

Novo otkiveni i stresom inducirani proteini ASR u kulturi tkiva kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff.

Tudić, Antonio

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:535146>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Antonio Tudić

**Novo otkriveni i stresom inducirani proteini ASR u kulturi
tkiva kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff.**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biljnu proteomiku pod vodstvom doc. dr. sc. Petre Peharec Štefanić i u Laboratoriju za molekularnu genetiku uz stručnu pomoć dr. sc. Kristine Majsec na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te u Laboratoriju Centra za proteomiku i spektrometriju masa Instituta Ruđer Bošković uz stručnu pomoć izv. prof. dr. sc. Maria Cindrića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

Od srca se zahvaljujem doc. dr. sc. Petri Peharec Štefanić na stručnom vodstvu, strpljenju, pruženom znanju te svom uloženom trudu i vremenu.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Mariju Cindriću i dr. sc. Kristini Majsec na konstruktivnim kritikama, za pruženo znanje i iskustvo.

Također, zahvaljujem se kolegama i kolegicama Laboratorija za biljnu proteomiku, Laboratorija za molekularnu genetiku na Zavodu za molekularnu biologiju i Centra za proteomiku i spektrometriju masa Instituta Ruđer Bošković na svim pruženim savjetima i ugodnom vremenu provedenom u laboratoriju.

*Hvala i svim mojim prijateljima s kojima su godine studiranja bile "šaka suza, vrića smija".
Posebno hvala mojoj djevojci na podršci i strpljenju.*

Najviše se zahvaljujem obitelji, a pogotovo roditeljima, bez čije podrške i ljubavi ne bih bio tu gdje jesam.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Novo otkriveni i stresom inducirani proteini ASR u kulturi tkiva kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff.

Antonio Tudić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Proteini inducirani apscizinskom kiselinom, stresom i dozrijevanjem (ASR) su specifični za biljke, imaju malu molekulsku masu i stabilni su pri povišenoj temperaturi zbog izražene hidrofilnosti. Pronađeni su u jezgri i citoplazmi, što upućuje na to da se radi o transkripcijskim faktorima i šaperonima. Osim u odgovoru na sušu i salinitet, uključeni su u regulaciju metabolizma šećera, aminokiselina s razgranatim bočnim lancima i stanične stijenke. Proteini ASR nisu prisutni u svim biljkama, primjerice, geni *ASR* nisu pronađeni u modelnom organizmu *Arabidopsis thaliana*. Također, proteini slični proteinu ASR nisu poznati za porodicu kaktusa, koju karakterizira visoka učinkovitost korištenja vode i otpornost na sušu. Ovim istraživanjem dokazano je, po prvi put, postojanje proteina sličnih proteinu ASR pročišćavanjem afinitetnom kromatografijom, razdvajanjem proteina jedno- i dvodimenzionalnom SDS-PAG elektroforezom te *de novo* sekvenciranjem peptida spektrometrijom masa. Prijenosom proteina na membranu i detekcijom specifičnim α ASR1 antitijelom, uočena je promjena ekspresije proteina sličnog proteinu ASR u tkivima kaktusa (izdanak, kalus, tumor) pod utjecajem solnog i osmotskog stresa. Pokazano je da solni stres dovodi do veće ekspresije proteina sličnog proteinu ASR u odnosu na osmotski stres. Umnažanjem cDNA degeneriranim početnicama te molekularnim kloniranjem identificirana je parcijalna cDNA gena sličnog genu *ASR* koja odgovara konzerviranim motivima 1 i 2 proteina ASR.

(82 stranice, 21 slika, 17 tablica, 75 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: ASR proteini, Cactaceae, Ni-NTA agaroz, 2D elektroforeza, *de novo* sekvenciranje peptida, abiotički stres, parcijalna cDNA

Voditelj: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Neposredni voditelj: Dr. sc. Kristina Majsec

Ocjenitelji: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv. prof.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Rad prihvaćen: 13.2.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Newly detected and stress-induced ASR proteins in cactus tissue culture ***Mammillaria gracilis* Pfeiff.**

Antonio Tudić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Abscisic acid-, stress-, and ripening- induced (ASR) proteins are plant specific, low molecular weight and heat-stable proteins that have pronounced hydrophilicity. They were found in the nucleus and cytoplasm, indicating their transcription factor and chaperon-like activities. They are involved not only in plant drought and salinity tolerance, but also in regulation of sugar, branched amino acids and cell wall metabolism. ASR proteins are not present in all plant species, for instance, ASR genes are not found in model organism *Arabidopsis thaliana*. Also, ASR-like proteins are not known for Cactaceae family, characterised by high water efficiency and drought tolerance. This research has proven, for the first time, presence of ASR-like proteins by means of affinity chromatography purification, one- and two-dimensional SDS-PAGE proteins separation and mass spectrometry *de novo* peptide sequencing. Using western blot and specific α ASR1 antibody, changes in expression profiles of ASR-like proteins in cacti tissues (shoot, callus, tumor) affected by salt and osmotic stress was noticed. It was shown that salt stress leads to higher expression of ASR-like protein compared to the osmotic stress. cDNA amplification with degenerate primers and molecular cloning was used for identification of partial cDNA ASR-like gene corresponding to conserved motifs 1 and 2 of ASR protein.

(82 pages, 21 figures, 17 tables, 75 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: ASR proteins, Cactaceae, Ni-NTA agarose, 2D electrophoresis, *de novo* peptide sequencing, abiotic stress, partial cDNA

Supervisor: Dr. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.

Assistant Supervisor: Dr. Kristina Majsec

Reviewers: Dr. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.

Dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Thesis accepted: February 13th, 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Protein ASR.....	2
1.1.1. Prisutnost gena <i>ASR</i> u biljnim vrstama	2
1.1.2. Proteinska struktura.....	4
1.1.3. Substancična lokalizacija	6
1.1.4. Ekspresija u tkivu i uloga u metabolizmu	7
1.2. Abiotički stres kod biljaka.....	8
1.3. Utjecaj solnog i osmotskog stresa na ekspresiju gena <i>ASR</i> i njegovog produkta.....	9
1.4. Kaktus <i>Mammillaria gracilis</i> Pfeiff.	10
1.5. Spektrometrija masa.....	12
1.5.1. Sekvenciranje peptida i proteina <i>de novo</i>	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	14
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Materijal	17
3.1.1. Biljni materijal.....	17
3.2. Metode.....	19
3.2.1. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina tumorskog tkiva	19
3.2.2. Pročišćavanje ukupnih topivih proteina tumora pomoću Ni-NTA agarozne kolone	19
3.2.3. Ekstrakcija kiselih proteina normalnog izdanka, kalusa i tumora.....	20
3.2.4. Određivanje koncentracije proteina.....	21
3.2.5. Denaturacija uzoraka i razdvajanje proteina jednodimenzionalnom SDS-PAG elektroforezom	22
3.2.6. Razdvajanje proteina dvodimenzionalnom SDS-PAG elektroforezom.....	23
3.2.6.1. Prva dimenzija - izoelektrično fokusiranje.....	23
3.2.6.2. Druga dimenzija – SDS-PAGE	24

3.2.7. Vizualizacija razdvojenih proteina bojom <i>Coomassie Brilliant Blue</i> (CBB)	24
3.2.8. Prijenos proteina na membranu	25
3.2.9. Vizualizacija razdvojenih proteina na membrani kemiluminiscencijom	25
3.2.10. Spektrometrija masa MALDI-TOF/TOF	26
3.2.10.1. Digestija proteina u gelu	26
3.2.10.2. Izolacija peptida iz gela	27
3.2.10.3. Pročišćavanje peptida tehnikom ZipTip C ₁₈	28
3.2.10.4. Derivatizacija peptida uz kemijski potpomognutu fragmentaciju.....	28
3.2.10.5. Analiza peptida spektrometrom masa	29
3.2.10.6. Identifikacija proteina <i>de novo</i> sekvenciranjem	30
3.2.11. Izolacija ukupne RNA	32
3.2.12. Razdvajanje DNA elektroforezom na agaroznom gelu.....	33
3.2.13. Reverzna transkripcija na kalupu RNA.....	33
3.2.14. Umnažanje fragmenta DNA	34
3.2.14.1. Kontrolne reakcije PCR	34
3.2.14.2. Reakcije PCR sa degeneriranim početnicama.....	35
3.2.15. Izolacija umnoženih fragmenata iz gela.....	36
3.2.16. Kloniranje umnoženog fragmenta u vektorski plazmid	36
3.2.17. Transformacija bakterijskih stanica	37
3.2.18. Izolacija plazmida i sekvenciranje	38
4. REZULTATI.....	40
4.1. Pročišćavanje, razdvajanje i detekcija proteina sličnog proteinu ASR.....	41
4.1.1. Razdvajanje kiselih proteina 1D SDS-PAG elektroforezom i detekcija na membrani.....	41
4.1.2. Razdvajanje topivih proteina pročišćenih pomoću Ni-NTA agarozne kolone 1D SDS-PAG elektroforezom i detekcija na membrani	42
4.1.3. Razdvajanje kiselih proteina 2D SDS-PAG elektroforezom i detekcija na membrani.....	44

4.1.4. Identifikacija proteina spektrometrijom masa.....	46
4.2. Utjecaj solnog i osmotskog stresa na ekspresiju proteina sličnog proteinu ASR	53
4.3. Identifikacija parcijalne cDNA gena sličnog genu <i>ASR</i>	56
4.3.1. Dizajniranje degeneriranih početnica	56
4.3.2. Izolacija ukupne RNA kaktusa i provjera kvalitete dobivene cDNA	59
4.3.3. Reakcije PCR sa degeneriranim početnicama.....	61
4.3.4. Sekvenciranje parcijalne cDNA	62
5. RASPRAVA.....	64
6. ZAKLJUČAK	72
7. LITERATURA.....	74

POPIS KRATICA

1DE	jednodimenzionalna elektroforeza
2DE	dvodimenzionalna elektroforeza
AA	akrilamid
ABA	apscizinska kiselina
ABA/WDS	engl. <i>Abscisic acid/water-deficit sequence</i>
AGE	agarozna gel elektroforeza
APS	amonijev peroksodisulfat
ASR	apscizinskom kiselinom, stresom i dozrijevanjem inducirani proteini
Bis	N,N'-metilen-bis-akrilamid
CAF	kemijski potpomognuta fragmentacija
CAM	engl. <i>crassulacean acid metabolism</i>
CBB	<i>Comassie Brilliant Blue</i>
cDNA	komplementarna DNA
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonijev]-2-hidroksi-1-propansulfonat
CHCA	α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina
deH ₂ O	destilirana voda
dNTP	deoksiribonukleotidi
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EtOH	etanol
IAA	jodacetamid
IDP	nativno neuređeni proteini
IEF	izoelektrično fokusiranje
IgG-HRP	antitijelo konjugirano s peroksidazom iz hrena
IPTG	izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid
LEA	engl. <i>late embryogenesis abundant proteins</i>
m/z	omjer mase i naboja
MALDI	matricom potpomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem
MS	spektrometrija masa
MS/MS	tandemska spektrometrija masa
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ni-NTA	nikal-nitriloacetatna kiselina
NLS	jezgrin lokacijski signal

NTC	engl. <i>no template control</i>
PAGE	poliakrilamid gel elektroforeza
PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	lančana reakcija polimerazom
PEG	polietilen glikol
reH ₂ O	redestilirana voda
SDS	natrij dodecil sulfat
TAE	Tris-acetat-EDTA
TBS	engl. <i>Tris-Buffered Saline</i>
TCA	triklor octena kiselina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TFA	trifluor octena kiselina
TOF	vrijeme leta
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
Tween	polietilen glikol sorbitan monolaurat
UV	ultraljubičasto zračenje
αASR1	antitijelo za protein ASR1

1. UVOD

1.1. Protein ASR

Apscizinskom kiselinom, stresom i dozrijevanjem inducirani (ASR) proteini su specifični za biljke, male molekulske mase i temperaturno stabilni zbog svoje izražene hidrofilitnosti (Hu i sur. 2013). Proteini ASR ne sadrže nikakve prepoznatljive proteinske potpise koji bi mogli ukazati na njihovu biološku funkciju i time precizna fiziološka funkcija proteina ASR ostaje nepoznata (Kalifa i sur. 2004a; Hu i sur. 2013). Geni *ASR* kodiraju visoko nabijene proteine grupirane u skupinu hidrofilina, poznatih kao LEA (engl. *late embryogenesis abundant*) proteini koji su uključeni u adaptaciju biljke na manjak vode (Battaglia i sur. 2008).

1.1.1. Prisutnost gena *ASR* u biljnim vrstama

Prvi član navedene porodice gena, *ASR1*, otkriven je u rajčici (*Solanum lycopersicum*) pretraživanjem zbirke komplementarne DNA (cDNA) te usporedbom sa cDNA listova biljaka koje su izložene stresnim uvjetima. Proteini ASR su također po prvi puta zabilježeni u rajčici gdje su bili uključeni u prilagodbu na suhe klimatske uvjete (Iusem i sur., 1993). Genska obitelj *ASR* iz rajčice sastoji se od 5 gena prisutnih u jednom klasteru na kromosomu 4. Ovi geni kodiraju visoko homologne proteine i sadrže jedan intron različite duljine, ali konzervirane pozicije. Četiri gena (*ASR1*, *ASR2*, *ASR3* i *ASR5*) kodiraju proteine male molekulske mase (~110 aminokiselina svaki), dok je polipeptid *ASR4* približno trostruko veći (297 aminokiselina). Najbolje istražen član obitelji *ASR* u rajčici je protein *ASR1*, nakon kojeg slijedi protein *ASR2*, dok su informacije o proteinima *ASR3*, *ASR4* i *ASR5* vrlo oskudne. Većina biljnih gena *ASR* kodira proteine male molekulske mase, međutim genomi velikog broja biljnih vrsta dodatno sadrže gen koji kodira za veće polipeptide *ASR* (Golan i sur. 2014). Do danas je identificirano nekoliko ortologa i paraloga gena *ASR* u različitim vrstama dvosupnica i jednosupnica, kao i kod golosjemenjača poput bora (*Pinus taeda*) i ginka (*Ginkgo biloba*) (Frankel i sur. 2006; Battaglia i sur. 2008; González i Iusem 2014). Ipak, geni *ASR* nisu pronađeni u uročnjaku (*Arabidopsis thaliana*), biljci često korištenoj kao modelni organizam, kao ni u drugim vrstama obitelji Brassicaceae što sugerira da proteini *ASR* nisu prisutni u svim biljnim vrstama (Golan i sur. 2014). Zanimljivo je što proteini *ASR* nisu pronađeni u biljci uročnjak, iako sadrži mnoge proteine LEA i srodne proteine RAB (engl. *responsive to Abscisic acid*) te proteine DHN (dehidrini). Opisan je velik broj proteina *ASR* u različitim biljnim vrstama i poznato je da variraju u molekulskoj masi (od 70 do 230

aminokiselina), u izoelektričnoj točki pI (od bazične prema kiseloj), u specifičnosti za tkivo ili organ i u regulaciji ekspresije (Čakir i sur. 2003).

Tablica 1. Zastupljenost konzerviranih motiva (1, 2, 3, 4 i 5) proteina ASR u biljnim vrstama (prilagođeno prema Battaglia i sur. 2008)

Pristupni broj	Vrste	Motiv				
		5	2	1	3	4
Golosjemenjače						
gi 27917236	<i>Cycas rumphii</i>	■	■	■	■	■
gi 38532363	<i>Ginkgo biloba</i>	■	■	■	■	■
gi 1401226	<i>Pinus taeda</i>		■	■	■	
gi 1401234	<i>Pinus taeda</i>		■	■	■	
gi 56481741	<i>Pseudotsuga menziesii</i> var. <i>menziesii</i>		■	■	■	
gi 56481743	<i>Pseudotsuga menziesii</i> var. <i>menziesii</i>		■	■	■	
gi 57908273	<i>Pinus taeda</i>		■	■		
gi 57908277	<i>Pinus taeda</i>		■	■		
gi 56481723	<i>Pseudotsuga menziesii</i> var. <i>menziesii</i>		■	■		
Kritosjemenjače						
Dvosupnice						
gi 11994861	<i>Calystegia soldanella</i>	■	■	■	■	■
gi 25037206	<i>Capsicum annuum</i>		■	■	■	
gi 119329343	<i>Coffea canephora</i>	■	■	■	■	■
gi 103480838	<i>Eucalyptus gunnii</i>	■	■	■	■	■
gi 38679405	<i>Glycine max</i>	■	■	■	■	■
gi 37901078	<i>Hevea brasiliensis</i>	■	■	■	■	■
gi 124484381	<i>Ipomoea nil</i>		■	■	■	■
gi 68500144	<i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i> ASR1	■	■	■	■	■
gi 32395661	<i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i> ASR2		■	■	■	
gi 68500165	<i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i> ASR3	■	■	■	■	■
gi 68500714	<i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i> ASR4		■	■	■	■
gi 157977459	<i>Medicago sativa</i>	■	■	■	■	■
gi 3064035	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	■	■	■	■	■
gi 47575681	<i>Musa acuminata</i>	■	■	■	■	■
gi 92040340	<i>Nicotiana tabacum</i>	■	■	■	■	■
gi 52534204	<i>Populus trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i>	■	■	■	■	■
gi 2677824	<i>Prunus armeniaca</i>	■	■	■	■	■
gi 16588758	<i>Prunus persica</i>	■	■	■	■	■
gi 33833428	<i>Rosa hybrid</i> cultivar	■	■	■	■	■
gi 110237281	<i>Salicornia brachiata</i>		■	■	■	■
gi 23095773	<i>Solanum tuberosum</i>		■	■	■	■
gi 81075517	<i>Solanum tuberosum</i>	■	■	■	■	■
gi 86156026	<i>Vitis pseudoreticulata</i>	■	■	■	■	■
gi 14582465	<i>Vitis vinifera</i>	■	■	■	■	■
gi 157352512	<i>Vitis vinifera</i>	■	■	■	■	■
Jednosupnice						
gi 6525055	<i>Lilium longiflorum</i>	■	■	■	■	■
gi 15667623	<i>Saccharum officinarum</i>	■	■	■	■	■
gi 116309406	<i>Oryza sativa</i> (<i>indica</i> cultivar-group)		■	■	■	■
gi 125548308	<i>Oryza sativa</i> (<i>indica</i> cultivar-group)		■	■	■	■
gi 115442359	<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i> cultivar-group)	■	■	■	■	■
gi 115442415	<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i> cultivar-group)		■	■	■	■
gi 115446583	<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i> cultivar-group)	■	■	■	■	■
gi 115458392	<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i> cultivar-group)		2X	■	■	■
gi 115484359	<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i> cultivar-group)		■	■	■	■
gi 38605916	<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i> cultivar-group)		■	■	■	■
gi 57900285	<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i> cultivar-group)		■	■	■	■
gi 148497450	<i>Polygonatum sibiricum</i>		■	■	■	■
gi 25204886	<i>Triticum aestivum</i>	■	■	■	■	■
gi 12083739	<i>Zea mays</i>		■	■	■	■
gi 87115299	<i>Zingiber officinale</i>	■	■	■	■	■

1.1.2. Proteinska struktura

Rajčica je vrsta u kojoj su proteini ASR najbolje istraženi na strukturnoj razini. Naime, ASR1 iz rajčice je polipeptid molekulske mase od 13 kDa u kojem su vrlo zastupljene nabijene aminokiseline poput lizina (17%), histidina (15%), glutamata (15%), alanina (13%) i glicina (7%) (González i Iusem 2014). Svi poznati proteini ASR posjeduju tri vrlo konzervirane regije (motivi 1, 2 i 3) i dvije manje konzervirane regije (motivi 4 i 5) (Tablica 1 i 2).

Tablica 2. Aminokiselinske sekvence konzerviranih motiva (1, 2, 3, 4 i 5) proteina ASR (prilagođeno prema Battaglia i sur. 2008)

MOTIV	KONZERVIRANA SEKVENCA
1	A A G A Y A L H E K H K A K K D P E H A H R H K I F E
2	E I A A A A A V G A G G F A F H E H H E K K E A K V V A S Y V Y Q D D H
3	D Y K K E E K H H K H M E H L G E L G A V K R L Q Q I M T M
4	H H H H H L F H H H K D W F R K Q Q
5	E E E E E A H G K K H H L F K D Q H E F

Aminokiseline su označene različitim bojama. Nepolarne aminokiseline: ljubičasta = alifatske, siva = aromatske; Polarne aminokiseline: zelena = nenabijene, plava = pozitivno nabijene; crvena = negativno nabijene.

Jedan od motiva (motiv 3) nalazi se unutar C-terminalne regije i sadrži jezgrin lokalizacijski signal (NLS, engl. *nuclear localization signal*) (Battaglia i sur. 2008). Većina proteina ASR ima bipartitni NLS s lizinom i argininom kao najzastupljenijim aminokiselinama, npr. SbASR-1 iz caklenjače (*Salicornia brachiata*) i LLA23 iz ljiljana (*Lilium longiflorum*), dok proteini ASR1 iz obitelji Solanaceae imaju monopartitni NLS. Osim NLS-a, C-terminalna regija sadrži još dvije konzervirane domene: cink (Zn^{2+})-ovisnu DNA-veznu domenu i domenu bogatu hidrofobnim aminokiselinama koja sprječava vezanje za DNA (Jha i sur. 2012). Unutar C-terminalne regije nalazimo i dvije regije bogate alaninom, mjesto za N-miristoilaciju i ABA/WDS (engl. *Abscisic acid/water-deficit*) domenu koja je karakteristična za stresne proteine (Hu i sur. 2013; Luo i sur. 2014; Zhang i sur. 2014).

Druga dva motiva (motiv 1 i 2), koja se nalaze na N-terminalnom kraju, obiluju histidinskim ostacima i čine Zn^{2+} -veznu domenu sposobnu za vezanje atoma cinka, te imaju važnu ulogu u Zn^{2+} -ovisnom vezanju za DNA. Poznato je da takav linearni slijed histidinskih ostataka ima visoki afinitet za metalne ione poput nikla (Ni^{2+}) i cinka (Zn^{2+}), koji se mogu iskoristiti za pročišćavanje proteina ASR pomoću Ni-NTA (nikal-nitriloacetatna kiselina) agaroznih kolona (Kalifa 2004b; Battaglia i sur. 2008; González i Iusem 2014). Nakon vezanja cinkovih iona, proteini ASR prelaze u uređeniju strukturu s mogućnošću formiranja homodimera, te postaju manje osjetljivi na proteolizu (Goldgur i sur. 2007; Rom i sur. 2006; Dai i sur. 2011).

Iako nema preciznih informacija o sekundarnoj strukturi proteina ASR, postoje predikcije da se radi o α -helikalnoj strukturi s povećanom dostupnosti molekulama vode (Vaidyanathan i sur. 1999; Cakir i sur. 2003). Bioinformatičke analize i rezultati cirkularnog dikroizma (CD) potvrdili su da protein ASR pripada velikoj obitelji poznatoj kao nativno neuređeni proteini (IDP, engl. *intrinsically disordered proteins*), kojima nedostaje stabilna trodimenzionalna struktura (Dai i sur. 2011). U prosjeku 30 % svih eukariotskih proteina je potpuno ili djelomično neuređeno. Zbog njihove fleksibilnosti i hidrofilitnosti, IDP mogu djelovati kao molekularni šaperoni koji mijenjaju svojstva otapala unutar stanica zahvaćenih vodnim stresom i stabiliziraju makromolekule zadržavajući pritom vodu unutar biljne stanice. Također, sudjeluju u transkripcijskoj regulaciji ostalih gena u odgovoru na stresne uvjete (Dai i sur. 2011; Jha i sur. 2012). Protein ASR1 prelazi u smotano stanje nakon vezanja Zn^{2+} iona, koji induciraju njegov prijelaz iz monomernog u dimerni oblik uz stvaranje unakrsnih veza. Ovu tezu potvrđuje i njegova visoka osjetljivost na proteaze, koja proizlazi iz njegovog nesmatanja u nativnim uvjetima i smanjuje se nakon vezanja Zn^{2+} iona. Također, kada je u kompleksu sa Zn^{2+} , ASR1 pokazuje stupanj denaturacije nakon $76^{\circ}C$ (dokaz strukturne uređenosti), dok u odsutnosti Zn^{2+} nisu vidljive nikakve promjene u fazi što upućuje na nedostatak konformacije (Goldgur i sur. 2006).

1.1.3. Substancična lokalizacija

Protein ASR1 iz rajčice posjeduje dualnu substancičnu lokalizaciju. Naime, nalazi se u citosolu kao IDP, te u jezgri kao strukturirani homodimer ili monomer koji se može vezati na DNA u prisustvu Zn^{2+} (Kalifa i sur. 2004b; Goldgur i sur. 2006), što upućuje na njegovu ulogu transkripcijskog faktora (Cakir i sur. 2003; Kalifa i sur. 2004b; Yang i sur. 2005). Pokazano je da proteini molekulske mase do 40-60 kDa mogu pasivno difundirati kroz jezgrine pore niz koncentracijski gradijent. Iako ASR1 bez problema prolazi kroz jezgrine pore, zahvaljujući svojoj veličini, on ipak sadrži NLS blizu svog C-kraja (Kalifa i sur. 2004a). Obitelj proteina ASR regulira gene za heksozne transportere i gene inducirane apscizinskom kiselinom (ABA) (Jha i sur. 2012). Ortolog iz vinove loze (*Vitis vinifera*), VvMSA, je kromosomski nehistski protein koji se kao transkripcijski faktor veže za pojačivač gena za transporter šećera (VvHT1) i stvara heterodimere s drugim faktorima kao što je DREB (engl. *dehydration-responsive element binding*) transkripcijski faktor (Saumonneau i sur. 2008). Dokazano je da su ciljni geni proteina ASR1 oni koji kodiraju proteine uključene u transport vode, kao što su akvaporini, i proteine uključene u sintezu stanične stijenke, naročito celuloza sintaza i glukanaza (Ricardi i sur. 2014). Također, ciljni geni proteina ASR5 u riži (*Oryza sativa*) povezani su sa tolerancijom na aluminij, primjerice ABC transporter STAR1 (Arenhart i sur. 2013).

Neuređena struktura proteina ASR1 u citosolu i njegova izražena hidrofilnost, omogućila mu je šaperonsko djelovanje, odnosno mogućnost stabiliziranja određenog broja proteina od denaturacije uslijed djelovanja topline, ciklusa zaleđivanja i topljenja, te abiotičkog stresa (Konrad i sur. 2008; Philippe i sur. 2010; Dai i sur. 2011). Istraživanja su pokazala da je u prosjeku trećina eksprimiranog proteina ASR1 lokalizirano u jezgri, dok ostatak nalazimo u citosolu. Nadalje, izlaganje solnom stresu ne mijenja substancičnu raspodjelu proteina (Kalifa i sur. 2004a). Dualna substancična lokalizacija također je potvrđena i za proteine ASR mnogih vrsta, među ostalima i u polenu ljiljana, dok je protein OsASR1 u riži pokazao šaperonsko djelovanje (Golan i sur. 2014).

1.1.4. Ekspresija u tkivu i uloga u metabolizmu

Uzorak ekspresije gena *ASR* varira između različitih biljnih vrsta. Transkripti gena se nakupljaju za vrijeme biljnog razvoja, senescencije, zriobe plodova i/ili sazrijevanja peluda i sjemenki. Također, proteini *ASR* su uključeni u odgovor na uvjete abiotičkog stresa, kao što su suša, salinitet, hladnoća, osmotski stres, ograničeno svjetlo i ranjavanje tkiva, te biotičkog stresa (Cakir i sur. 2003; Chen i sur. 2011; Henry i sur. 2011; Jha i sur. 2012; Luo i sur. 2014). Kao što se može zaključiti iz njihovog naziva, ekspresija gena *ASR* može se potaknuti apscizinskom kiselinom (Battaglia i sur. 2008). Postoji dokaz da su regulirani i šećerima, iako to nije potvrđeno za sve proteine *ASR* (Carrari i sur. 2004).

Specifičnost ekspresije u organima i tkivima također se razlikuje od vrste do vrste. Dokazano je da su geni *ASR1* (ekspimiran u svim biljnim tkivima) i *ASR4* (ekspresija ograničena na fotosintetske organe i prašnike) jako ekspimirani u vegetativnim tkivima rajčice u uvjetima koji nisu stresni, dok su razine ekspresije *ASR2* i *ASR3/5* dva do tri puta manje (Golan i sur. 2014). Transkripti gena *ASR* uočeni su u plodovima rajčice, dinje (*Cucumis melo*), pomela (*Citrus maxima*), marelice (*Prunus armeniaca*) i vinove loze, u gomoljima krumpira (*Solanum tuberosum*), u korijenju riže, rajčice i bora, u listovima i stabljikama rajčice, riže i kukuruza (*Zea mays*), u polenu ljiljana i u sjemenkama rajčice (Amitai-Zeigerson i sur. 1994; Canel i sur. 1995; Riccardi i sur. 1998; Wang i sur. 1998; Hong i sur. 2002; Yang i sur. 2005; Battaglia i sur. 2008; Maskin i sur. 2008).

Proteini *ASR* uključeni su u regulaciju fotosinteze, respiracije, biosinteze razgranatih aminokiselina i metabolizma fitohormona i ugljikohidrata (signalizacija ugljikohidratima i transport šećera) (Virlouvet i sur. 2011; Golan i sur. 2014; Zhang i sur. 2014). Nadalje, predložen je i model transkripcijske regulacije gena *VvMSA* iz vinove loze u koju su uključeni heksokinaza 1 i SnRK1, što ukazuje na združeno djelovanje glukoze i signalnih puteva reguliranih apscizinskom kiselinom (Saumonneau i sur. 2012). Također, istraživanje koje su proveli Dominguez i suradnici (2013) pokazalo je da *ASR* nije samo uključen u signalizaciju šećerima, već je odgovoran za vezu između signalizacije hormonima (ABA ili giberelini) i šećerima u fotosintetski aktivnim listovima duhana (*Nicotiana tabacum*). Sva navedena istraživanja sugeriraju da protein *ASR* može imati regulatornu ulogu između primarnog metabolizma ugljikohidrata i signalizacije hormonima. Međutim, ostaje nejasno doprinose li navedeni biološki procesi povećanju tolerancije biljaka na stresne uvjete okoliša (Zhang i sur. 2014).

1.2. Abiotički stres kod biljaka

Zbog sesilnog načina života, biljke su svakodnevno izložene raznim abiotičkim vrstama stresa kao što su temperaturni ekstremi, radijacija, neoptimalne razine minerala i nedostatak vode (Kalifa i sur. 2004a; Dai i sur. 2011). Među njima salinitet i suša predstavljaju najvažnije ograničavajuće faktore koji utječu na biljni rast i razvoj, te produktivnost usjeva u svijetu. Biljke su razvile sposobnost prilagodbe kako bi preživjele stresne uvjete, u koje se ubraja i veliki broj fizioloških, biokemijskih i molekularnih promjena (Kalifa i sur. 2004a). Na molekularnoj razini, glavni odgovor biljaka na stres uključuje prepoznavanje stresnih podražaja i prijenos signala signalnim putevima koji aktiviraju brojne gene u odgovoru na stres (Luo i sur. 2014). Primjerice, izlaganje solnom i osmotskom stresu rezultira drastičnim promjenama u profilu ekspresije gena koji je pod kontrolom nekoliko staničnih puteva, od kojih su neki ovisni o apscizinskoj kiselini. Odgovor na solni stres reguliran na nivou gena, očituje se u gotovo svim aspektima biljnih funkcija i metabolizma, uključujući signalnu transdukciju, ionsku homeostazu, metabolizam ugljikohidrata i dušika, fotosintezu, rast i razvoj (Kalifa i sur. 2004a).

Salinitet i suša su okolišni stresni faktori koji su vrlo često usko povezani. Taloženjem soli u tlu stvara se zona niskog vodnog potencijala koji otežava biljkama primanje vode i hranjivih tvari iz okoliša. Stoga solni stres dovodi do gubitka vode u biljkama, odnosno poprima oblik fiziološke suše (Mahajan i Tuteja 2005). Obje vrste stresa dovode do osmotskog stresa koji rezultira dehidracijom stanica i osmotskom neravnotežom. Osim osmotskog učinka, salinitet izaziva i ionski stres zbog specifične toksičnosti iona. Zbog toga se fiziološki mehanizmi u odgovoru na salinitet i sušu mogu razlikovati između različitih biljnih vrsta (Erdei i sur. 1990; Lefèvre i sur. 2001).

Osim prijenosa signala induciranog abiotičkim stresom (Rock 2000; Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki 2000; Xiong i Zhu 2001), poseban interes fokusiran je na enzime uključene u sintezu osmolita (Hare i sur. 1998; Bohnert i Shen 1999) ili razgradnju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) koji se nakupljaju nakon izlaganja stresu (Bohnert i Sheveleva 1998), zaštitne proteine (Hasegawa i sur. 2000), proteine zadužene za ionsku homeostazu (Blumwald 2000) i kanale za vodu (Johansson i sur. 2000). Gotovo polovica gena reguliranih solnim stresom kodira za proteine kojima nije moguće predvidjeti ulogu iz njihove primarne strukture, te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se u cijelosti otkrila kompleksa mreža interakcija tih proteina (Aubourg i Rouze 2001; Bohnert i sur. 2001). Razumijevanje kako se

biljke prilagođavanju i reagiraju na kontinuirane promjene u okolišu na staničnoj i molekularnoj razini predstavlja preduvjet za stvaranje biljaka koje imaju povećanu toleranciju na solni i osmotski stres (Dos Reis i sur. 2012).

1.3. Utjecaj solnog i osmotskog stresa na ekspresiju gena *ASR* i njegovog produkta

Geni kojima se ekspresija mijenja u stresnim uvjetima okoliša, mogu se podijeliti u dvije grupe. Prvoj grupi pripadaju geni kojima ekspresija ostaje promijenjena sve dok su biljke pod stresom, dok drugoj grupi pripada *ASR*, odnosno geni čija je ekspresija prolazna (Amitai-Zeigerson i sur. 1995). Aktivnost gena *ASR* u odgovoru na okolišne faktore kao što su salinitet, suša i hladnoća većinom je proučavana RNA analizama (Hu i sur. 2013), dok nedostaju istraživanja ekspresije provedena na proteinskoj razini. Kako bi se simulirali uvjeti solnog ili osmotskog stresa, u istraživanjima se koriste tretmani u kojima su biljke izložene različitim koncentracijama soli (NaCl), odnosno polietilen glikola (PEG) ili manitola u određenom vremenskom periodu.

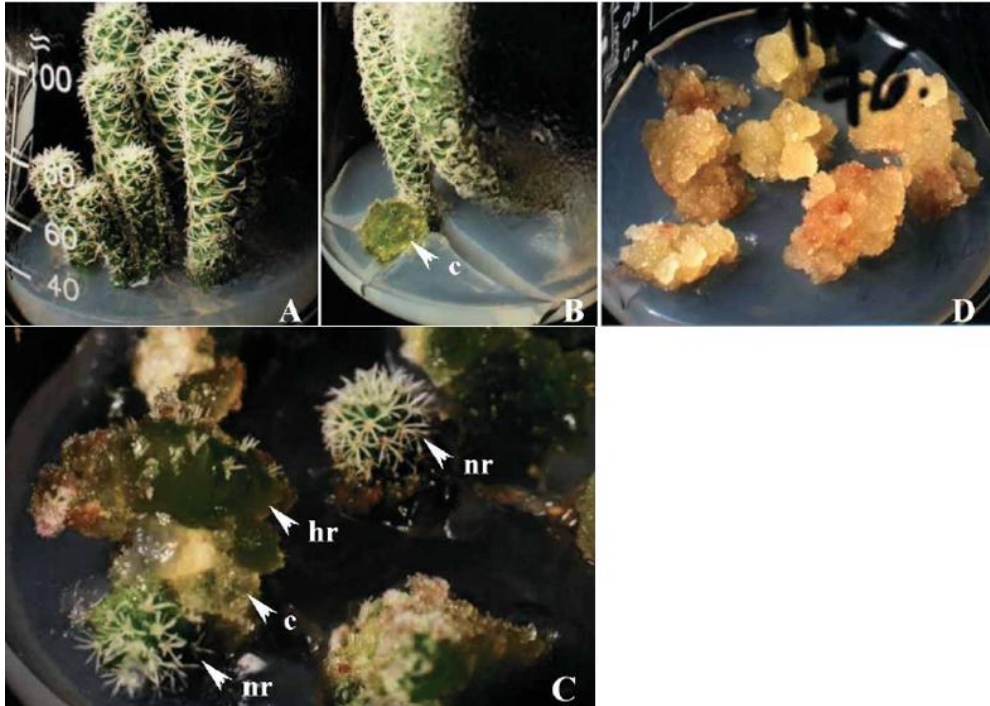
U listovima rajčice ubranim nakon 24 h izlaganja rajčice solnom ili osmotskom stresu, uočeno je povećanje razine *ASR1* i *ASR4* transkripata. S druge strane, manje eksprimirani geni *ASR2* i *ASR3/5* pokazali su manja povećanja u ekspresiji (Golan i sur. 2014). Amitai-Zeigerson i suradnici (1995) su također izvijestili da solni i osmotski stres uzrokuje prolazno povećanje ekspresije gena *ASR1* kojeg prati povećanje ekspresije proteina ASR1. Za razliku od navedenih rezultata, u plantana bananama (*Musa paradisiaca*) je primijećeno da promjena ekspresije ASR na genskoj i proteinskoj razini ne moraju uvijek korelirati (Dai i sur. 2011). Povećanje razine transkripata ortologa *ASR* uslijed djelovanja solnog i osmotskog stresa potvrđeno je i u mangu (*Mangifera indica*) (Luo i sur. 2014), caklenjači (Jha i sur. 2009), duhanu (Kalifa i sur. 2004a) i kukuruzu (Wang i sur. 2003) s najvećom izmjerenom ekspresijom 12-72 h nakon početka tretmana. Za razliku od njih, najveća izmjerena ekspresija *OsASR1* u riži (Vaidyanathan i sur. 1999; Kawasaki i sur. 2001) i *TaASR1* u pšenici (*Triticum aestivum*) (Hu i sur. 2013) uočen je već nakon 2-6 h tretmana. Međutim, poznato je da ne postoji zajednički uzorak ekspresije gena *ASR* u svim vrstama. Analize genske ekspresije pokazale su da je gen *MiASR* u mangu pozitivno i negativno reguliran solnim i osmotskim stresom u različitim vremenskim okvirima (Luo i sur. 2014). Postupan pad ekspresije *ASR* potvrđen je nakon 3-4 dana tretmana u nekoliko vrsta (Amitai-Zeigerson i sur. 1995; Vaidyanathan i sur. 1999; Jha i sur. 2009; Dai i sur. 2011; Luo i sur. 2014).

1.4. Kaktus *Mammillaria gracilis* Pfeiff.

Kaktusi se uzgajaju radi hrane, stočne hrane, kao ukrasne biljke, te u medicinske i terapijske svrhe. Uglavnom su zastupljeni u aridnim i semiaridnim područjima za koja su karakteristični dugi suhi periodi s kratkim kišnim razdobljima (Le Houréou 1996). Zbog ovakvih životnih uvjeta kaktusi, koji se ubrajaju u kserofite, razvili su posebne anatomske prilagodbe: njihovi su listovi potpuno reducirani u obliku bodlji koji nemaju sposobnost fotosinteze, imaju smanjenu propusnost epiderme, a stabljike su im građene od posebne vrste tkiva koja nakupljaju vodu za vrijeme kratkih kišnih razdoblja (zbog čega ih ubrajamo u stabljične sukulente) - sve radi optimizacije zadržavanja vode u tkivima i smanjivanja transpiracije (Balen i sur. 2002). Posebna fiziološka prilagodba kaktusa je CAM (engl. *crassulacean acid metabolism*) način fotosinteze. CAM biljke u velikoj su mjeri ovisne o noćnoj akumulaciji CO₂ potrebnog za fotosintezu jer su njihove puči zatvorene tijekom dana što sprječava gubitak vode (Malda i sur. 1999).

Biljke kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff. uzgajane *in vitro* u uvjetima kulture tkiva (Slika 2A), kao što su povišena relativna vlažnost i bogata hranjiva podloga, razvijaju obilan neorganizirani kalus (Slika 2B) bez dodataka ikakvih egzogenih regulatora rasta. Takav habituirani kalus, koji raste neovisno o dodavanju hormona rasta, spontano regenerira morfološki normalne izdanke i poluorganizirane hiperhidrirane izdanke s deformiranim i nepravilnim uzorkom bodlji (Slika 2C). Kako bi se dobilo potpuno dediferencirano tumorsko tkivo kaktusa koje se može uspoređivati s habituiranim i hiperhidriranim kalusom, stanice kaktusa se mogu transformirati bakterijom *Agrobacterium tumefaciens*. Za razliku od kalusa, tumorsko tkivo kaktusa (Slika 2D) inducirano pomoću *A. tumefaciens* ne pokazuje nikakav potencijal za organogenezu (Krsnik-Rasol i Balen 2001; Peharec i sur. 2010).

Kao kserofiti s CAM načinom fotosinteze, kaktuse karakterizira visoka učinkovitost korištenja vode i otpornost na sušu. S druge strane, kaktusi su osjetljivi na salinitet koji drastično inhibira rast većine vrsta kaktusa. Stoga je povećano zanimanje za istraživanje biokemijskih i fizioloških mehanizama koji bi mogli povećati otpornost kaktusa na salinitet (Balen i sur. 2013). Unatoč tome što su vrste kaktusa industrijski važne, proteomska istraživanja na vrstama kaktusa veoma su rijetka. Nadalje, radi se o vrsti čiji genom nije sekvenciran (Rogić i sur. 2015). Proteini slični proteinu ASR nisu poznati za porodicu kaktusa, koja bi mogla imati aktivne gene slične genu *ASR* kao odgovor na stresne uvjete prirodnog staništa.



Slika 1. *Mammillaria gracilis* u *in vitro* kulturi tkiva. A - biljka kaktus, B - spontano razvijeni habituirani kalus (c), C - normalni (nr) i hiperhidrirani (hr) regenerirani izdanci na kalusnom tkivu (c), D - tumorsko tkivo. Prilagođeno na temelju Balen i sur. 2002.

1.5. Spektrometrija masa

Napredak u istraživanju proteina postignut je razvojem tehnika ionizacije spojeva velikih molekulskih masa te korištenjem istih zajedno s metodama spektrometrije masa (MS, engl. *Mass Spectrometry*). Spektrometrija masa je analitička metoda kojom se pomoću određivanja mase peptida ili proteina omogućuje identifikacija istih, određivanje njihovog aminokiselinskog slijeda, identifikacija i određivanje položaja posttranslacijskih modifikacija, određivanje mutacija te provjera strukture i čistoće proteina dobivenih genetskim inženjeringom. Nadalje, MS se primjenjuje i u istraživanju različitih interakcija između proteina i iona metala, malih organskih molekula i različitih bioloških spojeva (Galić i Cindrić 2008).

Osnovni dijelovi spektrometra masa su ionski izvor, analizator masa i detektor. Analiza spektrometrijom masa započinje uvođenjem analita u ionski izvor gdje se događa ionizacija. Potom nastali ioni putuju u analizator masa gdje se razdvajaju prema njihovim omjerima mase i naboja (m/z , engl. *mass-to-charge ratio*), te u konačnici dolaze do detektora koji registrira broj iona pri svakoj vrijednosti m/z , što rezultira stvaranjem spektra masa. Mogućnosti izvedbe spektrometra masa, s obzirom na izbor ionizatora, analizatora i detektora, su mnogobrojne (Aebersold i Mann 2003).

Kod analize uzoraka tehnikama spektrometrije masa neophodno je prevođenje analita u plinovito stanje i njegova ionizacija. Za ionizaciju proteina i peptida najčešće se koriste desorpcijske metode ionizacije mekim ionskim izvorima i to matricom pomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem (MALDI, engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), te elektroraspršenje (ESI, engl. *Electrospray-ionization*). MALDI je blaga ionizacijska tehnika koja rezultira formiranjem jednostruko nabijenih iona što uvelike olakšava identifikaciju spektara. MALDI tehnika temelji se na desorpciji analita prethodno ugrađenog u kristalnu strukturu molekula matrice kojoj slijedi ionizacija nakon apsorpcije energije emitirane pulsnim visokoenergetskim laserom (dušikov, diodni ili IR laser). Kao matrica za analizu proteina i peptida najčešće se koristi α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (CHCA). Unutar desorbiranih klastera molekula matrice i molekula analita odvija se ionizacija analita prijenosom protona sa molekula matrice na molekule analita ili obrnuto (Dodig 2016). MALDI se najčešće povezuje s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta (TOF, engl. *Time of Flight*), zbog mogućnosti mjerenja velikog raspona m/z vrijednosti, te sinkronizacije rada sa pulsnim radom ionskog izvora. Tehnika MALDI-TOF može biti

unaprijeđena dodatkom još jednog analizatora masa, pa se tako ta tehnika naziva MALDI-TOF/TOF, a po brzini rada, točnosti mjerenih masa, kvaliteti MS/MS spektara i osjetljivosti instrumenata uveliko nadmašuje performanse klasičnog instrumenta MALDI-TOF (Galić i Cindrić 2008).

1.5.1. Sekvenciranje peptida i proteina *de novo*

Identifikacija proteina klasičnim visokofrekventnim pristupom baze podataka temelji se na uspoređivanju eksperimentalno dobivenih podataka s teorijski izračunatim masama u bazama podataka. Genomski slijed većine organizama je i dalje nepoznat, pa prema tome u bazama nisu zastupljeni podaci o odgovarajućim proteinima. Osim toga, ako i u bazama postoje podaci o poznatim proteinima različite modifikacije kao npr. posttranslacijske modifikacije, mogu onemogućiti identifikaciju dijela ili cijelog proteinskog aminokiselinskog slijeda. Zbog toga potpuno određivanje primarne strukture proteina zahtijeva određivanje aminokiselinskog slijeda s minimalnom uporabom baza podataka, odnosno *de novo* sekvenciranje peptida i proteina. Takvo određivanje temelji se na tandemnoj spektrometriji masa MS/MS, gdje se nakon prolaza kroz prvi TOF analizator odabrane čestice mogu dalje fragmentirati u kolizijskim ćelijama te propustiti kroz drugi TOF analizator koji određuje masu čestica ispisivanjem spektra MS/MS. Kako bi se olakšala interpretacija složenih spektara, peptidi se kemijski derivatiziraju prikladnim reagensima koji gotovo isključivo ili pretežno daju jednu seriju fragmentnih iona. Iz razlike u masama između konsektivnih signala određuje se slijed aminokiselina (Galić i Cindrić 2008).

Metode koje se temelje na razdvajanju proteina nekom od elektroforetskih tehnika i analizi spektrometriji masa, uspješno se koriste za vizualizaciju i identifikaciju proteina uključenih u odgovor biljaka na stres (Zivy i de Vienne 2000; Thiellement i sur. 2002).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Poznato je da geni *ASR* sudjeluju u transkripcijskom odgovoru na sušu i salinitet tako što neki od njih kodiraju komponente staničnih putova prijenosa signala uključenih u prilagodbu na solni i osmotski stres. Kaktusi, koje nalazimo u aridnim područjima, karakterizira visoka učinkovitost korištenja vode i otpornost na sušu. Proteini ASR, pronađeni u brojnim biljnim vrstama, nisu poznati za porodicu kaktusa koja bi mogla imati proteine slične proteinu ASR kao odgovor na stresne uvjete prirodnog staništa. Također, postavlja se i pitanje koliko paraloga gena sličnog genu *ASR* postoji u kaktusu, s obzirom da taj broj veoma varira među vrstama. Iako je kodirajuća sekvenca za ASR konzervirana, njegova se ekspresija nakon izlaganja osmotskom i solnom stresu razlikuje od vrste do vrste te između tkiva iste vrste. Stoga su ciljevi ovog istraživanja:

- istražiti tkiva (izdanak, kalus, tumor) vrste *M. gracilis*, koja su rasla u kulturi *in vitro*, kako bi otkrili da li se proteini slični proteinu ASR nalaze u vrstama porodice kaktusa
- razviti metode ekstrakcije, purifikacije, razdvajanja i detekcije proteina sličnih proteinu ASR u kulturi tkiva kaktusa
- ispitati utjecaj solnog i osmotskog stresa na proteine slične proteinu ASR nakon tretmana s NaCl i manitolom i usporediti dobivene rezultate normalnog izdanka te kalusnog i tumorskog tkiva kaktusa
- identificirati parcijalne cDNA gena sličnog genu *ASR* u kaktusu

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Biljni materijal

U ovom istraživanju korišteni su normalni izdanci (B), kalusno (K) i tumorsko (T) tkivo kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff. uzgojenog u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tkiva kaktusa uzgajana su na krutim hranjivim podlogama MS (Murashige i Skoog 1962) pH 5.8, u sterilnim Erlenmeyerovim tikvicama, bez dodataka regulatora rasta i uz dodavanje organskih dodataka (Tablica 3). Za pripremu krutih podloga u tekuću podlogu MS dodavali smo 0.8% (w/v) agara. Tkiva kaktusa presađivana su svaki mjesec u aseptičkim uvjetima u komori s horizontalnim strujanjem sterilnog zraka i uzgajana su u klima komori s fotoperiodom 16/8-h svjetlo/tama pod umjetnom rasvjetom fluorescentnih svjetiljki inteziteta $90 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na temperaturi od $24 \text{ }^\circ\text{C}$.

Za ekstrakciju i purifikaciju proteina sličnih proteinu ASR pomoću Ni-NTA kolone, detekciju proteina na membrani te izolaciju RNA korišteno je svježe tumorsko tkivo, uzgajano na krutoj MS podlozi.

Za ekstrakciju kiselih proteina, njihovo razdvajanje dvodimenzionalnom SDS-PAG elektroforezom, detekciju proteina na membrani te spektrometriju masa korišteni su normalni izdanci, kalusno i tumorsko tkivo kaktusa uzgajano na krutoj MS podlozi.

Utjecaj solnog i osmotskog stresa na protein sličan proteinu ASR proučavan je na normalnim izdancima, kalusnom i tumorskom tkivu kaktusa u tekućoj MS podlozi s dodatkom 250 mM NaCl ili 500 mM manitola u trajanju od 1, 4 i 7 dana. Kontrolni uzorci uzgajani su u tekućoj MS podlozi bez dodatka soli ili manitola.

Tablica 3. Sastav hranidbene podloge Murashige i Skoog, pH 5.9

MAKROELEMENTI	mg/L	mM
KNO ₃	1900	18.80
NH ₄ NO ₃	1650	20.60
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	2.99
KH ₂ PO ₄	170	1.25
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370	1.5
MIKROELEMENTI	mg/L	μM
H ₃ BO ₃	6.20	100.317
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025	0.105
KI	0.83	5
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25	1.0332
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025	0.1001
MnSO ₄ x 4H ₂ O	16.90	77
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27.80	99.9944
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37.30	99.671
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8.60	29.9068
ORGANSKI DODACI	mg/L	μM
Tiamin-HCl (vitamin B1)	0.10	0.331
Piridoksin-HCl (vitamin B6)	0.50	2.431
Nikotinska kiselina	0.50	4.0614
OSTALI DODACI	g/L	μM
Mioinozitol	0.10	555.0621
Glicin	0.002	26.6418
Saharoza	30.00	87642.418

3.2. Metode

3.2.1. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina tumorskog tkiva

Izvagano je 10 g svježeg tumorskog tkiva koje je liofilizirano 36 h (pri temperaturi od 64 °C i tlaku od 0.025 mbara) kako bi se sublimacijom i desorpcijom iz njega uklonila voda. Tarionik i tučak su ohlađeni tekućim dušikom, uzorci tkiva su smrvljeni u fini prah na koji je dodano 15 mL ekstrakcijskog pufera (50 mM natrij-fosfatni pufer pH 8.0 sastava prikazanog u tablici 4, 300 mM NaCl i 10 mM imidazol). Homogenat je centrifugiran 15 min pri 25000 x g i 4 °C (*Eppendorf Centrifuge 5804 R*, Eppendorf, Njemačka) kako bi se uklonili stanični ostaci. Supernatant je dodatno profiltriran kroz *Whatman* filter-papir (GE Healthcare, SAD) kako bi se uklonili eventualni ostaci tkiva koji bi mogli začepiti kolonu, te je konačno dobiveno 7.5 mL ekstrakta tumorskog tkiva.

Tablica 4. Sastav natrij-fosfatnog pufera

1 M natrij-fosfatni pufer pH 8.0, 50 mL	
1 M NaH ₂ PO ₄	3.4 mL
1 M Na ₂ HPO ₄	46.6 mL

3.2.2. Pročišćavanje ukupnih topivih proteina tumora pomoću Ni-NTA agarozne kolone

Afinitetna kolona za pročišćavanje nalazila se u hladnjaku na 4 °C i bila je spojena s motornom pumpom koja ubrzava protok tekućine u koloni. Prije nanošenja 1.5 mL Ni-NTA agaroze (*Protino*[®], Macherey-Nagel, Njemačka), kolona je isprana sa 30% etanolom. Nakon nanošenja Ni-NTA agaroze, dodano je malo destilirane vode (deH₂O) kako kolona ne bi presušila dok se agarozna taloži. Provedeno je kondicioniranje Ni-NTA agaroze s 7.5 mL ekstrakcijskog pufera, nakon čega je dodano 7.5 mL ekstrakta tumorskog tkiva. Nakon što je uzorak prošao kroz agarozu, u ukupnom trajanju od 2 sata, agarozna je 2 puta isprana sa 7.5 mL pufera za ispiranje (50 mM natrij-fosfatni pufer pH 8.0, 300 mM NaCl i 20 mM imidazol) kako bi isprali sve proteine koji su nespecifično vezani za agarozu. Kako bi eluirali proteine slične proteinu ASR, koji su linearnim slijedom histidinskih ostataka vezani za Ni-NTA agaroznu kolonu, korištene su različite koncentracije imidazola (Crowe i sur. 1994). Prvih 7

frakcija dobiveno je ispiranjem kolone elucijskim puferom A (50 mM natrij-fosfatni pufer pH 8.0, 300 mM NaCl i 50 mM imidazol), a drugih 7 elucijskim puferom B (50 mM natrij-fosfatni pufer pH 8.0, 300 mM NaCl i 125 mM imidazol). Svi eluati su sakupljeni u *Eppendorf* tubice volumena 1.5 mL (*Eppendorf*, Njemačka) i pospremljeni na -20 °C.

3.2.3. Ekstrakcija kiselih proteina normalnog izdanka, kalusa i tumora

Za ekstrakciju kiselih proteina korišteno je 4 g normalnog izdanka, kalusnog ili tumorskog tkiva koje je smrvljeno u tarioniku uz dodatak tekućeg dušika. Na tkivo je dodano 4 mL (4 x 1 mL) 250 mM H₂SO₄ i polivinilpirolidon (PVP) na vrh spatule, te je tkivo homogenirano tučkom. Ekstrakt je centrifugiran 15 min na 15300 x g pri 4 °C (*Eppendorf Centrifuge 5804 R*, *Eppendorf*, Njemačka), nakon čega je supernatant odpipetiran u čiste 2 mL tubice. Proteini su precipitirani pomoću 100% trikloroctene kiseline (TCA) koja je dodavana u supernatant u omjeru 1:3 (500µL TCA u 1500 µL supernatanta). Smjesa je ostavljena preko noći na 4 °C kako bi se proteini dobro precipitali. Slijedeći dan uzorci su centrifugirani 20 min na 15300 x g pri 4 °C, nakon čega su supernatanti uklonjeni, a na pelet je dodan 1 mL acetona ohlađenog na -20°C. Pelet je resuspendiran u acetonu, vorteksiran i centrifugiran 20 min na 15300 x g pri 4 °C. Ispiranje acetonom je ponovljeno u 3 ciklusa. Nakon zadnjeg ispiranja, talozi su ostavljeni da se osuše na zraku dok aceton ne ispari. Osušeni talog resuspendiran je u 500 µL pufera za izoelektrično fokusiranje (IEF) s dodatkom 2 mg/mL ditiotreitola (DTT) i 5.2 µL/mL amfolita neposredno prije upotrebe (Tablica 5). Kako se osušeni talozi ne otapaju lako u IEF puferu, tubice su stavljene 10 min na tresilicu, te su ponovno resuspendirane pipetom do potpunog otapanja taloga. Tubice su potom centrifugirane 5 min na 20800 x g pri sobnoj temperaturi, a supernatant je prebačen u čiste tubice od 1.5 mL.

Tablica 5. Sastav pufera za izoelektrično fokusiranje (IEF)

IEF PUFER, 10 mL	
Urea	5.4 g
CHAPS	0.2 g
reH ₂ O	do 10 mL
DTT	20 mg
Amfoliti	52 µL

3.2.4. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u proteinskim ekstraktima određena je modificiranom metodom po Bradfordu (Faurobert i sur. 2007) koja se od originalne (Bradford 1976) razlikuje po dodatku 0.1 M HCl koja zakiseljuje otopinu što pospješuje vezanje proteina za boju *Comassie Brilliant Blue G-250* (CBB), koja je sastavni dio Bradford otopine. Ova metoda se temelji na spektrofotometrijskom mjerenju apsorbancije produkta, koji nastaje reakcijom proteina i reagensa (radna otopina Bradford, Tablica 6), pri valnoj duljini od 595 nm.

Tablica 6. Sastav matične i radne Bradford otopine

BRADFORD MATIČNA OTOPINA, 650 mL		BRADFORD RADNA OTOPINA, 500 mL	
96%-tni EtOH	100 mL	96%-tni EtOH	15 mL
88% H ₃ PO ₄	200 mL	88% H ₃ PO ₄	30 mL
CBB	350 mL	Bradford matična otopina	30 mL
		reH ₂ O	425 mL

Uzorci su pripremljeni uzimanjem 10 µL 0.1 M HCl, 20 µL uzorka, 70 µL redestilirane vode (reH₂O) i 3.5 mL Bradford radne otopine, nakon čega su kratko

vorteksirani i ostavljeni 10 min u mraku. Slijepa proba umjesto uzorka sadrži 20 μ L IEF pufera. Koncentracija proteina u svakom uzorku, izražena u mg/mL otopine, određena je očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina serumskog goveđeg albumina (BSA) poznatih koncentracija (0.2-2.0 mg/mL) pomoću spektrofotometra *ATI/Unicam model UV/VIS* (Unicam, Engleska).

3.2.5. Denaturacija uzoraka i razdvajanje proteina jednodimenzionalnom SDS-PAG elektroforezom

Natrij dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE, engl. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) provedena je prema metodi koju je opisao Laemmli (1970), u sustavu *Mini-PROTEAN 2 Cell* (Bio-Rad, SAD). Za elektroforezu korišten je 1X SDS-elektrodni pufer pH 8.3 (Tablica 7). Prije nanošenja na gel, u proteinske ekstrakte dodan je Laemmli pufer za denaturaciju (125 mM Tris pH 6.8, 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) β -merkaptoetanol, 32% (v/v) glicerol i kap bromfenol plavog) u omjeru 4:1. Uzorci su vorteksirani i denaturirani zagrijavanjem 5 min na 95 °C u termomikseru *Eppendorf Thermomixer[®] comfort* (Eppendorf, Njemačka). U svakoj jažici nanosena je jednaka masa proteina. Na gelove za vizualizaciju bojom CBB nanoseno je 10 μ g proteina, a za prijenos proteina na membranu nanoseno je 15 μ g proteina. Uzorci su razdvajani 15 min pri konstantnom naponu od 100 V u gelu za koncentriranje (4%) i 45 min pri 200 V u gelu za razdvajanje (12%) dok boja bromfenol plavo nije došla do kraja gela (Tablica 8). Kao biljeg molekularnih masa proteina korišten je *Pierce[™] Unstained Protein MW Marker* (Thermo Scientific, SAD).

Tablica 7. Sastav 10X SDS elektrodnog pufera

10X ELEKTRODNI PUFER, 1 L	
Tris	30 g
Glicin	144 g
SDS	10 g
6 M HCl	do pH 8.3
reH ₂ O	do 1 L

Tablica 8. Sastav gelova za SDS-PAGE

	GEL ZA RAZDVAJANJE (12%)	GEL ZA KONCENTRIRANJE (4%)
reH ₂ O	3.35 mL	3.050 mL
Tris/HCl	1.5 M, pH 8.8; 2.50 mL	0.5 M, pH 6.8; 1.250 mL
30%-tni AA/Bis	4.00 mL	0.665 mL
10%-tni SDS	100 µL	50 µL
10%-tni APS	50 µL	35 µL
TEMED	5 µL	8 µL

3.2.6. Razdvajanje proteina dvodimenzionalnom SDS-PAG elektroforezom

Izolirani kiseli proteini poznatih koncentracija razrijeđeni su IEF puferom do volumena od 300 µL, tako da svi uzorci sadrže 400-500 µg proteina. U svaku tubicu s uzorkom dodano je 5 µL bromfenol plavog, nakon čega su tubice votreksirane i centrifugirane 5 min na 15300 x g pri sobnoj temperaturi (*Eppendorf Centrifuge 5804 R*, Eppendorf, Njemačka). U svaku jažicu u posudi za rehidraciju dodano je 300 µL uzorka i u njih su položeni imobilini *Immobiline DryStrip* (GE Healthcare, SAD), duljine 7 cm s gradijentnim gelom (pH = 3-10), okrenuti prema dolje pazeći da nema mjehurića zraka. Imobilini uronjeni u otopinu proteinskih uzoraka prelivevani su sa 900 µL otopine za nadsvođenje *Immobiline DryStrip Cover Fluid* (GE Healthcare, SAD) kako bi se spriječilo isušivanje gelova. Imobilini su ostavljeni da se rehidriraju preko noći na sobnoj temperaturi.

3.2.6.1. Prva dimenzija - izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje provedeno je prema metodi koju je opisao Robertson i suradnici (1987). Nakon rehidracije, imobilini su ocijeđeni i prebačeni na keramičku podlogu uređaja za izoelektrično fokusiranje *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare, SAD). Pri tome je potrebno paziti na duljinu i orijentaciju postavljenih imobilina. Elektrodni papirići namočeni u deH₂O postavljeni su uzdužno pri oba vrha gela te su na njih postavljene elektrode. Cijela površina keramičke podloge s imobilinima pokrivena je otopinom za nadsvođenje. Uređaj za izoelektrično fokusiranje pokrenut je preko programa 3 (1 h pri gradijentnom porastu napona

od 0-500 V, 1 h pri gradijentnom porastu napona od 500-1000 V, 1 h pri gradijentnom porastu napona od 1000-8000 V i 8 h pri stalnom naponu od 8000 V). Nakon završetka izoelektričnog fokusiranja (35000 Vh) imobilini su spremljeni na -80 °C.

3.2.6.2. Druga dimenzija – SDS-PAGE

Nakon razdvajanja proteina prema njihovoj izoelektričnoj točki u prvoj dimenziji, proteini su u drugoj dimenziji razdvojeni prema njihovoj masi pomoću SDS-PAGE elektroforeze. Korištena je metoda koju je opisao Laemmli (1970), u sustavu *Mini-PROTEAN 2 Cell* (Bio-Rad, SAD). Otopljeni imobilini inkubirani su 15 min u 2 mL ekvibracijskog pufera (0.05 M Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glicerol i 2% (w/v) SDS) uz dodatak 0.04 g DTT-a na tresilici. Zatim su imobilini prebačeni u čiste plastične posudice te inkubirani 15 min u 2 mL ekvibracijskog pufera uz dodatak 0.05 g jodacetamida (IAA). Ekvilibrirani gelovi umočeni su u 1X elektrodni pufer (Tablica 7) i položeni na pripremljeni gel za razdvajanje (12%) (Tablica 8). Biljeg molekulskih masa proteina nanesen je na *Whatmann* papir koji je postavljen na gel uz desni (-) kraj trake imobilina. Sve je zatim pokriveno s 0.5%-tnom otopinom agaroze u 1X elektrodnom puferu s dodatkom 40 µL bromfenol plavog. Nakon što se gel stvrdnuo, pokrenuta je elektroforeza u 1X elektrodnom puferu koja se odvijala 15 min pri konstantnom naponu od 100 V, a zatim 45 min pri 200 V do kraja elektroforeze.

3.2.7. Vizualizacija razdvojenih proteina bojom *Coomassie Brilliant Blue* (CBB)

Gelovi su nakon jedno- (1D) i dvodimenzionalne (2D) elektroforeze, inkubirani 2 h na tresilici pri sobnoj temperaturi u otopini za bojenje (0.1% (w/v) CBB R-250, 45% (v/v) metanol i 10% (v/v) ledena octena kiselina) prema Balen i suradnicima (2011). Nakon toga gelovi su se odbojavali na tresilici pri sobnoj temperaturi u otopini za odbojavanje (10% (v/v) octena kiselina i 10% (v/v) etanol), koju je potrebno nekoliko puta promijeniti do postizanja zadovoljavajuće razine odbojenja. Gelovi su skenirani pomoću skenera *Epson Perfection V700 Photo Scanner* (Epson, SAD).

3.2.8. Prijenos proteina na membranu

Mokri prijenos izveo se u vertikalnom sustavu za elektroprijenos *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) prema Balen i suradnicima (2011). Neposredno prije uporabe nitrocelulozna membrana se namočila u pufer za prijenos. Nakon 1D i 2D SDS-PAG elektroforeze gelovi se slažu u "sendvič" za prijenos proteina na nitroceluloznu membranu. Gel se polaže na membranu, a cijeli se sustav nalazi između sloja filter-papira i spužvica. Potrebno je sve slojeve dobro pritisnuti kako bi istisnuli zrak koji može blokirati prijenos proteina. Prijenos je trajao 60 min pod stalnim naponom od 60 V uz dodatak pufera za prijenos (28 mM Tris, 192 mM glicin i 10% (v/v) metanol).

3.2.9. Vizualizacija razdvojenih proteina na membrani kemiluminiscencijom

Nakon završenog prijenosa, membrane su obojene bojom *Rouge Ponceau S* koja se veže na sve proteine i reverzibilno ih boji. Membrane su isprane s reH₂O dok proteinske vrpce nisu bile jasno uočljive, a zatim su biljezi molekulskih masa ucrtani grafitnom olovkom. Potom su membrane dodatno isprane s reH₂O i dva puta po 2 min sa 1X TBS puferom (Tablica 9), sve dok se membrane nisu u potpunosti obezbojile. Naposljetku su membrane blokirane 60 min u 30 mL otopine A (Tablica 10). Zatim su membrane preko noći inkubirane primarnim antitijelom anti-rabbit α ASR1 (iz laboratorijske kolekcije, prof. Dudy Bar-Zvi, Izrael), specifično za protein ASR1 iz rajčice, dodanim u 30 mL otopine A u omjeru 1:2000. Nakon toga je slijedilo ispiranje 10 min u 20 mL otopine A koje je ponovljeno još tri puta. Membrane tretirane primarnim antitijelom inkubirane su 60 min sekundarnim antitijelom goat anti-rabbit IgG-HRP dodanim u 30 mL otopinu A u omjeru 1:10000. Zatim su uslijedila dva ispiranja po 10 min sa 30 mL otopine B (Tablica 10). Nakon dodavanja otopina za kemiluminiscenciju (1 mL *Peroxide solution* i 1 mL *Luminol solution*) na mebranu i inkubacije 5 min u mraku, detekcija proteina se postiže pomoću uređaja *C-DiGit Blot*[®] *Scanner* (LI-COR Biosciences, SAD).

Tablica 9. Sastav 10X TBS i 10X PBS pufera

10X TBS PUFER, 1 L		10X PBS PUFER, 500 mL	
Tris	2.42 g	NaCl	40.00 g
NaCl	29.20 g	KCl	1.00 g
6 M HCl	do pH 7.5	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	4.698 g
reH ₂ O	do 1 L	KH ₂ PO ₄	1.00 g
		reH ₂ O	do 500 mL

Tablica 10. Sastav otopina A i B

	OTOPINA A, 300 mL	OTOPINA B, 200 mL
10X PBS	30 mL	20 mL
Tween	3 mL	2 mL
Mlijeko u prahu	6 g	-
reH ₂ O	do 300 mL	do 200 mL

3.2.10. Spektrometrija masa MALDI-TOF/TOF

Kiseli topivi proteini razdvojeni dvodimenzionalnom SDS-PAG elektroforezom analizirani su tandemskom spektrometrijom masa (MS/MS) MALDI-TOF/TOF (Butorac i sur. 2013) pomoću uređaja *4800 Plus MALDI TOF/TOFTM Analyzer* (Applied Biosystems, SAD).

3.2.10.1. Digestija proteina u gelu

Proteinske mrlje odabrane za analizu spektrometrijom masa izrezane su iz gelova plastičnim nastavkom za pipetu s proširenim vrhom. Izrezani komadići gela prebačeni su u tubice od 1.5 mL te inkubirani u 1 mL otopine za odbojavanje (10% (v/v) octena kiselina i 40% (v/v) metanol) preko noći na termomikseru pri sobnoj temperaturi. Od potpuno

odbojenih komadića gela pipetom je odvojena otopina za odbojavanje te je dodano 500 μL 50 mM pufera amonijevog hidrogenkarbonata (NH_4HCO_3) pH 7.8. Gelovi su inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi na termomikseru *Eppendorf Thermomixer[®] comfort* (Eppendorf, Njemačka). Nakon što je otopina odvojena, u tubice je ponovno dodano 500 μL NH_4HCO_3 , nakon čega su inkubirane 5 min na termomikseru. Postupak je ponovljen još dva puta s tim da je zadnje inkubiranje provedeno 30 min, čime se postiže optimalna pH vrijednost za rad proteaze tripsina. Nakon uklanjanja otopine, na komadiće gela dodano je 500 μL otopine dobivene miješanjem 50 mM NH_4HCO_3 pH 7.8 i acetonitrila (CH_3CN) u omjeru 1:1 (v/v), te su inkubirani sljedećih 30 min na termomikseru pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije otopina je bačena, a na gelove je dodano 100 μL 100%-tnog CH_3CN . Uzorci su inkubirani 5 min u termomikseru. Potom je CH_3CN uklonjen iz tubica, a preostali komadići gelova su stavljeni na sušenje uparavanjem 30 min pri 45 °C u vakuum centrifugi *Concentrator 5301* (Eppendorf, Njemačka). Upareni gelovi prebačeni su u tubice od 200 μL u koje je dodano 10 μL otopine tripsina koncentracije 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ koja je pripravljena otapanjem matične otopine tripsina koncentracije 1 mg/mL u 25 mM NH_4HCO_3 pH 7.8. Uzorci su inkubirani u termomikseru na 37 °C preko noći.

3.2.10.2. Izolacija peptida iz gela

Nakon digestije, sadržaj u tubicama centrifugiran je nekoliko sekundi uređajem *MiniSpin* (Eppendorf, Njemačka) kako bi se sav pufer sa tripsinom skupio na dno tubice. Zatim je tekući dio prebačen u tubice od 1.5 mL i uparen 30 min pri 45 °C u vakuum centrifugi *Concentrator 5301* (Eppendorf, Njemačka). Komadićima gela u tubicama od 0.2 mL dodano je 10 μL otopine za izolaciju dobivene miješanjem otopine 5%-tne trifluoroctene kiseline (TFA) i CH_3CN u omjeru 1:1 (v/v), nakon čega su uzorci inkubirani 30 min pri sobnoj temperaturi u sonifikacijskoj kupelji *Ultrasonic Cell Disruptor XL* (Misonix Inc., SAD). Tubice su nakon sonifikacije inkubirane 15 min pri sobnoj temperaturi na termomikseru *Eppendorf Thermomixer[®] comfort* (Eppendorf, Njemačka). Izolati peptida su potom spojeni sa pripadajućim uparenim tripsinskim puferima. Uzorci su stavljeni na sušenje 30 min pri 45 °C u vakuum centrifugi *Concentrator 5301* (Eppendorf, Njemačka), nakon čega su spremljeni na - 80 °C.

3.2.10.3. Pročišćavanje peptida tehnikom ZipTip C₁₈

Za pročišćavanje peptida korišten je automatizirani uređaj *AssayMAP Bravo Automated Liquid Handling Platform* (Agilent Technologies, SAD). Uređaj sadrži modificiranu 96-kanalnu robotsku ruku opremljenu s preciznim protočnim špicama koje se spajaju na kromatografske kolone kroz posebnu sondu. Postupak pročišćavanja peptida temelji se na principu tekućinske kromatografije obrnutih faza u kojoj je nepokretna faza C₁₈ na koju se elektrostatskim interakcijama vežu peptidi. Nepokretna faza C₁₈ nalazi se pri vrhu ZipTip nastavaka za automatske pipete. Molekule soli koje se ne vežu na nepokretnu fazu ispiru se polarnim otapalom (vodenom otopinom TFA), dok se peptidi eluiraju otapalom manje polarosti (vodenom otopinom CH₃CN). Izoliranim i osušenim peptidima iz gela dodano je 100 µL 0.1%-tne TFA. Kolone su prvo kondicionirane sa 100 µL pripremnog pufera (Tablica 11) brzinom od 300 µL/min, a potom sa 100 µL ekvibracijskog pufera (Tablica 11) brzinom od 10 µL/min. Zatim je uslijedilo nanošenje uzoraka (90 µL) brzinom 5 µL/min i elucija peptida elucijskim puferom (Tablica 11) u volumenu od 30 µL brzinom od 3 µL/min. Pročišćeni uzorci upareni su 1 h pri 45 °C u vakuum centrifugi *Concentrator 5301* (Eppendorf, Njemačka) i korišteni za daljnu analizu.

Tablica 11. Sastav otopina za kondicioniranje i eluciju peptida s kolone

	PRIPREMNI PUFER, 50 mL	EKVILIBRACIJSKI PUFER, 50 mL	ELUCIJSKI PUFER, 50 mL
CH ₃ CN	25 mL	-	35 mL
reH ₂ O	25 mL	50 mL	15 mL
TFA	50 µL	50 µL	50 µL

3.2.10.4. Derivatizacija peptida uz kemijski potpomognutu fragmentaciju

Pripremljena je derivatizacijska otopina koja sadrži 1 g/L CAF (engl. *Chemically Assisted Fragmentation*) reagensa (4-formil-1,3-benzen-disulfonska kiselina) i 4 g/L natrijevog cijanoborhidrida (NaBH₃CN) u 10 mM kalijevom hidrogenfosfatnom puferu pH 5.0. Na uparene peptide dodano je 20 µL derivatizacijske otopine, a potom je sadržaj resuspendiran, vorteksiran i kratko centrifugiran (*MiniSpin*, Eppendorf, Njemačka) kako bi se

slegao na dno tubice. Uzorci su zagrijavani 8 min u mikrovalnoj pećnici na 180 W. Nakon zagrijavanja, uzorcima je dodano 80 μL otopine TFA (konačno 0.1% TFA u 100 μL) te su ponovno pročišćeni tehnikom ZipTip C_{18} (opisano u poglavlju 3.2.10.3.), nakon čega su upareni 1 h pri 45 °C u vakuum centrifugi *Concentrator 5301* (Eppendorf, Njemačka).

3.2.10.5. Analiza peptida spektrometrom masa

Pročišćeni i upareni peptidi resuspendirani su u 4 μL matrice α -cijano-4-hidroksicimentne kiseline (CHCA) koncentracije 5 mg/mL, koja je pripravljena otapanjem u vodenoj otopini CH_3CN u omjeru 1:1 (v/v). Uzorci su nakon otapanja naneseni na MALDI pločicu (inertni nosač od nehrđajućeg čelika). Nakon kristalizacije matrice i analita, uzorci na pločici su analizirani spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF. MS i MS/MS analize peptida obilježenih CAF reagensom provedene su u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa (Tablica 12). Za internu kalibraciju korišteni su signali CAF reagensom obilježenih peptida nastalih autolizom tripsina. Nakon snimanja spektara MS, odabire se deset peptida prekursora s najintenzivnijim signalima koji se podvrgnu daljnjoj fragmentaciji kako bi se dobio spektar MS/MS.

Tablica 12. Parametri MALDI-TOF/TOF analize spektrometrijom masa (MS) i tandemskom spektrometrijom masa (MS/MS)

Tip analize Parametar	MS	MS	MS/MS	MS/MS
Detekcija iona	Pozitivna	Negativna	Pozitivna	Negativna
Zrcalo	Reflektron	Reflektron	Reflektron	Reflektron
Broj snimaka/spektara	80	80	80	80
Raspon masa / Da	1000-4000	1000-4000	1000-4000	1000-4000
Brzina snimanja / Hz	200	200	200	200
Kolizijski plin	Isključen	Isključen	Uključen	Isključen

3.2.10.6. Identifikacija proteina *de novo* sekvenciranjem

Dobiveni spektri masa MS/MS korišteni su za daljnju pretragu NCBI nr/Plants baze podataka prema*: rajčici, krumpiru, primorskoj travi (*Suaeda liaotungensis*), caklenjači, riži, pomelu, azijskoj trešnji (*Litchi chinensis*), divljoj banani (*Musa acuminata*, *Musa balbisiana*, *Musa itinerans*), čaju (*Camellia sinensis*), duhanu, kukuruzu, soji (*Glycine max*), ljiljanu i vinovoj lozi, za koje je poznato da imaju protein ASR, pomoću specijaliziranog računalnog programa *Protein Acrobat* (razvijen na Institutu Ruđer Bošković) s integriranim algoritmom za objedinjavanje pozitivnih i negativnih spektara masa te pretraživanje proteinskih baza podataka. Iz dobivenih MS/MS spektara, na temelju razlike u masama između pojedinih signala spektra, iščitava se slijed aminokiselina fragmentiranih peptida, a algoritmi već spomenutog računalnog programa vezanog uz MALDI-TOF/TOF instrument preklapaju i slažu u cjelinu. Preklapanje se obavlja usporedbom s bazom podataka prema algoritmu najveće sličnosti uz pretragu iste baze uz korištenje BLAST Blossom 80 pretražnog algoritma. U konačan ishod pretrage, nakon probira pogodaka potvrđenih u slučaju preklapanja prema sličnosti i *de novo* iščitanja, u obzir su uzeti samo pogotci koji imaju BLAST bodovanje manje od 0.01. Na taj je način mogućnost pogreške svedena na najmanju moguću vrijednost. S obzirom da navedene peptidne sekvence ne postoje u bazi podataka za kaktus (*Mammillaria gracilis*), pretraga je izvršena prema načelu homolognosti sa prethodno navedenih 16 biljnih vrsta. Iz tako iščitanih aminokiselinskih slijeda, identificira se protein kojemu ta sekvenca pripada uspoređivanjem izmjerenih masa signala dobivenih spektara s teoretski izračunatim masama peptida pohranjenima u bazama podataka. Parametri pretrage mogu se isčitati iz tablice 13.

Tablica 13. Prikaz parametara pretrage homolognih proteina

PARAMETAR	VRIJEDNOST
Tolerancija pogreške u masi peptida (MS)	0.3
Tolerancija pogreške u masi b-iona	0.3
Tolerancija pogreške u masi y-iona	0.3
Minimalni % pokrivenosti (očitanja) sekvence	10.0
Maksimalni broj pogodaka peptida po MS/MS spektru	6000
Najmanji broj aminokiselina u redu	4
Najbolja podudarnost prvih vrsta	10
Pregled prema	16 biljnih vrsta*

3.2.11. Izolacija ukupne RNA

Za izolaciju RNA iz tumorskog tkiva, nediferenciranog kalusa i diferenciranog kalusa kaktusa korišten je komercijalno dostupan komplet kemikalija *PureLinkTM RNA Mini Kit* (Ambion, SAD). Postupak je odrađen prema pripadajućem protokolu. Odvagano je 0.1 g tkiva kaktusa koje je homogenirano u tarioniku dodatkom 0.5 mL pufera za lizu (*Lysis Buffer*). Dobiveni lizati su prebačeni u tubice i centrifugirani 5 min na 2600 x g (*Eppendorf 5415D Centrifuge*, Eppendorf, Njemačka). Supernatanti su prebačeni u nove tubice bez RNaza u koje je dodano je 0.5 volumena 96%-tnog etanola. Potom je 700 µL uzoraka dodano na kolone za pročišćavanje (*Spin Cartridge*) sa pripadajućim tubicama za sakupljanje (*Collection Tube*), nakon čega su uzorci centrifugirani 15 s na 12000 x g pri sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, eluati su odbačeni i postupak je ponovljen dok sav uzorak nije dodan na kolone. Zatim je na kolone dodano 700 µL pufera za ispiranje (*Wash Buffer*). Kolone su centrifugirane 15 s na 12000 x g pri sobnoj temperaturi. Eluati u tubicama se odbacuju, a kolone su prenesene u nove tubice. Na kolone je dodano 500 µL pufera za ispiranje II (*Wash Buffer II*) s etanolom, nakon čega su kolone centrifugirane 15 s na 12000 x g pri sobnoj temperaturi i eluati odbačeni. Postupak ispiranja membrane kolona i centrifugiranja je ponovljen, a eluati su odbačeni. Kolone su potom centrifugirane 1 min na 12000 x g pri sobnoj temperaturi, kako bi se osušile membrane na koje su se vezale molekule RNA. Nakon što su kolone prebačene u nove tubice, na kolone je dodano 50 µL vode bez nukleaza (*Nuclease-Free Water*). Kolone su inkubirane 1 min na sobnoj temperaturi, te potom centrifugirane 2 min na 12000 x g kako bi se RNA eluirala u tubice. Koncentracije izolirane RNA izmjerene su na uređaju *NanoVue PlusTM Spectrophotometer* (GE Healthcare, SAD). Uzorci su spremljeni na -20 °C.

Izolirani RNA uzorci tretirani su DNazom kako bi se uklonila genomska DNA i dobila pročišćena RNA. Korištena je DNaza iz laboratorijske kolekcije i pufer za DNazu sastava 40 mM Tris-HCl i 6 mM MgCl₂. Reakcijske smjese sastojale su se od 10 µL (1 µg) izolirane RNA, 1 µL DNaze, 1.5 µL 10X pufera za DNazu i 2.5 µL sterilne deH₂O u kojoj su inaktivirane RNaze. Reakcijske smjese inkubirane su 10 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je slijedila inaktivacija DNaze 10 min pri 70 °C.

3.2.12. Razdvajanje DNA elektroforezom na agaroznom gelu

Kako bi se provjerila kvaliteta RNA, uspješnost izolacije RNA i umnažanje DNA fragmenata (PCR reakcije), te kako bi se detektirala moguća kontaminacija uzoraka provedena je elektroforeza na 1% agaroznom gelu (AGE, engl. *agarose gel electrophoresis*) u TAE puferu (40 mM Tris, 20 mM natrij acetat i 2 mM EDTA) pri naponu od 100 V u trajanju od 20 min korištenjem *RunOne™ Electrophoresis System* (EmbiTec, SAD). Detekcija uzoraka postignuta je dodavanjem 1 μL *SYBR™ Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, SAD) u male gelove (15 mL) ili 2 μL u velike gelove (30 mL), a signal je vizualiziran pod UV svjetlom i snimljen pomoću kamere *Kodak Gel Logic 100 System* (Kodak, SAD). Veličina fragmenata određena je usporedbom s DNA markerom *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Scientific, SAD) koji sadrži DNA molekule veličine 250 pb do 1000 pb .

3.2.13. Reverzna transkripcija na kalupu RNA

Nakon mjerenja koncentracija i razdvajanja elektroforezom, istraživanje je nastavljeno s RNA koja je izolirana iz tumorskog tkiva kaktusa. Pročišćena RNA prevedena je u cDNA metodom reverzne transkripcije. U tubici je priređena reakcijska smjesa koja se sastojala od 15 μL RNA tretirane DNazom, 1 μL oligo(dT) početnica (100 μM), 3 μL smjese deoksiribonukleotida (dNTP) (10 mM svakog) i 4 μL sterilne deH₂O. U prvom koraku provedena je denaturacija koja je trajala 5 min pri 65 °C prilikom koje se denaturiraju sekundarne strukture RNA, a potom je slijedila inkubacija od 1 min na ledu. U drugom koraku u reakcijsku smjesu je dodano 1 μL (200 U/ μL) reverzne transkriptaze *PrimeScript Reverse Transcriptase* (TaKaRa BIO INC, Japan) i 6 μL pufera *5X PrimeScript Reverse Transcriptase Buffer* (TaKaRa BIO INC, Japan). Uvjeti reakcije u drugom koraku bili su 2 h pri 42 °C radi provođenja reverzne transkripcije, a potom 15 min pri 70 °C radi deaktivacije enzima. Dobivena cDNA pohranjena je na -20 °C.

3.2.14. Umnažanje fragmenta DNA

Sve lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) odvijale su se u aparatu za termocikliranje *2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems, SAD). U svakoj reakciji korištene su određene uzvodne i nizvodne početnice, *EmeraldAmp MAX PCR Master Mix* (TaKaRa BIO INC), sterilna deH₂O i cDNA dobivena iz tumorskog tkiva kaktusa. *EmeraldAmp MAX PCR Master Mix* sadrži pufer, *Taq* DNA polimerazu, smjesu dNTP-a, boju za nanošenje na gel (zelena) i glicerol. Pri umnažanju fragmenata korištene su i negativne kontrolne NTC (engl. *no template control*) reakcije u kojima je umjesto cDNA dodan jednak volumen sterilne deH₂O (Innis i sur. 1990).

3.2.14.1. Kontrolne reakcije PCR

Kvaliteta dobivene cDNA ispitana je umnažanjem kontrolnih gena koji su uvijek eksprimirani u stanicama, odnosno čija je RNA uvijek prisutna pa je stoga njihova detekcija pokazatelj uspješne reakcije reverzne transkripcije. Budući da nije poznat sekvencirani kontrolni gen iz kaktusa korištene su uzvodne (5'-TGGTTAAGGCTGGATTTGC) i nizvodne (5'-GCATCCTTTTGACCCATACC) početnice za gen *AKT* iz duhana koji kodira za protein kinazu B (PKB), poznatu i pod nazivom Akt te uzvodne (5'-GAGATGCACCACGAAGCTC) i nizvodne (5'-GGAGTTGGAAGCAACAAACC) gen *EF1a* iz duhana koji kodira za elongacijski faktor 1 alfa. Očekivana duljina DNA fragmenata dobivenih PCR reakcijama je oko 80 pb za oba gena. Reakcijska smjesa se sastojala od 5 µL *EmeraldAmp MAX PCR Master Mix*, 1 µL cDNA, 1 µL uzvodnih i nizvodnih početnica za *AKT* ili *EF1A* (10 µM) i 2 µL sterilne deH₂O. Početna denaturacija odvija se 2 min pri 98 °C. Potom, uzorci su prošli 40 ciklusa PCR reakcija, od kojih se svaki sastojao od 3 koraka:

- 1) denaturacija cDNA pri 98 °C, 10 s
- 2) prijanjanje početnica pri 57 °C, 30 s
- 3) elongacija polimerazom pri 72 °C, 10 s

Završna elongacija odvijala se 2 minute pri 72 °C, nakon čega su produkti PCR reakcije pohranjeni na 4 °C.

3.2.14.2. Reakcije PCR sa degeneriranim početnicama

Korištene su sve moguće kombinacije uzvodnih F1 (5'-TWYGCYYTGYAYGAGAAGCA i F2 (5'-AGAAGCAYVARKCARAGAARGA) (engl. *forward*) te nizvodnih R1 (5'-AAGGTRCTCGTRGTRSTCTTYTTY) i R2 (5'-CCTAWRCGDAAGGTRCTCGTRG) (engl. *reverse*) degeneriranih početnica kako bi se umnožio fragment cDNA, koji odgovara sekvenci za dio motiva 1 i 2 proteina ASR sličnog proteina u kaktusu (~120 pb). U reakcije je dodano 1 µL cDNA, 1 µL (10 µM) uzvodnih početnica, 1 µL (10 µM) nizvodnih početnica, 2 µL sterilne deH₂O i 5 µL *EmeraldAmp MAX PCR Master Mix*. Početna denaturacija u PCR reakcijama odvijala se 2 min pri 98 °C. Nakon toga, uzorci su prošli 40 ciklusa PCR reakcija, od kojih se svaki sastojao od 3 koraka:

- 1) denaturacija cDNA pri 98 °C, 10 s
- 2) prijanjanje početnica pri 60 °C, 30 s
- 3) elongacija polimerazom pri 72 °C, 30 s

Završna elongacija odvijala se 7 min pri 72 °C, nakon čega su produkti PCR reakcije pohranjeni na 4 °C.

Nakon detektiranja DNA vrpce na agaroznom gelu, kombinacije početnica koje su dale najbolji rezultat korištene su u drugom PCR-u pri povećanoj temperaturi prijanjanja početnica i skraćenim vremenom elongacije polimerazom s ciljem povećanja specifičnosti vezanja početnica na DNA kalup i uspješnije izolacije umnoženih fragmenata iz gela. Reakcijska smjesa je sadržavala 3 µL cDNA, 5 µL (10 µM) uzvodnih početnica, 5 µL (10 µM) nizvodnih početnica, 12 µL sterilne deH₂O i 25 µL *EmeraldAmp MAX PCR Master Mix*. Početna denaturacija u PCR reakcijama odvijala se pri 2 min pri 98 °C. Nakon toga, uzorci su prošli 40 ciklusa PCR reakcija, od kojih se svaki sastojao od 3 koraka:

- 1) denaturacija cDNA pri 98 °C, 10 s
- 2) prijanjanje početnica pri 61 °C, 30 s
- 3) elongacija polimerazom pri 72 °C, 15 s

Završna elongacija odvijala se 7 min pri 72 °C, nakon čega su produkti PCR reakcije pohranjeni na 4 °C.

3.2.15. Izolacija umnoženih fragmenata iz gela

Nakon detektiranja DNA vrpci umnoženih fragmenata drugog PCR-a sa degeneriranim početnicama na agaroznom gelu uslijedilo je izrezivanje DNA vrpci pod UV svjetlom. Otapanje, izolacija i pročišćavanje DNA iz gela odrađeno je pomoću komercijalnog dostupnog seta kemikalija *QIAquick[®] Gel Extraction Kit* (Qiagen, Njemačka) prema protokolu proizvođača. Izrezani DNA fragmenti prebačeni su u tubicu te im je izmjerena masa. Potom je u tubice dodano tri volumena pufera QG na jedan volumen izrezanog gela (100 mg ~ 100 µL). Uzorci su inkubirani 10 min na 50 °C uz vorteksiranje svakih 2-3 min. Nakon inkubiranja, dodan je volumen izopropanola koji odgovara jednom volumenu gela. Pripremljene su kolone za pročišćavanje (*QIAquick spin column*) koja su stavljene u tubicu za sakupljanje (*QIAquick collection tube*). Uzorci su prebačeni u kolone za pročišćavanje koja su centrifugirane 1 min na 16100 x g (*Eppendorf 5415D Centrifuge*, Eppendorf, Njemačka), nakon čega su eluati odbačeni. Na kolone je potom dodano 0.5 mL pufera QG (*QG buffer*), te su centrifugirane 1 min na 16100 x g. Nakon što su eluati odbačeni, na kolone je dodano 0.75 mL pufera PE (*PE buffer*) te su ostavljene 5 min na sobnoj temperaturi. Kolone su zatim centrifugirane 1 min na 16100 x g i eluati su odbačeni. Kolone su ponovno centrifugirane 1 min na 16100 x g, te su prebačene u čiste tubice. Dodatkom 100 µL sterilne destilirane vode na membranu kolona i centrifugiranjem 1 min na 16100 x g, DNA je eluirana u tubice. Kako bi se postigla veća koncentracija eluirane DNA uzorci su upareni u vakuum centrifugi *SavantTM DNA120 SpeedVacTM* (Thermo Scientific, SAD) i spremljeni na -20 °C. Koncentracija izoliranih molekula DNA iz gela izmjerena je na uređaju *NanoVue PlusTM Spectrophotometer* (GE Healthcare, SAD).

3.2.16. Kloniranje umnoženog fragmenta u vektorski plazmid

Produkti reakcija PCR na kalupu cDNA, izolirani iz gela, ugrađeni su u vektorski plazmid *pGEM[®]-T Easy Vector System* (Promega, SAD). Navedeni komercijalno dostupni plazmid je linearan s T (timin) 3' ljepljivim krajevima koji služe za uspješno vezanje i ligaciju PCR produkta s A (adenin) 3' ljepljivim krajevima koje radi *Taq* polimeraza (Zhou i Gomez-Sanchez 2000). Plazmid *pGEM[®]-T Easy* sadrži laktozni operon i gen za rezistenciju na ampicilin, te u kompletu dolazi već pocijepan na mjestu unutar gena *lacZ* za β-galaktozidazu gdje bi se trebao ugraditi željeni DNA insert. Navedene karakteristike omogućuju kontrolu ugradnje inserta u plazmid. Ukoliko se u plazmide ugradi insert, gen *lacZ* će biti inaktiviran.

Ako se plazmid ligira bez ugradnje inserta, gen *lacZ* će postati aktivan. Korištene bakterijske stanice moraju imati inaktivirani kromosomski gen *lacZ*. Bakterijske stanice koje prime plazmid mogu rasti na podlozi s ampicilinom. Uz prisutnost induktora IPTG-a aktivirana β -galaktozidaza razgrađuje kromogeni supstrat X-Gal, te se razvijaju plavo obojene kolonije. Ako bakterije prime plazmid s insertom, inaktivira se sinteza enzima β -galaktozidaze i kolonije su obojene bijelo.

Potrebno je utvrditi koliko se inserta umnoženog PCR-om dodaje u reakcijsku smjesu kako bi ligacijska reakcija uspjela. Molarni omjer PCR produkta (inserta) i vektora iznosi 5:1. Masa inserta korištena u ligacijskim reakcijama izračunata je prema jednadžbi:

$$\text{masa inserta (ng)} = \frac{\text{masa vektora (ng)} \times \text{duljina inserta (kb)}}{\text{duljina vektora (kb)}} \times \frac{\text{insert}}{\text{vektor}} \text{ molarni omjer}$$

gdje je masa vektora 50 ng, duljina inserta 0.15 kb i duljina vektora 3 kb.

Reakcijska smjesa sastojala se od 5 μ L pufera za brzu ligaciju (engl. *2X Rapid Ligation Buffer*), 1 μ L *pGEM[®]-T Easy* vektora, 1 μ L T4 DNA ligaze, 1.13 μ L inserta i sterilne deH₂O do ukupnog volumena od 10 μ L. Nakon dodavanja svih komponenti, ligacijska smjesa je inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi.

3.2.17. Transformacija bakterijskih stanica

Pripremljene su petrijeve zdjelice sa 30 mL krute hranjive podloge za rast bakterija. Kao hranjiva podloga korišten je Luria-Bertani (LB) sastava 10 g/L baktotripton, 5 g/L suhi ekstrakt kvasca i 10 g/L NaCl (Sezonov i sur. 2007). Prije izlijevanja u petrijeve zdjelice medij je autoklaviran, te je u njega dodan ampicilin do konačne koncentracije 100 μ g/mL i agar do konačne koncentracije 20 g/L. Prije nasađivanja na osušene ploče je dodano 100 μ L smjese koja sadrži 0.1 M IPTG i 20 mg/mL X-Gal.

Za kemijsku transformaciju plazmida korišten je XL1-Blue soj bakterije *Escherichia coli*. Dan prije nasađena je prekonoćna kultura bakterija u 3 mL tekuće LB podloge koja je pripremljena na isti način kao i kruta LB podloga, samo bez agara. U 2 mL tubicu

odpipetirano je 300 μL prekonoćne kulture i razrijeđeno s 1.7 mL tekućeg LB medija. Bakterijske stanice su potom uzgojene do log faze rasta (OD600 između 0.5 i 0.6), nakon čega je potrebno raditi na ledu. Bakterije su centrifugirane 3 min na 6000 x g pri 4 °C (*Eppendorf 5415D Centrifuge*, Eppendorf, Njemačka), supernatant je odbačen, a talog resuspendiran u 200 μL hladnog 50 mM CaCl_2 . Zatim je opet slijedilo centrifugiranje 3 min na 6000 x g pri 4 °C i odlijevanje supernatanta, a talog je resuspendiran u 50 μL hladnog 50 mM CaCl_2 . Nakon 15 min inkubacije stanica na ledu, dodano je 2 μL pripremljenih ligacijskih smjesa. Sadržaj je promiješan invertiranjem tubica koje su ostavljene 40 min na ledu. Nakon inkubacije stanice su bile podvrgnute toplinskom šoku na 42 °C u trajanju od 60-90 s, a zatim hlađenju na ledu u trajanju od 60-90 s. U tubice je dodano 100 μL LB medija te su ostavljene 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon što su se bakterijske stanice oporavile, nasađuju se na prethodno pripremljene LB ploče s ampicilinom, IPTG-om i X-Gal-om. Ligacijske smjese dodane su zasebno u volumenima od 50 μL i 100 μL na LB ploče koje su potom inkubirane 24 h na 37 °C.

3.2.18. Izolacija plazmida i sekvenciranje

Odabrane su samo bijele kolonije koje su zasebno prenesene s ploča u 3 mL tekućeg LB medija s dodatkom ampicilina koncentracije 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ koji je prethodno odpipetiran u epruvete. Epruvete su zatim inkubirane preko noći na 37 °C uz lagano miješanje, kako bi se višestruko umnožio broj bakterija koje sadrže plazmide sa specifičnim insertima.

Iz prekonoćnih kultura transformiranih bakterijskih stanica provedena je izolacija i pročišćavanje plazmida pomoću komercijalnog seta *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, SAD). Prekonoćne kulture bakterijskih stanica razdijeljene su u dvije tubice koje su centrifugirane 5 min na 6000 x g (*Eppendorf 5415D Centrifuge*, Eppendorf, Njemačka), a supernatanti odbačeni. Peleti su sakupljeni u dvije tubice resuspendiranjem u 250 μL otopine za resuspendiranje stanica (*Cell Resuspension Solution*). Zatim je dodano 250 μL otopine za lizu stanica (*Cell Lysis Solution*) u svaku tubicu i sadržaj je invertiranjem tubica promiješan, nakon čega je uslijedila inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju od 4 min. Potom je u tubice dodano 10 μL otopine alkalne proteaze (*Alkaline Protease Solution*). Sadržaj je promiješan invertiranjem tubica koje su ostavljene 5 min na sobnoj temperaturi. Dodano je 350 μL otopine za neutralizaciju (*Neutralization Solution*), tubice su invertirane 4 puta i centrifugirane 10 min na 14000 x g. Pripremljene su tubice za

sakupljanje (*Collection tube*) i u njih su stavljene kolone za pročišćavanje (*Spin Column*). Supernatanti, dobiveni nakon centrifugiranja, prebačeni su u kolone koje su potom centrifugirane 5 min na 14000 x g. Eluati iz tubica za sakupljanje su odbačeni, a kolone su vraćene u iste tubice, te je u njih dodano 750 µL otopine za ispiranje (*Wash Solution*). Zatim su kolone centrifugirane 1 min na 14000 x g na sobnoj temperaturi. Postupak ispiranja je ponovljen s 250 µL otopine za ispiranje, nakon kojeg su kolone centrifugirane 2 min na 14000 x g. Kolone su prebačene u nove sterilne tubice. Plazmidne DNA eluirane su dodavanjem 50 µL vode bez nukleaza (*Nuclease-Free Water*) u kolone i centrifugiranjem 1 min na 14000 x g. Postupak elucije je ponovljen dodavanjem 50 µL eluata u iste kolone i centrifugiranjem. Time je osigurana bolja elucija i veća konačna koncentracija plazmidnih DNA koje su nakon izolacija spremljene na -20 °C.

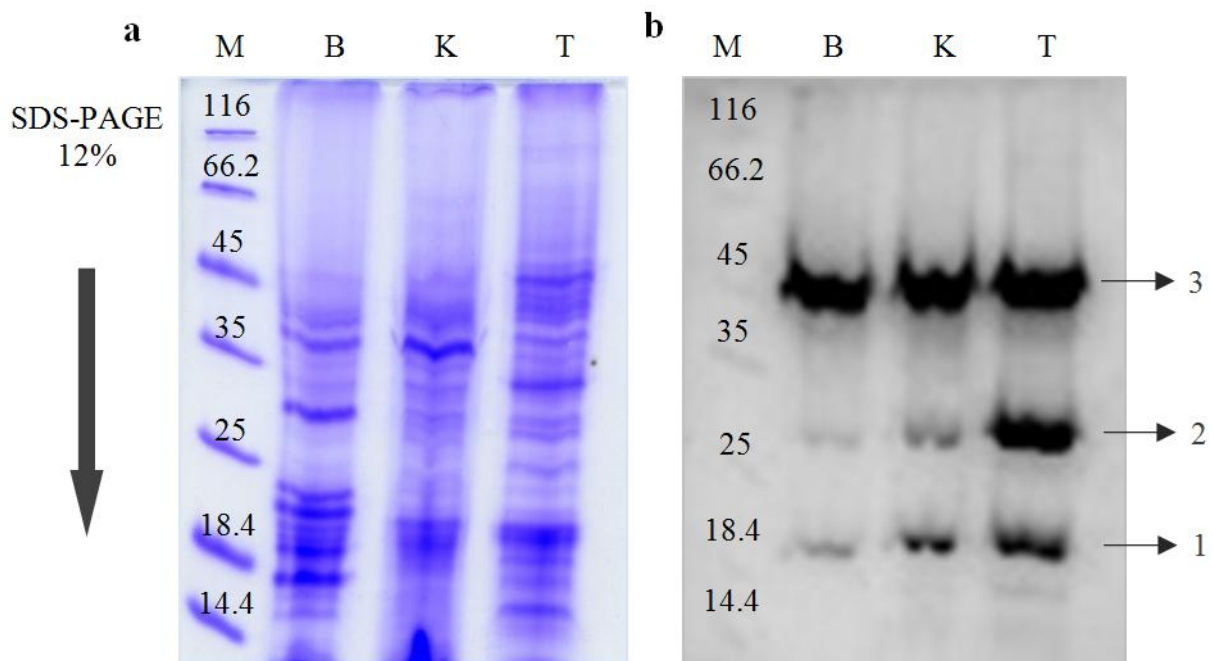
Za sekvenciranje izoliranih i pročišćenih plazmida s DNA insertima korištena je Macrogen-ova (Nizozemska) usluga sekvenciranja *Standard-seq single Regular*. Odabrano je sekvenciranje u oba smjera sa M13F uzvodnim početnicama i M13R nizvodnim početnicama. Nukleotidni sljedovi fragmenata analizirani su programom BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

4. REZULTATI

4.1. Pročišćavanje, razdvajanje i detekcija proteina sličnog proteinu ASR

4.1.1. Razdvajanje kiselih proteina 1D SDS-PAG elektroforezom i detekcija na membrani

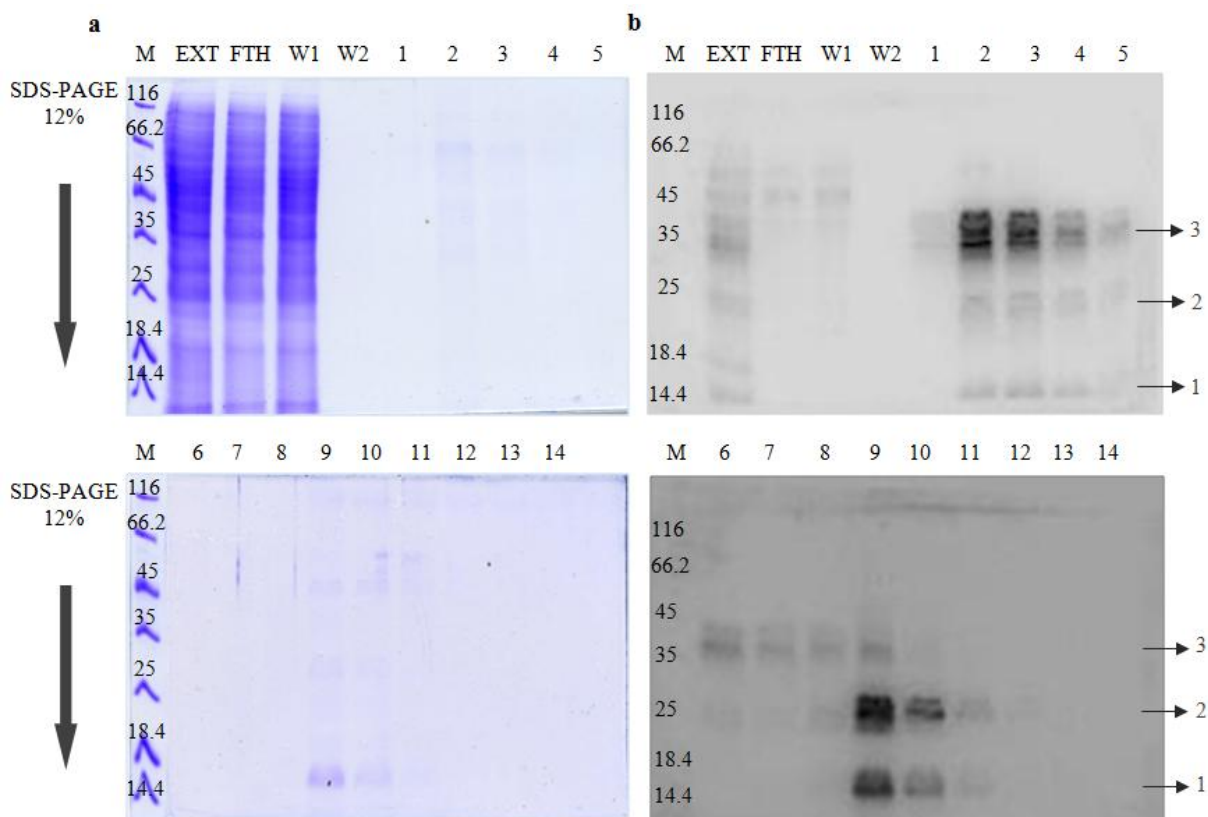
Slika 2a prikazuje proteinski profil kiselih proteina koji su izolirani iz normalnih izdanaka, kalusnog i tumorskog tkiva kaktusa te razdvojeni 1D SDS-PAG elektroforezom i vizualizirani bojom CBB. Kiselim ekstrakcijom izoliran je velik broj kiselih proteina, stoga je za detekciju proteina sličnog proteinu ASR korišten prijenos, a proteini slični proteinu ASR vizualizirani su na membrani antitijelom α ASR1. U svim tkivima uočene su tri proteinske vrpce od oko 18 kDa, 25 kDa i 40 kDa (Slika 2b). Najveća ekspresija vidljiva je kod proteina u vrpce 3 (~40 kDa) koja je jednakim intezitetom prisutna u svim tkivima. Nadalje, može se uočiti da su proteini u vrpce 1 (~18 kDa) i 2 (~25 kDa), koji imaju slabiju ekspresiju od proteina u vrpce 3, najizraženiji u tumorskom tkivu, odnosno da je najveća ekspresija proteina sličnih proteinu ASR prisutna u tumorskom tkivu. Ekspresija proteina u vrpce 1 i 2 slabija je u kalusnom tkivu za razliku od tumorskog tkiva, dok je u normalnim izdancima slabo eksprimirana.



Slika 2. Kiseli proteini izolirani iz normalnih izdanaka (B), kalusnog (K) i tumorskog (T) tkiva kaktusa razdvojeni 1D SDS-PAG elektroforezom. a) Vizualizacija proteina bojom CBB. b) Detekcija proteina na membrani antitijelom α ASR1 označena brojevima 1-3. M označava biljeg molekularskih masa (kDa).

4.1.2. Razdvajanje topivih proteina pročišćenih pomoću Ni-NTA agarozne kolone 1D SDS-PAG elektroforezom i detekcija na membrani

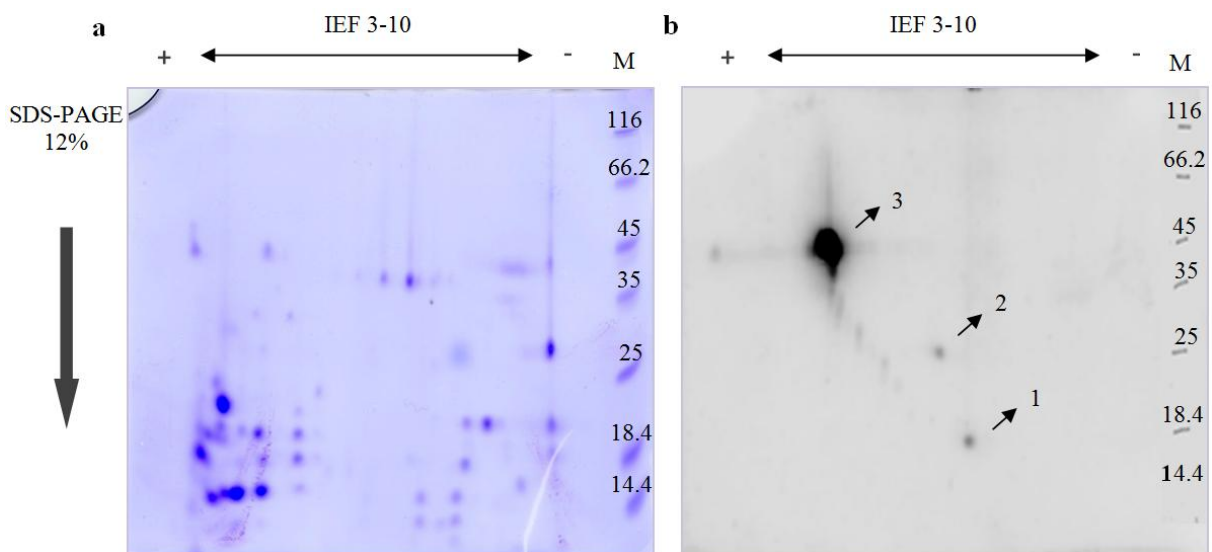
Sve sakupljene frakcije dobivene pročišćavanjem ukupnih topivih proteina tumorskog tkiva pomoću Ni-NTA agarozne kolone, razdvojeni su 1D SDS-PAG elektroforezom i vizualizirani bojom CBB. Vidljivo je da se već prvim ispiranjem kolone puferom za ispiranje (W1) uklanjaju gotovo svi proteini nespecifično vezani za agarozu (Slika 3a). Proteini sa linearnim slijedom histidinskih ostataka počinju se eluirati u frakcijama od 2-11 s povećanom koncentracijom imidazola, što potvrđuje rezultat ekspresije proteina sličnog proteinu ASR na membrani (Slika 3b). Prvo se eluira najveći protein koji pripada vrpce 3 (~40 kDa) u frakcijama od 2-4 korištenjem 50 mM imidazola, a zatim se zajedno eluiraju proteini vrpce 1 i 2 (~18 i ~25 kDa) u frakcijama od 9-11 korištenjem 125 mM imidazola.



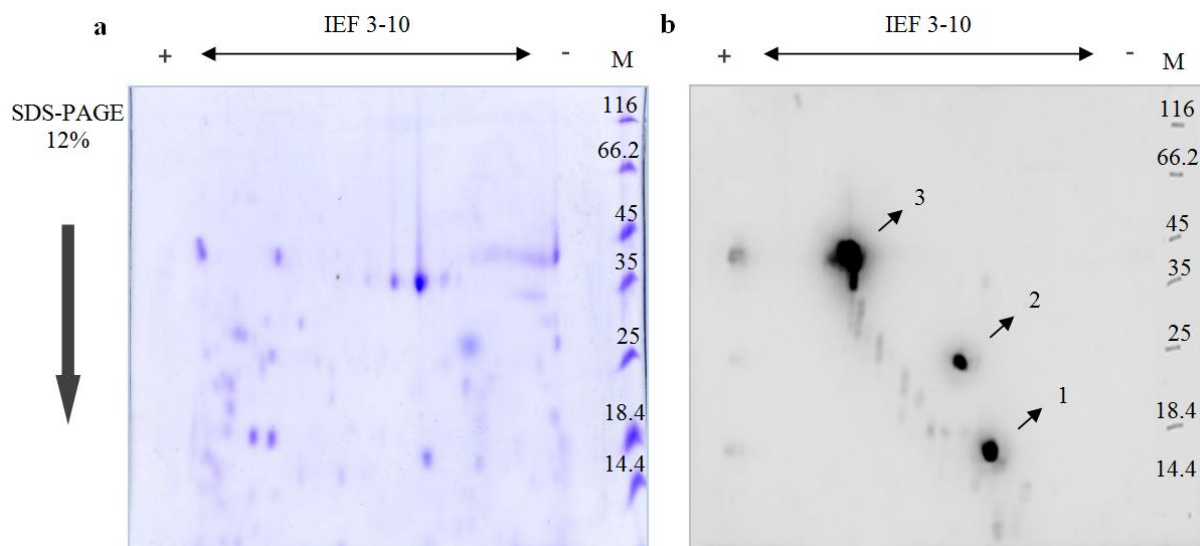
Slika 3. Ukupni topivi proteini tumorskog tkiva pročišćeni Ni-NTA agarozom razdvojeni 1D SDS-PAGE elektroforezom. a) Vizualizacija proteina bojom CBB. b) Detekcija proteina na membrani antitijelom α ASR1 označena brojevima 1-3. Na gel su naneseni: ukupni topivi proteini tumorskog tkiva (EXT), proteini koji se nisu vezali na afinitetnu kolonu nakon nanošenja proteinskog ekstrakta tumorskog tkiva i tijekom njihovog pročišćavanja (FTH), proteini koji su se slabo ili nespecifično vezali za kolonu te su isprani s kolone dva puta u puferu za ispiranje (W1, W2) te proteini slični proteinu ASR koji su se isprali s kolone u puferu za eluciju (1-14). M označava biljeg molekulske mase (kDa).

4.1.3. Razdvajanje kiselih proteina 2D SDS-PAG elektroforezom i detekcija na membrani

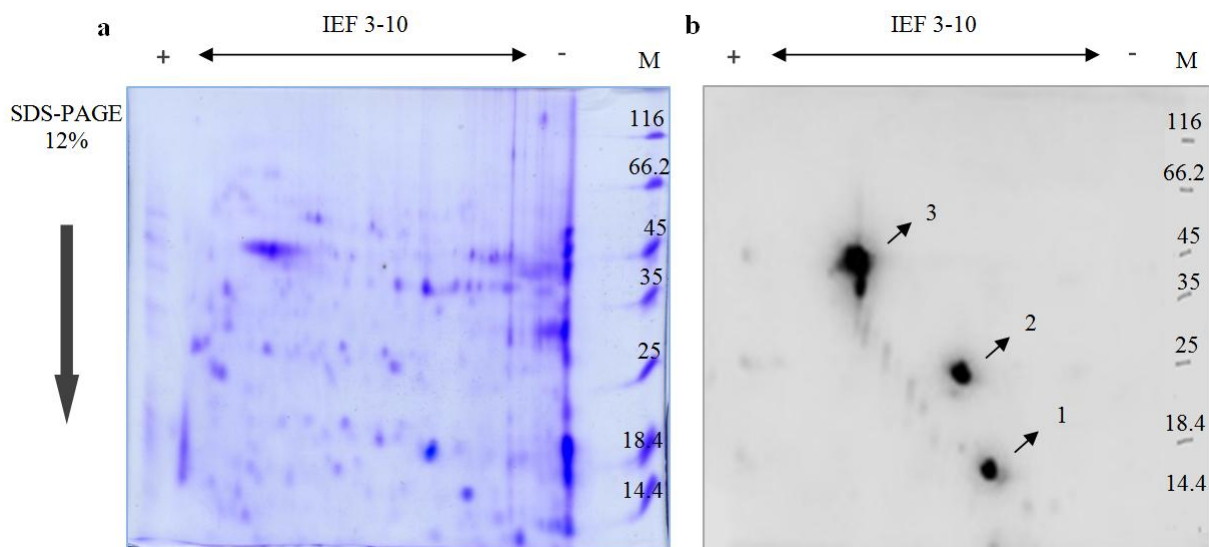
Radi boljeg razlučivanja velikog broja izoliranih kiselih proteina iz normalnih izdanaka, kalusnog i tumorskog tkiva, proteini su razdvojeni 2D SDS-PAG elektroforezom na temelju naboja i molekulske mase, te vizualizirani bojom CBB (Slika 4a, 5a i 6a). Prijenosom na membranu i detekcijom antitijelom α ASR1 uočene su tri proteinske mrlje označene brojevima (Slika 4b, 5b i 6b). Najveća ekspresija proteina vidljiva je u proteinskoj mrlji 3 (~40 kDa) koja ima kiselu izoelektričnu točku pI i jednako je eksprimirana u svim tkivima. Proteinsku mrlju 2 (~25 kDa) nalazimo u neutralnom pH području i najjače je eksprimirana u tumoru, slabije u kalusu i najslabije u normalnim izdancima. Proteinska mrlja 1 (~18 kDa) ima lužnatu izoelektričnu točku pI i podjednako je eksprimirana u tumoru i kalusu, a slabije u normalnim izdancima. Ovi rezultati se podudaraju s rezultatima razdvajanja proteina 1D SDS-PAG elektroforezom.



Slika 4. Kiseli proteini ekstrahirani iz normalnih izdanaka kaktusa razdvojeni 2D SDS-PAG elektroforezom. a) Vizualizacija proteina bojom CBB. b) Detekcija proteina na membrani antitijelom α ASR1 označena brojevima 1-3. M označava biljeg molekulske mase (kDa).



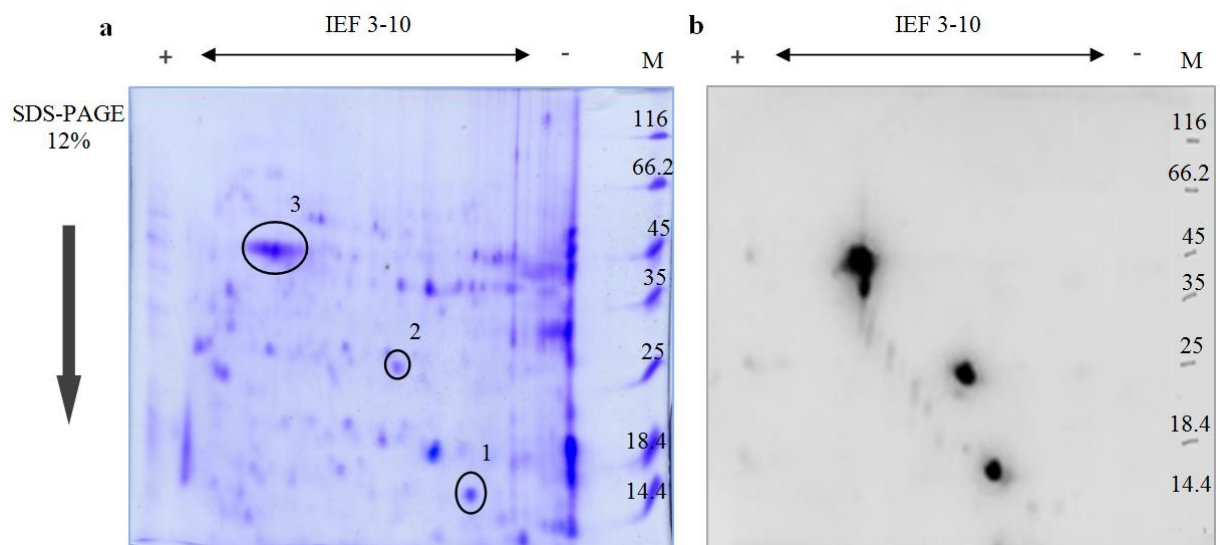
Slika 5. Kiseli proteini ekstrahirani iz kalusnog tkiva kaktusa razdvojeni 2D SDS-PAG elektroforezom. a) Vizualizacija proteina bojom CBB. b) Detekcija proteina na membrani antitijelom α ASR1 označena brojevima 1-3. M označava biljeg molekulske masa (kDa).



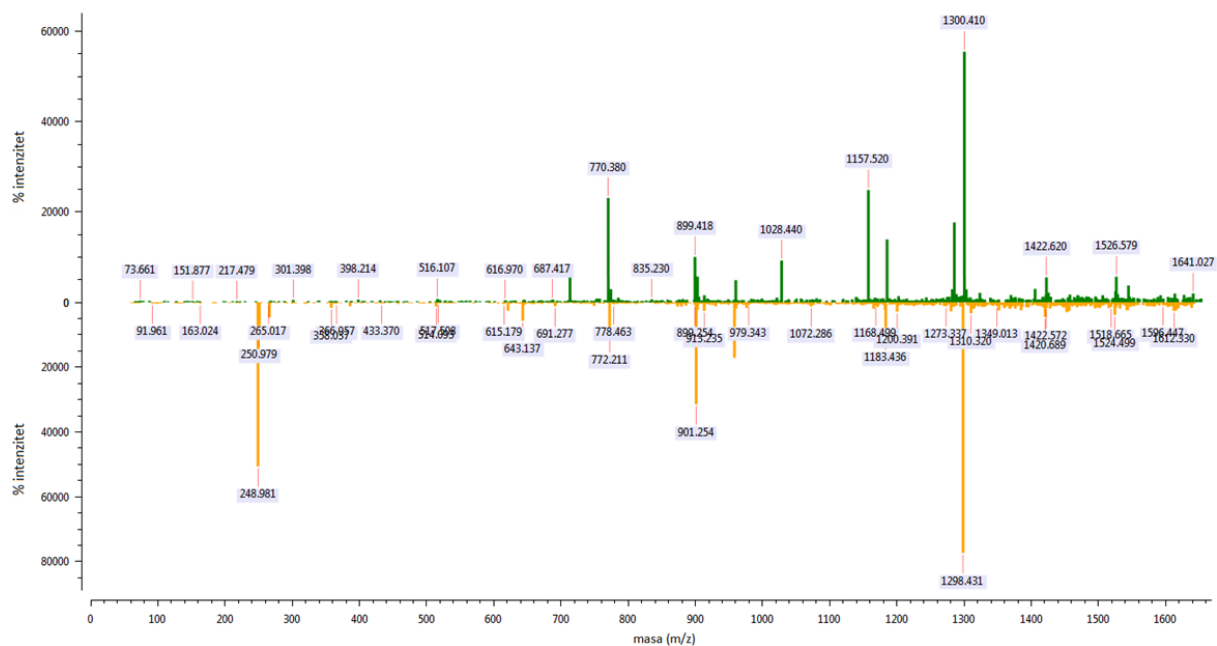
Slika 6. Kiseli proteini ekstrahirani iz tumorskog tkiva kaktusa razdvojeni 2D SDS-PAG elektroforezom. a) Vizualizacija proteina bojom CBB. b) Detekcija proteina na membrani antitijelom α ASR1 označena brojevima 1-3. M označava biljeg molekulske masa (kDa).

4.1.4. Identifikacija proteina spektrometrijom masa

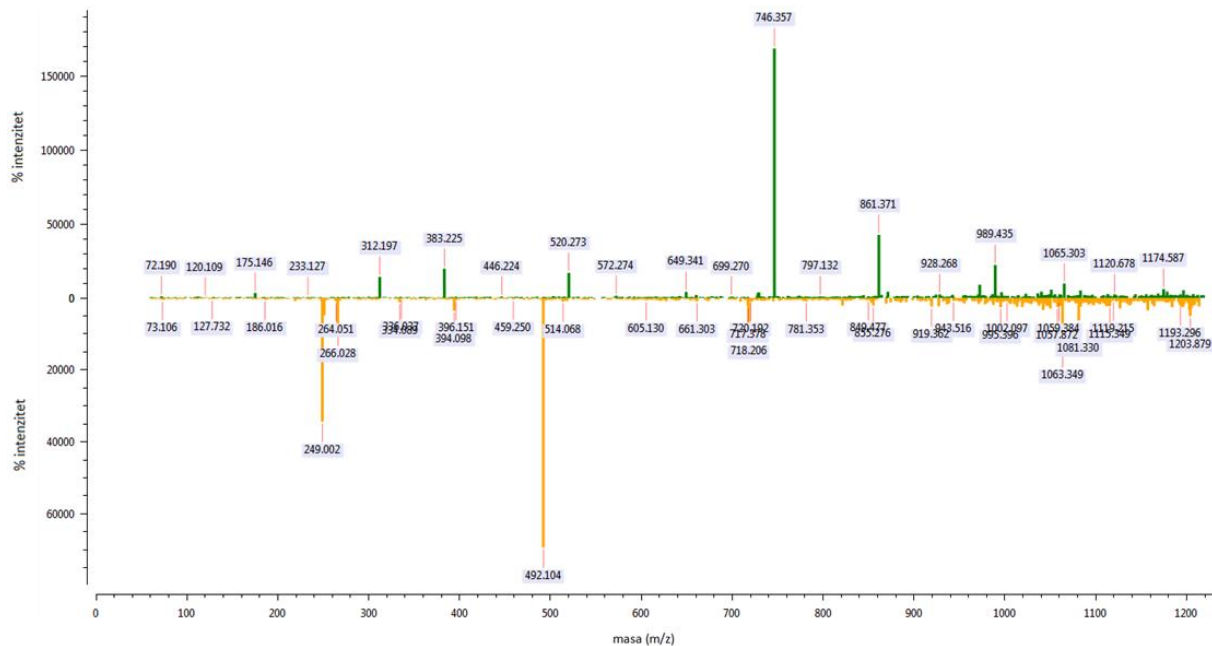
Odabrane proteinske mrlje (Slika 7a) iz tumorskog tkiva analizirane su spektrometrom masa. Proteinskim mrljama (1-3) snimljen je spektar MS, nakon čega su peptidi podvrgnuti dodatnoj fragmentaciji i snimanju spektra MS/MS (primjeri spektra za proteinske mrlje 1, 2 i 3 nalaze se na slikama 8, 9 i 10). Iz tako dobivenih spektara očitane su *de novo* aminokiselinske sekvence peptida. Kako genom kaktusa još nije sekvenciran, proteini su pronađeni usporedbom peptida dobivenih MS/MS analizom sa 16 biljnih vrsta za koje je poznato da imaju protein ASR. Pretraživanjem dobivenih peptida prema 6 biljnih vrsta (duhan, kukuruz, soja, ljiljan, vinova loza i divlja banana *M. itinerans*) nije dalo pozitivan rezultat. Popis proteina u kojima su detektirane *de novo* očitane aminokiselinske sekvence dobivene analizom MS/MS nalazi se u tablici 14, 15 i 16 s pripadajućim pristupnim brojevima, BLAST bodovanjem, molekulskim masama, pI vrijednostima i biljnom vrstom u kojoj su nađeni. Teoretske molekulske mase i pI vrijednosti izračunate su korištenjem alata Compute pI/Mw (ExPASy, https://web.expasy.org/compute_pi/). Pomoću programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) napravljeno je višestruko poravnanje aminokiselinskih sekvenci proteina ASR iz biljnih vrsta u kojima su analizom MS/MS detektirani *de novo* očitani peptidi (Slika 11). Uočava se kako gotovo svi detektirani peptidi odgovaraju konzerviranim dijelovima sekvence proteina ASR. Područje u kojem su peptidi dobiveni analizom MS/MS detektirani u svim vrstama, odgovara samom kraju motiva 1 i početku motiva 2 proteina ASR.



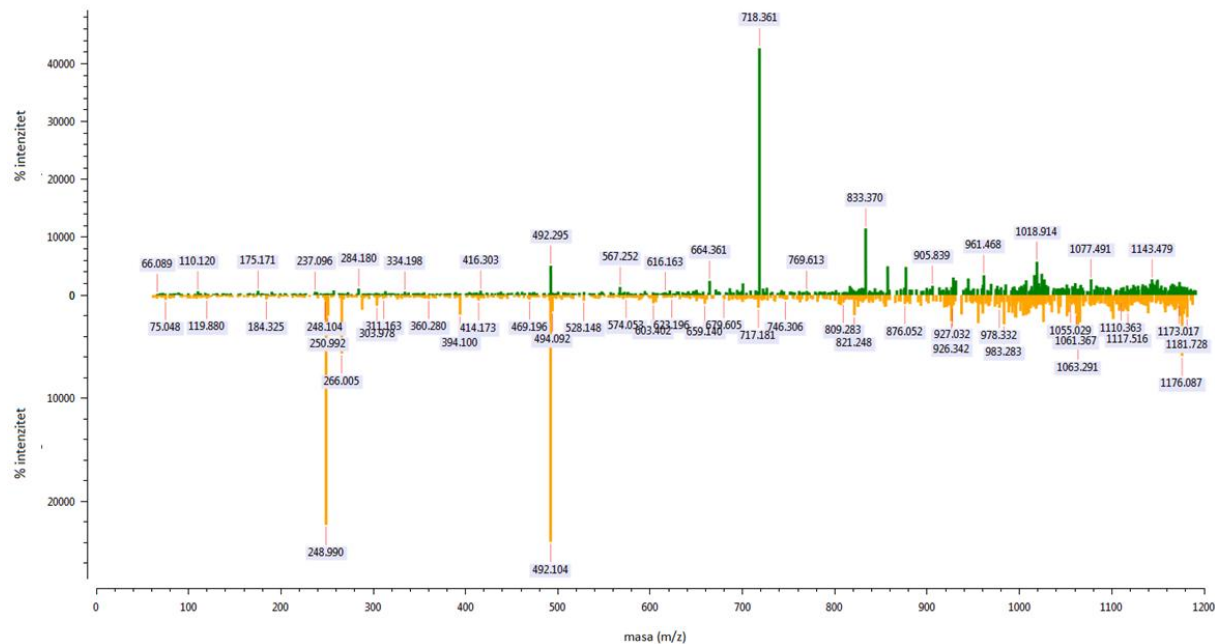
Slika 7. Kiseli proteini ekstrahirani iz tumorskog tkiva kaktusa razdvojeni 2D SDS-PAG elektroforezom. a) Vizualizacija proteina bojom CBB. b) Detekcija proteina na membrani antitijelom α ASR1 kojim su uočene tri proteinske mrlje 1-3 odabrane za analizu MS. M označava biljeg molekulskih masa (kDa).



Slika 8. Prikaz MS/MS (m/z) spektra u pozitivnom (zeleno) i negativnom (narančasto) obliku iona za 1670.7778 peptidni fragment (proteinska mrlja 1 - protein sličan proteinu ASR3, XP_004237807, rajčica).



Slika 9. Prikaz MS/MS (m/z) spektra u pozitivnom (zelena) i negativnom (narančasta) obliku iona za 1237.5707 peptidni fragment (proteinska mrlja 2 - protein sličan proteinu ASR, AAT35818, divlja banana *M. acuminata*).



Slika 10. Prikaz MS/MS (m/z) spektra u pozitivnom (zelena) i negativnom (narančasta) obliku iona za 1209.5026 peptidni fragment (proteinska mrlja 3 - protein sličan proteinu ASR4, NP_001269248, rajčica).

Tablica 14. *de novo* očitane aminokiselinske sekvence peptida dobivene analizom MS/MS u proteinskoj mrlji 1 te popis biljnih vrsta i proteina ASR u kojima su te sekvence prisutne

BROJ NA GELU: 1						
Sekvenca	Bodovanje	Biljna vrsta	Protein	Pristupni broj (NCBI)	Masa proteina (kDa)	pI
KEEEGGPADPEK	0.002	<i>Solanum lycopersicum</i>	PREDICTED: abscisic stress-ripening protein 3-like	XP_004237807	12.11	9.37
DPENAHHHK	3.18 ⁻⁶	<i>Suaeda liaotungensis</i>	Abscisic acid stress ripening-related protein	AGZ20206	24.94	5.02
DPENAHHHK	1.92 ⁻⁵	<i>Salicornia brachiata</i>	Abscisic acid stress ripening protein	ACI15208, AIY55327	21.01	5.30
DPENAHHHK	0.000222	<i>Litchi chinensis</i>	Abscisic acid senescence and ripening inducible protein	AGA37173	17.25	6.10
DPENAHHHK	0.002	<i>Oryza sativa</i>	Abscisic stress ripening protein	AHI88412, AHI88413, AHI88414, AHI88415, AHI88416, AHI88417	15.46	6.20
DPENAHHHK	0.005	<i>Musa balbisiana</i>	Abscisic stress ripening	ACZ50752	16.77	5.81
DPENAHHHK	0.006	<i>Citrus maxima</i>	ASR	AAA82741	10.87	6.03

Tablica 15. *de novo* očitane aminokiselinske sekvence peptida dobivene analizom MS/MS u proteinskoj mrlji 2 te popis biljnih vrsta i proteina ASR u kojima su te sekvence prisutne

BROJ NA GELU: 2						
Sekvenca	Bodovanje	Biljna vrsta	Protein	Pristupni broj (NCBI)	Masa proteina (Da)	pI
KDPEHAHR	2.92 ⁻⁵	<i>Suaeda liaotungensis</i>	Abscisic acid stress ripening-related protein	AGZ20206	24.94	5.02
KDPEHAHR	0.000177	<i>Salicornia brachiata</i>	Abscisic acid stress ripening protein	ACI15208, AIY55327	21.01	5.30
KDPEHAHK	0.000722	<i>Litchi chinensis</i>	Abscisic acid senescence and ripening inducible protein	AGA37173	17.25	6.10
KDPEHAH	0.0005	<i>Musa balbisiana</i>	Abscisic stress ripening	ACZ50752	16.77	5.81
KDPEHAH	0.002	<i>Camellia sinensis</i>	Abscisic stress-ripening protein ASR	AHI09608	19.89	5.69
KDPEHAH	0.007	<i>Musa acuminata</i>	Abscisic stress ripening protein-like protein	AAT35818	16.26	5.99
KDPEHAH	0.008	<i>Citrus maxima</i>	ASR	AAA82741	10.87	6.03

Tablica 16. *de novo* očitane aminokiselinske sekvence peptida dobivene analizom MS/MS u proteinskoj mrlji 3 te popis biljnih vrsta i proteina ASR u kojima su te sekvence prisutne

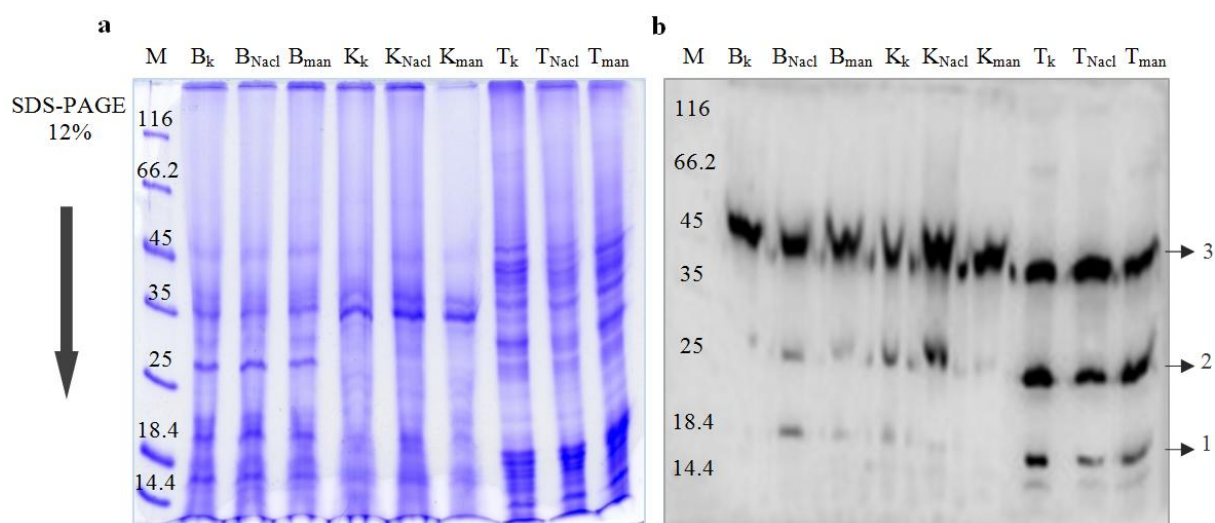
BROJ NA GELU: 3						
Sekvenca	Bodovanje	Biljna vrsta	Protein	Pristupni broj (NCBI)	Masa proteina (Da)	pI
KDPEHAHK	4.37 ⁻⁵	<i>Musa balbisiana</i>	Abscisic stress ripening	ACZ50752	16.77	5.81
KDPEHAHK	0.00016	<i>Camellia sinensis</i>	Abscisic stress-ripening protein ASR	AHJ09608	19.89	5.69
KDPEHAHK	0.006	<i>Solanum lycopersicum</i>	ASR 4	NP_001269248, AAY98032	33.00	4.95
KDPEHAHK	0.006	<i>Solanum lycopersicum</i>	ASR 2	NP_001307920, ABY84857, CAA52873, P37219	12.95	6.78
KDPEHAHK	0.006	<i>Solanum lycopersicum</i>	ASR 1	Q08655, AAA34137, AAB64185, NP_001234137	12.55	6.48
KDPEHAHK	0.006	<i>Solanum lycopersicum</i>	ASR	AAC61780, AAA99440		
KDPEHAHK	0.006	<i>Solanum tuberosum</i>	cold inducible; similar to other osmotic stress induced gene products	AAD00254	12.43	6.45
KDPEHAHK	0.006	<i>Solanum tuberosum</i>	Fruit-ripening protein-like	ABB55381	12.43	6.57
KDPEHAHK	0.0006	<i>Musa acuminata</i>	Abscisic stress ripening protein-like protein	AAT35818	16.26	5.99
KDPEHAHK	0.000722	<i>Litchi chinensis</i>	Abscisic acid senescence and ripening inducible protein	AGA37173	17.25	6.10
KDPEHAH	0.003	<i>Citrus maxima</i>	ASR	AAA82741	10.87	6.03
GGYGSTE	0.000389	<i>Suaeda liaotungensis</i>	Abscisic acid stress ripening-related protein	AGZ20206	24.94	5.02
GSNDAGR	0.002	<i>Suaeda liaotungensis</i>	Abscisic acid stress ripening-related protein	AGZ20206	24.94	5.02
TGGGYGSTD	0.00014	<i>Suaeda liaotungensis</i>	Abscisic acid stress ripening-related protein	AGZ20206	24.94	5.02
GGYGSTEGNR	4.99 ⁻⁵	<i>Salicornia brachiata</i>	Abscisic acid stress ripening protein	ACII5208, AIY55327	21.01	5.30
GGYGSTEGGR	8.58 ⁻⁵	<i>Salicornia brachiata</i>	Abscisic acid stress ripening protein	ACII5208, AIY55327	21.01	5.30
DTTGGGYGSTD	0.000456	<i>Salicornia brachiata</i>	Abscisic acid stress ripening protein	ACII5208, AIY55327	21.01	5.30
YGSET-GGYGSTE	5.5 ⁻⁸	<i>Suaeda liaotungensis</i>	Abscisic acid stress ripening-related protein	AGZ20206	24.94	5.02
ETGGYGSTEGNR	4.28 ⁻⁵	<i>Salicornia brachiata</i>	Abscisic acid stress ripening protein	ACII5208, AIY55327	21.01	5.30
TSTGGGYGYGGA	0.001	<i>Salicornia brachiata</i>	Abscisic acid stress ripening protein	ACII5208, AIY55327	21.01	5.30
YGTDTGG-YGSTE	3.54 ⁻⁶	<i>Suaeda liaotungensis</i>	Abscisic acid stress ripening-related protein	AGZ20206	24.94	5.02
YGSETGGYGSTEG	4.28 ⁻⁵	<i>Salicornia brachiata</i>	Abscisic acid stress ripening protein	ACII5208, AIY55327	21.01	5.30
TEATGGGYGYGGA	0.000477	<i>Salicornia brachiata</i>	Abscisic acid stress ripening protein	ACII5208, AIY55327	21.01	5.30
TTGGG-YGSTDAGGG	6.83 ⁻⁶	<i>Salicornia brachiata</i>	Abscisic acid stress ripening protein	ACII5208, AIY55327	21.01	5.30
YGTDTGGYGSTEGGG	8.8 ⁻⁹	<i>Salicornia brachiata</i>	Abscisic acid stress ripening protein	ACII5208, AIY55327	21.01	5.30

BROJ NA GELU: 3

Sekvenca	Bodovanje	Biljna vrsta	Protein	Pristupni broj (NCBI)	Masa proteina (Da)	pI
YGSETGGYGSTEGGG	7.89^{-7}	<i>Salicornia brachiata</i>	Absciscic acid stress ripening protein	ACI15208, AIY55327	21.01	5.30
YASDTGGYGSTEGGG	1.58^{-6}	<i>Salicornia brachiata</i>	Absciscic acid stress ripening protein	ACI15208, AIY55327	21.01	5.30
YGSDDTTGGGYGSTD	1.2^{-6}	<i>Suaeda liaotungensis</i>	Absciscic acid stress ripening-related protein	AGZ20206	24.94	5.02
YGESTGGYGSTEGGG	0.008	<i>Camellia sinensis</i>	Absciscic stress-ripening protein ASR	AHJ09608	19.89	5.69
YGSDDTTGGGYGSTDKT	3.01^{-7}	<i>Suaeda liaotungensis</i>	Absciscic acid stress ripening-related protein	AGZ20206	24.94	5.02

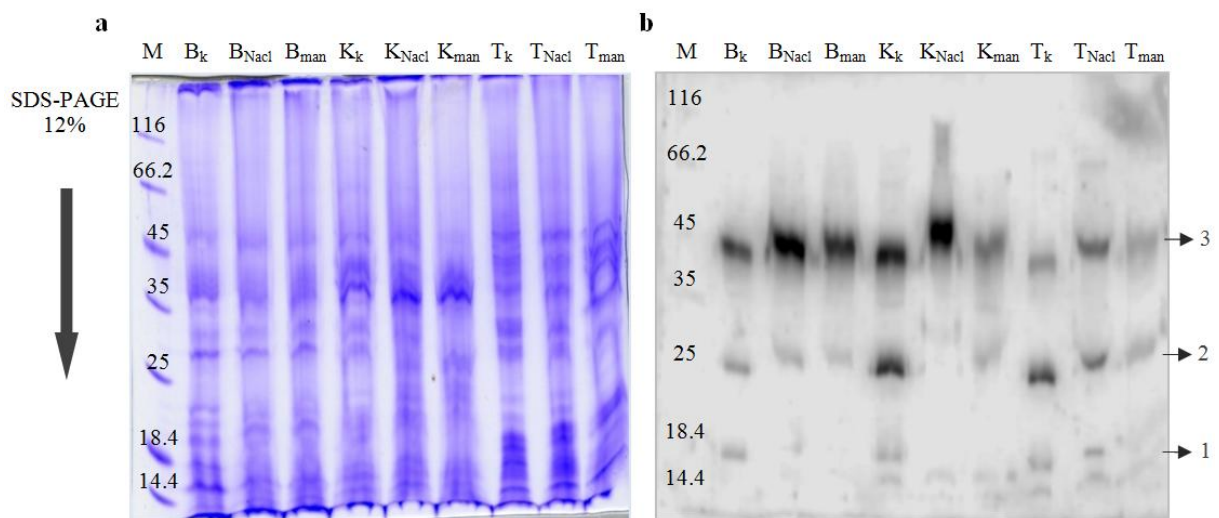
4.2. Utjecaj solnog i osmotskog stresa na ekspresiju proteina sličnog proteinu ASR

S obzirom da je u prethodnim rezultatima dokazano postojanje proteina sličnog proteinu ASR u svim tkivima kaktusa, te da se radi o proteinu kojeg između ostalog inducira i abiotički stres, ispitan je utjecaj solnog (NaCl) i osmotskog (manitol) stresa na promjenu ekspresije proteina sličnog proteinu ASR u normalnim izdancima, kalusnom i tumorskom tkivu kaktusa u odnosu na kontrolne uzorke. Nakon tretmana normalnih izdanaka kaktusa sa 250 mM NaCl-om ili 500 mM manitolom u trajanju od 1 dana uočeno je povećanje ekspresije proteina sličnog proteinu ASR i to, znatnije izraženo u tretmanu s NaCl-om (Slika 12b). Također, isti uzorak ekspresije javlja se i kod kalusnog tkiva u tretmanu s NaCl-om, dok u tretmanu s manitolom pokazuje smanjenje ekspresije proteina u vrpcama 1 i 2. U tumorskom tkivu ekspresija svih proteinskih vrpca ostaje nepromijenjena u jednodnevnim tretmanima s NaCl-om ili manitolom, osim proteina u vrpca 1 koji pokazuje blago smanjenje ekspresije u navedenim tretmanima. Ekspresija proteina sličnog proteinu ASR nakon izlaganja solnom i osmotskom stresu najizraženija je u tumorskom tkivu.



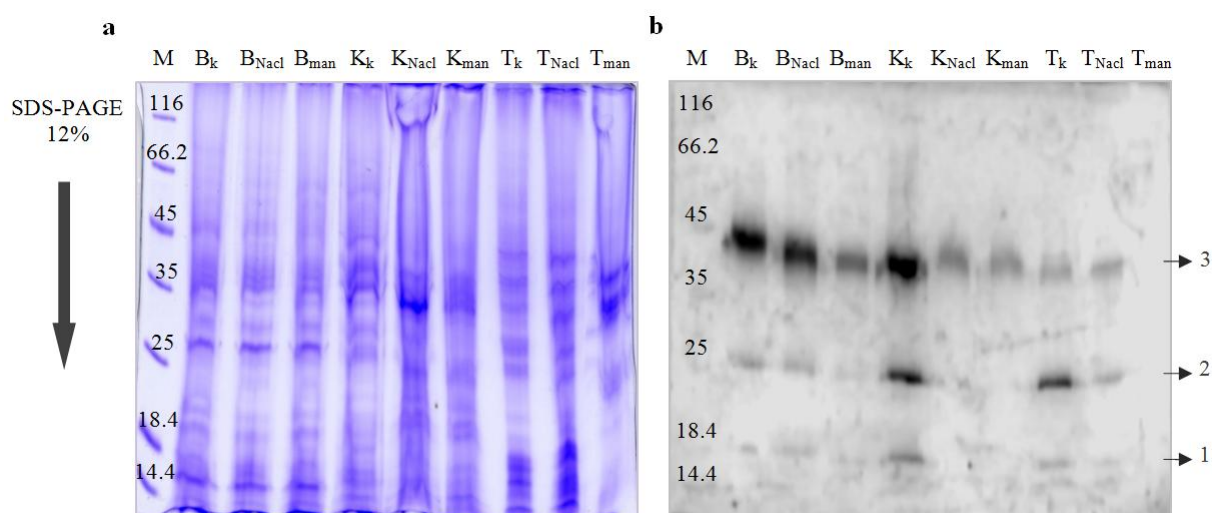
Slika 12. Kiseli proteini ekstrahirani iz normalnih izdanaka (B), kalusnog (K) i tumorskog (T) tkiva kaktusa nakon prvog dana tretmana s NaCl-om ili manitolom (man). Kiseli proteini kontrolnog (k) i tretiranog tkiva razdvojeni 1D SDS-PAG elektroforezom. a) Vizualizacija proteina bojom CBB. b) Detekcija proteina na membrani antitijelom α ASR1 označena brojevima 1-3. M označava biljeg molekularnih masa (kDa).

Nakon četvrtog dana tretmana, uzorak ekspresije proteina sličnog proteinu ASR u normalnim izdancima kaktusa razlikuje se ovisno o tretmanu (Slika 13b). Protein u vrpici 3 pokazuje povećanje ekspresije u tretmanu s NaCl-om ili manitolom u odnosu na kontrolne uzorke, protein u vrpici 2 ostaje nepromijenjene ekspresije, dok ujedno dolazi do gubitka ekspresije proteina u vrpici 1. U kalusnom tkivu izloženom manitolu dolazi do smanjenja ekspresije svih proteinskih vrpki. Tretman kalusnog tkiva s NaCl-om rezultira povećanjem ekspresije proteina u vrpici 3, ali i potpuni gubitak ekspresije proteina u vrpici 2. Iako je ekspresija proteinskih vrpki u tumorskom tkivu ostaje nepromijenjena nakon izlaganja solnom stresu, do smanjenja ekspresije dolazi nakon izlaganja osmotskom stresu.



Slika 13. Kiseli proteini ekstrahirani iz normalnih izdanaka (B), kalusnog (K) i tumorskog (T) tkiva kaktusa nakon četvrtog dana tretmana s NaCl-om ili manitolom (man). Kiseli proteini kontrolnog (k) i tretiranog tkiva razdvojeni 1D SDS-PAG elektroforezom. a) Vizualizacija proteina bojom CBB. b) Detekcija proteina na membrani antitijelom α ASR1 označena brojevima 1-3. M označava biljeg molekularnih masa (kDa).

Na slici 14b vidljivo da nakon sedmog dana tretmana dolazi do smanjenja ili potpunog gubitka ekspresije proteina sličnog proteinu ASR u tkivima kaktusa u odnosu na kontrolne uzorke. U normalnim izdancima nije vidljiva promjena proteinske ekspresije u tretmanu NaCl-om, dok u tretmanu s manitolom dolazi do smanjenja svih proteinskih vrpca. Kalusno tkivo izloženo NaCl-u ili manitolu, pokazuje smanjenje ekspresije proteina u vrpca 3 i potpuni gubitak ekspresije proteina u vrpcama 1 i 2. Tumorsko tkivo također pokazuje smanjenu razinu ekspresije svih proteinskih vrpca u tretmanu s NaCl-om. Zanimljivo je da u tumorskom tkivu izloženom 500 mM manitolu dolazi do potpunog gubitka proteinske vrpce 1 i 2, pa čak i proteina u vrpca 3 koja je prisutna u svim tkivima pod utjecajem solnog i osmotskog stresa. Nakon sedam dana tretmana vidljive su veće promjene u ekspresiji proteina sličnog proteinu ASR u odnosu na kontrolu, nego u tretmanima s NaCl-om.



Slika 14. Kiseli proteini ekstrahirani iz normalnih izdanaka (B), kalusnog (K) i tumorskog (T) tkiva kaktusa nakon sedmog dana tretmana s NaCl-om ili manitolom (man). Kiseli proteini kontrolnog (k) i tretiranog tkiva razdvojeni 1D SDS-PAG elektroforezom. a) Vizualizacija proteina bojom CBB. b) Detekcija proteina na membrani antitijelom α ASR1 označena brojevima 1-3. M označava biljeg molekularnih masa (kDa).

4.3. Identifikacija parcijalne cDNA gena sličnog genu *ASR*

4.3.1. Dizajniranje degeneriranih početnica

Iz NCBI baze podataka preuzete su poznate kodirajuće DNA sekvence (cDNA) za protein *ASR* iz: rajčice (808175958), čaja (KF880380.1), pomela (U18972.1), azijske trešnje (430071300), žižule (*Ziziphus nummularia*; KC816463.1), breskve (*Prunus persica*; AF317062.1), marelice (U93164.1), pješčarskog ladoleža (*Calystegia soldanella*; 11994860), divlje banane (*M. acuminata*, 270064319; *M. balbisiana*, 270064309; *M. itinerans*, 270064282), soje (AY382827.1), kaučukovca (*Hevea brasiliensis*; AY221984.1), ljiljana (AF077629.1), riže (AF039573.1), kukuruza (EU164845.1), caklenjače (727346941), primorske trave (KC460335.1), ledka (*Mesembryanthemum crystallinum*; AF054443.1), ginka (AY461715.1) i bora (U67135.1) te je napravljeno poravnanje višestrukih sekvenci (Slika 15) pomoću programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Identificirani su konzervirani motivi 1 i 2 na razini DNA, te su na temelju toga dizajnirane uzvodne F i nizvodne R degenerirane početnice (Tablica 17) koje se vežu za gen *ASR* unutar kodirajućeg područja za motive 1 i 2 (Slika 16).

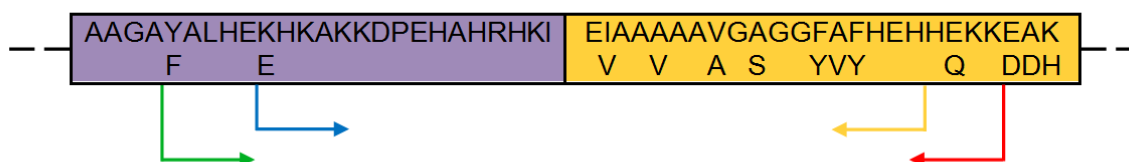
S. lycopersicum	156	ACTGTTGCTGCCGGTGCCTACGCCCTTG	183	CATGAGAACAATGAGGCAAAAGAAAGATCCAGAA
C. sinensis	399	GCTGTTGCTGCTGGCACTTTTGCCCTTG	426	TATGAGAAGCAATCAGTCAAAGAAAGATCCAGAG
C. maxima	112	ACTGCTGGAGCTGGTGTCTTTCTCTCGT	139	CTTGAGAGTCAATAGGCAGAAAAGATCCAGAC
L. chinensis	335	GCTGCTGCTGCCGGTGCCTATGCTCTTG	850	CATGAGAAGCAATAGGCAGGGAAGATCCAGAG
Z. nummularia	732	GCTGCAGCTGCTGGAGCTTTTGCCCTTG	759	CATGAGAAGCAATGAGGCAAAAGAAAGATCCAGAG
P. persica	433	GCTGCTGCTGCTGGTGTCTTTTGCCCTTG	460	CATGAGAAGCAATGAGTCAAAGAAAGATCCAGAG
P. armeniaca	567	GCTGCTGCTGCTGGTGTCTTTTGCCCTTG	594	CATGAGAAGCAATGAGTCAAAGAAAGATCCAGAG
C. soldanella	595	ACTGTCCGCCAGGTGCCTATGCTTTTG	622	TATGAGAAGCAATGAGGCAAAAGAAAGATCCAGAG
M. acuminata	220	GCTGTCCGCCCGGTGCCTTTTGCTCTG	336	TACGAGAAGCAATGAGGCGAAGAAAGATCCCGAT
M. balbisiana	220	GCTGTCCGCCCGGTGCCTTTTGCTCTG	335	TATGAGAAGCAATGAGGCGAAGAAAGATCCCTGAT
M. itinerans	220	GCTGTCCGCCCGGTGCCTTTTGCTCTG	335	TATGAGAAGCAATGAGGCGAAGAAAGATCCCTGAT
G. max	606	GCTGCATCTGCTGCTGCTTACGCCCTTG	633	CATGAGAAGCAATAGGCAGAAAGAAAGATCCAGAG
H. brasiliensis	192	GCTGCTGCTGCTGGCACTTACGCCCTTG	219	CATGAGAAGCAATGCGGCAAAAGAAAGATCCAGAG
L. longiflorum	613	ACGGCCCGGCCCGGTGCCTTTTGCCCTTG	640	TACGAGAAGCAATGAGGCAAAAGAAAGATCCCGAG
O. sativa	275	GCCCTCGCCCGCGGCCGCTTCGCCCTTG	302	TATGAGAAGCAATGAGGCGAAGAAAGATCCCGGAG
Z. mays	151	GCCATCGCCCGCGGCCGCTACGCTCTG	178	CACGAGAAGCAATAGGCCAAAGAAAGATCCCGGAG
S. brachiata	1337	GCTGTTGCCCTCTGGTGCCTATGCTTTG	2975	TATGAGAAGCAATGAGGCAAAAGAAAGATCCAGAG
S. liaotungensis	554	GCTGTTGCTTCTGGTGCCTATGCTTTG	581	TATGAGAAGCAATCAGCAAAAGAAAGATCCCGGAG
M. crystallinum	232	GCCGTGCTGCTGGTGCCTTTCGCTCTG	259	CATGAGAAGCAATAGATTGAGAAGAAAGATCCAGAG
G. biloba	442	ACCATGGCTGCTGGAGCCTATGCAATG	469	TATGAGAACAATGAGCAAAAGAAAGATCCCGGAG
P. taeda	301	ACTGTGGCTGCTGGAGCCTTTGCACTC	328	CACGAGAAGCAATGCATCGAAGAAAGATCCAGAG
S. lycopersicum	215	CATGCACACAAACACRAGATAGAGGAAGAGATAGCAGCAGCTGCTGCAGTTGGGGCAGGT		
C. sinensis	459	CATGCCACCAAGCATATAGATAGAGGAAGAGATAGCAGCTGTGGCTGCAGTTGGATCTGGT		
C. maxima	172	CATGCACACAGGCACRAGATAGAGGAGGAGATAGCCCGCCCGCAGGCCCTTTGGATCGGGA		
L. chinensis	883	AACGCTCACRAGCACRAGATACRAGAGGAGATTGCTGCTGCAGCCCGCTGGGAGCCCGGT		
Z. nummularia	792	CATAGTCCACAGGCACRAGATAGAAAGAGGAGGTAGCCCGCAGTGGCTGCAGTTGGATCTGGA		
P. persica	493	CATGCTCACRAGGCACRAGATAGAGGAGGAGATTGCTGCAGCAGCTGCAGTTGGGCTTGGT		
P. armeniaca	627	CATGCTCACRAGGCACRAGATAGAGGAGGAGATTGCTGCAGCAGCTGCAGTTGGGCTTGGT		
C. soldanella	655	AATGCGCACAGGCACRAGATAGAGGAAGAGGTTGCCAGCCCGCTGGCCGTTGGATCAGGT		
M. acuminata	369	CACGCCCAARAGCACRAGATCAGGAGGAGATCGCTGCAGCCGGTGGCCGTTGGCAGCCGA		
M. balbisiana	368	CACGCCCAARAGCACRAGATCAGGAGGAGATCGCTGCAGCCGGTGGCCGTTGGCAGCCGA		
M. itinerans	368	CACGCCCAARAGCACRAGATCAGGAGGAGATCGCTGCAGCCGGTGGCCGTTGGCAGCCGA		
G. max	666	CATGCTCACRAGGCACRAGATAGAAAGAGGAGGTTGCAGCAGCAGCTGCAGTTGGGATCTGGT		
H. brasiliensis	252	CATGCCATGGGCACRAGATAAAAGAGGAGGTAGCTGCAGCCGGTGCRAATAGGAGCTGGG		
L. longiflorum	673	CACGCCCAARAGCACRAGATAGGAGGAGGAGATTGCCCGCAGCTGCAGCTGCCGGGGCTTGA		
O. sativa	335	AACGGCACAGGCACRAGATCAGGAGGAGATCGCCGCCACGGCCCGGCTGGCCGCGCCG		
Z. mays	210	AACGAGCACCGCCACCGGGTCAAGGAGGAGGTTGGCCCGCCGCTGCCCGCCGTTGGGCTCCGCC		
S. brachiata	3007	AATGCCCAARAGCACRAGATAGCTGAAGAGGATTCGGCTGTGGGAGCGGTTGCATCAGGT		
S. liaotungensis	614	AATGCCCAARAGCACRAGATAGCAGAAGAGGTTAGCAGCCGTTGGAGCCGCTGCCCTCTGGT		
M. crystallinum	292	CATGCCCAARAGCACRAGATAGAGGAGGAAATCGCAGCAGCCGGCTGCCGCTGGGGCCGCT		
G. biloba	502	CATGCCCAARAGCACRAGATAGAGGAGGAGGTTGCAGCAGCAGCTGCCTGTGGGTGCAGGT		
P. taeda	361	AACGCTCACAGGCACRAGATTAGGAGGAGATAGCTGCAGCAGCTGCAGTTGGGAGCAGGG		
S. lycopersicum	275	GGATTGCAATCCATGAGCATCATGAGAAAAAATGATGCCAAGAAAGAGA		
C. sinensis	519	GGGTATGCATCCATGAGCATCATGAGAAAGAAATGCCAAGGAAGAGA		
C. maxima	232	GGATTGCGTTCCACGAGCACCATGAGAAAGAAATGAGCCAAAGGAAGAGA		
L. chinensis	943	GGATTGCGCTCCATGAGCACCATGAGAAAGAAATGAGCCAAAGGAAGAGA		
Z. nummularia	851	GGTTTTGCCCTTGCATGAGCATCATGATAGAAAGSAGGCTAAGGAACRAGA		
P. persica	553	GGGTTTGCCTCCATGAGCATCATGAGAAAGAAATGAGCCAAAGGAAGAGA		
P. armeniaca	607	GGGTTTGCCTCCATGAGCATCATGAGAAAGAAATGAGCCAAAGGAAGAGA		
C. soldanella	715	GGATTGCAATCCATGAGCATCATGAGAAAGAAATGAGACTAAGGAGGAGA		
M. acuminata	429	GGCTATGCCTCCACGAGCACCATGAGAAAGAAATGATGCCAAGAACGAGGC		
M. balbisiana	428	GGCTATGCCTCCACGAGCACCATGAGAAAGAAATGATGCCAAGRAAGGAGGC		
M. itinerans	428	GGCTATGCCTCCACGAGCACCATGAGAAAGAAATGATGCCAAGRAAGGAGGC		
G. max	726	GGGTTTGCCTCCATGAACATCATGAGAAAAAATGATGCCAAGGAAGAGA		
H. brasiliensis	312	GGATTGCGCTCCATGAGCATCATGAGAAAGAAATGAGCCAAAGGAAGAGA		
L. longiflorum	733	GGGTACACCTCCATGAGCACCATGAGAAAGAAATGATGCCAAGGAAGAGA		
O. sativa	395	GGCTACGCCCTCCACGAGCACCATGAGAAAGAAATGAGGACCAAGAGCAGGC		
Z. mays	270	GGGTTGCGCTCCACGAGCATCATGAGAAAGAAATGATGCCAAGRAAGCAGGC		
S. brachiata	3067	GGATTGCAATCCATGAGCATCACCCAGAAAAATGATGTTAAGGAAGATAG		
S. liaotungensis	674	GGATTGCGCTCCATGAGCATCATGAGAAAGAAATGATGCCAAGGAAGAGCC		
M. crystallinum	352	GGCTATGCTCCATGAGCACCATGAGAAAGAAATGATGCCAAGGAAGAGAG		
G. biloba	562	GGTTATGCATCCATGAGCACCATGAGAAAGAAATGATGCCAAGGAAGAGGC		
P. taeda	421	GGTTACGCTGCTCCACGAGCATCATGAGAAAGAAATGATGCCAAGGAAGAGA		

Slika 15. Rezultati poravnanja višestrukih sekvenci programom Clustal Omega (prikazane su samo kodirajuće sekvence gena *ASR* za motive 1 i 2). Mjesta vezanja dizajniranih degeneriranih početnica označena su različitim bojom. Zelena = F1 početnica; plava = F2 početnica; crvena = R1 početnica; žuta = R2 početnica.

Tablica 17. Degenerirane početnice za lančanu reakciju polimerazom (PCR)

Početnica	Duljina (nt)	T _m (°C)	Sekvenca početnice
F1	20	52.3	5'-TWYGCYYTGYAYGAGAAGCA
F2	22	52.8	5'-AGAAGCAYVARKCARAGAARGA
R1	24	58.4	5'-AAGGTRCTCGTRGTRSTCTTYTTY
R2	22	60.3	5'-CCTAWRCGDAAGGTRCTCGTRG

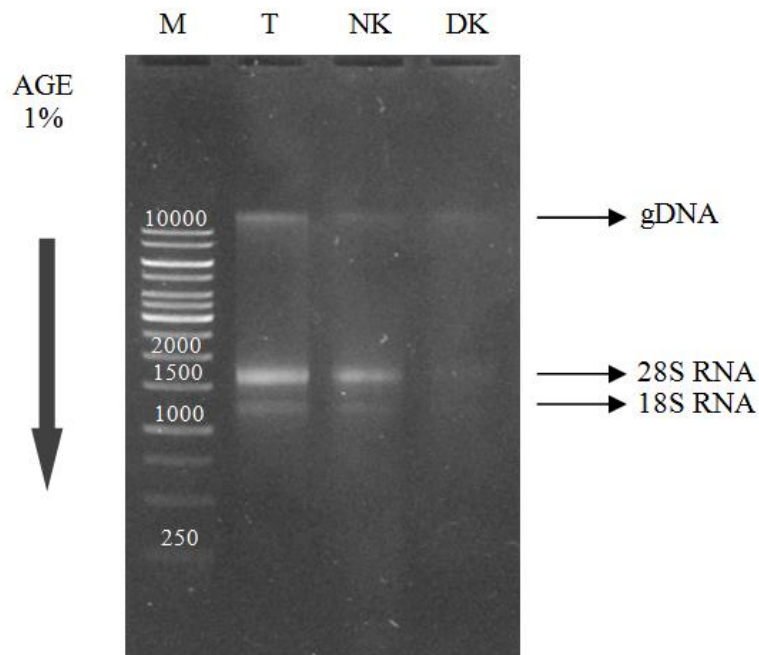
Oznake: **W** (engl. *Weak*) - A ili T; **S** (engl. *Strong*) - G ili C; **K** (engl. *Keto*) - G ili T; **Y** (engl. *pYrimidine*) - T ili C; **R** (engl. *puRine*) - G ili A; **D** (engl. *not C (D comes after C)*) - G, A ili T; **V** (engl. *not T (V comes after T and U)*) - A, C ili G.



Slika 16. Shematski prikaz motiva 1 i 2 proteina ASR s pripadajućom konzerviranom sekvencom (objavljena u Battaglia i sur. 2008). Ljubičastom bojom označen je motiv 1, dok je žutom označen motiv 2. Mjesta vezanja dizajniranih degeneriranih početnica označena su strelicama različite boje. Zelena = F1 početnica; plava = F2 početnica; crvena = R1 početnica; žuta = R2 početnica.

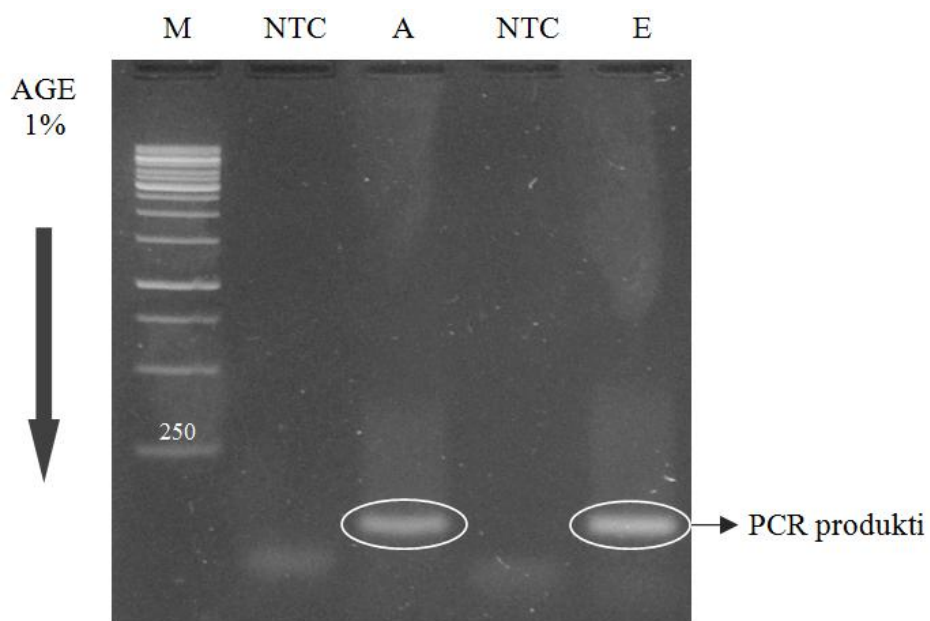
4.3.2. Izolacija ukupne RNA kaktusa i provjera kvalitete dobivene cDNA

Rezultati elektroforeze na agaroznom gelu upućuju na uspješnu izolaciju RNA iz različitih tkiva kaktusa. Uočene su gornje vrpce koje pripadaju kontaminirajućoj gDNA (više od 10 kpb) i donje vrpce 28S rRNA (1.6 kpb) i 18S rRNA (1.2 kpb) (Slika 17). Radi se o kvalitetno provedenoj izolaciji jer se ne uočava degradirana RNA. Kontaminirajuća gDNA eliminirana je u tretmanu s DNazom. Intenzitet obojenja vrpce na agaroznom gelu u skladu je s izmjerenim koncentracijama izolirane RNA iz različitih tkiva kaktusa. S obzirom na najveću izmjerenu koncentraciju RNA (105.6 ng/μL), najintenzivnije obojenje pripadajuće vrpce na gelu i najveću ekspresiju proteina sličnog proteinu ASR, istraživanje je nastavljeno na RNA izoliranoj iz tumorskog tkiva.



Slika 17. Uspješnost izolacije i provjera kvalitete RNA izolirane iz tumorskog tkiva (T), nediferenciranog kalusa (NK) i diferenciranog kalusa (DK) kaktusa *M. gracilis*. M označava DNA marker (pb).

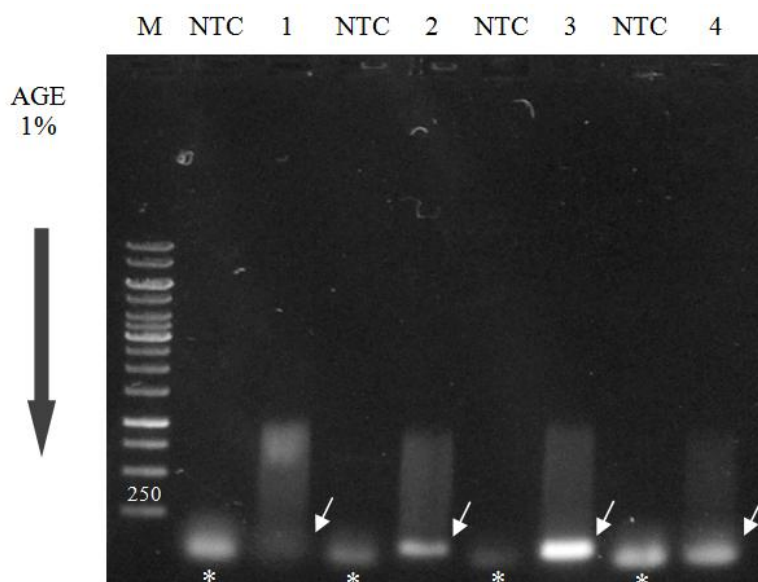
Nakon reverzne transkripcije, kontrolni PCR sa specifičnim početnicama za kontrolne gene *AKT* i *EF1a* iz duhana pokazao je da je reverzna transkripcija uspješno provedena. Vidljivo je da su dobiveni umnoženi PCR produkti kontrolnih gena veličine ~80 pb (Slika 18). Također, dokazano je da se navedeni kontrolni geni iz duhana mogu koristiti i kao kontrolni geni za kaktus.



Slika 18. Provjera kvalitete cDNA dobivene reverznom transkripcijom umnažanjem kontrolnih gena *AKT* (A) i *EF1a* (E). Umnoženi PCR produkti su zaokruženi na prikazu gela. NTC označava negativnu kontrolu, a M označava DNA marker (pb).

4.3.3. Reakcije PCR sa degeneriranim početnicama

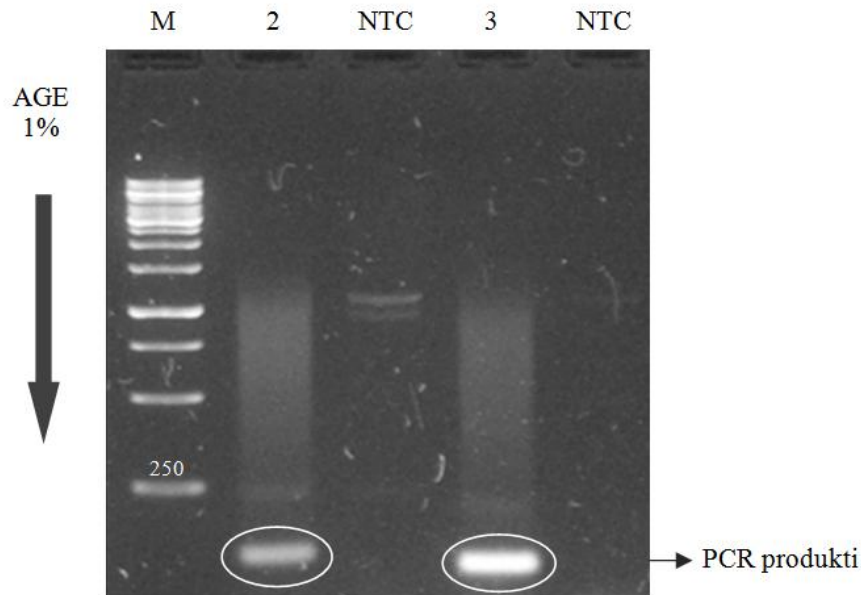
Uočeni su produkti dimerizacije početnica u negativnim kontrolama (NTC) s duljinom manjom od duljine umnoženih PCR produkata sa degeneriranim početnicama (~120 pb) (Slika 19). Dimeri početnica najmanje su prisutni u reakcijama s kombinacijama početnica F1R2 i F2R2. Nadalje, kod fragmenata umnoženih s kombinacijama početnicama F1R2 i F2R2 vidljivo je najintenzivnije obojenje vrpce (~120 pb) na gelu uspoređujući s pripadajućim kontrolama, što je rezultat najspecifičnijeg vezanja istih na cDNA kalup. Usporedbom PCR produkata i njihovih pripadajućih negativnih kontrola (NTC), odabrane su kombinacije početnica koje daju najbolji rezultat - F1R2 i F2R2.



Slika 19. Umnoženi PCR produkti sa degeneriranim početnicama F1R1 (1), F1R2 (2), F2R2 (3) i F2R1 (4) označeni su strelicom. Dimeri početnica označeni su zvjezdicom. NTC označava negativnu kontrolu, a M označava DNA marker (pb).

Nakon drugog PCR-a pri povećanoj temperaturi prijanjanja početnica i skraćenim vremenom elongacije DNA polimerazom uočene su još jasnije definirane vrpce na gelu koje odgovaraju umnoženim PCR produktima sa degeneriranim početnicama. Povećanjem temperature prijanjanja početnica povećana je specifičnost vezanja početnica što dokazuje uspješna eliminacija dimera početnica koji nisu uočeni na gelu. Vidljivo je intenzivnije obojenje vrpce koja odgovara fragmentu umnoženog s početnicama F2R2. Duljina fragmenta koji je umnožen početnicama F1R2 neznatno je veća od fragmenta umnoženog početnicama

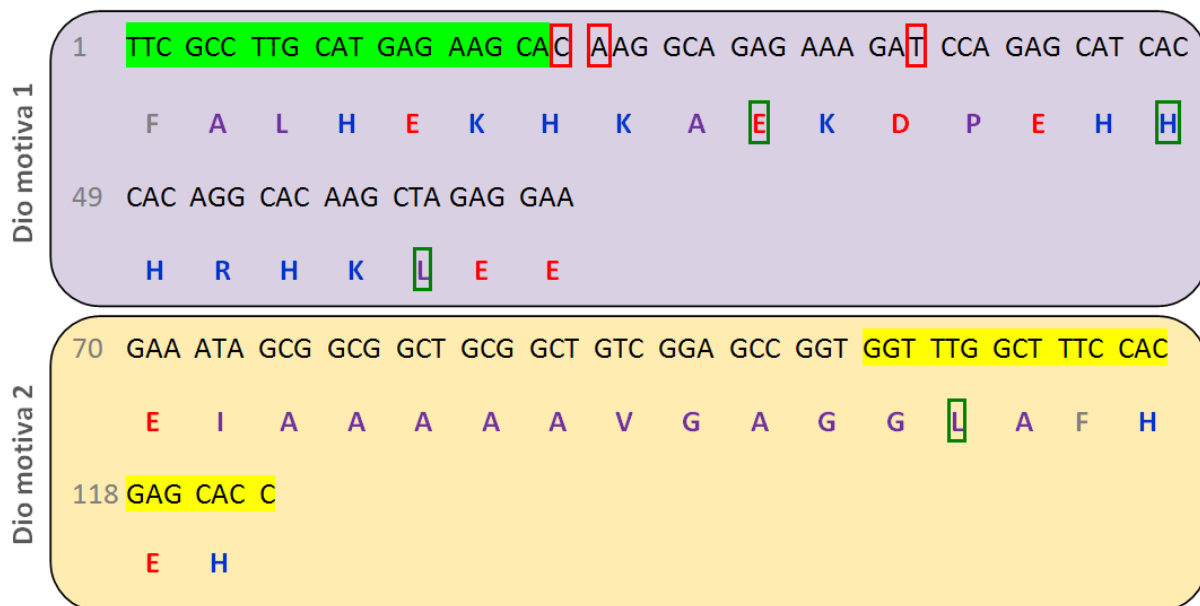
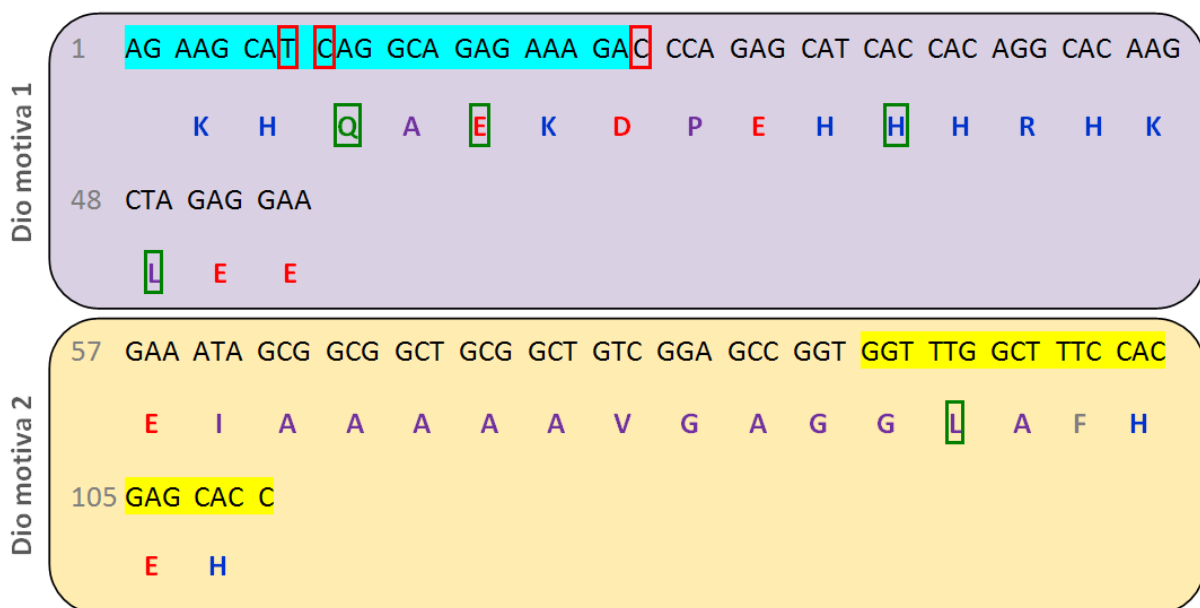
F2R2 zbog samog dizajna početnica (Slika 20). Vrpce koje odgovaraju dobivenim PCR produktima umnoženim početnicama F1R2 ili F2R2 (zaokruženi na slici 20) izrezane su iz gela, a fragmenti DNA su pročišćeni iz gela i ugrađeni u *pGEM[®]-T Easy* plazmid i sekvencirani.



Slika 20. Umnoženi PCR produkti sa degeneriranim početnicama F1R2 (2) i F2R2 (3) nakon drugog PCR-a pri povećanoj temperaturi prijavanja početnica i skraćenim vremenom elongacije polimerazom zaokruženi su na prikazu gela. DNA vrpce odabrane za izrezivanje iz gela su zaokružene. NTC označava negativnu kontrolu, a M označava DNA marker (pb).

4.3.4. Sekvenciranje parcijalne cDNA

Sekvenciranjem plazmida *pGEM[®]-T Easy* u koji je kloniran F1R2 ili F2R2 insert, uočen je slijed nukleotida koji nije prisutan u plazmidu bez ugrađenog inserta. Translacijom dobivenih parcijalnih sekvenci cDNA u pravilnom okviru čitanja uočene su konzervirane aminokiselinske sekvence koje pripadaju motivima 1 i 2 proteina ASR (Slika 21). Između produkta umnoženog F1R2 i F2R2 početnicama vidljive su tri razlike u primarnoj strukturi DNA sekvence koje su vjerojatno nastale zbog degeneriranosti početnica. Nakon translacije dobivenih sekvenci uočena je razlika u jednoj aminokiselini između sekvenci. U odnosu na konzerviranu aminokiselinsku sekvencu (objavljena u Battaglia i sur. 2008), translirane cDNA sekvence razlikuju se u 3-4 aminokiseline.

F1R2**F2R2**

Slika 21. Rezultati sekvenciranja PCR produkta umnoženog F1R2 i F2R2 početnicama. Ljubičastom bojom označen je motiv 1, dok je žutom bojom označen motiv 2. Mjesto vezanja početnica F1, F2 i R2 označene su zelenom, plavom i žutom bojom. Crvenim okvirom označeni su nukleotidi koji se razlikuju između sekvenci koje su dobivene umnažanjem različitim parom početnica. Zelenim okvirom označene su aminokiseline koje se razlikuju prema konzerviranoj sekvenci (Battaglia i sur. 2008). Aminokiseline su označene različitim bojama. Nepolarne aminokiseline: ljubičasta = alifatske, siva = aromatske; Polarne aminokiseline: zelena = nenabijene, plava = pozitivno nabijene; crvena = negativno nabijene.

5. RASPRAVA

U posljednjih 25 godina proteini ASR identificirani su u brojnim biljnim vrstama, od drevnih evolucijskih linija golosjemenjača do dvosupnica i jednosupnica. Široko rasprostranjeni proteini ASR vrlo su važni čimbenici u odgovoru biljaka na stresne uvjete okoliša, posebno u odgovoru na solni i osmotski stres, i upravo zbog toga su predmet istraživanja brojnih znanstvenih grupa unutar interdisciplinarnih istraživanja (González i Iusem 2014). Proteini ASR nisu poznati za porodicu kaktusa koja bi ih mogla imati s obzirom na stresne uvjete prirodnog staništa. Iako kaktus nije komercijalno zanimljiva biljna vrsta u Europi, njene prilagodbe na sušna tla čine je pogodnim organizmom za proučavanje biokemijskih i molekularnih mehanizama tijekom izlaganja solnom i osmotskom stresu (Balen i sur. 2002). Međutim, informacije o proteomu vezane uz odgovor kaktusa na abiotički stres nedostaju (Rogić i sur. 2015).

Proteomske metode kao što su 2D elektroforeza i MS izrazito su korisne za razdvajanje, vizualizaciju i identifikaciju biljnih proteina u odgovoru na stres (Zivy i de Vienne 2000). Identifikacija takvih proteina vodi do otkrivanja eksprimiranih gena koji imaju ulogu u toleranciji na stres. U takve se proteine ubrajaju proteini slični proteinu ASR u kaktusu čija je prisutnost prvo dokazana razdvajanjem 1D SDS-PAG elektroforezom, prijenosom na nitroceluloznu membranu i detekcijom pomoću antitijela α ASR1. Ekspresija proteina sličnih proteinu ASR zabilježena je u svim tkivima kaktusa. Tumorsko tkivo pokazalo je najveću ekspresiju proteina sličnih proteinu ASR. Iako je ekspresija proteinske vrpce 3 (~40 kDa) jednaka u svim tkivima, proteini u vrpčama 1 (~18 kDa) i 2 (~25 kDa) u tumoru pokazali su veću ekspresiju uspoređujući ih s njihovom ekspresijom u normalnim izdancima i kalusu, što je vjerojatno rezultat velikih metaboličkih i biokemijskih promjena u neorganiziranom tkivu tumora s drugačijim metaboličkim potrebama u odnosu na normalne izdanke i kalusno tkivo (Rogić i sur. 2015). Također, slično kao i u kaktusu, razlika u ekspresiji gena *ASR* zabilježena je i u različitim tkivima rajčice (Golan i sur. 2014) i riže (Vaidyanathan i sur. 1999). Iz navedenih rezultata zaključuje se da kaktus sadrži proteine slične proteinu ASR.

Protein ASR1 sadrži 18 histidinskih ostataka, od kojih je pet uzastopno prisutno na amino-kraju proteina. Poznato je da takav histidinski privjesak pokazuje visoki afinitet za metalne ione poput nikla (Ni^{2+}) ili cinka (Zn^{2+}) zbog čega je moguće pročistiti ovaj protein afinitetnom kromatografijom (npr. Ni-NTA kolonom) (Crowe i sur. 1994). Proteini slični proteinu ASR u kaktusu uspješno su pročišćeni Ni-NTA agarozom i eluirani puferom s povećanom koncentracijom imidazola što je u skladu s dosadašnjim saznanjima o proteinu

ASR1 koji ima visoki afinitet vezanja za metale i koji je pročišćen Ni-NTA agarozom (Kalifa i sur. 2004b). Zanimljivo je da se prvo eluira najveći protein sličan proteinu ASR koji se nalazi u vrpici 3 (~40 kDa) korištenjem 50 mM imidazola, a zatim proteini koji se nalaze u vrpicama 1 i 2 (~18 i ~25 kDa) korištenjem 125 mM imidazola. S obzirom da se protein u vrpici 3 ispire s kolone pri manjoj koncentraciji imidazola, njegov afinitet vezanja za afinitetnu kolonu je manji od preostala dva proteina. Može se pretpostaviti da je smanjenje afiniteta vezanja na kolonu povezano s postizanjem uređenije strukture proteina sličnog proteinu ASR u vrpici 3 jer je poznato da je za navedeni proces potrebno vezanje Zn^{2+} na linearni histidinski slijed čime se posljedično smanjuje afinitet vezanja proteina za Ni^{2+} na koloni (Goldgur i sur. 2006). Stoga bi bilo zanimljivo istražiti stupanj osjetljivosti pročišćenih proteina sličnih proteinu ASR na proteaze i stupanj denaturacije pri visokim temperaturama, s obzirom da je potvrđeno da nakon vezanja Zn^{2+} iona protein ASR1 dolazi do smanjenja osjetljivost na proteaze što je rezultat postizanja uređenije strukture (Rom i sur. 2006; Goldgur i sur. 2006). Kada je u kompleksu sa Zn^{2+} , ASR1 pokazuje stupanj denaturacije nakon 76°C (dokaz strukturne uređenosti), dok u odsutnosti Zn^{2+} nisu vidljive nikakve promjene u fazi što upućuje na nedostatak konformacije (Goldgur i sur. 2006). Adekvatnim pročišćavanjem pomoću afinitetne kromatografije (Ni-NTA agarozne kolone) i razdvajanjem topivih proteina iz kaktusa dokazano je postojanje proteina sličnih proteinu ASR koji sadrže linearni slijed histidina s afinitetom za vezanje metalnih iona (Ni^{2+}). Također, proteini slični proteinu ASR pokazali su različit afinitet za vezanje na Ni-NTA agarozu.

Ispitano je nekoliko metoda ekstrakcije proteina sličnih proteinu ASR s ciljem odabira metode s najvećim prinosom proteina koja je kompatibilna s metodama razdvajanja visoke rezolucije. S obzirom da se radi o kiselim proteinima (Amitai-Zeigerson i sur. 1995), ekstrakcija proteina sličnih proteinu ASR sulfatnom kiselinom (H_2SO_4) te precipitacija pomoću TCA i acetona pokazala se najboljom metodom. Navedena metoda ekstrakcije, koja vrlo dobro zamjenjuje fenolnu ekstrakciju, kompatibilna je s pripremom uzoraka za 2D elektroforezu. Konačna potvrda da se radi o proteinima sličnim proteinu ASR dobivena je analizom proteinskih mrlja iz 2D SDS-PAGE gelova spektrometrom masa i usporedbom *de novo* očitanih aminokiselinskih sekvenci s biljnim vrstama za koje je poznato da imaju protein ASR s obzirom da genom kaktusa nije sekvenciran. Protein kaktusa sličan proteinu ASR iz proteinske mrlje 3 (~40 kDa) ima kiselu izoelektričnu točku pI te je *de novo* utvrđena aminokiselinska sekvenca prisutna i u proteinima ASR1, ASR2 i ASR4 iz rajčice te proteinu ASR iz krumpira, čaja, pomela, azijske trešnje, divlje banane (*M. balbisiana* i *M. acuminata*),

primorske trave i caklenjače. Teoretski izračunata molekulska masa proteina ASR4 od 33 kDa te izoelektrična točka pI 4.95 najviše odgovara proteinskoj mrlji 3. Razlika u molekulskoj masi proteina sličnog proteinu ASR kaktusa iz proteinske mrlje 3 određena eksperimentalno i proteina ASR4 iz rajčice određena teoretski, može se objasniti slabijom mobilnosti proteina sličnog proteinu ASR u SDS-PAGE gelu zbog čega se stvara privid veće molekulske mase od stvarne vrijednosti. Takva pojava uzrokovana je visokim stupnjem hidrofilitnosti koji je karakterističan za IDP (Dai i sur. 2011). Međutim, ne može se odbaciti ni pretpostavka da proteinska mrlja 3 sadrži protein sličan proteinu ASR4 i protein male molekulske mase s kojim je u interakciji. U prilog tome ide i mali afinitet proteina sličnog proteinu ASR iz proteinske vrpce 3 za vezanje na Ni-NTA agarozu što sugerira postizanje uređenije strukture monomera ili povezivanje dva proteina. Potencijalni kandidati koji stvaraju veze s proteinom sličnim proteinu ASR4 mogli bi biti drugi transkripcijski faktori male molekulske mase s obzirom da su proteini ASR također uključeni u regulaciju ekspresije gena (Cakir i sur. 2003; Kalifa i sur. 2004b; Yang i sur. 2005). Protein kaktusa sličan proteinu ASR iz proteinske mrlje 2 (~25 kDa) ima izoelektričnu točku pI u neutralnom području te je *de novo* utvrđena aminokiselinska sekvenca prisutna i u ASR proteinima iz čaja, pomela, azijske trešnje, divlje banane (*M. balbisiana* i *M. acuminata*), primorske trave i caklenjače. Uspoređujući molekulsku masu, protein sličan proteinu ASR u kaktusu iz proteinske mrlje 2 (~25 kDa) pokazao je najveću podudarnost s proteinom ASR iz primorske trave (24.94 kDa). Naposljetku, protein kaktusa sličan proteinu ASR iz proteinske mrlje 1 (~18 kDa) ima izoelektričnu točku pI u lužnatom području te je *de novo* utvrđena aminokiselinska sekvenca prisutna i u proteinu ASR3 iz rajčice te proteinu ASR iz riže, pomela, azijske trešnje, divlje banane (*M. balbisiana*), primorske trave i caklenjače. Protein ASR3 (12.11 kDa) sa pI 9.37 također posjeduje izoelektričnu točku u lužnatom pH području što, od svih proteina, najbolje odgovara proteinskoj mrlji 1. Mala razlika u molekulskoj masi proteina ASR3 i proteinske mrlje 1 povezana je s visokim stupnjem hidrofilitnosti proteina sličnog proteinu ASR u kaktusu iz proteinske mrlje 1 što uzrokuje slabiju mobilnost u SDS-PAGE gelu (Dai i sur. 2011). Protein sličan proteinu ASR u kaktusu koji je prema MS rezultatima najbližiji proteinu ASR4 iz rajčice, nalazi se u proteinskoj mrlji 3 s najvećom zabilježenom razinom ekspresije u kaktusu. S druge strane, protein sličan proteinu ASR u kaktusu koji je prema MS rezultatima najbližiji proteinu ASR3 iz rajčice, kojeg nalazimo u proteinskoj mrlji 1, pokazuje vidljivo slabiju ekspresiju. Iz literature je poznato da je razina ekspresije gena *ASR4* visoka u vegetativnim tkivima rajčice, dok je razina ekspresije gena *ASR3* dva do tri puta manja (Golan i sur. 2014) što odgovara rezultatima ekspresije proteina sličnih proteinu ASR u kaktusu.

Analizom MS potvrđena je prisutnost proteina sličnog proteinu ASR u sve tri proteinske mrlje dobivene razdvajanjem 2D SDS-PAG elektroforezom, a navedena saznanja upućuju na moguće postojanje tri proteina sličnih proteinu ASR u kaktusu: protein (~18 kDa) sličan proteinu ASR3 i protein (~40 kDa) sličan proteinu ASR4 iz rajčice, te protein (~25 kDa) sličan proteinu ASR iz primorske trave.

Odgovor gena *ASR* na različite okolišne stresne uvjete uglavnom je proučavan analizama ekspresije mRNA (Hu i sur. 2013), dok istraživanja na proteinskoj razini nedostaju. Budući da je jedan od odgovora na stres promjena uzorka ekspresije gena, nedvojbeno dolazi do kvalitativne i kvantitativne promjene razine ekspresije proteina. Međutim, genomska istraživanja koja odgovor na salinitet i sušu prate na razini transkripcije gena *ASR* (Golan i sur. 2014; Dominguez i Carrari 2015), ne moraju nužno korelirati s promjenama u razini ekspresije proteina ASR (Dai i sur. 2011). Prema tome, samo istraživanja na proteinima mogu pružiti informaciju o njihovoj stvarnoj ekspresiji i aktivnosti (Zivy i de Vienne 2000). U svim dosadašnjim istraživanjima utjecaj solnog i osmotskog stresa na ekspresiju gena ili proteina ASR ispitan je u tretmanima u trajanju do maksimalno 4 dana. Ovim radom dobivene su informacije o ekspresiji proteina sličnog proteinu ASR nakon dužeg izlaganja solnom i osmotskom stresu u trajanju do 7 dana. Sva tkiva kaktusa pokazuju visoku razinu ekspresije proteina sličnog proteinu ASR u kontrolnim uzorcima koji nisu bili izloženi stresnim uvjetima. Slično tome, transkript *SbASR1* iz caklenjače isto je uočen u kontroli (Jha i sur. 2009) što sugerira da kod biljaka, koje se prirodno nalaze u stresnim uvjetima okoliša, razina ekspresije gena i proteina ASR ostaje povišena i u optimalnim uvjetima. Također, konstitutivna ekspresija gena *OsASR1* iz riže potvrđuje da je gen *ASR* bitan za normalnu funkciju stanice (Vaidyanathan i sur. 1999).

Povećanje ekspresije proteina sličnog proteinu ASR u odnosu na kontrolu zabilježeno je nakon prvog dana tretmana normalnih izdanaka i kalusa i to znatnije izraženo u tretmanima sa 250 mM NaCl-om nego sa 500 mM manitolom, dok ekspresija proteina u tumorskom tkivu ostaje nepromijenjena. Dobiveni rezultati se podudaraju s istraživanjima koja su pokazala da je najveća izmjerena ekspresija gena *ASR* zabilježena 12-48 h nakon tretmana biljaka sa NaCl-om (Golan i sur. 2014; Jha i sur. 2009; Kalifa i sur. 2004a). Na proteinskoj razini, Amitai-Zeigerson i suradnici (1995) izvijestili su da solni stres (150 mM NaCl) uzrokuje prolazno povećanje ekspresije proteina ASR1 u rajčici s najvećom izmjerenom ekspresijom nakon 48 h. Sličan rezultat dobiven je i pod utjecajem osmotskog stresa (5%-tni PEG 8000) s najvećom izmjerenom ekspresijom nakon 24 h (Amitai-Zeigerson i sur. 1995). Ekspresija

proteina sličnog proteinu ASR iz tumora ostaje nepromijenjena što upućuje na nemogućnost aktiviranja zaštitnih procesa uključenih u obranu od solnog i osmotskog stresa, a to potvrđuje i smanjenje ekspresije šaperonskih proteina Hsp70 i Hsp60 sa zaštitnom ulogom u tumorskom tkivu kaktusa izloženom 250 mM NaCl-u ili 500 mM manitolu (Rogić i sur. 2015). Nakon četvrtog dana tretmana s 250 mM NaCl-om dolazi do blagog smanjenja ekspresije proteina sličnog proteinu ASR u normalnim izdancima i kalusu koja je i dalje veća u odnosu na kontrolne uzorke. Tretman s 500 mM manitolom u trajanju od 4 dana doveo je do smanjenja ekspresije proteina u normalnim izdancima na razinu ekspresije kontrolnih uzoraka, dok je u kalusu zabilježen još izraženiji pad ekspresije proteina sličnog proteinu ASR ispod razine ekspresije proteina u kontroli. Tumorsko tkivo pod utjecajem solnog stresa nije pokazalo promjenu u ekspresiji proteina sličnog proteinu ASR, a pod utjecajem osmotskog stresa dolazi do blagog smanjenja ekspresije vidljivo u tretmanu s 500 mM manitolom. Do smanjenja razine ekspresije gena *SbASR1* iz caklenjače i gena *OsASR1* iz riže ispod razine ekspresije kontrolnih uzoraka dolazi 3-4 dana nakon izlaganja solnom stresu. Također, smanjenje ekspresije proteina ASR zabilježeno je nakon 3-4 dana tretmana rajčica ili plantana banana s 150 mM NaCl-om ili 500 mM manitolom (Amitai-Zeigerson i sur. 1995; Dai i sur. 2011). Nakon sedmog dana tretmana s 250 mM NaCl-om razina ekspresije proteina sličnog proteinu ASR u normalnim izdancima pada na razinu ekspresije kontrolnih uzoraka, a razina ekspresije proteina u kalusnom tkivu pada ispod razine ekspresije kontrole. U tretmanu s 500 mM manitolom zabilježen je pad razine ekspresije proteina u normalnim izdancima i kalusu ispod razine ekspresije kontrolnih uzoraka. U tumorskom tkivu nakon sedmog dana tretmana s 250 mM NaCl dolazi do blagog smanjenja ekspresije, a u tretmanu s 500 mM manitolom do potpunog gubitka ekspresije proteina sličnog proteinu ASR. Dugotrajna izloženost visokim koncentracijama NaCl-a, PEG-a ili manitola smanjuje ili u potpunosti prekida aktivnost gena *ASR* zbog toksičnog učinka iona soli te zbog prejakog intenziteta stresa koji rezultira ireverzibilnim oštećenjima unutar biljke (Amitai-Zeigerson i sur. 1995; Vaidyanathan i sur. 1999). Vidljivo je kako su korišteni tretmani predugi i zato bi trebalo promatrati ekspresiju proteina sličnog proteinu ASR u kraćim vremenskim intervalima. Prije samih tretmana bi bilo zanimljivo testirati utjecaj različitih koncentracija NaCl-a i manitola na tkiva kaktusa u trajanju od 24 h i odabrati koncentracije pri kojima je ekspresija proteina sličnih proteinu ASR najveća, te onda njih koristiti u vremenski kraćim tretmanima. Ovo istraživanje pokazalo je da solni ili osmotski stres dovodi do promjene ekspresije proteina sličnog proteinu ASR u kaktusu što dokazuje da je uključen u odgovor na abiotički stres. Prekomjerna ekspresija gena *ASR* iz ljiljana (*LLA23*) u biljci uročnjak (Yang i sur. 2005) i gena *ASR1* iz rajčice u duhanu

(Kalifa i sur. 2004a) dovodi do povećane otpornosti transgeničnih biljaka na osmotski i solni stres. Također je pokazano da solni stres uzrokuje veću ekspresiju proteina sličnih proteinu ASR u odnosu na osmotski stres tokom 7 dana tretmana.

Nakon analize MS, peptidi sekvencirani *de novo* pokazali su homologiju s dijelovima sekvence motiva 1 i 2 poznatih proteina ASR, što ne čudi s obzirom da se radi o konzerviranim dijelovima proteina (Battaglia i sur. 2008). Uspoređujući sekvence gena *ASR* iz drugih biljnih vrsta ustanovljena je konzerviranost motiva 1 i 2 na nukleotidnoj razini. Na temelju ovih informacija dizajnirane su degenerirane početnice kojima je uspješno identificirana parcijalna cDNA gena sličnog genu *ASR* koja odgovara motivima 1 i 2. U istraživanju su korištena dva para početnica s kojima su dobivene dvije cDNA sekvence koje se preklapaju. Dobivene sekvence međusobno se razlikuju u tri nukleotida. Međutim, navedene razlike rezultirale su u samo jednoj razlici na aminokiselinskom nivou. Prema rezultatima MS može se pretpostaviti da je razlika između cDNA sekvenci rezultat prisustva paraloga gena sličnog genu *ASR*, no ipak vjerojatnije se radi o krivo sparenim bazama (engl. *mismatch*) između kalupa cDNA i početnica zbog njihove degeneriranosti. Dobivena translirana parcijalna sekvenca gena sličnog genu *ASR* u kaktusu dijeli više od 90% sličnosti s konzerviranom aminokiselinskom sekvencom (objavljena u Battaglia i sur. 2008) proteina ASR. U dobivenoj parcijalnoj aminokiselinskoj sekvenci gena sličnog genu *ASR* najzastupljenije su polarne aminokiseline (više od 50%) koje doprinose ukupnom naboju proteina sličnog proteinu ASR. Zbog visokog udjela polarnih aminokiselina i velike hidrofilnosti proteini ASR ubrajaju se u skupinu hidrofilina (Cakir i sur. 2003). Dobivena sekvenca dijela gena sličnog genu *ASR* nalazi se unutar konzervirane ABA/WDS domene koja je karakteristična za stresne proteine (Hu i sur. 2013; Luo i sur. 2014; Zhang i sur. 2014). Zbog toga se određeni autori zalažu za klasificiranje proteina ASR kao proteini ABA/WDS s jedinstvenom funkcijom i ulogom, s obzirom da ne dijele sličnost u primarnoj strukturi s proteinima koji se ubrajaju u prihvaćene grupe proteina LEA (González i Iusem 2014). Dobivena sekvenca gena sličnog genu *ASR* najveću homologiju dijeli s genom *ASR4* što odgovara analizi MS kojom je u kaktusu pronađena sekvenca proteina *ASR4* iz rajčice. Iako su geni *ASR* strukturno izrazito slični, ne čudi vezanje degeneriranih početnica baš za cDNA gena *ASR4* s obzirom da je ekspresija gena *ASR4* vrlo velika u vegetativnom tkivu rajčice (Golan i sur. 2014). Umnažanjem degeneriranim početnicama na kalupu ukupne cDNA kaktusa uspješno je detektiran središnji dio gena sličnog genu *ASR* koji odgovara

konzerviranim motivima 1 i 2, te time sa sigurnošću možemo tvrditi da kaktus posjeduje protein sličan proteinu ASR.

Potpuni gen sličan genu *ASR* iz kaktusa mogao bi se dobiti PCR amplifikacijom cDNA krajeva (RACE) na temelju dobivene sekvence motiva 1 i 2 (Dorit i Ohara 2001). Nakon sekvenciranja gena otvara se mogućnost ispitavanja utjecaja solnog i osmotskog stresa na ekspresiju gena sličnog genu *ASR* u tkivima kaktusa metodom kvantitativne polimerazne lančane reakcije u stvarnom vremenu (RT-qPCR). Uloga proteina ASR kao transkripcijskog faktora još uvijek je nerazjašnjena, odnosno malo toga se zna o njegovim ciljnim genima. Stoga, nakon identifikacije gena sličnog genu *ASR*, trebalo bi istražiti ciljne gene proteina sličnog proteinu ASR kromatinskom imunoprecipitacijom (ChIP) kao što je provedeno u riži (Arenhart i sur. 2013) i rajčici (Ricardi i sur. 2014). Nadalje, kako bi potvrdili biološku ulogu gena sličnog genu *ASR* u kaktusu, bilo bi zanimljivo prekomjerno eksprimirati navedeni gen u biljci uročnjak koja ne posjeduje gen *ASR* ili neku srodniju biljnu vrstu koja ima sličan proteom kao kaktus. Analize takvih transgeničnih biljaka doprinijele bi razumijevanju uloge proteina sličnog proteinu ASR u odgovoru na stresne uvjete, kao i mehanizma regulacije drugih gena.

6. ZAKLJUČAK

- Dokazano je, po prvi put, postojanje proteina sličnih proteinu ASR u normalnim izdancima, kalusnom i tumorskom tkivu i to s najvećom ekspresijom proteina prisutnom u tumorskom tkivu kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff.
- Razvijena je metoda ekstrakcije, purifikacije, razdvajanja i detekcije proteina sličnih proteinu ASR u kaktusu
- Proteini slični proteinu ASR uspješno su pročišćeni afinitetnom Ni-NTA agaroznom kolonom pokazujući različiti afinitet za vezanje na Ni²⁺.
- Analiza MS/MS i *de novo* sekvencirani peptidi upućuju na postojanje tri proteina sličnog proteinu ASR u kaktusu.
- Solni i osmotski stres dovodi do promjene ekspresije proteina sličnog proteinu ASR što dokazuje da je uključen u odgovor na abiotički stres. Pokazano je da solni stres uzrokuje veću ekspresiju proteina sličnih proteinu ASR u odnosu na osmotski stres.
- Identificirana je parcijalna cDNA gena sličnog genu *ASR* koja odgovara konzerviranim motivima 1 i 2 proteina ASR.

7. LITERATURA

- Aebersold, R. i Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), pp.198-207.
- Amitai-Zeigerson, H., Scolnik, P. i Bar-Zvi, D. (1995). Tomato *Asr1* mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. *Plant Science*, 110(2), pp.205-213.
- Arenhart, R., Bai, Y., Valter de Oliveira, L., Bucker Neto, L., Schunemann, M., Maraschin, F., Mariath, J., Silverio, A., Sachetto-Martins, G., Margis, R., Wang, Z. i Margis-Pinheiro, M. (2014). New Insights into Aluminum Tolerance in Rice: The ASR5 Protein Binds the STAR1 Promoter and Other Aluminum-Responsive Genes. *Molecular Plant*, 7(4), pp.709-721.
- Aubourg, S. i Rouzé, P. (2001). Genome annotation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(3-4), pp.181-193.
- Balen, B., Milošević, J. i Krsnik-Rasol, M. (2002). Protein and Glycoprotein Patterns Related to Morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. Tissue Culture. *Food Technology and Biotechnology*, 40(4), pp.275–280.
- Balen, B., Pavoković, D., Peharec Štefanić, P. i Krsnik-Rasol, M. (2011). Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. *Hrvatska sveučilišna naknada, Zagreb*.
- Balen, B., Tkalec, M., Rogić, T., Šimac, M., Štefanić, P., Rončević, S., Svedružić, L. i Krsnik-Rasol, M. (2013). Effects of iso-osmotic NaCl and mannitol on growth, proline content, and antioxidant defense in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. in vitro-grown cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49(4), pp.421-432.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F. i Covarrubias, A. (2008). The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiology*, 148(1), pp.6-24.
- Blumwald, E. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(4), pp.431-434.
- Bohnert, H. i Shen, B. (1998). Transformation and compatible solutes. *Scientia Horticulturae*, 78(1-4), pp.237-260.
- Bohnert, H. i Sheveleva, E. (1998). Plant stress adaptations — making metabolism move. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(3), pp.267-274.

- Bohnert, H., Ayoubi, P., Borchert, C., Bressan, R., Burnap, R., Cushman, J., Cushman, M., Deyholos, M., Fischer, R., Galbraith, D., Hasegawa, P., Jenks, M., Kawasaki, S., Koiwa, H., Kore-eda, S., Lee, B., Michalowski, C., Misawa, E., Nomura, M., Ozturk, N., Postier, B., Prade, R., Song, C., Tanaka, Y., Wang, H. i Zhu, J. (2001). A genomics approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(3-4), pp.295-311.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), pp.248-254.
- Butorac, A., Dodig, I., Bačun-Družina, V., Tishbee, A., Mrvčić, J., Hock, K., Diminić, J. i Cindrić, M. (2013). The effect of starvation stress on *Lactobacillus brevis* L62 protein profile determined by de novo sequencing in positive and negative mass spectrometry ion mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27(9), pp.1045-1054.
- Cakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saumonneau, A., Delrot, S. i Atanassova, R. (2003). A Grape ASR Protein Involved in Sugar and Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell*, 15(9), pp.2165-2180.
- Canel, C., Bailey-Serres, J. i Roose, M. (1995). Pummelo Fruit Transcript Homologous to Ripening-Induced Genes. *Plant Physiology*, 108(3), pp.1323-1324.
- Carrari, F., Fernie, A. i Iusem, N. (2004). Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story. *Trends in Plant Science*, 9(2), pp.57-59.
- Chen, J., Liu, D., Jiang, Y., Zhao, M., Shan, W., Kuang, J. i Lu, W. (2011). Molecular Characterization of a Strawberry *FaASR* Gene in Relation to Fruit Ripening. *PLoS One*, 6(9), p.e24649.
- Crowe, J., Döbeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D. i Henco, K. (1994). 6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression/Purification. *Protocols for Gene Analysis*, pp.371-388.
- Dai, J., Liu, B., Feng, D., Liu, H., He, Y., Qi, K., Wang, H. i Wang, J. (2011). *MpAsr* encodes an intrinsically unstructured protein and enhances osmotic tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, 30(7), pp.1219-1230.

- Dodig, I. (2016). Iščitanje reverzne translacije sekvenciranjem peptida *de novo* tehnikama tandemne spektrometrije masa. Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Dominguez, P., Frankel, N., Mazuch, J., Balbo, I., Iusem, N., Fernie, A. i Carrari, F. (2013). ASR1 Mediates Glucose-Hormone Cross Talk by Affecting Sugar Trafficking in Tobacco Plants. *Plant Physiology*, 161(3), pp.1486-1500.
- Dominguez, P. i Carrari, F. (2015). ASR1 transcription factor and its role in metabolism. *Plant Signaling & Behavior*, 10(4), p.e992751.
- Dorit, R. i Ohara, O. (2001). cDNA amplification using one-sided (anchored) PCR. *Current Protocols in Immunology*.
- Dos Reis, S., Lima, A. i De Souza, C. (2012). Recent Molecular Advances on Downstream Plant Responses to Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), pp.8628-8647.
- Erdei, L., Trivedi, S., Takeda, K. i Matsumoto, H. (1990). Effects of osmotic and salt stresses on the accumulation of polyamines in leaf segments from wheat varieties differing in salt and drought tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 137(2), pp.165-168.
- Faurobert, M., Pelpoir, E. i Chaïb, J. (2007). Phenol Extraction of Proteins for Proteomic Studies of Recalcitrant Plant Tissues. *Plant Proteomics*, pp.9-14.
- Frankel, N., Carrari, F., Hasson, E. i Iusem, N. (2006). Evolutionary history of the *Asr* gene family. *Gene*, 378, pp.74-83.
- Galić, N. i Cindrić, M. (2008). Analiza proteina spektrometrijom masa. *Kemija u industriji*, 57, pp.231-243.
- Golan, I., Dominguez, P., Konrad, Z., Shkolnik-Inbar, D., Carrari, F. i Bar-Zvi, D. (2014). Tomato *ABSCISIC ACID STRESS RIPENING (ASR)* Gene Family Revisited. *PLoS One*, 9(10), p.e107117.

- Goldgur, Y., Rom, S., Ghirlando, R., Shkolnik, D., Shadrin, N., Konrad, Z. i Bar-Zvi, D. (2006). Desiccation and Zinc Binding Induce Transition of Tomato Abscisic Acid Stress Ripening 1, a Water Stress- and Salt Stress-Regulated Plant-Specific Protein, from Unfolded to Folded State. *Plant Physiology*, 143(2), pp.617-628.
- González, R. i Iusem, N. (2014). Twenty years of research on *Asr* (ABA-stress-ripening) genes and proteins. *Planta*, 239(5), pp.941-949.
- Hare, P., Cress, W. i Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, 21(6), pp.535-553.
- Hasegawa, P., Bressan, R., Zhu, J. i Bohnert, H. (2000). Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51(1), pp.463-499.
- Henry, I., Carpentier, S., Pampurova, S., Van Hoylandt, A., Panis, B., Swennen, R. i Remy, S. (2011). Structure and regulation of the *Asr* gene family in banana. *Planta*, 234(4), pp.785-798.
- Hong, S., Kim, I., Yang, D. i Chung, W. (2002). Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from *Cucumis melo*. *Journal of Experimental Botany*, 53(378), pp.2271-2272.
- Hu, W., Huang, C., Deng, X., Zhou, S., Chen, L., Li, Y., Wang, C., Ma, Z., Yuan, Q., Wang, Y., Cai, R., Liang, X., Yang, G. i He, G. (2013). *TaASR1*, a transcription factor gene in wheat, confers drought stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant, Cell & Environment*, 36(8), pp.1449-1464.
- Innis, M. A., Gelfand D. H., Sninsky, J. J. i White, T. J. (1990). PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. *Academic Press, Inc., San Diego*.
- Iusem, N., Bartholomew, D., Hitz, W. i Scolnik, P. (1993). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Transcript Induced by Water Deficit and Ripening. *Plant Physiology*, 102(4), pp.1353-1354.
- Jha, B., Agarwal, P., Reddy, P., Lal, S., Sopory, S. i Reddy, M. (2009). Identification of salt-induced genes from *Salicornia brachiata*, an extreme halophyte through expressed sequence tags analysis. *Genes & Genetic Systems*, 84(2), pp.111-120.

- Jha, B., Lal, S., Tiwari, V., Yadav, S. i Agarwal, P. (2012). The *SbASR-1* Gene Cloned from an Extreme Halophyte *Salicornia brachiata* Enhances Salt Tolerance in Transgenic Tobacco. *Marine Biotechnology*, 14(6), pp.782-792.
- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C. i Kjellbom, P. (2000). The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1-2), pp.324-342.
- Kalifa, Y., Perlson, E., Gilad, A., Konrad, Z., Scolnik, P. i Bar-Zvi, D. (2004a). Over-expression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 27(12), pp.1459-1468.
- Kalifa, Y., Gilad, A., Konrad, Z., Zaccari, M., Scolnik, P. i Bar-Zvi, D. (2004b). The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochemical Journal*, 381(2), pp.373-378.
- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D. i Bohnert, H. (2001). Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in Rice. *The Plant Cell*, 13(4), p.889.
- Konrad, Z. i Bar-Zvi, D. (2008). Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated ASR1 protein and the osmolyte glycine-betaine. *Planta*, 227(6), pp.1213-1219.
- Krsnik-Rasol, M. i Balen, B. (2001). Electrophoretic protein patterns and peroxidase activity related to morphogenesis in *Mammillaria gracilis* tissue culture. *Acta Botanica Croatica*, 2, pp.219-226
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680-685.
- Lefèvre, I., Gratia, E. i Lutts, S. (2001). Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in rice (*Oryza sativa*). *Plant Science*, 161(5), pp.943-952.
- Luo, C., Dong, L., He, X., Yu, H., Ou, S. i Fang, Z. (2014). Molecular cloning and characterisation of a cDNA encoding an abscisic acid-, stress-, and ripening-induced (ASR) protein in mango (*Mangifera indica* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 89(3), pp.352-358.

- Mahajan, S. i Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2), pp.139-158.
- Malda, G., Backhaus, R. i Martin, C. (1999). Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of in vitro cultured cactus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58(1), pp.1-9.
- Maskin, L., Maldonado, S. i Iusem, N. (2008). Tomato leaf spatial expression of stress-induced *Asr* genes. *Molecular Biology Reports*, 35(4), pp.501-505.
- Murashige, T. i Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp.473-497.
- Peharec, P., Posilović, H., Balen, B. i Krsnik-Rasol, M. (2010). Spine micromorphology of normal and hyperhydric *Mammillaria gracilis* Pfeiff. (Cactaceae) shoots. *Journal of Microscopy*, 239(1), pp.78-86.
- Philippe, R., Courtois, B., McNally, K., Mournet, P., El-Malki, R., Le Paslier, M., Fabre, D., Billot, C., Brunel, D., Glaszmann, J. i This, D. (2010). Structure, allelic diversity and selection of *Asr* genes, candidate for drought tolerance, in *Oryza sativa* L. and wild relatives. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(4), pp.769-787.
- Ricardi, M., González, R., Zhong, S., Domínguez, P., Duffy, T., Turjanski, P., Salgado Salter, J., Alleva, K., Carrari, F., Giovannoni, J., Estévez, J. i Iusem, N. (2014). Genome-wide data (ChIP-seq) enabled identification of cell wall-related and aquaporin genes as targets of tomato ASR1, a drought stress-responsive transcription factor. *BMC Plant Biology*, 14(1), p.29.
- Riccardi, F., Gazeau, P., de Vienne, D. i Zivy, M. (1998). Protein Changes in Response to Progressive Water Deficit in Maize. *Plant Physiology*, 117(4), pp.1253-1263.
- Robertson, E., Dannelly, H., Malloy, P. i Reeves, H. (1987). Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Analytical Biochemistry*, 167(2), pp.290-294.
- Rock, C. (2000). Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytologist*, 148(3), pp.357-396.

- Rogić, T., Horvatić, A., Tkalec, M., Cindrić, M. i Balen, B. (2015). Proteomic analysis of *Mammillaria gracilis* Pfeiff. in vitro-grown cultures exposed to iso-osmotic NaCl and mannitol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(1), pp.127-146.
- Rom, S., Gilad, A., Kalifa, Y., Konrad, Z., Karpasas, M., Goldgur, Y. i Bar-Zvi, D. (2006). Mapping the DNA- and zinc-binding domains of ASR1 (abscisic acid stress ripening), an abiotic-stress regulated plant specific protein. *Biochimie*, 88(6), pp.621-628.
- Saumonneau, A., Agasse, A., Bidoyen, M., Lallemand, M., Cantereau, A., Medici, A., Laloi, M. i Atanassova, R. (2008). Interaction of grape ASR proteins with a DREB transcription factor in the nucleus. *FEBS Letters*, 582(23-24), pp.3281-3287.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. i D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), pp.8746-8749.
- Shinozaki, K. i Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3), pp.217-223.
- Thiellement, H., Zivy, M. i Plomion, C. (2002). Combining proteomic and genetic studies in plants. *Journal of Chromatography B*, 782(1-2), pp.137-149.
- Vaidyanathan, R., Kuruvilla, S. i Thomas, G. (1999). Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. *Plant Science*, 140(1), pp.21-30.
- Virlouvet, L., Jacquemot, M., Gerentes, D., Corti, H., Bouton, S., Gilard, F., Valot, B., Trouverie, J., Tcherkez, G., Falque, M., Damerval, C., Rogowsky, P., Perez, P., Noctor, G., Zivy, M. i Coursol, S. (2011). The *ZmASRI* Protein Influences Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis and Maintains Kernel Yield in Maize under Water-Limited Conditions. *Plant Physiology*, 157(2), pp.917-936.
- Wang, C., Liau, Y., Huang, J., Wu, T., Su, C. i Lin, C. (1998). Characterization of a Desiccation-Related Protein in Lily Pollen during Development and Stress. *Plant and Cell Physiology*, 39(12), pp.1307-1314.

- Wang, H., Miyazaki, S., Kawai, K., Deyholos, M., Galbraith, D.W. i Bohnert, H. J. (2003). Temporal progression of gene expression responses to salt shock in maize roots. *Plant Molecular Biology*, 52, pp.873–891.
- Xiong, L. i Zhu, J. (2001). Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. *Physiologia Plantarum*, 112(2), pp.152-166.
- Yang, C., Chen, Y., Jauh, G. i Wang, C. (2005). A Lily ASR Protein Involves Abscisic Acid Signaling and Confers Drought and Salt Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(2), pp.836-846.
- Zhang, L., Hu, W., Wang, Y., Feng, R., Zhang, Y., Liu, J., Jia, C., Miao, H., Zhang, J., Xu, B. i Jin, Z. (2014). The *MaASR* gene as a crucial component in multiple drought stress response pathways in Arabidopsis. *Functional & Integrative Genomics*, 15(2), pp.247-260.
- Zhou, M. i Gomez-Sanchez, C. (2000). Universal TA Cloning. *Current Issues in Molecular Biology*.
- Zivy, M. i de Vienne, D. (2000). Proteomics; a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Molecular Biology*, 44, pp.575-580.

ŽIVOTOPIS

Ime **Antonio Tudić**

Datum i mjesto rođenja **5.2.1995., Beč**

OBRAZOVANJE

2016 – 2019 **Diplomski sveučilišni studij molekularne biologije**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički
fakultet, Zagreb

2013 – 2016 **Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički
fakultet, Zagreb

2009 – 2013 **Gimnazija Antuna Vrančića**
Prirodoslovno-matematička gimnazija

ISKUSTVO

**Laboratorij za biljnu proteomiku, Laboratorij za molekularnu genetiku i Laboratorij
Centra za proteomiku i spektrometriju masa**

Sveučilište u Zagrebu, PMF i IRB (2017/2018)

Diplomski rad

- Tema: Novo otkiveni i stresom inducirani proteini ASR u kulturi tkiva kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff.
- Mentorica: doc. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Laboratorij za biljnu proteomiku

Sveučilište u Zagrebu, PMF (2015/2016)

Rad za rektorovu nagradu

- Tema: Utjecaj nanočestica srebra na klijance duhana (*Nicotiana tabacum*)
- Mentorica: doc. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 congress

Prag, Češka

Poster

Majsec, Kristina; Tudić, Antonio; Cvjetko, Petra; Balen, Biljana; Peharec Štefanić, Petra (2016). Impact of differently coated silver nanoparticles on antioxidative stress response in *Nicotiana tabacum* seedlings. *Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 congress*

17th European Carabidologists Meeting

Hotel Zora, Primošten (2015)

Organizacijski odbor - tehnička podrška

Kolegij Zoologija

Sveučilište u Zagrebu, PMF (2014)

Demonstratura

Dan i noć na PMF-u (dan otvorenih vrata)

Sveučilište u Zagrebu, PMF (2014, 2015, 2016 i 2017)

Organizacija i prezentacija

ICYS 2012

Radboud Universiteit Nijmegen, Nizozemska

Prezentacija istraživačkog rada

- Tema: Orhideje šibenske okolice
- Mentor: dr. sc. Milenko Milović