

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

Gospočić, Janko

Master's thesis / Diplomski rad

2008

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:094854>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2020-10-24**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Janko Gospić

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

Diplomski rad

Zagreb, 2008.

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

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

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

Svim članovima Zavoda za molekularnu biologiju zahvaljujem na pomoći.

Janko

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveu ilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matemati ki fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

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

Janko Gospo i

Biološki odsjek, Prirodoslovno – matemati ki fakultet Sveu ilišta u Zagrebu
Rooseveltov trg 6, Zagreb, Hrvatska

U ovom radu uspore ivane su transformirane linije hrena (tumorska i teratomska) s kontrolnim tkivom lista u elektroforetskoj slici i glikozilaciji ukupnih stani nih proteina. Poseban naglasak stavljen je na usporedbu navedenih tkiva u strukturi i sastavu N-glikana proteina endoplazmatskog retikuluma.

Osim središnje uloge u metabolizmu, endoplazmatski retikulum je i po etno mjesto glikozilacije proteina u eukariotskoj stanici. N-glikozilacija je glavna modifikacija proteina u biljnim stanicama. Prema supstituentima vezanim na še ernu jezgru, biljne N-glikane možemo podijeliti u etri osnovne grupe: visoko manozni tip, složeni tip, paucimanozni tip te hibridni tip N-glikana. Dok je N-glikozilacija relativno dobro opisan proces, O-glikozilacija u biljaka je slabo istražena.

U ovom radu glikoproteini su odvojeni SDS-PAG elektroforezom te preneseni na nitroceluloznu membranu. N-glikozilirani proteini na membranama otkriveni su lektinom Con A. Glikani su dalje analizirani obradom membrana razli itim lektinima (GNA, MAA, SNA, PNA, DSA, RCA I i UEA). Rezultati prikaza glikoziliranih proteina lektinima dokazali su da je glikozilacija ukupnih stani nih proteina i proteina endoplazmatskog retikuluma promijenjena tijekom diferencijacije stanica hrena.

Elektronskom mikroskopijom uo ene su velike razlike u unutrašnjoj gra i stanica tkiva lista, teratoma (organiziranog i neorganiziranog) te tkiva tumora. U svim transformiranim linijama primije eni su nepravilno gra eni plastidi. Velika sli nost u gra i stanica uo ena je kod tumora i neorganiziranog teratoma. Ova dva tipa tkiva sadrže velike nepravilne jezgre i male plastide. U navedenim tkivima nisu uo ene razlike u strukturi endoplazmatskog retikuluma.

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

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

Klju ne rije i: hren, stani na diferencijacija, glikozilacija, N-glikani, endoplazmatski retikulum, lektini, elektronska mikroskopija

Mentor: dr. sc. Biljana Balen, doc.

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

Rad prihva en: 12.11.2008.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

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

Janko Gospo i

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

In this work different horseradish transformed lines (tumour and teratoma) were compared with control samples of leaf tissue in electrophoretic pattern of total cell proteins and their glycosylation. Emphasis was put on the comparison of these tissues in structure and composition of N-glycans of endoplasmic reticulum proteins.

Despite its central metabolic role, the endoplasmic reticulum is also a starting point of protein glycosylation in eukaryotic cells. Two forms of protein glycosylation are known, N- and O-glycosylation. N-glycosylation is a major modification of proteins in plant cells. Plant N-glycans can be classified into four basic groups: high-mannose-type, complex-type, paucimannosidic-type and hybrid-type. N-glycosylation is a well described process whereas O-glycosylation is not well characterized.

Glycoproteins were separated on SDS-PAGE and subsequently transferred onto nitrocellulose membrane. Glycosylated proteins were detected with Con A. N-glycans were further characterized by treating the membranes with different lectins (GNA, MAA, SNA, PNA, DSA, RCA I and UEA). The obtained results showed that glycosylation of total cell proteins and proteins of endoplasmic reticulum had been changed during horseradish cellular differentiation.

Electron microscopy showed great differences in cell structure between leaf tissue, teratoma tissue (organized and unorganized) and tumour tissue. In all transformed horseradish lines plastids with irregular structure were noticed. The great similarity between tumour tissue and unorganized teratoma tissue was also observed. These two types of tissues had large abnormal nuclei and small plastids. In all types of tissues no differences in structure of endoplasmic reticulum were noticed.

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

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

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

Supervisor: Dr. Biljana Balen, Asst. Prof.

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

Thesis accepted: 12.11.2008.

Sadržaj:

1.	UVOD	9
1.1.	Glikozilacija proteina	9
1.2.	Lektini	13
1.3.	Transformacija biljnih stanica bakterijom <i>Agrobacterium tumefaciens</i> i kultivacija <i>in vitro</i> transformiranih linija	14
2.	MATERIJALI I METODE	17
2.1.	Kultura tkiva.....	17
2.2.	Priprema biljnog tkiva i frakcija koje su oboga ene mikrosomima endoplazmatskog retikuluma za elektronsku mikroskopiju	18
2.3.	Priprema ukupnih stani nih i topivih stani nih proteina.....	19
2.4.	Izolacija frakcije oboga ene mikrosomima endoplazmatskog retikuluma	19
2.5.	Odre ivanje koncentracije proteina u ekstraktima biljnog tkiva	20
2.6.	Aktivnost enzima koji su primijenjeni kao biljezi frakcija	21
2.6.1	Aktivnost NADPH-Cyt c reduktaze	22
2.6.2	Aktivnost katalaze	22
2.6.3	Aktivnost askorbat peroksidaze	22
2.6.4	Aktivnost pirogolol peroksidaze.....	22
2.7.	Elektroforetska analiza proteina.....	23
2.8.	Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu i prikaz lektinima	23
3.	REZULTATI.....	25
3.1.	Elektronsko-mikroskopska opažanja stani nih struktura tkiva hrena i frakcija mikrosoma endoplazmatskog retikuluma.....	25

3.2.	Određivanje elektroforetskog uzorka ukupnih staničnih i topljivih staničnih proteina	278
3.3.	Određivanje sastava glikoproteina u ukupnim staničnim proteinima	29
3.4.	Aktivnost enzima koji su primijenjeni kao biljezi frakcija	32
3.4.1.	Aktivnost NADPH-Cyt c reduktaze	32
3.4.2.	Aktivnost katalaze	33
3.4.3.	Aktivnost askorbat peroksidaze	34
3.4.4.	Aktivnost pirogaloil peroksidaze.....	34
3.5.	Elektroforetska analiza proteina iz frakcija obogaćenih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma.....	35
3.6.	Određivanje sastava glikoproteina iz frakcija obogaćenih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma.....	36
4.	RASPRAVA.....	39
5.	ZAKLJUČAK	43
6.	LITERATURA.....	44

Popis kratica:

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

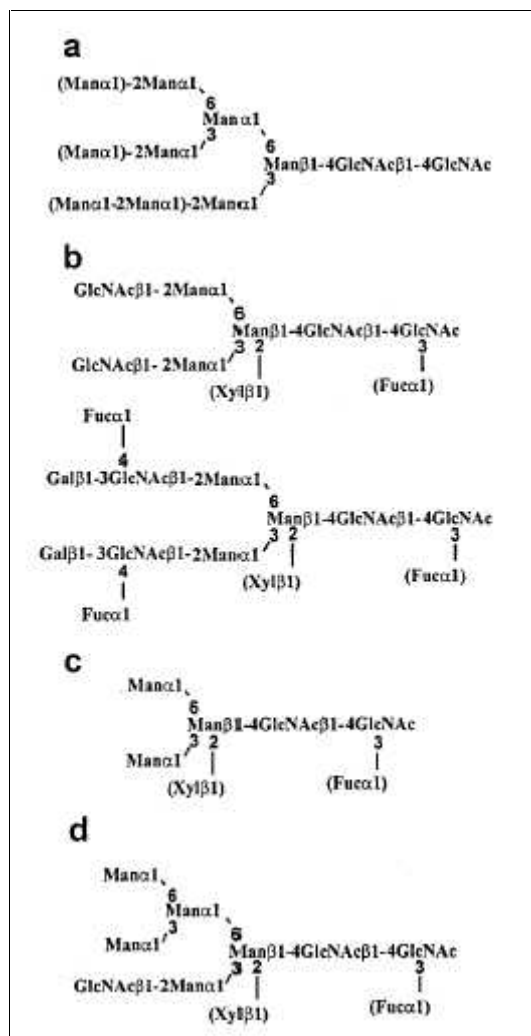
1. UVOD

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

1.1. Glikozilacija proteina

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

N-glikozilacija je enzimski proces u kojem nastaje glikan (še erni dio) vezan na bo ni lanac asparagina preko amida u proteinu. N-glikozilacijsko mjesto je tripeptid Asn-X-Ser/Thr gdje X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina i aspartata. Svi N glikani dijele zajedni ku minimalnu strukturu $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ koja se sastoji od N,N'-diacilhitobioza, -manoze vezane na hitobiozu te dvije -manoze vezane na 3. i 6. hidroksilnu grupu -manoze. Prema supstinentima vezanim na še ernu jezgru, biljne N-glikane možemo podijeliti u etiri osnovne grupe: visoko manozni tip, složeni tip, paucimanozni tip te hibridni tip N-glikana (Slika 1).



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

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

Složeni tip N-glikana nastaje daljnjom obradom visokomanoznog tipa u Golgijevom kompleksu pomo u specifi nih glikozidaza i glikozil-transferaza. Složeni tip N-glikana karakterizira prisutnost -(1,3)-fukoze i/ili -(1,2)-ksiloze vezanih na proksimalni N-acetilglukozamin te na -manozu šeerne jezgre. Tako er je za ovaj tip N-glikana karakteristi an -(1,2)-N-acetilglukozamin vezan na -manozu. U ovaj tip N-glikana pripada i

Lewisov antigen. Lewisov motiv sastoji se od Gal 1,3-(Fuc 1,4)-GlcNAc te zbog njega nastaje križna reakcija pri kojoj nastaju antitijela usmjerena protiv kompleksa Le^a ljudskih eritrocita (Wilson 2002).

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

Hibridni tip N-glikana nastaje obradom α -(1,3)-manozne grane pri čemu nastaje α -(1,3)-fukoza i/ili α -(1,2)-ksiloza vezana na GlcNAcMan₅GlcNAc₂. Ovaj tip N-glikana pronađen je kod S-RNaza, enzima koji sprječavaju klijanje polenovih mješavina kod samooplodnje u porodice *Solanaceae* (Oxley i sur. 1996).

Kod biljaka N-glikozilacija proteina započinje u endoplazmatskom retikulumu prenošenjem oligosaharidnog prekursora Glc₃Man₉GlcNAc₂ s dolihol lipidnog nosača na specifični asparaginski ostatak u rastućem polipeptidnom lancu. Prekursor se zatim postupno modificira glikozidazama i glikozil-transferazama u visokomanozni, paucimanozni, hibridni ili složeni tip N-glikana. Obrada oligosaharidnog prekursora odvija se tijekom transporta proteina duž sekrecijskog puta od endoplazmatskog retikuluma do konačnih odredišta. Na kraju ovog puta neki biljni N-glikani imaju karakterističnu strukturu kojom se razlikuju od N-glikana pronađenih kod sisavaca. Biljne N-glikane karakterizira odsutnost sijalinske kiseline te prisutnost α -(1,3)-fukoze i α -(1,2)-ksiloze (Lerouge i sur. 1998). Kod sisavaca i kvasaca N-glikani vezani na glikoproteine u endoplazmatskom retikulumu složene su strukture koje proizlaze iz kruženja glikoproteina između endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog kompleksa. N-glikani izolirani iz kalretikulina štakora sadrže modifikacije (terminalno vezane galaktoze) koje se specifično događaju samo u Golgijevom kompleksu (Van Nguyen i sur. 1989). Nedostatak složenih N-glikana u kalretikulinu biljaka ne isključuje u potpunosti recikliranje iz post-endoplazmatskih odjeljaka natrag u endoplazmatski retikulum (Navazio i sur. 1996.)

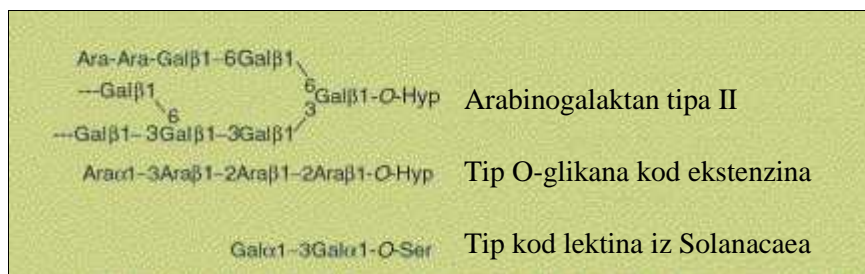
N-glikozilacija ima veliku ulogu u razvoju biljaka. Nedavno je dokazano da su za biosintezu celuloze te normalnu embriogenezu potrebni određeni enzimi N-glikozilacijskog puta. Među njima su manozna-1-fosfat-gvanilil-transferaza koja sudjeluje u sintezi GDP-manoze te α -glukozidaza I endoplazmatskog retikuluma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

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

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

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

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



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

U zadnje vrijeme procesi glikozilacije u biljaka postali su objekt mnogih istraživanja zbog mogu nosti korištenja biljaka u proizvodnji terapijskih proteina. Biljke kao "tvornice" terapijskih proteina imaju prednost pred mikroorganizmima zbog mogu nosti postranslacijskih modifikacija uklju uju i glikozilaciju, fosforilaciju i metilaciju. Posebna važnost pridaje se inaktiviranju gena za fukosiltransferaze i ksiloziltransferaze (enzima karakteristi nih za biljnu glikozilaciju) te uvo enju gena za glikoziltransferaze koji su karakteristi ni za ovjeka (Ko i sur. 2008).

1.2. Lektini

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

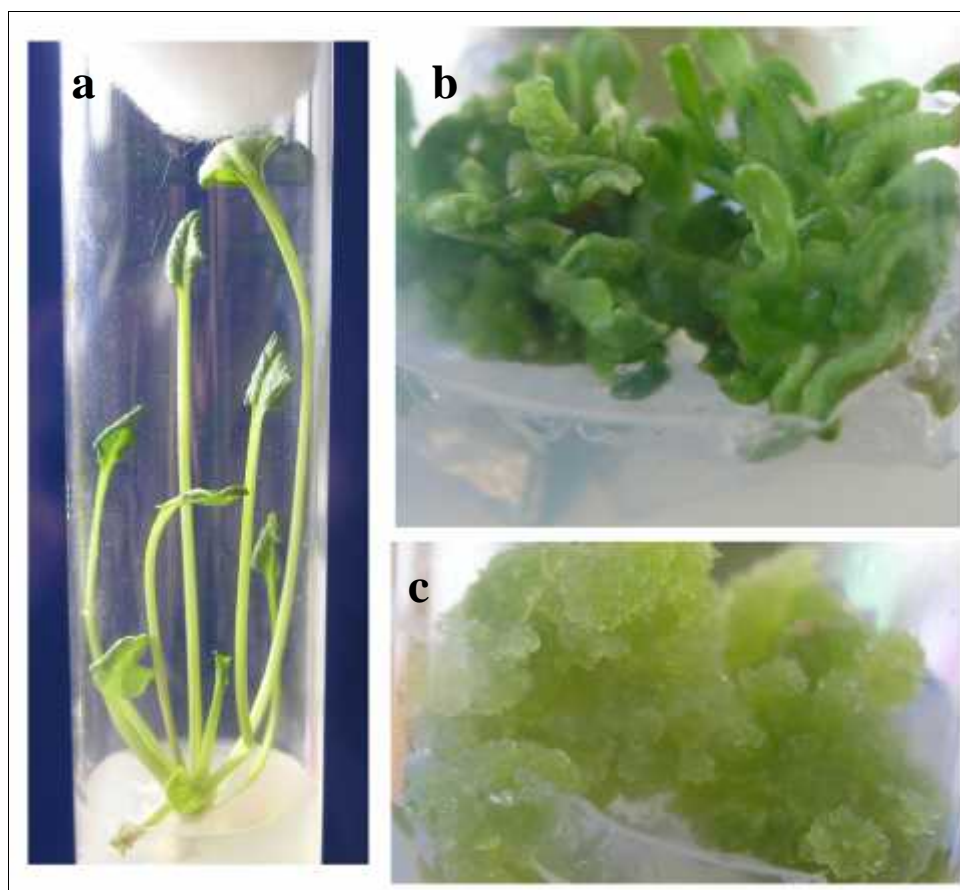
U ovom radu korištene su transformirane linije hrena (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) koje se subkultiviraju u uvjetima *in vitro* ve više od šesnaest godina (Krsnik-Rasol 1991). Tumori vrata korijena dobiveni su zaražavanjem fragmenta lista divljim tipom bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (B6S3).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

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

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Kultura tkiva

Biljke hrena (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) te njihove transformirane linije uzgojene su *in vitro* u uvjetima fotoperioda 16/8-h dan/no (intenzitet svjetlosti $90 \mu\text{E} / \text{m}^2\text{s}$) na 24°C na vrstoj hranjivoj podlozi MS bez dodatka regulatora rasta (Murashige i Skoog 1962). Tumorska i teratomska linija dobivene su inokulacijom lista s bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* soja B6S3 (Krsnik-Rasol 1991, Peškan i sur. 1996). Svaka tri tjedna kulture su presa ivane na istu hranjivu podlogu. Za analizu uzimao sam uzorke tkiva lista, teratoma i tumora nakon dvanaestog dana od presa ivanja tkiva (Slika 3).



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

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

Za elektronsku mikroskopiju pripremio sam tkivo lista, teratoma (organizirano i neorganizirano) i tumora. Tkivo sam fiksirao 1 %-tnim (v/v) glutaraldehydom u 50 mM kakodilatnom puferu (pH 7,2), 20 min na 4 °C. Nakon ispiranja u kakodilatnom puferu (2 × 10 min) tkivo sam postfiksirao 1 %-tnim osmijevim tetroksidom u 50 mM kakodilatnom puferu, 30 min na 4 °C. Nakon postfiksacije i ispiranja materijala deH₂O, preparati su dehidrirani kroz seriju etanola razli itog razrje enja (50 %, 60 %, 70 %, 80 % i 96 %). Nadalje, tkivo sam inkubirao 30 min u mješavini 100 %-tnog etanola i 100 %-tnog acetona u omjeru 1:1, te daljnjih 30 min u 100 %-tnom acetonu. Dehidrirani materijal zatim je preba en u mješavinu 100 %-tnog acetona i Spurrovog sredstva u omjeru 1:1 na 1 h i na kraju u isto Spurrovo sredstvo. Materijal je držan u Spurrovom sredstvu 5 h na 40 °C te je zatim plošno uklopljen u kalupe. Proces polimerizacije Spurrovog sredstva trajao je dva dana u termostatu na 65 °C.

U frakcije oboga ene mikrosomima endoplazmatskog retikuluma dodao sam glutaraldehyd tako da je kona ni udio glutaraldehyda bio 1 % (v/v). Nakon 30 min inkubacije na 4 °C dodao sam agar. Nakon što se agar stvrdnuo, uzorke sam izrezao na komadi e i isprao u kakodilatnom puferu. Nakon ispiranja u puferu, uzorke sam postfiksirao 1 %-tnim osmijevim tetroksidom u 50 mM kakodilatnom puferu, 30 min na 4 °C. Nakon ispiranja deH₂O preparati su dehidrirani i uklopljeni u smolu prema protokolu koji sam koristio za dehidriranje i uklapanje tkiva.

Ultratanki prerezi, debljine 70-95 nm, na injeni su ultramikrotomom pomo u staklenih noževa. Prerezi su zatim kontrastirani 4 %-tnom vodenom otopinom uranil-acetata (10 min) te nakon ispiranja deH₂O, olovnim acetatom (pH 12, 10 min) (Reynolds 1963). Na kraju, preparati su isprani toplom deH₂O.

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

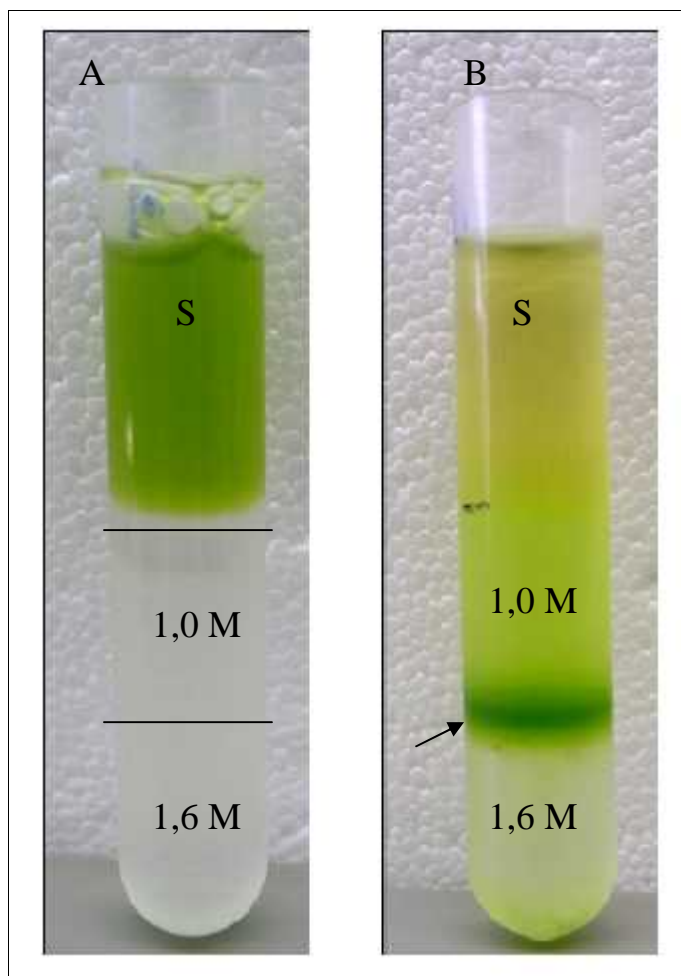
2.3. Priprema ukupnih stani nih i topivih stani nih proteina

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

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

2.4. Izolacija frakcije oboga ene mikrosomima endoplazmatskog retikuluma

Frakciju oboga enu mikrosomima endoplazmatskog retikuluma izolirao sam prema Roew (2001) uz odre ene modifikacije. U hladnom tarioniku homogenizirao sam 1 g tkiva uz dodatak 3 mL ledenohladnog homogenizacijskog pufera. Homogenizacijski pufer sadržavao je 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,33 M saharozu te 1 % (w/v) PVP. Homogenat sam centrifugirao na 1 000 × g i 4 °C tijekom 20 min. Dobiveni supernatant centrifugirao sam 10 min na 10 000 × g i 4 °C. Supernatant sam nadsvodio na diskontinurani gradijent od 1,6 M i 1,0 M saharoze. Osim saharoze, otopine za gradijent su sadržavale i 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂ i 1 mM 2-merkaptotanol. Gradijent sam centrifugirao 60 min u ultracentrifugi na 100 000 × g i 4 °C. Frakcija oboga ena mikrosomima endoplazmatskog retikuluma nalazila se na granici 1,6 M i 1,0 M saharoze (Slika 4).



Slika 4. Gradijent saharoze (A) prije i (B) nakon 60 min centrifugiranja na $100\,000 \times g$ i $4\text{ }^\circ\text{C}$. Frakcija oboga ena mikrosomima endoplazmatskog retikuluma nalazi se na granici 1,6 M i 1,0 M saharoze.

2.5. Određivanje koncentracije proteina u ekstraktima biljnog tkiva

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

2.6. Aktivnost enzima koji su primijenjeni kao biljezi frakcija

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

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

pri emu je:

- A srednja vrijednost promjene apsorbancije na zadanoj valnoj duljini u odre enom vremenskom intervalu
- f faktor s kojim se množi srednja promjena apsorbancije A da bi se rezultat izrazio u minuti
- V_{uk} ukupan volumen reakcijske smjese
- V_{uz} volumen ekstrakta
- m masa proteina u volumenu ekstrakta (izražena u mikrogramima)
- specifi an apsorpcijski koeficijent

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

2.6.1 Aktivnost NADPH-Cyt c reduktaze

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

2.6.2 Aktivnost katalaze

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

2.6.3 Aktivnost askorbat peroksidaze

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

2.6.4 Aktivnost pirogalol peroksidaze

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

2.7. Elektroforetska analiza proteina

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

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

2.8. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu i prikaz lektinima

Nakon razdvajanja proteina SDS-PAG elektroforezom, proteine sam prenio na nitroceluloznu membranu u ure aju za prijenos, BioRad Mini protean II, pri konstantnom naponu od 60 V tijekom 60 minuta. Pufer za prijenos sadržavao je 20 mM Tris/HCl (pH 6,8), 150 mM glicin i 10 % (v/v) metanol. Nakon prijenosa membrane sam obojio bojom Rouge Ponceau S kako bih potvrdio prijenos. Boju sam isprao deH₂O, a neokupirana mjesta na membrani blokirao sam inkubiraju i membranu u 0,1 % Tween-20 u puferu TBS (pH 7,5) na 4 °C preko no i. Membrane sam inkubirao s lektinima Con A, GNA, DSA, PNA, SNA, MAA, RCA I i UEA.

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

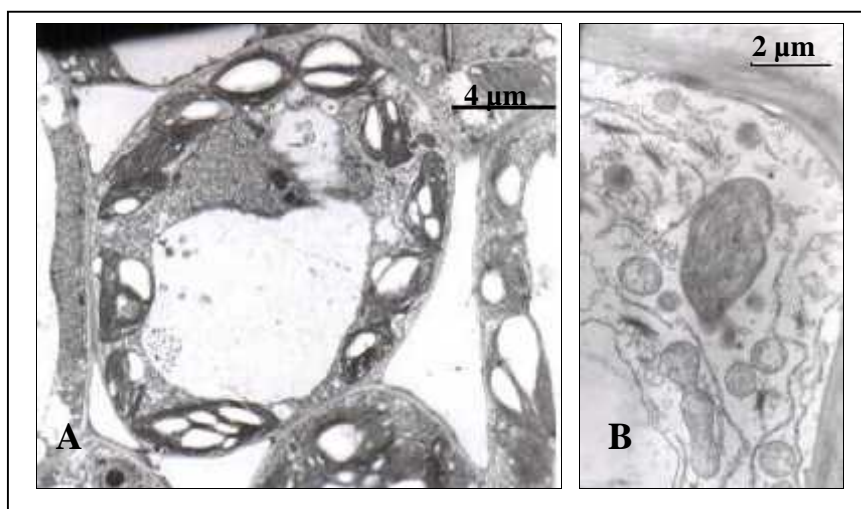
Lektini GNA, DSA, PNA, SNA i MAA obilježeni su digoksigeninom pa sam za njihov prikaz koristio alkalnu fosfatazu obilježenu anti-digoksigeninom. Koncentracija lektina u inkubacijskoj otopini bila je 1 µg/mL za GNA, SNA i DSA; 10 µg/mL za PNA te 5 µg/mL za MAA. Bojanje sam provodio prema uputama proizvođača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

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

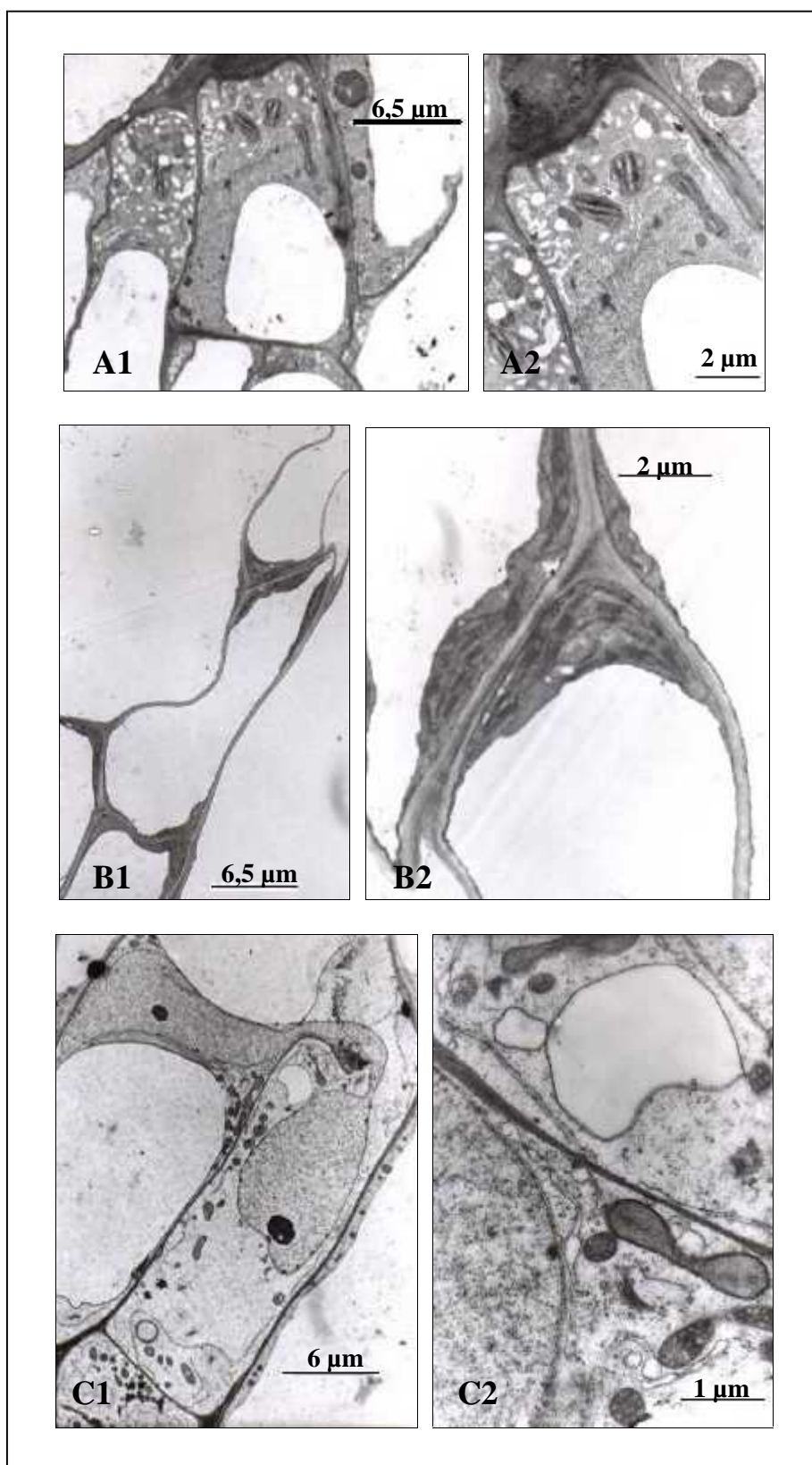
3. REZULTATI

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

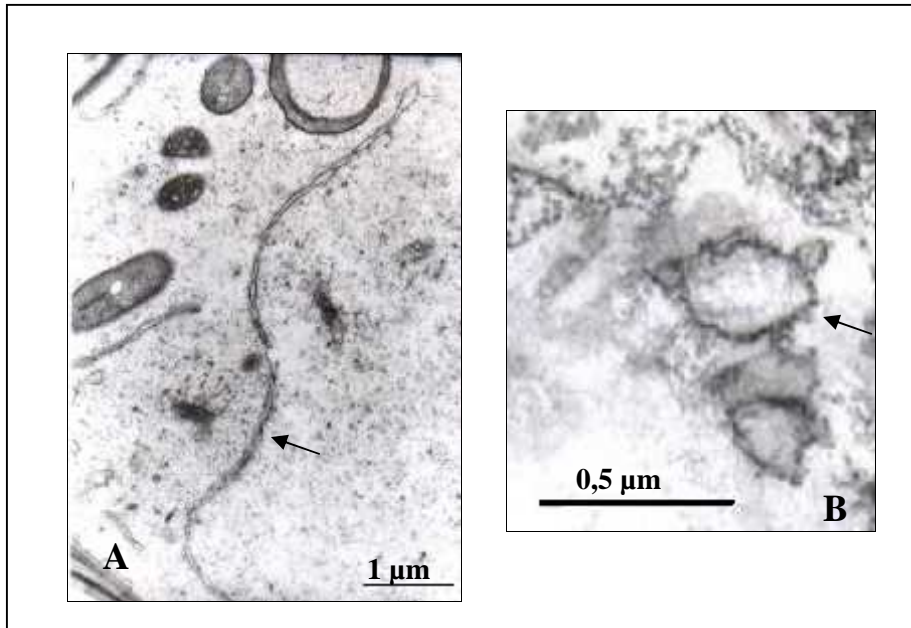
Pomoću elektronskog mikroskopa uočeno su velike razlike u unutrašnjoj građi stanica tkiva lista, teratoma (organiziranog i neorganiziranog) te tkiva tumora. Primijetio sam da mezofil lista teratoma (organizirani dio teratoma) ima populaciju stanica različitih veličina i oblika (Slika 6 A i B), za razliku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



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



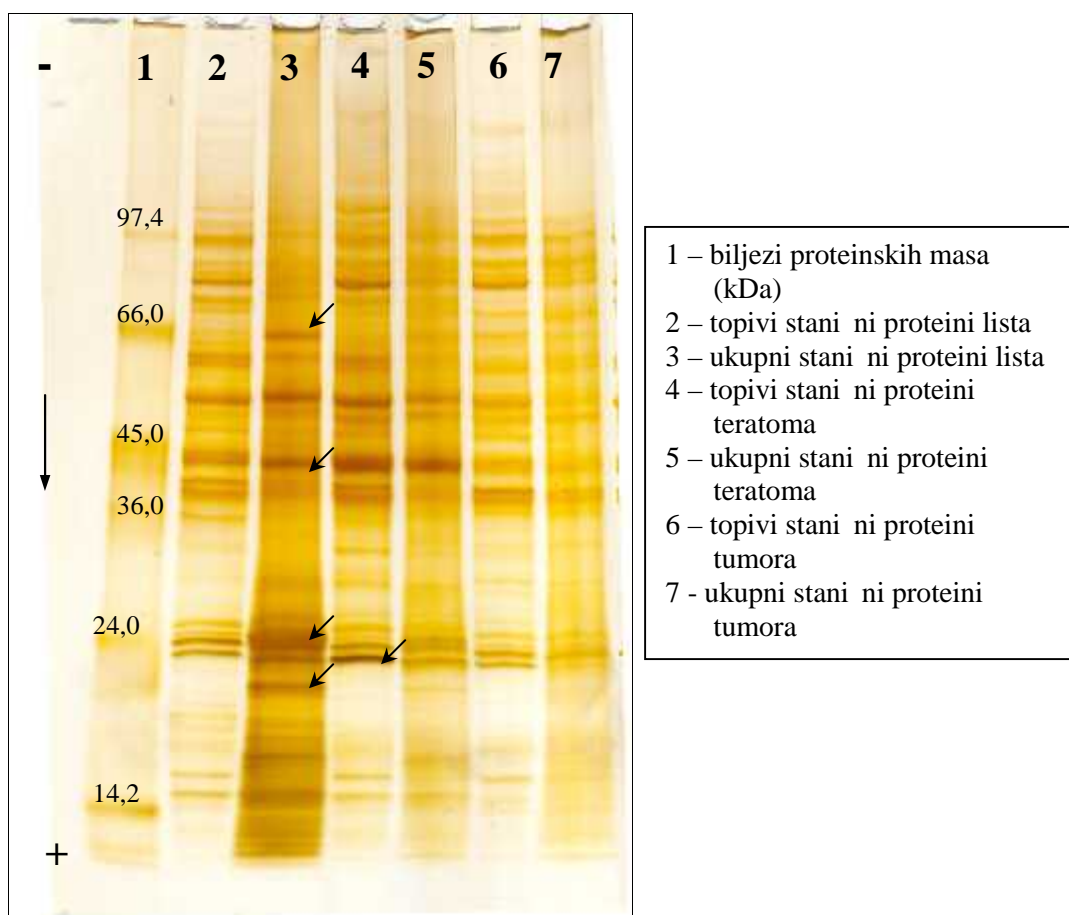
Slika 6. Strukture stanica (A i B) organiziranog i (C) neorganiziranog tkiva teratoma dobivene elektronskom mikroskopijom.



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

3.2. Određivanje elektroforetskog uzorka ukupnih staničnih i topljivih staničnih proteina

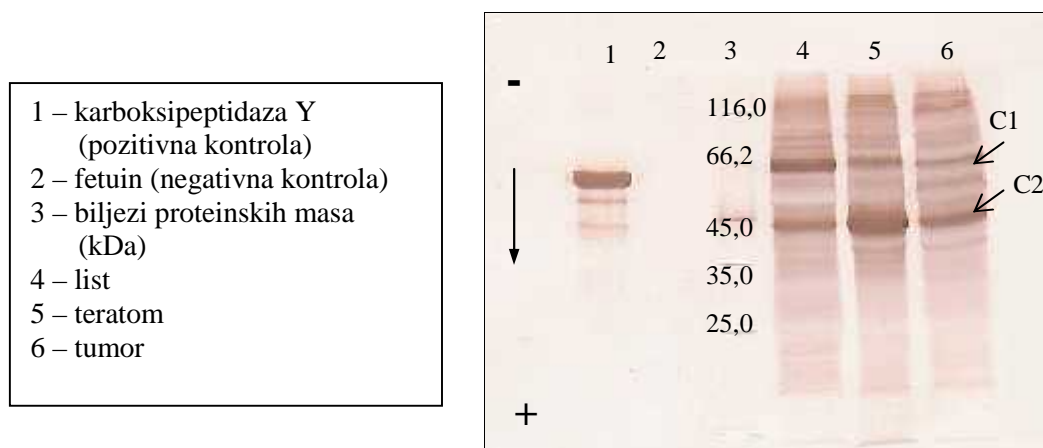
Nakon razdvajanja SDS-PAGE elektroforezom i bojanja gelova srebrovim nitratom u ekstraktima različitih tkiva hrena primijetio sam velik broj proteinskih vrhova. Uzorci proteina na gelu kod različitih tipova tkiva pokazuju međusobno veliku sličnost. Također sam primijetio veliki broj zajedničkih proteinskih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



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

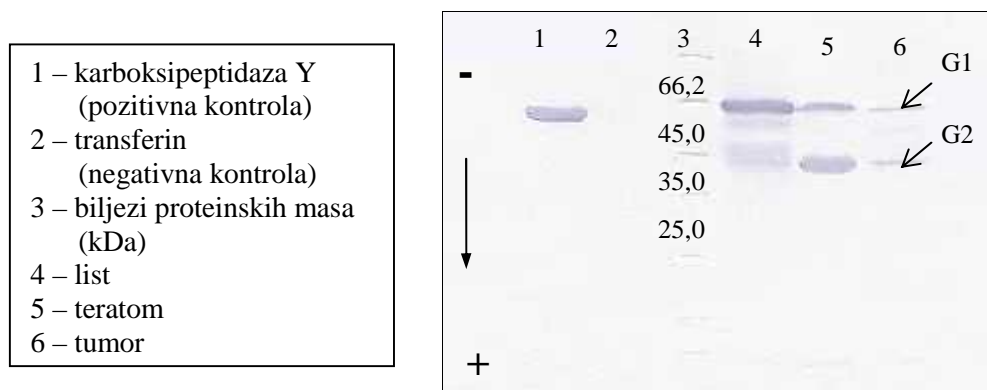
3.3. Određivanje sastava glikoproteina u ukupnim staničnim proteinima

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



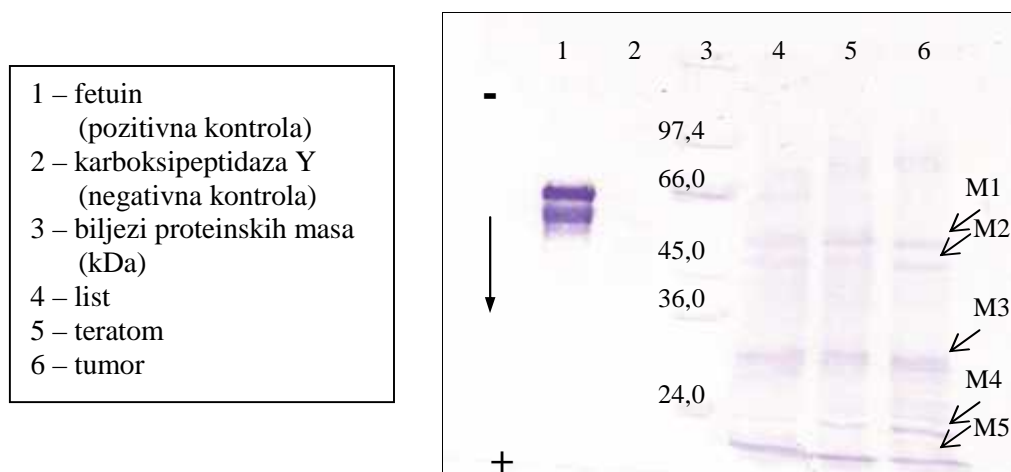
Slika 9. Sastav glikoproteina na koje se vezao lektin Con A u ukupnim staničnim proteinima hrena.

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



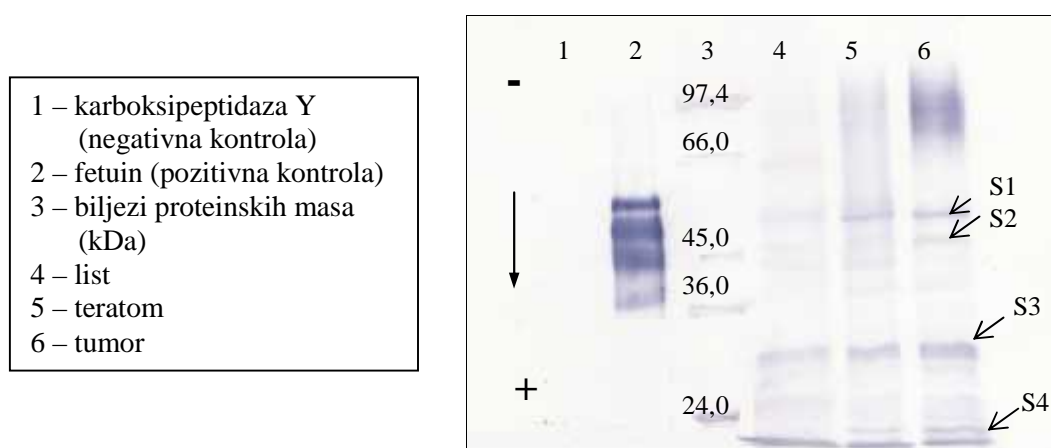
Slika 10. Sastav glikoproteina na koje se vezao lektin GNA u ukupnim staničnim proteinima hrena.

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



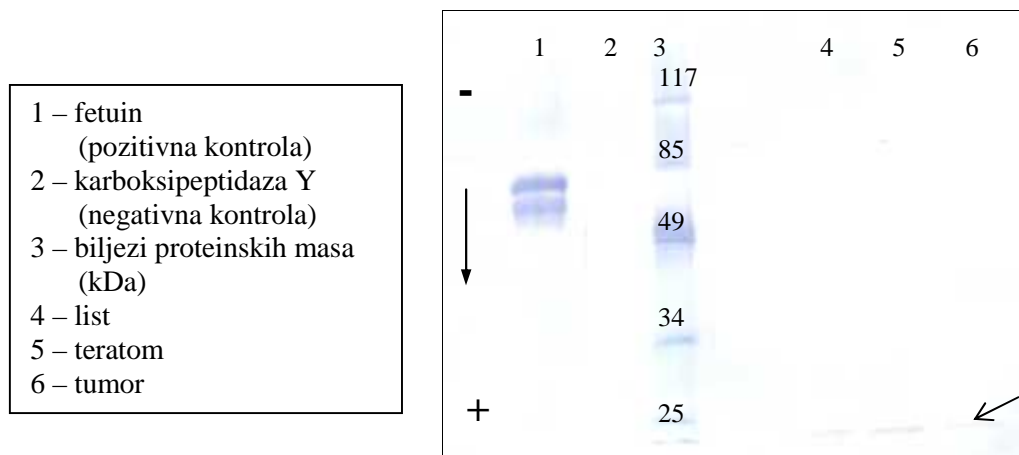
Slika 11. Sastav glikoproteina na koje se vezao lektin MAA u ukupnim stani nim proteinima hrena.

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



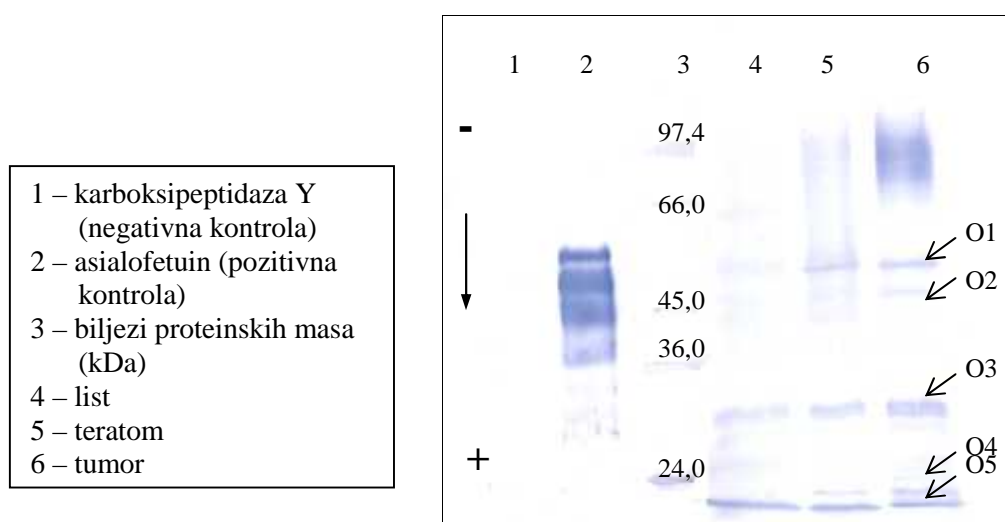
Slika 12. Sastav glikoproteina na koje se vezao lektin SNA u ukupnim stani nim proteinima hrena.

Na membrani obra enoj lektinom DSA uo io sam samo jednu vrlo slabo izraženu vrpceu na oko 20 kDa (Slika 13).



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

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



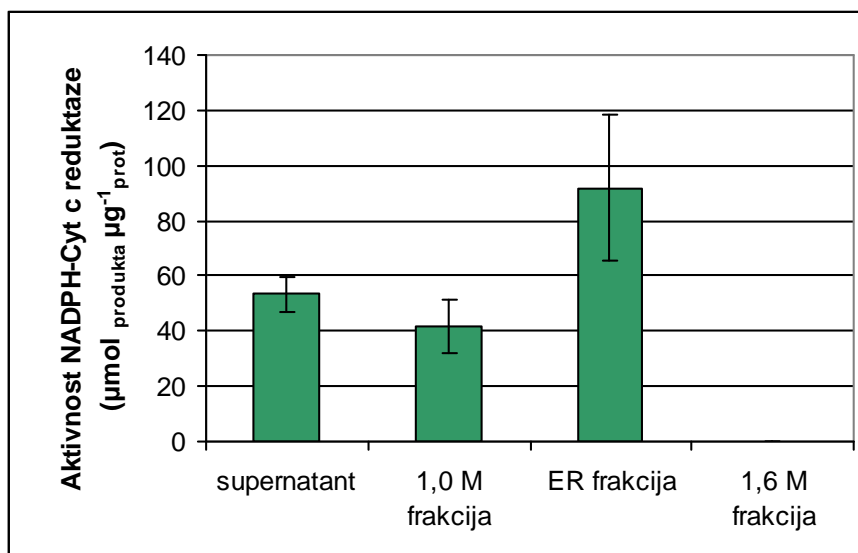
Slika 14. Sastav glikoproteina na koje se vezao lektin PNA u ukupnim stani nim proteinima hrena.

Na membranama tretiranim lektinima RCA I i UEA nisam uo io niti jednu proteinsku vrpču u ukupnim stani nim proteinima lista, teratoma i tumora hrena.

3.4. Aktivnost enzima koji su primijenjeni kao biljezi frakcija

3.4.1. Aktivnost NADPH-Cyt c reduktaze

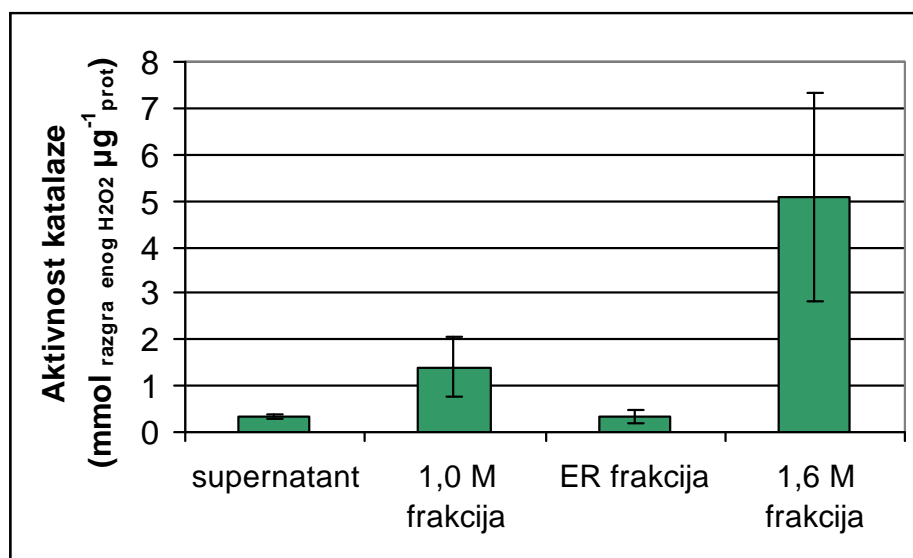
Pra enjem aktivnosti NADPH-citokrom c reduktaze duž gradijenta saharoze primjetio sam najve u aktivnost na granici 1,0 M i 1,6 M saharoze što odgovara frakciji oboga enoj mikrosomima endoplazmatskog retikuluma (Slika 15). U frakciji 1,6 M saharoze aktivnost je bila nemjerljiva. Povišenu aktivnost pokazale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



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

3.4.2. Aktivnost katalaze

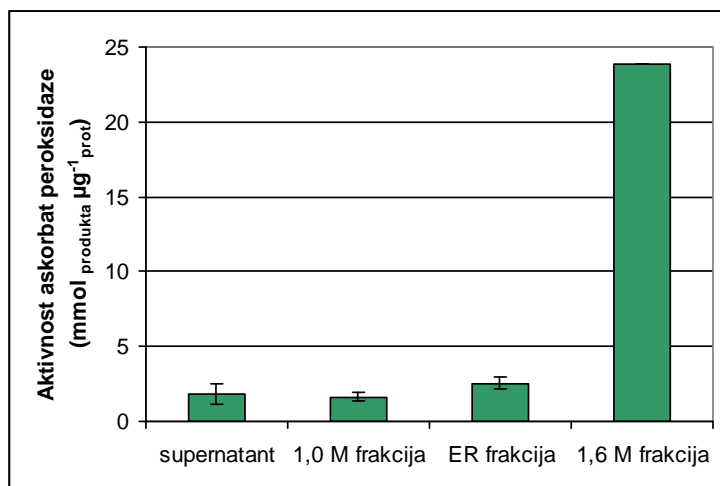
Najve u aktivnost katalaze izmjerio sam u 1,6 M frakciji koja je bila 3,5 puta ve a od aktivnosti u 1,0 M frakciji, odnosno 15,5 puta ve a od aktivnosti u supernatantu i ER frakciji (Slika 16).



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

3.4.3. Aktivnost askorbat peroksidaze

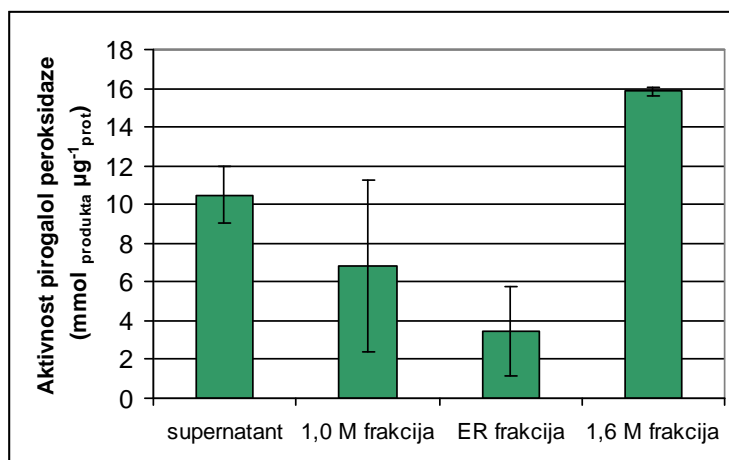
Prilikom pra enja aktivnosti askorbat peroksidaze duž gradijenta saharoze primijetio sam pove anu aktivnosti u 1,6 M frakciji u odnosu na ostale frakcije. Vrijednosti u ostalim frakcijama bile su 9 do 12 puta manje (Slika 17).



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

3.4.4. Aktivnost pirogalol peroksidaze

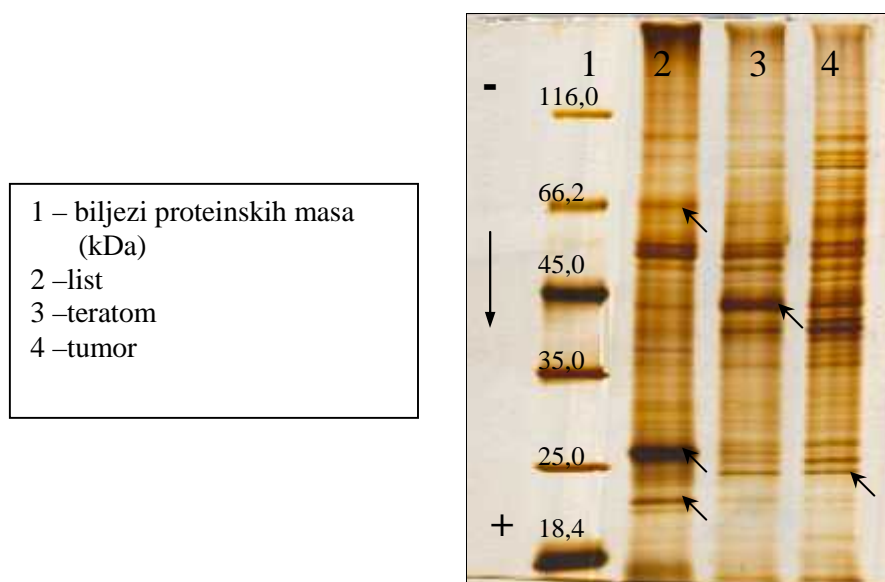
Pra enjem aktivnosti pirogalol peroksidaze najnižu aktivnost primijetio sam u frakciji oboga enoj mikrosomima endoplazmatskog retikuluma, dok je u 1,6 M frakciji izmjerena najve a aktivnost (Slika 18).



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

3.5. Elektroforetska analiza proteina iz frakcija oboga enih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma

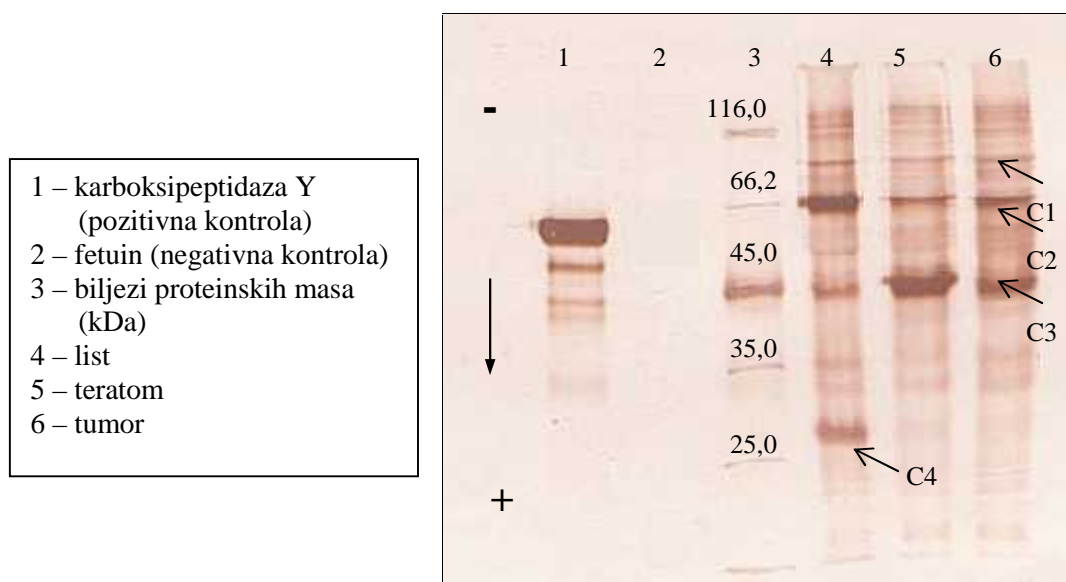
Nakon razdvajanja SDS-PAG elektroforezom te bojanja gelova srebrovim nitratom u frakcijama oboga enim mikrosomima endoplazmatskog retikuluma primijetio sam velik broj proteinskih vrpce. Uzorci proteina na gelu u razli itim tipovima tkiva pokazali su veliku sli nost, no primijetio sam i neke razlike.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



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

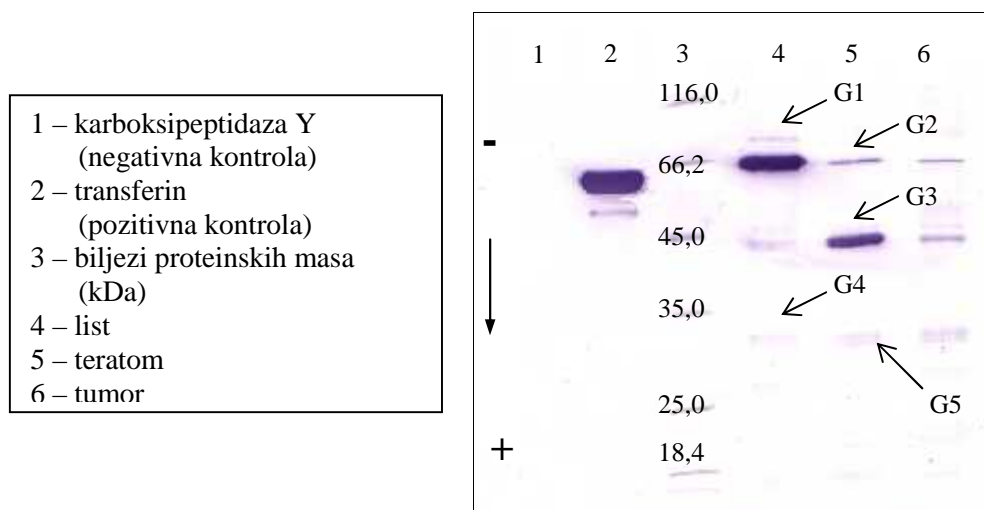
3.6. Određivanje sastava glikoproteina iz frakcija oboga enih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma

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



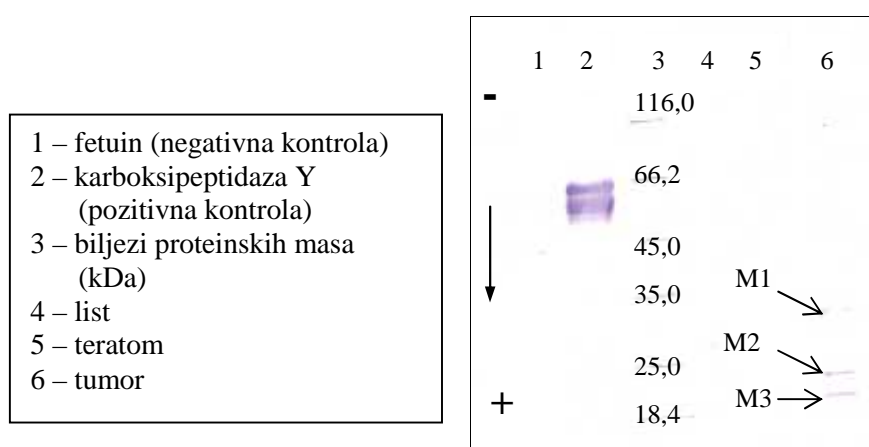
Slika 20. Sastav glikoproteina iz frakcija oboga enih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma na koje se vezao lektin Con A.

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



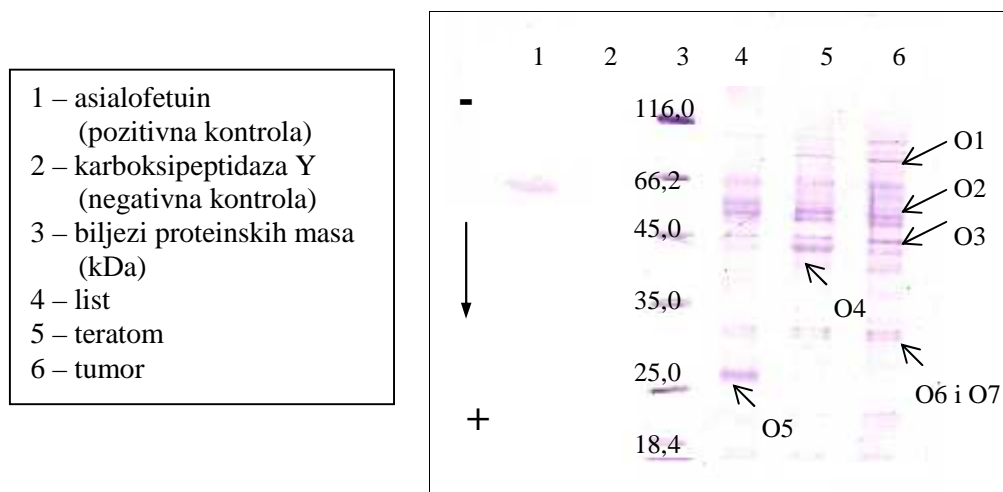
Slika 21. Sastav glikoproteina iz frakcija oboga enim mikrosomima endoplazmatskog retikuluma na koje se vezao lektin GNA.

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



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

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



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

Na membranama obra enim lektinima SNA, DSA, RCA I i UEA nisam uoio niti jednu glikoproteinsku vrpču u frakcijama oboga enim mikrosomima endoplazmatskog retikuluma.

4. Rasprava

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

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

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

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

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

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

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

Pra enjem aktivnosti NADPH-citokrom c reduktaze duž gradijenta saharoze primijetio sam najve u aktivnost ovog enzima na granici 1,0 M i 1,6 M saharoze što sam i uzimao kao frakciju oboga enu mikrosomima endoplazmatskog retikuluma. Pra enjem aktivnosti ostalih enzima duž gradijenta potvrdio sam da je rije o frakciji najmanje kontaminiranoj ostalim sadržajem stanice. Izoenzime katalaze pronalazimo u citosolu, glioksisomima te peroksisomima (Wojtaszek 1997), zbog ega mi je aktivnost katalaze duž gradijenta bila dobar pokazatelj kontaminacije ovim stani nim odjeljcima. Askorbat peroksidaze su enzimi koji razgra uju vodikov peroksid u citosolu i kloroplastima biljne stanice, a tako er je izoenzim askorbat peroksidaze otkriven i u membrani mitohondrija (Sarowar i sur. 2005). U stanicama hrena prevladava razred III peroksidaza, me u kojima dominiraju izvanstani ne i vakuolarne peroksidaze (Jespersen i sur. 1997), zbog ega sam pratio aktivnost pirogolol peroksidaza duž gradijenta.

Elektronskom mikroskopijom nisam uo io razlike u gra i endoplazmatskog retikuluma kod razli itih linija hrena. Me utim, kod transformiranih sam linija primijetio ve i broj endoplazmatskih prostora i Golgijevih cisterni, što može biti posljedica poja ane aktivnosti ovih odjeljaka. Usporedbom frakcija oboga enih mikrosomima endoplazmatskog retikuluma u elektroforetskoj slici proteina, sli no kao i kod ukupnih stani nih proteina, izme u transformiranih linija i tkiva lista uo io sam više sli nosti nego razlika. Naro ito treba istaknuti nedostatak proteinskih vrpce od 26 i 20 kDa kod transformiranih linija, te jaku obojenost vrpce od oko 45 kDa u tkivu teratoma. Upravo bi tim razlikama trebalo posvetiti posebnu pažnju u daljnjim istraživanjima.

Glikozilacijski profil proteina endoplazmatskog retikuluma tako er je prou avan primjenom lektina. Kao i kod ukupnih stani nih proteina najviše do izražaja dolaze glikoproteini od 66 i 45 kDa na membranama obra enim lektinima Con A i GNA. Kako hibridni tip N-glikana nastaje kasnije u glikozilacijskom putu proteina, za ove glikoproteine možemo re i da sadrže visokomanozni tip N-glikana koji je karakteristi an za proteine endoplazmatskog retikuluma. Na membranama obra enim lektinom GNA uo io sam i neke dodatne vrpce koje nisu bile vidljive u ekstraktima ukupnih stani nih proteina. Tako er sam zamijetio ve i broj glikoproteina otkrivenih lektinom PNA nego kod ukupnih stani nih proteina. PNA specifi no prepoznaje slijed Gal- (1,3)-GalNAc u O-glikanima. Zanimljivo je da glikoproteini od 66 i 45 kDa, koji su vidljivi na membranama obra enim s Con A i GNA, tako er stupaju u interakcije i s PNA. Ovaj rezultat može ukazivati da navedeni proteini sadrže i N- i O-glikozilacijska mjesta ili da GNA i PNA prepoznaju razli ite glikoproteine sli ne molekularne mase koji se nisu razdvojili SDS-PAG elektroforezom. Ako se dokaže

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

5. Zaključak

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

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

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

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

6. Literatura

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Matsuoka, K (2003) Protein modification in the Golgi apparatus. *Ann. Plant Rev.* 9, 102-113.
- Monzo A, Bonn GK, Guttman A (2007) Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. *Trends Analyt. Chem.* 26, 423-432.
- Munné-Bosch S, Alegre L (2001) Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. *Plant Physiol.* 125, 1094–1102.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880.
- Navazio L, Baldan B, Mariani P, Gerwig GJ, Vliegenthart JFG (1996) Primary structure of the N-linked carbohydrate chains of Calreticulin from spinach leaves. *Glycoconj. J.* 13, 977-983.
- Nguyen Van P, Peter F, Söling HD (1989) Four intracisternal calcium-binding glycoproteins from rat liver microsomes with high affinity for calcium. *J. Biol. Chem.* 264, 17494-17501.
- Oxley D, Munro SLA, Craik DJ, Bacic A (1996) Structure of N-glycans on the S3- and S6-allele stylar self-incompatibility ribonucleases of *Nicotiana glauca*. *Glycobiology* 6, 611-618.
- Park OK (2003) Proteomic studies in plants. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37, 133-138.
- Peškan T, Turković Perica M, Krsnik-Rasol M (1996) Biochemical characterization of horse-radish tumour and teratoma tissues. *Plant Physiol. Biochem.* 34, 385–391.
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212.

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

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

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

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

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

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

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

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

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