

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet – Biološki odsjek

Tea Rogić i Matija Šimac

**Utjecaj solnog i osmotskog stresa na kaktus
Mammillaria gracilis Pfeiff. u kulturi *in vitro***

Zagreb, 2009./2010.

«Ovaj rad izrađen je u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Biljane Balen, u sklopu znanstvenog projekta „Diferencijalna ekspresija proteina u biljnim stanicama“, 119-1191196-1200 voditeljice prof. dr. sc. Marijane Krsnik-Rasol i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2009./2010.

POPIS KRATICA I SMIBOLA

3,3'-DAB	3,3'-diaminobenzidin
AA	akrilamid
AcOH	octena kiselina
APS	amonij peroksodisulfat
BCIP/NBT	5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat/nitro blue tetrazolium
BIS	bisakrilamid
CaCl ₂	kalcijev klorid
CAM	Crassulacean Acid Metabolism
Con A	konkanavalin A
DIG - GNA	lektin izoliran iz visibabe <i>Galanthus nivalis</i> L.
DMSO	dimetil sulfoksid
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazin
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EtOH	etanol
HCl	klorovodična kiselina
MeOH	metanol
MgCl ₂	magnezijev klorid
MS	hranidbena podloga, Murashige i Skoog 1962
PVP	polivinil pirolidon (netopivi, visokomolekularni)
SDS	natrijev dodecil sulfat
SDS-PAGE	poliakrilamid-gel elektroforeza uz dodatak SDS-a
TBK	tiobarbituratna kiselina
TBS	pufer koji sadrži 20mM Tris i 500mM NaCl, pH7.5
TEMED	tetrametiletildiamin
Tris	tris[hidroksimetil]aminometan
TTBS	pufer TBS koji sadrži 0,1% Tween 20(v/v)

SADRŽAJ

1	Uvod	6
1.1	CAM i kultura tkiva kaktusa	6
1.2	Biljke i abiotički stres	7
1.3	Protein ASR1 kao indikator solnog stresa	9
1.4	Oksidativni stres kao rezultat abiotičkog stresa	9
2	Cilj istraživanja	13
3	Materijali i metode	14
3.1	Materijali	14
3.1.1	Biljni materijal	14
3.1.2	Kemikalije, enzimi i ostali pripravci	16
3.1.3	Instrumenti i pribor	17
3.2	Metode	18
3.2.1	Uzgoj biljaka	18
3.2.2	Ekstrakcija ukupnih topivih proteina	18
3.2.3	Ekstrakcija kiselih topivih proteina	25
3.2.4	Prijenos proteina na membranu (Western blot)	27
3.2.5	Vizualizacija proteinskih vrpca	27
4	Rezultati	32
4.1	Analiza biokemijskih parametara i ekspresija enzima uključenih u antioksidativni odgovor	32
4.1.1	Udio MDA i protein karbonila	32
4.1.2	Aktivnost antioksidativnih enzima	34
4.2	Ekspresija ukupnih proteina u tkivu kaktusa nakon kratkotrajnog stresa	42

4.2.1	Elektroforetska analiza proteina i detekcija proteina ASR1.....	42
4.2.1	Detekcija fosforiliranih proteina	44
4.2.2	Detekcija glikoziliranih proteina.....	46
5	Rasprava	49
5.1	Kaktus <i>Mammillaria gracilis</i> Pfeiff. kao model za istraživanja utjecaja stresa na biljke.....	49
5.2	Aktivacija antioksidativnog sustava nakon izlaganja biljke stresnim uvjetima.....	50
5.3	Promjene u proteinskoj slici kiselih topivih proteina nakon izlaganja biljaka stresnim uvjetima 53	
6	Zaključak.....	56
7	Zahvale	57
8	Popis literature.....	58
	Sažetak.....	Error! Bookmark not defined.
9	Summary.....	Error! Bookmark not defined.

1 Uvod

1.1 CAM i kultura tkiva kaktusa

Kserofiti su biljke koje rastu i žive u vrlo suhim staništima, gdje su vlažnost zraka i dostupnost vode u tlu niski i ograničeni. Kaktusi su kserofiti Novog Svijeta. Zbog ovakvih životnih uvjeta kaktusi su razvili posebne anatomske prilagodbe: njihovi su listovi potpuno reducirani u obliku bodlji koje nemaju sposobnost fotosinteze, imaju smanjenu propusnost epiderme, a stabljike su im građene od posebne vrste tkiva koja nakupljaju vodu za vrijeme kratkih kišnih razdoblja (zbog čega ih ubrajamo u stabljične sukulente) – sve radi optimizacije zadržavanja vode u tkivima i smanjivanja transpiracije (Balen 2002).

Jedna od važnih ekofizioloških prilagodbi kaktusa na sušne uvjete jest CAM (Crassulacean Acid Metabolism) fotosinteza (Lüttge, 1993; Grams and Thiel, 2002), kod koje se fiksacija CO₂ u Calvinovom ciklusu događa preko noći (Lüttge, 1993; Dodd i sur., 2002). Biljke primaju CO₂ kroz puči. Otvaranjem puči tijekom noći, kada su temperature niže, bitno se smanjuje gubitak vode transpiracijom. Kao sukulente biljke s CAM metabolizmom, kaktusi su posebno osjetljivi na uvjete kulture tkiva za koju su karakteristična visoka vlažnost i bogata hranidbena podloga (Malda i sur., 1999). U okolišu koji je bogat vodom, njihove puči ostaju otvorene i tijekom dana; kao rezultat toga odvija se stimulirana fotosinteza, a fotorespiracija je intenzivnija (Krsnik-Rasol i Balen 2001).

Biljke kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff. uzgajane u uvjetima kulture tkiva razvijaju kalus bez dodatka ikakvih egzogenih regulatora rasta. Takav habituirani kalus, koji raste neovisno o dodavanju hormona rasta, spontano regenerira morfološki normalne i hiperhidrirane izdanke (Krsnik-Rasol i Balen 2001). Hiperhidriranost je fiziološki poremećaj koji često pogađa biljke uzgajane u uvjetima *in vitro* i povezan je sa smanjenom transpiracijom i prekomjernim

uzimanjem vode, što može smanjiti razinu kisika u tkivima na razinu blizu hipoksije (Gaspar i sur., 2000; Franck i sur., 2004). Može se pojaviti kao rezultat posebnih uvjeta u kulturi *in vitro* kao što su visoka vlažnost, visoke razine regulatora rasta, akumulacija plinova u atmosferi unutar posuda za uzgoj i intenzitet svjetla (George 1996). Hiperhidrirani izdanci kaktusa *M. gracilis* su prozirni, okruglasti te djelomično pokriveni mekanim bodljama koje rastu u nepravilnom uzorku, imaju veći sadržaj vode i smanjeni sadržaj klorofila. Anatomija ovih hiperhidriranih izdanaka je također promijenjena u vidu slabo razvijene stanične stijenke i degeneracije kloroplasta (Poljuha i sur., 2003). Habitucija i hiperhidriranost se smatraju neoplastičnim procesom koji kratkoročno dovodi do gubitka stanične diferencijacije i regenerativnih sposobnosti, a dugoročno do raka ili smrti biljke (Gaspar i sur., 2000). Kako bi se dobilo potpuno dediferencirano tumorsko tkivo kaktusa koje se može uspoređivati s habituiranim i hiperhidriranim kalusom korištenim u pokusima, stanice kaktusa transformirane su bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* (Krsnik-Rasol i Balen 2001).

Uvjeti u kulturi tkiva također mogu utjecati i modificirati rast tkiva i inducirati spontane prijelaze iz karakterističnog organiziranog oblika u neorganizirani kalus. Ovakav sustav, u kojem biljno tkivo karakterističnog organizacijskog uzorka može prijeći u neorganizirani rast, pokazao se pogodan za studije razvoja biljaka (Cassells i Curry 2001; Franck i sur., 2004; Saher i sur., 2004, 2005; Dewir i sur., 2006).

1.2 Biljke i abiotički stres

U današnjem svijetu, u kojem broj stanovnika raste iz dana u dan, potražnja za izvorima hrane, a time i za obradivim površinama, također raste. U konstantnom nedostatku obradivih površina, ljudi su prisiljeni proširiti kulture ekonomski iskoristivih biljaka na područja koja tim biljkama nisu prirodna i koja izazivaju različite vrste abiotičkog stresa. Takav stres uključuje

ekstremne varijacije u temperaturi, iradijaciji, neoptimalnim razinama minerala i nedostatak vode (Kalifa i Perlson 2004).

Biljke su razvile sposobnost prilagodbe kako bi preživjele stresne uvjete, u koje se ubraja i veliki broj fizioloških, biokemijskih i molekularnih promjena. Na primjer, izlaganje solnom ili osmotskom stresu rezultira masovnim promjenama u profilu genske ekspresije pod čijom su kontrolom višestruki stanični putevi. Geni kontrolirani stresom su kontrolna točka odgovora biljaka na stres (Bray 1997; Hasegawa i sur., 2000; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 2000). Genski reguliran odgovor na solni stres očituje se u gotovo svim aspektima biljnih funkcija i metabolizma, uključujući signalnu transdukciju, ionsku homeostazu, metabolizam ugljikohidrata i dušika, fotosintezu, rast i razvoj (Kalifa i sur., 2004). Poseban interes fokusiran je na proteine regulirane stresom koji se mogu podijeliti u dvije grupe: proteini koji su dio signalnog puta i proteini koji direktno igraju ulogu u preživljavanju biljke u stresnim uvjetima. Proteini prve grupe uključuju transkripcijske faktore, RNA–vezane proteine, protein-kinaze i fosfataze, molekule čija je aktivacija signal stanicama da su se uvjeti promijenili i da treba djelovati u smjeru smanjenja posljedica nastalih doživljenim šokom (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 2000; Rock 200; Xiong i Zhu 2001). Druga grupa uključuje proteine čija aktivnost omogućava biljci preživljavanje tih stresnih uvjeta u smislu direktnog smanjenja učinka koji stresori imaju na stanicu i uključuje proteine zadužene za ionsku homeostazu (Blumwald 2000), kanale za vodu (Johansson i sur., 2000), enzime uključene u razgradnju aktivnih kisikovih radikala (Bohnert i Sheveleva 1998) ili sintezu osmolita (Hare 1998; Bohnert i Shen 1999) te zaštitne proteine (Hasegawa i sur., 2000). Razumijevanje molekularnih detalja biljnog odgovora na stres ovisi o razjašnjavanju biološke aktivnosti ovih proteina te njihove interakcije s drugim staničnim komponentama, kao i o dešifriranju puteva u kojima ti proteini djeluju. Takvo znanje će pomoći u razvoju transgeničnih biljaka s povećanom tolerancijom na solni i osmotski stres, što će definitivno imati veliki utjecaj

na olakšanu kultivaciju biljaka na novim staništima i poboljšanje produktivnosti biljaka na već postojećim staništima (Kalifa i Zaccai 2004).

1.3 Protein ASR1 kao indikator solnog stresa

Naziv gena *Asr1* je skraćena od „*abscisic acid stress ripening*“ što u prijevodu znači „zoridba potaknuta stresom izazvanim abscizinskom kiselinom“ (ABA). Taj gen kodira za visokonabijeni protein male molekulske mase od 13 kDa, sa Zn^{2+} -ovisnom, sekvencno-specifičnom DNA-veznom aktivnosti. ASR1 je protein specifičan za biljke i nije zabilježen njegov homolog kod drugih organizama (Kalifa i sur., 2004).

Kod proučavanja biljaka u stresnim uvjetima, ASR1 se pokazao kao dobar indikator abiotičkog, naročito solnog stresa. Naime, u korjenju i izdancima rajčice pronađene su niske razine *Asr1* mRNA (Amitai-Zeigerson, Scolnik i Bar-Zvi 1995). Nakon tretmana biljaka s NaCl-om, polietilen glikolom (PEG) ili ABA-om, razine ASR1 su se povećale (Amitai-Zeigerson i sur., 1995). Pojačana ekspresija ovog proteina također je opažena u korijenju kukuruza koji je uzgajan u uvjetima solnog stresa (Wang i sur., 2003) dok je visoka ekspresija opažena za homologe proteina ASR1 u riži nakon 3 i 6 sati izlaganja biljaka prekomjernim koncentracijama soli (Kawasaki i sur. 2001).

Također se čini da je ekspresija *Asr1* razvojno regulirana tako da se razina *Asr1* mRNA povećava tijekom zoridbe voća (Iusem i sur., 1993).

1.4 Oksidativni stres kao rezultat abiotičkog stresa

Uz sva tehnološka dostignuća, salinitet i suša su i dalje glavni abiotički faktori stresa koji utječu na rast i produktivnost agrikultura širom svijeta. Vrlo često su salinitet i suša okolišni uzročnici stresa koji su međusobno povezani (Kalifa i Perlson 2004). Također, dostupnost slatke vode postaje sve veći problem danas u svijetu pa se sve više pribjegava upotrebi slane vode u

poljoprivredi (Murillo-Amador 2001). Prekomjerna koncentracija soli u tlu uzrokuje nakupljanje soli u korijenju biljaka (Schuch i Kelly 2008).

Danas se smatra da je salinitet jedan od glavnih faktora ograničavanja rasta, razvoja i produktivnosti biljaka, posebno važnih žitarica (McWilliam 1986). Solni stres uzrokuje inhibiciju rasta biljke preko redukcije u dostupnosti vode, akumulaciji iona natrija i neravnoteži minerala, što dovodi do uništavanja biljke na staničnoj i molekularnoj razini u vidu razaranja proteina, membranskih lipida, nukleinskih kiselina i klorofila (Silva-Ortega i sur., 2008).

Jedan od načina razaranja stanica je putem aktivnih kisikovih radikala (*reactive oxygen species* - ROS), čija se razina u stanici povećava djelovanjem solnog stresa. ROS su veoma reaktivne molekule koje oksidiraju većinu molekula u stanici i na taj način smanjuju ili potpuno uništavaju njihovu funkciju. Nastaju kao posljedica aerobnog načina života i to parcijalnom redukcijom kisika u stanici (Foyer i Noctor, 2001; Vranova i sur., 2002). Ako se razina ROS-a neznatno poveća, uključuje se antioksidativni sustav koji ih učinkovito razgrađuje, ali kada stanica izgubi kontrolu nad njihovim stvaranjem i razgradnjom, nastupaju velika stanična oštećenja. Biljke stoga posjeduju veoma učinkovit antioksidativni sustav koji se brine o regulaciji razine ROS-a u stanicama (Cassells i Curry 2001).

Neki od enzima uključenih u antioksidativni odgovor i odgovornih za razgradnju ROS-a redom su:

- Peroksidaze (PPX EC 1.11.1.7) – pripadaju velikoj porodici enzima oksidoreduktaza koje generalno kataliziraju razgradnju H_2O_2 uz nastanak vode. Najčešće su hemoproteini i nalaze se u mnogim staničnim odjeljcima: vakuoli, Golgijevom tijelu, endoplazmatskom retikulumu, mitohondrijima, staničnoj stijenci kao i u izvanstaničnim prostorima. Imaju veliki broj supstrata, a mi smo aktivnost peroksidaze proučavali primjenom supstrata pirogalola.

- Askorbat peroksidaza (APX EC 1.11.1.11) – ovaj hemoprotein detoksificira perokside (kao npr H_2O_2) pomoću askorbata u reakciji u kojoj nastaje dehidrogen askorbat. Dio je glutation-askorbatnog ciklusa koji djeluje u citosolu, mitohondrijima, plastidima i peroksisomima.
- Katalaza (CAT EC 1.11.1.6) – spada u hemoproteine i nalazi se u gotovo svim živim organizmima koji su izloženi kisiku gdje razgrađuje vodikov peroksid (H_2O_2) na kisik i vodu; nalazi se u organelima koji se zovu peroksisomi.
- Esteraze – u njih spada širok spektar enzima, a svima im je zajedničko da cijepaju estere na kiseline i alkohole pomoću vode u reakciji koja se zove hidroliza. Mi smo proučavali arilesteraze (EC 3.1.1.2) i karboksilesteraze (EC 3.1.1.1) čiji su supstrati 1- i 2-naftilacetat. Ne ubrajaju se u antioksidativne enzime, ali zbog visoke aktivnosti i velikog broja izoenzima u tkivima kaktusa (Balen i sur., 2003), izabrali smo ih kao jedan od parametara kod istraživanja solnog i osmotskog stresa.

Tijekom djelovanja osmotskog stresa, omjeri ROS-a i antioksidativnih enzima u stanici se poremete i eventualna akumulacija ROS-a do visokih, toksičnih koncentracija rezultira staničnom smrću (Saher i sur., 2005). Mnoge studije ukazuju na to da je stečena tolerancija na solni stres posljedica poboljšane otpornosti na oksidativni stres (Hernandez i sur., 1993, 1995, 1999, 2000, 2001; Shalata 1998; Gosset i sur., 1996; Gueta-Dahan i sur., 1997; Gomez i sur., 1999; Bor i sur., 2003) i u većini navedenih studija se vidi korelacija između otpornosti na solni stres i učinkovitijeg antioksidativnog sustava (Olmos i sur., 1994, Piqueras i sur., 1996; Hernandez i sur., 1993; Gomez i sur., 1999; Mitova i sur., 2000). Sposobnost biljaka da povećaju aktivnost antioksidativnih enzima utječe na njihovu relativnu toleranciju na abiotički stres (Bowler i sur., 1992).

Šteta prouzročena oksidativnim stresom može utjecati na fiziološku, epigenetsku i genetičku varijabilnost biljaka propagiranih *in vitro* (Mangolin i sur., 1997; Gribble 1999; Cassells i Curry 2001). Razvojni događaji uzrokovani promjenama u genskoj ekspresiji mogu se predvidjeti proučavanjem elektroforetske slike proteina i izoenzimskih uzoraka (Balen i sur., 2003).

2 Cilj istraživanja

Svrha ovog istraživanja bila je utvrditi tolerantnost kalusnog i tumorskog tkiva kaktusa *M. gracilis*, uzgajanog u uvjetima kulture tkiva, na solni i osmotski stres. Ispitivanjem različitih biokemijskih parametara željeli smo istražiti kako različite koncentracije natrijevog klorida i manitola, koje smo primijenili kao uzročnike solnog i osmotskog stresa, utječu na aktivnost antioksidativnog sustava kaktusa uspoređivanjem aktivnosti nekoliko antioksidativnih enzima za koje se smatra da su dio odgovora biljaka na stresne uvjete i uspoređivanjem uzoraka njihovih izoenzima. Ispitivanjem molekularnih parametara, ekspresije i posttranslacijskih modifikacija kiselih proteina, posebice proteina ASR1, željeli smo saznati na koji se način mijenja ekspresija gena uključenih u odgovor biljke na izlaganje stresnim uvjetima.

3 Materijali i metode

3.1 Materijali

3.1.1 Biljni materijal

U istraživanju smo koristili vrstu *Mammillaria gracilis* Pfeiff. iz porodice *Cactaceae*, koja je uzgajana u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za izolaciju ukupnih topivih proteina korišteno je svježe kalusno i tumorsko tkivo, uzgajano na osnovnoj hranidbenoj podlozi prema Murashige i Skoog (1962) (u daljnjem tekstu označene MS), bez dodataka regulatora rasta i uz dodavanje organskih dodataka.

3.1.1.1 Podloga

Za uzgoj tkiva kakusa *in vitro* korištenog u pokusima koristili smo podloge MS, pH 5.8 sastava prikazanog u Tablici 1.

Tikvice u koje smo razlijevali podloge prvo smo stavili u sušionik radi sterilizacije. Skuhali smo podloge prema uputama u Tablici 1 i razlili u tikvice. Nakon toga smo dodali različite količine natrijevog klorida (NaCl) i manitola kako bi postigli sljedeće koncentracije: 75 mM, 250 mM i 350 mM NaCl te 150 mM, 500 mM i 700 mM manitol, nakon čega smo uskladili pH na 5,8 dodatkom 1,0 mM KOH. Zatim smo podloge razlili u tikvice ili petrijeve posudice. Za pripremu krutih podloga u podlogu MS dodavali smo 0,8% agar (w/v). Tikvice smo začepili vatom i prekrili aluminijskom folijom i skupa sa priborom za nasađivanje sterilizirali u autoklavu na temperaturi od 121 °C i tlaku 150 kPa u trajanju od 18 minuta.

Kulture smo presađivali u aseptičkim uvjetima u komori s horizontalnim strujanjem sterilnog zraka.

Tablica 1. Sastav hranidbene podloge MS.

MS		
MAKROELEMENTI	mg/L	mM
KNO ₃	1900	18,80
NH ₄ NO ₃	1650	20,60
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440	2,99
KH ₂ PO ₄	170	1,25
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370	1,5
MIKROELEMENTI	mg/L	mM
H ₃ BO ₃	6,20	0,100317
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025	0,000105
KI	0,83	0,005
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25	0,0010332
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025	0,0001001
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	16,90	0,077
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,80	0,0999944
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	37,30	0,099671
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,60	0,0299068
ORGANSKI DODACI	mg/L	mM
Tiamin-HCl (vitamin B1)	0,10	0,000331
Piridoksin-HCl (vitamin B6)	0,50	0,002431
Nikotinska kiselina	0,50	0,0040614
OSTALI DODACI	g/L	mM
Mioinozitol	0,10	0,5550621
Glicin	0,002	0,0266418
Agar	8,00	
Saharoza	30,00	87,642418

3.1.2 Kemikalije, enzimi i ostali pripravci

1-naftilacetat (*Sigma*, USA), 3,3'-DAB (*Sigma*, USA), β -merkaptoetanol (*Sigma*, USA), aceton (*Kemika*, Hrvatska), acetonitril (*J.T.Bauer*, USA), agar (*Sigma*, USA), AgNO_3 (*Kemika*, Hrvatska), akrilamid (*Sigma*, USA), APS (*Gram-Mol*, Hrvatska), askorbinska kiselina (*Kemika*, Hrvatska), BCIP/NBT (*Roche*, Njemačka), bisakrilamid (*Sigma*, USA), bromfenol-plavilo (*Sigma*, USA), $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (*Kemika*, Hrvatska), Comassie Brilliant Blue (*Sigma*, USA), $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (*Kemika*, Hrvatska), concanavalin A (*Sigma*, USA), $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (*Kemika*, Hrvatska), DIG-GNA (*Roche*, Njemačka), DMSO (*Sigma*, USA), DNPH (*Aldrich*, Njemačka), EDTA (*Kemika*, Hrvatska), etanol (*Kemika*, Hrvatska), etilacetat (*Sigma*, USA), $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (*Kemika*, Hrvatska), formaldehid (*Kemika*, Hrvatska), glicin (*Sigma*, USA), H_2SO_4 (*Kemika*, Hrvatska), H_3BO_3 (*Kemika*, Hrvatska), HCl (*Kemika*, Hrvatska), K_2HPO_4 (*Kemika*, Hrvatska), kalcijev klorid (*Kemika*, Hrvatska), KH_2PO_4 (*Kemika*, Hrvatska), KI (*Kemika*, Hrvatska), KNO_3 (*Kemika*, Hrvatska), magnezijev klorid (*Kemika*, Hrvatska), manitol (*Kemika*, Hrvatska), metanol (*Kemika*, Hrvatska), $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (*Kemika*, Hrvatska), $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (*Kemika*, Hrvatska), mioinozitol (*Kemika*, Hrvatska), mlijeko u prahu (*Dukat*, Hrvatska), $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (*Kemika*, Hrvatska), Na_2CO_3 (*Kemika*, Hrvatska), Na_2EDTA (*Kemika*, Hrvatska), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (*Kemika*, Hrvatska), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (*Kemika*, Hrvatska), NaCl (*Kemika*, Hrvatska), natrijev acetat (*Kemika*, Hrvatska), NH_4NO_3 (*Kemika*, Hrvatska), nikotinska kiselina (*Kemika*, Hrvatska), octena kiselina (*Kemika*, Hrvatska), peroksidaza (*Sigma*, USA), pirogalol (*Sigma*, USA), H_2PO_4 (*Kemika*, Hrvatska), protutijelo antiASR (*Department of life sciences*, Ben-Gurion University, Izrael), Pro Q Diamond (*Invitrogen*, USA), Pro Q Emerald 488 (*Invitrogen*, USA), PVP (*Sigma*, USA), Rouge Ponceau S (*Roche*, Njemačka), saharoza (*Kemika*, Hrvatska), SDS (*Sigma*, USA), TCA (*Kemika*, Hrvatska), tekući dušik (*Mess*, Hrvatska), TEMED (*Sigma*, USA), tiamin·HCl (*Kemika*, Hrvatska), Tris (*Sigma*, USA), TWEEN 20 (*Sigma*, USA), urea (*Fluka*,

Belgija), vitamin B1 (*Kemika*, Hrvatska), vitamin B6 (*Kemika*, Hrvatska), vodikov peroksid (*Kemika*, Hrvatska), $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (*Kemika*, Hrvatska).

Radi određivanja profila ukupnih topivih i kiselih proteina i sastava izoenzima koristili smo biljege molekulskih masa iz kita Unstained protein molecular weight, *Fermentas*, Kanada.

3.1.3 Instrumenti i pribor

Autoklav (*Astell scientific*, Velika Britanija); centrifuga Eppendorf (model 5417R, *Eppendorf*, Njemačka); centrifuga Sorwall (model RC-5B refrigerated superspeed centrifuge, *Sorwall*, USA); ultrazvučna kupelj (*Bandelin*, Sonorex); vortex (model MS3 BASIC *IKA*, USA); termomixer (*Eppendorf*, Njemačka); uređaji za elektroforezu (modeli MINI PROTEAN II, PROTEAN II, *BioRad*, USA); power supply (model POWERPAC; *BioRad*, USA); spektrofotometar (model UV/VIS, *Unicam*, Engleska); pH metar (*Sartorius*, Njemačka); membrane za prijenos (veličine pora 0,2 μm , *BioRad*, USA); električna miješalica/grijalica (*Schott Instruments*, Njemačka); hamilton igla (*Hamilton*, USA); liofilizator (model Alpha 1-2 LD, *Christ*, Osterode, Germany); pipete i njihovi nastavci (*Eppendorf*, Njemačka).

3.2 Metode

3.2.1 Uzgoj biljaka

Kalusno i tumorsko tkivo kaktusa nasadili smo na pripremljene podloge MS i ostavili ih da rastu u klima komori na temperaturi od 24 ± 2 °C pod umjetnom rasvjetom fluorescentnih svjetiljki ($90 \mu\text{Es}^{-1} \text{m}^{-2}$). Kontrolna tkiva rasla su na podlogama istog temeljnog sastava ali bez dodatka NaCl-a ili manitola. U pokusima s kratkotrajnim stresom koristili smo tekuće podloge MS s koncentracijom NaCl-a od 250 mM i manitola 500 mM, a tkivo je uzgajano na tresilicama. Kod dugotrajnog stresa koristili smo krute podloge MS s koncentracijama NaCl-a od 75 mM, 250 mM i 350 mM te manitola 150 mM, 500 mM i 700 mM.

3.2.2 Ekstrakcija ukupnih topivih proteina

Jedan dan prije ekstrakcije svježe tkivo smo stavili na liofilizaciju (24 h pri temperaturi od -64 °C i tlaku od 0,025 mbara) kako bi se sublimacijom i desorpcijom iz njega uklonila voda. Liofilizirano tkivo vagali smo tako da mase replika variraju između 0,0900 i 0,0920 g. Replike smo homogenirali u dobro ohlađenom tarioniku uz dodavanje tekućeg dušika. Čim se tkivo smrznulo, dodali smo PVP (kao zaštitu proteina od raznih oksidaza u stanici) i 2 mL hladnog (0-4 °C) 1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 pripremljenog prema Tablici 2. Ekstrakte smo zatim centrifugirali 15 minuta na 20800 g i +4 °C. Supernatant smo prebacili u čiste tubice i ponovno centrifugirali 1 h na 20800 g i +4 °C. Dobivene supernatante smo čuvali na -20 °C i koristili za mjerenja.

Tablica 2. Sastav 1M kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 (čuva se na +4 °C).

1M KALIJ-FOSFATNI PUFER – 50 mL, pH 7.0	
1 M KH ₂ PO ₄	1,925 mL
1 M K ₂ HPO ₄	3,075 mL
10 mM EDTA	500 µL
Askorbinska kiselina	44 mg
reH ₂ O	Do 50 mL

3.2.2.1 Određivanje koncentracije proteina u ekstraktima ukupnih topivih proteina

Supernatant dobiven ekstrakcijom u 1 M kalij-fosfatnom puferu korišten je kao sirovi ekstrakt u kojem smo određivali koncentraciju proteina metodom po Bradfordu (1976). Ova metoda temelji se na mjerenju apsorbancije smjese proteinskog ekstrakta i reagensa (Bradford radna otopina) pri valnoj duljini 595 nm. U 1 mL radne otopine Bradford (Tablica 3.) dodali smo 20 µL uzorka sirovog ekstrakta. Koncentraciju proteina u svakom uzorku odredili smo očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina serumskog goveđeg albumina poznatih koncentracija (od 0,0 mg/mL do 1,6 mg/mL).

Tablica 3. Sastav Bradford radne otopine

BRADFORD RADNA OTOPINA, 500mL	
95% Etanol	15 mL
88% H ₃ PO ₄	30 mL
Bradford stock otopina	30 mL
Re H ₂ O	425 mL
BRADFORD STOCK OTOPINA, 650mL	
96% etanol	100 mL
88% H ₃ PO ₄	200 mL
CBB G 250	350 mg

3.2.2.2 Određivanje sadržaja malondialdehida i protein karbonila

Sadržaj malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, određivali smo miješanjem 200 μL supernatanta sa 1300 μL reakcijske smjese (0,25% tiobarbiturna kiselina otopljena u 10%-tnoj trikloroctenoj kiselini). Kao slijepu probu koristili smo 1,5 mL reakcijske smjese. Zagrijavali smo ih u termomikseru 30 min na 95 °C i zatim naglo ohladili na ledu (5 min) te centrifugirali 10 min na 10 000 g. Nakon toga slijedilo je očitavanje apsorbancije na 532 te na 600 nm zbog korekcije na nespecifično замуćenje (Heath i Packer, 1968). Tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica stresa pri čemu nastaje malondialdehid (MDA). Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA, a time se stvara crvenkasti kromogen kojemu se mjeri apsorbancija. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao MDA u jedinicama $\text{nmol/g}_{\text{sv. t}}$ uz ekstinkcijski koeficijent $\epsilon_{532} = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Sadržaj karbonila temelji se na reakciji karbonilnih skupina s DNPH, a određivali smo ga spektrofotometrijskim mjerenjem otopljenih uzoraka na valnoj duljini od 370 nm (Levine i sur., 1990). Po 200 μL supernatanta pomiješali smo s 300 μL dinitrofenilhidrazina (DNPH) u 2 M HCl za cijepanje proteina. Kao slijepu probu koristili smo alikvot istog uzorka (200 μL) pomiješan samo s 2 M HCl-om (300 μL). Pripremljene uzorke inkubirali smo 1 sat na sobnoj temperaturi u mraku (promiješali smo ih nakon 30 minuta). Nakon inkubacije je slijedila precipitacija proteina s 500 μL 10% trikloroctene kiseline (TCA), zatim su se par minuta uzorci hladili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ te smo ih centrifugirali 10 minuta na 15 300 g. Dobiveni talog smo ispirali smjesom etanola i etilacetata u omjeru 1:1 (2 x 500 μL) da bi se uklonilo nevezani reagens. Zatim smo talog otapali u 1 mL 6 M otopine uree u 20 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 2,4).

$$\text{KARBONILI} = \frac{A \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times \epsilon \times l} ; \text{ [}\mu\text{M/ml]}$$

$$\text{KARBONILI/ g} = \frac{\text{KARB} \times 1000}{m \text{ (g) / 1 ml}}$$

$V_{r.s.}$ = volumen reakcijske smjese = 1 mL

F.R. = faktor razrjeđenja = 1

$V_{uzor.}$ = volumen uzorka = 1 mL

ϵ = ekstincijski koeficijent = 22 mM⁻¹cm⁻¹

l = duljina optičkog puta = 1 cm

3.2.2.3 Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima

Za mjerenje aktivnosti pirogalol peroksidaze (PPX) koristili smo reakcijsku otopinu po Chanceu i Maehlyu (1955) koja sadrži 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0), 20 mM pirogalola i 1 mM H₂O₂ kojeg smo dodali neposredno prije mjerenja. Na 990 μ L otopine dodali smo 10 μ L uzorka i mjerili porast apsorbancije svakih 15 s tijekom 2,5 min pri valnoj duljini od 430 nm. Aktivnost PPX je izražena kao količina nastalih produkata u μ mol po minuti po miligramu proteina koristeći $\epsilon_{430} = 2,47 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Kao reakcijsku otopinu za askorbat peroksidazu (APX) koristili smo otopinu po Nakanu i Asadi (1981) koja je sadržavala 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7,0), 0,5 mM askorbinsku kiselinu, 0,1 mM EDTA i 12 mM H₂O₂. Vodikov peroksid (10 μ L) dodali smo u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Na 860 μ L ove otopine dodali smo 120 μ L supernatanta i mjerili pad apsorbancije zbog oksidacije askorbinske kiseline svaku sekundu tijekom 15 sekundi pri valnoj

duljini od 290 nm. Aktivnost APX je izračunata na isti način kao i aktivnost CAT, no uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Za mjerenje aktivnosti katalaze (CAT) koristili smo reakcijsku otopinu koja sadrži 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7,0) i 10 mM H_2O_2 (Aebi, 1984). Na 970 μL otopine dodali smo 30 μL sirovog ekstrakta i mjerili pad apsorbancije svakih 10 sekundi tijekom 2 minute pri valnoj duljini od 240 nm. Aktivnost katalaze je izražena kao jedinica aktivnosti po miligramu proteina ($U = \mu\text{mol}/\text{min g sv.t}$):

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A_{sv} \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times \epsilon \times l} \quad \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min ml}} \right]$$

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A \times \mu\text{mol} \times \text{min} \times \text{ml}}{m \text{ (g)}} \quad \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min g}_{sv.t}} \right]$$

$$\lambda = 240 \text{ nm}$$

ΔA_{sv} = srednja vrijednost promjene aporbancije u zadanom vremenu mjerenja

$V_{r.s.}$ = volumen reakcijske smjese

F.R. = faktor razrjeđenja uzorka

$V_{uzor.}$ = volumen uzorka

$$\Sigma_{240} = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

l = duljina optičkog puta (1 cm)

m = masa svježe tvari

Specifična aktivnost katalaze:

$$\text{CAT} = \frac{\text{aktivnost katalaze} \left[\frac{\Delta A \mu\text{mol}}{\text{min g}_{sv.t.}} \right]}{\text{sadržaj proteina} \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}_{sv.t.}} \right]}$$

Reakcijska otopina za mjerenje aktivnosti esteraza (EST) pripremljena je prema metodi koju su opisali Burlina i Galzigna (1972.) i sadržavala je 100 mL 100mM Tris/HCl-a pH 7,4 i 10 mM 1-naftilacetata otopljenog u 10 mL metanola. Na 950 μ L Tris-HCl dodali smo 30 μ L supstrata (1-naftilacetat) i 150 μ L supernatanta. Aktivnost je mjerena svakih 15 sec tokom 3 min. Ekstinkcijski koeficijent za esteraze je $\epsilon_{322} = 2,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2.2.4 Priprema uzoraka za elektroforezu

Prije razdvajanja izoenzima, u supernatant smo dodali kap mješavine bromfenol plavog i saharoze kako bi mogli pratiti tijek elektroforeze i kako bi nam uzorci otežali i time bolje pali na dno jažica.

3.2.2.5 Elektroforeza ukupnih topivih proteina u nativnim uvjetima

Ukupne topive proteine razdvajali smo vertikalnom diskontinuiranom poliakrilamid-gel elektroforezom (Laemmli, 1970, Tablica 4), u nativnim uvjetima uz dodatak elektrodnog pufera (Tablica 5) pod konstantnim naponom od 100V prvih 45 min (kako bi se uzorci koncentrirali u gornjem gelu za sabijanje) a ostatak na 220V, na temperaturi od +4 °C uz kontinuirano hlađenje vodom. Na gelove smo nanosili oko 70 μ L uzorka po jažici.

Tablica 4. Sastav gela za elektroforezu u nativnim uvjetima

	GEL ZA RAZDVAJANJE (10%)	GEL ZA SABIJANJE(4%)
Re H ₂ O	16.8 mL	6,1 mL
Tris-HCl	1,5 M; pH 8,8; 10 mL	0,5 M; pH 6,8; 2,5 mL
AA/Bis (30%: 29,2 g AA, 0,8 g Bis, re H ₂ O do 100 ml)	13,2 mL	1,3 mL
10% APS	200 μ L	50 μ L
TEMED	20 μ L	10 μ L

Tablica 5. Sastav elektrodnog pufera koncentriranog 10 puta

ELEKTRODNI PUFER KONCENTRIRAN 10 PUTA, 1L	
Tris	30g(0,24 M)
Glicin	144g(1,9182 M)
pH	8,3
Re H ₂ O	1 L

3.2.2.6 Određivanje aktivnosti enzima u gelu

Za otkrivanje izoenzima PPX, gelove smo prvo inkubirali u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 , 30 min. Zatim smo koristili otopinu koja je sadržavala 20 mM pirogolol i 4 mM H₂O₂ u 50 mM kalij fosfatnom puferu pH vrijednosti 7,0 (Siegel i Galston 1967). Nakon 5-10 minuta pojavile su se smeđe pruge koje predstavljaju položaj izoenzima peroksidaze u gelu.

Za detekciju izoformi APX gelove smo inkubirali 30 min (3 x 10 min) u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala 20 mM askorbinsku kiselinu u 50 mM kalij fosfatnom puferu pH 7,0. Gelove smo zatim inkubirali 20 min u istom puferu koji je sadržavao 4 mM askorbinsku kiselinu i 2 mM H₂O₂ nakon čega smo ih isprali 1 min u 50 mM kalij fosfatnom puferu pH 7,0. Izoforme APX su se pojavile kao akromatske pruge na plavoljubičastoj podlozi nakon bojanja u otopini koja je sadržavala 2,45 mM kloridnu sol nitrotetrazolijum plavila (NBT) i 28 mM TEMED u 50 mM kalij fosfatnom puferu pH 7,8. (Mittler i Zilinskas, 1993).

Otkrivanje izoenzima CAT izveli smo prema metodi Woodbury i sur., 1971. Nakon tri ispiranja od po 15 min u deH₂O gelove smo inkubirali 10 min u otopini 5 mM H₂O₂. Nakon kratkog ispiranja gelove smo inkubirali u otopini 1%-tnog (w/v) željeznog klorida i 1%-tnog (w/v) kalijevog fericijanida u deH₂O. Izoenzimi CAT su se pojavili kao žute vrpce na tamnozelenoj podlozi.

Identifikaciju izoenzima EST izveli smo najprije inkubiranjem gelova 30 min u otopini koja je sadržavala po 40 mg 1- i 2-naftilacetata otopljenih u smjesi 8 mL 50% acetona (v/v) i 100 mL 50 mM Tris-HCl pufera pH 7,1. Nakon toga smo gelove isprali u vodovodnoj vodi i inkubirali ih u otopini koja se sastojala od 200 mg boje Fast Blue RR salt otopljene u 10 mL metanola i profiltrirane u 100 mL 50 mM Tris-HCl pufera pH 7,1, do pojavljivanja smeđeružičastih vrpca (Balen i sur., 2003).

3.2.2.7 Obrada podataka

Podatke smo obrađivali koristeći one way ANOVA analizu i post-hoc LSD test za usporedbu razlike medijana između dviju grupana na razini značajnosti $p \leq 0,05$. Test smo provodili pomoću programa Excel (*Microsoft*) i STATISTICA (*StatSoft*).

3.2.3 Ekstrakcija kiselih topivih proteina

Približno 2 g tkiva homogenirali smo u tarioniku uz dodatak tekućeg dušika dok nismo dobili prah. Nakon toga smo dodavali 8 mL 250 mM H_2SO_4 u 2 obroka od 4 mL i još kratko homogenirali. Ekstrakt smo centrifugirali 15 min na 15300 g, odpipetirali supernatant i spremili na $-20^\circ C$.

Proteine smo precipitirali pomoću 100% triklor octene kiseline (TCA) koju smo dodavali u supernatant u omjeru 1:3 (500 μL TCA u 1500 μL supernatanta). Smjesu smo ostavljali preko noći na $+4^\circ C$ kako bi se proteini dobro precipitirali.

3.2.3.1 Priprema uzoraka za elektroforezu

Precipitirane proteine centrifugirali smo 20 min na 15300 g na $+4^\circ C$, nakon čega smo supernatant uklonili pipetom i bacili. Talog smo ispirali acetonom ohlađenim na $-20^\circ C$, vorteksirali te ponovo centrifugirali 20 min na 15300 g na $+4^\circ C$. Ispiranje smo ponavljali 3 puta. Nakon zadnjeg ispiranja ostavili smo talog da se kratko osuši na zraku (da aceton ispari) te ga

otopili u 50 μL pufera za denaturaciju (Tablica 6), vorteksirali i otapali u ultrazvučnoj kupelji 5 min. Uzorke smo denaturirali u termomikseru 6 min na 96 $^{\circ}\text{C}$ i 300 rpm, nakon čega su bili spremni za elektroforezu.

Tablica 6. Sastav pufera za denaturaciju (čuva se na +4 $^{\circ}\text{C}$).

SAMPLE BUFFER, 25 mL	
Glicerol	6 mL
β -merkaptioetanol	1,5 mL
20%SDS	7,5 mL
4xTris, pH 6,8	9,375 mL
Bromfenol-blue	0,4 mL
reH ₂ O	do 25 mL

3.2.3.2 Elektroforeza kiselih topivih proteina malih molekulskih masa u denaturirajućim uvjetima

Ukupne kisele proteine razdvajali smo vertikalnom diskontinuiranom poliakrilamid-gel elektroforezom (Laemmli, 1970, Tablica 7) u denaturirajućim uvjetima uz dodatak elektrodnog pufera za razdvajanje kiselih proteina malih molekulskih masa (Tablica 8) i u konstantnom strujnom polju od 100V.

Tablica 7. Sastav gela za MINI PROTEAN II

	GEL ZA RAZDVAJANJE	GEL ZA SABIJANJE
Re H ₂ O	850 μL	1,80 mL
Tris-HCl, pH 8,8	5,0 mL	2,50 mL
AA/Bis (30%)	4,0 mL	665 μL
10% SDS	100 μL	50 μL
10% APS	50 μL	35 μL
TEMED	5 μL	8 μL

Tablica 8. Sastav elektrodnog pufera za razdvajanje kiselih proteina malih molekulskih masa koncentriranog 10 puta

ELEKTRODNI PUFER KONCENTRIRAN 10 PUTA, 1L	
Tris	48 g
Glicin	114 g
SDS	10 g
pH	8,3
Re H ₂ O	do 1 L

3.2.4 Prijenos proteina na membranu (Western blot)

Nakon elektroforeze gelove smo složili u sendvič za prijenos proteina na nitroceluloznu membranu. Iz sendviča smo prethodno dobro istisnuli zrak kako ne bi smetao proteinima da se prenesu. Prijenos je trajao 60 min pod stalnim naponom od 60V uz dodatak pufera za prijenos (Tablica 9). Nakon prijenosa, membrane smo tretirali na jedan od načina opisanih u poglavlju vizualizacija proteinskih vrpca.

Tablica 9. Sastav pufera za prijenos

PUFER ZA PRIJENOS	
Tris	25 mM
Glicin	192 mM
Metanol	10% (v/v)
pH	8,3

3.2.5 Vizualizacija proteinskih vrpca

Ukupne stanične proteine vizualizirali smo prema dolje navedenim protokolima.

3.2.5.1 Bojanje vrpce srebrovim nitratom

Gelove smo nakon elektroforeze inkubirali preko noći na +4 °C u fiksativu (otopina 50% metanola (v/v) i 12% octene kiseline (v/v) u koju smo dodali 0,5 mL 37% formaldehida (HCOH) na 1L fiksativa). Nakon fiksiranja gelove smo ispirali 3x10 min u 15 mL 50% etanola, te ih inkubirali 1 min u 0,805 mM Na₂S₂O₃ x 5H₂O, te zatim ispirali 3x20 sec u deH₂O. Gelove smo impregnirali 20 min u otopini 11,77 mM AgNO₃ i 37 % HCOH (75 µL/ 100 mL otopine) , ponovno ispirali 3x20 sec u deH₂O i razvijali u otopini koja je sadržavala 0,2417 mM Na₂S₂O₃ x 5H₂O, 37 % HCOH (50 µL/100 mL otopine) i 0,805 mM Na₂CO₃ dok se nisu pojavile vrpce. Razvijanje smo zaustavljali otopinom koja je sadržavala 50% metanola i 12% octene kiseline (v/v).

3.2.5.2 Vizualizacija proteina primjenom protutijela za protein ASR1

Nakon prijenosa proteina membrane smo tretirali bojom Rouge Ponceau S 2 min kako bi provjerili uspješnost prijenosa i označili biljege molekulskih masa koje smo ucrtali grafitnom olovkom. Nakon toga odbojavali smo kratko svaku membranu u 20 mL TBS pufera (Tablica 10.) 3-4 puta dok se boja nije potpuno isprala. Zatim smo membrane inkubirali 60 min u 30 mL otopine A (Tablica 11.) i nakon toga ostavljali membrane preko noći na +4 °C da se inkubiraju u primarnom protutijelu (protutijelo ASR1) otopljenom u otopini A. Idući dan membrane smo ispirali 4x10 min u 20 mL otopine A nakon čega je slijedila inkubacija 60 min u sekundarnom protutijelu (anti zečji IgG). Sekundarno protutijelo ispirali smo prvo 2x10 min u 20 mL otopine B (Tablica 11.) i zatim 2 x 10 min u 20 mL otopine C (Tablica 11). Vrpce smo vizualizirali u mraku (zbog osjetljivosti supstrata za alkalnu fosfatazu, BCIP/NBT, na svjetlo) oko 5 min u 5 mL otopine C u koju smo dodali 100 µL supstrata BCIP/NBT, isprali u vodovodnoj vodi i stavili na sušenje.

Tablica 10. Sastav TBS pufera koncentriranog 10 puta

TBS pufer koncentriran 10 puta	
Tris	20 mM
NaCl	500 mM
pH	7,5

Tablica 11. Sastav otopina A, B i C

Otopina A	
TBS	do 500 mL
Tween 20	0,500 mL
Mlijeko u prahu	12 g
Otopina B (priprema se neposredno prije upotrebe)	
TBS	do 50 mL
Tween 20	0,050 mL
Otopina C	
Tris-HCl	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5 mM
pH	9,5
Re H ₂ O	do 500 mL

3.2.5.3 Bojanje vrpce bojom Pro Q Diamond

Gelove smo nakon elektroforeze stavljali u plastične posude i inkubirali u 50 mL fiksativa (50% metanol (v/v) i 10% octena kiselina (v/v)) prvo 30 min, a zatim preko noći na mješalici na sobnoj temperaturi. Idući dan smo ih ispirali 3 x 10 min u 50 mL reH₂O nakon čega smo ih inkubirali 90 min u 50 mL boje Pro Q Diamond u posudi zamotanoj u foliju. Odbojavali smo ih 3 x 30 min u 50 mL otopine za odbojavanje (60 mL acetonitrila i 15 mL 1M natrijevog acetata pomiješanih sa 300 mL redestilirane vode) i ispirali 2 x 5 min u 50 mL reH₂O. Vrpce smo vizualizirali pomoću uređaja Typhoon gdje smo primijenili valne duljine pobudne i emitirane svjetlosti od 555 i 580 nm.

3.2.5.4 Bojanje vrpce bojom Pro Q Emerald

Gelove smo nakon elektroforeze stavljali u plastične posude i inkubirali u 50 mL fiksativa (50% metanol (v/v) i 10% octena kiselina (v/v)) prvo 60 min a zatim preko noći na mješalici na sobnoj temperaturi. Idući dan smo ih ispirali 2 x 20 min u 50 mL otopine za ispiranje (3% octene kiseline (v/v)) nakon čega smo ih inkubirali prvo 20 min u 25 mL otopine za oksidaciju (Component B, kit Pro-Q® Emerald 488 Glycoprotein Gel and Blot Stain Kit), ispirali 3 x 20 min u 50 mL otopine za ispiranje i zatim opet inkubirali 120 min u 50 mL boje Pro Q Emerald u posudi zamotanoj u foliju. Nakon bojanja ispirali smo ih 3 x 30 min u 50 mL otopine za ispiranje i vizualizirali pomoću uređaja Typhoon gdje smo primijenili valne duljine pobudne i emitirane svjetlosti od 510 i 520 nm.

3.2.5.5 Bojanje vrpce bojom Sypro Ruby

Ovu metodu primjenjivali smo nakon tretiranja gelova bojama Pro Q Diamond i Emerald, kako bi bili sigurni da smo kod elektroforeze nanijeli iste količine proteina.

Gelove smo prvo inkubirali u fiksativu 2x30 min (MeOH 50 %(v/v) i AcOH 7% (v/v)) a zatim stavili na inkubaciju u boju SYPRO Ruby (Molecular probes, *Invitrogen*) preko noći, u posudi zamotanoj u foliju i stavljenoj na tresilicu i ostavljenoj na sobnoj temperturi. Idući dan ispirali smo ih 30 min u otopini za ispiranje (MeOH 10 % (v/v) i AcOH 5% (v/v)) i zatim 2x5 min u de H₂O, nakon čega smo ih vizualizirali pomoću uređaja Typhoon gdje smo primjenili valne duljine pobudne i emitirane svjetlosti od 280 i 450 nm za pobudnu i 610 nm za emitiranu svjetlost.

3.2.5.6 Otkrivanje glikoziliranih proteina lektinom ConA

Nakon prijenosa proteina membrane smo tretirali bojom Rouge Ponceau S 2 min kako bi provjerili uspješnost prijenosa i označili biljege molekulskih masa koje smo ucrtali grafitnom olovkom. Nakon toga odbojavali smo kratko svaku membranu u 20 mL TBS pufera (Tablica 10.)

3-4 puta dok se boja nije potpuno isprala. Membrane smo ostavljali preko noći na +4 °C u 20 mL pufera TTBS (pufer TBS, Tablica 10. uz dodatak 0,2 mL Tween 20) kako bi popunili pore u membrani u koje proteini nisu zapeli – kako bi spriječili pojavu lažnih signala. Idući dan inkubaciju smo radili 90 min u 20 mL otopine soli i TTBS-a (TTBS pufer uz dodatak 1mM CaCl₂ i 1M MgCl₂) i 25 µg/mL otopine konkanavalina A (ConA). Nakon inkubacije ispirali smo ih 6 x 5 min u istoj otopini samo bez ConA i ponovno inkubirali 60 min u toj otopini uz dodatak 50 µg/mL peroksidaze. Zatim smo ih opet ispirali 6 x 5 min u otopini soli i TTBS-a i nakon toga u TBS puferu 15 min, nakon čega je slijedilo razvijanje miješanjem otopina 30µL 30% H₂O₂ / 50 mL TBS i 30 mg 3,3'DAB / 10mL MeOH. Razvijanje smo zaustavljali ispiranjem membrana u većoj količini deH₂O.

3.2.5.7 Otkrivanje glikoziliranih proteina lektinom GNA

Nakon prijenosa proteina membrane smo tretirali bojom Rouge Ponceau S 2 min kako bi provjerili uspješnost prijenosa i označili biljege molekulskih masa koje smo ucrtali grafitnom olovkom. Nakon toga odbojavali smo kratko svaku membranu u 20 mL TBS pufera (Tablica 10.) 3-4 puta dok se boja nije potpuno isprala. Membrane smo ostavljali preko noći na +4 °C u 20 mL pufera TTBS. Idući dan ispirali smo ih 2 x 10 min u TBS-u, zatim 10 min u otopini TTBS-a i soli i inkubirali u otopini TTBS-a i soli uz dodatak 10 µL GNA/10 mL otopine. Ponovno smo ih ispirali 3 x 10 min u TBS-u i inkubirali 60 min u otopini 10 mL TBS-a i 10 µL antiDIG-alkalne fosfataze, nakon čega je slijedilo još jedno ispiranje 3 x10 min u TBS-u i vizualizacija vrpca pomoću 100 µL supstrata BCIP/NBT dodanog u 5 mL otopine soli i TTBS.

4 Rezultati

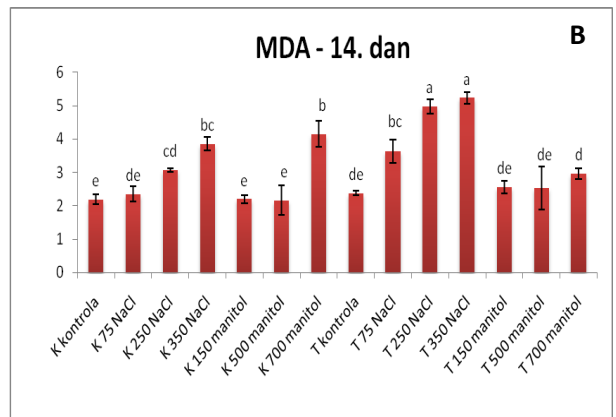
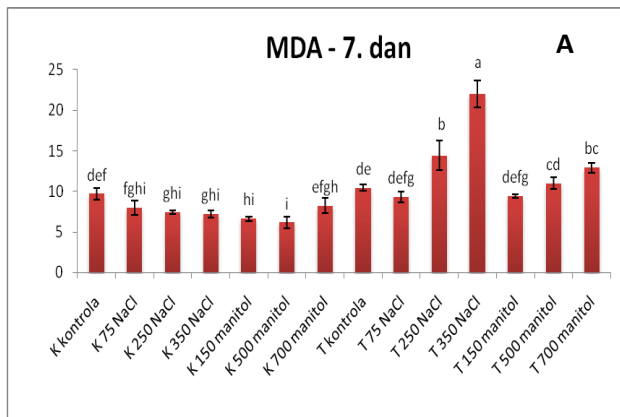
4.1 Analiza biokemijskih parametara i ekspresija enzima uključenih u antioksidativni odgovor

4.1.1 Udio MDA i protein karbonila

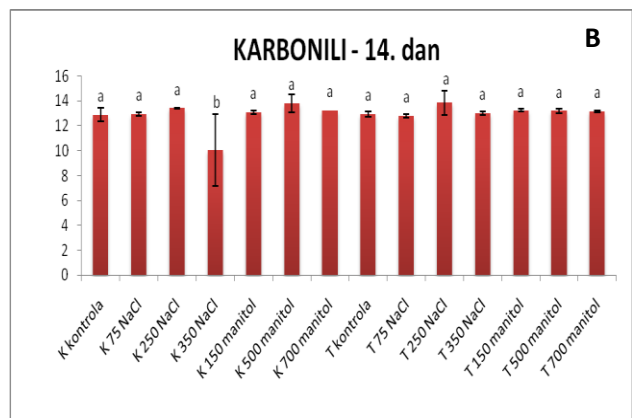
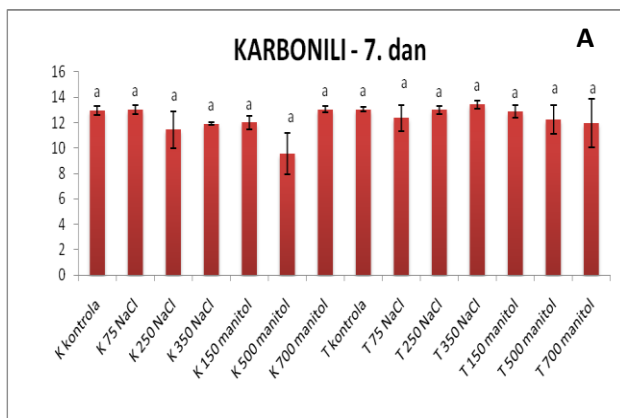
Nakon 7. dana tretmana u kalusnom tkivu nismo zamijetili bitnu razliku između kontrole i tretiranog tkiva (Slika 1A). Nakon 14. dana tretmani s 250 mM i 350 mM soli kao i 700 mM manitolom pokazali su značajno viši sadržaj MDA u odnosu na kontrolu (Slika 1B).

U tumorskom tkivu nakon 7. dana povećani sadržaj MDA u odnosu na kontrolu pokazali su tretmani s 250 mM i 350 mM NaCl-om i 700 mM manitolom (Slika 1A). Nakon 14. dana tretmani sa sve tri ispitane koncentracije soli rezultirali su povišenim udjelom MDA (Slika 1B).

Udio karbonila u uzorcima nije se znatno promijenio niti u jednom tretmanu u odnosu na kontrolne vrijednosti klausa i tumora (Slika 2A i B).



Slika 1. Sadržaj malondialdehida (MDA) u kalusnom (K) i tumorskom (T) tkivu kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff. A) nakon 7. dana ispitanih tretmana. B) nakon 14. dana ispitanih tretmana



Slika 2. Sadržaj protein karbonila u kalusnom (K) i tumorskom (T) tkivu kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff. A) nakon 7. dana ispitanih tretmana. B) nakon 14. dana ispitanih tretmana

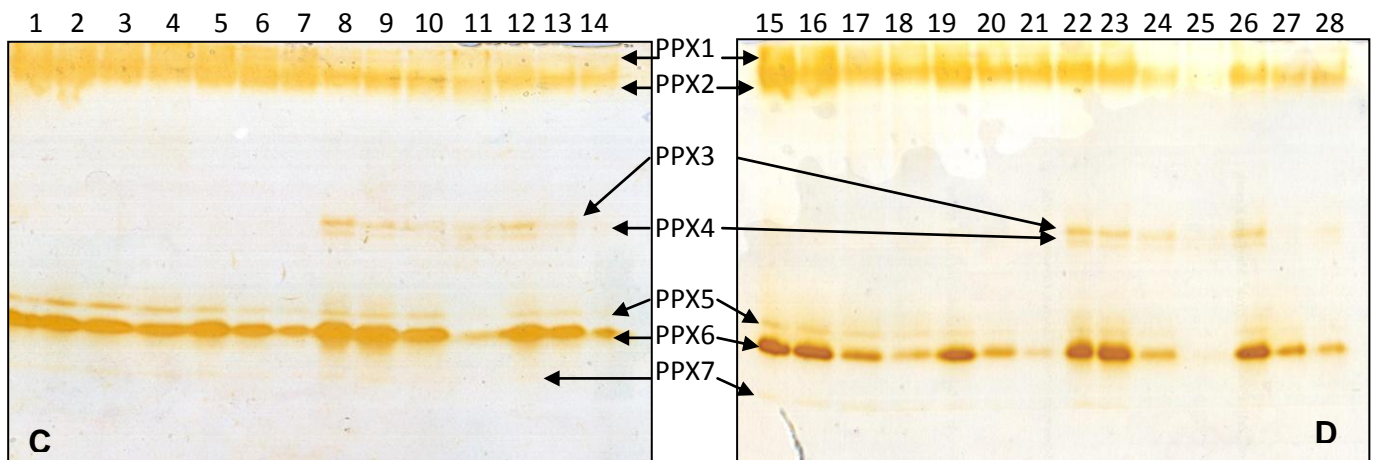
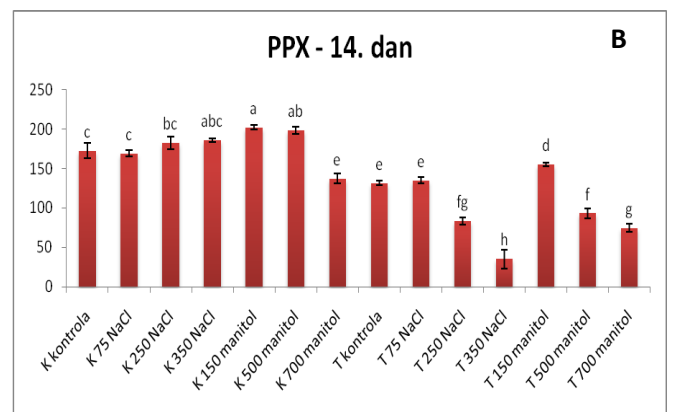
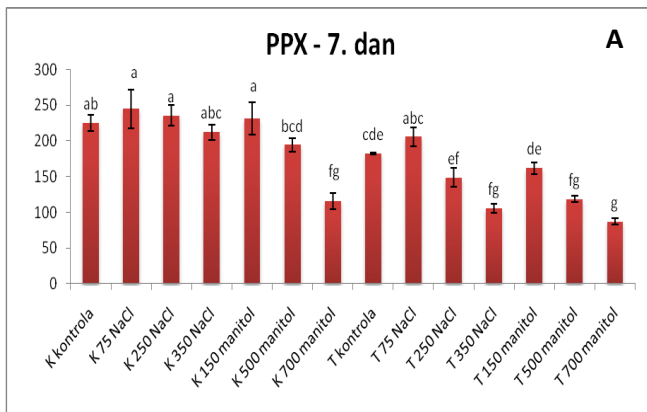
4.1.2 Aktivnost antioksidativnih enzima

4.1.2.1 Aktivnost PPX

Istraživanje je pokazalo da je aktivnost PPX-a u kalusnom tkivu nakon 7. dana tretiranja bila znatno niža kod tretmana sa 700 mM manitolom (Slika 3A). Nakon 14. dana eksperimenta, povišenu aktivnost PPX-a imala su tkiva uzgajana na podlogama sa 150 i 500 mM manitolom, dok je najveća koncentracija manitola (700 mM) pokazala smanjenu aktivnost (Slika 3B).

Tumorsko tkivo je pokazalo sniženu aktivnost PPX na podlogama s 350 mM NaCl-om te 500 mM i 700 mM manitolom nakon 7. dana tretmana (Slika 3A) te kod tretmana 250 mM i 350 mM NaCl-om te 500 mM i 700 mM manitolom nakon 14. dana tretiranja (Slika 3B). Tretman sa 150 mM manitolom pokazao je neznatno višu aktivnost od kontrole tumora nakon 14. dana (Slika 3B).

U tumorskom tkivu aktivnost peroksidaza bila je generalno niža nego kod kalusa, ali se u obje vrste tkiva moglo jasno razlučiti nekoliko izoformi PPX-a (PPX1-PPX9). Izoforma PPX6 je daleko najjače eksprimirana kod svih tretmana, a prate je izoforme PPX1 i PPX2. U tumorima smo detektirali neke izoforme PPX-a koje kod kalusa nisu bile vidljive (PPX3 i PPX4). Aktivnost izoformi se podudarala sa spektrofotometrijskim mjerenjima (Slika 3C i D).



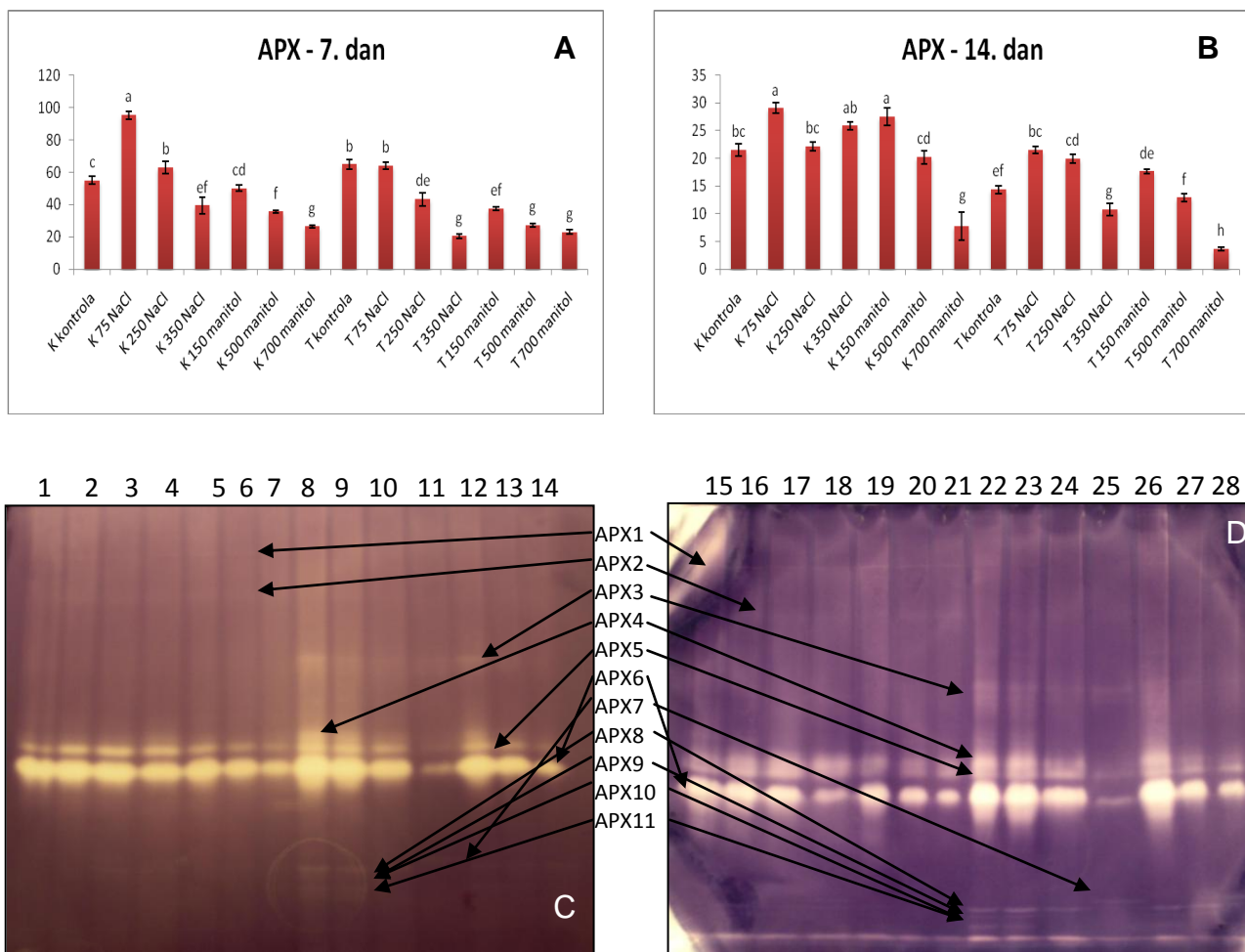
Slika 3. Aktivnost enzima peroksidaze u kalusnom (K) i tumorskom (T) tkivu kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff. i Grafički prikazi aktivnosti PPX-a nakon A) 7. i B) 14. dana tretmana; Aktivnost PPX-a na gelu nakon C) 7. i D) 14. dana tretmana. 1 i 15 – K kontrola; 2 i 16 – K 75 mM NaCl; 3 i 17 – K 250 mM NaCl; 4 i 18 – K 350 mM NaCl; 5 i 19 – K 150 mM manitol; 6 i 20 – 500 mM manitol; 7 i 21 – 700 mM manitol; 8 i 22 – T kontrola; 9 i 23 – T 75 mM NaCl; 10 i 24 – T 250 mM NaCl; 11 i 25 – T 350 mM NaCl; 12 i 26 – T 150 mM manitol; 13 i 27 – T 500 mM manitol; 14 i 28 – T 700 mM manitol. PPX1-7 – detektirane izoforme PPX-a.

4.1.2.2 Aktivnost APX

Nakon 7. dana tretmana aktivnost APX-a u kalusu je bila statistički značajno povećana kod tretmana sa 75 mM i 250 mM NaCl-om, a smanjena kod tretmana s 350 mM NaCl-om te 500 mM i 700 mM manitolom (Slika 4A). Nakon 14. dana tkivo je pokazalo povišenu aktivnost enzima na tretmanima sa 75 mM NaCl-om i 150 mM manitolom i znatno smanjenu aktivnost na najvećoj koncentraciji manitola (700 mM) (Slika 4B).

Svi tretmani tumorskih tkiva, osim onog sa najnižom koncentracijom soli, pokazali su smanjenu aktivnost APX u odnosu na kontrolu nakon 7. dana (Slika 4A); 14 dan tretmana rezultirao je padom aktivnosti kod najviših koncentracija soli i manitola (350 mM NaCl i 700 mM manitol) te porastom aktivnosti pri koncentraciji soli od 75 mM i 250 mM (Slika 4B).

Analizom aktivnosti na gelu detektirali smo ukupno 11 izoformi (APX1-11), od kojih su u svim tkivima daleko najizraženije bile APX5 i APX6. Razlika u intenzitetu vrpce između tretmana kod svih vrsta tkiva i duljine trajanja tretmana generalno je pratila podatke dobivene spektrofotometrijskim mjerenjima. Kod kalusnog tkiva izoforma APX4 nije bila izražena nakon 7. dana tretmana ali se jasno vidjela nakon 14. dana. Sedmi i 14. dan tretiranja kalusa pokazali su jedva zamjetno povišenje aktivnosti 2 izoforme (APX1 i 2) u odnosu na tumorsko tkivo. U tumoru smo detektirali izoformu koju nismo našli kod kalusa (APX3). Izoforme APX8,9,10 i 11 bile su slabije izražene i u kalusu i u tumoru u odnosu na ostale izoforme APX; no, ono što smo primjetili je da su jačeg intenziteta bile u tumorskom tkivu: kontroli i tkivu uzgajanom na podlozi s najmanjom koncentracijom soli nakon 7. dana tretmana i u tkivima sa svih tretmanima 14. dana (Slika 4C i D).



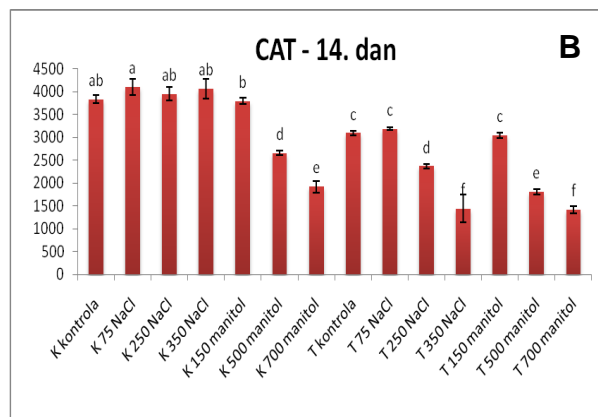
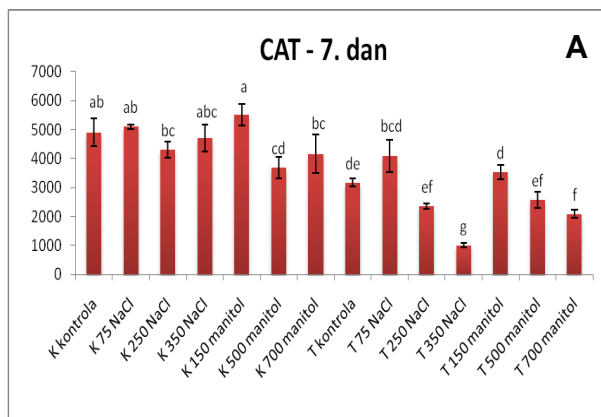
Slika 4. Aktivnost enzima askorbat peroksidaze u kalusnom (K) i tumorskom (T) tkivu kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff. Grafički prikazi aktivnosti APX-a nakon **A) 7. i **B)** 14. dana tretmana; Aktivnost APX-a na gelu nakon **C)** 7. i **D)** 14. dana tretmana. 1 i 15 – K kontrola; 2 i 16 – K 75 mM NaCl; 3 i 17 – K 250 mM NaCl; 4 i 18 – K 350 mM NaCl; 5 i 19 – K 150 mM manitol; 6 i 20 – 500 mM manitol; 7 i 21 – 700 mM manitol; 8 i 22 – T kontrola; 9 i 23 – T 75 mM NaCl; 10 i 24 – T 250 mM NaCl; 11 i 25 – T 350 mM NaCl; 12 i 26 – T 150 mM manitol; 13 i 27 – T 500 mM manitol; 14 i 28 – T 700 mM manitol. APX1-7 – detektirane izoforme APX-a.**

4.1.2.3 Aktivnost CAT

Tkivo kalusa pokazalo je smanjenu aktivnost CAT na tretmanu s 500 mM manitolom nakon 7. dana tretmana (Slika 5A). Nakon 14. dana smanjenu aktivnost pokazali su tretmani s 500 mM i 700 mM manitolom (Slika 5B).

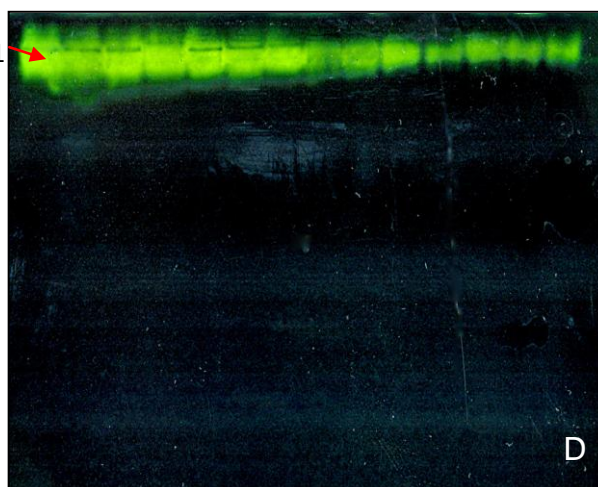
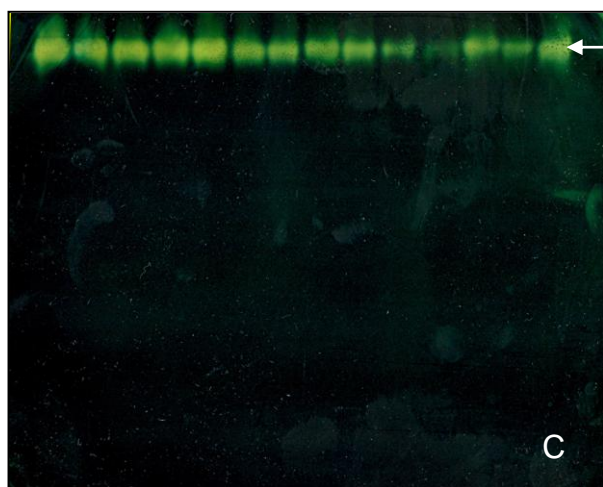
Tumorsko tkivo pokazalo je smanjenu aktivnost CAT na tretmanima s najvišim koncentracijama soli i manitola (350 mM NaCl i 700 mM manitol) nakon 7. dana (Slika 5A). Svi tretmani nakon 14. dana pokazali su smanjenu aktivnost, osim najnižih koncentracija soli (75 mM) i manitola (150 mM) (Slika 5B).

Kod oba analizirana tkiva kaktusa i svih ispitanih tretmana detektirali smo samo jednu izoformu, CAT 1, čija je aktivnost u gelu bila u skladu sa spektrofotometrijskim mjerenjima (Slika 5C i D), što je najbolje vidljivo kod uzorka 11 (350 mM NaCl) – na gelu je pokazao znatno slabiju aktivnost i nakon 7. i nakon 14. dana tretmana i time potvrdio mjerenja dobivena spektrofotometrijskom metodom.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28



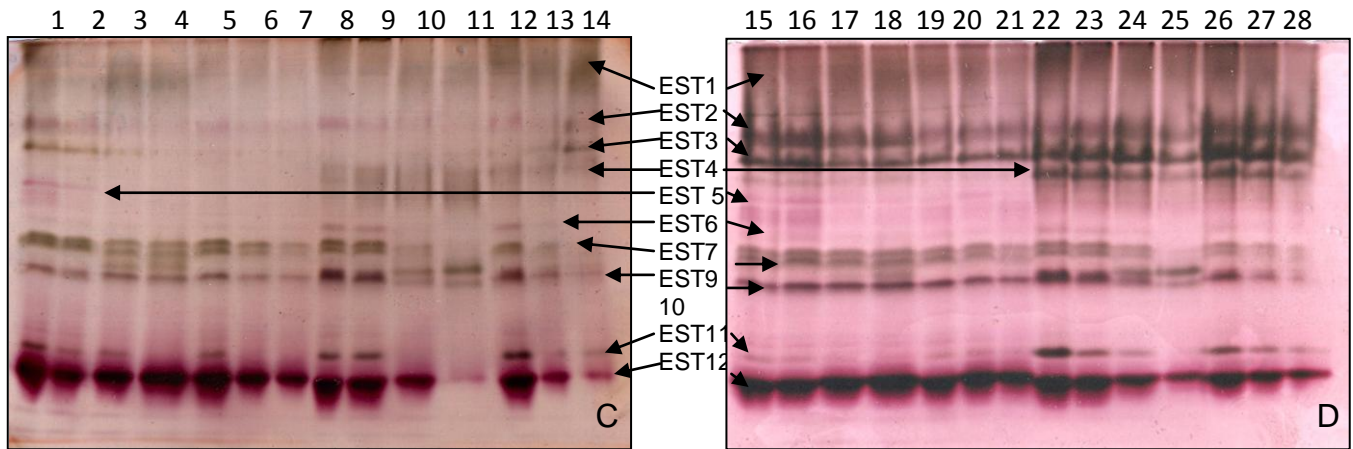
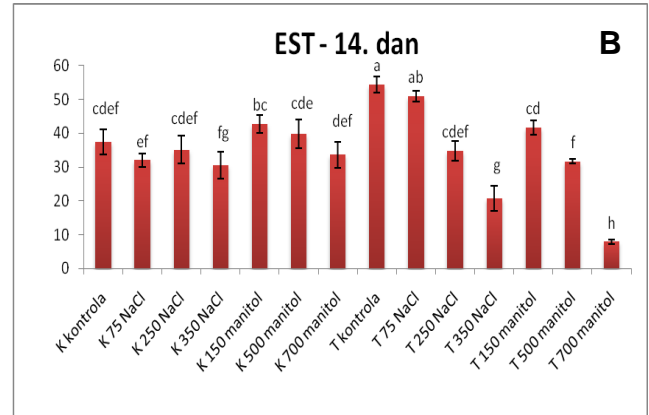
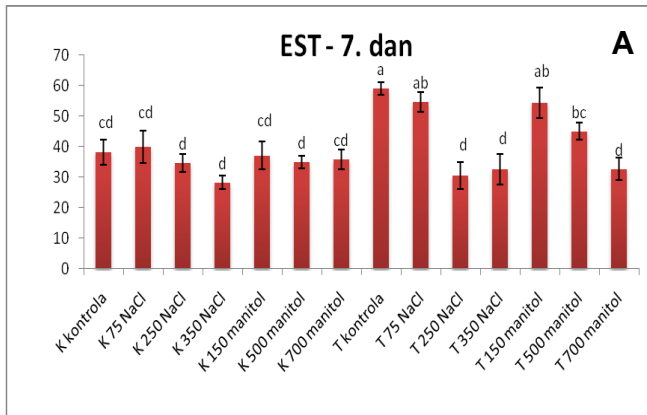
Slika 5. Aktivnost enzima katalaze u kalusnom (K) i tumorskom (T) tkivu kaktusa *Mammilaria gracilis* Pfeiff. Grafički prikazi aktivnosti CAT nakon **A) 7. i **B)** 14. dana tretmana; i Aktivnost CAT na gelu nakon **C)** 7. i **D)** 14.dana tretmana. 1 i 15 – K kontrola; 2 i 16 – K 75 mM NaCl; 3 i 17 – K 250 mM NaCl; 4 i 18 – K 350 mM NaCl; 5 i 19 – K 150 mM manitol; 6 i 20 – 500 mM manitol; 7 i 21 – 700 mM manitol; 8 i 22 – T kontrola; 9 i 23 – T 75 mM NaCl; 10 i 24 – T 250 mM NaCl; 11 i 25 – T 350 mM NaCl; 12 i 26 – T 150 mM manitol; 13 i 27 – T 500 mM manitol; 14 i 28 – T 700 mM manitol. CAT1 - detektirana izoforma CAT.**

4.1.2.4 Aktivnost EST

Aktivnost esteraza u kalusnom tkivu nakon tretmana 7 dana nije pokazala značajnu razliku u odnosu na kontrolno tkivo (Slika 6A). Tretmani nakon 14. dana pokazali su isti uzorak aktivnosti (Slika 6B).

Tumorsko tkivo pokazalo je smanjenu aktivnost EST na svim tretmanima osim na najnižim koncentracijama soli i manitola (75 mM NaCl i 150 mM manitol) nakon 7. dana (Slika 6A), dok je nakon 14. dana uzorak aktivnosti ostao isti uz smanjenje aktivnosti kod najniže koncentracije manitola (Slika 6B).

Analizom izoenzima esteraze na gelu detektirali smo ukupno 12 izoformi, označenih EST1-12, od kojih je najjače izražena kod svih tretmana bila izoforma EST12. Aktivnosti u gelu pratile su vrijednosti dobivene spektrofotometrijskom analizom (Slika 6C i D). U kalusu je izoforma EST5 bila vidljiva nakon 7. dana tretmana u kontroli i tretmanu sa 75 mM NaCl (uzorci 1 i 2), dok je u ostalim tretmanima nismo zamijetili. Isto se dogodilo i sa izoformom EST11, koja je bila jasno vidljiva u kontroli, tretmanu sa 75 mM i 250 mM NaCl-om te 150 mM manitolom, ali je nismo zapazili kod tretmana sa 350 mM NaCl-om kao ni kod tretmana 500 mM i 700 mM manitolom. (Slika 6C). Nakon 14. dana eksperimenta, nismo zamijetili razlike u uzorku vrpca između kontrole i bilo kojeg tretmana. U tumoru se mogla zamijetiti vrpca EST3 kod svih tretmana manitolom i 350 mM NaCl-om ali ne i u kontroli i ostalim koncentracijama soli. Izoforma EST6 je bila izražena u kontroli i najnižim koncentracijama soli i manitola – u ostalim tretmanima je nije bilo (250 mM, 350 mM NaCl i 700 mM manitol) ili je bila jedva zamjetna (500 mM manitol). Izoforme EST7,8,9 i 10 bile su puno jače izražene u kontroli i najnižim koncentracijama soli i manitola. Slično ponašanje pokazala je i EST11, uz iznimku što na tretmanima soli nije pokazala nikakvu aktivnost (Slika 6B).



Slika 6. Aktivnost enzima katalaze u kalusnom (K) i tumorskom (T) tkivu kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff. Grafički prikazi aktivnosti EST nakon A) 7. i B) 14. dana tretmana; Aktivnost EST na gelu nakon C) 7. i D) 14. dana tretmana. 1 i 15 – K kontrola; 2 i 16 – K 75 mM NaCl; 3 i 17 – K 250 mM NaCl; 4 i 18 – K 350 mM NaCl; 5 i 19 – K 150 mM manitol; 6 i 20 – 500 mM manitol; 7 i 21 – 700 mM manitol; 8 i 22 – T kontrola; 9 i 23 – T 75 mM NaCl; 10 i 24 – T 250 mM NaCl; 11 i 25 – T 350 mM NaCl; 12 i 26 – T 150 mM manitol; 13 i 27 – T 500 mM manitol; 14 i 28 – T 700 mM manitol. EST1-9 - detektirane izoforme EST.

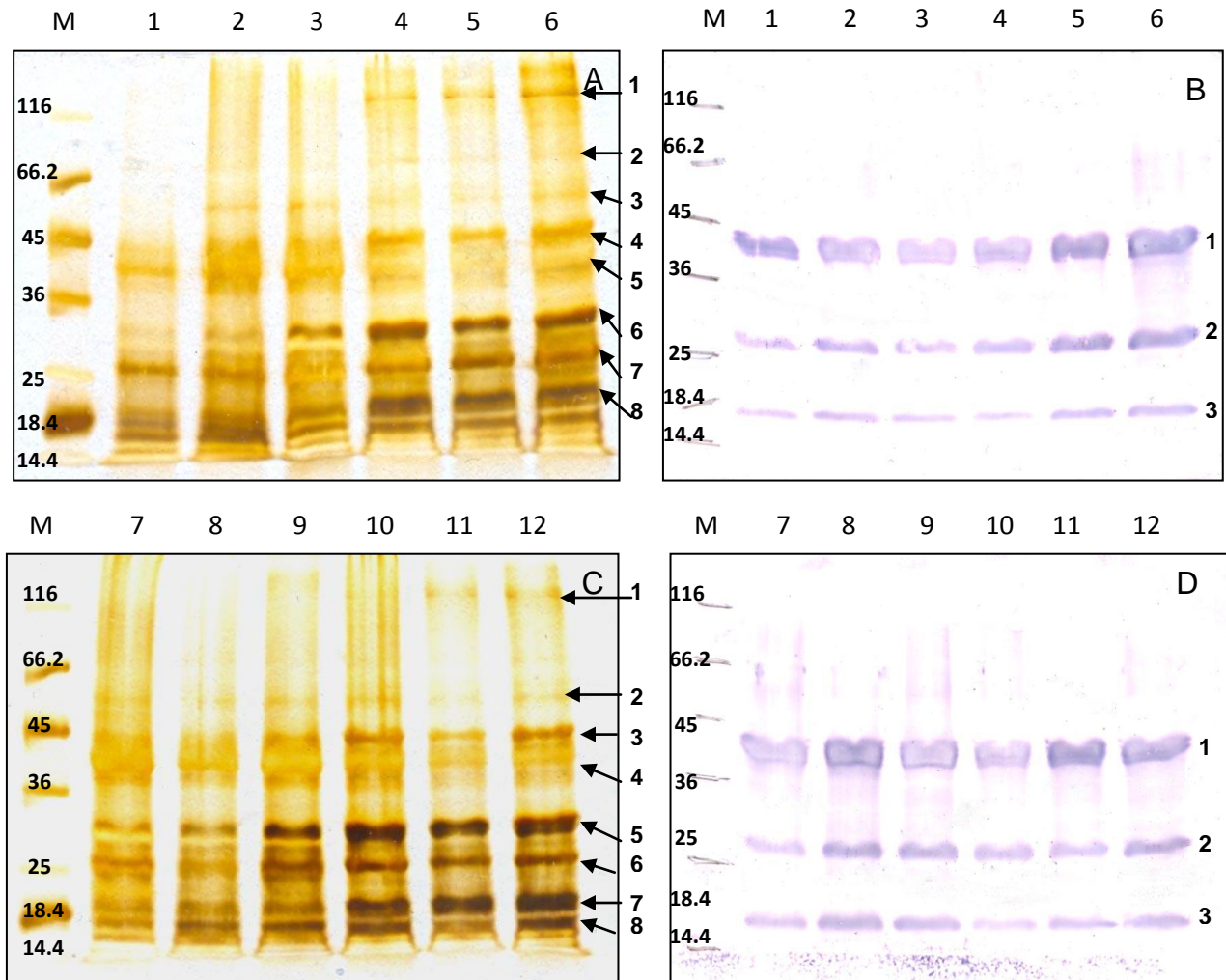
4.2 Ekspresija ukupnih proteina u tkivu kaktusa nakon kratkotrajnog stresa

4.2.1 Elektroforetska analiza proteina i detekcija proteina ASR1

Tkiva kalusa koja su tretirana 15 min sa soli i manitolom u tekućoj podlozi pokazala su jaču ekspresiju u 3 vrpce (Slika 7A): oko 40 kDa (vrpce 4 i 5), 25 kDa (vrpca 7) i 18-14 kDa (vrpca 8). Jaču ekspresiju proteina veličine oko 40 kDa (vrpce 4 i 5) imali su tretmani s obzirom na kontrolu. I solni i osmotski stres rezultirali su pojavom nove vrpce, na položaju od oko 50 kDa (vrpca 3) (Slika 7A). Vrpca veličine približno 30 kDa (vrpca 6) imala je najjaču ekspresiju kod tretmana manitolom i slabiju kod tretmana NaCl-om, te jedva zamjetnu kod kontrole (Slika 7A.) Kod tumorskih tkiva tretiranih 15 min izraženije su bile vrpce oko 30 kDa (vrpca 6), 25 kDa (vrpca 7) i 18-14 kDa (vrpca 8). Nismo zamijetili razliku u ekspresiji između tretmana i kontrole (Slika 7A). Kod tumora su se, u usporedbi s kalusnim tkivom, pojavile dvije nove vrpce, od oko 120 kDa (vrpca 1) i oko 66 kDa (vrpca 2), dok je vrpca oko 40 kDa (vrpca 5) bila slabije izražena (Slika 7A).

Nakon tretmana od 3 sata jasno izražene vrpce kod kalusa bile su one blizu i ispod 30 kDa (vrpce 5-8) s time da je tkivo tretirano manitolom pokazalo generalno jaču ekspresiju svih proteina (Slika 7C). Tkivo tumora pokazalo je naglašenu ekspresiju proteina od oko 30 kDa i manje (vrpce 5-8), ali i pojačanu ekspresiju proteina od oko 45 kDa (vrpca 3), kao i jednu novu vrpca (u usporedbi s kalusnim tkivom) od oko 120 kDa (vrpca 1). S obzirom na kontrolu, kod tretmana nismo mogli zamijetiti bitnije razlike u ekspresiji (Slika 7C).

Protein ASR1 detektirali smo u 3 izoforme (vrpce 1-3 na slici 7B i 1-3 na slici 7D), kod kontrola i kod svih tretmana (Slika 7B i 7D); ekspresija je bila slična između kontrola i tretmana, kao i između kalusa i tumora.



Slika 7. Kiseli proteini kaktusa malih molekulskih masa – kalusno (K) i tumorsko (T) tkivo.

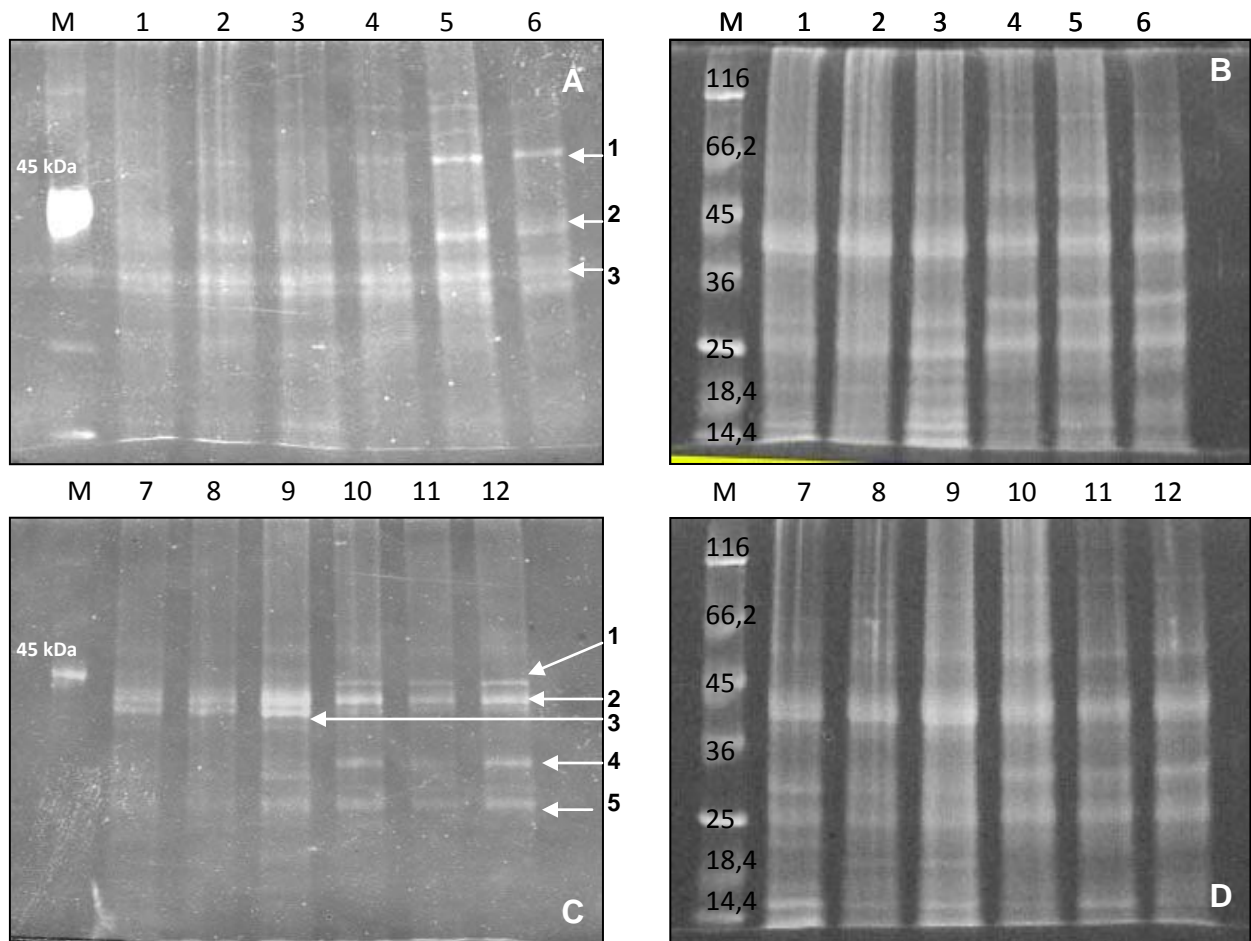
A) SDS-PAGE kalusnog i tumorskog tkiva nakon tretmana 15 min **B)** Odgovarajuća nitrocelulozna membrana tretirana protutijelom ASR1 **C)** SDS-PAGE kalusnog i tumorskog tkiva nakon tretmana 3 sata **D)** Odgovarajuća nitrocelulozna membrane tretirana protutijelom ASR1.

M - biljezi molekulskih masa (116, 66.2, 45, 36, 25, 18.4, 14.4 kDa). Uzorci: 1 – $K_{kontrola_{15min}}$; 2 - $K_{NaCl_{15min}}$; 3 - $K_{manitol_{15min}}$; 4 – $T_{kontrola_{15min}}$; 5 - $T_{NaCl_{15min}}$; 6 - $Tumor_{manitol_{15min}}$; 7 – $K_{kontrola_{3h}}$; 8 - $K_{NaCl_{3h}}$; 9 - $K_{manitol_{3h}}$; 10 – $T_{kontrola_{3h}}$; 11 - $T_{NaCl_{3h}}$; 12 - $T_{manitol_{3h}}$

4.2.1 Detekcija fosforiliranih proteina

Kod tretmana 15 min mogle su se opaziti dvije jako eksprimirane vrpce, od oko 40 kDa i 35 kDa (vrpce 2 i 3). Kalus nije pokazao znakovite promjene u ekspresiji fosforiliranih proteina između tretmana i kontrole, dok se kod tumorskih tkiva pokazala generalno jača ekspresija proteina na tretmanu s 250 mM NaCl-om (uzorak 5), kao i jedna nova vrpca oko 50 kDa – vrpca 1 – koja je bila jače eksprimirana u tretmanima nego u kontroli (Slika 8A). Analiza bojom Sypro Ruby pokazala je da smo nanijeli približno iste količine proteina u jažice (Slika 8B).

Analiza tretmana od 3 sata (Slika 8C) pokazala je da su svi tretmani imali ekspresiju proteina molekulske mase oko 40 kDa (vrpca 2). Kalusno tkivo imalo je dodatnu vrpcu malo manje molekulske mase od 40 kDa (na slici 8C vrpca 3), dok je tumor eksprimirao proteine mase malo veće od 40 kDa (na slici 8C vrpca 1). Tumorska tkiva, skupa s kalusom tretiranim manitolom, pokazala su dvije nove vrpce oko 30 kDa i 25 kDa (4 i 5). Tretman nije pokazao znakovite promjene u ekspresiji proteina kalusnog tkiva (Slika 8C), iako se čini da je tretman manitolom jače eksprimiran (Slika 8D). Kod tumorskog tkiva postojala malo jača ekspresija kod tretmana manitolom (Slika 8C).



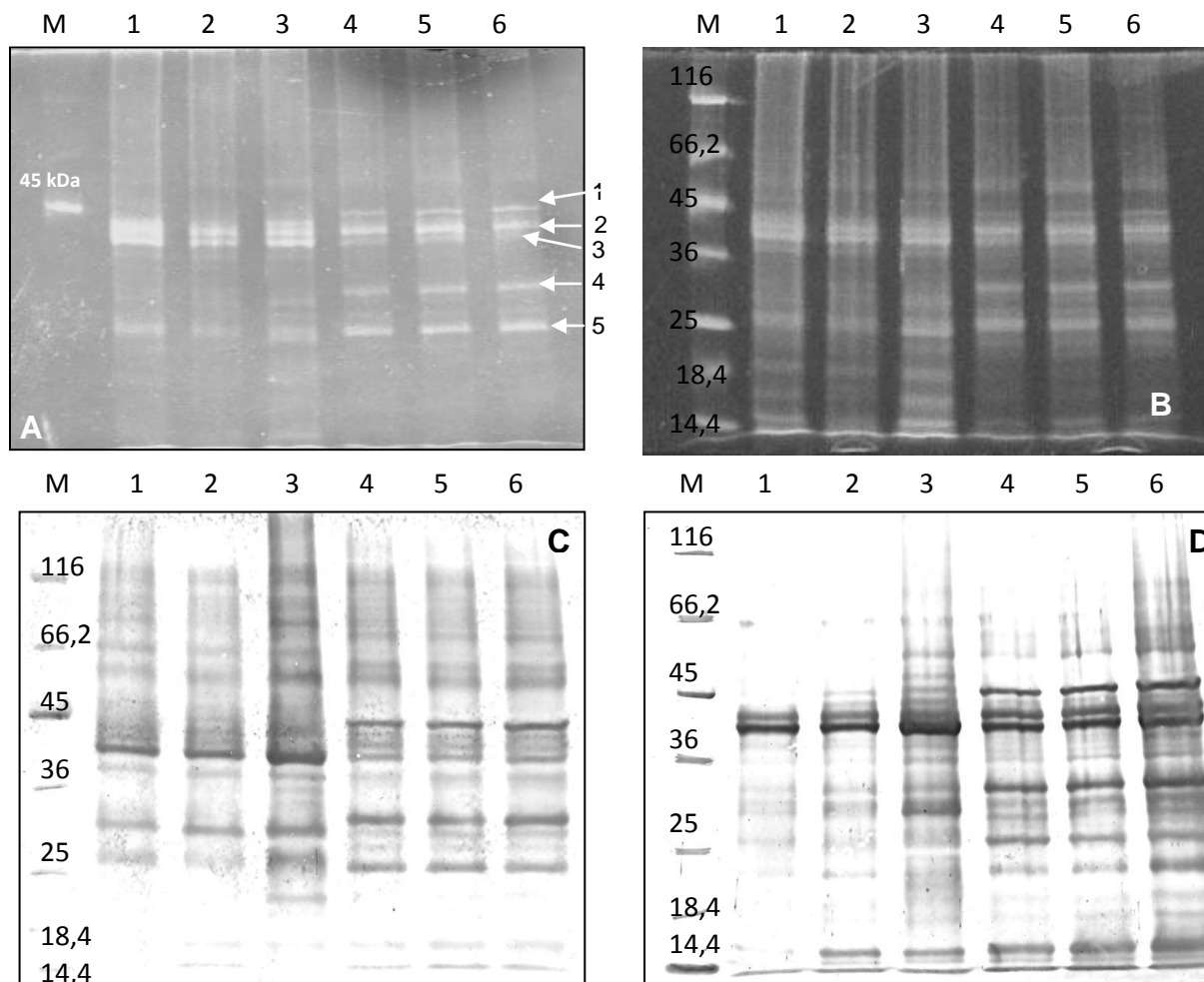
Slika 8. Kiseli proteini kaktusa malih molekulskih masa – kalusno (K) i tumorsko (T) tkivo.

A) Fosforilirani proteini kalusnog i tumorskog tkiva obojeni bojom Pro-Q-Diamond nakon tretmana 15 min. **B)** Isti gel obojan bojom SYPRO Ruby. **C)** Fosforilirani proteini kalusnog i tumorskog tkiva obojeni bojom Pro-Q-Diamond nakon tretmana 3 sata. **D)** Isti gel obojan bojom SYPRO Ruby. M - biljezi molekulskih masa (116, 66.2, 45, 36, 25, 18.4, 14.4 kDa). Uzorci: 1 – $K_{kontrola_15min}$; 2 - K_{NaCl_15min} ; 3 - $K_{manitol_15min}$; 4 – $T_{kontrola_15min}$; 5 - T_{NaCl_15min} ; 6 - $Tumor_{manitol_15min}$; 7 – $K_{kontrola_3h}$; 8 - K_{NaCl_3h} ; 9 - $K_{manitol_3h}$; 10 – $T_{kontrola_3h}$; 11 - T_{NaCl_3h} ; 12 - $T_{manitol_3h}$.

4.2.2 Detekcija glikoziliranih proteina

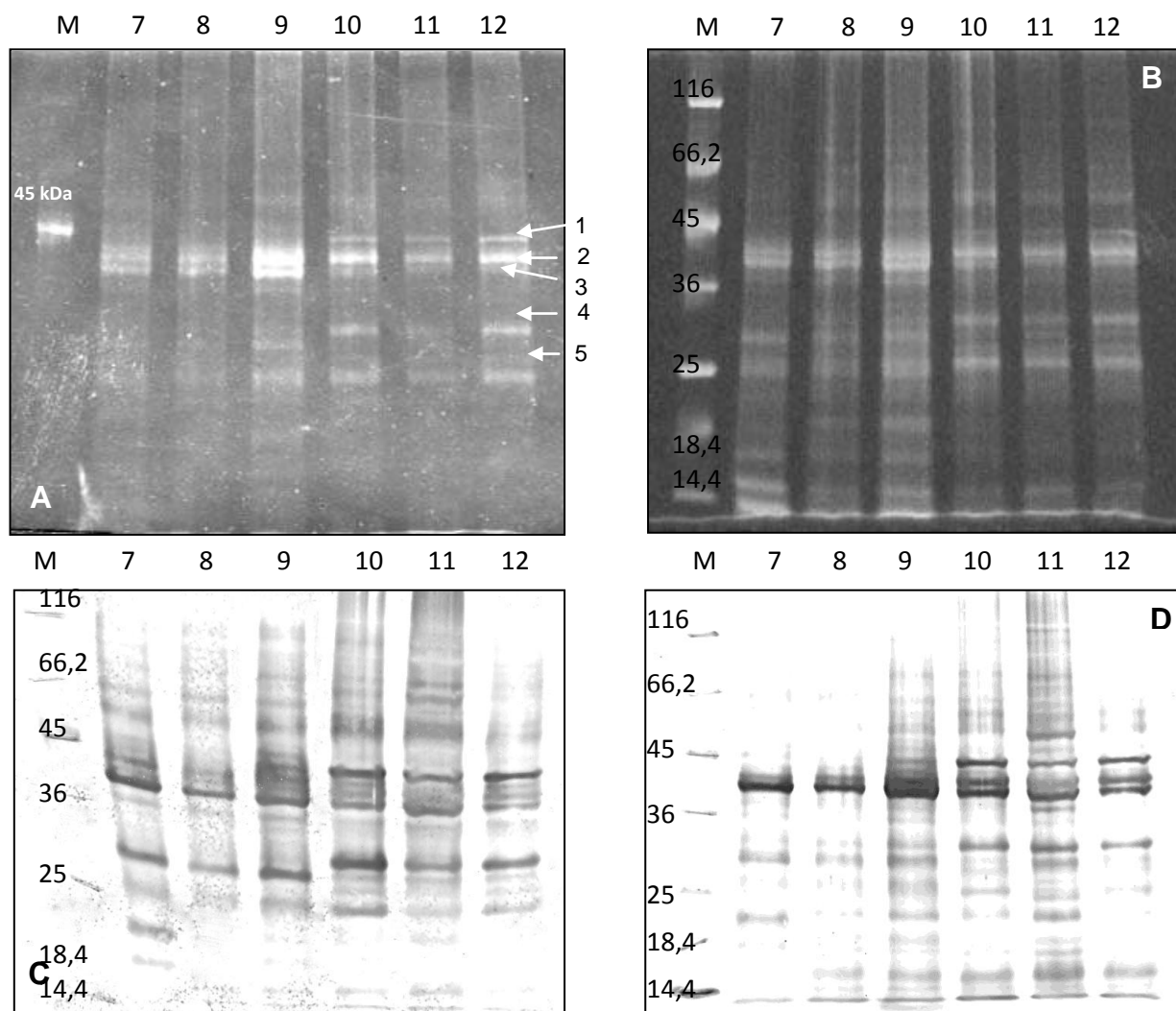
Vizualizacijom glikoziliranih proteina pomoću boje Pro Q Emerald nakon tretmana 15 minuta otkrili smo da se ekspresija proteina nije razlikovala između tretmana i kontrole, bilo da se radilo o kalusu ili tumoru (Slika 9A). I kod kalusa i kod tumora jasno je bila ekspimirana vrpca oko 40 kDa (vrpca 2). Kod kalusa je bio jače ekspimiran protein nešto manji od 40 kDa (vrpca 3) nego kod tumorskog tkiva. U tumorskom tkivu detektirali smo protein mase od oko 30 kDa (vrpca 4), kao i jedan malo veći od 40 kDa (vrpca 1), koje nismo zapazili u kalusnom tkivu (Slika 9A). Analiza bojom Sypro Ruby pokazala je da smo nanijeli približno jednaku količinu proteina na gel (Slika 9B). Obilježavanje proteina lektinom ConA pokazalo je jaču ekspresiju glikoziliranih proteina na tretmanu manitolom u kalusnom tkivu s obzirom na kontrolu, a lektin GNA je pokazao da je ekspresija glikoziliranih proteina na tretmanu manitolom bila jača kod obje vrste tkiva s obzirom na njihove kontrole (Slika 9C i 9D).

Rezultati nakon 3 sata tretiranja bili su u skladu s uzorkom ekspresije tretmana nakon 15 min i pokazali su veću ekspresiju glikoziliranih proteina u kalsus na tretmanu manitolom (uzorak 3) kod svih načina detekcije (Slika 10 A,B,C i D).



Slika 9. Kiseli proteini kaktusa malih molekulskih masa – kalusno (K) i tumorsko (T) tkivo.

A) Glikozilirani proteini kalusnog i tumorskog tkiva obojeni bojom Pro-Q-Emerald tretmana 15 min. **B)** Isti gel obojan bojom SYPRO Ruby. **C)** Nitrocelulozna membrana tretirana lektinom ConA tretmana 15 min. **D)** Nitrocelulozna membrana tretirana lektinom GNA tretmana 15 min. M - biljezi molekulskih masa (116, 66.2, 45, 36, 25, 18.4, 14.4 kDa). Uzorci: 1 – $K_{kontrola_{15min}}$; 2 - $K_{NaCl_{15min}}$; 3 - $K_{manitol_{15min}}$; 4 – $T_{kontrola_{15min}}$; 5 - $T_{NaCl_{15min}}$; 6 - $Tumor_{manitol_{15min}}$.



Slika 10. Kiseli proteini kaktusa malih molekulskih masa – kalusno (K) i tumorsko (T) tkivo. A) Glikozilirani proteini kalusnog i tumorskog tkiva obojeni bojom Pro-Q-Emerald tretmana 3 sata. **B)** Isti gel obojan bojom SYPRO Ruby. **C)** Nitrocelulozna membrana tretirana lektinom ConA tretmana 3 sata. **D)** Nitrocelulozna membrana tretirana lektinom GNA tretmana 3 sata. M - biljezi molekulskih masa (116, 66.2, 45, 36, 25, 18.4, 14.4 kDa). Uzorci: 7 – $K_{kontrola_3h}$; 8 - K_{NaCl_3h} ; 9 - $K_{manitol_3h}$; 10 – $T_{kontrola_3h}$; 11 - T_{NaCl_3h} ; 12 - $T_{manitol_3h}$.

5 Rasprava

5.1 Kaktus *Mammillaria gracilis* Pfeiff. kao model za istraživanja utjecaja stresa na biljke

Tijekom svog života biljke prolaze kroz mnoge faze rasta i razvitka, od kojih se neke pojavljuju postepeno i blago a neke naglo i dramatično – sve kao posljedica odgovora biljaka na unutarnje i vanjske (okolišne) čimbenike. Dramatične razvojne promjene na genetičkoj i molekularnoj razini opisalo je nekoliko autora (Laux i Bowman 2003; Chuck i Hake 2005), a nazivaju ih promjena faze (*phase change*). Promjene faze vrlo su često praćene i promjenama u morfologiji biljnog tkiva (Balen 2002).

Meristemi su nediferencirani dijelovi biljke koji aktivno stvaraju nove, matične stanice koje diobama daju stanice-prekursore za formiranje novih organa i tkiva, a nalaze se na perifernim dijelovima biljke koji aktivno rastu. Kako oblik biljke ovisi o aktivnosti meristema, smatra se da promjena faze mora kao unutarnji faktor inicijacije sadržavati komponentu ovisnu o meristemu, no s druge strane, razvojne promjene vezane su i za okolišne čimbenike koji indirektno utječu na meristem. Znači, ravnoteža meristemskih i nemeristemskih čimbenika rezultira postepenim ili promjenama faze (Balen 2002). Novija istraživanja pokazuju da oštećenja biljnog tkiva nastala djelovanjem okolišnih čimbenika, kao što su oksidativni stres i sastav hranidbene podloge, mogu utjecati na fiziološku, epigenetsku i genetsku varijabilnost biljaka u kulturi (Mangolin 1997; Gribble 1999; Cassells i Curry 2001).

Kao kserofiti s tipom fotosinteze CAM, kaktusi su veoma osjetljivi na uvjete u kulturi tkiva i, kao rezultat toga, razvijaju habituirane (neosjetljive na dodatak hormona) i hiperhidrirane kaluse, koji se mogu uspoređivati s tumorskim stanicama jer kao i tumori, zadržavaju meristemske

osobine i nemaju sposobnost diferencijacije što ih čini dobrim sustavom za proučavanje diferencijacije stanica (Balen 2002). Stoga smo u pokusima, uz spontano nastalo habituirano kalusno tkivo kaktusa, koristili i tumorsko tkivo dobiveno nakon transformacije stanica kaktusa bakterijom *Agrobacterium tumefaciens*, čija morfologija ne ovisi jedino o inducirajućem plazmidu već i o biljci-domaćinu, kao i o mjestu ugradnje strane DNA u biljni genom (Bakran-Petricioli i Krsnik-Rasol 1989; Krsnik-Rasol i Bakran-Petricioli 1989; Krsnik-Rasol 1991).

Iako *Mammillaria gracilis* nije komercijalno zanimljiva biljna vrsta u Europi, njene prilagodbe na sušna tla čine je pogodnim organizmom za proučavanje biokemijskih i molekularnih mehanizama tijekom izlaganja solnom i osmotskom stresu. (Balen 2002) Reakcija na solni i osmotski stres može se očitovati na dva načina: pojačanom ekspresijom proteina koji sudjeluju u samom odgovoru na stres ili aktiviranjem metaboličkih puteva koji bi eliminirali štetne produkte koji nastaju radi stresa (Kalifa i sur., 2004). Iz tog smo razloga postavili eksperiment od dva dijela: (I) pratili smo promjene u biokemijskim parametrima (malondialdehid i protein karbonili te ekspresija enzima uključenih u antioksidativni odgovor); (II) pratili smo ekspresiju ukupnih proteina, s posebnim osvrtom na protein ASR1 za koji je već poznato da se pojačano eksprimira tijekom izlaganja biljnog tkiva solnom stresu (Amitai-Zeigerson i sur., 1995).

5.2 Aktivacija antioksidativnog sustava nakon izlaganja biljke stresnim uvjetima

Lipidna peroksidacija je već proučavana u tkivu kaktusa kao indikator oksidativnog stresa nastalog uslijed djelovanja podloge – udio protein karbonila i MDA je bio znatno povišen kod hiperhidriranih i habituiranih kalusa, kao i kod tumora, u odnosu na normalne izdanke što je ukazivalo na pojavu oksidativnog stresa (Balen i sur., 2009). U našim pokusima povišeni udio MDA kod tretmana u odnosu na kontrole također je potvrdio prisutnost oksidativnog stresa i nakon 7.dana i nakon 14.dana tretiranja. Podloge koje su sadržavale sol više su naštetile tkivu i

kalusa i tumora od podloga s manitolom. U kalusnom tkivu nismo našli zamjetne razlike u udjelu MDA nakon prvog tjedna tretmana dok je nakon drugog tjedna postojalo povišenje kod najviših koncentracija. Nasuprot tome, tumorska tkiva pokazala su osjetljivost na solni i osmotski stres i nakon prvog i nakon drugog tjedna tretmana, što ukazuje na to da je tumorsko tkivo osjetljivije na utjecaj stresa od kalusnog kojem je trebalo tjedan dana da počne pokazivati znakove stresa.

Analiza udjela protein karbonila (spojevi koji su produkt oštećenja staničnih proteina) nije pokazala nikakve razlike kod tretmana niti nakon prvog niti nakon drugog tjedna rasta, što upućuje na to da su proteini možda bolje zaštićeni od ostalih makromolekula izloženih oksidativnom stresu, što je potrebno detaljnije proučiti nekim dodatnim metodama.

Peroksidaza, zajedno s katalazom i askorbat peroksidazom, dio je staničnih puteva koji smanjuju razarajući utjecaj oksidativnog stresa na biljke. U našim pokusima pokazalo se da je aktivnost peroksidaze u kalusnom tkivu relativno stabilna u kalusnom tkivu (jedino je na najvećoj koncentraciji manitola pokazala smanjenje aktivnosti i nakon 7. i nakon 14. dana tretmana), dok su tumorska tkiva pokazala smanjenje aktivnosti na srednjim i najvišim koncentracijama soli i manitola. Usporedbom izoformi vidjeli smo da tumorsko tkivo eksprimira dvije izoforme koje nismo našli kod kalusa, što je u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Balen i sur. (2002, 2009) u kojima je tumorsko tkivo kaktusa također pokazalo veći broj izoformi u odnosu na ostala istraživana tkiva kaktusa. Kod proučavanja askorbat peroksidaze zamijetili smo povećanje aktivnosti na najnižim koncentracijama soli i manitola, kao i smanjenje kod najviših koncentracija. Analizom izoformi vidjeli smo da je broj izoenzima prisutnih u tkivu veći kod tumora nego kod kalusa. Katalaza je pokazala smanjenje aktivnosti na najvišim koncentracijama soli i manitola nakon 7 dana (s time da kalus nije pokazao smanjenje na podlogama sa soli) i na srednjim i najvišim koncentracijama nakon 14 dana. Jedina izoforma CAT koju smo detektirali na gelu je pokazala intenzitet obojenja koji je pratio podatke dobivene spektrofotometrijskim mjerenjima. Balen i sur. (2009) pokazali da su aktivnosti antioksidativnih

enzima PPX, APX i CAT bile povišene kod kalusnog i tumorskog tkiva kaktusa u odnosu na normalne izdanke, što je kao i u našem istraživanju, upućivalo na pojavu oksidativnog stresa.

Zamijetili smo da je aktivnost antioksidativnih enzima u nekim slučajevima bila blago povišena na najmanjim koncentracijama soli i manitola, što jako lijepo demonstrira aktivaciju antioksidativnog sustava u odgovoru na stres koji je prouzročila sol ili manitol dodan u podlogu. Također, kod svih antioksidativnih enzima zamijetili smo smanjenje aktivnosti na najvišim koncentracijama soli i manitola, što upućuje na to da su te koncentracije – 350 mM NaCl i 700 mM manitol – vjerojatno bile previsoke da bi se biljka mogla obraniti od stresa koji uzrokuju. Rezultat toga je propadanje biljnog tkiva, prevelika oštećenja makromolekula te smanjena sinteza, a samim tim i funkcija istraživanih enzima, a to se očituje u smanjenju njihove aktivnosti. Izoforme PPX i APX koje su detektirane kod tumora, ali ne i kod kalusa, vjerojatno su rezultat transformacije tkiva kaktusa bakterijom *A. tumefaciens* i ugradnje Ti-plazmida u biljni genom (Krsnik-Rasol 1991).

Iako ne spadaju u antioksidativne enzime, esteraze smo ubacili u istraživanje jer su u tkivu kaktusa prisutne u vrlo velikom broju izoenzima i s vrlo velikom aktivnošću (Balen 2002.; Balen i sur., 2004). Tijekom proučavanja aktivnosti esteraza primjetili smo nešto drugačije ponašanje u odnosu na antioksidativne enzime (PPX, APX i CAT). Zanimljivo je da su pokazale kako je na njih, od svih ispitanih enzima, oksidativni stres koji je izazvala sol i manitol u podlozi imao najmanji utjecaj. Aktivnost u kalusnom tkivu bila nepromijenjena i nakon 7. i nakon 14. dana tretmana bez obzira na primijenjenu koncentraciju soli i manitola. U svome radu Bekheet i sur. (2006) su istraživali utjecaj solnog stresa na uzorak izoesteraza u vrsti *Allium cepa* L., gdje su pokazali da je povišena esterazna aktivnost povezana sa poboljšanom tolerancijom biljaka na sol. Još zanimljivije je da se tumorsko tkivo, koje načelno ima jaču ekspresiju esteraza od kalusa (Balen i sur., 2004), pokazalo osjetljivijim na srednje i najviše koncentracije NaCl-a i manitola. Ovi rezultati čine se posebno zanimljivi jer pokazuju da tkivo kaktusa, osobito kalusa,

nije u potpunosti nekrotično na visokim koncentracijama soli i manitola, kako bi se moglo zaključiti iz smanjene aktivnosti PPX, APX i CAT već da se biljka na neki način ipak prilagodi stresu i živi s njim. Analiza izoenzima pokazala je zanimljive razlike u ekspresiji istih izoformi nakon različitih tretmana (izoforme EST 5 i 11 kod kalusa i EST3, 6-11), što ukazuje na to da različite koncentracije soli i manitola kod ovih tkiva izazivaju gašenje nekih izoformi inače normalno prisutnih u kontrolnim tkivima kao rezultat postepenog razaranja tkiva uslijed djelovanja oksidativnog stresa.

5.3 Promjene u proteinskoj slici kiselih topivih proteina nakon izlaganja biljaka stresnim uvjetima

Kao direktni produkti gena, proteini odražavaju ekspresiju gena specifično s obzirom na različita tkiva, tako da promjene u proteinskoj slici direktno pokazuju razlike u aktivnosti gena (Balen 2002), koje, između ostalog, mogu biti rezultat različite sposobnosti prilagodbe tkiva na stresne faktore, kao i varijacije u količini stresnih faktora koji u danom trenutku djeluju na biljku. Budući da smo, prateći određene biokemijske parametre, primijetili da najniže primijenjene koncentracije soli manitola djeluju pozitivno tj. stimulirajuće na razvoj biljke, a već srednja ispitana koncentracija NaCl-a i manitola je djelovala negativno, odlučili smo upravo srednju koncentraciju istražiti nakon izlaganja biljke kratkotrajnom solnom i osmotskom stresu.

Nakon kratkotrajnog stresa od 15 minuta nismo zamijetili velike razlike u ekspresiji ukupnih proteina kao ni proteina ASR1, što je bilo i za očekivati jer je vrijeme tretmana bilo prekratko da bi se pokrenula sinteza novih proteina. U tako kratkom vremenu bi eventualno mogli izmjeriti razlike u količini mRNA koja kodira za te proteine, što u ovom istraživanju nismo radili. Iako smo očekivali da vjerojatno neće biti razlike u ekspresiji proteina nakon 15 min, tretman smo izveli jer smo željeli pratiti posttranslacijsku modifikaciju proteina, pošto je prvi i najbrži odgovor na promijenu uvjeta na razini proteina njihova modifikacija, posebno njihova

fosforilacija, odnosno defosforilacija. U našem eksperimentu opazili smo da je već nakon 15 min kod svih tretmana došlo do izraženije fosforilacije proteina veličine od oko 40 i 35 kDa (od čega vrpca oko 40 kDa odgovara veličini jednoj od izoformi proteina ASR1), posebno kod tretmana tkiva tumora NaCl-om. Kod tretmana od 3 sata se činilo kao da je kalus tretiran manitolom imao jaču ekspresiju u odnosu na kontrolu, ali je boja Sypro Ruby pokazala da smo u tu jažicu, kao i kod kontrole tumora, nanijeli preveliku količinu proteina što je vrpčama dalo lažni intenzitet, tako da je jedino tumor tretiran manitolom pokazao veći stupanj fosforilacije. U odnosu na tretman 15 min, kod tretmana 3 sata možemo zamijetiti dvije nove vrpce koje nisu eksprimirane kod tretmana 15 min – kasnije su se fosforilirale/modificirale, a kod 15 min se vidi vrpca koje nema u tretmanu 3 sata, što ukazuje na defosforilaciju proteina, a dokaz je da već kratkotrajni stres poput 15 min i 3 h dovodi do drastičnih promjena u strukturi proteina.

U prijašnjim studijama pokazano je da se razine proteina ASR1 i njegove mRNA povećavaju nakon izlaganja solnom i osmotskom stresu (Amitai-Zeigerson i sur., 1995). Prema Kalifa i sur. (2004), substancična lokalizacija ASR1 proteina je jednom trećinom jezgrena, dok je ostatak raspršen u citoplazmi. Kako je pokazano da je ASR1 protein koji sadrži DNA veznu domenu (Kalifa i sur., 2004), smatra se da ima funkciju regulacije ekspresije određenih gena što zahtjeva njegovu prisutnost u jezgri. Prema tome, translokacija proteina između citoplazme i jezgre je mogući način regulacije proteina, preko procesa fosforilacije i glikozilacije. Trenutno su u fazi istraživanja koja ukazuju na pojačanu fosforilaciju proteina ASR1 prilikom izlaganja biljke abiotičkom, posebice solnom stresu (Bar-Zvi, usmeno priopćenje), što je djelomična potvrda našim rezultatima.

U prijašnjim studijama Balen (2002) pokazala je kako se glikozilacijska slika kaktusa mijenja tijekom diferencijacije stanica. Vizualizacijom glikoziliranih proteina pomoću boje Pro Q Emerald te lektina ConA i GNA nakon tretmana 15 minuta otkrili smo da se

ekspresija glikoziliranih proteina povećala kod tretmana obje vrste tkiva manitolom. Tretman 3 sata je pokazao smanjenje stupnja glikozilacije kod tkiva tumora tretiranih manitolom i povećanje kod tkiva tretiranih NaCl-om, što upućuje na to da se i glikozilacija, kao i fosforilacija, mijenja čak i nakon kratkotrajnog izlaganja biljke stresu zbog sposobnosti biljke da modificira proteine u vrlo kratkom vremenskom roku kako bi što više smanjila štetni utjecaj stresa na staničnim razinama. Trenutno se malo zna o utjecaju abiotičkog stresa na glikozilaciju proteina. Na primjer, mutacija u STT3, koji kodira esencijalnu podjedinicu kompleksa oligosaharil transferaze koja je odgovorna za N-glikozilaciju proteina, povećala je toleranciju na solni i osmotksi stres, što ukazuje na činjenicu da je glikozilacija proteina neophodna za toleranciju na stres (Koiwa i sur., 2003).

6 Zaključak

Na temelju provedenog istraživanja možemo zaključiti sljedeće:

1. Solni i osmotski stres imali su utjecaja na metabolizam tkiva kalusa i tumora, i to u različitoj mjeri u odnosu na korištene podloge – koncentracije stresnih faktora.
2. Udio MDA je pokazao da je tkivo tumora osjetljivije na prisutnost stresa od kalusnog tkiva, dok su rezultati mjerenja karbonila dali naslutiti da su proteini ipak najmanje pogođeni razaranjem uzrokovanim djelovanjem stresa.
3. Aktivnost antioksidativnih enzima i njihovi izoenzimi bili su u skladu i pokazali su najnižu aktivnost kod najviših koncentracija soli kao rezultat nemogućnosti prilagodbe tkiva na prevelik utjecaj stresa, s povremenim povećanjem aktivnosti na najnižim koncentracijama soli i manitola kao stimulativnim podlogama.
4. SDS-elektroforezom malih kiselih proteina uočili smo da već kratkotrajni stres utječe na promjene u proteinima u vidu glikozilacija i fosforilacija koje su mogući načini regulacije gena kao odgovor na stresne uvjete.

7 Zahvale

Ovim putem zahvaljujemo cijelom timu koji radi u labosu za Elektroforezu proteina Zavoda za molekularnu biologiju na volji i želji da nam pokažu i da nas nauče.

Posebne zahvale idu dipl. ing Petri Peharec na volji za ostajanjem na faksu do kasnih sati i dolaženjem subotom kako bi stigli napraviti rad na vrijeme, i doc. dr. sc. Biljani Balen na neizmjernom razumijevanju, podršci u vrlo kasnim satima i čeličnim žvcima.

8 Popis literature

- Amitai-Zeigerson H., Scolnik P.A. & Bar-Zvi D. (1995) Tomato *Asr1* mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. *Plant Science* **110**, 205–213
- Balen B, (2002) Proteinski biljezi morfogeneze u kulturi tkiva kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff. Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu
- Balen B., Krsnik-Rasol M., Simeon-Rudolf V. (2003) Isoenzymes of peroxidase and esterase related to morphogenesis in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. tissue culture. *J. Plant Physiol.* **160**, 1401–1406
- Balen B., Krsnik-Rasol M., Zadro I., Simeon-Rudolf V. (2004) Esterase activity and isoenzymes in relation to morphogenesis in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. tissue culture *Acta Bot. Croat.* **63** (2), 83–91
- Balen B., Tkalec M., Pavoković D., Pevalek-Kozlina B., Krsnik-Rasol M. (2009) Growth Conditions in In Vitro Culture Can Induce Oxidative Stress in *Mammillaria gracilis* Tissues *J Plant Growth Regul* **28**:36–45 DOI 10.1007/s00344-008-9072-5
- Bekheet S.A.; Taha H.S. and Solliman M.E. (2006) Salt tolerance in tissue culture of onion (*Allium cepa* L.) *Arab J. Biotech. Vol. 9, No. (3) Oct. (2006): 467-476.*
- Blumwald, E. (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 431–434
- Bohnert, H. J. and Shen, B. (1999) Transformation and compatible solutes. *Sci. Hortic.* **78**, 237–260
- Bohnert, H. J. and Sheveleva, E. (1998) Plant stress adaptations – making metabolism move. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 267–274
- Bor M., Ozdamir F., Tuřkan I., The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L., *Plant Sci.* **164** (2003) 77–84.
- Bowler C., Van Montagu M., and Inze´ D. (1992), Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 83-116.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248–254
- Bray E.A. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**, 48–54.

Cassells AC, Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 64: 145–157

Dewir YH, Chakrabarty D, Ali MB, Hahn EJ, Paek KY (2006) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia milli* hyperhydric shoots. *Environ Exp Bot* 58:93–99

Dodd A., Borland A., Haslam R., Griffiths H., and Maxwell K. (2002), Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. *J. Exp. Bot.* **53**, 569-580.

Foyer C. H. and Noctor G. (2001), Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol.* **146**, 359-388

Franck T, Kevers C, Gaspar T, Dommes J, Deby C, Greimers R, Serteyn D, Deby-Dupont G (2004) Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. *Plant Physiol Biochem* 42:519–527

Gaspar T, Kevers C, Bisbis B, Franck T, Crevecoeur M, Greppin H, Dommes J (2000) Loss of plant organogenic totipotency in the course of in vitro neoplastic progression. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:171–181

George EF (1996) Plant propagation by tissue culture. Part 2. The practice, 2nd edn. Exegetics Ltd., Edington, UK, p 1361

Go´mez J.M., Herna´ndez J.A., Jime´nez A., del Rio L.A., Sevilla F., Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants, *Free Radical Res.* 31 (1999) S11–S18.

Gossett D.R., Banks S.W., Millhollon E.P., Cran Lucas M., Antioxidant response to NaCl stress in a control and a NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, buthionine sulfoximine and exogenous glutathione, *Plant Physiol.* 112 (1996) 803–809.

Grams T. and Thiel S. (2002), High light-induced switch from C3-photosynthesis to Crassulacean acid metabolism is mediated by UV-A/blue light. *J. Exp. Bot.* **53**, 1475-1483.

Gribble K (1999) The influence of relative humidity on vortification, growth and morphology of *Gypsophila paniculata* L. *Plant Growth Regul* 27: 179–188

Gueta-Dahan Y., Yaniv Z., Zilinskas B.A., Ben-Hayyim G., Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus, *Planta* 203 (1997) 460–469.

Hare, P. D., Cress, W. A. and Van Staden, J. (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* **21**, 535–553

Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K. & Bonhert H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 463–499.

- Hernańdez J.A., Almansa M.S., Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea plants, *Physiol. Plant.* 115 (2002) 251–257.
- Hernańdez J.A., Campillo A., Jiméñez A., Alarcón J.J., Sevilla F., Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants, *New Phytol.* 141 (1999) 241–251.
- Hernańdez J.A., Corpas F.J., Gońmez M., del Río L.A., Sevilla F., Salt induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria, *Physiol. Plant.* 89 (1993) 103–110.
- Hernańdez J.A., Jiméñez A., Mullineaux P.M., Sevilla F., Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses, *Plant Cell Environ.* 23 (2000) 853–862.
- Hernańdez J.A., Olmos E., Corpas F.J., Gońmez M., Sevilla F., del Río L.A., Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants, *Plant Sci.* 105 (1995) 151–167.
- Iusem N.D., Bartholomew D.M., Hitz W.D. & Scolnik P.A. (1993) Tomato (*Lycopersicon esculantum* L.) transcript induced by water deficit and ripening. *Physiologia Plantarum* **102**, 1353–1354.
- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C. and Kjellbom, P. (2000) The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance, *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 324–342
- Kalifa Y., Perlson E., Gilad A., Konrad Z., Scolnik P.A., Bar-Zvi –D.(2004) Over-expression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. *Plant, Cell and Environment* (2004) **27**, 1459–1468
- Kalifa Y., Zaccari M., Gilad A., Konrad Z., Scolnik P.A., Bar-Zvi –D.(2004) The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochem. J.* (2004) **381**, 373–378 (Printed in Great Britain)
- Kawasaki S., Borchert C., Deyholos M., Wang H., Brazille S., Kawai K., Galbraith D. & Bohnert H.J. (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* **13**, 889–905.
- Koiwa H, Li F, McCully MG, Mendoza I, Koizumi N, Manabe Y, Nakagawa Y, Zhu JH, Rus A, Pardo JM, Bressan RA, Hasegawa PM (2003) The STT3a subunit isoform of the arabidopsis oligosaccharyltransferase controls adaptive responses to salt/osmotic stress. *Plant Cell* 15: 2273-2284
- Krsnik-Rasol, M. (1991) Peroxidase as a developmental marker in plant tissue culture. *Int. J. Dev. Biol.* **35**, 259-263
- Krsnik-Rasol M, Balen B (2001) Electrophoretic protein patterns and peroxidase activity related to morphogenesis in *Mammillaria gracilis* tissue culture. *Acta Bot Croat* 2:219–226
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–68

Lüttge U. (1993), The role of crassulacean acid metabolism (CAM) in the adaptation of plants to salinity. *New Phytol.* **125**, 59-71.

Malda G, Backhaus RA, Martin C (1999) Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of in vitro cultured cactus. *Plant Cell Tiss Org Cult* 58:1–9

Mangolin CA, Prioli AJ, Machado MFPS (1997) Isozyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochem Genet* 35: 189–204

McWilliam, J. R., 1986: The national and international importance of drought and salinity effects on agricultural production. In: C. N. Turner, and B. J. Passioura (eds), *Plant Growth, Drought and Salinity*, pp. 1–13. CSIRO, Canberra, Australia.

Mitova V., Volokita M., Guy M., Tal M., Activities of SOD and ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennelli*, *Physiol. Plant.* 110 (2000) 42–51.

Mittler R, Zilinskas BA (1993) Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal Biochem* 212:540–546

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–479

Murillo-Amador B., Corte-As-Avila A., Troyo-Die-Águez E., Nieto-Garibay A. and Jones H.G. (2001) Effects of NaCl Salinity on Growth and Production of Young Cladodes of *Opuntia ficus-indica*. *J. Agronomy & Crop Science* 187, 269-279

Olmos E., Hernández J.A., Sevilla F., Hellín E., Induction of several antioxidant enzymes in the selection of a salt-tolerant cell line of *Pisum sativum*, *J. Plant Physiol.* 144 (1994) 594–598.

Piqueras A., Hernández J.A., Olmos E., Hellín E., Sevilla F., Changes in antioxidant (CT) enzymes and organic solutes associated with adaptation of citrus cells to salt stress, *Plant Cell Tiss. Org. Culture* 45 (1996) 53–60.

Poljuha D, Balen B, Bauer A, Ljubesčić N, Krsnik-Rasol M (2003) Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracilis* (Cactaceae) in in vitro culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 75:117–123

Rock, C. D. (2000) Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.* **148**, 357–396

Saher S, Piqueras A, Hellin E, Olmos E (2004) Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiol Plant* 120:152–161

Saher S, Fernández-García N, Piqueras A, Hellin E, Olmos E (2005) Reducing properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and normal carnation shoots cultured in vitro: a hypoxia stress? *Plant Physiol Biochem* 43:573–582

Schuch U.K. and Kelly J.J. (2008) Salinity Tolerance of Cacti and Succulents. *Turfgrass, Landscape and Urban IPM Research Summary*, (P-155), January 2008

Shinozaki K. & Yamaguchi-Shinozaki K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 217–223.

Silva-Ortega C.O., Ochoa-Alfaro Ana E., Reyes-Aguero Juan A., Aguado-Santacruz Gerardo A., Jimenez-Bremont Juan F. (2008) Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiology and Biochemistry* **46** (2008) 82-92

Vranova E., Inze´ D., and Breusegem F. (2002), Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* **53**, 1227-1236.

Wang H., Miyazaki S., Kawai K., Deyholos M., Galbraith D.W. & Bohnert H.J. (2003) Temporal progression of gene expression responses to salt shock in maize roots. *Plant Molecular Biology* **52**, 873–891.

Woodbury WA, Spencer K, Stahlmann MA (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem* **44**:301–305

Xiong, L. and Zhu, J. K. (2001) Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. *Physiol. Plantarum* **112**, 152–166

9 Sažetak

Tea Rogić i Matija Šimac

Utjecaj solnog i osmotskog stresa na kaktus *Mammillaria gracilis* Pfeiff. u kulturi *in vitro*

Tkiva kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff. u kulturi *in vitro* rastu spontano u obliku neorganiziranog kalusa i to bez ikakvih dodataka regulatora rasta, zbog čega su pogodni za uspoređivanje sa tumorskim linijama transformiranim *Agrobacterium tumefaciens*. Cilj ovog istraživanja bio je vidjeti kako kalusna i tumorska tkiva reagiraju na prisutnost solnog i osmotskog stresa, i to proučavanjem biokemijskih markera (MDA i karbonila) i antioksidativnih enzima kao indikatora oksidativnog stresa te proučavanjem uzoraka izoformi antioksidativnih enzima kao i proteinske slike malih kiselih proteina i njihovih posttranslacijskih modifikacija. Aktivnost enzima mjerena je spektrofotometrijski i pokazala je smanjenje kod najviših koncentracija soli i manitola korištenih u pokusu, kao i povremenu stimulaciju tkiva na najnižim koncentracijama soli i manitola. Slika izoenzima i njihova aktivnost proučavana je elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u nativnim uvjetima. Pokazalo se da tkiva ekspimiraju razne izoforme antioksidativnih enzima, kao i esteraza, kako zbog utjecaja Ti-plazmida ugrađenog transformacijom, tako i kao rezultat utjecaja stresnih faktora u vidu smanjenja sinteze i ekspresije nekih izoformi. Elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima te tretiranjem membrana lektinima ConA i GNA, kao i bojama Pro Q Emerald i Diamond, vidjeli smo da već kratkotrajni stres izaziva posttranslacijske modifikacije kod tkiva tretiranih soli i manitolom kao prve reakcije tkiva na stres, što skupa sa jasno vidljivom ekspresijom proteina ASR1 i mjerenjima aktivnosti enzima i njihovih izoformi, jasno upućuje na prisutnost oksidativnog stresa koji je rezultat soli i manitola u podlogama.

Ključne riječi: kaktus, *Mammillaria gracilis*, tumor, habituirani kalus, oksidativni stres, antioksidativni enzimi, malondialdehid (MDA), protein karbonili, protein ASR1

10 Summary

Tea Rogić i Matija Šimac

Effects of salt and osmotic stress on cactus *Mammillaria gracilis* Pfeiff cultivated *in vitro*

Cactus *Mammillaria gracilis* Pfeiff., cultivated *in vitro*, grows spontaneously without the addition of any growth regulators, producing unorganized calli, which makes them convenient for comparison with tumor tissues produced by transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. The goal of this study was to determine how calli and tumor tissues respond to salt and osmotic stress through studying treatment-specific content of biochemical markers (MDA and carbonyl) and the activity of antioxidative enzymes and their isoforms as indicators of oxidative stress, and through analyzing the expression of small acid proteins and their posttranslational modifications. Activity of the enzymes was measured spectrophotometrically and has shown a decrease at the lowest concentration of salt and manitol, but has also occasionally shown to be stimulated with the lowest concentrations of salt and manitol. Isoenzyme patterns and their activity was studied with polyakrilamide-gel electrophoresis in native conditions, and those assays showed multiple tissue- and treatment-specific isoforms. SDS-PAGE of the small acid proteins, together with the treatment of membranes after Western blots with ConA and GNA lectins and Pro Q Diamond and Emerald gel stains, shows that already the short-term stress induces posttranslational modifications in tissues treated with salt and manitol, which together with the clearly visible expression of ASR1 proteins clearly indicates presence of oxidative stress resulted from the presence of salt and manitol in the medium.

Key words: cactus, *Mammillaria gracilis*, tumor, habituated callus, oxidative stress, antioxidative enzymes, malondialdehyd (MDA), protein carbonyl, ASR1protein