

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Alen Crnković

Glikozilacija izvanstaničnih proteina tijekom
somatske embriogeneze bundeve
(*Cucurbita pepo* L.)

Diplomski rad

Zagreb, 2010.

Ovaj rad, izrađen u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

GLIKOZILACIJA IZVANSTANIČNIH PROTEINA TIJEKOM SOMATSKE EMBRIOGENEZE BUNDEVE (*Cucurbita pepo* L.)

Alen Crnković

Institut Ruđer Bošković, Zavod za molekularnu biologiju,
Bijenička 54, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Biljne stanice u suspenziji rastu i izlučuju proteine u hranidbenu podlogu i time utječu na daljnji rast i diferencijaciju stanica. Glikoproteini čine većinu izvanstaničnih proteina od kojih mnogi imaju strukturnu i/ili enzimatsku ulogu. Ranija istraživanja pokazala su da se profil izlučenih proteina mijenja ovisno o promjenama vezanim uz indukciju somatske embriogeneze, a nepravilna glikozilacija može izazvati zastoj u razvitku embrija. Jedan od najbolje opisanih glikoproteina vezanih uz somatsku embriogenezu biljaka je endohitinaza EP3, karakteristična za rani stadij embriogeneze u mrkve i uročnjaka.

Cilj istraživanja bio je usporediti status glikozilacije proteina izlučenih u staničnoj suspenziji dviju embriogenih linija bundeve induciranih pomoću 2,4-D ili na modificiranoj podlozi MS bez hormona koja sadrži 1 mM NH₄Cl kao jedini izvor dušika. Uočeno je da je tijekom kultivacije embriogenog tkiva u podlozi s NH₄Cl kao jedinim izvorom dušika dolazilo do značajnog zakiseljavanja podloge. Dodatkom 25 mM MES, vrijednost pH podloge je stabilizirana što je potaklo izlučivanje izvanstaničnih proteina. Prisustvo i promjene u aktivnosti specifičnih izvanstaničnih endohitinaza ovisile su o hranidbenoj podlozi i razvojnim promjenama tijekom somatske embriogeneze. Izvanstanični proteini razdvojeni su elektroforezom SDS-PAGE, preneseni na membranu i analizirani obradom membrane različitim lektinima (ConA, GNA, DSA, PNA). Rezultati rada pokazali su da postoji razlika u razini glikozilacije uzrokovane različitim sastavom i vrijednosti pH kultivacijske podloge.

(42 stranice, 11 slika, 70 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *C. pepo*, dušik, endohitinaza, EP3, glikozilacija, izvanstanični proteini, pH, somatska embriogeneza

Voditeljica: Dr. sc. Snježana Mihaljević, zn. sur.

Suvoditeljica: Doc. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić, dr. sc. Snježana Mihaljević, zn. sur., doc. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, dr. sc. Damjan Franjević

Rad prihvaćen: 30. lipnja 2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

GLYCOSYLATION OF EXTRACELLULAR PROTEINS DURING SOMATIC EMBRYOGENESIS IN PUMPKIN (*Cucurbita pepo* L.)

Alen Crnković

Ruđer Bošković Institute, Department of Molecular Biology,
Bijenička 54, 10 000 Zagreb, Croatia

Plant cells cultivated in a suspension secrete proteins in the cultivation medium, thereby affecting the further growth and cell differentiation. Glycoproteins make up the majority of extracellular proteins, many of which have structural and/or enzymatic role. Previous research has shown that the profile of extracted protein is changed in relation to changes during somatic embryogenesis induction. Moreover, an abnormal glycosylation may cause delay in plant embryo development. One of the best described glycoprotein associated with somatic embryogenesis of plants is endochitinase EP3, characteristic for the early stage of embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*.

The objective of this work was to compare the glycosylation status of proteins extracted in cell suspension of two pumpkin embryogenic lines induced by 2,4-D or on a modified MS medium without hormones containing 1 mM NH₄Cl as the sole source of nitrogen. It was noted that the cultivation medium with NH₄Cl as the sole source of nitrogen undergo acidification. The addition of 25 mM MES stabilized pH of the culture medium, what enhanced the secretion of extracellular proteins. Presence of specific endochitinases and changes in their activity depended on the medium composition and developmental changes during somatic embryogenesis. Extracellular proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis, transferred to membrane and analyzed by processing membrane with different lectins (ConA, GNA, DSA, PNA). The results showed that there was a difference in the level of glycosylation caused by medium composition and pH.

(42 pages, 11 figures, 70 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: *Cucurbita pepo*, endochitinase, EP3, extracellular proteins, glycosylation, nitrogen, pH, somatic embryogenesis

Supervisors: dr. sc. Snježana Mihaljević, Assoc. Invest., dr. sc. Dunja Leljak-Levanić, Asst. Prof.

Reviewers: dr. sc. Dunja Leljak-Levanić, Asst. Prof., dr. sc. Snježana Mihaljević, Assoc. Invest., dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Asst. Prof., dr. sc. Damjan Franjević

Thesis accepted: June 30th 2010

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. EMBRIOGENEZA U BILJAKA	1
1.2. BIOLOŠKA FIKSACIJA DUŠIKA	2
1.3. ASIMILACIJA NITRATA	4
1.4. ASIMILACIJA AMONIJEVIH IONA	5
1.5. UČINAK AMONIJEVIH IONA NA RAZVITAK BILJAKA I EMBRIJA	7
1.6. UČINAK IZVANSTANIČNIH PROTEINA NA SOMATSKU EMBRIOGENEZU	9
1.7. GLIKOZILACIJA U BILJAKA	11
1.8. OBRAZLOŽENJE TEME	13
2. MATERIJALI I METODE	15
2.1. BILJNI MATERIJAL	15
2.2. METODE	15
2.2.1. Uvjeti kultiviranja embriogenog tkiva	15
2.2.2. Izdvajanje izvanstaničnih proteina iz kultivacijske podloge	16
2.2.3. Izdvajanje ukupnih staničnih proteina	16
2.2.4. Mjerenje koncentracije proteina	17
2.2.5. Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu ...	18
2.2.6. Bojanje SDS-poliakrilamidnih gelova srebrom	19
2.2.7. Imunodetekcija proteina na membrani (Western analiza)	19
3. REZULTATI	23
3.1. ELEKTROFORETSKA SLIKA IZVANSTANIČNIH PROTEINA	23
3.2. IMUNODOKAZIVANJE ENDOHITINAZE EP3	25
3.2.1. Imunodokazivanje endohitinaze EP3 u uzorku izvanstaničnih proteina	25
3.2.2. Imunodokazivanje endohitinaze EP3 u uzorku ukupnih topivih staničnih proteina	27
3.3. ANALIZA IZVANSTANIČNIH GLIKOPROTEINA LEKTINIMA	28
3.3.1. Konkavalin A	28
3.3.2. GNA	29
3.3.3. PNA	30
3.3.4. DSA	31
4. RASPRAVA	32
5. ZAKLJUČAK	36
6. LITERATURA	37

1. UVOD

1.1. EMBRIOGENEZA U BILJAKA

Embriogeneza je proces kojim započinje razvoj biljke. Iako embriogeneza obično počinje spajanjem spermija i jajne stanice u jednostaničnu zigotu, u određenim uvjetima i somatske stanice mogu postati embriogene. Taj proces pokazuje pravu prirodu totipotentnosti biljnih stanica. Somatska embriogeneza je aseksualni način razmnožavanja biljaka, bez fuzije gameta. Stvaranje somatskih embrija može se zbivati prirodnim putem kao u vrste *Malaxis*, gdje se somatski embriji pojavljuju spontano na vrhovima listova (Taylor 1967), ili u obliku apomiksije (razvoj sjemenki bez oplodnje). U uvjetima *in vitro*, somatsku embriogenezu moguće je potaknuti dvama mehanizmima: izravno na primarnom eksplantatu i posredno, iz kalusa (Santacruz-Ruvalcaba i sur. 1998). Kod posredne embriogeneze najprije se razvija kalusno tkivo u kojem se kasnije zameću embriji iz takozvanih determiniranih embriogenih stanica. Diferencirane stanice se najprije dediferenciraju i zatim, nakon stanične diobe, ponovno determiniraju kao embrijske stanice. Zajedničke karakteristike embrionalnih stanica su: malih su dimenzija i brzo se dijele, imaju gustu citoplazmu, male vakuole i velike jezgre s istaknutom jezgričicom.

Somatski embriji prolaze karakteristične morfološke stadije razvoja embrija kao i zigotni embriji. Zreli somatski embriji ne razlikuju se od zigotnih embrija ni strukturno ni biokemijski (Jelaska 1994). Karakteristični stadiji zigotne embriogeneze mnogih kritosjemenjača su:

globularni stadij: nakon prve zigotne diobe, apikalne stanice ulaze u seriju dioba te 30 sati nakon oplodnje stvaraju osmostanični globularni embrio,

srcoliki stadij: dolazi do brze diobe stanica na dvije strane budućeg apikalnog pola,

torpedo stadij: dolazi do izduživanja stanica uz os embrija,

stadij zrelog embrija: embrio gubi vodu i ulazi u stadij mirovanja.

Kod većine biljaka somatsku embriogenezu moguće je potaknuti dodavanjem auksina u podlogu (Toonen i sur. 1994). Poslije inicijacije diobe stanica i perioda proliferacije u prisutnosti auksina, jedan mali dio populacije stanica postaje embriogen (De Vries i sur. 1988). Te nakupine malih citoplazmatskih stanica nazivaju se još i proembriogena masa (Halperin 1966). Suprotno od neembriogenih stanica, proembriogena masa postaje

neosjetljiva na auksin (Lo Schiavo i sur. 1991). Međutim, osjetljivost na auksine postepeno se vraća sa zrenjem i klijanjem embrija.

Ponekad stanice mogu postati embriogene ne samo ako se u medij dodaju regulatori rasta, nego i uslijed naglih promjena vanjskih čimbenika kao što su vrijednost pH hranidbene podloge, toplina, utjecaj električnog polja (Dijak i sur. 1986), koncentracija soli (Kiyosue i sur. 1989), dodatak teških metala (Kamada i sur. 1989, Kiyosue i sur. 1990), etanola ili gamma zračenjem (Pechan i Keller 1989). Isto tako, i razvoj embrija može se kontrolirati tretmanima koji ne uključuju regulatore rasta, npr. promjenom osmolarnosti te upotrebom različitih oblika dušikovih soli (Leljak i Jelaska 1995).

Somatsku embriogenezu bundeve moguće je potaknuti na podlozi s auksinom 2,4-D ili na podlozi s 1 mM NH_4Cl kao jedinim izvorom dušika (Leljak i Jelaska 1995). Embriogeno tkivo bundeve inducirano i održavano na podlozi s 1 mM NH_4Cl kao jedinim izvorom dušika raste sporo i izaziva zakiseljavanje podloge u kulturi (Leljak-Levanić i sur. 2003). Embriogeno tkivo sastoji se od malih agregata sferičnih stanica s gustom citoplazmom koje se na opisanoj podlozi ne mogu razviti u zrelije stadije embrija. Razvitak odvedenijih razvojnih stadija embrija moguć je nakon supkultiviranja embriogenog tkiva na podlogu bez hormona, s dodatkom dušika u obliku amonijevih (20 mM NH_4^+) i nitratnih (40 mM NO_3^-) iona (Leljak-Levanić i sur. 2003).

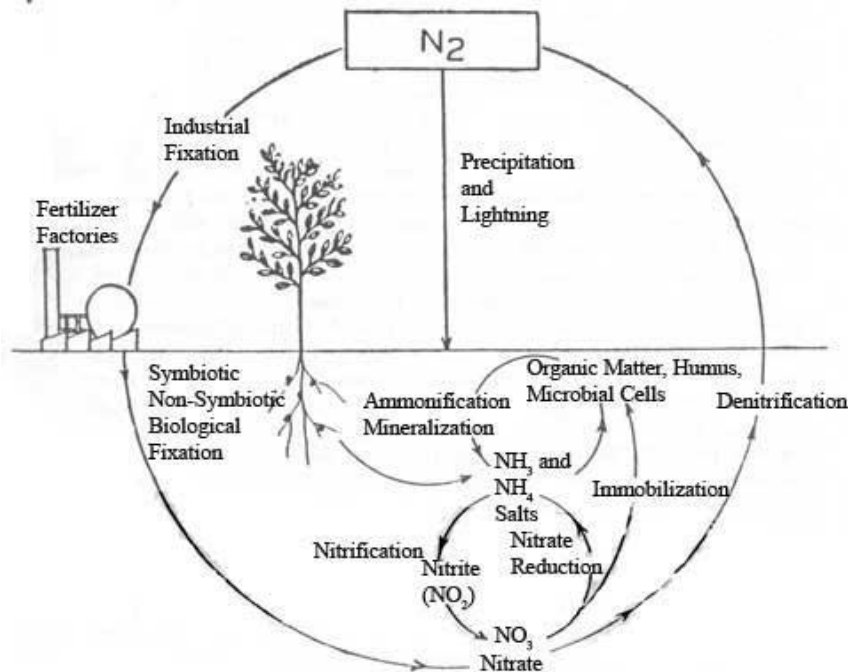
1.2. BIOLOŠKA FIKSACIJA DUŠIKA

Mnoge organske molekule u biljnim stanicama sadržavaju dušik. Dušik se nalazi u nukleozid fosfatima i aminokiselinama, a oni su osnovni građevni blokovi za izgradnju nukleinskih kiselina i proteina. Dodavanje anorganskog dušika u mnogim prirodnim i agrikulturalnim ekosistemima za posljedicu ima značajan porast biološke produktivnosti, što ukazuje na važnost dušika kao hranidbenog elementa.

U biosferi, dušik se nalazi u mnogo oblika (sl. 1). U atmosferi ima 78% molekularnog dušika (N_2), ali ta velika količina nije direktno dostupna živim organizmima. Da bi atmosferski dušik postao dostupan, najprije se moraju pocijepati veoma stabilne trostruke kovalentne veze između dva atoma dušika ($\text{N}\equiv\text{N}$) kako bi nastao amonijak (NH_3), amonijevi ioni (NH_4^+), nitrit (NO_2^-) i nitrat (NO_3^-).

Više biljke upotrebljavaju dušik uglavnom u obliku amonijevih iona i nitrata. Ključan događaj u uključivanju atmosferskog dušika u biokemijske cikluse u biosferi je biološka fiksacija dušika koju provode prokarioti (bakterije, actinobakterije i određeni tipovi

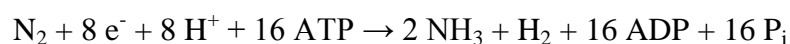
anaerobnih bakterija). Neki od ovih organizama žive samostalno (*Azotobacter*), a neki u simbiozi s biljkama (*Rhizobium*).

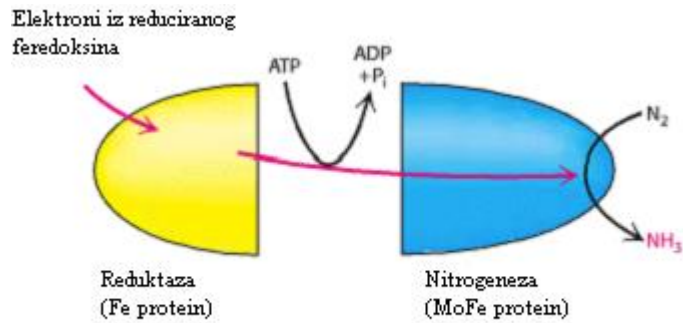


Slika 1. Ciklus dušika u prirodi. Preuzeto s: <http://www.microbiologyprocedure.com/soil-microbiology-introduction/turnover-of-nitrogen.html>

Fiksacija dušika mora se odvijati samo u anaerobnim uvjetima budući da kisik ireverzibilno inaktivira nitrogenazu, glavni enzim u tom procesu (sl. 2). Stoga, svaki organizam koji fiksira dušik djeluje u anaerobnim uvjetima ili je sposoban sam stvoriti anaerobne uvjete. Npr. cijanobakterije stvaraju anaerobne uvjete pomoću specijaliziranih organela zvanih heterociste, dok aerobne bakterije vrste *Azotobacter* anaerobne uvjete za fiksaciju dušika stvaraju visokom stopom respiracije (Burriss 1976). Bakterije vrste *Rhizobium*, koje žive u simbiozi s biljkama, za potrebe fiksacije dušika iz atmosfere stvaraju posebna nabreknuća na korijenju biljaka, tzv. nodule.

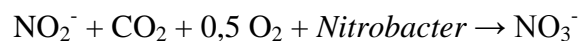
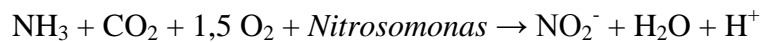
Enzim nitrogenaza sastoji se od dvije podjedinice: reduktaze, koja je izvor elektrona, i nitrogenaze, koja koristi te elektrone da bi reducirala dušik. Transfer elektrona s reduktaze do nitrogenaze zbiva se uz hidrolizu ATP-a.





Slika 2. Enzimski kompleks nitrogenaze (Stryer 2004)

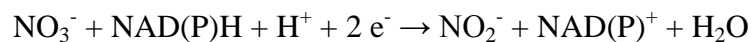
Drugi važan proces u asimilaciji anorganskog dušika je nitrifikacija - asimilacija amonijevih iona koji su u tlu nastali razgradnjom organskih tvari. U procesu nitrifikacije amonijevi ioni oksidiraju do nitrita i nitrata. Nitrifikaciju provode bakterije vrste *Nitrosomonas* i *Nitrobacter*. Bakterije vrste *Nitrosomonas* oksidiraju NH_4^+ u NO_2^- , a bakterije vrste *Nitrobacter* NO_2^- u NO_3^- .



Jednom kada je fiksiran u obliku amonijevih iona ili nitrata, dušik ulazi u biokemijske cikluse i prolazi kroz nekoliko organskih i anorganskih oblika prije nego što se u konačnici vrati u molekularni oblik (N_2). Amonijevi i nitratni ioni stvoreni fiksacijom ili otpušteni razgradnjom organske tvari predmet su intenzivne kompeticije između biljaka i mikroorganizama.

1.3. ASIMILACIJA NITRATA

Prvi korak u asimilaciji nitrata apsorbiranog korijenjem je redukcija nitrata do nitrita u citosolu (Oaks 1994). Tu reakciju katalizira enzim nitrat-reduktaza prema jednadžbi:

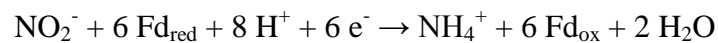


gdje NAD(P)H označava NADH ili NADPH . Enzim nitrat-reduktaza prenosi dva elektrona s NAD(P)H preko tri redoks centara koji se sastoje od dvije prostetičke skupine (flavin-andenin dinukleotid i hem) i kofaktora molibdena (MoCo), koji je kompleks molibdena i pterina.

Nitrat-reduktaza u listu najčešće koristi NADH kao donor elektrona, dok drugi oblik nitrat reduktaze koji se nalazi u korijenu koristi NADH i NADPH (Warner i Kleinhofs 1992).

Nitrat, svjetlo i ugljikohidrati čimbenici su koji utječu na aktivnost nitrat-reduktaze na nivou transkripcije i translacije (Sivansankar i Oaks 1996). Ti vanjski čimbenici stimuliraju enzim protein-fosfatazu da defosforilira serinske ostatke na nitrat-reduktazi i tako je aktivira. Suprotno tome, tiamin i Mg^{2+} stimuliraju enzim protein-kinazu da fosforilira iste te serinske ostatke, na koje se tada veže inhibitor te inaktivira nitrat-reduktazu (Keiser i sur. 1999).

Nitrit je veoma reaktivan te potencijalno toksičan ion pa biljke odmah transportiraju stvoreni nitrit iz citosola u kloroplaste u lišću ili ostale plastide u korijenju. U tim organelima nitrit reduktaza reducira nitrit do amonijevih iona prema jednadžbi:



gdje Fd označava feredoksin, a supskripti *red* i *ox* označavaju termine *reduciran* i *oksidiran*. Reducirani feredoksin nastaje prijenosom elektrona u procesu fotosinteze u kloroplastima i u stanicama korijenja u putu pentoza-fosfata.

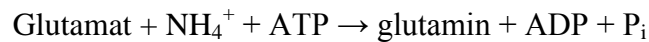
Kloroplasti i plastidi u korijenju imaju različite forme nitrit-reduktaze, ali obje forme sastoje se od jednog polipeptida s dvije prostetičke skupine (Fe_4S_4) i hema (Siegel i Wilkerson 1989). Djelujući zajedno, te skupine vežu nitrit i reduciraju ga direktno u amonijev ion, bez asimilacije dušikovih spojeva u međukoracima.

1.4. ASIMILACIJA AMONIJEVIH IONA

Amonijeve ione iz rizosfere ili intercelulara biljke uzimaju putem transportera amonijevih iona koji se nalaze u plazma membrani i distribuira ih u unutarstanične odjeljke kao što su kloroplasti, mitohondriji i vakuole. Koncentracija amonijevih iona u organelima varira ovisno o brojnim čimbenicima uključujući koncentraciju u susjednim organelima, razlici u pH i električnom potencijalu između organela. U organelima u kojima su amonijevi ioni metabolizirani, kao što su citosol i plastidi, ravnotežna koncentracija je niža od predviđene vrijednost.

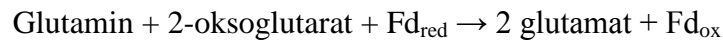
Osim toga, amonijevi ioni mogu nastati u biljnim stanicama tijekom katabolizma proteina, a transporteri omogućuju da se amonijevi ioni premjeste iz mjesta nastajanja u mjesta potrošnje. Ipak, amonijevi ioni ne koriste se za transport dušika na veće udaljenosti u biljci, nego umjesto toga većina amonijevih iona asimilira se djelovanjem glutamin sintetaze u citoplazmi i plastidima.

Primarni put za asimilaciju amonijevih iona uključuje nekoliko uzastopnih reakcija glutamin sintetaze i glutamat sintaze (Lea i sur. 1992). Glutamin sintetaza (GS) kombinira amonijev ion s glutamatom kako bi nastao glutamin prema jednadžbi:



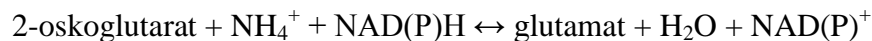
Biljke imaju dvije vrste GS, jednu u citosolu i drugu u plastidima korijenja i kloroplastima izdanaka. GS u korijenju stvara amidni dušik za lokalnu upotrebu, a GS u kloroplastima izdanaka reasimilira NH_4^+ nastao fotorespiracijom (Lam i sur. 1996).

Povećana razina glutamina u plastidima stimulira glutamat sintazu (glutamin oksoglutarat aminotransferaza, GOGAT). On prenosi amidnu grupu glutamina na 2-oksoglutarat da bi nastale dvije molekule glutamata. Reakcija se odvija prema jednadžbi:

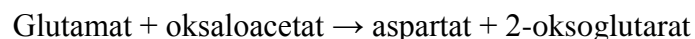


Biljke imaju dva tipa GOGAT. Jedan tip prima elektrone s NADH, a drugi s feredoksina.

Sekundarni put asimilacije amonijevih iona ide pomoću glutamat dehidrogenaze (GDH). Taj enzim katalizira reverzibilnu reakciju koja sintetizira ili deaminira glutamat:

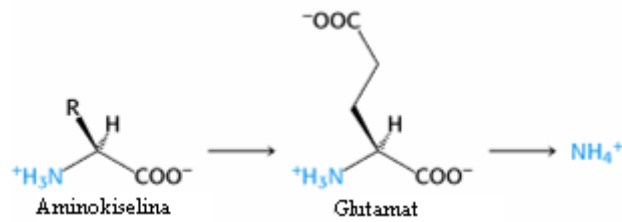


Jednom kada je dušik asimiliran u glutamin ili glutamat, on se može ugraditi u ostale aminokiseline reakcijom transaminacije. Enzimi koji kataliziraju takve reakcije zovu se aminotransferaze. Primjer za takvu reakciju je aspartat aminotransferaza (Asp-AT) koja katalizira nastajanje aspartata:

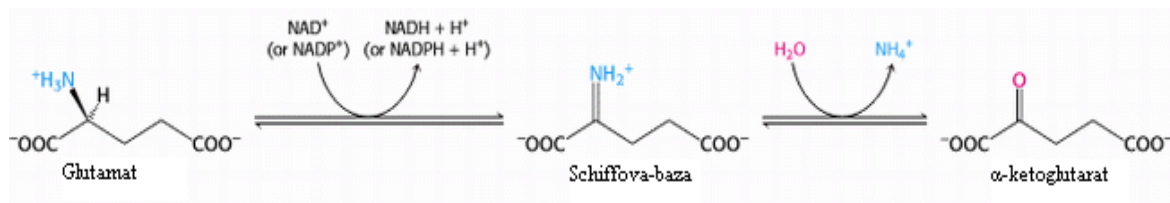


Aminotransferaze se nalaze u citoplazmi, kloroplastima, mitohondrijima, glioksisomima i peroksisomima.

Pri razgradnji proteina iste te aminotransferaze odcjepljuju amino-skupine aminokiselina i vezuju ih na α -ketoglutarat te tada nastaje glutamat.



Dušikov atom koji je prenesen na α -ketoglutarat u reakciji transaminacije, pretvara se u slobodan amonijev ion oksidativnom deaminacijom. Ta reakcija katalizirana je glutamat dehidrogenazom. Dolazi do dehidrogenacije C-N veze, te nastaje Schiffova baza koja hidrolizira.

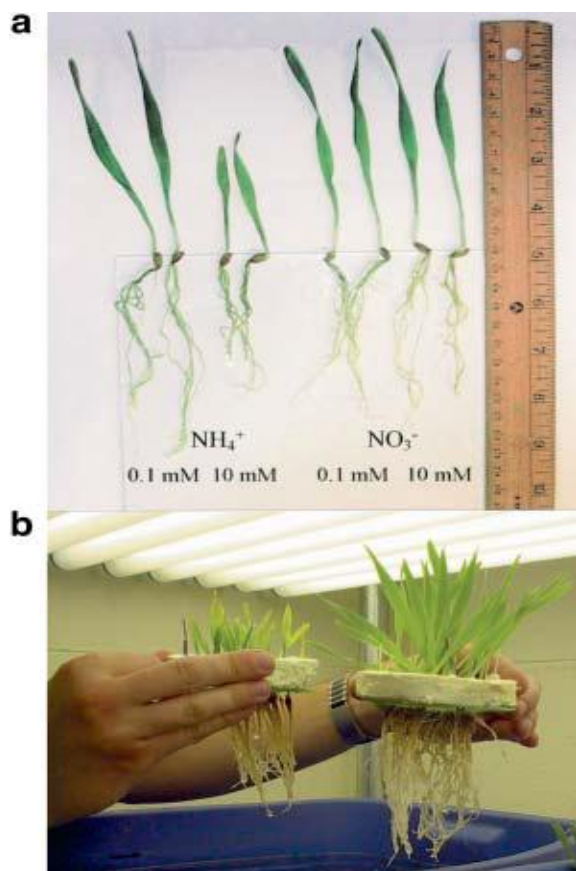


1.5. UČINAK AMONIJEVIH IONA NA RAZVITAK BILJAKA I EMBRIJA

Iskorištavanje nitrata i amonijevih iona kao izvora dušika ima fundamentalnu ulogu u rastu, razvoju i metabolizmu biljaka. Iako je u prosjeku koncentracija amonijevih iona u tlu 10-1000 puta manja nego koncentracija nitrata, biljke preferiraju amonijeve ione (Marschner 1995) i to zato jer za asimilaciju amonijevih iona biljke trebaju manje energije nego za asimilaciju nitrata koji prije asimilacije trebaju biti reducirani (Bloom i sur. 1992). Međutim, paradoksalno je to što amonijevi ioni iako „probavljiviji“ izvor dušika (Salsac i sur. 1987) i intermedijer u mnogim metaboličkim reakcijama (Joy 1988), mogu biti toksični za mnoge biljke ako predstavljaju jedini raspoloživi izvor dušika (Gerendas i sur. 1997). Visoke koncentracije amonijaka toksične su za stanice zato jer dovode do zakiseljavanja rizosfere ili podloge u kulturi što je nepovoljno za rast stanica. Asimilacijom NH_4^+ , a radi povećane aktivnosti H^+ -ATPaze, iz stanice se izlučuje ekvimolarna količina H^+ koja dovodi do zakiseljavanja tla i smanjenog unosa važnih kationa kao što su K^+ , Ca^{2+} i Mg^{2+} (Marschner 1995). Suprotno tome, pri asimilaciji nitrata nastaju OH^- ioni koji pridonose povećanju pH vrijednosti izvanstaničnog prostora i rizosfere. Ako nema nitrata, biljke slabije rastu jer su nitrati važni protuioni u translokaciji kationa u ksilemu.

Veoma visoke koncentracije dušika u obliku amonijevih iona ili potpuni nedostatak istog može nepovoljno djelovati na rast i diferencijaciju u biljaka (Das i sur. 2001.). Amonijevi ioni kao jedini izvor dušika uzrokuju slab razvitak korijena i izdanaka te smanjenje razine mineralnih kationa u odnosu na biljke koje su rasle u prisustvu nitrata ili amonijevog nitrata kao izvora dušika (Lang i sur. 1994, Britto i Kronzucker 2002) (sl. 3). Ako se biljke koje su rasle u podlozi s amonijevim ionima i nitratima kao izvorima dušika premjeste u podlogu koja sadrži samo amonijeve ione, tada će novonastali listovi biti manji i imati će manji broj stanica nego listovi koji su formirani prije nego je biljka premještena. Na povećanu koncentraciju amonijevih iona posebno su osjetljive mlade biljke. Te promjene povezane su s velikim opadanjem koncentracije citokinina (Walch-Liu i sur. 2000) i rastom koncentracije apscizinske kiseline, hormona koji inhibira procese rasta (Peuke i sur. 1998).

Ukratko, efekt amonijevih iona na biljku naziva se i „amonijev sindrom“ (Mehrer i Mohr 1989). On uključuje zakiseljavanje podloge, smanjenje unosa kationa, povećanje koncentracije aniona, promjene u metabolizmu, toksičnost te u konačnici smanjenje rasta ili čak uvenuće.



Slika 3. Učinak različitih izvora dušika na rast klijanaca ječma: a) osam dana stari klijanaci ječma (*Hordeum vulgare* L. cv. Klondike) rasli pri različitim koncentracijama NH₄⁺ i NO₃⁻; b) klijanaci ječma kultivirani u podlozi s NH₄⁺ kao jedinim izvorom dušika. Lijevo klijanaci koji su rasli pri koncentraciji NH₄⁺ od 10 mmolL⁻¹; desno klijanaci rasli pri koncentraciji od 1 mmolL⁻¹. Preuzeto iz Britto i Kronzucker, *J. Plant Physiol.* 2002, **159**: 567-584.

Smatra se da je primjenom različitih koncentracija amonijaka i nitrata moguće potaknuti somatsku embriogenezu. Amonijev nitrat kao jedinstven izvor dušika održava embriogenezu u suspenziju stanica krastavca (*Cucumis sativus* L.) dok natrijev nitrat stimulira razvoj embrija (Burza i Malepszy 1995). Embriogene stanice i globularni embriji kultivirani u podlozi koja sadržava samo NH_4^+ manji su od onih kultiviranih u podlozi s dodatkom NH_4^+ i NO_3^- (Leljak-Levanić i sur. 2003). Ako je relativni odnos amonijaka i nitrata 1:1 onda će nezreli embrij biti manje osjetljiv na auksin (Grimes i sur. 1990). Povećanje koncentracije amonijevog nitrata (NH_4NO_3) u podlozi može udvostručiti broj stvorenih embrija kao i broj embrija kao i broj embrija sposobnih za regeneraciju izdanka (Greer i sur. 2009). Dobro je poznato da nitrat kao jedini izvora dušika nepovoljno utječe na somatsku embriogenezu, a potaknut će ju ako su u podlozi prisutni amonijak i nitrati (Walker i Sato 1981). Optimalni biljni rast postignut je ako su prisutna oba oblika dušikovih soli.

1.6. UČINAK IZVANSTANIČNIH PROTEINA NA SOMATSKU EMBRIOGENEZU

Mnoge molekule vezane na staničnu stijenu utječu na regulaciju embriogeneze. Regulacija je sama po sebi kompleksna, ovisi o ekspresiji gena, transportu i enzimatskoj aktivnosti molekula uključenih u među- i unutarstanični prijenos signala. Među najbolje istražene grupe izvanstaničnih proteina vezanih uz somatsku embriogenezu ubrajamo endohitinaze i peroksidaze.

S obzirom na primarnu strukturu, endohitinaze su podijeljene u četiri klase (Collinge i sur. 1993). U klasu I spadaju enzimi s vrlo konzerviranom središnjom domenom i cisteinom bogatom N-terminalnom domenom koja je od središnje domene odvojena hipervarijabilnom regijom bogatom glicinom i prolinom. Endohitinaze klase II nemaju cisteinom bogatu N-terminalnu domenu kao ni C-terminalnu domenu, dok je 40% središnje domene homologno onoj u endohitinaza klase I (Perrakis 1993). Hitinaze klase III nemaju sličnosti s nukleotidnim sekvencama hitinaza klase I i II, niti imaju cisteinom bogatu N-terminalnu domenu. Endohitinaze klase IV sadrže cisteinom bogatu N-terminalnu domenu i imaju konzerviranu središnju strukturu koja je slična onima pronađenima u klasama I i II, ali su proteini znatno manji radi četiri delecije čije su pozicije vrlo konzervirane u svih endohitinaza klase IV.

Geni za hitinaze pronađeni su u svim višim biljkama. Sudeći prema indukciji aktivnosti hitinaza nakon napada patogena i njihovih katalitičkih svojstava, smatra se da su hitinaze uključene u obrambene mehanizme protiv biljnih patogena (Boller 1987, Mauch 1988). Aktivnost hitinaza povećana je i nakon ranjavanja, dodavanjem etilena te raznim

abiotičkim stresovima (Kragh i sur. 1996). Osim toga, hitinaze mogu potaknuti i razvitak embrija (Van Hengel i sur. 1998) i sjemenke (Van Damme i sur. 1999).

Stanična linija mrkve, ts11, je varijanta osjetljiva na temperaturu čija je somatska embriogeneza zaustavljena u globularnoj fazi na temperaturi višoj od 31 °C (Lo Schiavo i sur. 1990). Dokazano je da dodatak izvanstaničnih proteina iz suspenzije stanica divljeg tipa mrkve omogućava daljnji razvoj embrija. Izvanstanični protein EP3 identificiran je kao kiselina endohitinaza klase IV, veličine 32 kDa, odgovoran za prijelaz iz globularnog u sroliki stadij embrija mutantne linije ts11 pri nepovoljnoj temperaturi (De Jong i sur. 1992).

Van Hengel i sur. (2001) predložili su arabinogalaktane kao moguće supstrate za endohitinaze. Arabinogalaktani su proteoglikani koji se nalaze vezani na membranu preko glikozilfosfatidil inozitola (GPI) ili u staničnoj stijenci, a mogu biti izlučeni u međustanični prostor i hranidbeni medij. Prisutni su u svim stadijima biljnog razvoja (Gaspar i sur. 2001) i potiču somatsku embriogenezu mrkve kada su hidrolitički aktivirani endohitinazama (Van Hengel i sur. 2001). Sastoje se od male proteinske okosnice koja čini nešto manje od 10% mase molekule te sadržavaju glukozamin i N-acetil-D-glukozamin (Molano i sur. 1979, Usui i sur. 1990). Ipak, kasnija istraživanja pokazala su da je sadržaj glukozamina i N-acetil glukozamina u frakciji izvanstaničnih proteina nedostatan da bi podržao ovu hipotezu (Immerzeel i sur. 2004).

Kasnije je otkriveno da neke druge molekule, osim arabinogalaktana, mogu biti supstrati za hitinaze (Dyachok i sur. 2002). Hitinski oligosaharidi i njihovi derivati su lipofilne molekule koje sadrže N-acetilirane glukozamine i supstrat su za hitinaze. Uključeni su u razvojne i obrambene signalne puteve, stimuliraju diobu stanica u proembriogenoj masi te mogu potaknuti niz direktnih odgovora u biljnoj stanici, kao što je pojačan tok iona kroz plazma membranu što rezultira brzim zakiseljavanjem medija, promjenom u fosforilaciji proteina te oksidaciji lipida. Hitinski oligosaharidi i njihovi derivati izolirani su iz embriogenih kultura obične smreke (*Picea abies*) i smatra se da stimuliraju rane stadije somatske embriogeneze indukcijom stanične diobe i inhibicijom smrti stanica u proembriogenoj masi (Dyachok i sur. 2002).

Čini se da različite hitinaze mogu regulirati embriogenezu na različite načine. Dok endohitinaza EP3 u mrkvi (*Daucus carota* L.) inducira formiranje lipofilnih hitin oligosaharida (Van Hengel i sur. 2001), hitinaza molekularne mase 28 kDa izlučena iz somatskih stanica omorike (*Picea omorika* L.) razgrađuje hitin oligosaharide (Dyachok i sur. 2002). Lipooligosaharidi (LCO) su acetilirani derivati hitin oligosaharida, a stvara ih

simbiotska bakterija roda *Rhizobium* (Spaink 2000). Ti derivati hitin oligosaharida stimuliraju diobu stanica kore korijena, rezultirajući nastajanjem novog organa, nodula korijena u kojem se nalazi bakterija. Lipooligosaharidi nastaju djelovanjem nodulacijskog proteina NodC koji je N-acetilglukozamin-transferaza. Lipooligosaharidi iz bakterije *Rhizobium leguminosorum* pokazuju jednak učinak na staničnu liniju ts11 kao i endohitinaze, a to ukazuje na uključenost endohitinaze EP3 u nastajanju molekula sličnih faktorima Nod (De Jong i sur. 1993).

Važne molekule u embriogenezi su i CLP (chitinase like proteins). Sposobnost CLP da cijepaju šećerne lance arabinogalaktana dokazano je u embriogenim stanicama bora *Pinus sylvestris* L. (Domon i sur. 2000) i mrkve (Passarinho i sur. 2001). Imaju N-terminalni signalni peptid, izlučuju se izvan stanice i neki od njih su N-glikozilirani.

Uloga izoperoksidaza u embriogenezi pokazana je ranijim istraživanjima (Joersbo i sur. 1989), a tada je otkrivena i peroksidaza karakteristična za rane stadije razvoja embrija mrkve. Dokazano je da peroksidaza iz mrkve može biti zamijenjena kationskom peroksidazom iz hrena za poticanje embriogeneze u nenormalnim linijama.

1.7. GLIKOZILACIJA U BILJAKA

Površina stanične stijenke okružena je izvanstaničnim matriksom kojeg uglavnom tvore glikoproteini i proteoglikani vezani za stanicu ili otopljeni i izlučeni u okolinu stanice. Stanična stijenka, osim toga, sadrži razne strukturne proteine, kao što su glikoproteini bogati hidroksiprolinom (HRGP), arabinogalaktani (AGP), proteini bogati glicinom (GRP), proteini bogati prolinom (PRP), i enzime, kao što su hidrolaze, esterase, peroksidaze, i transglikozilaze. Većina ovih proteina podliježe posttranslacijskoj modifikaciji, među kojima je najčešća glikozilacija.

Glikozilacija je ključni mehanizam za regulaciju bioaktivnosti, metabolizma i lokacije molekula u živim stanicama. Ovisno o udjelu ugljikohidrata odnosno proteina razlikujemo glikoproteine i proteoglikane. Proteoglikani su oni koji sadrže više ugljikohidrata, a glikoproteini oni koji sadrže više proteina. Ugljikohidratni lanac je kratki lanac šećernih ostataka povezanih glikozidnim vezama. Vezan za polipeptid, ugljikohidrat ima veliki utjecaj na fiziokemijska svojstva samog proteina kao što su topivost proteina, otpornost na denaturaciju temperaturom te zaštita od proteolitičke razgradnje. Glikozilacija može promijeniti osnovnu biološku funkciju proteina uključujući imunogeničnost, specifičnu

aktivnost te interakciju liganda i receptora. Glikoproteini se, ovisno o vezanju ugljikohidratnog lanca, dijele na N-vezane i O-vezane. Kod N-vezanih glikoproteina, ugljikohidrat je vezan na dušikov atom bočnog ogranka asparagina, a kod O-vezanih glikoproteina vezan je za kisikov atom bočnog ogranka serina ili treonina. Šećeri izravno vezani na te položaje su N-acetilglukozamin kod N-vezanih i N-acetilgalaktozamin kod O-vezanih šećera. N-glikozilacija se zbiva u endoplazmatskom retikulumu (ER), a Golgijev aparat je mjesto O-glikozilacije proteina. Biosinteza biljnih N-glikana započinje kotranslacijskom modifikacijom ugljikohidrata, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ s dolikom lipida na specifični asparaginski ostatak rastućeg polipeptidnog lanca. Procesiranje tog oligosaharida u različite tipove N-glikana zbiva se u sekretornom putu kada protein prelazi iz ER do svog konačnog odredišta. Dok se glikoprotein još nalazi u endoplazmatskom retikulumu, uklanjaju se tri glukozna ostatka i jedna manoza. Nakon što uđe u Golgijev aparat, prva preinaka proteina namijenjenog za izlučivanje ili za smještaj na staničnoj membrani jest uklanjanje još tri manoze. Potom slijedi u nizu: dodavanje N-acetilglukozamina, uklanjanje još dvije manoze, pa dodavanje fukoze i još dva N-acetilglukozamina. Konačno se dodaju tri galaktoze i tri sijalinske kiseline. Glikoproteini se tijekom prolaska kroz Golgijev aparat doraduju do različite mjere, što ovisi i o građi proteina i o količini i tipu enzima prisutnih u Golgijevom aparatu različitih vrsta stanica.

Svi N-glikani dijele istu osnovnu građu, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, koja se sastoji od N,N'-diacetilhitobioze i dvije α -manoze vezane za hidrosil 3. i 6. β -manoze. N-vezani ugljikohidrati biljnih glikoproteina kovalentno su vezani za asparagin unutar proteinske sekvence Asn-Xaa-Ser/Thr (gdje Xaa predstavlja bilo koju aminokiselinu osim prolina i asparaginske kiseline. Visokomanozni N-glikani, od $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ do $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ nastaju sukcesivnom modifikacijom prekursora oligosaharida pomoću glikozidaza i glikoziltransferaza lociranih u ER i Golgijevom aparatu sve dok u konačnici ne nastanu kompleksni N-glikani (Lerouge i sur. 1998, Bardor 1999). Svaka klasa glikoproteina definirana je karakterističnim, visoko ponavljajućim slijedovima proteina (Knox 1995).

Somatska embriogeneza u mrkvi može biti zaustavljena dodatkom tunikamicina, a dodatkom izvanstaničnih proteina iz podloge u kojoj su kultivirane netretirane stanice ponovno dolazi do normalne somatske embriogeneze (De Vries i sur. 1988). Tunikamicin je smjesa homolognih nukleozidnih antibiotika koji inhibiraju enzim GlcNAc-fosfotransferazu (GPT), a GPT katalizira transfer N-acetilglukozamin-1-fosfata sa UDP-N-acetilglukozamina na dolikom fosfat u prvom koraku sinteze glikoproteina. Glikoprotein molekularne mase 38

kDa odgovoran za poništavanje inhibicije tunikamicinom identificiran je kao peroksidaza koja sadržava hem (Cordewener i sur. 1991).

Poremećena i/ili nedovoljna glikozilacija moguć je uzrok zastoja u rastu i razvoju somatskih embrija u mutantnoj staničnoj liniji mrkve, ts11 (Lo Schiavo i sur. 1990). U ovoj staničnoj liniji, izvanstanični glikoproteini sintetizirani pri temperaturama višim od 31 °C ne akumuliraju se na periferiji embrija kao u divljem tipu, nego su razmješteni po cijelom embriju. Nadalje, izvanstanični glikoproteini sintetizirani pri nepovoljnoj temperaturi sadrže puno manje fukoze nego oni sintetizirani u divljem tipu. Pretvorba visokomanoznih glikana u tipične glikane koji sadrže mnogo fukoze zbiva se u Golgijevom aparatu u nekoliko koraka i to tako da prije dodavanja fukoze na primarnu jezgru glikana djeluju α -manozidaze i acetilglukozamil transferaze koje uklanjaju manozu odnosno dodaju N-acetilglukozamin. Prvo manozidaza iz ER specifično uklanja jedan manozni ostatak te nastaje $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. Zatim u Golgijevom aparatu α -manozidaza I uklanja jednu do četiri $\alpha(1-2)$ -manozu te nastaje $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Nakon toga, N-acetilglukozamil transferaza I dodaje GlcNAc na $\alpha(1-3)$ -manozu. Naknadno α -manozidaza II uklanja dvije manoze, a N-acetilglukozamil transferaza II dodaje još jedan GlcNAc i to na $\alpha(1-6)$ -manozu. Nakon toga $\alpha(1-3)$ -fukozil transferaza dodaje $\alpha(1-3)$ -fukozu (Balen i sur. 2007). Jedan od tih koraka vjerojatno je defektan u staničnoj liniji ts11 (Lo Schiavo i sur. 1990), a funkcionalni nedostatak može biti popravljen dodatkom izvanstaničnih proteina iz stanične suspenzije divljeg tipa. To znači da aktivnost određenih izvanstaničnih proteina koji su esencijalni za prijelaz iz globularnog u sroliki stadij ovisi o točnoj modifikaciji njihovih oligosaharidnih lanaca (Lo Schiavo i sur. 1990).

1.8. OBRAZLOŽENJE TEME

Biljne stanice u suspenziji rastu i izlučuju proteine koji kondicioniraju hranidbenu podlogu i time utječu na daljnji rast i diferencijaciju stanica. Većinu izvanstaničnih proteina čine glikoproteini od kojih mnogi imaju strukturnu i/ili enzimatsku ulogu, a cijepanjem njihovog šećernog dijela mogu nastati i signalne molekule. Poznato je da se profil izlučenih proteina mijenja ovisno o promjenama vezanim uz indukciju somatske embriogeneze, a nepravilna glikozilacija može izazvati zastoj u razvitku embrija. Jedan od najbolje opisanih glikoproteina vezanih uz somatsku embriogenezu biljaka je endohitinaza EP3, karakteristična za rani stadij embriogeneze u mrkve i uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*).

Cilj istraživanja bio je usporediti status N-glikozilacije proteina izlučenih u staničnoj suspenziji dviju embriogenih linija bundeve induciranih pomoću 2,4-D (2,4-diklorofenoksiocetna kiselina) ili na modificiranom MS mediju bez hormona koji sadrži NH₄Cl kao jedini izvor dušika (Leljak i Jelaska 1995). Izvanstanični proteini razdvojeni su SDS-PAGE elektroforezom, preneseni na membranu i analizirani obradom membrane različitim lektinima (ConA, GNA, DSA, PNA). Prisustvo i promjene u aktivnosti specifičnih endohitinaza u izvanstaničnim proteinima bundeve u ovisnosti o hranidbenoj podlozi i razvojnim promjenama tijekom somatske embriogeneze analizirane su imunodokazivanjem uz upotrebu protutijela na endohitinazu EP3 iz mrkve.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. BILJNI MATERIJAL

U istraživanju sam koristio tri embriogene linije bundeve (*Cucurbita pepo* L.) dobivene u kulturi zrelih zigotnih embrija (Leļjak-Levanić i sur. 2003):

1. linija PEDC, inducirana i supkultivirana u modificiranoj podlozi MS (Murashige i Skoog 1962) bez hormona s dodatkom 1,0 mM NH₄Cl kao jedinog izvora dušika i 3,37 µM tiamina-HCl (**MSNH₄**);
2. linija DEC inducirana u podlozi MS s dodatkom 4,5 µM 2,4-diklorofenoksiotene kiseline (**MS2,4-D**);
3. linija HEC, habituirano embriogeno tkivo ustaljeno nakon prijenosa linije DEC MS2,4-D na podlogu MS bez hormona s konvencionalnim izvorom dušika (**MS0**) i kontinuirano uzgajana na njoj.

Radi održavanja nepromijenjene vrijednosti pH podloga tijekom kultivacije dio tkiva linije PEDC je, osim na podlozi MSNH₄, uzgajan i na podlozi MSNH₄ s dodatkom 25 mM 2-(N-morfolino)etansulfonske kiseline (**MSNH₄MES**). Svim podlogama dodavano je 250 mM glukoze; početna vrijednost pH hranidbenih podloga bila je 5,8. Tkivo linija PEDC i DEC sadržavalo je nakupine proembrijskih stanica i globularnih embrija, a tkivo HEC embrije u svim razvojnim stadijima.

2.2. METODE

2.2.1. Uvjeti kultiviranja embriogenog tkiva

Trajne embriogene linije održavane su na hranidbenim podlogama ukrućenim dodatkom 0,8% ispranog agara (Sigma). Vrijednost pH podloga podešavana je dodatkom nekoliko kapi 0,2 M KOH. Krute podloge sterilizirane su autoklaviranjem, 10 min pri 118 °C i 1,2 bara.

Za potrebe izolacije izvanstaničnih proteina, embriogeno tkivo uzgajano je u tekućoj podlozi steriliziranoj filtriranjem (0,22 µm). Približno jedan gram embriogenog tkiva inokuliran je u 30 ml tekuće hranidbene podloge u tikvici od 100 ml. Kulture embriogenog tkiva u suspenziji rasle su 7 do 21 dan na rotirajućoj tresilici (120 rpm).

Sve kulture rasle su u klima komori pri 22 ± 1 °C u uvjetima dugog dana (16 sati svjetlo, 8 sati tama). Izvor svjetla bile su fluorescentne lampe (40 W, 400-700 nm) intenziteta osvjjetljenja 17 Wm^{-2} .

2.2.2. Izdvajanje izvanstaničnih proteina iz kultivacijske podloge

Biljno tkivo tijekom kultivacije izlučuje izvanstanične proteine u podlogu. Tekuća hranidbena podloga filtrirana je kroz dvostruku najlonsku mrežicu s porama veličine $100 \mu\text{m}$ nakon 7 odnosno 21 dan rasta stanica u kulturi, zatim centrifugirana 10 min pri 5000g, te još jednom filtrirana kroz filter s porama veličine $0,2 \mu\text{m}$ kako bi se uklonile zaostale stanice. Profiltrirana podloga zatim je dijalizirana u nitroceluloznom crijevu koje ne propušta proteine molekularnih masa većih od 8 kDa, u 40 puta većem volumenu dH_2O , tijekom noći pri 4 °C. Tijekom dijalize, dH_2O izmijenjena je svježom nakon 30 min, jednog i dva sata. Nakon što je tekuća podloga dijalizirana, proteini su ugušćeni višestrukim centrifugiranjem pri 3000g u kolonama Centriprep® (Millipore, volumen 15 mL) koje ne propuštaju molekule veće od 10 kDa. U istim kolonama uzorak ugušćenih proteina odsoljen je ispiranjem dva puta u 0,02 M fosfatnom puferu, pH 8. Odsoljavanje je bitno za uklanjanje soli koje pri elektroforezi mogu uzrokovati širenje elektroforetskih pruga. Ugušćeni uzorci liofilizirani su, otopljeni u 0,02 M fosfatnom puferu, pH 8 (200 μL) i zatim dijalizirani u 200 mL 0,02 M fosfatnog pufera, pH 8, upotrebom nitrocelulozne membrane koja ne propušta molekule mase veće od 8 kDa. Zbog niske koncentracije proteina, uzorci su ponovno liofilizirani.

Prije i nakon dijalize te nakon ugušćivanja u koloni, uzorci podloge odvojeni su za određivanje koncentracije proteina.

2.2.3. Izdvajanje ukupnih staničnih proteina

Topivi stanični proteini izdvojeni su iz tkiva tri embriogene linije: PEDC, DEC i HEC. Svježe tkivo raslo 21 dan u kulturi (300 μg) smrznuto je u tekućem dušiku, smrvljeno u prah u tarioniku i otopljeno u 1,5 mL ohlađenog (4 °C) pufera za izdvajanje proteina.

Sastav pufera za izdvajanje proteina:

1 M Tris-HCl	2,50 mL
NaCl	8,77 g
Nonidet P40	0,50 mL
Na-deoksikolat	0,25 g
Inhibitor proteaza (Sigma)	0,50 mL
dH ₂ O	do 50 mL

Homogenizirano tkivo centrifugirano je 20 min pri 13000g i 4 °C nakon čega je izdvojen supernatant. Nakon određivanja koncentracije proteina, uzorci su pohranjeni pri -80 °C.

2.2.4. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracije staničnih i izvanstaničnih proteina izmjerene su spektrofotometrijskom metodom po Bradfordu (1976.). Ovaj postupak mjerenja koncentracije proteina temelji se na brzom pomaku apsorbancije (465 do 595 nm) u trenutku kada se Coomassie Brilliant Blue u kiseljoj otopini veže na proteine. Tada ovisno o koncentraciji proteina nastaje zeleno-smeđe do plavo obojenje. Za vezanje proteina i boje važne su elektrostatske sile između bazičnih aminokiselinskih ostataka u proteinima i sulfatnih grupa boje te hidrofobne interakcije sa ostacima aromatskih aminokiselina.

Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini 595 nm pomoću čitača ELISA-pločica s 96 bazenčića (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). U bazenčiće je dodavano 100 µL uzorka i 100 µL dva puta koncentriranog reagensa po Bradfordu (Bradford 2X), odnosno 10 µL koncentriranog uzorka i 200 µL reagensa po Bradfordu (1X). Koncentracija proteina izračunata je pomoću baždarne krivulje dobivene pomoću različitih razrjeđenja albumina iz seruma goveda (0,1-5,0 µg BSA). Baždarne krivulje potrebno je napraviti radi variranja koncentracije proteina koje se mjere u uzrocima. Napravljene su posebne baždarne krivulje za različita razrjeđenja reagensa po Bradfordu.

Sastav Bradford reagensa:

Coomassie Brilliant Blue G-	100 mg
95% etanol	50 mL
85% fosforna kiselina	100 mL
dH ₂ O	do 1000 mL

2.2.5. Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu

Uzorci proteina denaturirani su puferom za denaturaciju (u omjeru 2:1) koji sadrži β -merkaptetoetanol kao reducirajući agens (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% SDS (m/v), 32% glicerola (v/v), 5% β -merkaptetoetanol (v/v) i 0,5% bromfenol modrila (v/v)), nakon čega su inkubirani 5-10 min u kipućoj vodi. β -merkaptetoetanol reducira S-S vezu i razbija sekundarnu, tercijarnu i kvartarnu struktura proteina. Elektroforeza proteina (Laemmli 1970) provedena je u 12% poliakrilamidnom gelu s 4% gelom za sabijanje pri naponu 180 V, u puferu za elektroforezu (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 1,4% glicin (m/v); 0,1% SDS (m/v)). Dimenzija gela bila je 6x8 cm, a debljina 1 mm.

Gel za sabijanje, 4% (ukupni volumen 5,65 mL)

dH ₂ O	3,05 mL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 mL
akrilamid/bisakrilamid (30%)	660,00 μ L
10% natrijev dodecilsulfat (SDS)	50,00 μ L
10% amonijev peroksodisulfat	50,00 μ L
TEMED	5,00 μ L

Gel za razdvajanje, 12% (ukupni volumen 10,005 mL)

dH ₂ O	3,35 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,50 mL
akrilamid/bisakrilamid (30%)	4,00 mL
10% SDS	100,00 μ L
10% APS	50,00 μ L
TEMED	5,00 μ L

Nakon elektroforeze, proteini u gelu obojani su bojom Coomassie Brilliant Blue G-250. Boja se u kiselim uvjetima veže elektrostatskim silama za amino skupine proteina. Nakon 15-30 minuta bojanja, gelovi su odbojani u kipućoj vodi do pojave vrpca, odnosno nestanka pozadinskog obojenja. Gelovi su skenirani kao slike rezolucije 200 ppi upotrebom skenera HP Scanjet G3010 (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA).

Sastav otopine za bojanje proteina u gelu:

Coomassie Brilliant Blue G-	1 g
metanol	400 mL
ledena octena kiselina	100 mL
dH ₂ O	do 1000 mL

2.2.6. Bojanje SDS-poliakrilamidnih gelova srebrom

Ova metoda je oko 100 puta osjetljivija od bojenja sa Coomassie Brilliant Blue G-250. Stvara se kompleks između negativno nabijenih grupa fiksiranih proteina i srebrnih iona iz otopine srebrovog nitrata iz kojeg se kasnije izlučuje srebro dajući prugama proteina tamno smeđu boju. Gel je prvo fiksiran 30 minuta u otopini 50% metanola (v/v), 12% octene kiseline (v/v) i 0,05% formaldehida (HCOH, v/v). Gel je zatim ispran tri puta po dvadeset minuta u 30% etanolu (v/v). Prije impregniranja u otopini 0,2% srebrovog nitrata (m/v) i 37% HCOH (v/v) u trajanju 20 minuta, gelove je potrebno uroniti na jednu minutu u otopinu 0,02% natrijevog tiosulfata pentahidrata ($\text{Na}_2\text{S}_3\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, m/v) te isprati tri puta po dvadeset sekundi u mqH_2O . Nakon impregniranja gela sa srebrom ponovno slijedi ispiranje u mqH_2O dva puta po dvadeset sekundi. Za detekciju pruga koristi se otopina 6% natrijevog karbonata (Na_2CO_3 , m/v), 37% HCOH (v/v) i 0,02% $\text{Na}_2\text{S}_3\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (m/v). Reakcija se zaustavlja ispiranjem otopinom 50% metanola (v/v) i 12% octene kiseline (v/v). Gelovi su skenirani kao slike rezolucije 200 ppi upotrebom skenera HP Scanjet G3010 (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA).

2.2.7. Imunodetekcija proteina na membrani (Western analiza)

Western analiza je osjetljiva tehnika za identifikaciju i određivanje prisutnosti malih količina određenih proteina. Postupak se temelji na prepoznavanju i ostvarivanju kompleksa između protutijela i antigena.

Nakon gel-elektroforeze, proteini su preneseni na poliviniliden fluorid (PVDF) membranu (Immobilon-P, Millipore) u Mini Trans-Blot[®] elektroforetskom sustavu za transfer (Bio-Rad) električnom polju napona 80 V tijekom 90 minuta u puferu za prijenos. Učinkovitost prijenosa proteina provjerena je bojanjem gela bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 ili bojanjem membrane u 0,2% vodenoj otopini boje Poanseau S (m/v).

Sastav pufera za prijenos:

Tris	3,03 g
glicin	14,33 g
10% SDS	1 mL
metanol	200 mL
dH ₂ O	do 1000 mL

2.2.7.1. Imunodokazivanje izvanstanične endohitinaze EP3 (Western)

Nakon prijenosa proteina na membranu, membrana je inkubirana u puferu 1xTBS (150 mM NaCl i 20 mM Tris-HCl) s dodatkom 5% mlijeka u prahu (m/v) i 1% Tween® 20 (v/v), 60 minuta pri 4 °C. Za detekciju izvanstanične endohitinaze EP3 upotrebljena su primarna poliklonska protutijela na izvanstaničnu hitinazu (EP3) iz mrkve, proizvedena u zecu. Kao sekundarna protutijela upotrebljena su protutijela u kompleksu s peroksidazom hrena, proizvedena u zecu.

Membrana (5,5 x 8,5 cm) je inkubirana s primarnim protutijelima (zečja poliklonska protutijela anti EP3-1 hitinaza iz mrkve) razrijeđenim u 10 ml otopine za blokiranje (1:1000) preko noći pri 4 °C uz neprekidno zibanje. Nakon inkubacije membrana je isprana u puferu TBS s dodatkom 1% Tween® 20, tri puta po 5 minuta. Zatim je membrana inkubirana u otopini za blokiranje s dodatkom sekundarnih protutijela (1:5000), 2 sata pri 4 °C te ponovno isprana 3 puta po 5 minuta u puferu TBS s dodatkom 1% Tween® 20. Kao reagens za blokiranje upotrebjeno je nemasno mlijeko u prahu.

Reagens za kemiluminiscenciju priređen je neposredno prije detekcije miješanjem 1 mL otopine A (50 mg luminola u 200 mL 0,1 M Tris, pH 8,6), 100 µL otopine B (11 mg p-hidroksikumarinske kiseline u 10 mL dimetilsulfoksida) i 3 µL 3% H₂O₂. Membrana je u toj otopini inkubirana 2 minute nakon čega je višak tekućine uklonjen filter papirom, a membrana umotana u prozirnu foliju i u mraku prislonjena uz film za autoradiografiju u za to predviđenoj kaseti. Dodavanjem kemiluminiscentnog supstrata peroksidazi dolazi do emisije svijetla na onim mjestima na kojima se nalaze sekundarna protutijela, a ta mjesta se vide kao zatamnjene pruge nakon što se membrana prisloni uz film. Ekspoziranje radiografskog filma (Agfa-Gevaert) trajalo je 1 do 5 minuta nakon čega je film uronjen u razvijач (Efke® FR-210; Fotokemika, Zagreb). Nakon pojave signala, film je ispran u dH₂O i prebačen u fiksativ (Efke® FF-210; Fotokemika, Zagreb). Nakon ispiranja u dH₂O, film je osušen na zraku. Filmovi su skenirani kao slike rezolucije 400 ppi upotrebom skenera HP Scanjet 7400c (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA).

2.2.7.2. Imunodokazivanje izvanstaničnih glikoproteina konkavalinom A

Membrana je, nakon prijenosa proteina na membranu, inkubirana u puferu TTBS (otopina 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1% Tween® 20, pH 7,5) tijekom 60 minuta, a nakon toga inkubirana je u puferu TTBSi (TTBS, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) s dodatkom konkavalina A (25 µg mL⁻¹), tijekom 90 minuta. Zatim je membrana isprana 6 puta po 5 minuta u puferu TTBSi te inkubirana u puferu TTBSi s dodatkom peroksidaze (50 µg mL⁻¹) tijekom 90 minuta. Nakon toga membrana je ponovno isprana 6 puta po 5 minuta u puferu TTBSi, a zatim uronjena 15 min u pufer TBS (vodena otopina 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5). Kao reagens za detekciju upotrebljena je mješavina otopine A (50 mL TBS i 30 µL 30% H₂O₂) i otopine B (30 mg 3,3'-diaminobenzidina u 10 mL metanola). Obje otopine pripremljene su i pomiješane neposredno prije detekcije. Signal se pojavio nakon nekoliko sekundi, a reakcija je zaustavljena ispiranjem membrane nekoliko puta u dH₂O. Kao pozitivne kontrole korišteni su karboksipeptidaza Y i transferin, a kao negativne kontrole fetuin i asialofetuin (sve iz DIG Glycan Differentiation Kit, Roche). U gel je stavljeno po 2,0 µg uzoraka proteina i 2,5 µg kontrolnog glikoproteina. Membrane su skenirane kao slike rezolucije 200 ppi upotrebom skenera HP Scanjet G3010 (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA).

2.2.7.3. Imunodokazivanje izvanstaničnih *N*- i *O*-glikoproteina lektinima obilježenima digoksigeninom

Nakon prijenosa na membranu, proteini su fiksirani 15 minuta u vodenoj otopini 25% izopropanola (v/v) i 10% octene kiseline (v/v). Membrana je zatim kratko isprana dva puta u destiliranoj vodi, nakon čega je inkubirana tijekom noći pri 4 °C u TTBS puferu. Idućeg dana membrana je isprana dva puta po 10 minuta u puferu TBS (vodena otopina 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5), a nakon toga ispirana 10 minuta u puferu TTBSi. Za dokazivanje visokomanoznih *N*-glikana i *O*-vezanih manozna membrana je inkubirana u puferu TTBSi s dodatkom 10 µL otopine lektina iz visibabe, *Galanthus nivalis* L. (GNA) obilježenih s digoksigeninom iz kompleta DIG Glycan Differentiation Kit (Roche Applied Diagnostic). Inkubacija s GNA trajala je 60 minuta nakon čega je membrana isprana tri puta po 10 minuta u TBS puferu. Nakon toga membrana je inkubirana u 10 mL pufera TBS u koji je dodano 33

μ L otopine monoklonskih anti-DIG protutijela u kompleksu s alkalnom fosfatazom, proizvedenih u mišu (Sigma Aldrich). Inkubacija je trajala 60 minuta, nakon koje je membrana isprana tri puta po pet minuta u TBS puferu. Za vizualizaciju kompleksa protein-protutijelo koristi se otopina BCIP/NBT (5-bromo-4-kloro-3'-idolilfosfat ptoluidinska sol i nitro-plavi tetrazolij klorid). Membrana je inkubirana u 10 mL otopine BCIP/NBT u mraku do pojavljivanja vrpca. Reakcija je zaustavljena ispiranjem membrane s destiliranom vodom.

Za dokazivanje središnjeg disaharida galaktozil- β (1 \rightarrow 3)-N-acetilgalaktozamina te identifikaciju O-glikana upotrebljen je lektin iz kikirikija (PNA), a za dokazivanje galaktozil- β (1 \rightarrow 4)-N-acetilgalaktozamina u kompleksnim i hibridnim N-glikanima, u O-glikanima i N-acetilgalaktozamina upotrebljen je lektin iz kužnjaka, *Datura stramonium* L. (DSA). Oba lektina obilježena su digoksigeninom (DIG Glycan Differentiation Kit, Roche Diagnostics GmbH), a postupak dokazivanja je isti kao i kod dokazivanja izvanstaničnih glikoproteina lektinom GNA. Sljedeći kontrolni glikoproteini su korišteni: karboksipeptidaza Y je korištena kao pozitivna kontrola za GNA i negativna kontrola za DSA, i PNA; transferin je korišten kao pozitivna kontrola za DSA i kao negativna kontrola za GNA, i PNA; fetuin je korišten kao pozitivna kontrola za DSA i kao negativna kontrola za GNA, i PNA; asialofetuin je korišten kao pozitivna kontrola za PNA i kao negativna kontrola GNA (sve iz DIG Glycan Differentiation Kit, Roche). U gel je stavljeno po 2,0 μ g uzoraka proteina i 2,5 μ g kontrolnog glikoproteina. Membrane su skenirane kao slike rezolucije 200 ppi upotrebom skenera HP Scanjet G3010 (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA).

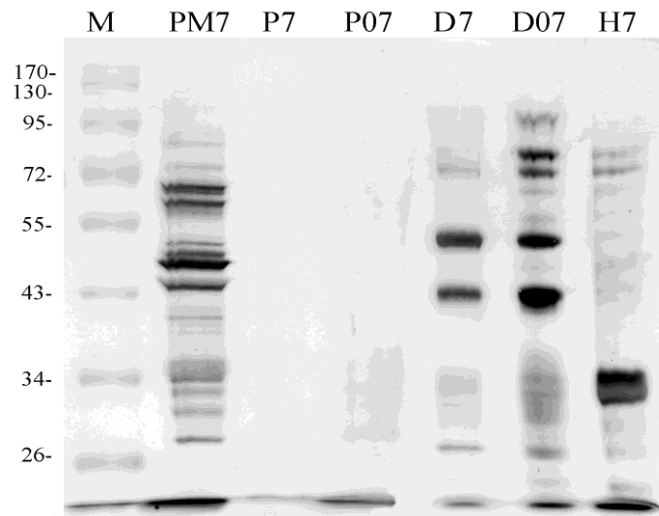
3. REZULTATI

3.1. ELEKTROFORETSKA SLIKA IZVANSTANIČNIH PROTEINA

Elektroforetski profil izvanstaničnih proteina embriogenih linija PEDC razlikuje se ovisno o sastavu podloge (sl. 4). U uzorku linije PEDC kultivirane 7 dana u podlozi MS s dodatkom 1 mM NH_4Cl kao jedinog izvora dušika (MSNH_4), i u uzorku linije PEDC rasle 7 dana u podlozi MSNH_4 , a zatim 7 dana u podlozi MS s konvencionalnim izvorima dušika (20 mM NH_4^+ i 40 mM NO_3^-) (MS0) nije bilo vidljivih polipeptida. Suprotno tome, u uzorku linije PEDC rasle 7 dana u podlozi MSNH_4 puferiranoj dodatkom 2-(N-morfolino)etansulfonske kiseline (MSNH_4MES) broj različitih polipeptida bio je velik. Uočeno je šest karakterističnih polipeptida molekulske mase 66,5, 60,5, 48, 45, 32 i 30 kDa, od kojih su prva četiri dominirali. Nakon 7 dana kultivacije embriogenog tkiva linije PEDC u suspenziji, vrijednost pH puferirane podloge MSNH_4MES bila je 5,5 dok je vrijednost pH nepuferirane podloge MSNH_4 bila 3,4.

U uzorku linije DEC kultiviranom 7 dana na podlozi MS s dodatkom 2,4-D dominirali su polipeptidi molekulske mase 53 i 43 kDa, dok su se u uzorku linije DEC kultivirane sedam dana na podlozi MS0 (bez regulatora rasta), uz proteine molekulske mase 53 i 43 kDa, pojavili i proteini od 80 i 72 kDa.

Linija HEC je habituirano embriogeno tkivo ustaljeno nakon prijenosa linije DEC s podloge MS2,4-D na podlogu MS0 i kontinuirano uzgajana na njoj. U uzorku linije HEC kultiviranom 7 dana u podlozi MS0 uočeni su polipeptidi od 34 i 32 kDa te, u manjoj količini, polipeptidi od 89 i 72 kDa.



Slika 4. SDS-poliakrilamidna elektroforeza izvanstaničnih proteina izdvojenih iz kultivacijske podloge nakon 7 dana rasta embriogenog tkiva bundeve u suspenziji. PM7 - linija PEDC kultivirana u podlozi MSNH₄MES, P7 - linija PEDC kultivirana u podlozi MSNH₄, P07 - linija PEDC kultivirana u podlozi MS0, D7 - linija DEC kultivirana u podlozi MS2,4-D, D07 - linija DEC kultivirana u podlozi MS0, H7 - linija HEC kultivirana u podlozi MS0. M - biljeg molekulskih masa (kDa). Ukupna masa proteina po uzorku je 2 µg. Gel je obojen srebrom.

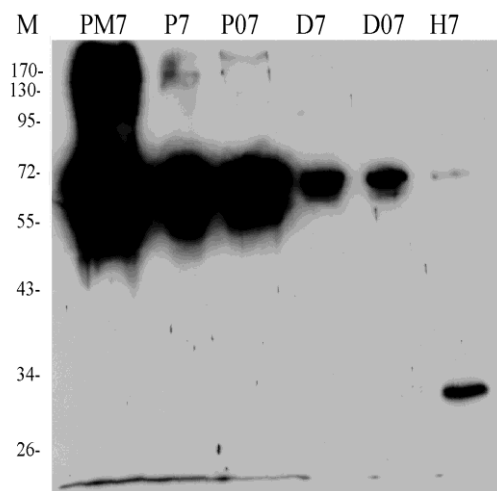
3.2. IMUNODOKAZIVANJE ENDOHITINAZE EP3

3.2.1. Imunodokazivanje endohitinaze EP3 u uzorku izvanstaničnih proteina

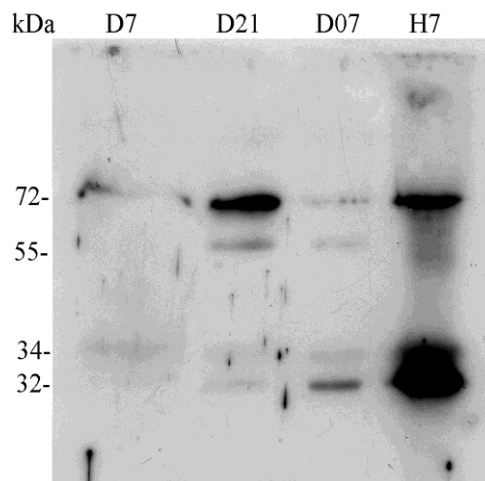
Nakon hibridizacije proteina prenesenih na membranu s protutijelima za endohitinazu EP3 iz mrkve, u uzorku izvanstaničnih proteina iz embriogene kulture bundeve linije PEDC rasle 7 dana u podlozi MSNH₄ odnosno podlozi MS0 pojavila su se dva signala molekulske mase 72 i 58 kDa (sl. 5). U uzorku embriogene linije PEDC rasle 7 dana u podlozi MSNH₄MES, uz signal od 72 i 58 kDa, pojavio se i signal mase 140 kDa. Signali od 72 i 58 kDa u uzorcima iz embriogene linije DEC kultiviranima 7 dana u podlogama MS2,4-D ili MS0 bili su znatno slabiji, a gotovo da ih nije bilo u uzorku embriogene linije HEC raslom 7 dana u podlozi MS0. Suprotno tome, u uzorku HEC pojavio se signal pri 32 kDa.

U uzorku izvanstaničnih proteina linije DEC kultiviranom 21 dan u podlozi MS2,4-D, pri manje restriktivnim uvjetima hibridizacije (primarna protutijela razrijeđena 1:800) u odnosu na uobičajene uvijete (1:1000), pojavili su se dodatni signali od 72, 58, 34 i 32 kDa (sl. 6). Najjači signal dao je polipeptid mase 72 kDa. U liniji DEC kultiviranoj 7 dana u podlozi MS2,4-D pojavili su se samo signali od 72 kDa i, slabiji, od 32 kDa. Sedam dana nakon presađivanja tkiva linije DEC s podloge MS2,4-D u podlogu MS0 bez hormona signali za proteine mase 72, 58 i 34 kDa slabe, a jači signal pojavio se kod proteina mase 32 kDa.

U uzorku izvanstaničnih polipeptida embriogene linije HEC kultivirane 7 dana u podlozi MS0 pojavili su se signali od 72, 34 i 32 kDa. Nije uočen signal od 58 kDa koji se pojavio u liniji DEC. Za razliku od embriogene linije DEC, signali molekulske mase 34 i 32 kDa bili su jače izraženi (sl. 6).



Slika 5. Imunodokazivanje endohitinaze EP3 u uzorku ukupnih izvanstaničnih proteina linija PEDC, DEC i HEC. Protutijela razrijeđena 1:1000. M - biljeg molekulskih masa (kDa), ostali uzorci kao na slici 4. Ukupna masa proteina po uzorku je 2 μ g.

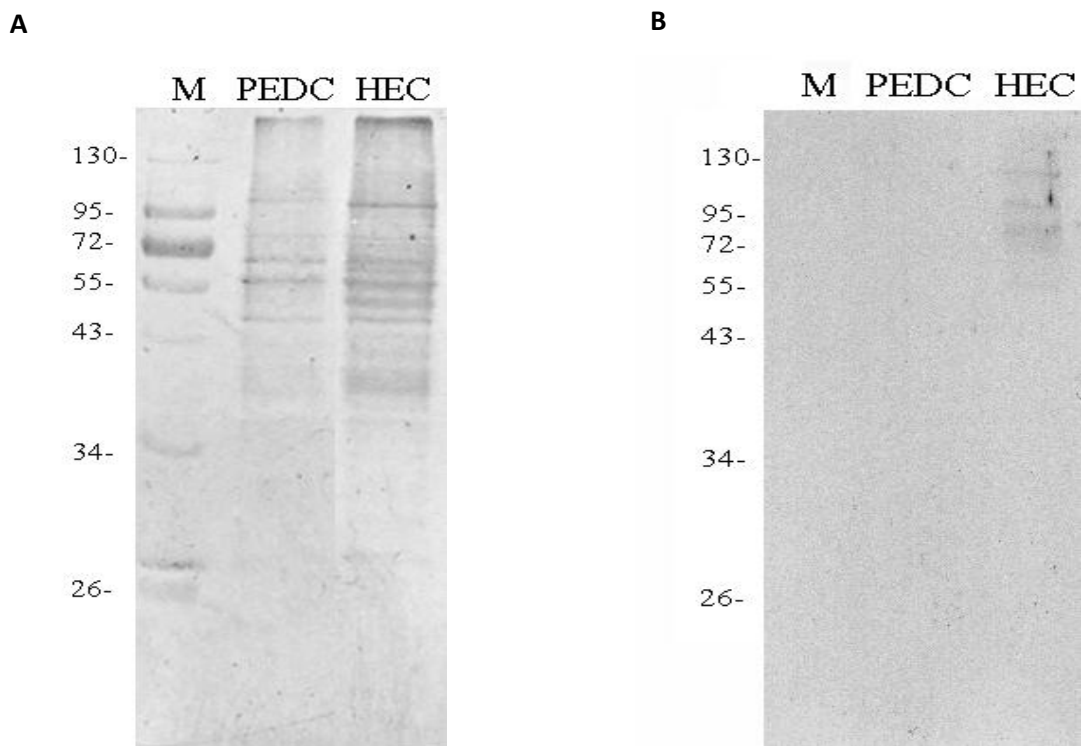


Slika 6. Imunodokazivanje endohitinaze EP3 u uzorku ukupnih izvanstaničnih proteina linija DEC i HEC, pri manje restriktivnim uvjetima hibridizacije (protutijela razrijeđena 1:800). D21 - linija DEC kultivirana 21 dan u podlozi MS2,4-D, ostali uzorci kao na slici 4. Ukupna masa proteina po uzorku je 2 μ g.

3.2.2. Imunodokazivanje endohitinaze EP3 u uzorku ukupnih topivih staničnih proteina

Elektroforetski profil unutarstaničnih proteina linije PEDC kultivirane 21 dan u podlozi MSNH₄ i linije HEC kultivirane 21 dan u podlozi MS0 pokazao je određene razlike. U liniji PEDC najizraženiji su bili proteini molekulske mase 104, 68, 59 i 48 kDa. Proteini približno jednakih molekulskih masa uočeni su i u uzorku linije HEC. Za razliku od linije PEDC, linija HEC sadržavala je još proteine mase 51,5 i 39 kDa (sl. 7A).

Da bi ispitali moguće zaostajanje proteina imunološki srodnih endohitinazi EP3 iz mrkve unutar embriogenih stanica bundeve, provedena je hibridizacija ukupnih staničnih proteina s protutijelima za endohitinazu EP3. Nakon imunodokazivanja nije uočen nikakav značajan signal (sl. 7B).



Slika 7. Imunodokazivanje endohitinaze EP3 u ekstraktu ukupnih topivih staničnih proteina bundeve. A) SDS-poliakrilamidna elektroforeza unutarstaničnih proteina nakon 21 dan kultivacije: linija PEDC rasla na podlozi MSNH₄, i linija HEC rasla na podlozi MS0; B) Imunohibridizacija s protutijelima za endohitinazu EP3 iz mrkve. M - biljeg molekulskih masa (kDa). Masa proteina po uzorku je 10 µg.

3.3. ANALIZA IZVANSTANIČNIH GLIKOPROTEINA LEKTINIMA

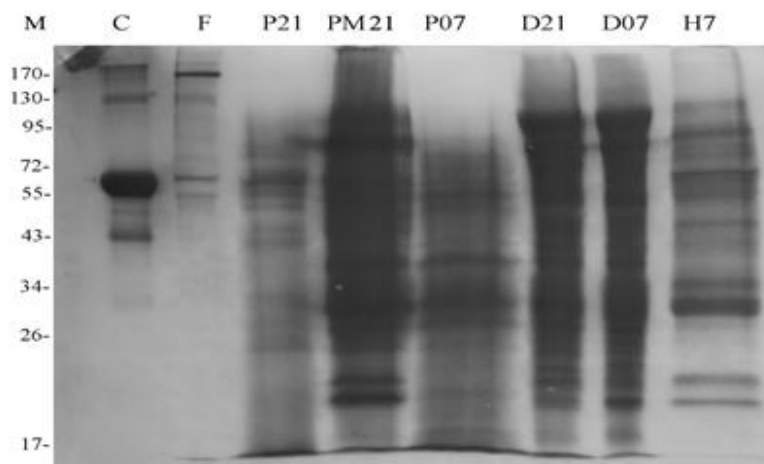
3.3.1. Konkavalin A

Konkavalinom A dokazuje se postojanje izvanstaničnih glikoproteina s vezanom D-manozom. U izolatu izvanstaničnih proteina embriogene linije PEDC kultivirane 21 dan u podlozi MSNH₄ uočeno je pet karakterističnih signala mase 63,5, 55, 49, 45 i 41 kDa. U uzorku PEDC uzgajanom 21 dan u podlozi MSNH₄MES uočeno je više signala nego u uzorku koji je uzgajan u nepuferiranoj podlozi MSNH₄. Pozitivno su reagirali polipeptidi od 86, 38, 32, 28, 22 i 19 kDa. Uzorku PEDC kultiviranom 7 dana u podlozi MS0 izostali su signali za polipeptide od 86, 22 i 19 kDa. Ostali polipeptidi iz uzorka MS0 slabije su reagirali od polipeptida iz uzorka MSNH₄MES (sl. 8).

Profil glikoproteina iz uzorka DEC kultiviranog 21 dan u podlozi MS2,4-D i 7 dana u podlozi MS0 bio je gotovo identičan. Pojavili su se signali od 113, 86, 55 i 38 kDa. U uzorku DEC MS0 protein od 19 kDa malo je jače reagirao nego u uzorku DEC MS2,4-D.

U uzorku embriogene linije HEC kultiviranog 7 dana u podlozi MS0 najjače je reagirao polipeptid od 32 kDa. Uočena su još četiri karakteristična polipeptida od 116, 94, 66 i 36 kDa.

Signali nakon imunodokazivanja glikoproteina lektinom konkavalinom A bili su jaki i brojni, zato se pristupilo analizi glikoproteina primjenom više specifičnih lektina.



Slika 8. Imunodokazivanje izvanstaničnih glikoproteina koji sadrže D-manozu. C - karboksipeptidaza (pozitivna kontrola), F - fetuin (negativna kontrola), P21 - linija PEDC kultivirana 21 dan u podlozi MSNH₄, PM21 - linija PEDC kultivirana 21 dan u podlozi MSNH₄MES, P07 - linija PEDC kultivirana 7 dana u podlozi MS0, D21 - linija DEC kultivirana 21 dan u podlozi MS2,4-D, D07 - linija DEC kultivirana 7 dana u podlozi MS0, H7 - linija HEC kultivirana 7 dana u podlozi MS0, M - biljeg molekularskih masa (kDa). Ukupna masa proteina po uzorku je 2 µg.

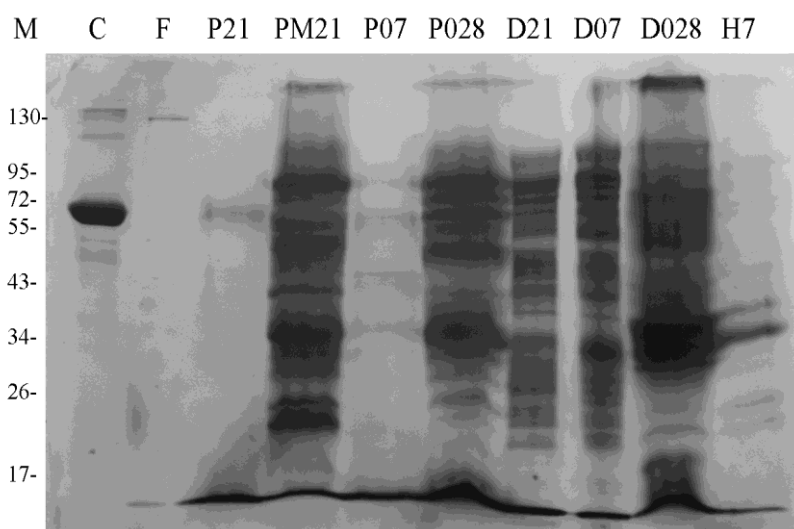
3.3.2. GNA

Uzorak linije PEDC kultiviran 21 dan u podlozi MSNH₄ sadržavao je samo jedan visokomanozni glikoprotein mase 66 kDa. U uzorku embriogene linije PEDC kultiviranom 21 dan u podlozi MSNH₄MES uočeno je pet karakterističnih polipeptida molekulske mase 83,5, 40, 20 i 16 kDa. Za razliku od ovog uzorka, uzorak embriogene linije PEDC uzgajane 7 dana u podlozi MS0 sadržavao je četiri polipeptida mase 83,5, 66, 43 i 32 kDa, ali su ti signali bili slabo izraženi. U liniji PEDC uzgajanoj 28 dana u podlozi MS0, uz polipeptide od 83,5, 66 i 32 kDa, pozitivno su reagirali još i polipeptidi mase 72, 57, 49, 32, 28, 26 i 20 kDa (sl. 9).

Elektroforetski profili embriogene linije DEC kultivirane 21 dan u podlozi MS2,4-D ili 7 dana u podlozi MS0 nisu se bitno razlikovali. Oba uzorka sadržavali su polipeptide mase 113, 86, 72, 32, 26 i 20 kDa. U embriogenoj liniji DEC uzgajanoj 28 dana u podlozi MS0 najjače su bili izraženi signali mase 140, 36, 34 i 32 kDa. Pojavili su se novi signali koji odgovaraju polipeptidima mase 115, 95, 72, 49, 22, 20 i 18 kDa, ali su oni bili slabije izraženi.

U liniji HEC kultiviranoj 7 dana u podlozi MS0 jake signale dali su proteini masa 36 i 32 kDa. Pozitivno, ali slabije, reagirali su polipeptidi od 22 i 20 kDa.

Svi uzorci, neovisno o tipu podloge, sadržavali su signal od 15 kDa.

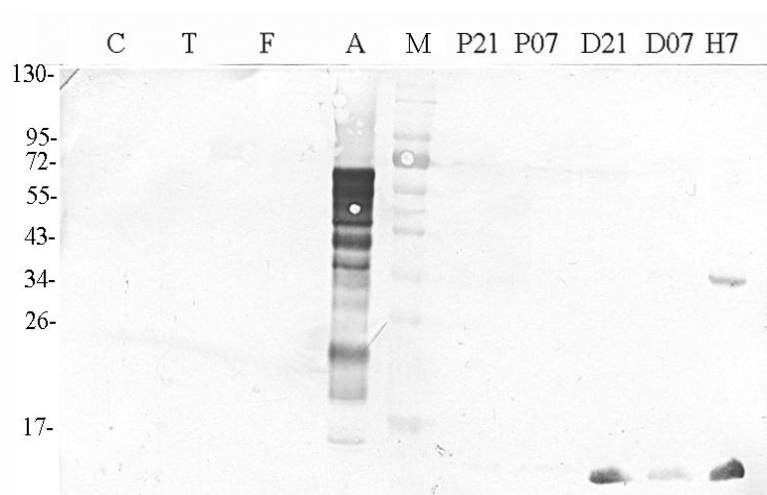


Slika 9. Imunodokazivanje izvanstaničnih visokomanozних glikoproteina lektinom GNA. C - karboksipeptidaza (pozitivna kontrola), F - fetuin (negativna kontrola), P028 – linija PEDC kultivirana 28 dana u podlozi MS0, D028 – linija DEC kultivirana 28 dana u podlozi MS0, M - biljeg molekulske mase (kDa), ostali uzorci kao na slici 8. Ukupna masa proteina po uzorku je 2 µg.

3.3.3. PNA

Nakon imunodokazivanja O-glikana lektinom PNA, u uzorku izvanstaničnih proteina embriogene linije PEDC kultivirane 21 dan u podlozi MSNH₄ ili 7 dana u podlozi MS0 nije uočen nikakav signal. Za razliku od navedenih uzoraka, u uzorku embriogene linije DEC kultivirane 21 dan u podlozi MS2,4-D ili 7 dana u podlozi MS0 pozitivno je reagirao polipeptid od 15 kDa, s time da je u uzorku uzgajanom u podlozi MS0 signal bio slabije izražen.

U liniji HEC, osim polipeptida mase 15 kDa, pozitivno je reagirao i polipeptid mase 32 kDa (sl. 10). Polipeptid mase 15 kDa dao je jači signal.

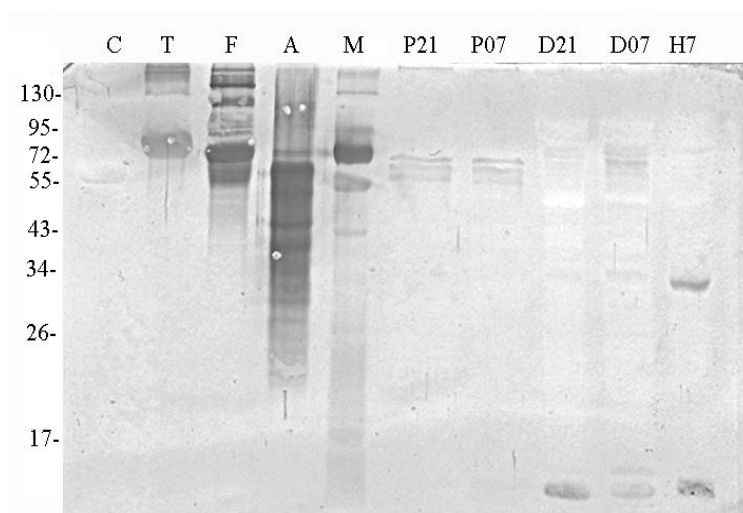


Slika 10. Imunodokazivanje središnjeg disaharida galaktozil- β (1 \rightarrow 3)-N-acetilgalaktozamina te identifikacija O-glikana lektinom PNA. C - karboksipeptidaza (negativna kontrola), T – transferin (negativna kontrola), F – fetuin (negativna kontrola), A - asialofetuin (pozitivna kontrola), M - biljeg molekularnih masa (kDa), ostali uzorci kao na slici 8. Ukupna masa proteina po uzorku je 2 μ g.

3.3.4. DSA

Nakon dokazivanja kompleksnih N- i O-glikana lektinom DSA, u uzorcima izvanstaničnih proteina iz kulture embriogene linije PEDC rasle 21 dan u podlozi MSNH₄ ili 7 dana u podlozi MS0 uočena su tri karakteristična signala molekulskih masa 66, 58 i 54 kDa. Za razliku od navedenog uzorka, više signala molekulskih masa u rasponu od 43 do 95 kDa sadržavali su uzorci izvanstaničnih proteina linije DEC rasle 21 dan u podlozi MS2,4-D ili 7 dana u podlozi MS0, s tim da su u drugom uzorku polipeptidi mase 72, 70 i 66 kDa dali jače signale. Najjači signal u uzorcima iz linije DEC dao je peptid mase 15 kDa, a još je uočljiv i signal veličine 32 kDa. Uzorak izvanstaničnih proteina linije HEC uzgajan 7 dana u podlozi MS0 sadržavao je, kao i uzorci iz linije DEC, polipeptid od 15 kDa, ali je najjači signal u tom uzorku dao karakterističan polipeptid od 32 kDa (sl. 11).

Pozitivi upotrebljeni u pokusu (fetuin, asialofetuin, transferin) dali su znatno jače signale od uzoraka iz kulture tkiva. Negativ (karboksipeptidaza) nije dao signal.



Slika 11. Imunodokazivanje galaktozil- β (1 \rightarrow 4)-N-acetilgalaktozamina u kompleksnim i hibridnim N-glikanima, u O-glikanima i N-acetilgalaktozamina upotrebom lektina DSA. C – karboksipeptidaza (negativna kontrola), T - transferin (pozitivna kontrola), F – fetuin (pozitivna kontrola), A – asialofetuin (pozitivna kontrola), M - biljeg molekulskih masa (kDa), ostali uzorci kao na slici 8. Ukupna masa proteina po uzorku je 2 μ g.

4. RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti prisustvo i promjene u aktivnosti endohitinaze EP3 u uzorku izvanstaničnih proteina bundeve u ovisnosti o hranidbenoj podlozi i razvojnim promjenama tijekom somatske embriogeneze te usporediti status glikozilacije proteina izlučenih u staničnoj suspenziji embriogene linije bundeve inducirane pomoću 2,4-D ili na modificiranoj podlozi MS bez hormona koja sadrži 1 mM NH_4Cl kao jedini izvor dušika (Leljak i Jelaska 1995).

Elektroforetski profil izvanstaničnih proteina embriogenih linija pokazao je razlike ovisno o sastavu podloge. U uzorku linije PEDC kultivirane 7 dana u podlozi MSNH_4 i u uzorku linije PEDC rasle 7 dana u podlozi MSNH_4 , a zatim 7 dana u podlozi MS0 nije bilo vidljivih polipeptida. Suprotno tome, u uzorku linije PEDC rasle 7 dana u podlozi MSNH_4MES broj različitih polipeptida bio je velik. Moguće da je nizak pH nepuferirane podloge MSNH_4 (3,6) utjecao na stabilnost nekih izlučenih proteina. U podlogama koje sadrže NH_4^+ kao jedini izvor dušika dolazi do zakiseljavanja jer apsorpcijom NH_4^+ u stanice i radom protonske pumpe (P-tip H^+ -ATPaza) dolazi do lučenja ekvimolarne količine H^+ iz stanice u podlogu (Howitt i Udvardi 1999). Time dolazi i do smanjenog unosa važnih kationa kao što su K^+ , Ca^{2+} i Mg^{2+} te do smanjenog rasta stanica i tkiva (Marschner 1995).

Već u ranijim istraživanjima otkriveno je da su određene hitinaze odgovorne za razvoj kasnih stadija embrija mrkve (Kragh i sur. 1996). Biokemijska svojstva i serološki odnosi pokazali su da postoji barem pet veoma srodnih hitinaza EP3, od kojih se četiri identificirane kao hitinaze klase IV veličine 30 kDa, a ostala dva proteina identificirana su kao serološki srodna kisela endohitinaza klase I (DcChitI) veličine 34 kDa i serološki nesrodna kisela endohitinaza klase II (DcChitII) veličine 29 kDa (Kragh i sur. 1996). Istraživanjem embriogeneze mrkve dokazano je da pročišćena endohitinaza EP3 klase IV omogućuje razvoj embrija linije ts11 osjetljive na temperaturu pri 31 °C (De Jong i sur. 1992).

Imunodokazivanjem izvanstanične endohitinaze klase IV u izolatu izvanstaničnih proteina iz suspenzije embriogenog tkiva bundeve, linija PEDC, uočena su tri signala za polipeptide molekulske mase 140, 72 i 58 kDa. Signal mase 140 kDa pojavljuje se samo u uzorku PEDC raslom u podlozi MSNH_4MES dok u uzorku raslom u podlozi MSNH_4 ili MS0 taj peptid nije reagirao. U uzorku linije PEDC raslom u podlozi MSNH_4 ili MS0 dobiven je signal puno jači od očekivanog s obzirom na elektroforetski profil proteina. U uzorcima embriogenog tkiva raslog u podlozi MS2,4-D ili MS0 dobiveni su signali slabijeg intenziteta

nego u uzorcima raslim u podlozi MSNH₄. Ipak, nakon imunodetekcije s manje razrijeđenim protutijelima EP3, u uzorcima linije DEC i HEC uočeni su, osim signala molekulskih masa 72 i 58 kDa, i dodatni signali od 34 i 32 kDa. Polipeptidi masa 34 i 32 kDa odgovaraju po veličini endohitinazi klase I (DcChitI) odnosno endohitinazi klase IV iz mrkve (Kragh i sur. 1996). U uzorku DEC kultiviranom 21 dan u podlozi MS2,4-D dominira signal od 72 kDa, dok u uzorku DEC kultiviranom 7 dana u podlozi MS0 dominira signal od 32 kDa. Jedan od mogućih razloga što je u uzorku raslom u podlozi MS0 signal od 32 kDa bio jači je taj što u podlozi nije bilo auksina. U ranijim istraživanjima otkriveno je da auksin i citokinin blokiraju nakupljanje mRNA za hitinazu u tkivu duhana čime inhibiraju sintezu hitinaza (Shinshi i sur. 1987). U uzorku linije HEC uočeni su jaki signali za polipeptide mase 34 i 32 kDa, jači nego u liniji DEC što bi moglo biti povezano s razlikom u zastupljenosti razvojnih stadija embrija u ove dvije linije. Tkivo linije HEC sadrži sve stadije razvoja embrija, dok tkivo linija PEDC i DEC sadržava samo nakupine proembrijskih stanica i globularne embrije. Razlika u zastupljenosti razvojnih stadija embrija vjerojatno je rezultirala razlikom u zastupljenosti izvanstaničnih proteina bundeve koji su reagirali s protutijelom na endohitinazu EP3, a to je posljedica razlike u sastavu kultivacijske podloge i duljini kultivacije.

Imunodokazivanjem endohitinaze EP3 u ekstraktu ukupnih topivih staničnih proteina dobiveni su vrlo slabi signali te se ne može sa sigurnošću tvrditi da ti signali nisu posljedica nespecifične reakcije. Rezultati ukazuju da se endohitinaze izlučuju izvan embriogenih stanica bundeve i ne zaostaju u citoplazmi.

Analizom *N*-glikana u uzorku topivih endogenih glikoproteina u listovima biljaka duhana utvrđeno je da promjena vanjskih uvjeta ili rast biljaka mogu utjecati na razlike u glikozilaciji proteina tijekom razvojnog procesa (Elbers i sur. 2001). U ranijim istraživanjima dokazano je da je poremećena i/ili nedovoljna glikozilacija mogući uzrok zastoja u rastu i razvoju somatskih embrija u mutantnoj staničnoj liniji mrkve, ts11 (Lo Schiavo i sur. 1990).

U ovom istraživanju pokazano je da je glikozilacija proteina u embriogenim stanicama bundeve kultiviranima u podlozi MSNH₄ pri pH 3,6 manja nego u stanicama koje su rasle u puferiranoj podlozi vrijednosti pH 5,8. Rezultati ukazuju da su promjene u glikozilaciji izvanstaničnih proteina bar djelomično povezane s promjenama vrijednosti pH podloge tijekom kultivacije embriogenog tkiva bundeve.

Razumijevanje prirode glikoproteina te njihove uloge u fiziološkim procesima biljaka može se poboljšati karakterizacijom glikanskih komponenti. U ovom istraživanju biljni glikoproteini detektirani su upotrebom lektina ConA, GNA, PNA i DSA.

Upotrebom lektina konkavalina A koji prepoznaje terminalnu D-manozu u svim embriogenim linijama dobiven je niz pozitivnih signala, čiji se profil razlikuje ovisno od embriogenoj liniji i kultivacijskoj podlozi. To je u skladu s ranijim istraživanjima u kojima je dokazano da različite stanične linije i kulture tkiva pokazuju razlike u glikozilaciji proteina u ovisnosti o promjenama u sastavu hranidbene podloge (Andersen i sur. 1994). Uzorak izvanstaničnih proteina embriogene linije PEDC kultivirane u podlozi MSNH₄MES pokazao je jači signal u odnosu na liniju PEDC kultiviranu u podlozi MSNH₄. U toj podlozi tijekom kultivacije dolazilo je do smanjivanja vrijednosti pH podloge, te se može zaključiti da je puferiranje podloge utjecalo na bolju glikozilaciju proteina. Nadalje, nije uočena razlika u jačini i profilu glikoziliranih proteina u uzorcima linije PEDC kultivirane 21 dan u podlozi MSNH₄ ili onima koji su nakon tog tretmana rasli još 7 dana u podlozi MS0. Isto je opaženo i u uzorcima linije DEC uzgajanim 21 dan u podlozi MS2,4-D odnosno 7 dana u podlozi MS0. Pretpostavlja se da je 7 dana kratak vremenski period da se profil glikozilacije proteina promijeni nakon što se tkivo prebaci u podlogu s konvencionalnim sadržajem dušika i bez hormona. Promjena u jačini glikozilacije može se očekivati produljivanjem vremena kultivacije. U liniji HEC najjači signal dao je protein mase 32 kDa što odgovara molekulskoj masi proteina EP3 klase IV iz mrkve (De Jong i sur. 1992). U uzorcima embriogenih linija PEDC uzgajanim 21 dan u podlozi MSNH₄MES ili 7 dana u podlozi MS0 uočeni su signali od 28 kDa i 38 kDa, što odgovara molekulskoj masi endohitinaze klase II odnosno peroksidazi koja sadržava hem i odgovorna je za poništavanje inhibicije somatske embriogeneze mrkve tunikamicinom (Cordewener i sur. 1991).

Lektin GNA prepoznaje $\alpha(1-2)$, $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-6)$ vezanu terminalnu manozu te se veže za N-glikane visoko manoznog tipa. Hibridizacija lektinom GNA pokazala je da je najviše visokomanoznih glikoproteina sadržavala embriogena linija PEDC kultivirana 21 dan u podlozi MSNH₄MES, a najmanje embriogena linija PEDC kultivirana u nepuferiranoj podlozi MSNH₄. Kao i pri analizi s Con A, rezultati ukazuju na negativan učinak niske vrijednosti pH kultivacijske podloge na glikozilaciju. Uzorak linije PEDC kultivirane 28 dana u podlozi MS0 sadrži znatno više glikoproteina u odnosu na uzorak kultiviran 7 dana. Razliku u glikozilaciji između ta dva uzorka moguće je objasniti razlikom u duljini kultivacije embriogenog tkiva u suspenziji i nakupljanjem proteina u kultivacijskoj podlozi. U embriogenoj liniji DEC kultiviranoj 28 dana u podlozi MS0 signali koje daju polipeptidi masa 36, 34 i 32 kDa bili su jače izraženi nego u ostalim uzorcima linije DEC, a ovaj uzorak sadržavao je još i signal od 140 kDa kojeg u ostalim uzorcima nije bilo. Uzorak iz embriogene linije HEC dao je najjači

signal mase 32 kDa što odgovara molekulknoj masi endohitinaze EP3 iz mrkve. Mogući razlog razlike u profilu glikozilacije linije HEC u odnosu na linije PEDC i DEC vjerojatno je taj što za razliku od linija PEDC i DEC koje sadrže rane stadije razvoja embrija tkivo linije HEC sadrži kasnije stadije razvoja embrija. U prijašnjim istraživanjima pokazano je da struktura staničnih glikoproteina varira ovisno o razini stanične organizacije te različitim razvojnim fazama tkiva (Balen i sur. 2005).

Rezultati imunodokazivanja s lektinom PNA ukazali su na slabu prisutnost disaharida Gal- β (1,3)-GlcNAc koji čini središnju strukturu O-glikana. Slab signal dobiven je u embriogenim linijama DEC i HEC dok uzorci linije PEDC nisu pozitivno reagirali. U embriogenoj liniji DEC kultiviranoj 21 dan u podlozi MS2,4-D dobiven je signal od 15 kDa. Isti taj signal pojavio se i u uzorku linije DEC kultivirane 7 dana u podlozi MS0, ali je bio nešto slabiji. U linije HEC također se pojavljuje signal od 15 kDa, ali i jači signal od 32 kDa. Oba signala dobivena su i nakon hibridizacije s lektinom GNA što ukazuje na mogućnost da su ti proteini i N- i O- glikozilirani.

Hibridizacija lektinom DSA pokazala je slabu zastupljenost složenih i hibridnih struktura N-glikana u uzorcima izvanstaničnih proteina embriogenog tkiva bundeve. U liniji PEDC pojavljuje se signal za tri polipeptida molekulske mase 66, 58 i 54 kDa, a u liniji DEC slab signal pokazuje više proteina u rasponu od 43 do 95 kDa. Dosta slabi signali koji su se pojavili u liniji PEDC i u liniji DEC u rasponu od 43 do 95 kDa vjerojatno ukazuju na nespecifično vezanje. U embriogenoj liniji DEC kultiviranoj 21 dan u podlozi MS2,4-D ili 7 dana u podlozi MS0 uočeni su još i signali veličine 32 i 15 kDa, od koji je posljednji bio nešto jači. U uzorku linije HEC također se pojavljuju signali od 32 i 15 kDa, veličinom i intenzitetom jednaki onima dobivenim nakon detekcije lektinom PNA.

U uzorcima proembriogenog tkiva bundeve u kojem dominiraju rani stadiji razvoja embrija (jednostanične strukture, mali stanični agregati i globularni embriji) signali dobiveni hibridizacijom lektinima PNA i DSA bili su slabo zastupljeni. Moguće je da kompleksni i hibridni N-glikani koje prepoznaje lektin PNA i lektin DSA nastaju u kasnijim fazama embriogeneze kada se visokomanozni glikoproteini modificiraju u hibridne i kompleksne tipove N-glikana. Već je pokazano da struktura staničnih N-glikana varira u ovisnosti o različitim razvojnim fazama i razinom stanične organizacije kultiviranog tkiva (Balen i sur. 2005).

5. ZAKLJUČAK

1. Elektroforetski profil izvanstaničnih proteina i glikoproteina mijenjao se ovisno o sastavu podloge.
2. Zakiseljavanje podloge djelovalo je negativno na izlučivanje proteina. Puferiranje podloge MSNH_4 s dodatkom MES potaklo je izlučivanje većeg broja izvanstaničnih proteina proembriogene linije PEDC.
3. Nizak pH onemogućuje pravilnu glikozilaciju proteina. U uzorku linije PEDC kultiviranom 21 dan u podlozi s dodatkom MES (pH 5,8) glikozilacija je bila jača nego u uzorcima linije PEDC uzgajanima 7 dana u podlozi MSNH_4 (pH 3,6) ili MS0 (pH 3,8).
4. Hibridizacija lektinima PNA i DSA pokazala je da su kompleksni i hibridni N-glikani slabo zastupljeni ili ih nema u izvanstaničnim proteinima embriogenih linija koje rastu u podlogama za poticanje ranih stadija embriogeneze (MSNH_4 i MS2,4-D).
5. U svim uzorcima izvanstaničnih proteina izoliranih iz kultivacijske podloge tri ispitane embriogene linije bundeve dokazani su proteini koji reagiraju s protutijelima na endohitinazu EP3 iz mrkve.
6. Najjači signal s protutijelima na endohitinazu EP3 iz mrkve pokazali su izvanstanični proteini iz linije PEDC kultivirane u podlozi MSNH_4 s dodatkom MES.
7. Tkivo kultivirano u podlozi MS0 bez regulatora rasta izlučivalo je više hitinaza u podlogu nego tkivo kultivirano u podlozi sa 2,4-D.
8. U uzorcima unutarstaničnih proteina linije PEDC i HEC nije bilo proteina koji reagiraju s protutijelima na endohitinazu EP3.

6. LITERATURA

Andersen, D. C., Goochee, C. F. (1994): The effect of cell-culture conditions on the oligosaccharide structures of secreted glycoproteins. *Curr Opin Biotechnol*, **5**: 546-549

Balen, B., Krsnik-Rasol, M., Zamfir, A. D., Zadro, I., Vakhrushev, S. Y., Peter-Katalinić, J. (2007): Assessment of N-Glycan heterogeneity of cactus glycoproteins by one-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Journal of biomolecular Techniques*, **18**: 162-172

Balen, B., Krsnik-Rasol, M. (2007): N-Glycosylation of recombinant therapeutic glycoproteins in plant systems. *Food Technol. Biotechnol.*, **45**: 1-10

Balen, B., Zamfir, A., Vakhrushev, S.Y., Krsnik-Rasol, M., Peter-Katalinić, J. (2005): Determination of *Mammillaria gracillis* N-glycan patterns by ESI Q-TOF mass spectrometry. *Croat. Chem. Acta* **78**: 463–477

Bardor, M., Faye, L. i Lerouge, P. (1999): Analysis of the N-glycosylation of recombinant glycoproteins produced in transgenic plants. *Trends in plant science*, Vol. 4, No. 9

Bloom, A. J., Sukrapanna, S. S., Warner, R. L. (1992): Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barely. *Plant Physiol*, **99**: 1294-1301

Boller, T. (1987): Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In: Koshuge, T., Nester, E. W. (eds) Plant-Microbe Interactions. *Molecular and genetic Perspectives*, vol 3, pp. 385-411

Britto, T., Kronzucker, H. J. (2002): NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review, *J. Plant Physiol*. **159**: 567–584

Buris, R. H. (1976): Nitrogen fixation. In *Plant biochemistry* , 3rd ed., j. Bonner and J. Varner, eds., Academic Press, New York, pp. 887-908

Burza, W., Malepszy, S. (1995): *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L. XVII. Plants from protoplasts through direct somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **41**: 259-266

Collinge, D. B., Kragh, K., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, H., Vad, K. (1993): Plant chitinases. *Plant J*, **3**: 31-40

Cooper, G. M. i Hausman, E. R.: Stanica, molekularni pristup, *Medicinska naklada*, Zagreb. 2004

Cordewener, J., Booil, H., Der Zandt, H., Van Engelen, F., Van Kammen, A., de Vries, S. C. (1991): Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryos-genesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta* **184**: 478-486

- Das, S., Ray, S., Dey, S., Dasgupta, S. (2001): Optimisation of sucrose, inorganic nitrogen and abscisic acid levels for *Santalum album* L. somatic embryo production in suspension culture. *Process Biochemistry*, **37**: 51–56
- De Jong, A., Cordewener, J., Lo Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerckhove, J., Kammen, A. V., De Vries, S. C. (1992): A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *The Plant Cell*, vol. 4, 425-433
- De Jong, A., Heidstram R., Spaink, H. P., Hartog, M. V., Meijer, E. A., Hendriks, T., Lo Schiavo, F., Terzi, M., Bisseling, T., Kammen, A. V., De Vries, S. C. (1993): Rhizobium lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *The Plant Cell*, vol 5, 615-620
- De Vries, S. C., Booij, H., Janssens, R., Vogels, R., Saris, L., Lo Schiavo, F., Terzi, M., Van Kammen, A. (1988): Carrot somatic embryogenesis depends on the phytochrome-controlled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. *Genes and Development*, **2**: 462-476
- De Vries, S. C., Booij, H., Meyerink, P., Huisman, G., Wilde, D. H., Thomas, T. L., van Kammen, A (1988): Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta* **176**: 196-204
- Dijak, M., Smith, D. L., Wilson, T. J., Brown, D. C. W. (1986): Stimulation of direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa*. *Plant Cell Rep* **5**: 468-470
- Domon, J. M., Neutelunga, G., Roger, D., David, A., David, H. (2000): A basic chitinase-like protein secreted by embryogenic tissues of *Pinus caribea* acts like arabinogalactan proteins extracted from the same cell lines. *J. Plant Physiol.*, **156**: 33-39
- Dyachok, J., Wiweger, M., Kenne, L., Von Arnold, S. (2002): Endogenous Nod-factor-like signal molecules promote early somatic embryo development in norway spruce. *Plant Physiol.*, **128**: 523-533
- Elbers, I. J. W., Stoopen, G. M., Bakker, H., Stevens, L. H., Bardor, M., Molthoff, J. W., Jordi, W. J. R. M., Bosch, D. I., Lommen, A. (2001): Influence of Growth Conditions and Developmental Stage on N-Glycan Heterogeneity of Transgenic Immunoglobulin G and Endogenous Proteins in Tobacco Leaves. *Plant Physiol.* **126**: 1314-1322
- Gaspar, Y., Johnson, K. L., McKenna, J. A., Bacic, A., Schultz, C. J. (2001): The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant. Mol. Biol.* **47**: 161-176
- Gerendas, J., Zhu, Z., Bendixen, R., Ratcliffe, R. G., Sattelmacher, B. (1997): Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Z Pflanzenernaehr Bodenkd* **160**: 239–251
- Greer, M. S., Kovalchuk, I. i Eudes, F. (2009): Ammonium nitrate improves direct embryogenesis and biolistic transformation of *Triticum aestivum*. *New Biotechnology*, **26**, Numbers 1/2.

- Grimes, H.D. and Hodges, T.K. (1990): The inorganic $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* **136**: 362–367
- Halperin, W. (1966): Alternative morphogenetic events in cell suspensions. *Am. J. Bot.* **53**: 443-453
- Howit, S. M., Udvardi, M. K. (1999): Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochimica et biophysica acta*, **1465**: 172-170
- Immerzeel, P., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., de Vries, S. C. (2004): Different arabinogalactan proteins are present in carrot (*Daucus carota*) cell culture medium and in seeds. *Physiologia Plantarum*, **122**: 181-189
- Jelaska, S. (1994): Kultura biljnih stanica i tkiva. *Školska knjiga*, Zagreb
- Joersbo, M., Andersen, J. M., Okkels, F. T., Rajagopal, R. (1989): Isoperoxidases as markers of somatic embryogenesis in carrot cell suspension cultures. *Physiol. Plant.*, **76**: 10-16
- Joy, K. W. (1988): Ammonia, glutamine, and asparagine: A carbon-nitrogen interface. *Can J Bot* **66**: 2103–2109
- Kamada, H., Kobayashi, T., Kiyosue, T., Harada, H. (1989): Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In Vitro Cell Dev Biol* **25**: 1163-1166
- Keiser, W. M., Weiner, H., and Huber, S. C. (1999): Nitrate reductase in higher plants. A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. *Physiol. Plant.* **105**: 385-390
- Kiyosue, T., Kamada, H., Harada, H. (1989): Induction of somatic embryogenesis by salt stress in carrot. *Plant Tissue Cult Lett (Japan)* **6**: 162-164
- Kiyosue, T., Takano, T., Kamada, H., Harada, H. (1990): Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. *Can. J. Bot.* **68**: 2301-2303
- Knox, P. J.(1995): Developmentally regulated proteoglycans and glycoproteins of the plant cell surface. *The FASEB Journal*, Vol 9, 1004-1012
- Kragh, K. M., Hendriks, T., de Jong, A. j., Lo Schiavo, F., Bucherna, N., Højrup. P., Mikkelsen, J. D., de Vries, S. C. (1996): Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant *ts11*. *Plant Molecular Biology*, **31**: 631-645
- Lang, B., Kaiser, W. M. (1994): Solute content and energy status of roots of barley plants cultivated at different pH on nitrate- or ammonium-nitrogen. *New Phytologist* **128**: 451-459.

- Lam, H. M., Coschigano, K. T., Oliveira, I. C., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G. M. (1996): The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiology plant Mol. Biol.* **47**: 569-593
- Lea, P. J., Blackwell, R.D., Joy, K. W. (1992): Ammonia assimilation in higher plants. In *Nitrogen metabolism of Plants* (proceedings of the Phytochemical Society of Europe 33), K. Mengel and D. J. Pilbeam, eds, Clarendon, Oxford, pp. 153-186
- Leljak, D., Jelaska, S. (1995) Callus formation and somatic embryo production in pumpkin *Cucurbita pepo* L. explants on hormone-free medium. *Period Biol* **97**: 327–332
- Leljak-Levanić, D., Bauer, N., Mihaljević, S., Jelaska, S. (2003): Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): Control of somatic embryo development by nitrogen compounds. *J. Plant Physiol.* **161**: 229–236
- Lerouge, P et al (1998): N-glycoprotein biosynthesis in plants: Recent development and future trends. *Plant Mol. Biol.* **38**: 31-48
- Lo Schiavo, F., Guiuliano, G., de Vries, S. C., Gemga, A., Bolini, R., Pitto, L., Cozzani, F., Nuti-Ronchi, V., Terzi, M. (1990): A carrot cell variant temperature sensitive for somatic embryogenesis reveals defect in the glycosylation of wextracellular proteins. *Molecular and general genetics*, **223**: 385-393
- Lo Schiavo, F., Filippini, F., Cozzani, F., Vallone, D., Terzi, M. (1991): Modulation of auxin-binding proteins in cell suspensions. I. Differential responses of carrot embryo cultures. *Plant Physiol* **97**: 60-64
- Marschner, H.L. (1995): Mineral Nutrition in Higher Plants. *Academic Press*, London
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., Bollet, T. (1988): Antifungal hydrolases in pea tissue. *Plant Physiol*, **88**: 936-924
- Mehrer, I., Mohr, H. (1989): Ammonium toxicity : description of the syndrome in *Sinapis alba* and the search for its causation. *Physiologia Plantarum* **77**: 545-554.
- Molano, J., Polancheck, I., Duran, A., Cacib, E. (1979): An endochitinase from wheat germ. Activity on nascent and preformed chitin. *J. Biol. Chem.* **254**: 4901-4907
- Oaks, A. (1994): Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* **72**: 739-750
- Passarinho, P. A., Van Hengel, A. J., Fransz, P. F., de Vries, S. C. (2001): Expression pattern of *Arabidopsis thaliana* AtEP3/AtchilV endochitinase gene. *Planta*, **212**: 556-567
- Pechan, P. M., Keller, W. A. (1989): Induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. by gamma irradiation and ethanol stress. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, **25**: 1073-1074

- Perrakis, A., Wilson, K. S., Chet, I., Oppenheim, A. B., Vorgas, C. E. (1993): Phylogenetic relationship of chitinases. In: Mezzarelli RAA (ed) Chitin Enzymology. *Proceedings of the International Symposium on Chitin Enzymology*, pp. 217-232
- Peuke, A. D., Jeschke, W. D., Hartung, W. (1998): Foliar application of nitrate and ammonium as sole nitrogen supply in *Ricinus communis*. II. The flows of cations, chloride and abscisic acid. *New Phytol*, **140**: 625-636
- Salsac, L., Chaillou, S., Morot-Gaudry, J. F., Lesaint, C., Jolivoie, E. (1987): Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol Biochem* **25**: 805-812
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A. i Rodríguez-Garay, B. (1998): Somatic Embryogenesis in Some Cactus and Agave Species
- Shinshi, H., Mohnen D., Meins, F. (1987): Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and Cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**: 89-93
- Siegel, L. M., Wilkerson, J. Q. (1989): Structure and function of spinach ferredoxin-nitrite reductase. In *Molecular and Genetics Aspects of Nitrate Assimilation*, J. L. Wray and J. R. Kinghorn, eds., Oxford Science, Oxford, pp. 263-283
- Sivanskar, A., Oaks, A. (1996): Nitrate assimilation in higher plants-The effect of metabolites and light. *Plant Physiol. Biochem.* **34**: 609-620
- Spaink, H. P. (2000): Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **54**: 257-288
- Stryer, L., Berg, J. M., Tymoczko, J. L. (2004): Biochemistry 5th ed, W. H. Freeman and Company
- Taylor, R. L. (1967): The foliar embryos of *Malaxis paludosa*. *Can. J. Bot.* **45**: 1553-1556
- Toonen, M. A. J., Hendriks, T., Schmidt, E. D. L., Verhoeven, H. A., Van Kamen, A., De Vries, S. C. (1994): Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* **194**: 565-572
- Usui, T., Matsui, H., Isobe, K. (1990): Enzymic synthesis of useful chitooligosaccharides utilizing transglycosylation by chitinolytic enzymes in a buffer containing ammonium sulfate. *Carbohydr. Res.*, **203**: 65-77
- Van Damme, E.J., Charels, D., Roy, S., Tierens, K., Barre, A., Martins, J.C., Rouge, P., Van Leuven, F., Does, M., Peumans, W.J. (1999): A gene encoding a hevein-like protein from elderberry fruits is homologous to PR-4 and class V chitinase genes. *Plant Physiology*, **119**: 1547-1556
- Van Hengel, A. J., Guzzo, F., Kaenen, A. V., de Vries, S. C. (1998): Expression pattern of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension cultures and in developing seeds. *Plant. Physiol.* **117**: 43-53

Van Hengel, A. J., Tadesse, Z., Immerzeel, O., Schols, H., van Kemmen. A., de Vries, S. C. (2001): N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol.*, **125**: 1880-1890

Walch-Liu, P., Neumann, G., Bangerth, F., Engels, C. (2000): Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, vol 51, 227-237

Walker, K. A., Sato, S. J. (1981): Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*. The role of ammonium ion in somatic embryogenesis. *Plant cell, Tissue and organ Culture*, **1**: 109-121

Warner, R. L., Kleinhofs, A. (1992): Genetics and molecular biology of nitrate metabolism in higher plants. *Physiol. Plant.* **85**: 245-252