamin
Ti-plazmid	**T**umor **i**nducirajući plazmid
Tris	Tris[hidroksimetil]aminometan

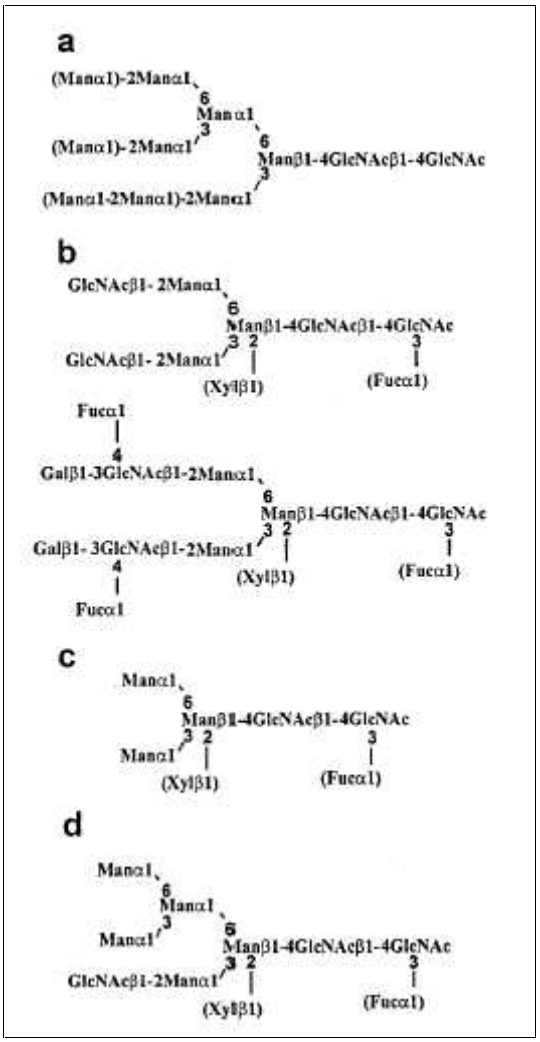
1. UVOD

Endoplazmatski retikulum (ER) biljaka primarno je mjesto biogeneze membrana, fosfolipidnog metabolizma, modifikacija masnih kiselina i akumulacije triacilglicerola te mjesto sinteze proteina i početno mjesto u sekrecijskom putu proteina (Coughlan i sur. 1995). Osim središnje uloge u metabolizmu, endoplazmatski retikulum je i početno mjesto glikozilacije proteina u eukariotskoj stanici. Biljni endoplazmatski retikulum jedan je od najslabije istraženih organela zbog teškoće pripreme čistih frakcija endomembrana iz biljnog tkiva.

1.1. Glikozilacija proteina

Proteini prolaze kroz posttranslacijske modifikacije kao što su fosforilacija, glikozilacija, sulfatacija, prenilacija, acetilacija i ubikvintizacija (Park 2003). Posttranslacijske modifikacije moduliraju proteinske funkcije, uključujući aktivnost, stabilnost te lokalizaciju. N-glikozilacija je glavna modifikacija proteina u biljnim stanicama.

N-glikozilacija je enzimski proces u kojem nastaje glikan (šećerni dio) vezan na bočni lanac asparagina preko amida u proteinu. N-glikozilacijsko mjesto je tripeptid Asn-X-Ser/Thr gdje X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina i aspartata. Svi N glikani dijele zajedničku minimalnu strukturu $Man_3GlcNAc_2$ koja se sastoji od N,N'-diacilhitobioza, β-manoze vezane na hitobiozu te dvije α-manoze vezane na 3. i 6. hidroksilnu grupu β-manoze. Prema supstituentima vezanim na šećernu jezgru, biljne N-glikane možemo podijeliti u četiri osnovne grupe: visoko manozni tip, složeni tip, paucimanozni tip te hibridni tip N-glikana (Slika 1).



Slika 1. Strukture (a) visokomanoznog, (b) složenog, (c) paucimanoznog i (d) hibridnog tipa N-glikana izolirane iz biljnih glikoproteina. Preuzeto iz Lerouge i sur. (1998).

Visokomanozni tip N-glikana najčešći je oblik glikozilacije u biljaka (Saint-Jore-Dupas i sur. 2006). Ovaj oblik N-glikana nastaje iz oligosaharidnog prekusora u endoplazmatskom retikulumu. Prvi put je kod biljaka identificiran na aglutininu soje, a kasnije je pronađen u velikom broju izvanstaničnih i vakuolarnih glikoproteina (Lerouge i sur. 1998). Poseban oblik ovog tipa N-glikana pronađen je u kalretikulinu špinata koji ima ulogu chaperona u endoplazmatskom retikulumu (Navazio i sur 1996).

Složeni tip N-glikana nastaje daljnjom obradom visokomanoznog tipa u Golgijevom kompleksu pomoću specifičnih glikozidaza i glikozil-transferaza. Složeni tip N-glikana karakterizira prisutnost α-(1,3)-fukoze i/ili β-(1,2)-ksiloze vezanih na proksimalni N-acetilglukozamin te na β-manozu šećerne jezgre. Također je za ovaj tip N-glikana karakterističan β-(1,2)-N-acetilglukozamin vezan na α-manozu. U ovaj tip N-glikana pripada i

Lewisov antigen. Lewisov motiv sastoji se od Galβ1,3-(Fucα1,4)-GlcNAc te zbog njega nastaje križna reakcija pri kojoj nastaju antitijela usmjerena protiv kompleksa Le^a ljudskih eritrocita (Wilson 2002).

Paucimanozni tip rezultat je uklanjanja terminalnih ostataka složenog tipa N-glikana u post-Golgijevim odjeljcima. Ovaj tip N-glikana sadrži fukozu i/ili ksilozu, ali mu nedostaju terminalni ostaci galaktoze. Paucimanozni tip glikana karakterističan je za vakuolarne proteine (Ko i sur. 2008).

Hibridni tip N-glikana nastaje obradom α-(1,3)-manozne grane pri čemu nastaje α-(1,3)-fukoza i/ili β-(1,2)-ksiloza vezana na $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$. Ovaj tip N-glikana pronađen je kod S-RNaza, enzima koji sprječavaju klijanje polenove mješinice kod samooplodnje u porodice *Solanacae* (Oxley i sur. 1996).

Kod biljaka N-glikozilacija proteina započinje u endoplazmatskom retikulumu prenošenjem oligosaharidnog prekusora $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ s dolihol lipidnog nosača na specifični asparaginski ostatak u rastućem polipeptidnom lancu. Prekusor se zatim postupno modificira glikozidazama i glikozil-transferazama u visokomanozni, paucimanozni, hibridni ili složeni tip N-glikana. Obrada oligosaharidnog prekusora odvija se tijekom transporta proteina duž sekrecijskog puta od endoplazmatskog retikuluma do konačnog odredišta. Na kraju ovog puta neki biljni N-glikani imaju karakterističnu strukturu kojom se razlikuju od N-glikana pronađenih kod sisavaca. Biljne N-glikane karakterizira odsutnost sijalinske kiseline te prisutnost α-(1,3)-fukoze i β-(1,2)-ksiloze (Lerouge i sur. 1998). Kod sisavaca i kvasaca N-glikani vezani na glikoproteine u endoplazmatskom retikulumu složene su strukture koje proizlaze iz kruženja glikoproteina između endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog kompleksa. N-glikani izolirani iz kalretikulina štakora sadrže modifikacije (terminalno vezane galaktoze) koje se specifično događaju samo u Golgijevom kompleksu (Van Nguyen i sur 1989). Nedostatak složenih N-glikana u kalretikulinu biljaka ne isključuje u potpunosti recikliranje iz post-endoplazmatskih odjeljaka natrag u endoplazmatski retikulum (Navazio i sur 1996.)

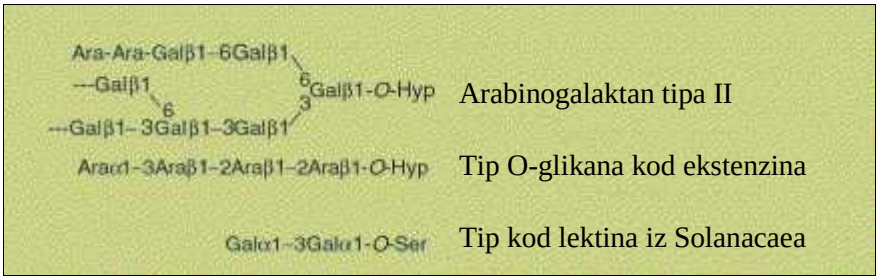
N-glikozilacija ima veliku ulogu u razvoju biljaka. Nedavno je dokazano da su za biosintezu celuloze te normalnu embriogenezu potrebni određeni enzimi N-glikozilacijskog puta. Među njima su manoza-1-fosfat-gvanilil-transferaza koja sudjeluje u sintezi GDP-manoze te α-glukozidaza I endoplazmatskog retikuluma koja sudjeluje u odcjepljivanju glukoza s novosintetiziranih N-glikoproteina (Wilson 2002).

Oligosaharidne strukture koje nastaju postupnom obradom N-glikana u endoplazmatskom retikulumu, Golgijevom kompleksu i post-Golgijevim odjeljcima mogu

poslužiti kao korisni biljezi glikoproteinskog transporta duž sekrecijskog puta. Npr. većina vakuolarnih N-glikoproteina je paucimanoznog tipa, dok većina izvanstaničnih glikoproteina sadrži složeni tip N-glikana s terminalnim N-acetilglukozaminom ili antigenom Le^a (Lerouge i sur. 1998).

O-glikozilacija je glikozilacija hidroksilne grupe bočnog lanca aminokiselina. Dok je N-glikozilacija relativno dobro opisan proces, O-glikozilacija u biljaka slabo je istražena. Razlog tome je što se ovaj tip glikozilacije jako razlikuje između različitih tipova eukariota. Najčešći oblik O-glikozilacije kod životinja je glikozilacija serinskih ili treoninskih ostataka u Golgijevom kompleksu, a kod kvasaca homomanoza vezana u endoplazmatskom retikulumu (Matsuoka 2003).

O-glikozilacija kod viših biljaka je složenija nego u prethodno navedenim organizmima. U biljaka postoji nekoliko klasa O-glikana vezanih na protein duž sekrecijskog puta. To su galaktozni i mucinski tip glikana koji su vezani na serin, arabinozni tip i arabinogalaktan vezani na hidroksiprolin te ksiloza vezana na regije bogate hidroksiprolinom ili treoninom (Shimizu i sur. 2005). O-glikani su mnogo raznolikije strukture od N-glikana (Kilcoyne i sur. 2008). Neke strukture biljnih O-glikana prikazane su na Slici 2. O-glikozilaciju proteina pronalazimo često na citoplazmatskim proteinima te na nekim vakuolarnim proteinima (Shimizu i sur. 2005).



Slika 2. Primjeri struktura O-glikana u biljaka. Prikazani su arabinogalaktan, arabinozni te galaktozni tip O-glikana. Preuzeto iz Wilsona (2002).

U zadnje vrijeme procesi glikozilacije u biljaka postali su objekt mnogih istraživanja zbog mogućnosti korištenja biljaka u proizvodnji terapeutskih proteina. Biljke kao "tvornice" terapeutskih proteina imaju prednost pred mikroorganizmima zbog mogućnosti postranslacijskih modifikacija uključujući glikozilaciju, fosforilaciju i metilaciju. Posebna važnost pridaje se inaktiviranju gena za fukosiltransferaze i ksiloziltransferaze (enzima karakterističnih za biljnu glikozilaciju) te uvođenju gena za glikoziltransferaze koji su karakteristični za čovjeka (Ko i sur. 2008).

1.2. Lektini

Glikoproteini se boje kao i ostali proteini, no nekoliko je tehnika pomoću kojih ih možemo razlikovati od neglikoziliranih proteina. Za detekciju glikoproteina mogu se koristiti radioaktivno ili fluorescencijski obilježeni ili enzimatski konjugirani lektini.

Lektini su proteini neimunološkog porijekla koji se specifično vežu na različite šećerne ostatke glikoproteina, a da ih pritom ne mijenjaju. Lektini se najčešće izoliraju iz sjemenki, gdje se nalaze u velikim količinama. Smatra se da lektini imaju značajnu ulogu u klijanju sjemenki te da sudjeluju u vezanju glikoproteina na površini biljnih stanica. Osim u biljaka lektini su prisutni i kod životinja gdje sudjeluju u sortiranju glikoproteina duž sekrecijskog puta. Lektini imaju brojne biološke uloge od regulacije stanične adhezije, sinteze glikoproteina do kontrole razine određenih proteina u krvnoj plazmi (Monzo i sur. 2007). Za lektine je opće poznato da igraju važnu ulogu u imunološkom sustavu kod prepoznavanja ugljikohidrata pri napadu patogena.

Biljni lektini primarno se vežu za monosaharide, no također je poznato da se za složenije determinante vežu jačim afinitetom. Neki lektini kao što je Con A specifično prepoznaju zajedničke komponente mnogih glikoproteina (jezgra N-glikana), dok drugi prepoznaju specifične konfiguracije terminalnih šećernih ostataka glikana (Hart 1980). U Tablici 1 prikazani su neki lektini i njihova specifičnost za pojedine šećerne ostatke. Lektini iz porodice *Amaranthaceae,* kao što je ALL, stvaraju specifične interakcije s GalNAc te su koristan alat u prepoznavanju O-glikana iz različitih tkiva, tumora i stanica (Hernández i sur. 2004)

Tablica 1. Neki od najčešće korištenih lektina u afinitetnoj kromatografiji i za detekciju glikoproteina na nitroceluloznoj membrani.

Lektin	Izvor lektina	Specifičnost prema monosaharidu	Napomena o vezanju
Con A	*Canavalia ensiformis*	α-D-Glu α-D-Man	Prepoznaje jezgru N-glikana.
RCA I	*Ricinus communis*	β-D-Gal β-D-GalNAc	Prepoznaje terminalnu Gal vezanu β-(1,4) vezom.
SNA	*Sambucus nigra*	β-D-Gal	Prepoznaje sijalinsku kiselinu vezanu (2,6) vezom na Gal.
UEA	*Ulex europaeus*	α-D-Fuc	Prepoznaje oligosaharide s terminalnom α-L-Fuc.
PNA	*Arachis hypogaea*	β-Gal-(1,3)-GalNAc	Prepoznaje O-glikane.
MAA	*Maackia amurensis*	SA	Prepoznaje sijalinsku kiselinu vezanu (2,3) vezom na Gal.
DSA	*Datura starmonium*	GlcNAc	Prepoznaje Gal-(1,4)-GlcNAc u složenom i hibridnom tipu N-glikana.
GNA	*Galanthus nivalis*	α-D-Man	Detekcija visokomanoznog tipa N-glikana.

1.3. Transformacija biljnih stanica bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* i kultivacija *in vitro* transformiranih linija

Bakterija *Agrobacterium tumefaciens* živi u tlu i napada uglavnom dvosupnice. Pri tome uzrokuje razvoj tumora vrata korijena (crown-gall tumour). Ovi se tumori najčešće razvijaju na vratu korijena, ali se mogu razviti i na drugim dijelovima biljke. Tumor vrata korijena u većini slučajeva nije fatalan za biljku domaćina, već je uzrok smanjene produktivnosti bolesnih biljaka.

Tijekom infekcije bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* u kromosome biljne stanice ugrađuje se dio molekule DNA bakterije. Virulentni sojevi *A. tumefaciens* uz kromosomsku DNA sadrže i izvankromosomsku DNA - Ti-plazmid. Mali dio Ti-plazmida tzv. T-DNA ugrađuje se u kromosomsku DNA biljne stanice. Prvi korak u transformaciji stanica s T-DNA je prepoznavanje kompatibilne biljne stanice. Biljna stanica može biti kompatibilna ili nekompatibilna za infekciju s *A. tumefaciens* što ovisi o genotipu biljne stanice domaćina i genotipu soja bakterije. Svaka stanica koja je podložna infekciji ovom bakterijom sadrži polisaharid-polisaharid vezujuća mjesta koje prepoznaje *A. tumefaciens* (Kuta i Tripathi 2005). Bakterije se do mjesta ozljede gibaju kemotaksijom u smjeru aminokiselina, šećera i

drugih organskih spojeva oslobođenih iz ozljede. Bakterije se najprije slabim vezama (acetiliranim polisaharidima) pričvrste za biljnu stanicu, nakon čega slijedi jače vezanje ugradnjom celuloznih mikrofibrila (Escobar i Dandekar 2003). Istovremeno se aktivira regija *vir* na molekuli bakterijske DNA koja sadrži set operona (*vir A, vir B, vir C, vir D, vir E i vir G*) potrebnih za prijenos T-DNA u biljnu stanicu. T-DNA se zatim ugrađuje u kromosomsku DNA biljne stanice nehomolognom rekombinacijom. Za ovaj proces također su potrebni i biljni proteini (enzimi za popravak DNA i rekombinaciju). T-DNA sadrži pet onkogena čiji su proteinski produkti bitni u biosintezi auksina i citokinina. Akumulacija auksina i citokinina u transformiranim stanicama primarni je pokretač tumorigeneze. Niti jedan od tih gena nije aktiviran u bakteriji, ali kada se ugrade u kromosom biljne stanice počinje njihova transkripcija, što dovodi do nastanka enzima koji sudjeluju u sintezi zeatina i auksina. T-DNA sadrži i gene koji kodiraju enzime uključene u sintezu spojeva opina koji sadrže dušik. To su metaboliti specifični za tumor, a u biljci se sintetiziraju samo nakon transformacije. Opini mogu činiti 7% mase suhog tumorskog tkiva. Bakterije posjeduju inducibilne gene za katabolizam opina i mogu ih iskoristiti kao izvor dušika, što ne mogu biljne stanice (Escobar i Dandekar 2003).

Tumorske stanice mogu autonomno rasti *in vitro* bez dodatka biljnih regulatora rasta. Ovo svojstvo tumorskih stanica je nasljedno zbog stabilne integracije T-DNA u genom biljne stanice. Zabilježeno je da dugotrajnom kultivacijom transformiranog tkiva *in vitro* može doći do spontanih promjena na morfološkoj, staničnoj i biokemijskoj razini. Tumori vrata korijena ponekad se mogu spontano diferencirati u abnormalne organe koje nazivamo teratomi. Samo određene kombinacije soja bakterije i genotipa biljke domaćina mogu dovesti do spontanog razvoja teratoma (Gresshoff i sur. 1979). Metode *in vitro* biljne kulture pokazale su u kojoj mjeri genotip biljke utječe na morfogenetski potencijal. Različiti odnosi biljnih hormona potrebni su za postizanje organogeneze iz kulture tkiva bliskih kultivara i vrsta (Braun i Wood 1975). Tumori vrata korijena pokazuju slične varijacije u diferencijaciji organiziranog tkiva. Organogenetski potencijal tumora razlikuje se i unutar iste biljke; tumori nastali iz gornjih dijelova stabljike duhana lakše formiraju teratome s korjenčićima nego tumori nastali iz donjih dijelova stabljike (Gresshoff i sur. 1979).

Tkivo uzgojeno iz jedne teratomske stanice ne razlikuje se od teratomskog tkiva iz kojeg je stanica izolirana. To ukazuje da je kapacitet organiziranog razvoja nasljedno svojstvo individualne teratomske stanice. Također je primijećeno da teratomske stanice mogu postepeno u potpunosti izgubiti tumorsko svojstvo neorganiziranog rasta te ponovo poprimiti normalan rast i razvoj. Kako se iz jedne transformirane stanice može dobiti cijela biljka

dokazano je da transformacija ne rezultira gubitkom genetičke informacije potrebne za normalan razvoj.

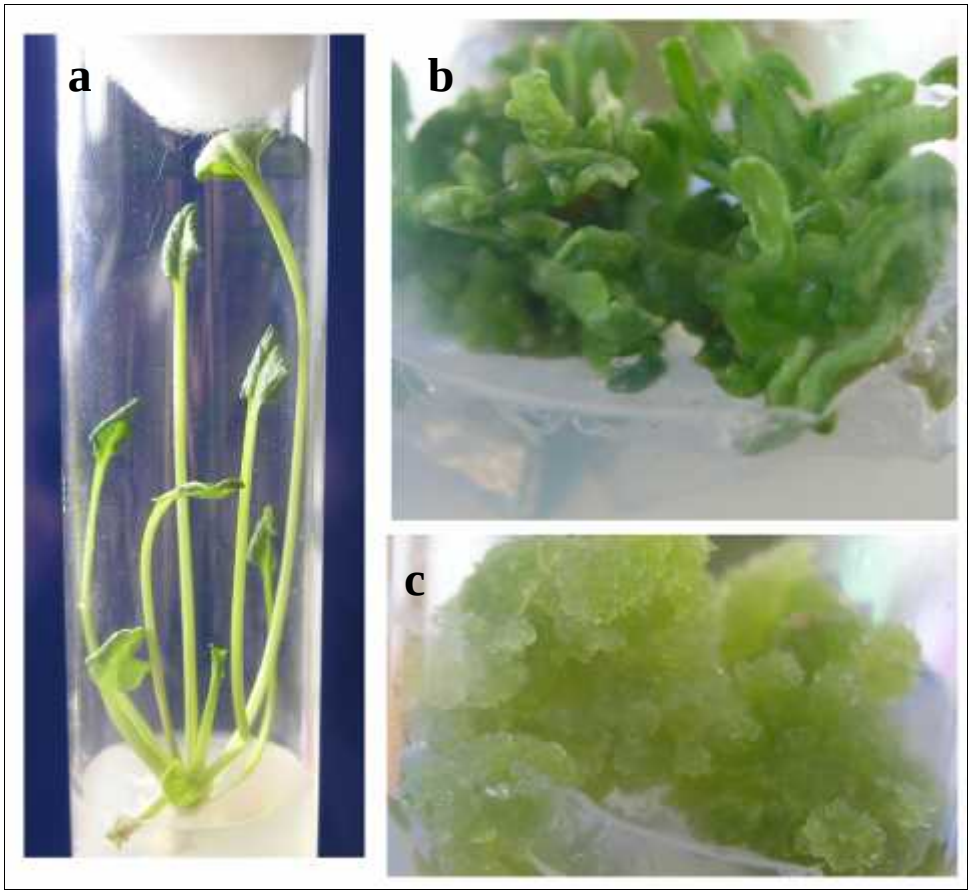
U ovom radu korištene su transformirane linije hrena (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) koje se subkultiviraju u uvjetima *in vitro* već više od šesnaest godina (Krsnik-Rasol 1991). Tumori vrata korijena dobiveni su zaražavanjem fragmenta lista divljim tipom bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (B6S3). Primarni tumori bili su neorganizirani te su se subkultivirali na hranjivoj podlozi MS bez dodatka hormona. Većina tumora rasla je neorganizirano, a manji broj razvio se u teratomsko tkivo s abnormalnim izdancima i listovima. Presađivanjem na podlogu MS bez dodatka hormona tkivo je nastavilo rasti neorganizirano ili u obliku terataoma. Teratomski izdanci nikada nisu razvili korjenčiće.

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti ove dvije transformirane linije hrena s kontrolnim tkivom lista u elektroforetskoj slici proteina te odrediti razlike u N-glikozilaciji proteina. Poseban naglasak ovog istraživanja bila je usporedba navedenih tkiva u strukturi te sastavu N-glikana proteina endoplazmatskog retikuluma.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Kultura tkiva

Biljke hrena (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) te njihove transformirane linije uzgojene su *in vitro* u uvjetima fotoperioda 16/8-h dan/noć (intenzitet svjetlosti 90 µE / m^2s) na 24 ºC na čvrstoj hranjivoj podlozi MS bez dodatka regulatora rasta (Murashige i Skoog 1962). Tumorska i teratomska linija dobivene su inokulacijom lista s bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* soja B6S3 (Krsnik-Rasol 1991, Peškan i sur. 1996). Svaka tri tjedna kulture su presađivane na istu hranjivu podlogu. Za analizu uzimao sam uzorke tkiva lista, teratoma i tumora nakon dvanaestog dana od presađivanja tkiva (Slika 3).



Slika 3. Biljka hrena i njezine transformirane linije u kulturi *in vitro* stare dvanaest dana od presađivanja - (a) biljka hrena, (b) teratom i (c) tumor.

2.2. Priprema biljnog tkiva i frakcija koje su obogaćene mikrosomima endoplazmatskog retikuluma za elektronsku mikroskopiju

Za elektronsku mikroskopiju pripremio sam tkivo lista, teratoma (organizirano i neorganizirano) i tumora. Tkivo sam fiksirao 1 %-tnim (v/v) glutaraldehidom u 50 mM kakodilatnom puferu (pH 7,2), 20 min na 4 ºC. Nakon ispiranja u kakodilatnom puferu (2 × 10 min) tkivo sam postfiksirao 1 %-tnim osmijevim tetroksidom u 50 mM kakodilatnom puferu, 30 min na 4 ºC. Nakon postfiksacije i ispiranja materijala deH_2O, preparati su dehidrirani kroz seriju etanola različitog razrjeđenja (50 %, 60 %, 70 %, 80 % i 96 %). Nadalje, tkivo sam inkubirao 30 min u mješavini 100 %-tnog etanola i 100 %-tnog acetona u omjeru 1:1, te daljnjih 30 min u 100 %-tnom acetonu. Dehidrirani materijal zatim je prebačen u mješavinu 100 %-tnog acetona i Spurrovog sredstva u omjeru 1:1 na 1 h i na kraju u čisto Spurrovo sredstvo. Materijal je držan u Spurrovom sredstvu 5 h na 40 ºC te je zatim plošno uklopljen u kalupe. Proces polimerizacije Spurrovog sredstva trajao je dva dana u termostatu na 65 ºC.

U frakcije obogaćene mikrosomima endoplazmatskog retikuluma dodao sam glutaraldehid tako da je konačni udio glutaraldehida bio 1 % (v/v). Nakon 30 min inkubacije na 4 ºC dodao sam agar. Nakon što se agar stvrdnuo, uzorke sam izrezao na komadiće i isprao u kakodilatnom puferu. Nakon ispiranja u puferu, uzorke sam postfiksirao 1 %-tnim osmijevim tetroksidom u 50 mM kakodilatnom puferu, 30 min na 4 ºC. Nakon ispiranja deH_2O preparati su dehidrirani i uklopljeni u smolu prema protokolu koji sam koristio za dehidriranje i uklapanje tkiva.

Ultratanki prerezi, debljine 70-95 nm, načinjeni su ultramikrotomom pomoću staklenih noževa. Prerezi su zatim kontrastirani 4 %-tnom vodenom otopinom uranil-acetata (10 min) te nakon ispiranja deH_2O, olovnim acetatom (pH 12, 10 min) (Reynolds 1963). Na kraju, preparati su isprani toplom deH_2O.

Za analizu ultrastrukture korišten je transmisijski elektronski mikroskop FEI Morgagni 268D.

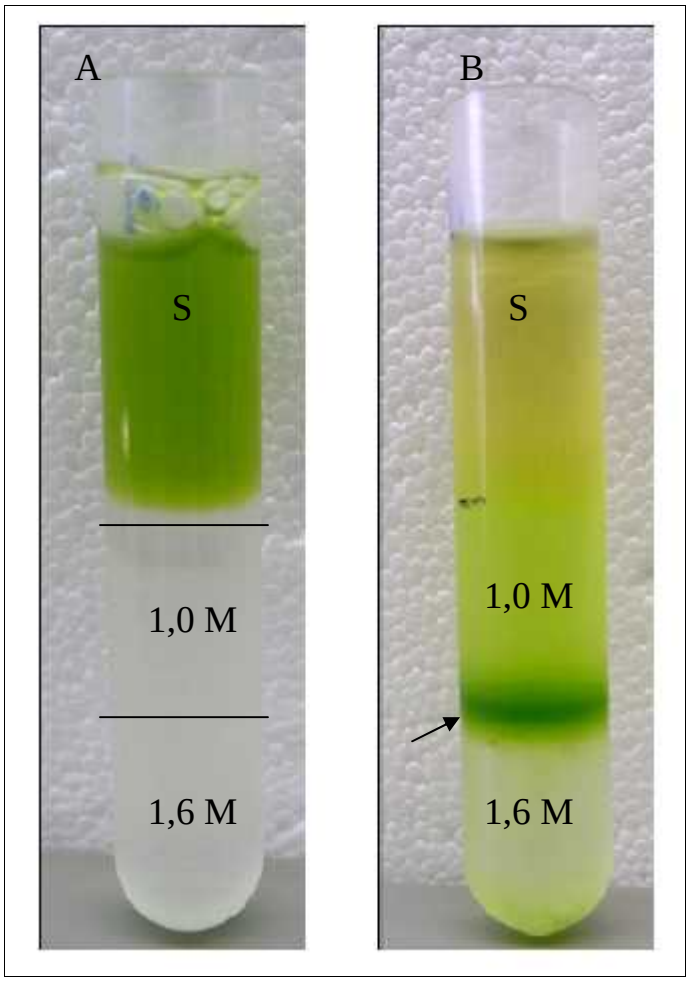
2.3. Priprema ukupnih staničnih i topivih staničnih proteina

Za ekstrakciju ukupnih staničnih proteina (topivih i membranskih) homogenirao sam biljno tkivo u tekućem dušiku u hladnom tarioniku. Na 0,5 g dobivenog biljnog praha dodao sam 1 mL ekstrakcijskog pufera zagrijanog na 80 ºC. Ekstrakcijski pufer sadržavao je 400 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4,6 % (w/v) SDS, 16 % (v/v) glicerol te 0,6 % (w/v) DTT. Homogenat sam zatim inkubirao 10 min u termomikseru na 80 ºC i 300 rpm-a. Nakon kratke inkubacije na ledu (3 min) ekstrakte sam centrifugirao 10 min na 20 800× *g* i 4 ºC. Dobiveni supernatant upotrijebio sam za daljnju analizu.

Stanične topive proteine ekstrahirao sam homogenizirajući 1,2 g svježeg tkiva u hladnom tarioniku uz dodatak PVP-a (na vrh spatule) i 2 mL 0,1 M pufera Tris-HCl (pH 8,0) koji je sadržavao 0,5 M saharozu, 0,1 % (w/v) askorbinske kiseline te 0,1 % (w/v) cisteina. Homogenat sam centrifugirao 15 min na 20 000 × *g* i 4 ºC. Dobiveni supernatant prebacio sam u novu tubicu te centrifugirao 90 min na 127 000 × *g* i 4 ºC. Dobivenom supernatnatu izmjerio sam koncentraciju proteina metodom po Bradfordu (1976).

2.4. Izolacija frakcije obogaćene mikrosomima endoplazmatskog retikuluma

Frakciju obogaćenu mikrosomima endoplazmatskog retikuluma izolirao sam prema Roeu (2001) uz određene modifikacije. U hladnom tarioniku homogenizirao sam 1 g tkiva uz dodatak 3 mL ledenohladnog homogenizacijskog pufera. Homogenizacijski pufer sadržavao je 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0,33 M saharozu te 1 % (w/v) PVP. Homogenat sam centrifugirao na 1 000 × *g* i 4 ºC tijekom 20 min. Dobiveni supernatant centrifugirao sam 10 min na 10 000 × *g* i 4 ºC. Supernatant sam nadsvodio na diskontinurani gradijent od 1,6 M i 1,0 M saharoze. Osim saharoze, otopine za gradijent su sadržavale i 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM $MgCl_2$ i 1 mM 2-merkaptoetanol. Gradijent sam centrifugirao 60 min u ultracentrifugi na 100 000 × *g* i 4 ºC. Frakcija obogaćena mikrosomima endoplazmatskog retikuluma nalazila se na granici 1,6 M i 1,0 M saharoze (Slika 4).



Slika 4. Gradijent saharoze (A) prije i (B) nakon 60 min centrifugiranja na 100 000 × *g* i 4 ºC. Frakcija obogaćena mikrosomima endoplazmatskog retikuluma nalazi se na granici 1,6 M i 1,0 M saharoze.

2.5. Određivanje koncentracije proteina u ekstraktima biljnog tkiva

Koncentraciju proteina u ekstraktima odredio sam spektrofotometrijski metodom po Bradfordu (1976) koristeći UV/VIS spektrofotometar. Metoda se temelji na mjerenju apsorbancije (pri valnoj duljini od 595 nm) proteinskog ekstrakta i reagensa čiji je osnovni sastojak boja Comassie Brilliant Blue G-250. Koncentraciju proteina u uzorcima odredio sam očitavanjem s baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije niza otopina albumina goveđega seruma poznatih koncentracija (0,1-2,0 mg mL^{-1}).

2.6. Aktivnost enzima koji su primijenjeni kao biljezi frakcija

Ukupnu aktivnost enzima koji su primijenjeni kao biljezi frakcija (NADPH-Cyt c reduktaza, katalaza, pirogalol peroksidaza te askorbat peroksidaza) odredio sam spektrofotometrijski koristeći UV/VIS spektrofotometar. Aktivnost enzima izračunao sam prema sljedećem izrazu koristeći Beer-Lambertov zakon:

$$\text{aktivnost enzima} = \frac{\Delta A_a \times f \times V_{uk}}{V_{uz} \times m \times £}$$

pri čemu je:

ΔA_λ srednja vrijednost promjene apsorbancije na zadanoj valnoj duljini u određenom vremenskom intervalu

f faktor s kojim se množi srednja promjena apsorbancije ΔA_λ da bi se rezultat izrazio u minuti

V_{uk} ukupan volumen reakcijske smjese

V_{uz} volumen ekstrakta

m masa proteina u volumenu ekstrakta (izražena u mikrogramima)

ε specifičan apsorpcijski koeficijent

Rezultate sam izrazio kao količinu nastalog produkta ili potrošenog supstrata u µmolu po min i po µg proteina.

2.6.1 Aktivnost NADPH-Cyt c reduktaze

Aktivnost NADPH-Cyt c reduktaze određivao sam na sobnoj temperaturi u 1,5 mL reakcijske smjese koja je sadržavala 100 µL uzorka, 50 µL 50 mM kalijevog cijanida, 100 µL 0,45 mM citokroma c i 1175 µL 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,5). Reakciju sam započeo dodatkom 75 µL 3 mM NADPH. Nakon 30 s mjerio sam povećanje apsorbancije zbog redukcije citokroma c (ε = 18,5 mM^{-1} cm^{-1}) na valnoj duljini od 550 nm svakih 15 s tijekom 2,5 min (Munné-Bosch i Alegre 2001).

2.6.2 Aktivnost katalaze

Katalaznu aktivnost određivao sam u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7,0) te 10 mM H_2O_2. U ovu otopinu dodao sam 50 µl uzorka tako da je ukupni volumen u kvarcnoj kiveti bio 1 mL te sam mjerio smanjenje apsorbancije zbog razgradnje H_2O_2 (ε = 40 mM^{-1} cm^{-1}) svakih 10 s tijekom 2,5 min na valnoj duljini od 240 nm (Aebi 1984).

2.6.3 Aktivnost askorbat peroksidaze

Prilikom određivanja aktivnosti askorbat peroksidaze kao reakcijsku smjesu koristio sam 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7) u koji sam neposredno prije upotrebe dodao 1 mM EDTA, 0,5 mM askorbinsku kiselinu te 1 mM H_2O_2. Mjerio sam smanjenje apsorbancije uslijed oksidacije askorbata (ε = 2,8 mM^{-1} cm^{-1}) na valnoj duljini od 290 nm svake sekunde tijekom jedne minute (Nakano i Asada 1981).

2.6.4 Aktivnost pirogalol peroksidaze

Za određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze kao reakcijsku smjesu koristio sam 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7,0) u koji sam neposredno prije upotrebe dodao 20 mM pirogalola i 10 mM H_2O_2. U 950 µl tako priređene otopine dodao sam 50 µl uzorka. Mjerio sam povećanje apsorbancije zbog stvaranja purpurogalina (ε = 2,47 mM^{-1} cm^{-1}) na valnoj duljini od 430 nm svakih 15 s tijekom 2,5 min (Chance i Maehly 1954).

2.7. Elektroforetska analiza proteina

Za SDS-elektroforezu u poliakrilamidnom gelu koristio sam uzorke pomiješane s puferom koji je sadržavao 65 mM pufer Tris/HCl (pH 6,8), 6 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) glicerol, 6 % β-merkaptoetanol i 0,01 % (w/v) boju brom fenol modrilo za obilježavanje tijeka elektroforeze. Ovako pripremljene uzorke denaturirao sam 5 minuta na 96 ºC.

Poliakrilamidni gel pripremio sam u pločama uz dodatak 0,1 % SDS-a, u kojem je ukupna količina monomera akrilamida (w/v) u gelu za razdvajanje bila 12 % (T = 12%), a maseni udio bisakrilamida u ukupnoj smjesi akrilamida i bisakrilamida (w/w) 2.66 % (C = 2,66 %). Gel za razdvajanje sadržavao je i 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), čiji je volumni udio u gelu bio 25 % (v/v), inicijator polimerizacije APS (0,05 % w/v) te katalizator polimerizacije TEMED (0,05 % v/v). Gel za koncentriranje sadržavao je 4 % (T) akrilamid, 2,66 % (C) bisakrilamid, 25 % (v/v) 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), APS (0,07 % w/v) i TEMED (0,16 % v/v). Elektrodni pufer za anodnu elektroforezu sadržavao je 5 mM Tris/HCl i 15 mM glicin (pH 8,3). U jažice sam nanosio 4 µg proteina, a elektroforezu sam provodio pod uvjetima konstantnog napona (Laemmli 1970). Tijekom elektroforeze proteini su se kretali kroz gel za koncentriranje pri naponu od 100 V, a zatim kroz gel za razdvajanje pri naponu od 200 V. Nakon elektroforeze gelove sam obojio srebrovim nitratom (Blum i sur. 1987).

2.8. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu i prikaz lektinima

Nakon razdvajanja proteina SDS-PAG elektroforezom, proteine sam prenio na nitroceluloznu membranu u uređaju za prijenos, BioRad Mini protean II, pri konstantnom naponu od 60 V tijekom 60 minuta. Pufer za prijenos sadržavao je 20 mM Tris/HCl (pH 6,8), 150 mM glicin i 10 % (v/v) metanol. Nakon prijenosa membrane sam obojio bojom Rouge Ponceau S kako bih potvrdio prijenos. Boju sam isprao deH_2O, a neokupirana mjesta na membrani blokirao sam inkubirajući membranu u 0,1 % Tween-20 u puferu TBS (pH 7,5) na 4 ºC preko noći. Membrane sam inkubirao s lektinima Con A, GNA, DSA, PNA, SNA, MAA, RCA I i UEA.

Glikoproteine na koje se veže Con A utvrdio sam pomoću peroksidaze hrena (HRP). Vezana peroksidaza dokazana je uz pomoć 3,3’-diaminobenzidina (Faye i Chrispeels 1985). Kao pozitivnu kontrolu koristio sam karboksipeptidazu Y, a za negativnu kontrolu fetuin.

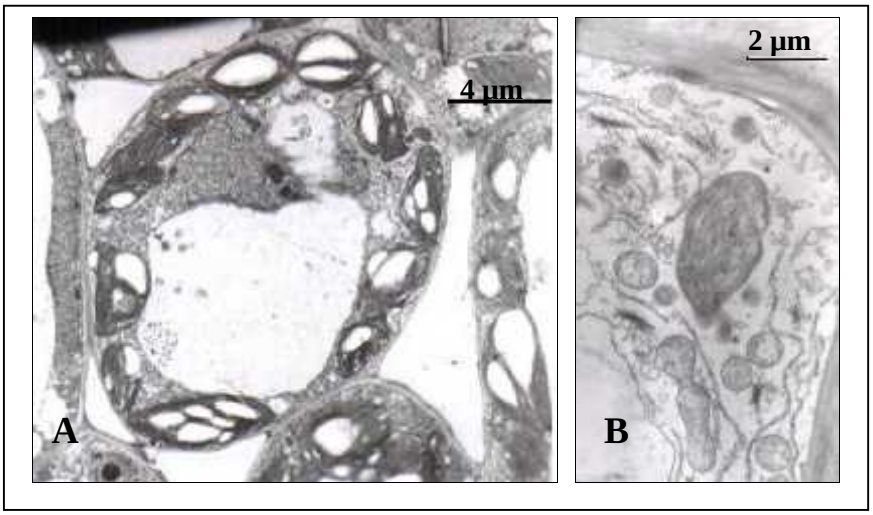
Lektini GNA, DSA, PNA, SNA i MAA obilježeni su digoksigeninom pa sam za njihov prikaz koristio alkalnu fosfatazu obilježenu anti-digoksigeninom. Koncentracija lektina u inkubacijskoj otopini bila je 1 µg/mL za GNA, SNA i DSA; 10 µg/mL za PNA te 5 µg/mL za MAA. Bojanje sam provodio prema uputama proizvođača (DIG Glycan Differentiation Kit, Roche). Membrane sam inkubirao u otopini alkalne fosfataze obilježene anti-DIG-om, nakon čega sam prisutnost alkalne fosfataze dokazao otopinom NBT/BCIP. Karboksipeptidazu Y koristio sam kao pozitivnu kontrolu za GNA, a za negativnu kontrolu transferin. Kao pozitivnu kontrolu za lektine SNA, MAA i DSA koristio sam fetuin, a za PNA asialofetuin. Za ove lektine negativna kontrola bila je karboksipeptidaza Y.

Za prikaz lektina obilježenih biotinom (RCA I i UEA) koristio sam alkalnu fosfatazu obilježenu streptavidinom. Prisutnost alkalne fosfataze na membrani otkrio sam otopinom NBT/BCIP.

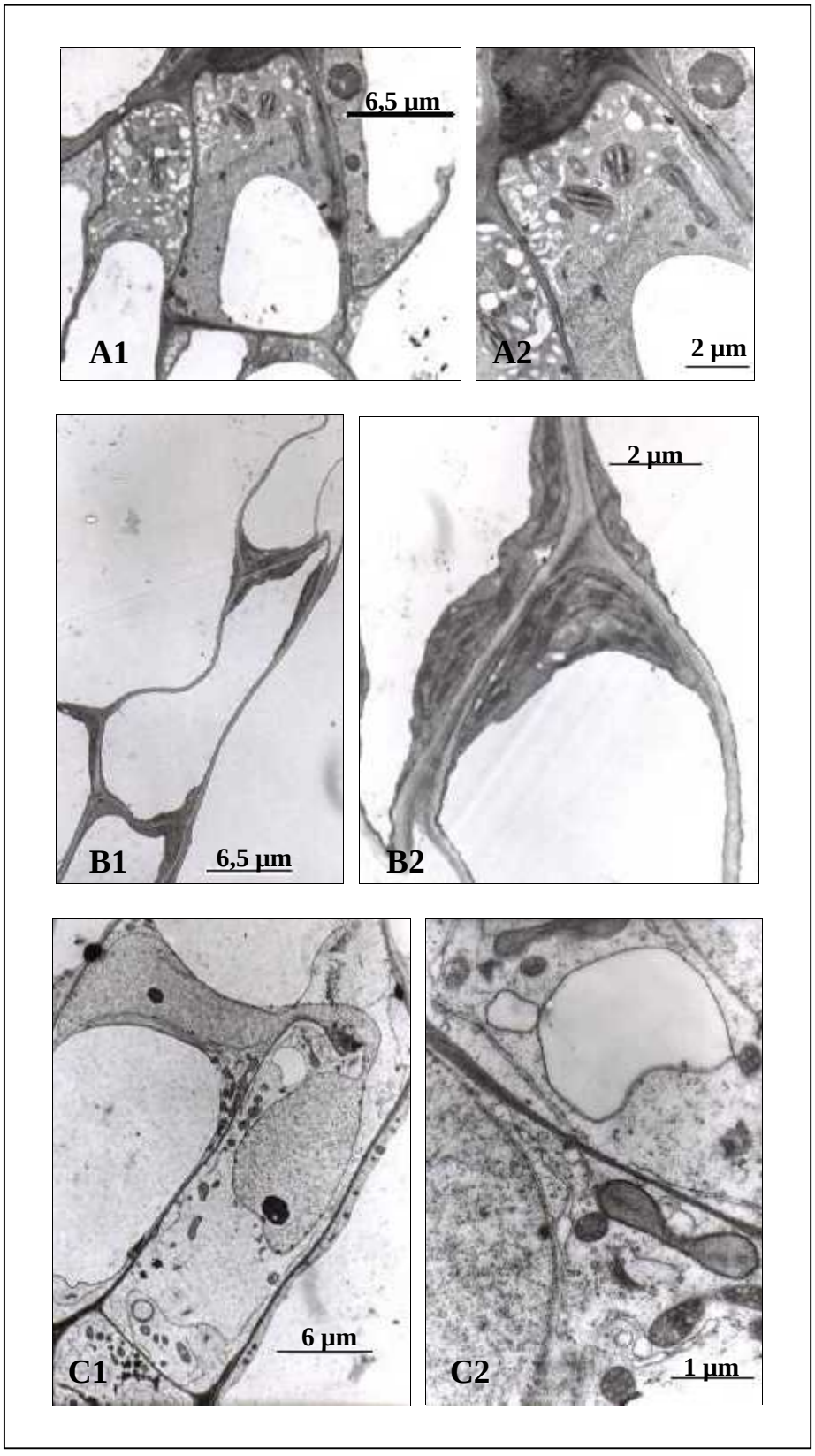
3. REZULTATI

3.1. Elektronsko-mikroskopska opažanja staničnih struktura tkiva hrena i frakcija mikrosoma endoplazmatskog retikuluma

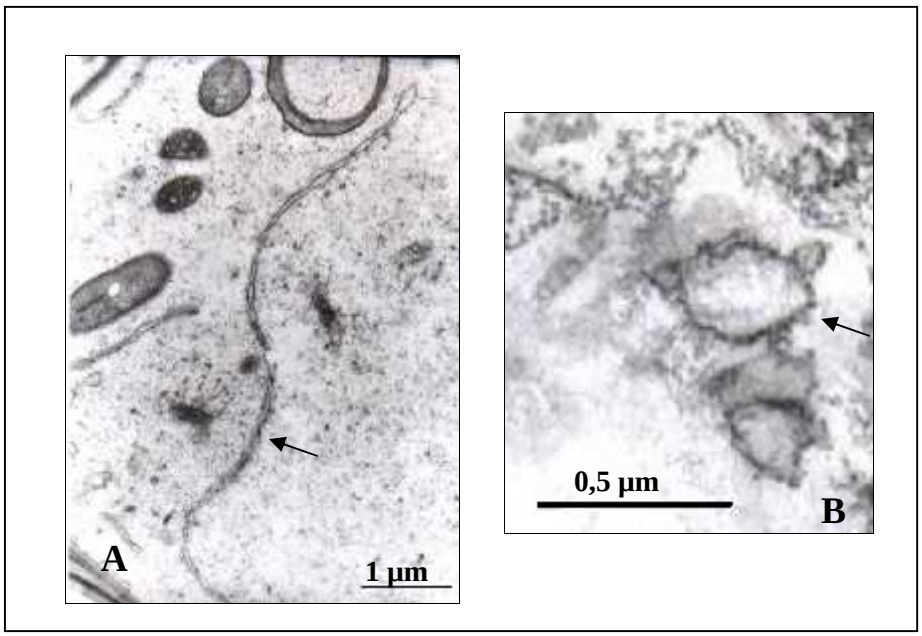
Pomoću elektronskog mikroskopa uočio sam velike razlike u unutrašnjoj građi stanica tkiva lista, teratoma (organiziranog i neorganiziranog) te tkiva tumora. Primijetio sam da mezofil lista teratoma (organizirani dio teratoma) čini populacija stanica različitih veličina i oblika (Slika 6 A i B), za razliku od mezofila normalnog lista kojeg čine stanice približno istog oblika i veličine (Slika 5 A). Nadalje, stanice neorganiziranog dijela teratoma (Slika 6 C) i tumora (Slika 5 B) po svojoj građi bile su vrlo slične. Najuočljivije razlike u ultrastrukturi lista hrena, organiziranog dijela teratoma, neorganiziranog dijela teratoma i tumora vidljive su u građi plastida i jezgre. Kloroplaste s dobro razvijenim fotosintetskim aparatom primijetio sam u listu hrena (Slika 5 A), za razliku od transformiranih linija gdje prevladavaju plastidi sa slabo razvijenim tilakoidnim sustavom. Plastidi transformiranih linija također variraju i veličinom i oblikom (Slika 5 B i Slika 6 A1, A2, B2, C1 i C2). U transformiranim linijama primijetio sam i nepravilne jezgre sa dubokim invaginacijama jezgrine ovojnice (Slika 5 C1). U navedenim tkivima nisam uočio razlike u strukturi endoplazmatskog retikuluma (Slika 7 A, strelica). U frakciji endoplazmatskog retikuluma tkiva teratoma uočio sam prisutnost mikrosoma s ribosomima (Slika 7 B, strelica).



Slika 5. Strukture stanica tkiva (A) lista i (B) tumora dobivene elektronskom mikroskopijom.



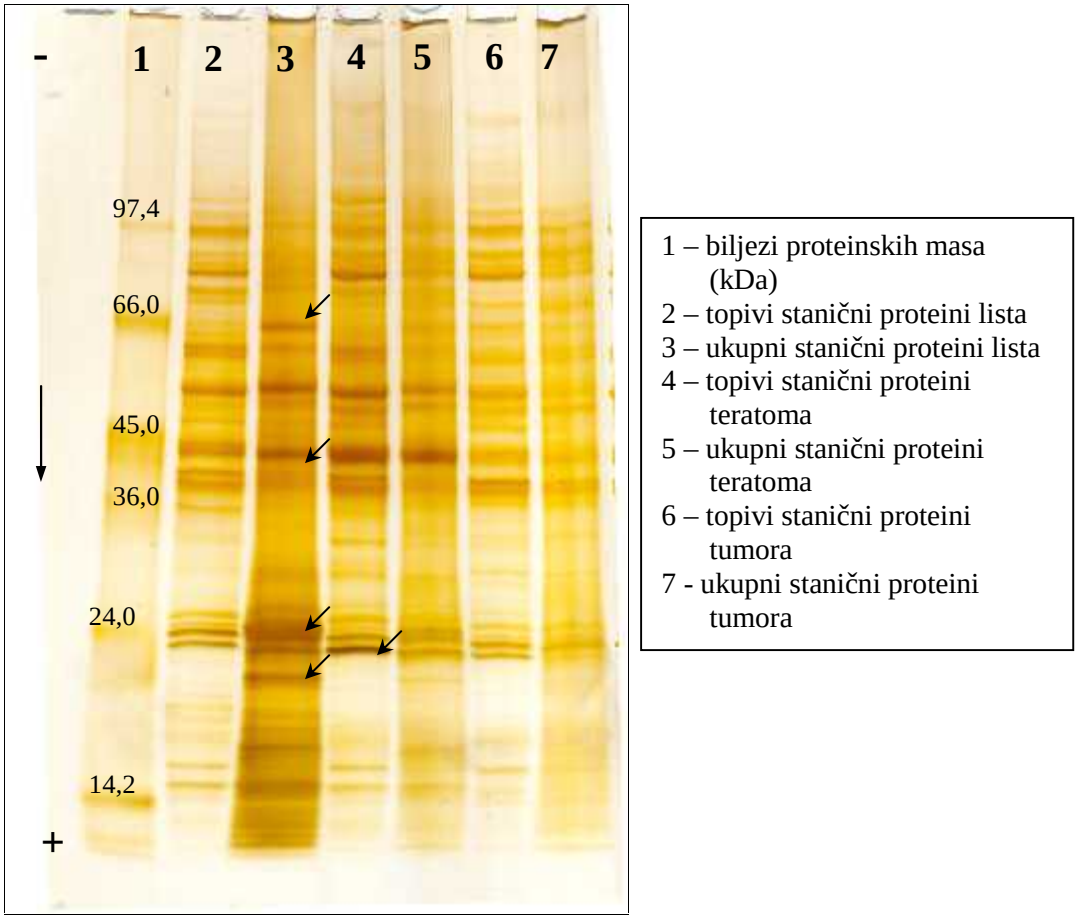
Slika 6. Strukture stanica (A i B) organiziranog i (C) neorganiziranog tkiva teratoma dobivene elektronskom mikroskopijom.



Slika 7. (A) Endoplazmatski retikulum i (B) mikrosomi endoplazmatskog retikuluma tkiva teratoma dobiveni elektronskom mikroskopijom.

3.2. Određivanje elektroforetskog uzorka ukupnih staničnih i topivih staničnih proteina

Nakon razdvajanja SDS-PAG elektroforezom i bojanja gelova srebrovim nitratom u ekstraktima različitih tkiva hrena primijetio sam velik broj proteinskih vrpci. Uzorci proteina na gelu kod različitih tipova tkiva pokazuju međusobno veliku sličnost. Također sam primijetio veliki broj zajedničkih proteinskih vrpci između topivih staničnih i ukupnih staničnih proteina (Slika 8). Najvidljivije razlike između različitih tipova tkiva istaknuo sam strelicama (66, 42, 24, 20 i 18 kDa).

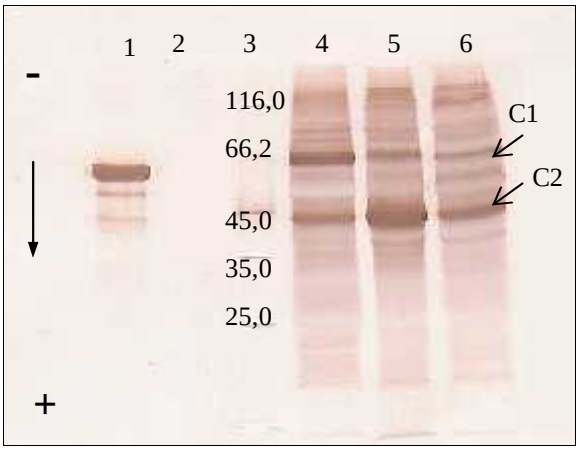


Slika 8. Sastav topivih staničnih i ukupnih staničnih proteina razdvojenih SDS-PAG elektroforezom na 8-18 % gelu i obojanih srebrovim nitratom.

3.3. Određivanje sastava glikoproteina u ukupnim staničnim proteinima

Nakon prijenosa ukupnih staničnih proteina na membranu primijetio sam velik broj glikoproteina na koje se veže lektin Con A (Slika 9). Uočio sam veliku sličnost između sve tri linije tkiva. Dvije najizraženije glikoproteinske vrpce obilježio sam s C1 (66,2 kDa) i C2 (45,0 kDa). Glikoproteini C1 i C2 pojavljuju se u sva tri tipa tkiva; C1 je najizraženiji u tkivu lista, a C2 u tkivu teratoma.

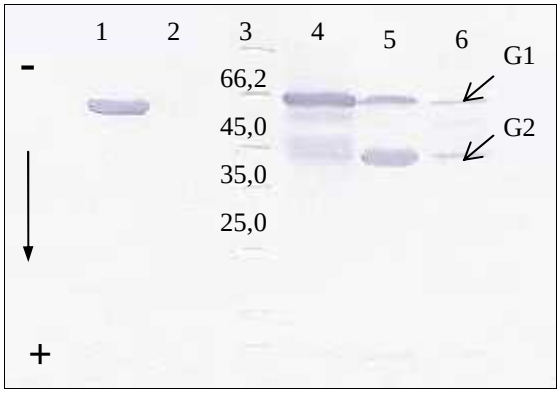
1 – karboksipeptidaza Y (pozitivna kontrola)
2 – fetuin (negativna kontrola)
3 – biljezi proteinskih masa (kDa)
4 – list
5 – teratom
6 – tumor



Slika 9. Sastav glikoproteina na koje se vezao lektin Con A u ukupnim staničnim proteinima hrena.

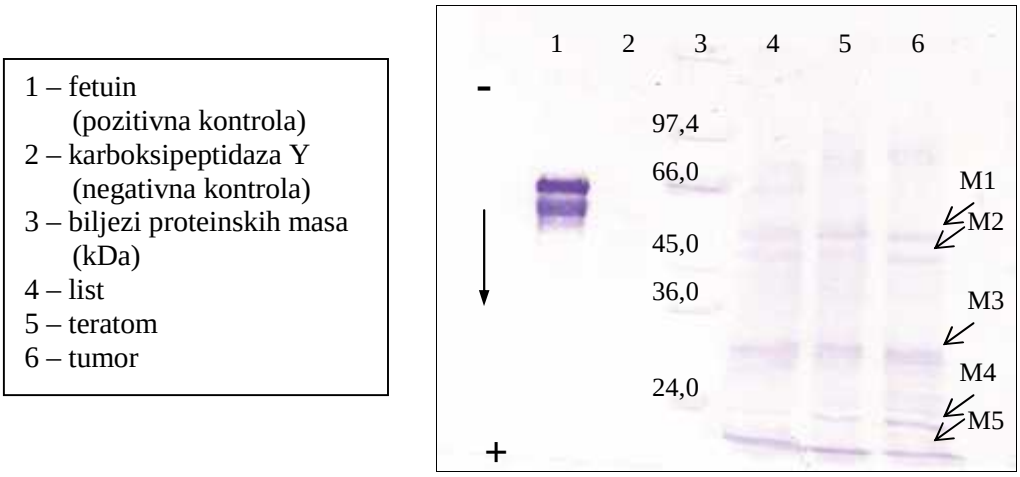
Na membrani obrađenoj lektinom GNA vidljivo je nekoliko glikoproteina (Slika 10). Najizraženije vrpce obilježio sam sa G1 (66,2 kDa) i G2 (45,0 kDa). Glikoprotein G1 najizraženiji je kod tkiva lista, a glikoprotein G2 u tkivu teratoma. Ova dva glikoproteina preklapaju se s glikoproteinima C1 i C2 koji su dobiveni nakon obrade membrane lektinom Con A.

1 – karboksipeptidaza Y (pozitivna kontrola)
2 – transferin (negativna kontrola)
3 – biljezi proteinskih masa (kDa)
4 – list
5 – teratom
6 – tumor



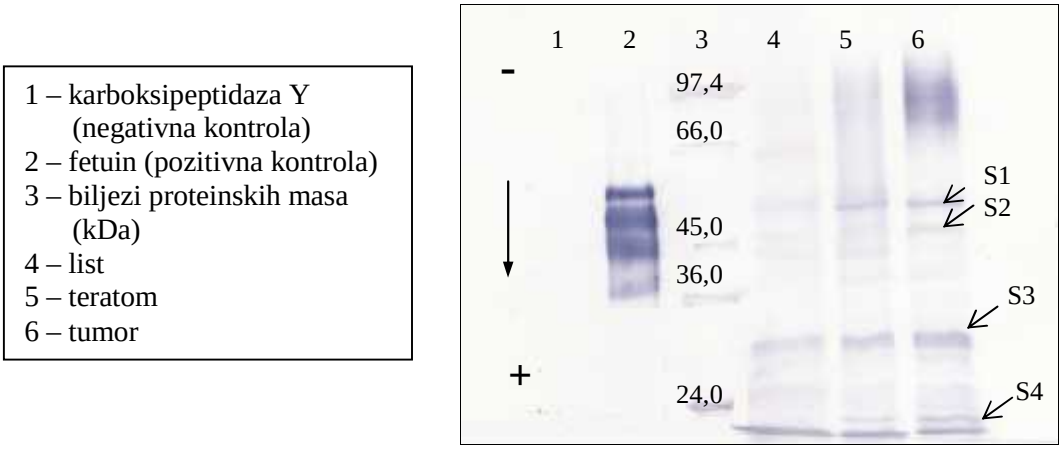
Slika 10. Sastav glikoproteina na koje se vezao lektin GNA u ukupnim staničnim proteinima hrena.

Na membrani obrađenoj lektinom MAA vidljivo je oko desetak glikoproteina. Najizraženije vrpce obilježio sam oznakama od M1 do M5 (55, 50, 30, 24 i 18 kDa). Većina glikoproteina jednako je zastupljena u sva tri tipa tkiva. Glikoproteinska vrpca M4 (24,0 kDa) najizraženija je u tumorskom tkivu (Slika 11).



Slika 11. Sastav glikoproteina na koje se vezao lektin MAA u ukupnim staničnim proteinima hrena.

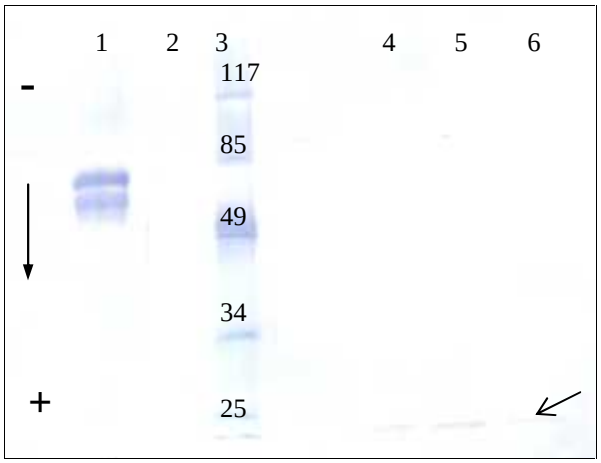
U ukupnim staničnim proteinima primijetio sam oko desetak glikoproteina na koje se vezao lektin SNA. Najizraženije glikoproteine označio sam oznakama od S1 do S4 (50, 30, 24 i 18 kDa) (Slika 12). Većina glikoproteinskih vrpci podjednako je zastupljena u svim tkivima. Vrpca S4 (24 kDa) prisutna je u svim tkivima, ali je najizraženija u tumorskom tkivu. Najizraženije vrpce odgovaraju najizraženijim vrpcama prikazanim s MAA.



Slika 12**.** Sastav glikoproteina na koje se vezao lektin SNA u ukupnim staničnim proteinima hrena.

Na membrani obrađenoj lektinom DSA uočio sam samo jednu vrlo slabo izraženu vrpcu na oko 20 kDa (Slika 13).

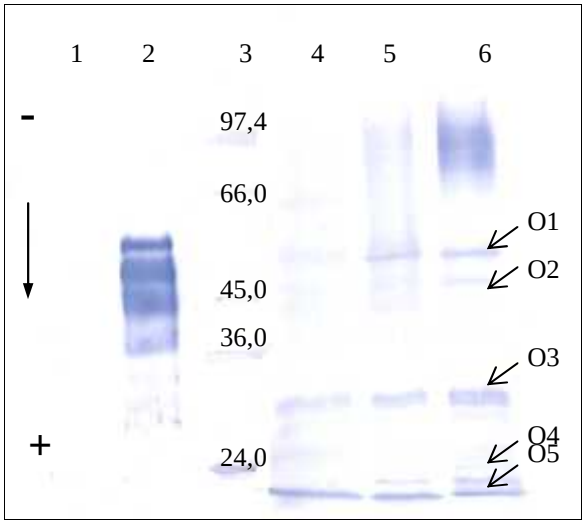
1 – fetuin
(pozitivna kontrola)
2 – karboksipeptidaza Y
(negativna kontrola)
3 – biljezi proteinskih masa
(kDa)
4 – list
5 – teratom
6 – tumor



Slika 13. Sastav glikoproteina na koje se vezao lektin DSA u ukupnim staničnim proteinima hrena.

Na membrani obrađenoj lektinom PNA vidljivo je oko desetak glikoproteina. Najizraženije vrpce obilježio sam oznakama od O1 do O5 (Slika 14). Glikoproteini O3 (30 kDa) i O5 (18 kDa) podjednako su izraženi u svim tipovima tkiva. Vrpca O1 (55 kDa) jasno je izražena u tumoru i teratomu, dok je u listu slabo vidljiva. Slabo izražen glikoprotein O2 (50 kDa) najizraženiji je u tumorskom tkivu, dok je kod ostalih linija jedva vidljiv. Glikoprotein O4 (24 kDa) vidljiv je samo u tumorskom tkivu i tkivu teratoma.

1 – karboksipeptidaza Y
(negativna kontrola)
2 – asialofetuin (pozitivna
kontrola)
3 – biljezi proteinskih masa
(kDa)
4 – list
5 – teratom
6 – tumor



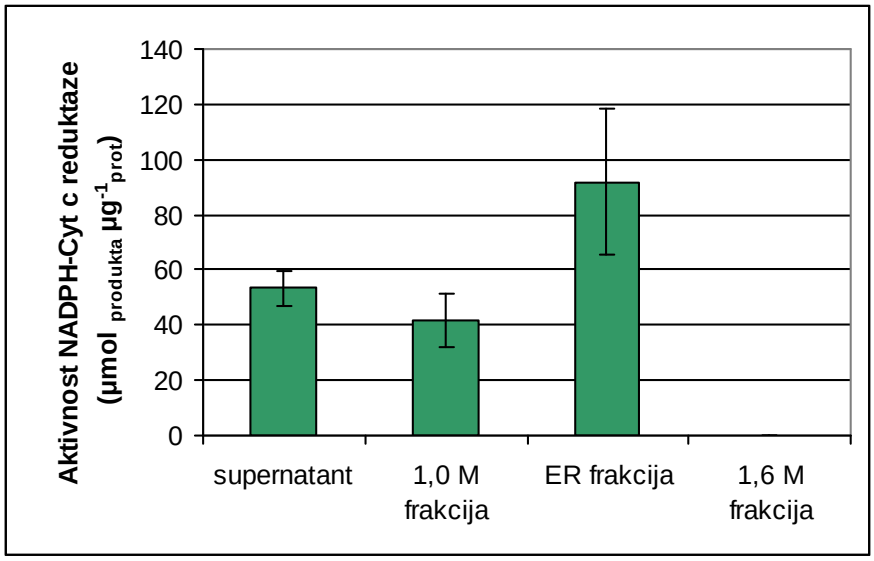
Slika 14. Sastav glikoproteina na koje se vezao lektin PNA u ukupnim staničnim proteinima hrena.

Na membranama tretiranim lektinima RCA I i UEA nisam uočio niti jednu proteinsku vrpcu u ukupnim staničnim proteinima lista, teratoma i tumora hrena.

3.4. Aktivnost enzima koji su primijenjeni kao biljezi frakcija

3.4.1. Aktivnost NADPH-Cyt c reduktaze

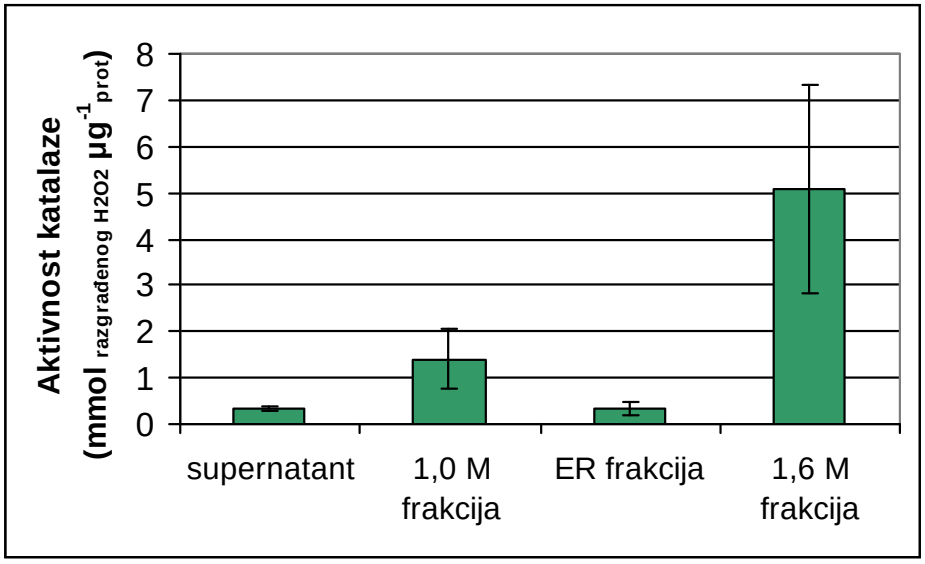
Praćenjem aktivnosti NADPH-citokrom c reduktaze duž gradijenta saharoze primjetio sam najveću aktivnost na granici 1,0 M i 1,6 M saharoze što odgovara frakciji obogaćenoj mikrosomima endoplazmatskog retikuluma (Slika 15). U frakciji 1,6 M saharoze aktivnost je bila nemjerljiva. Povišenu aktivnost pokazale su i frakcije supernatanta i 1,0 M saharoze, ali njihova aktivnost bila je 1,5-2 puta manja nego u frakciji endoplazmatskog retikuluma.



Slika 15. Aktivnost NADPH-citokrom c reduktaze duž gradijenta saharoze. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od tri replike ± standardna pogreška.

3.4.2. Aktivnost katalaze

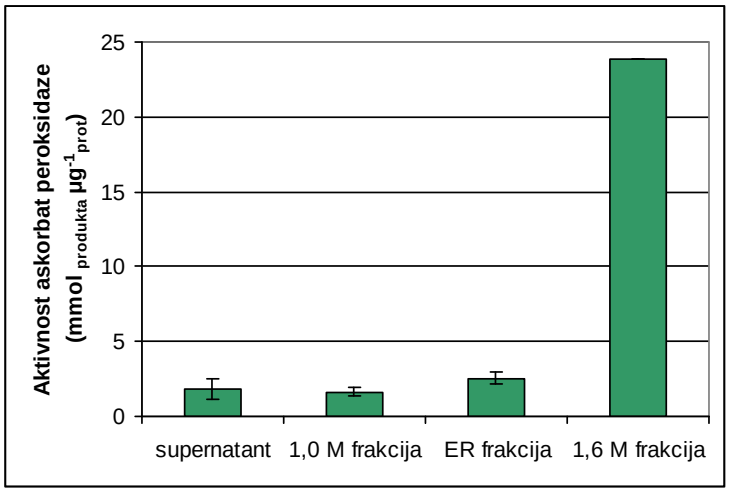
Najveću aktivnost katalaze izmjerio sam u 1,6 M frakciji koja je bila 3,5 puta veća od aktivnosti u 1,0 M frakciji, odnosno 15,5 puta veća od aktivnosti u supernatantu i ER frakciji (Slika 16).



Slika 16. Aktivnost katalaze duž gradijenta saharoze. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od tri replike ± standardna pogreška.

3.4.3. Aktivnost askorbat peroksidaze

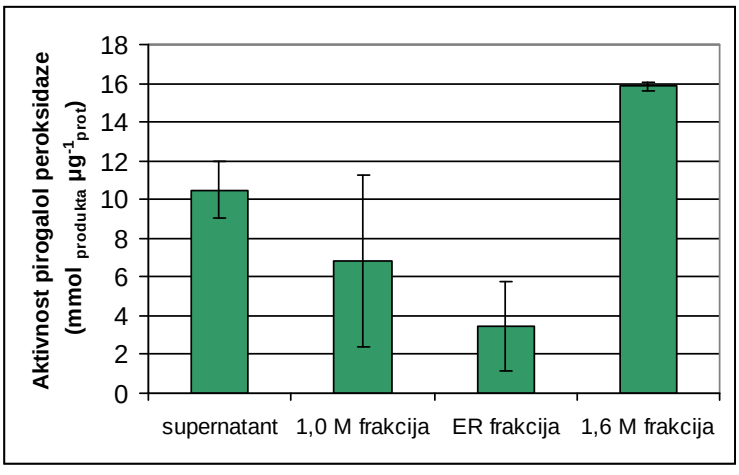
Prilikom praćenja aktivnosti askorbat peroksidaze duž gradijenta saharoze primijetio sam povećanu aktivnosti u 1,6 M frakciji u odnosu na ostale frakcije. Vrijednosti u ostalim frakcijama bile su 9 do 12 puta manje (Slika 17).



Slika 17. Aktivnost askorbat peroksidaze duž gradijenta saharoze. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od tri replike ± standardna pogreška.

3.4.4. Aktivnost pirogalol peroksidaze

Praćenjem aktivnosti pirogalol peroksidaze najnižu aktivnost primijetio sam u frakciji obogaćenoj mikrosomima endoplazmatskog retikuluma, dok je u 1,6 M frakciji izmjerena najveća aktivnost (Slika 18).

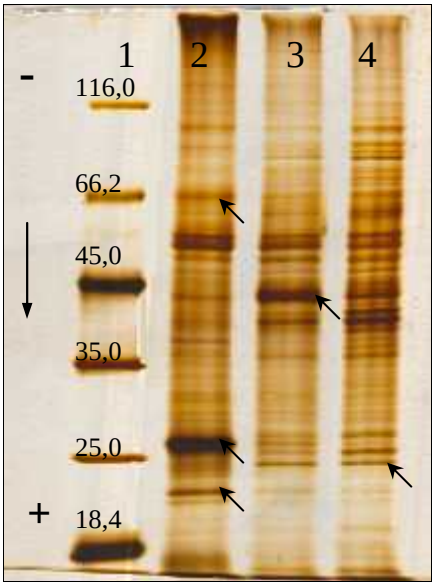


Slika 18. Aktivnost pirogalol peroksidaze duž gradijenta saharoze. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od tri replike ± standardna pogreška.

3.5. Elektroforetska analiza proteina iz frakcija obogaćenih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma

Nakon razdvajanja SDS-PAG elektroforezom te bojanja gelova srebrovim nitratom u frakcijama obogaćenim mikrosomima endoplazmatskog retikuluma primijetio sam velik broj proteinskih vrpci. Uzorci proteina na gelu u različitim tipovima tkiva pokazali su veliku sličnost, no primijetio sam i neke razlike. Proteinske vrpce od oko 66,2 26 i 22 kDa najizraženije su bile u tkivu lista, u odnosu na ostala tkiva. U tkivu teratoma najizraženija je bila vrpca od oko 45 kDa. Proteinsku vrpcu od oko 25 kDa uočio sam u transformiranim tkivima, dok je u listu bila slabo vidljiva (Slika 19).

1 – biljezi proteinskih masa (kDa)
2 –list
3 –teratom
4 –tumor

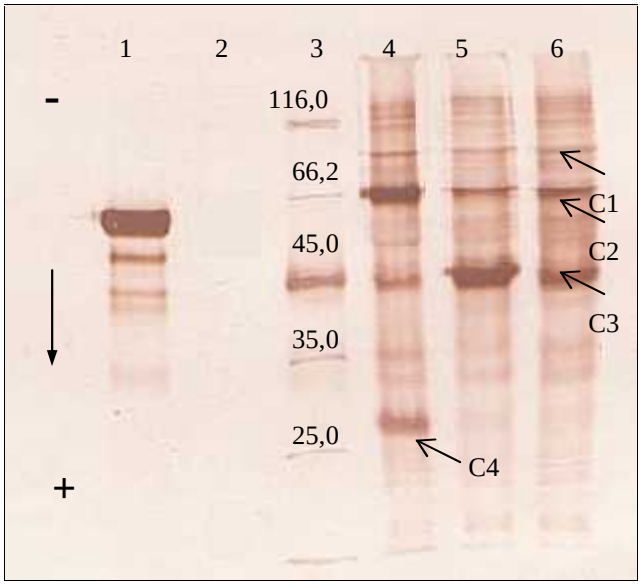


Slika 19. Sastav proteina iz frakcija obogaćenih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma, razdvojenih SDS-PAG elektroforezom i obojanih srebrovim nitratom. Najizraženije razlike u sastavu proteina označene su strelicama.

3.6. Određivanje sastava glikoproteina iz frakcija obogaćenih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma

U frakcijama obogaćenim mikrosomima endoplazmatskog retikuluma primijetio sam oko tridesetak glikoproteina na koje se vezao lektin Con A (Slika 20). Najizraženije glikoproteine označio sam oznakama od C1 do C4 (91, 66,2, 45 i 28 kDa). Glikoprotein C4 nalazio se u svim tkivima no njegova vrpca nakon obrade membrane lektinom Con A najizraženija je bila u tkivu lista. Glikoprotein C3 najizraženiji je bio u teratomu, a najslabije izražen u tkivu lista.

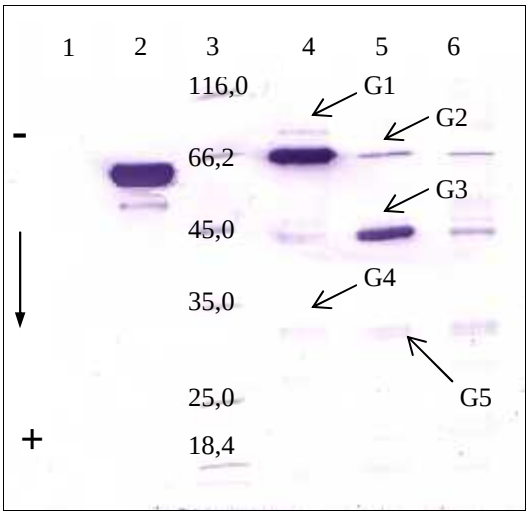
1 – karboksipeptidaza Y (pozitivna kontrola)
2 – fetuin (negativna kontrola)
3 – biljezi proteinskih masa (kDa)
4 – list
5 – teratom
6 – tumor



Slika 20. Sastav glikoproteina iz frakcija obogaćenih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma na koje se vezao lektin Con A.

U frakcijama obogaćenim mikrosomima endoplazmatskog retikuluma primijetio sam oko desetak glikoproteina na koje se vezao lektin GNA (Slika 21). Najizraženije glikoproteine označio sam oznakama od G1 do G5 (91, 66,2, 45, te dvije bliske vrpce od oko 32 kDa). Vrpce G4 i G5 podjednako su bile zastupljene u svim tkivima. Vrpca G2, iako prisutna u svim tkivima, najizraženija je bila u listu. Vrpca G3 također je uočena u svim tkivima, ali je najizraženija bila u tkivu teratoma. Vrpca G1 pojavila se samo u tkivu lista.

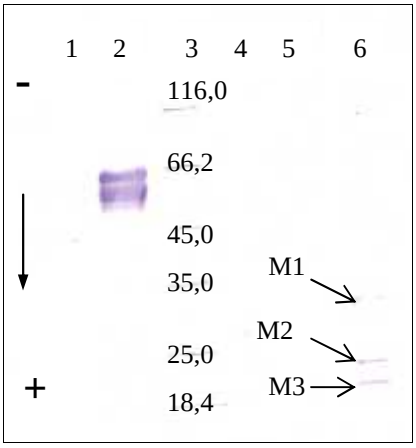
1 – karboksipeptidaza Y (negativna kontrola)
2 – transferin (pozitivna kontrola)
3 – biljezi proteinskih masa (kDa)
4 – list
5 – teratom
6 – tumor



Slika 21. Sastav glikoproteina iz frakcija obogaćenih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma na koje se vezao lektin GNA.

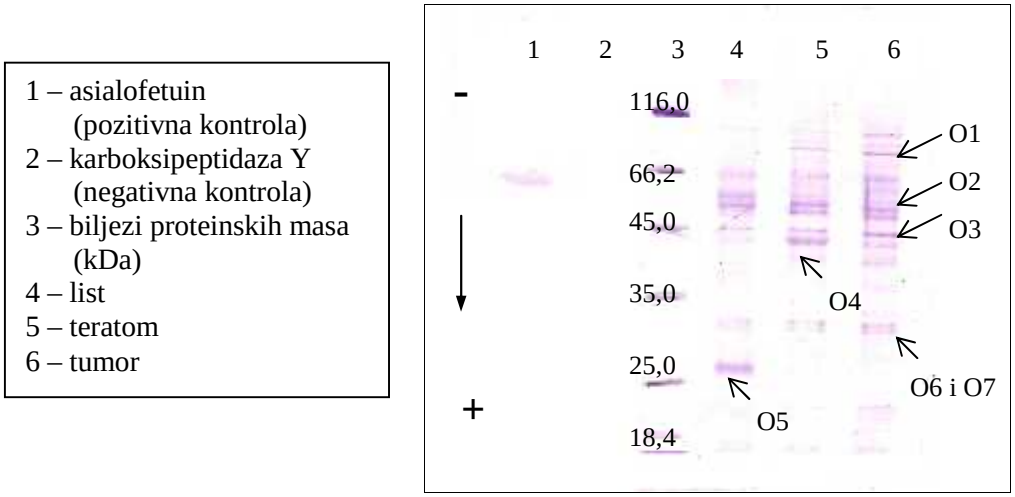
Nakon obrade membrane lektinom MAA nisam primijetio niti jednu glikoproteinsku vrpcu u tkivima lista i teratoma. U tumorskom tkivu vidljive su tri vrpce vrlo slabog signala koje sam označio sa M1 (32 kDa), M2 (22 kDa) i M3 (24 kDa) (Slika 22).

1 – fetuin (negativna kontrola)
2 – karboksipeptidaza Y (pozitivna kontrola)
3 – biljezi proteinskih masa (kDa)
4 – list
5 – teratom
6 – tumor



Slika 22. Sastav glikoproteina iz frakcija obogaćenih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma na koje se vezao lektin MAA.

Na membrani obrađenoj lektinom PNA vidljivo je oko dvadesetak glikoproteina. Najizraženije sam obilježio oznakama od O1 do O7 (Slika 23). Glikoproteini O2 (56 kDa) i O3 (45 kDa) vidljivi su u svim tkivima, dok je glikoprotein O5 (27 kDa) karakterističan za tkivo lista. Protein obilježen sa O1 (91 kDa) nedostaje u tkivu lista, a O4 (43 kDa) koji se pojavljuje u sva tri tipa tkiva najjasnije je izražen u tkivu teratoma. Dva glikoproteina vrlo bliska po molekularnoj veličini, O6 i O7 (bliske vrpce od oko 32 kDa), izražena su u svim tkivima te se preklapaju s glikoproteinima G4 i G5 prikazanim lektinom GNA.



Slika 23. Sastav glikoproteina iz frakcija obogaćenih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma na koje se vezao lektin PNA.

Na membranama obrađenim lektinima SNA, DSA, RCA I i UEA nisam uočio niti jednu glikoproteinsku vrpcu u frakcijama obogaćenim mikrosomima endoplazmatskog retikuluma.

4. Rasprava

U ovom radu uspoređivao sam transformirane linije hrena (tumorsku i teratomsku) s kontrolnim tkivom lista u elektroforetskoj slici proteina te sastavu glikoproteina. Posebnu pažnju obratio sam na sastav glikoproteina endoplazmatskog retikuluma, kao primarnog organela u glikozilacijskom putu proteina.

Proteini su direktni produkti gena i kao takvi dokaz su karakteristične genske ekspresije pojedinih tkiva. Promjene u elektroforetskoj slici proteina mogu biti posljedica različite razine razvoja ili diferencijacije pojedinih tipova tkiva. Analiza elektroforetske slike ukupnih staničnih proteina hrena pokazala je veću sličnost, nego razliku između transformiranih linija i tkiva lista. Zanimljive su bile proteinske vrpce od oko 66 i 21 kDa koje su izražene u tkivu lista, a slabo vidljive u ostalim tkivima. Proteinska vrpca od oko 40 kDa bila je karakteristična za tkivo lista i teratoma, dok u tumorskom tkivu nije uočena. Upravo nam ovakve razlike u ekspresiji proteina, mogu poslužiti kao biljezi u procesima tumorigeneze. Već su ranije zabilježene razlike u elektroforetskom uzorku topivih proteina te u izoenzimima različitih tipova peroksidaza između lista i transformiranih linija hrena (Balen i sur. 2008). Za peroksidaze se pokazalo da su važan parametar metaboličke aktivnosti tijekom promjena rasta i stanične diferencijacije.

Glikozilacijski profil staničnih proteina može biti promijenjen tijekom različitih razvojnih stadija biljke ili su te promjene posljedica rasta u uvjetima *in vitro*. Glikoproteini tkiva hrena otkriveni su lektinom Con A koji se specifično veže na ostatke α-D-manoze, a nešto slabijim afinitetom za ostatke α-D-glukoze (Kaji i sur. 2003). Nakon prijenosa ukupnih staničnih proteina na membranu, glikoproteini od oko 66 kDa (C1) i 45 kDa (C2) reagirali su s Con A u sva tri tipa tkiva. Ove dvije glikoproteinske vrpce reagirale su i s lektinom GNA, koji prepoznaje terminalne grupe D-manoze, osobito Man-α(1-3)-Man koju pronalazimo kod visokomanoznog tipa N-glikana. Ovo preklapanje ukazuje da ovi glikoproteini hrena sadrže visokomanozni ili hibridni tip N-glikana. Ova dva glikoproteina izražena su u svim tipovima tkiva, no glikoprotein G1 najizraženiji je u tkivu lista, dok je G2 najizraženiji u tkivu teratoma što odgovara i rezultatu dobivenom s Con A.

Veći broj slabo izraženih vrpci dobio sam na membranama obrađenim lektinima SNA i MAA. Dok SNA karakteristično prepoznaje sijalinsku kiselinu (SA) vezanu α-(2,6)-vezom, MAA prepoznaje sijalinsku kiselinu vezanu α-(2,3)- vezom na galaktozu. Prisutnost sijalinske kiseline, osobito N-acetilneuraminske kiseline (Neu5Ac) i N-glikolilneuraminske kiseline

(Neu5Gc), na terminalnim krajevima različitih glikokonjugata od velike je fiziološke važnosti. Sijalizacija utječe na biološku aktivnost mnogih terapeutski važnih glikoproteina među kojima su hormoni, enzimi, imunoglobulini, faktori zgrušavanja i citokini. U zadnjih nekoliko godina vodi se rasprava o prisutnosti sijalinske kiseline i sijalokonjugata u biljaka. Shah i sur. (2003) na temelju otkrivanja sijalinske kiseline vezane na 1,2-diamino-4,5-metilen dioksibenzen (DMB) tvrde da postoji genetička i enzimatska osnova za sijalilaciju u stanicama uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*). Iako su proučavanjem genoma uročnjaka pronađeni geni koji su homologni genima sisavaca koji kodiraju sijalotransferaze, većina ih ne sadrži strukturalne motive koji su biljezi aktivnih sijalotransferaza (Séveno i sur. 2004). Prisutnost derivata DMB-SA Séveno i sur. (2004) tumače pogrešnom interpretacijom rezultata zbog prisutnosti α-keto-3-deoksi-D-mano-oktulosonične kiseline (KDO) koja se također veže na DMB. KDO je sastavni dio stanične stjenke biljnih stanica te mogući izvor kontaminacije. Lektini MAA i SNA, koji specifično prepoznaju sijalinsku kiselinu, možda nisu najbolji alat za njezino dokazivanje jer vrlo često daju lažne pozitivne signale. Stoga bi prisutnost N-glikana sa sijalinskom kiselinom na glikoproteinima hrena trebalo dokazati i drugim metodama kao što je masena spektrometrija.

Na membrani obrađenoj lektinom PNA, koji se primjenjuje za otkrivanje O-glikana, primjetio sam samo nekoliko glikoproteina. Kod uzoraka ukupnih staničnih proteina nisam primijetio značajnije razlike u elektroforetskoj slici glikoproteina, između tkiva lista te transformiranih linija hrena. Kod membrana obrađenih lektinima DSA, RCA I i UEA, u uzorcima ukupnih staničnih proteina i frakcijama obogaćenim mikrosomima endoplazmatskog retikuluma, nisam primijetio pozitivne signale. UEA prepoznaje fukozu vezanu α-(1,2)-vezom na galaktozu, a RCA I prepoznaje terminalnu galaktozu vezanu β-(1,4)-vezom. Ove strukture pronalazimo kod animalnih N-glikana, dok su kod biljaka rijetke. Za biljke je karakteristična prisutnost α-(1,3)-fukoze u složenim N-glikanima.

Kako je endoplazmatski retikulum početno mjesto u glikozilacijskom putu proteina, odlučio sam pobliže istražiti razlike između transformiranih linija hrena i kontrolnog tkiva lista u elektroforetskoj slici proteina te sastavu N-glikana ovog staničnog odjeljka. Također sam pokušao utvrditi razlike u strukturi endoplazmatskog retikuluma pomoću elektronske mikroskopije. Na diskontinuiranom gradijentu saharoze odvojio sam frakcije endoplazmatskog retikuluma od ostatka staničnog sadržaja. Kao biljeg mikrosomalne frakcije endoplazmatskog retikuluma koristio sam enzim NADPH-citokrom c reduktazu, koja kod biljka sudjeluje u širokom rasponu reakcija od biosinteze hormona, signalnih molekula, sekundarnih metabolita do sudjelovanja u detoksikaciji od herbicida (Ro i sur. 2002).

Praćenjem aktivnosti NADPH-citokrom c reduktaze duž gradijenta saharoze primijetio sam najveću aktivnost ovog enzima na granici 1,0 M i 1,6 M saharoze što sam i uzimao kao frakciju obogaćenu mikrosomima endoplazmatskog retikuluma. Praćenjem aktivnosti ostalih enzima duž gradijenta potvrdio sam da je riječ o frakciji najmanje kontaminiranoj ostalim sadržajem stanice. Izoenzime katalaze pronalazimo u citosolu, glioksisomima te peroksisomima (Wojtaszek 1997), zbog čega mi je aktivnost katalaze duž gradijenta bila dobar pokazatelj kontaminacije ovim staničnim odjeljcima. Askorbat peroksidaze su enzimi koji razgrađuju vodikov peroksid u citosolu i kloroplastima biljne stanice, a također je izoenzim askorbat peroksidaze otkriven i u membrani mitohondrija (Sarowar i sur. 2005). U stanicama hrena prevladava razred III peroksidaza, među kojima dominiraju izvanstanične i vakuolarne peroksidaze (Jespersen i sur. 1997), zbog čega sam pratio aktivnost pirogalol peroksidaza duž gradijenta.

Elektronskom mikroskopijom nisam uočio razlike u građi endoplazmatskog retikuluma kod različitih linija hrena. Međutim, kod transformiranih sam linija primijetio veći broj endoplazmatskih prostora i Golgijevih cisterni, što može biti posljedica pojačane aktivnosti ovih odjeljaka. Usporedbom frakcija obogaćenih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma u elektroforetskoj slici proteina, slično kao i kod ukupnih staničnih proteina, između transformiranih linija i tkiva lista uočio sam više sličnosti nego razlika. Naročito treba istaknuti nedostatak proteinskih vrpci od 26 i 20 kDa kod transformiranih linija, te jaku obojenost vrpce od oko 45 kDa u tkivu teratoma. Upravo bi tim razlikama trebalo posvetiti posebnu pažnju u daljnjim istraživanjima.

Glikozilacijski profil proteina endoplazmatskog retikuluma također je proučavan primjenom lektina. Kao i kod ukupnih staničnih proteina najviše do izražaja dolaze glikoproteini od 66 i 45 kDa na membranama obrađenim lektinima Con A i GNA. Kako hibridni tip N-glikana nastaje kasnije u glikozilacijskom putu proteina, za ove glikoproteine možemo reći da sadrže visokomanozni tip N-glikana koji je karakterističan za proteine endoplazmatskog retikuluma. Na membranama obrađenim lektinom GNA uočio sam i neke dodatne vrpce koje nisu bile vidljive u ekstraktima ukupnih staničnih proteina. Također sam zamijetio veći broj glikoproteina otkrivenih lektinom PNA nego kod ukupnih staničnih proteina. PNA specifično prepoznaje slijed Gal-β(1,3)-GalNAc u O-glikanima. Zanimljivo je da glikoproteini od 66 i 45 kDa, koji su vidljivi na membranama obrađenim s Con A i GNA, također stupaju u interakcije i s PNA. Ovaj rezultat može ukazivati da navedeni proteini sadrže i N- i O-glikozilacijska mjesta ili da GNA i PNA prepoznaju različite glikoproteine slične molekularne mase koji se nisu razdvojili SDS-PAG elektroforezom. Ako se dokaže

postojanje sijalizacije u biljnim stanicama, nedostatak sijalinske kiseline u N-glikanima iz frakcija endoplazmatskog retikuluma mogao bi se objasniti činjenicom da se sijalizacija proteina odvija u Golgijevom kompleksu. Tada bi tri vrlo slabo izražene glikoproteinske vrpce na membranama tretiranim lektinom MAA mogle ukazati na kontaminaciju mikrosomima Golgijevog kompleksa.

5. Zaključak

Analiza elektroforetske slike ukupnih staničnih i topivih staničnih proteina pokazala je veću sličnost, nego razliku između transformiranih linija i tkiva lista. Uočene su proteinske vrpce karakteristične za tkivo lista (66 i 21 kDa) i tkivo teratoma (19 kDa). Proteinska vrpca od oko 40 kDa karakteristična je za tkiva lista i teratoma, dok u tumorskom tkivu nije uočena.

Rezultati prikaza glikoziliranih proteina lektinima dokazali su da je glikozilacija ukupnih staničnih proteina promijenjena tijekom diferencijacije stanica hrena. Glikoproteini od oko 66 kDa (C1) i 45 kDa (C2) reagirali su s Con A u sva tri tipa tkiva. Glikoprotein C1 najizraženiji je u tkivu lista, dok je C2 najizraženiji u tkivu teratoma. Ova dva lektina reagirali su i s lektinom GNA (G1 i G2). Veći broj, ali slabo izraženih signala primijećeni su na membranama tretiranim lektinima SNA i MAA. Glikoproteinska vrpca M4 (24 kDa) prisutna je u tkivu teratoma i tumora, dok u tkivu lista nije uočena. Velik broj zajedničkih glikoproteinskih vrpci uočen je i na membranama tretiranim s PNA.

Aktivnosti enzima, koji su primijenjeni kao biljezi frakcija, dokazale su uspješnost izolacije endoplazmatskog retikuluma na diskontinuiranom gradijentu saharoze. Glikozilacijski profil proteina endoplazmatskog retikuluma proučavan primjenom lektina pokazuje prisutnost N- i O-glikozilacije kod ovih proteina. U frakcijama obogaćenim mikrosomima endoplazmatskog retikuluma primijetio sam oko tridesetak glikoproteina na koje se vezao lektin Con A. Glikoprotein C4 nalazi se u svim tipovima tkiva, no njegova vrpca nakon obrade membrane lektinom Con A najizraženija je u tkivu lista. Glikoprotein C3 najizraženiji je u tkivu teratoma, a najslabije je izražen u tkivu lista. Također je primijećen velik broj glikoproteinskih vrpci na membranama obrađenim lektinima GNA i PNA. Na membranama obrađenim lektinima MAA, SNA, DSA, RCA I i UEA nisu primijećeni glikoproteini endoplazmatskog retikuluma.

Elektronskom mikroskopijom uočene su velike razlike u unutrašnjoj građi stanica tkiva lista, teratoma (organizirano i neorganizirano) te tkiva tumora. U svim transformiranim linijama primijećeni su nepravilno građeni plastidi. Velika sličnost u građi stanica uočena je kod tumora i neorganiziranog teratoma. Ova dva tipa tkiva sadrže velike nepravilne jezgre i male plastide. U navedenim tkivima nisam uočio razlike u strukturi endoplazmatskog retikuluma.

6. Literatura

Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. Methods Enzymol. 105, 121-126.

Balen B, Pavoković D, Peharec P, Krsnik-Rasol M (2008) Biochemical markers of morphogenesis in long term horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) tissue culture. doi:10.1016/j.scienta.2008.07.010.

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver-staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8, 93-99.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Braun AC, Wood HN (1976) Suppression of the neoplastic state with the acquisition of specialized functions in cells, tissues, and organs of crown gall teratomas of tobacco. Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 496-500.

Chance B, Maehly AC (1954) Assay of catalases and peroxidases. Methods Biochem. Anal. 1, 357-424.

Coughlan SJ, Hastings C, Winfrey Jr RJ (1996) Molecular characterisation of plant endoplasmic reticulum. Identification of protein disulfide-isomerase as the major reticuloplasmin. Eur. J. Biochem. 235, 215-224.

Escobar MA, Dandekar AM (2003) *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. Trends Plant. Sci. 8 (8), 380-386.

Gresshoff PM, Skotnicki ML, Rolff BG (1979) Crown gall teratoma formation is plasmid and plant controlled. J. Bacteriol. 137, 1020-1021.

Hart DA (1980) Lectins in biological systems: applications to microbiology. Am. J. Clin. Nutr. 33, 2416-2425.

Hernándeza P, Tetaert D, Vergoten G, Debray H, Jimenez MC, Alvarez G, Agundis C, Degand P, Zenteno E (2004) Specificity of *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin for O-glycopeptides. Biochim. Biophys. Acta 1674, 282– 290.

Jespersen HM, Kjaersgard VH, Østergaard L, Welinder KG (1997) From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. Biochem. J. 326, 305-310.

Kaji H, Saito H, Yamauchi Y, Shinkawa T, Taoka M, Hirabayashi J (2003) Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify *N*-linked glycoproteins. Nature Biotechnol. 21, 667–672.

Kilcoyne M, Shah M, Gerlach JQ Bhavanandan V, Nagaraj V, Amy D. Smith AD, Fujiyama K, Sommer U, Costello CE, Olszewski N, Joshi L (2008) O-glycosylation of protein subpopulations in alcohol-extracted rice proteins. doi:10.1016/j.jplph.2008.05.007.

Ko K, Ahn MH, Song M, Choo YK, Kim HS, Ko K, Joung H (2008) Glyco-engineering of biotherapeutic proteins in plants. Mol. Cells 25, 494-503.

Krsnik-Rasol M (1991) Peroxidase as a developmental marker in plant tissue culture. Int. J. Dev. Biol. 35, 259–263.

Kuta DD, Tripathi L (2005) *Agrobacterium*-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. Afr. J. Biotechnol. 4 (8), 752-757.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fischette-Lainé AC, Gomord V, Faye L (1998) N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. Plant Mol. Biol. 38, 31-48.

Matsuoka, K (2003) Protein modification in the Golgi apparatus. Ann. Plant Rev. 9, 102-113.

Monzo A, Bonn GK, Guttman A (2007) Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. Trends Analyt. Chem. 26, 423-432.

Munné-Bosch S, Alegre L (2001) Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. Plant Physiol. 125, 1094–1102.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22, 867–880.

Navazio L, Baldan B, Mariani P, Gerwig GJ, Vliegenthart JFG (1996) Primary structure of the N-linked carbohydrate chains of Calreticulin from spinach leaves. Glycoconj. J. 13, 977-983.

Nguyen Van P, Peter F, Söling HD (1989) Four intracisternal calcium-binding glycoproteins from rat liver microsomes with high affinity for calcium. J. Biol. Chem. 264, 17494-17501.

Oxley D, Munro SLA, Craik DJ, Bacic A (1996) Structure of N-glycans on the S3- and S6-allele stylar self-incompatibility ribonucleases of *Nicotiana alata.* Glycobiology 6, 611-618.

Park OK (2003) Proteomic studies in plants. J. Biochem. Mol. Biol. 37, 133-138.

Peškan T, Čurković-Perica M, Krsnik-Rasol M (1996) Biochemical characterization of horse-radish tumour and teratoma tissues. Plant Physiol. Biochem. 34, 385–391.

Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208-212.

Ro DK, Ehlting J, Douglas CJ (2002) Cloning, functional epression, and subcellular localization of multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from hybrid poplar. Plant Physiol. 130, 1837-1851.

Roe S (2001) Protein purification applications. Oxford University Press, Oxford.

Saint-Jore-Dupas C, Nebenführ A, Boulaflous A, Follet-Gueye ML, Plasson C, Hawes C, Driouich A, Faye L, Gomord V (2006) Plant N-glycan processing enzymes employ different targeting mechanisms for their spatial arrangement along the secretory pathway. The Plant Cell 18, 3182-3200.

Sarowar S, Kim EN, Kim YJ, Ok SH, Kim KD, Hwang BK, Shin JS (2005) Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens. Plant Science 169, 55-63.

Séveno M, Bardor M, Paccalet T, Gomord V, Lerouge P, Faye L (2004) Glycoprotein sialylation in plants? Nat. Biotechnol. 22, 1351-1352.

Shimizu M, Igasaki T, Yamada M, Yuasa K, Hasegawa J, Kato T, Tsukagoshi H, Nakamura K, Fukuda H, Matsuoka K (2005) Experimental determination of proline hydroxylation and hydroxyproline arabinogalactosylation motifs in secretory proteins. Plant J. 42, 877-889.

Shah MM, Fujiyama K, Flynn CR, Joshi L (2003) Sialylated endogenous glycoconjugates in plant cells. Nat. Biotechnol. 21, 1470-1471.

Wilson IBH (2002) Glycosylation of proteins in plants and invertebrates. Curr. Opin. Struct. Biol. 12, 569-577.

Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochem. J. 322, 681-692.