

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

O-glikozilacija proteina u biljaka

O-glycosylation in plant proteins

Anita Čarija

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2010.

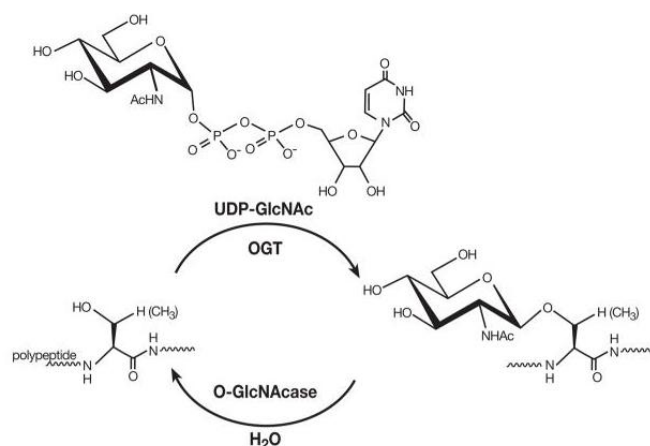
Sadržaj

1. UVOD	3
1.1. GLIKOZILACIJA	3
1.2. SKLADIŠNI PROTEINI RIŽE	4
2. METODE ISTRAŽIVANJA	5
2.1. EKSTRAKCIJA I PROČIŠĆAVANJE PROTEINA RIŽE	5
2.2. SDS-PAGE, PAŠ BOJANJE, LEKTIN- <i>WESTERN BLOTTING</i> I <i>HOT CAPPING</i>	5
2.3. ENZIM-LEKTIN TEST APSORBANCIJE (ELLA)	6
2.4. IDENTIFIKACIJA PROTEINA SPEKTROMETRIJOM MASA (MS).....	7
2.5. ALKALNA B-ELIMINACIJA I ANALIZA OTPUŠTENIH ALDITOLA	7
2.6. ANALIZA MONOSAHARIDA I TRETMANI ENDO-A-GALNACAZOM	7
2.7. PRIENOS PROTEINA NA MEMBRANU.....	8
3. REZULTATI	8
3.1. EKSTRAKCIJA PROTEINA, PROČIŠĆAVANJE I VEZANJE LEKTINA.....	8
3.2. ELLA TEST I INHIBICIJA	9
3.3. POTVRDA IDENTITETA PROLAMINA	10
3.4. ANALIZE MONOSAHARIDA, PRISUTNOST O-GLCNAC I T-ANTIGENA	11
4. ZAKLJUČAK	13
5. LITERATURA	16
6. SAŽETAK	17
7. SUMMARY	17

1. Uvod

1.1. Glikozilacija

Glikozilacija je složen, visokospecifičan i strogo reguliran post-translacijski proces kovalentnog vezanja složenih šećernih struktura na proteine i lipide. Glikani na proteine mogu biti vezani na dva osnovna načina: *N*-glikozilacijom i *O*-glikozilacijom. *N*-vezani glikani nastaju stvaranjem *N*-glikozidne veze između *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i aminokiselinskog ostataka asparagina (Asn) u proteinu. *O*-vezani glikani vežu se *O*-glikozidnom vezom najčešće na bočne ogranke serina (Ser) ili treonina (Thr) preko *N*-acetilgalaktozamina (GalNAc), ili mnogo rjeđe *N*-acetilglukozamina, manoze (Man) ili fukoze (Fuc). *O*-glikozilacija se događa u Golgijevom aparatu (GA), dok se *N*-glikozilacija odvija u Endoplazmatskom retikulumu (ER).



Slika 1. Uloga OGT u prijenosu GlcNAc na Ser/Thr bočne ogranke nascentnih proteina tijekom njihove *O*-glikozilacije. (Preuzeto iz <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

O-glikozilacija mucinskog tipa je dobro proučena kod sisavaca, ali ne i kod biljaka. Kod sisavaca enzim *N*-acetilgalaktozaminil transferaza (GalNAcT) katalizira prijenos *N*-acetil-D-galaktozamina iz UDP-GalNAc na bočne ogranke Ser ili Thr u nascentnih polipeptida. Takvim prijenosom započinje biosinteza *O*-vezanih oligosaharida mucinskog tipa. GalNAc motiv bi mogao biti produljen različitim šećerima kako bi se formiralo 8 osnovnih struktura (engl. *core structures*). Proksimalni GalNAc može biti modificiran galaktozil-transferazom (GalT) kako bi se formirao tip 1 disaharidne strukture, Gal- β -(1 \rightarrow 3)-GalNAc- α -*O*-Ser/Thr (T-antigen). Za osnovnu podjedinicu glutelina u riže pokazano je da ima T-antigen. Ovo je bio jedini izvještaj o glikozilaciji mucinskog tipa u biljaka.

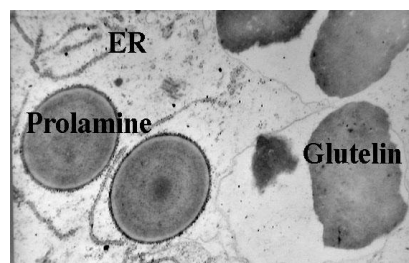
Dvije sekvence koje nalikuju *O*-GlcNAc transferazama (OGT, **Slika 1.**) pronađene su u genomu biljke *Arabidopsis thaliana*. Jedna od tih sekvenci, SPINDLY (SPY), proizvedena je u sustavu ekspresije bakulovirusa te je pokazala OGT aktivnost. Kapsidni protein iz biljnog virusa boginje šljiva (PPV-CP) je fosforiliran i *O*-GlcNAciliziran u blizini N-kraja. Predloženo je da je SECRET AGENT (SEC) također uključen u prijenos *O*-GlcNAc

modifikacija, ali još nije pokazano da OGT *Arabidopsis* modificira ikakav endogeni protein u biljaka.

Osim lokacije, malo se zna o biosintetskom putu ili funkciji glikozilacije proteina mucinskog tipa u biljaka. Nekoliko novootkrivenih oligosaharida s terminalnim GlcNAc modifikacijama, od kojih je većina *O*-vezana, identificirano je na proteinima jezgrinih pora u stanicama duhana koje su uzgojene u kulturi stanica u suspenziji. S obzirom na dinamičnost i različitost proteina s *O*-GlcNAcijom, vjerojatno je da ovaj motiv ima mnogo uloga. Njegovo učestvovanje u mnogim procesima uključujući i staničnu regulaciju, ukazuje na često recipročnu vezu s *O*-fosforilacijom, na uključenost u stanično signaliziranje za gibereline te na zaštitu od modificiranih proteina koji su nastali kao rezultat razgradnje proteazom.

1.2. Skladišni proteini riže

Glavni skladišni proteini u sjemenkama većine žitarica su prolamini i glutelini. Za razliku od sjemenaka drugih biljaka koje obično akumuliraju samo jedan tip skladišnih proteina, sjemenke riže akumuliraju dva tipa skladišnih proteina: prolamine i gluteline koji nalikuju globulinima. Nakupljanjem globulina i glutelina u sjemenkama formira se tip II proteinskog tijela (PB-II, **Slika 2.**). Takva struktura je vakuolarne građe što znači da su takvi proteini sintetizirani na membranama hrapavog ER-a, ko-translacijski transportirani u lumen ER-a te preko GA dospijevaju u vakuole koje skladište proteine. Skladišni prolamini riže uglavnom se nakupljaju u lumenu ER-a, što dovodi do formiranja proteinskog tijela tipa I (PB-I) koje je okruženo membranama podrijetlom iz ER-a. Prolamini sjemenaka riže dobiveni su kao pročišćene nereducirajuće proteinske frakcije topljive u alkoholu. Superobitelj prolamina topljivih u alkoholu je u osnovi podjeljena u dvije grupe: proteini sjemenke koji su niske molekularne mase i bogati su sumporom – tu spadaju 2S skladišni albumini, inhibitori α -amilaze i tripsini; te proteini skladišnog prolamina koji su bogati aminokiselinama prolinom (Pro) i glutaminom (Gln). Skladišni prolamini u riže kodirani su jednom velikom obitelji gena te obuhvaćaju tri grupe polipeptida od približno 10, 13 i 16 kDa.



Slika 2. Skladištenje proteina prolamina u PB-I u ER-u, te nakupljanje glutelina u PB-II. (Preuzeto iz <http://www.wsu.edu/>)

Natrij dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE) i spektrometrijom masa (MS) otkrile su se obitelji proteina od 14 i 16 kDa prisutne u pročišćenim prolaminskim frakcijama iz sjemenki riže koje su se vezale za lektine aglutinina iz biljke *Arachis hypogaea* (aglutinin kikirikija, PNA), lektine iz biljke *Vicia villosa* (VVL) i Jacalin, što ukazuje na prisutnost *O*-vezanih saharida. Naime, lektini su proteini koji na specifičan način prepoznaju ugljikohidrate te se koriste kao probe za detekciju ugljikohidrata u humanim, animalnim i biljnim stanicama. Prepoznavanje ugljikohidrata lektinom temelji se na specifičnim interakcijama koje se ostvaruju između ugljikohidrata i lektinske domene koja veže ugljikohidrate. Lektini se najčešće obilježavaju biotinom kako bi se mogli detektirati. Budući da je mala vjerojatnost da su skladišni prolamini riže *O*-glikozilirani, prisutnost *O*-vezanih saharida mogla bi biti rezultat prisutnosti ko-ekstrahiranih proteina, bilo zbog njihove topljivosti ili asocijacije s proteinskim tijelom.

2. Metode istraživanja

2.1. Ekstrakcija i pročišćavanje proteina riže

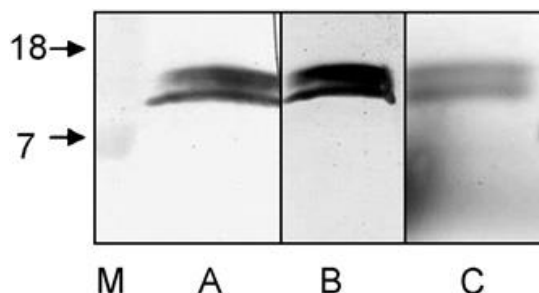
Oljuštene sjemenke riže samljevene su u brašno, te su porcije od 20 g u nizu ekstrahirane u 200 mL otopine koja sadrži 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 M NaCl, 0,1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) te 200 mL 60%-tne otopine *n*-propanola s 0,1 mM PMSF i 10%-tnom octenom kiselinom s 0,1 mM PMSF. Za ekstrakciju je korišten 60%-tni *n*-propanol jer je utvrđeno da je ta koncentracija dvostruko učinkovitija od 70%-tne. Dobiveni supernatanti su spojeni i liofilizirani. Grubi alkoholni ekstrakt je zatim bio podvrgnut visokodjelotvornoj tekućinskoj kromatografiji obrnute faze (RP-FPLC) uz pomoć kolone Vydac Protein & Peptid C18 Sephasil (22 x 250 mm) na sustavu ÄKTAexplorer sa stopom protoka od 10 mL/min pri sobnoj temperaturi. Eluat je bio praćen pri 215 nm, zatim sakupljan u frakcije od 12 mL koje su kasnije spojene i liofilizirane. Približan udio pročišćenog proteina (frakcija A) je obično iznosio 0,01% od ukupne početne težine brašna.

2.2. SDS-PAGE, PAS bojanje, lektin-Western blotting i hot capping

Odvajanje proteina frakcije A izvršeno je SDS-PAGE-om na 4-15%-tnom ili 4-20%-tnom Tris-HCl gelu ili na 10%-tnom ili 4-12%-tnom Bis-Tris gelu s MES puferom. Nakon otapanja liofiliziranog proteina u 60%-tnom *n*-propanolu dodan je 80%-tni glicerol. Vizualizacija je izvršena bojanjem bojom Coomassie R-250. Bojanjem su utvrđene dvije proteinske pruge na približno 14 i 16 kDa.

Elektroprijenos na poliviniliden difluorid (PVDF) membrani provedeni su korištenjem uređaja za polusuhi prijenos. Kako bi se utvrdilo postojanje glikoproteina na prugama

izvršeno je bojanje perjodna kiselina-Schiffov reagens (PAS bojenje). Nakon prijenosa proteina na membranu vizualizacija glikoproteina izvršena je reakcijom s lektinima obilježenim biotinom (**Slika 3.**): lektinom iz biljke *Vicia villosa* (VVL), aglutininom iz biljke *Arachis hypogaea* (PNA) i aglutininom iz biljke *Triticum vulgare* (aglutinin pšenične klice, WGA). Korišteno je po 2 µg/mL navedenih lektina u TBS (engl. *tris-buffered saline*) puferu koji uz 0,1% detergent Tween 20 (TBST pufer) sadrži i po 1 mM MgCl₂, MnCl₂ i CaCl₂. PVDF membrane su zatim bile osušene na zraku.



Slika 3. Proteini riže razdvojeni na 4-15%-tnom Tris-HCl poliakrilamidnom gelu, te preneseni na PVDF membranu i A – detektirani lektinom PNA; B – detektirani lektinom VVL; C – obojani bojom Coomassie blue; M – biljezi molekulske mase. (Preuzeto iz Kilcoyne *i sur.* 2009.)

Detekcija terminalnog GlcNAc motiva, koji se nalazio vezan za membranske proteine, omogućena je obilježavanjem s [³H] galaktozom. Inkubacija s GalT potaknula je premještanje [³H]Gal na terminalne GlcNAc. Premještanje je rezultiralo pojavom signala. Poslije obilježavanja, membrana je bila osušena na zraku i izložena BioMax XAR filmom na -80 °C.

2.3. Enzim-lektin test apsorbancije (ELLA)

Serijska razrjeđenja nekoliko prolaminskih frakcija pročišćenih metodom RP-FPLC testirana su na vezanje na Jacalin koji je bio obilježen biotinom. Mikrotitarska pločica s 96 jažica je preko noći pri 4 °C obložena različitim koncentracijama prolaminskih frakcija ili asialo ovčjim mucinom iz submandibularne žlijezde (asialoOSM) u 0,1 M natrijevog karbonata. Tijekom 2 h pri 20 °C pločica je inkubirana s 1%-tnim goveđim serum albuminom (BSA) u TBST puferu. ELLA testovi provedeni su s biljnim lektinom Jacalinom (250 µg), koji je obilježen biotinom, i razvijeni s avidin-alkalnom fosfatazom (1:2500 u 1%-tnim BSA u TBST puferu) i *p*NPP. Nakon 30-60 min inkubacije očitana je apsorbancija pri 405 nm u čitaču mikrotitarskih pločica. Za inhibicijske testove inhibitorni saharidi serijski su razrjeđeni u vodi, te su pomiješani s jednakim volumenima Jacalina u puferu. Iz dobivene krivulje inhibicije procijenjena je inhibicijska aktivnost, te je izražena kao koncentracija inhibitora (mM) pri kojoj dolazi do 50%-tne inhibicije kontrolnog vezanja lektina. Svi eksperimenti provedeni su dva ili tri puta, a na temelju njihovih rezultata izračunate su srednje vrijednosti za inhibicijsku aktivnost.

2.4. Identifikacija proteina spektrometrijom masa (MS)

Na dvama frakcijama, koje su prethodno pročišćene s RP-HPLC, izvršena je matriksom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (MALDI) spektrometrija masa na *Bruker Reflex IV time-or-flight* (TOF) masenom spektrometru. Molekularna masa netaknutih proteina izmjerena je korištenjem dušičnog lasera (337 nm, 3 ns širina pulsa). Da bi se uočili uzorci upotrebene su 2,5-hidroksibenzoična kiselina (DHB) matrica ili α -cijano-4-hidroksicinamična kiselina (CHCA) matrica, a za kalibraciju je upotrebljen mioglobin iz konjskog srca. Interpretacija je obavljena korištenjem softvera XTOF 5.1.1. Nakon redukcije s ditioneitolom (DTT) i alkilacijom jodoacetamidom, frakcije su razložene u gelu koji sadrži tripsin. Molekulske mase razgrađenih peptida zabilježene su pomoću spektrometrije masa MALDI-TOF na instrumentu Reflex IV. Slijedovi aminokiselina u peptidima bili su određeni on-line capLC ionizacijom elektroraspršenjem ili nanoraspršenjem i kolizijom induciranom fragmentacijom na Q-Star Pulsaru i kvadrupolnom ortogonalnom TOF masenom spektrometru. Dobiveni podaci su analizirani uz pomoć softvera QAnalyst, GPMaw 5.02 koji koristi BLAST pretraživanje baze podataka NCBI.

2.5. Alkalna β -eliminacija i analiza otpuštenih alditola

Kako bi se nadalje ispitala prisutnost T-antigen disaharida (Gal- β -(1 \rightarrow 3)-GalNAc), izvršena je alkalna β -eliminacija na pročišćenim proteinskim frakcijama (frakcija A). Alkalna β -eliminacija izvršena je pod dušikom u zapečaćenim cijevima s 1 M natrijevim borohidridom u 0,1 N natrijevog hidroksida na 45 °C tijekom 18 h u mraku. Poslije hlađenja, višak borohidrida je bio uništen, a smjesa je bila neutralizirana 1N octenom kiselinom. Uzorci su bili re-N-acetilirani i pročišćeni na AG 501-x8. Alditolni standardi GalNAc, GlcNAc, Gal i T-antigen disaharidi bili su slično pripremljeni. Otpušteni alditoli identificirani su uspoređivanjem s pripremljenim standardima pomoću visokodjelotvorne kromatografije ionske izmjene s detektorom električne sprovodljivosti (HPAEC-PAD) na koloni CarboPac MA1, eluirani na brzini protoka od 0,4 mL/min i na temperaturi kolone od 25 °C. Proučeni su oni vrhovi koji su bili slični vrhovima alditolnih standarda Gal (OH), GalNAc (OH), GlcNAc (OH) i Gal- β -(1 \rightarrow 3)-GalNAc (OH).

2.6. Analiza monosaharida i tretmani endo- α -GalNAcazom

Hidroliziranjem 0,5-3,6 mg pročišćene prolaminske frakcije s 2N trifluorooctenom kiselinom (TFA) ili 6N HCl pri 100 °C nastao je hidrolizat koji je upotrebljen za analizu monosaharida. Oslobođeni šećeri bili su podvrgnuti HPAEC-PAD, a vrhovi dobivenih eluata bili su identificirani i kvantificirani u usporedbi s vrhovima šest standardnih šećera: Fuc, GalN, GlcN, Gal, Glc i Man. Analiza je obavljena na koloni CarboPac PA10 (4 x 250 mm) kojoj je prethodila kolona za aminokiseline (4 x 50 mm), kako bi se minimalizirala interferencija produkata degradacije proteina, i izokratična elucija od 18, 22 ili 24 mM NaOH pri protočnoj brzini od 1 mL/min kroz 18,5 min na temperaturi kolone od 25 °C. Hidrolizati govedeg fetuina su korišteni kao pozitivna kontrola, a kiselina je korištena za ispravak.

Ista pročišćena prolaminska frakcija (1 mg) tretirana je s 10 mU endo- α -GalNAzom (*O*-glikanaza) u 50 mM natrijevom fostatu, pH 6,0, ili s 15%-tnim *n*-propanolom u istom puferu, u prisutnosti inhibitora biljnih proteaza (10 μ L/mL) pri 37 °C tijekom 24 h uz nježno protresanje. Utvrđeno je da je enzim zadržao 50% aktivnosti u 15%-tnom *n*-propanolu tijekom 24h. Reakcijska smjesa je zatim bila centrifugirana 1 min, a otpušteni glikani prikupljeni su prolaskom kroz kasetu Glyco H. Pročišćeni glikani su zatim bili obilježeni 2-aminobenzamidom (2-AB; λ_{ex} 330 nm, λ_{em} 420 nm), pročišćeni na kaseti Glyco i analizirani normalno-faznom visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (NP-HPLC) korištenjem kolone GlycoSepTM N na HPLS sustavu Waters 2795 koji je bio opremljen s fluorescencijskim detektorom valnih duljina Waters 2475. Gradijent je bio 35-50% B preko 70 min (eluat A: acetonitril; eluat B: 50 mM amonijev formijat, pH 4,4) pri brzini protoka od 0,4 mL/min na sobnoj temperaturi. T-antigen je bio također obilježen s 2-AB i korišten kao disaharidni standard.

Uzorci obilježeni s 2-AB su bili razrijeđeni u smjesi acetonitril: voda (50:50) s 0,1%-tnom mravljom kiselinom i analizirani ionizacijom elektroraspršenjem (ESI) (nanoraspršenje) na spektrometru masa Q-TOF2 direktno infuzirajući uzorak brzinom od 0,5 μ L/min. Instrument je bio kalibriran ljudskim glufibrinogen peptidom, a standardni 2-AB obilježeni T-antigen je bio zadržan na kolizijskoj energiji od 33 eV. Podaci su bili analizirani korištenjem softvera MassLynx 4.0.

2.7. Prijenos proteina na membranu

Elektroprijenosi na PVDF membrani provedeni su korištenjem uređaja za polusuhi prijenos. Za obilježavanje prenesenih proteina korišteno je monoklonalno mišje anti-*O*-GlcNAc protutijelo. Membrana je bila inkubirana u primarnim protutijelima (1:15,000) na sobnoj temperaturi tijekom 1,5 h. Za detekciju su bila upotrebljena dva anti-mišja sekundarna protutijela: jedno konjugirano s bojom IRDye® 800 CW i drugo konjugirano s alkalnom fosfatom. Vizualizacija je provedena s infracrvenim skenerom Odyssey.

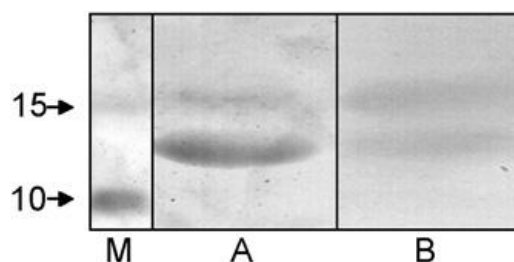
3. Rezultati

3.1. Ekstrakcija proteina, pročišćavanje i vezanje lektina

Bojanje gelova dobivenih SDS-PAGE-om bojom Coomassie blue pokazalo je dvije proteinske pruge na približno 14 i 16 kDa. Pozitivo PAS bojanje i vizualizacija lektinima VVL i PNA, koji su bili obilježeni biotinom, pokazali su da obe pruge sadrže glikoproteine. Budući da lektini VVL i PNA imaju specifični afinitet za GalNAc i T-antigen, rezultati obilježavanja lektinima upućuju na prisutnost *O*-glikozilacije. Kako bi se potvrdila ova

promatranja, grube frakcije prolamina bile su pročišćene pomoću RP-FPLC na koloni C18. Masa prikupljenih pročišćenih proteina iznosila je 4-5 mg od početnih 40 g usitnjene riže (približno 0.01 % od ukupne početne težine).

Rezultati PAS bojanja te obilježavanja lektinima VVL i PNA pročišćenih frakcija prolamina od 14 i 16 kDa su u osnovi bili isti kao i rezultati za frakcije grubih pripravaka. Vezanje lektina PNA je inhibirano prethodnom inkubacijom s 100 mM laktozom (**Slika 4.**), što ukazuje da se vezanje događalo uslijed interakcije lektina s ugljikohidratnim ligandima u prolaminskim frakcijama.

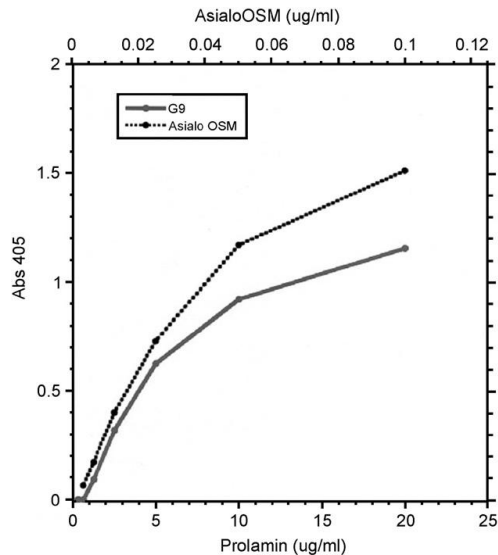


Slika 4. Proteini riže pročišćeni RP-FPLC-om i razdvojeni u 4-20%-tnom Tris-HCl poliakrilamidnom gelu, preneseni na PVDF membranu i obilježeni s: A - lektinom PNA; B - lektinom PNA uz prethodnu inkubaciju 100 mM laktozom; M - biljezi molekularnih masa (Preuzeto iz Kilcoyne *i sur.* 2009.)

3.2. ELLA test i inhibicija

ELLA testom ispitivano je vezanje prolaminskih frakcija pročišćenih pomoću RP-FPLC na Jacalin obilježen bitinom. Nalime, Jacalin ima specifični afinitet za T-antigen. U oba ispitivana slučaja vezanje lektina povećalo se porastom koncentracije proteina, ali utvrđeno je da ja 0,04 μg asialoOSM dalo istu apsorbanciju kao i 10,0 μg prolamina, što znači da je vezanje Jacalina obilježenog biotinom za asialoOSM 250 puta veće od vezanja za prolamin (**Slika 5.**). Uzrok takve razlike bi mogao biti relativno mali broj T-antigen disaharida vezanih za Jacalin po molekuli prolamina u usporedbi s mnogobrojnim GalNAc ograncima vezanim za asialoOSM. Na temelju podataka dobivenih analizom monosaharida može se zaključiti da je veoma mali udio molekula prolamina glikozilirano T-antigen disaharidima.

Da bi se ispitala specifičnost vezanja Jacalina za frakciju prolamina G8 i asialoOSM, proučavana je inhibicija vezanja pomoću melibioze (Gal- α -(1 \rightarrow 6)-Glc), D-GalNAc, D-Gal, L-Fuc i D-Fuc. Koncentracije melibioze i GalNAc koje su bile potrebne za 50% inhibicije vezanja za prolamin iznosile su 9 i 63 mM dok Gal, L-Fuc i D-Fuc nisu inhibirale vezivanje ni pri najvećim koncentracijama korištenim u testiranju, pri 100 mM. Koncentracije melibioze, GalNAc i Gal potrebne za 50% inhibicije vezanja za asialoOSM iznosile su 6, 40 i 100 mM. L- i D-Fuc također nisu djelovale inhibitoryno pri koncentracijama od 100 mM. Ovi rezultati potvrđuju da je vezanje Jacalina na frakcije prolamina posredovano ugljikohidratnim ligandima.

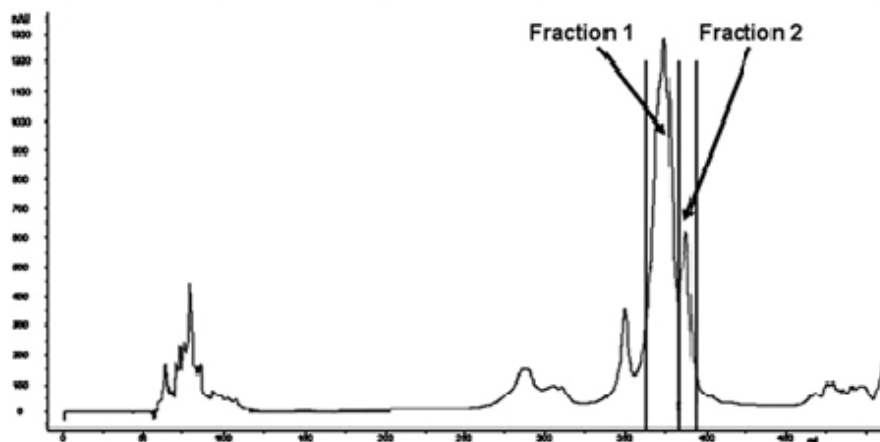


Slika 5. Vezanje Jacalina obilježenog biotinom za jažice mikrotitarske pločice obložene serijski razrijeđenim otopinama prolaminske frakcije G9 i s asialoOSM. (Preuzeto iz Kilcoyne *i sur.* 2009.)

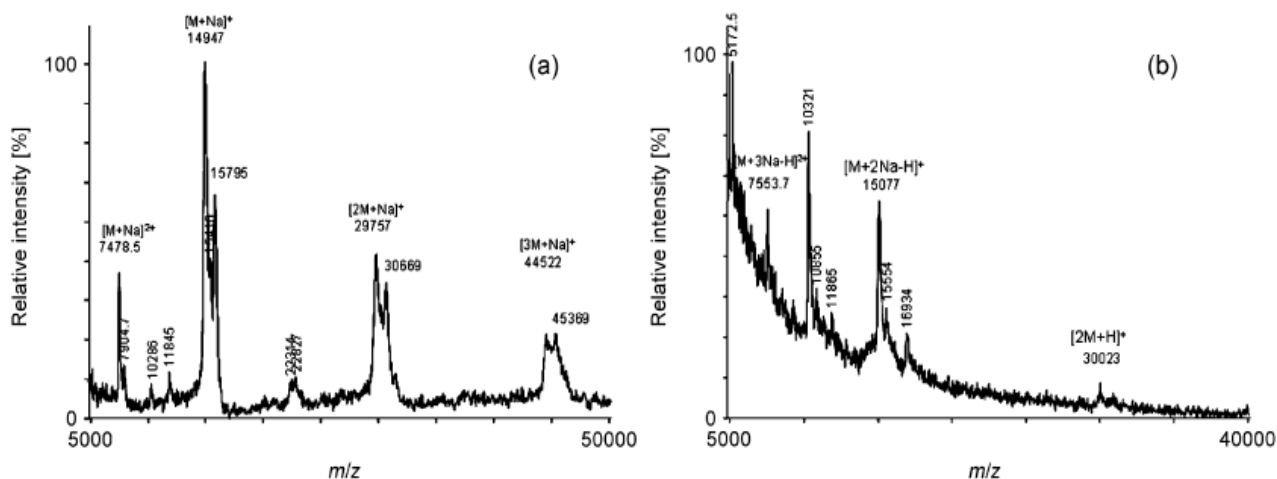
3.3. Potvrda identiteta prolamina

Pretraživanje potrebnih peptidnih sekvenci pomoću softvera SEQUEST rezultiralo je identifikacijom rižinog prolamina 7 s 15,3%-tnim preklapanjem sa sekvencom i rižine nukleozid difosfat kinaze I (NDK I), koja je obično asocirana s mikrotubulima, s 10,7%-tnim preklapanjem.

U svrhu analize netaknutih proteinskih masa iz frakcija dobivenih pročišćavanjem putem RP-HPLC (Frakcija 1 i 2, **Slika 6.**), dvije pročišćene frakcije razgrađene su tripsinom. Produkti razgradnje su bili analizirani pomoću MALDI-TOF MS (**Slika 7.**). Najjači signali $[M+H]^+$ pronađeni su na m/z 1195,4 u spektru Frakcije 1, te na m/z 1172,6 u spektru Frakcije 2. BLAST pretraživanja su pokazala prisutnost dvaju različitih grupa skladišnih prolamina.



Slika 6. RP-FPLC kromatogrami dobiveni korištenjem eluata A i C pokazuju frakcije sakupljene za MS analize. (Preuzeto iz Kilcoyne *i sur.* 2009.)



Slika 7. Spektri masa MALDI-TOF netaknutih proteina iz prolamina; (a) frakcija 1 i (b) frakcija 2 (Preuzeto iz Kilcoyne *i sur.* 2009.)

Rezultati dobiveni metodom otisaka prsta (engl. *peptide mass fingerprint*, PMF), spektrometrijom masa MALDI i ES tandemnom spektrometrijom masa pokazuju da je komponenta u Frakciji 1 vjerojatno prolamin 7, a u Frakciji 2 prolamin 14P. Molekulske mase za osnovne proteinske i peptidne komponente su odgovarale izračunatim vrijednostima za cDNA sekvence, te nisu dale dokaze o post-translacijskim modifikacijama ovih skladišnih prolamina.

3.4. Analize monosaharida, prisutnost *O*-GLCNac i T-antigena

Hidrolizat dobiven hidrolizacijom pročišćenog prolamina je podvrgnut analizi HPAEC-PAD metodom kako bi se ispitalo sadržaj monosaharida. Utvrđeno je da su Gal i Glc prisutni u pročišćenim ekstraktima prolamina, a na temelju Gal izračunat je ukupan sadržaj neutralnog šećera koji je iznosio približno 1 mol monosaharida na 161 mola proteina (**Tablica 1.**). Prisutnost heksozamina ispitana je s 6N HCl zbog čijeg djelovanja dolazi do otpuštanja svih prisutnih šećera, uključujući i heksozamine.

Tablica 1. HPAEC-PAD analize sadržaja monosaharida (1 mol monosaharida u X mola prolamina) u pročišćenoj frakciji prolamina. (Preuzeto iz Kilcoyne *i sur.* 2009.)

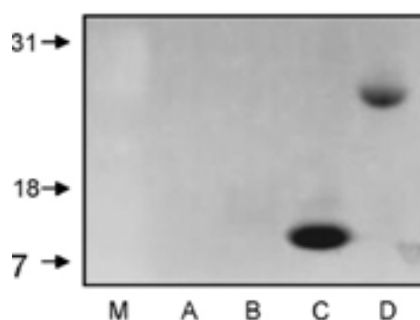
Hydrolysis	M_r (kDa)	GalN	GlcN	Gal	Glc
2 N TFA	16	–	–	161	66.2
	14	–	–	184	75.8
6 N HCl	16	488	746	450	nd
	14	556	855	515	nd

nd = not determined; – = not detected.

Analize ovih hidrolizata pokazale su prisutnost GalN (1 mol u 450 mola proteina), Gal (1 u 450), te količinu GlcN (1 u 746) kao dodatak velikoj količini Glc. Zabilježene su vrijednosti koje su prikazivale niže količine ugljikohidrata.

Prisutnost *O*-GlcNAc u pročišćenim prolaminima ispitana je obilježavanjem s lektinom WGA, s obzirom da se WGA specifično veže na GlcNAc. Proteinska vrpca od 14 kDa je reagirala pozitivno. Istraživanjima je utvrđeno da se vezanje lektina WGA može inhibirati pomoću 500 mM GlcNAc. Time je pokazano da je vezanje posredovano udjelom ugljikohidrata. Međutim, eksperiment *hot capping* je bio negativan.

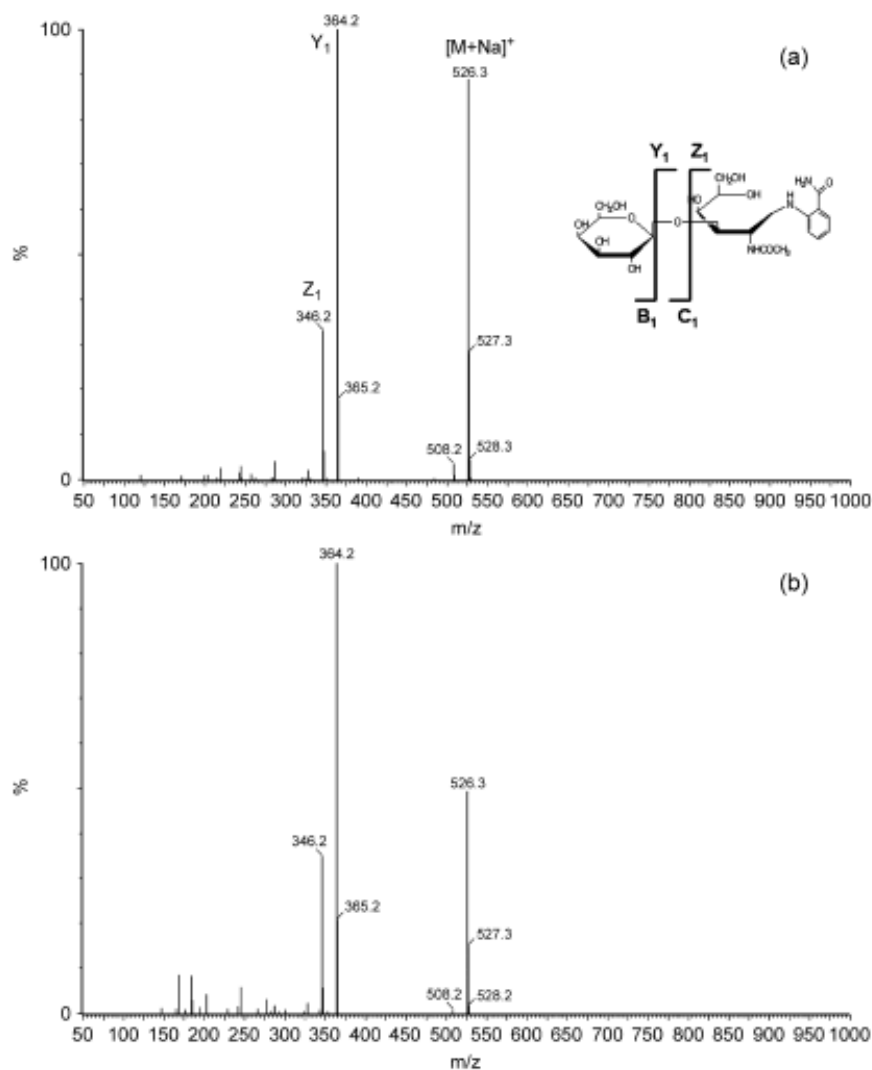
Obilježavanje pročišćenog prolamina s mišjim anti-*O*-GlcNAc protutijelom je također bilo pozitivno za proteinsku vrpcu od 14 kDa (**Slika 8.**). Vizualizacija pomoću različito obilježenih (IRDye® 800 CW i alkalna fosfataza) protutijela pokazala je isti rezultat. Ostale proteinske frakcije sjemenki riže su također bile testirane na prisutnost *O*-GlcNAc, te je uočena i slabija pozitivna pruga od 25 kDa. Ta pruga odgovara osnovnoj podjedinici glutelina.



Slika 8. Proteinske frakcije prolamina riže: A - albumini, B - globulini, C - prolamini, D - glutelini. Proteini su odvojeni na 4-12%-tnom Bis-Tris poliakrilamidnom gelu, nanešeni na PVDF membranu i obilježeni mišjim anti-*O*-GlcNAc monoklonskim protutijelima i kozjim anti-mišjim protutijelima obilježenim s bojom IRDye. (Preuzeto iz Kilcoyne *i sur.* 2009.)

Inkubacijom pročišćenog prolamina u *O*-glikanazi u dva različita pufera došlo je do otpuštanja saharida koju su zatim bili obilježeni s 2-AB i analizirani pomoću NP-HPLC. *O*-glikanaza katalizira hidrolize nesupstituiranog T-antigena α -vezanog za hidroksilnu skupinu određenih aglikona. Rezultati obaju inkubacija su bili gotovo pa identični, a vrh je identificiran kao Gal- β -(1 \rightarrow 3)-GalNAc-2-AB. Istovremeno nanošenje standarda i uzorka otopine je rezultiralo u ko-eluciji vrha standarda s vrhom slično obilježenog pročišćenog uzorka.

Analizom ESI-MS cijelog obilježenog uzorka uočen je vrh na m/z 526,3 koji odgovara očekivanom $[M+Na]^+$ m/z 526,36. MS/MS analize iona obilježenog uzorka na m/z 526,36 rezultirale su uzorkom fragmentacije sličnom onom kod standarda (**Slika 9.**).



Slika 9. (a) MS/MS spektar masa za $[M+Na]^+$ na m/z 526,26 pokazuje fragmentaciju T-antigena obilježenog s 2-AB (standard). (b) MS/MS spektar masa za $[M+Na]^+$ na m/z 526,26 pokazuje fragmentaciju pročišćenog prolamina obilježenog 2-AB. (Preuzeto iz Kilcoyne *i sur.* 2009.)

4. Zaključak

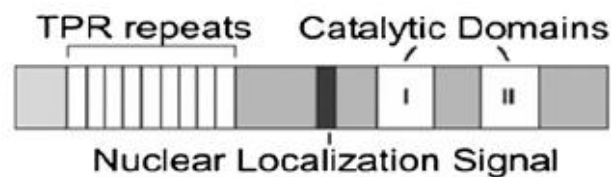
Budući da se skladišni prolamini kod riže nalaze u PB-I u ER-u, ne očekuje se da budu *O*-glikozilirani jer ne bivaju transportirani kroz GA. Mnogi glutelini zajedno s prolaminima formiraju polimere velike molekulske mase. Takvi polimeri sadrže međulančane disulfidne mostove. Stoga je uz pomoć reducirajućeg agensa omogućena ekstrakcija podjedinice glutelina zajedno s prolaminima. Među skladišne prolamine koji su bogati cisteinom uključeni su nespecifični transportni proteini i glutelini. Grupa skladišnih prolamina koji su bogati cisteinom, mase od 10 kDa, nije bila vizualizirana bojanjem gela bojom Coomassie. Signali od približno 10 kDa bili su viđeni u velikim i manjim signalima na MALDI spektru za kompletne proteinske mase u frakcijama 1 i 2, ali oni su mogli biti rezultat degradacije.

Tijekom analize MudPIT grubog alkoholnog ekstrakta identificirana je NDK I asocirana s mikrotubulima. Stoga, prisutnost *O*-glikozilacije u ekstraktu mogla bi se pripisati ko-ekstrahiranim proteinima koji su ostali asocirani s proteinskim tijelom ili su se sami otopili u alkoholu. Metodom MS/MS utvrđeno je da su osnovne komponente dviju pročišćenih frakcija skladišni prolamini koji nisu glikozilirani, a za ostale peptide se pretpostavilo da su mogli biti produkti autolize tripsina. Molekulska masa utvrđena SDS-PAGE-om je bila približno konstantna tijekom vremena čime se utvrdilo da proučavani prolamini nisu bili post-translacijski modificirani. No, budući da su dvije vrpce prolaminskih proteina dale pozitivnu reakciju na ugljikohidrate zaključeno je da bi neki glikoproteini mogli biti prisutni kao manja frakcija. Na temelju analize monosaharida i razlike od 250 puta pri vezanju Jacalin-a za asialoOSM i prolamin ustanovljeno je da je nivo glikozilacije prolamina nizak.

Disaharid otpušten iz pročišćenih frakcija prolamina je na temelju osjetljivosti na djelovanje endo- α -GalNAcaze, ko-migracije s jednako obilježenim standardom tijekom NP-HPLC, analize monosaharida, sličnosti u uzorku fragmentacije sa standardom dobivene tijekom ESI-MS-MS, te HPAEC-MS analizom spoja dobivenog β -eliminacijom *O*-vezanih saharida, identificiran kao Gal- β -(1 \rightarrow 3)-GalNAc.

Prisutnost GlcN nakon kiselih hidroliza, GlcNAc (OH) nakon β -eliminacije, vezanje lektina WGA koje se može inhibirati i vezanje anti-*O*-GlcNAc monoklonskog protitijela za proteinsku prugu od 14 kDa ukazuju na mogućnost *O*-GlcNAc modifikacije subpopulacije proteinske obitelji od 14 kDa. Međutim, nedostatak signala u eksperimentu *hot capping* postavlja pitanje o prirodi ugljikohidratnog motiva koji sadrži GlcNAc. Utvrđeno je da osnovna podjedinica riže ima T-antigen (*O*-vezan) i visoko manozni tip *N*-glikozilacije. Slab pozitivni signal dobiven je vezanjem protitijela za osnovnu podjedinicu glutelina. Motivi glikozilacije mogu se pojaviti i na ko-ekstrahiranim proteinima uključenim u transport prolaminske mRNA, posebno zato što bi mala količina prisutnih ugljikohidrata upućivala na modifikacije subpopulacija ekstrahiranih proteina.

Za regulaciju nivoa *O*-GlcNAcije proteina odgovorna je *O*-GlcNAcaza odgovorna za uklanjanje *O*-GlcNAc. Takvi enzimi nisu pronađeni u riži, a BLAST pretraživanjem rižinog proteoma ljudskom *O*-GlcNAcazom pronađene su samo sekvence veoma niskog stupnja sličnosti. Odsutnost *O*-GlcNAcaze slične ljudskoj i GalNAcT sekvenci kod riže mogla bi ukazivati da geni biljaka i sisavaca ne dijele zajedničkog pretka. Smatra se da *O*-GlcNAc ima ulogu u signalizaciji, sastavljanju i/ili stabilizaciji.



Slika 10. OGT domene. (Preuzeto iz Kilcoyne *i sur.* 2009.)

Dvije različite esencijalne izoforme OGT zabilježene su u riže: SPINDLY (OsSPY) i SECRET AGENT (OsSEC). Svi OGTi imaju dvije osobite domene, tetratrikopeptidni ponavljajući motivi na N-kraju i katalitička regija C-kraja. Katalitičke domene rižinih SPY i SEC proteina su visoko očuvane (**Slika 10.**) u usporedbi s ostalim dobro proučenim OGT biljaka i sisavaca. Predloženo je da je SPY, OGT homolog u *Arabidopsisu*, negativan regulator odgovora na giberelin. Giberelin je hormon koji ima ulogu u biljnom razvoju, posebno u poticanju klijanja sjemenke. SEC je identificiran kao nositelj *O*-GlcNAc modifikacije na PPV-CP, ali malo se zna o endogenim proteinskim metama OGT-a u biljnim stanicama.

Eksperimenti kojima bi se zaključno identificirali modificirani proteini su u tijeku. Ti eksperimenti bi mogli pomoći u otkrivanju funkcije ovog motiva kod sjemenki riže. Na temelju rezultata istraživanja predložena je prisutnost *O*-glikozilacije mucinskog tipa, posebno T-antigena, u pročišćenim i u alkoholu topljivim proteinskim ekstraktima u riže, te prisutnost *O*-vezanih GlcNAc u obitelji od 14 kDa. Prisutni GlcNAc vjerovatno nije terminalan, a zaključeno je da je motiv *O*-vezan budući da je GlcNAc bio otpušten tijekom β -eliminacije, te nije bilo dokaza o prisutnosti Man u analizama monosaharida.

5. Literatura

1. Hanisch, F.G. (2001): *O*-glycosylation of the mucin type. *Biological Chemistry* **382**, 143-149.
2. Hart G., Akimoto Y. (2009): *Essentials of Glycobiology, The O-GlcNAc modification*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
3. Kilcoyne et al. (2009): *O*-glycosylation of protein subpopulations in alcohol extracted rice proteins. *Journal of Plant Physiology* **166**, 219-232.
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
5. <http://www.wsu.edu/>

6. Sažetak

O-glikozilacija mucinskog tipa je dobro proučena kod sisavaca, ali ne i kod biljaka. Pročišćene nereducirajuće proteinske (prolaminske) frakcije topljive u alkoholu, dobivene iz sjemenaka riže, proučavane su kako bi se ustanovila prisutnost *O*-vezanih oligosaharida. Budući da je mala vjerojatnost da su skladišni prolamini *O*-glikozilirani, prisutnost *O*-glikozilacije u ekstraktu mogla bi se pripisati ko-ekstrahiranim proteinima, bilo to zbog njihove asociranosti s proteinskim tijelom ili zbog njihove topljivosti. Analize provedene SDS-PAGE i MS metodama otkrile su proteinske obitelji od 14 i 16 kDa prisutne u pročišćenim prolaminskim frakcijama koje su se vezale za lektine aglutinina iz kikirikija (PNA), lektine iz biljke *Vicia villosa* (VVL) i Jacalin, što ukazuje na prisutnost *O*-vezanih saharida. Otkriven je i udio ugljikohidrata koji sadrže *O*-vezan GlcNAc motiv. *Protein blotting* s anti-*O*-GlcNAc protutijelom je bio pozitivan za subpopulaciju frakcije proteina od 14 kDa, ali *hot capping* eksperiment je bio negativan. Stoga, GlcNAc ogranak najvjerojatnije nije terminalan. Obilježavanje fluorescentnim bojama i analize HPLC pokazale su vrh koji sadrži Gal- β -(1 \rightarrow 3)-GalNAc. *O*-glikozilacije mogla bi pridonositi proteinskoj funkcionalnosti ili regulaciji, ali daljnja istraživanja su potrebna kako bi se identificirali specifični proteini koji imaju ovakve modifikacije.

7. Summary

Mucin-type *O*-glycosylation has been well characterized in mammalian systems but not in plants. The purified alcohol-soluble, non-reduced protein (prolamin) fraction from rice seed was investigated for the occurrence of *O*-linked oligosaccharides. As it is unlikely that storage prolamins are *O*-glycosylated, any *O*-glycosylation present in the extract could be attributable to co-extracted proteins, whether because of their association with the protein body or solubility. SDS-PAGE and MS analyses revealed 14 and 16 kDa protein families present in purified prolamin fractions that bound to the lectins peanut agglutinin (PNA), *Vicia villosa* lectin (VVL) and Jacalin, indicative of the presence of *O*-linked saccharides. A GlcNAc-containing *O*-linked carbohydrate moiety was discovered. Protein blotting with anti-*O*-GlcNAc antibody was positive in a subpopulation of the 14 kDa protein fraction, but a hot capping experiment was negative. Therefore, the GlcNAc residue is unlikely to be terminal. Fluorescent labeling and HPLC analysis demonstrated a peak consistent with Gal- β -(1 \rightarrow 3)-GalNAc, with similar MS/MS fragmentation. *O*-glycosylation may contribute towards protein functionality or regulation but further investigation is required to identify the specific proteins with these modifications.