

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Borut ŠVAL

**VPLIV OSKRBE Z VODO NA PROTEOLITIČNO  
AKTIVNOST V LISTIH FIŽOLA IN AFRIŠKE  
VIJOLICE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Borut ŠVAL

**VPLIV OSKRBE Z VODO NA PROTEOLITIČNO AKTIVNOST V  
LISTIH FIŽOLA IN AFRIŠKE VIJOLICE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF WATER AVAILABILITY ON PROTEOLYTIC  
ACTIVITY IN BEAN  
AND AFRICAN VIOLET LEAVES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Odseku za biokemijo in molekularno biologijo Inštituta »Jožef Stefan« v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Blaža Cigića, za somentorico dr. Marjetko Kidrič in za recenzenta doc. dr. Rajka Vidriha.

Mentor: doc. dr. Blaž Cigić

Somentor: dr. Marjetka Kidrič

Recenzent: doc. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Borut Šval

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 577.152.34: 581.5: 635.652: 582.916.61(043)=163.6

KG encimi/ cisteinske proteaze/ fiziologija rastlin/ stres/ vodni stres/ suša/ poplava/ fižol/  
*Phaseolus vulgaris*/ afriška vijolica/ *Saintpaulia ionantha*/ encimska aktivnost/ encimski  
inhibitorji

AV ŠVAL, Borut

SA CIGIČ, Blaž (mentor)/ KIDRIČ, Marjetka (somentorica)/ VIDRIH, Rajko (recenzent)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

LI 2008

IN VPLIV OSKRBE Z VODO NA PROTEOLITIČNO AKTIVNOST V LISTIH FIŽOLA  
IN AFRIŠKE VIJOLICE

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP IX, 58 str., 8 pregl., 13 sl., 62 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Proteolitični encimi imajo velik pomen v razvoju rastlin, saj so vključeni v procese aktivacije proteinov in njihove razgradnje. Motena oskrba z vodo predstavlja za rastlino določen stres na katerega se odzove tudi s spremembo proteolitične aktivnosti. Ugotavljali smo vpliv vodnega stresa na aktivnost peptidaz v listih fižola *Phaseolus vulgaris* in afriške vijolice *Saintpaulia ionantha*. Študijo inhibicije smo izvajali na treh poskusnih skupinah rastlin fižola: rastlinah, ki so rasle na polju, rastlinah, ki so bile izpostavljene suši in rastlinah, ki so bile izpostavljene poplavi. Med preizkušanimi substrati je bila v prisotnosti reducenta proteolitična aktivnost v ekstraktih iz listov fižola povečana le na substrata Z-Arg-Arg-pNA in Z-Phe-Arg-pNA. Maksimum encimske aktivnosti na substrat Z-Phe-Arg-pNA smo določili pri pH 10. Med tremi inhibitorji, ki smo jih uporabili (E-64, Pefabloc SC in EDTA), je bila encimska aktivnost inhibirana le z E-64, pri vseh treh skupinah rastlin, kar pomeni, da večino proteolitične aktivnosti lahko pripišemo cisteinskim peptidazam. Proteolitična aktivnost na substrat azokazein se je v primerjavi s kontrolo povečala tako v suši kot v poplavi. V ekstraktih listov rastlin, ki so rasle na polju, pa je bila, v celotnem območju preizkušanih pH vrednosti, celo manjša kot v odsotnosti reducenta. Vsi trije uporabljeni inhibitorji so zavrli le majhnen del aktivnosti. V listih afriške vijolice smo v primerjavi s fižolom določili večjo vsebnost aminopeptidaz, ki razgrajujejo substrat L-levcin-p-nitroanilid. Izmerjena endopeptidazna aktivnost je bila precej manjša kot pri fižolu.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 577.152.34: 581.5: 635.652: 582.916.61(043)=163.6

CX enzymes/ cysteine proteases/ plant physiology/ stress/ water stress/ drought/ flood/ bean/  
*Phaseolus vulgaris*/ african violet/ *Saintpaulia ionantha*/ enzyme activity/  
enzyme inhibitors

AU ŠVAL, Borut

AA CIGIĆ, Blaž (supervisor)/ KIDRIČ, Marjetka (co-advisor)/ VIDRIH, Rajko (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and  
Technology

PY 2008

TI INFLUENCE OF WATER AVAILABILITY ON PROTEOLYTIC ACTIVITY IN  
BEAN AND AFRICAN VIOLET LEAVES

DT Graduation thesis (University studies)

NO IX, 58 p., 8 tab., 13 fig., 62 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Proteolytic enzymes have an important role in plant development, as they are involved in processes of protein's activation and in their breakdown. Disturbed water balance is a stress for plants and the change in proteolytic activity is a part of their adaptive response. Influence of water stress on proteolytic activity in leaves of plane bean *Phaseolus vulgaris* and African violet *Saintpaulia ionantha* was studied. Activity and inhibition studies were performed on three groups of bean plants: field plants, plants under drought and plants under flood. Among tested substrates, proteolytic activity in the extracts of bean leaves, was increased in the presence of reducing agent, only for Z-Arg-Arg-pNA and Z-Phe-Arg-pNA. Enzymatic activity of Z-Phe-Arg-pNA substrate hydrolysis, had its maximum at pH 10. Among the three inhibitors applied (E-64, Pefabloc SC and EDTA), E-64 inhibited some of the activity in the leaf extracts of all three groups of plants, indicating that majority of activity can be attributed to cysteine peptidases. In comparison to control, proteolytic activity of asocasein substrate was increased under drought or flood conditions. In the whole testing pH range, the activity in the leaf extracts of bean plants, grown on field, was even lower in the presence of reducing agent. All the inhibitors applied inhibited only a small percent of proteolytic activity. In the leaf extracts of African violet more aminopeptidase activity against L-leucine-p-nitroanilide substrate was determined in comparison to the bean. Determined endopeptidase activity was essentially lower.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 POMEN VODNEGA STRESA ZA RASTLINE .....	2
<b>2.1.1 Pomanjkanje vode .....</b>	<b>2</b>
2.1.1.1 Načini prilagoditve rastlin na pomanjkanje vode .....	3
2.1.1.2 Odziv na biokemijskem nivoju .....	4
2.1.1.2.1 Odziv na pomanjkanje vode .....	4
2.1.1.2.1.1 Potencialna vloga proteinov izraženih med sušnim stresom .....	6
2.1.1.2.2 Poplavljanje .....	7
2.1.1.2.2.1 Odziv na poplavljanje .....	8
2.2 CISTEINSKE PEPTIDAZE IN NJIHOVI INHIBITORJI V RASTLINAH .....	9
2.2.1 Proteolitični encimi in njihova razdelitev .....	9
2.2.2 Inhibitorji rastlinskih peptidaz .....	11
2.2.3 Značilnosti rastlinskih cisteinskih peptidaz .....	11
2.2.4 Vloga cisteinskih peptidaz pri razvoju rastlin .....	12
2.3 CISTEINSKE PEPTIDAZE IN ODZIV RASTLIN NA STRES .....	13
2.3.1 Biotski stres .....	13
2.3.2 Abiotski stres .....	14
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>16</b>
3.1 MATERIALI .....	16
3.1.1 Rastlinski material .....	16
3.1.1.1 Kalitev semen .....	16
3.1.1.2 Vzgoja rastlin pod kontroliranimi pogoji .....	16
3.1.1.3 Vzgoja fižola na polju .....	17
3.1.1.4 Vzgoja afriške vijolice .....	17
3.1.2 Priprava listov za poskuse .....	17
3.1.2.1 Priprava ekstrakta iz listov fižola .....	17
3.1.3 Kemikalije .....	18
3.2 METODE .....	18
3.2.1 Določanje vsebnosti proteinov v ekstraktu .....	18
3.2.2 Določanje encimske aktivnosti v svežem ekstraktu .....	19
3.2.2.1 Določanje aktivnosti z azokazeinom .....	19
3.2.2.2 Določanje encimske aktivnosti z Z-Phe-Arg-pNA .....	20
3.2.3 Izdelava pH diagrama .....	20
3.2.4 Določanje deleža inhibicije encimske aktivnosti z različnimi inhibitorji .....	21
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>23</b>
4.1 VPLIV SUŠE NA CISTEINSKE PEPTIDAZE IZ LISTOV FIŽOLA SORTE ZORIN23 .....	23
4.1.1 Izbira substratov in eksperimentalnih pogojev .....	23
4.1.2 Endopeptidazne aktivnosti listnih ekstraktov na azokazein .....	24

4.1.2.1 Aktivnosti v listih rastlin, ki so rasle na polju.....	24
4.1.2.2 Vpliv inhibitorjev na azokazeinolitično aktivnost ekstraktov iz rastlin fižola sorte Zorin, ki so rasle na polju.....	25
4.1.2.3 Vpliv pomanjkanja vode na azokazeinolitično aktivnost endopeptidaz v listnih ekstraktih fižola sorte Zorin.....	26
4.1.2.4 Vpliv inhibitorjev na azokazeinolitično aktivnost listnega ekstrakta iz rastlin, ki so bile izpostavljene suši in ekstrakta iz kontrolnih rastlin.....	27
4.1.2.5 Vpliv poplavljanja na azokazeinolitično aktivnost endopeptidaz v listnih ekstraktih iz fižola sort Zorin in Češnjevec.....	28
4.1.2.6 Vpliv inhibitorjev na azokazeinolitično aktivnost ekstrakta iz fižola sorte Zorin, ki je bila izpostavljena poplavi in ekstrakta iz kontrolnih rastlin.....	29
<b>4.1.3 Endopeptidazne aktivnosti listnih ekstraktov iz fižola sorte Zorin, na Z-Phe-Arg-pNA.....</b>	<b>30</b>
4.1.3.1 Aktivnosti v listih rastlin, ki so rasle na polju.....	30
4.1.3.1.1 Aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin fižola sorte Zorin, ki so bile izpostavljene suši in poplavi, ter kontrolnih rastlin, na Z-Phe-Arg-pNA.....	34
4.1.3.1.2 Aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin, ki so bile izpostavljene poplavi in kontrolnih rastlin, na Z-Phe-Arg-pNA.....	34
4.1.3.2 Vpliv inhibitorjev na endopeptidazno aktivnost na Z-Phe-Arg-pNA, v listnih ekstraktih iz rastlin fižola sorte Zorin.....	35
<b>4.2 ENDOPEPTIDAZNA AKTIVNOST V LISTNIH EKSTRAKTIH AFRIŠKE VIJOLICE.....</b>	<b>36</b>
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>39</b>
5.2 SKLEPI.....	41
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>42</b>
<b>7 VIRI.....</b>	<b>44</b>
ZAHVALA.....	48

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Proizvajalci uporabljenih substratov in inhibitorjev .....	18
Preglednica 2: Vsebnost proteinov (mg/ml) in specifična aktivnost ( $\Delta A_{405} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ; oz. $\Delta A_{340} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ za azokazein) ekstraktov iz listov rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin, ki so rasle na polju, določena s šestimi različnimi substrati.....	23
Preglednica 3: Delež inhibicije (%) azokazeinolitične aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin, ki so rasle na polju.....	26
Preglednica 4: Delež inhibicije (%) azokazeinolitične aktivnosti listnega ekstrakta iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin, ki so rasle pod pogoji suše in ekstrakta iz kontrolnih rastlin.....	27
Preglednica 5: Delež inhibicije (%) azokazeinolitične aktivnosti listnega ekstrakta iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin, ki so bile izpostavljene poplavi in ekstrakta iz kontrolnih rastlin. ....	30
Preglednica 6: Odvisnost specifične aktivnosti ekstrakta iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin-polje (na Z-Phe-Arg-pNA), od razredčitve ekstrakta.....	31
Preglednica 7: Delež inhibicije aktivnosti (%) ekstraktov iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin, na Z-Phe-Arg-pNA.....	35
Preglednica 8: Vsebnost proteinov (mg/ml) ter specifične aktivnosti; $\Delta A_{405} \times \text{mg}_{\text{pr.}}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ za p-NA substrate in $\Delta A_{340} \times \text{mg}_{\text{pr.}}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ za azokazein, v listnih ekstraktih iz rastlin <i>S. ionantha</i> ..	36



## KAZALO SLIK

Slika 1: pH profil specifičnih azokazeinolitičnih aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin, ki so rasle na polju.....	24
Slika 2: pH profil specifičnih azokazeinolitičnih aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin, ki so rasle na polju.....	25
Slika 3: Relativne specifične azokazeinolitične aktivnosti (%) v listnem ekstraktu iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin, ki so bile izpostavljene suši in v ekstraktu iz kontrolne skupine rastlin....	27
Slika 4: Relativne specifične azokazeinolitične aktivnosti (%) v listnem ekstraktu iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin, ki so rasle pod pogoji poplave in v ekstraktu iz kontrolnih rastlin.....	28
Slika 5: pH profil specifične azokazeinolitične aktivnosti listnega ekstrakta iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Češnjevce, ki so bile izpostavljene poplavi in ekstrakta iz rastlin iste sorte, ki je rasla pod optimalnimi pogoji oskrbe z vodo. ....	29
Slika 6: pH-diagram aktivnosti ekstrakta iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin, ki so rasle na polju, na Z-Phe-Arg-pNA.....	31
Slika 7: Časovna odvisnost aktivnosti na Z-Phe-Arg-pNA v listnem ekstraktu iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin, ki so rasle na polju (z dodanim reducentom), pri pH 9,5. ....	32
Slika 8: pH-diagram aktivnosti na Z-Phe-Arg-pNA v listnem ekstraktu iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin, ki mu je bil med ekstrakcijo dodan reducent. ....	33
Slika 9: pH profil aktivnosti na Z-Phe-Arg-pNA v listnem ekstraktu iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin-polje, kateremu smo dodali reducent in brez dodatka reducenta. ....	33
Slika 10: Relativne specifične aktivnosti (%) listnih ekstraktov iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin, izpostavljenih sušnim pogojem, v primerjavi s kontrolo, na Z-Phe-Arg-pNA.....	34
Slika 11: Relativne specifične aktivnosti (%) listnih ekstraktov iz rastlin <i>P. vulgaris</i> cv. Zorin, izpostavljenih pogojem poplavljanja, v primerjavi s kontrolo, na Z-Phe-Arg-pNA.....	35
Slika 12: pH profil azokazeinolitične aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin <i>S. ionantha</i> , z in brez dodanega reducenta. ....	37
Slika 13: pH profil specifičnih azokazeinolitičnih aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin <i>S. ionantha</i> , z in brez dodanega reducenta.....	38

## SEZNAM OKRAJŠAV

ABA	abscizinska kislina (abscisic acid)
ABRE	angl. abscisic acid response element
ACC	1-aminociklopropan-1-karboksilna kislina
APNA	L-alanin- <i>p</i> -nitroanilid (L-alanine- <i>p</i> -nitroanilide)
A <sub>330</sub>	absorbanca pri valovni dolžini 330 nm (absorbance at 330 nm)
A <sub>405</sub>	absorbanca pri valovni dolžini 405 nm (absorbance at 405 nm)
BAPNA	N-benzoil-L-arginin- <i>p</i> -nitroanilid (N-benzoyl-L-arginine- <i>p</i> -nitroanilide)
BSA	goveji serumski albumin (bovine serume albumine)
Da	Dalton (Dalton); enota za določanje molekulske mase
DRE	angl. drought response element
DTT	ditiotreitrol (dithiothreitol)
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina (ethylenediamine tetra-acetic acid)
E-64	E-64 (L-3-carboxy-2,3-trans-epoxypropionyl-leucylamido (4-guanidino) butane)
HOG	angl. high osmolarity glycerol
LEA-proteini	proteini, ki se v večjih količinah pojavljajo v pozni embriogenezi (Late Embryogenesis Abundant Proteins)
LPNA	L-levcin- <i>p</i> -nitroanilid (L-leucin- <i>p</i> -nitroanilide)
M	molarnost (molarity); enota za množinsko koncentracijo [mol/L]
Pa	paskal (pascal); enota za merjenje pritiska [N/m <sup>2</sup> ]
pI	izoelektrična točka (isoelectric point)
PMSF	fenilmetilsulfonyl-fluorid (phenylmethylsulphonyl fluoride)
PP	fosfatni pufer (phosphate buffer)
PVP	polivinilpirolidon (polyvinyl pyrrolidone)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (reactive oxydative species)
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	N-benzoil-sukcinat-alanin-alanin-prolin-fenilalanin- <i>p</i> -nitroanilid
TCA	trikloroocetna kislina (trichloroacetic acid)
Z-Arg-Arg-pNA	N-benzoil-arginin-arginin- <i>p</i> -nitroanilid
Z-Phe-Arg-MCA	N-benzoil-fenilalanin-arginin-metilkumaril-amid
Z-Phe-Arg-pNA	N-benzoil-fenilalanin-arginin- <i>p</i> -nitroanilid

## 1 UVOD

Proteolitični encimi imajo velik pomen v razvoju rastlin, od kalitve in rasti do staranja listov, saj omogočajo razgradnjo proteinov, ki je pomembna stopnja v kontroli njihovega delovanja in presnove. Peptidaze so vpletene tudi v odziv rastlin na abiotski in biotski stres (Brzin in Kidrič, 1995). Vse več je podatkov o vplivu pomanjkanja vode na izražanje genov, ki jih kodirajo, kakor tudi na njihove dejanske aktivnosti (Ingram in Bartels, 1996; Hieng in sod., 2004; Bartels in Sunkar, 2005), vendar je naše védenje še vedno v začetni fazi. Študije vpliva poplavljanja na proteolitične aktivnosti pa niso znane.

Za naše delo smo izbrali fižol (*Phaseolus vulgaris*) in afriško vijolico (*Saintpaulia ionantha*). Fižol je v prehrani zelo pomembna poljščina, ki je razmeroma občutljiva na sušo v primerjavi z drugimi zrnatimi stročnicami. S študijem afriške vijolice želimo pridobiti potrebno osnovo za preučevanje proteolitičnih encimov v poikilohidrični rastlini *Ramonda serbica*, ki tolerira izsušitev in pripada isti družini.

Dosedanje raziskave kažejo na vpletenost različnih endopeptidaz v odzivu teh dveh rastlin na pomanjkanje vode (Hieng in sod., 2004; Šoštarč, 2005), so pa omejene na podatke o spremembah proteolitičnih aktivnosti v listnih ekstraktih določenih samo z nekaterimi substrati. Le-ti so izpostavili serinske endopeptidaze podobne tripsinu. Za določitev proteolitičnih encimov drugačnega tipa, na katere tudi mogoče vpliva suša, je potrebno uporabiti še druge substrate in dodati reducent, s katerim aktiviramo cisteinske peptidaze. Tak pristop lahko pokaže tudi možen vpliv poplavljanja na proteolitično aktivnost.

### 1.1 NAMEN DELA

- z uporabo dveh različnih substratov in treh različnih tipov inhibitorjev peptidaz ugotoviti kako oskrba z vodo vpliva na proteolitično aktivnost v listih fižola (*Phaseolus vulgaris* cv. Zorin) in afriške vijolice (*Saintpaulia ionantha*);
- z merjenjem aktivnosti pri različnih pH vrednostih, v prisotnosti in odsotnosti inhibitorjev, določiti pH profil in vrsto proteolitične aktivnosti, ter tako določiti pogoje spremljanja proteolitične aktivnosti v postopkih izolacije posameznih encimov.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da se v listih fižola nahaja več peptidaz na katere vpliva oskrba z vodo, ter da bomo s primerjavo različnih proteolitičnih aktivnostih v listih kontrolnih in stresiranih rastlin uspeli detektirati določene razlike. Rezultati naloge bodo predstavljali izhodišče za izbiro ustreznih metod spremljanja proteolitične aktivnosti encimov, na katere vpliva vodni stres.

## 2 PREGLED OBJAV

Pregled objav vsebuje navedbe iz virov, ki so po svoji vsebini neposredno povezani s temo te diplomske naloge. Objave bom razdelil na tiste, ki obravnavajo odziv rastlin na pomanjkanje vode in tiste, ki obravnavajo odziv rastlin na presežek količine vode v njihovi okolici, pri čemer bo skupno izhodišče delovanje cisteinskih peptidaz.

### 2.1 POMEN VODNEGA STRESA ZA RASTLINE

Rastline tekom svojega življenjskega obdobja pogosto naletijo na spremembe v okolju, ki vplivajo na njihovo nadaljnjo rast in razvoj. Posledica sprememb, je lahko stresno stanje rastline.

V splošnem poznamo več stresnih dejavnikov, ki lahko vplivajo na razvoj rastlin. Ti lahko izvirajo iz nežive narave (abiotski dejavniki) ali pa iz žive narave (biotski dejavniki). Abiotski stresni dejavniki so: poplava, suša, slanost tal, pomanjkanje mineralov v tleh, pomanjkanje kisika v okolju, temperaturne spremembe okolja, premalo ali preveč svetlobe, onesnaženje okolja. Biotski stresni dejavniki pa so: prisotnost za rastline patogenih mikroorganizmov, virusov in insektov.

Pojem vodnega stresa je v literaturo uvedel že Larcher (Larcher, 1987), ki opredeljuje stresno stanje kot od normalnega različno fiziološko stanje rastline, ki nastopi pod vplivom delovanja poplave in suše.

Poleg suše in poplave, so v rastlinah raziskani še: procesi povezani s previsokimi oz. prenizkimi temperaturami okolja, učinek prekomernega obsevanja s sončno svetlobo, vplivi reaktivnih kisikovih zvrsti, pomanjkanje in presežek mineralov in povečana slanost v okolju rastline (Bray in sod., 2000).

Spremenjen vodni režim okolja, je najbolj pogost vzrok za propadanje rastlin v naravi, zato je tudi suša med najbolj preiskovanimi stresnimi dejavniki. Ostali dejavniki so seveda tudi pomembni, vendar jih bom v tem diplomskem delu izpustil iz obravnave.

Stresno stanje rastlin v naravi, ima lahko več vzrokov oz. je lahko rezultat delovanja več stresnih dejavnikov hkrati, zato je mnogokrat težko pripisati takšno stanje rastline zgolj enemu izmed vseh možnih dejavnikov. Pri preučevanju posameznega stresa, kot je pomanjkanje vode, zato izvajamo kontrolirano gojenje rastlin, ki vključuje izolacijo rastlin od nekaterih zunanjih vplivov okolja (izognemo se večjim temperaturnim spremembam, vplivu insektov, i.p.d.) in selekcijo rastlin (izločimo rastline, ki kažejo bolezenske znake ali pa so se nenormalno razvile), s čimer delovanje ostalih stresnih dejavnikov omejimo.

#### 2.1.1 Pomanjkanje vode

Pomanjkanje vode v okolju je posledica pomanjkanja padavin in segrevanja površine zemlje s sevanjem sončnih žarkov, ki povzroči izhlapevanje vode s površine. Če se voda ne nadomesti s padavinami, se količina vode v zemlji in zraku zmanjša.

Obdobje suše nastopi ko je količina padavin, ki je značilna za neko področje na zemeljskem površju, manjša od za to območje normalne količine padavin.

Dolgoročne posledice suše se kažejo v splošnem upadanju količine pridelka glavnih kulturnih rastlin in v slabši preživelosti rastlinskih vrst nasploh (razen redkih izjem), zato je vpliv suše na rastline že dolgo predmet raziskav.

Kratkoročna posledica suše pa je stresno stanje rastline, ki nastopi kadar je količina vode, ki se porablja pri transpiraciji, večja od količine vode, ki jo lahko rastlina istočasno privzame iz okolja, in traja, dokler ta negativna vodna bilanca ne doseže tiste mejne vrednosti relativne vsebnosti vode v tkivu, ki je še sprejemljiva za posamezno rastlinsko vrsto (za večino rastlinskih tkiv, je ta okoli 50%), in po kateri nastopi propadanje rastlinskega tkiva oz. celična smrt.

Zmanjšana količina vode v okolju ni edini dejavnik, ki povzroči pomanjkanje vode v rastlini. Nekateri stresni dejavniki, kot sta slanost in nizke temperature, imajo podoben učinek na rastlino in se vsi izražajo kot zmanjšanje količine vode v rastlini. (Bray in sod., 2000).

Pomanjkanje vode v celicah povzroči koncentriranje raztopljenih snovi, spremembo prostornine celice in oblike celične membrane, porušenje gradientov vodnih potencialov, izgubo napetosti membrane, pretrganje ovojnice in spremembe proteinov (Bray, 1997). Razmerje med prostornino tonoplasta in celične membrane in prostornino membran celičnih organelov se spremeni, kar ima lahko za posledico ireverzibilne poškodbe celične membrane in v končni fazi venenje rastline (Hsiao, 1973). Tvorba prostih radikalov je še ena od posledic pomanjkanja vode, ki negativno vpliva na celično presnovo in strukturo (Bartles in Sunkar, 2005).

#### 2.1.1.1 Načini prilagoditve rastlin na pomanjkanje vode

Nekatere morfološke lastnosti, ki omogočajo rastlini boljše preživetje v stresnem okolju, nastopajo skupaj; npr. premikanje listov in pospešena rast korenin ter njihovo poglobljanje. Na podlagi te ugotovitve, je Ludlow (1989) uvedel pojem strategije prilagoditve suši, ki pomeni kombinacijo med seboj v mehanizem povezanih telesnih znakov in odzivov, ki jih lahko skupno imenujemo obnašanje rastline v sušnem obdobju. Poznamo tri strategije za zmanjšanje stresa ob pomanjkanju vode:

- Beg pred sušo (ang. Escape)

Značilnosti rastlin s takšno strategijo so: nizka rast, razvojna plastičnost in občutljivost rastline na neposredno izpostavljenost sončni svetlobi. Življenjski krog teh rastlin poteka na ta način, da rastline preživijo sušo v obliki semen, medtem ko so v času zadostne preskrbljenosti z vodo sposobne hitro razviti semena z relativno nizkim energijskim vložkom.

- Izognitev (ang. Avoidance)

Za to skupino rastlin so značilne naslednje lastnosti: občutljivost tkiva na dehidracijo (vodni potencial med -1,5 in -2,5 MPa in relativna vsebnost vode pod 50%, sta mejni vrednosti, ki jih rastlina še lahko preživi), pomanjkanju vode v tleh se poskušajo izogniti s poglobljanjem korenin, z zmanjševanjem izgub vode (z uravnavanjem izhlapevanja preko telesne površine, s premikanjem listov, z odmetavanjem starejših in z razvojem mlajših listov), ter so, v manjši meri, sposobne tudi uravnati osmotski potencial in prilagajati delovanje fotosintetskega aparata. Dobra stran te strategije je ta, da rastline dosežejo boljšo rast pri maksimalnem privzemu vode iz okolice, slabosti pa se kažejo v večjih energijskih izgubah, ki nastanejo pri ponavljajočem se prehajanju iz stresnega v normalno stanje.

Primer izognitve na nivoju celic je proces osmotske prilagoditve, pri katerem se osmotski potencial vode v celici zniža, tako da se gradient vodnega potenciala poveča in posledično tudi vpijanje vode ter turgorski tlak, ki vzdržuje napetost celice.

- Toleranca (ang. Tolerance)

V to skupino spadajo rastline, ki zdržijo močno dehidracijo (vodni potencial pod -13 MPa in relativna vsebnost vode do 25%), imajo nekoliko slabše sposobnosti premagovanja stresa z vihanjem listov in tvorbo globokih korenin, vendar pa kažejo večjo sposobnosti pri uravnavanju osmotskega potenciala. Posledice teh prilagoditev se kažejo v izboljšani sposobnosti vgradnje ogljika in rasti med sušo in v dobri preživelosti listov.

Toleranca je zaradi svoje posebne uspešnosti v sušnem okolju med najbolj preiskovanimi mehanizmi in ugotovili so (Nilsen in Orcutt, 1996), da je toleranca na pomanjkanje vode v celicah rastlinskega tkiva lahko osnovana na vzdrževanju nizkega vodnega potenciala (ob pomoči osmotsko aktivnih snovi) ali pa na vzdrževanju visokega vodnega potenciala (s pomočjo zaščitnih snovi).

### 2.1.1.2 Odziv na biokemijskem nivoju

#### 2.1.1.2.1 Odziv na pomanjkanje vode

Odziv rastline na pomanjkanje vode naj bi se pojavil, na nivoju celičnega metabolizma, v nekaj sekundah (npr. v obliki spremembe fosforilacijskega stanja celičnih proteinov) oz. v nekaj minutah ali urah (na nivoju genske ekspresije).

Odvisen je od vrste in genotipa, starosti in stopnje razvoja rastline, vrste organa in tipa celic oz. celičnih organelov, ter dolžine trajanja in intenzivnosti pomanjkanja vode. Počasno zmanjševanje vsebnosti vode dovoljuje prilagoditev na pomanjkanje vode, medtem ko se pri hitrem zmanjševanju vsebnosti vode rastline največkrat ne morejo prilagoditi (Bray, 1997).

Prilagoditev rastline na neugodne razmere v okolju vključuje tri procese:

- zaznavanje stresnega dejavnika,
- prevajanje sprememb, ki nastanejo zaradi stresa, v biokemijski signal in
- odziv na ta signal, na ravni genske ekspresije.

Obstaja več vidikov izgube vode v celici, ki bi jih lahko enačili z mehanizmom razpoznavne stresa: zmanjšanje ali izguba napetosti membrane, sprememba v volumnu celice ali površini celične membrane, izguba »razteznosti« membrane, sprememba v vodni aktivnosti oz. v vsebnosti v vodi raztopljenih snovi, sprememba v povezavi med membrano in citoplazmo ali pa sprememba v interakcijah med proteini in njihovimi ligandi (Bray, 1997).

Mehanizem zaznavanja pomanjkanja vode vključuje receptorska mesta.

Pomanjkanje vode v rastlini ima ponavadi vpliv na osmotski potencial celic in medceličnega prostora, zato je večina receptorskih proteinov, ki jim pripisujemo vlogo pri prilagoditvi na sušo poimenovanih kot osmosenzorji. Nekateri osmosenzorji so lahko tudi peptidaze. Raziskave receptorskih proteinov, povezanih s tovrstnim stresom, izvajajo predvsem s pomočjo transgeneze pri kvasovkah in s transgenimi rastlinami (Trewavas, 2000). Nekateri izsledki iz poskusov na kvasovkah kažejo na to, da je za odziv ključnega pomena sprememba v stopnji fosforiliranosti nekaterih transmembranskih in citoplazemskih proteinov (Bray, 1997). Pri kvasovkah sta bila identificirana dva osmotska senzorja: Sho1p; t.j. transmembranski protein, ki se aktivira v primeru velike koncentracije osmotsko aktivnih snovi v okolici kvasnih celic. Drugi senzor je dvokomponentni upravljalni sistem, ki sestoji iz treh proteinov: (Sln1p, Ypd1 in Ssk1p), in ki je v takšnih razmerah zavrt. Oba sodelujeta pri

fosforilaciji proteinov poti HOG (angl. high osmolarity glycerol). Videti je, da imajo rastline podoben mehanizem, saj je bilo prikazano, da je rastlinski homolog SLN1, uspešno nadomestil kvasnega v genetsko spremenjenih kvasovkah, ki so vsebovale rastlinski sln1 (Bray, 1997).

Izguba vode v celici, ki se zazna, sproži vzpostavitev prevajalne poti signala, še vedno pa ni znano, koliko različnih receptorjev, ki so neposredno povezani s pomanjkanjem vode v rastlini, je pri tem vpletenih (Bray, 1997).

Čeprav pri rastlinah prilagoditve na sušo še ne poznamo tako dobro kot pri kvasovkah, pa lahko sklepamo da ima signalna molekula, ki nastane zaradi zaznave pomanjkanja vode, vpliv na izražanje genov, ki omogočijo rastlini hiter odziv na nivoju celotnega organizma. Ena izmed znanih signalnih molekul, ki se pojavlja v rastlini med sušnim stresom, je abscizinska kislina (ABA), ki je tudi sicer poznana kot signalna molekula, pri odzivu na mnoge stresne dejavnike. Indukcija genov, ki pripomorejo k prilagoditvi rastline na pomanjkanje vode ni vedno pogojena z delovanjem ABA, kar pomeni da ABA ni edina snov, ki bi lahko predstavljala signalno molekulo pri zaznavanju pomanjkanja vode. Poleg ABA poznamo še etilen, čigar koncentracija dokazano sodeluje pri procesih, povezanih s spremenjenim vodnim statusom rastline.

Prenos zaznave ABA poteka na več nivojih in vključuje receptorje, ki so sposobni zaznavati ABA tako zunaj kot tudi znotraj celice (Allan in Trewawas, 1994; Schwartz in sod., 1994). Nekateri raziskave kažejo, da poteka prenos signala iz medceličnega prostora v notranjost celice, v obliki kaskade med seboj povezanih, vzajemno delujočih proteinskih kinaz, katerih delovanje je odvisno od koncentracije  $Ca^{2+}$  ionov (Knetsch in sod., 1996). Poznani so nekateri genski elementi iz rastline *Arabidopsis thaliana*; npr.: ABRE, sestavljen iz zaporedja nukleotidov RYACGTGGYR (R označuje nukleotid s purinsko, Y pa nukleotid s pirimidinsko bazo) in DRE, sestavljen iz zaporedja nukleotidov TACCGACAT. Izražanje obeh omenjenih elementov je pogojeno s pomanjkanjem vode in prisotnostjo ABA, poleg tega pa še s prisotnostjo nekaterih transkripcijskih faktorjev oz. aktivatorjev. Za razliko od ABRE, katerega vpliv na izražanje je odvisen od ABA, pa so za DRE dokazali, da je v prvih nekaj urah pomanjkanja vode neodvisen od ABA. V poznejši fazi pomanjkanja vode ABA vpliva tudi na izražanje genov, ki vsebujejo DRE zaporedje. Oba genska elementa so izolirali še iz ječmena, pšenice, koruze in iz rastline *Crateriostigma* (Bray, 1997).

Prisotnost določenega fragmenta DNK še ne pomeni, da je ta nujno vpleten v proces regulacije izražanja specifičnega gena. Možni so mehanizmi regulacije, ki niso razvidni iz zaporedja nukleotidov; npr. dokazano je bilo, da je aktivnost vezave proteina EmBP1, ki se povezuje z elementom ABRE v t.i. Em genu pšenice, odvisna od njegovega položaja v nukleosomu (Bray, 1997).

Nekateri objave omenjajo tudi encim farnezil transferazo, ki naj bi kataliziral modifikacijo receptorja (t.j. eno izmed komponent za prenos ABA), z namenom, da se ta vgradi v celično membrano (Cutler in sod., 1996) in s tem povzroči, da se vzpostavi prevajalna pot signala ABA, kar ima za posledico, da pričnejo procesi, povezani s to spojino, potekati v večji meri, kot pred vzpostavitvijo te poti.

Mnogo komponent prenosa signalov, ki se pojavljajo v drugih organizmih, je bilo odkritih tudi pri rastlinah. Pri pomanjkanju vode se tako izražajo mnogi izmed genov, kot so npr.: fosfolipaza C (encim, ki pospešuje presnovo fosfatidilinozitola-4,5-difosfata s ciljem, da ustvari dve signalni spojini; t.j.: inositol-3-fosfat in diacilglicerol), od  $Ca^{2+}$  ionov odvisne MAP kinaza (Mitogen activated protein kinase) in ribosomska 6S kinaza (Mizoguchi in sod., 1996). Pogosto izražanje teh genov med obdobjem pomanjkanja vode, je podobno kot pri živalih, kjer se ti izražajo kot odgovor na dražljaje iz okolja, vendar pa natančnejših mehanizmov izražanja pri rastlinah še ne poznamo.

Novejše genetske raziskave na rastlinah sledijo projektu analize celotnega genoma repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*), s pomočjo preučevanja zakonitosti izražanja komplementarnih DNK, pomnoženih vzdolž celotnega genoma te rastline (Seki in sod., 2002). Omenjeni projekt vključuje tudi analizo sekvenc cDNK, ki se izražajo pri različnih stresnih pogojih rasti in izdelavo skupne genske banke njihovih promotorjev, ter podatkovne baze njihovih zaporedij. Rezultate iz te podatkovne baze so uporabili (Torres in sod., 2006) za primerjavo s sekvencami iz korenin fižola, izraženimi ob pomanjkanju vode, ki so jih določili s pomočjo metode DDRT-PCR (angl. differential display reverse transcriptase polimerase chain reaction). Nekatere med njimi se ujemajo s tistimi iz repnjakovca; npr.: membranski YKT61 protein in centromerni protein, odgovoren za cepitev mikrotubulov. Preostala večina je za fižol specifičnih. Najpomembnejše so tiste, ki se pojavljajo pri zgodnjem odzivu na sušo in katerih sekvence se ujemajo z nekaterimi že poznanimi geni (npr. ubikvitin). Zgodnjo pretvorbo proteinov pripisujejo predvsem genom: t.i. eiF4A iniciacijskega faktorja, ubikvitina, poliubikvitina in tistim, ki sodelujejo bodisi pri prenosu proteinov bodisi pri oblikovanju (zvijanju) proteinov v njihovo nativno obliko. Povečana je tudi regulacija izražanja genov, ki kodirajo zapis nekaterih encimov celičnega metabolizma; npr: fosfoglicerat mutaze, malat dehidrogenaze in inozinuridin nukleozid-transferaze. Zanimiva je povečana količina prepisa genov (npr. lipaza/acil hidrolaze), ki jih povezujejo s prenosom kationov in signalnih molekul, saj so nekatere izmed njih našli tudi v listih rastlin *Vigna unguiculata* in *Arabidopsis thaliana*, kjer ti sodelujejo pri prenosu informacije s pomočjo specifičnih lipidov.

#### 2.1.1.2.1.1 Potencialna vloga proteinov izraženih med sušnim stresom

Izražanje določenega gena med sušnim stresom, ne more biti edino merilo za pomembnost nekega gena, pri prilagoditvi rastline ne sušo. Genetski odgovor na pomanjkanje vode na splošno vključuje naslednje mehanizme: izognitev sami izgubi vode, zaščito celičnih struktur pred poškodbami, ki jih lahko povzroči izguba vode in odpravo poškodb celičnih struktur, ki se pojavljajo pri tej vrsti stresa.

- Mehanizmi izognitve pomanjkanju vode

Eden izmed načinov izognitve je sinteza osmotsko aktivnih snovi, ki imajo lastnost da kljub temu da nastopajo v veliki koncentraciji, ne škodujejo funkciji proteinov, s katerimi so v stiku. Poznamo osmotsko aktivne aminokisliline (npr. prolin), alkoholne sladkorje (npr. pinitol), ostale sladkorje (npr. fruktani) in kvartarne amonijeve spojine (npr. glicin betain). Encimi, ki so vključeni v sintezo teh osmotsko aktivnih snovi, omogočajo uravnavanje osmotskih potencialov (navadno zmanjšajo osmotski potencial v notranjosti celice, z namenom da celica lažje vsrka vodo in vzdržuje svojo obliko).

Raziskave osmotsko aktivnih spojin, so pripeljale do odkritja novih vlog, ki jih te spojine vršijo v rastlinah (npr. v *Arabidopsis thaliana*). Prolin nastane iz L-glutaminske kisline s sintezo preko  $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilata (5PC), kar katalizirata encima 5PC-sintaza in 5PC-reduktaza. Prvi se inducira ob pomanjkanju vode, povečani slanosti in ob prisotnosti ABA, medtem ko drugi ni odvisen od teh dejavnikov.

Razgradnja prolina do 5PC, ki jo katalizira prolin-dehidrogenaza, je zavrtta ob pomanjkanju vode in pa povečana ob prisotnosti prolina in pri privzemu vode v celico (Kiyosue in sod., 1996).

Poznan je tudi gen, ki kodira za prolin specifičen transportni protein ProT2. Izražanje tega gena je pogojeno s pomanjkanjem vode v celici, kar pa sicer ni lastnost vseh transporterjev



prolina iz družine ProT (Rentsch in sod., 1996). To kaže na dejstvo, da je porazdelitev prolina po celotni prostornini rastline še ena izmed funkcij, ki jo lahko opravljajo osmotsko aktivne snovi, pri uravnavanju osmotskega potenciala, med obdobjem pomanjkanja vode.

Način nalaganja osmotsko aktivnih snovi (in njihova vloga), se lahko med posameznimi rastlinskimi vrstami precej razlikuje; npr.: Pri *M. crystallinum* se pinitol nalaga med vodnim stresom in sinteza le tega se povečuje (Ishitani in sod., 1996), medtem ko pri *Arabidopsis thaliana* sinteza pinitola samega ni mogoča, saj ta rastlina ne vsebuje genov za njegovo sintezo, kakršne poznamo pri *M. crystallinum*.

Transportni proteini, ionski kanalčki in izmenjevalci nabitih molekul, vsi igrajo pomembno vlogo pri osmotski regulaciji ob pomanjkanju vode. Akvaporini, člani družine membranskih proteinov, ki uravnavajo vodni status celic rastline) zagotovo igrajo pomembno vlogo pri odzivu rastline na pomanjkanje vode. Stopnja fosforiliranosti akvaporinov špinače (*Spinacia oleracea* spp.), je odvisna od apoplastičnega vodnega potenciala (Xu in sod., 1996). Fosforilacijski status akvaporinov razumemo kot sposobnost celice za transport vode. Zmanjšan fosforilacijski status med pomanjkanjem vode naj bi upočasnil izgubo vode iz celic.

- Mehanizmi za zaščito celičnih struktur

Semena številnih rastlinskih vrst vsebujejo (v obdobju zgodnjega dozorevanja) t.i. LEA proteine (t.j. late embryogenesis abundant proteins), ki jim pomagajo razviti toleranco na izsušitev. Dokazano je bilo, da te iste proteine najdemo tudi v vegetativnih organih rastlin, izpostavljenih pomanjkanju vode. Vloga teh hidrofilnih globularnih proteinov je deljena na: ohranjanje strukture membran, ločevanje ionov, vezavo vode in na vlogo molekularskih spremljevalcev (oz. šaperonov) (Bray, 1997).

Dva proteina te vrste, HVA1 iz ječmena in LE4 iz paradižnika imata funkcijo razvijanja tolerance na vodni stres. Prvi je pri transgenem rižu omogočil toleranco na povišano slanost in sušo (Xu in sod., 1996), drugi pa je, izražen v kvasovkah, omogočil odpornost na povišano slanost ter na nizke temperature (Imai in sod., 1996).

Dehidrin, ki tudi spada med LEA proteine (poznani tudi po oznakah RAB; oz. D-11), se ugotovljeno inducira in izraža, pri mnogih stresnih pogojih in tudi pri dozorevanju semen. Zaradi svoje splošne prisotnosti v rastlinah, mu pripisujejo številne vloge; npr. tudi vlogo šaperona (Close, 1996).

- Popravljalni mehanizmi v rastlinski celici

Mnogo proteinov, izraženih ob pomanjkanju vode (npr.: ubikvitin, razni šaperoni in peptidaze), lahko služi ublažitvi poškodb celičnih struktur in odstranjevanju toksičnih spojin in zvrsti (težke kovine, prosti radikali; idr.). Vsi izmed naštetih, so lahko vključeni v procese obnove proteinov in njihovih osnovnih gradnikov.

Geni, ki kodirajo proteine, specializirane za odstranjevanje ROS, se tudi navadno izražajo pri sušnih pogojih (Ingram in Bartles, 1996). Včasih je težko z gotovostjo trditi, da ti geni služijo zgolj ublažitvi škode, ki nastane zaradi pomanjkanja vode, saj se ti zelo pogosto izražajo tudi pri sekundarnih pojavih stresa, kot je npr. povečana občutljivost za infekcije.

#### 2.1.1.2.2 Poplavljanje

Poplava je stanje v katerem površina zemlje sprejema večjo količino vode (zaradi dolgotrajnih padavin), kot jo je sama sposobna absorbirati. Za takšno stanje je značilno, da je nivo zemlje pod nivojem vode. Poplava sicer predstavlja velik problem tudi zaradi odnašanja rodovitnih plasti zemlje, izpiranja mineralov ter pomembnih organskih spojin in mikroorganizmov, ki jih

rastlina potrebuje za svoj obstoj in razvoj. Zaradi kompleksnosti pravkar omenjenih pojavov, se bomo pri obravnavi poplave omejili zgolj na primer, kjer so vsi deli rastline, razen korenin, nad vodno gladino in voda, ki prekriva zemljo ni pod pretokom.

Vse rastline si pri presežku vode v njihovem okolju, pomagajo s povečano transpiracijo (preko listnih rež in lenticel), dasiravno obstajajo pri tovrstni prilagojenosti na poplavljanje, razlike med posameznimi rastlinskimi vrstami.

Bistvena sprememba, ki spremlja proces poplavljanja, se kaže v spremenjeni sestavi zemlje, kjer se količina kisika zmanjša in posledično prične rasti anaerobna mikroflora.

Poplava torej neposredno vpliva na delovanje koreninskega sistema in večino sprememb v ostalih delih rastline, pripisujejo spremembam na tem sistemu.

Med prilagoditve na poplavo prištevamo: tvorbo t.i. zračnega tkiva (lat. Aerenchyma) in razvoj adventnih korenin. Prvo nastane zaradi ločevanja celic koreninskega sistema oz. njihovega propadanja, kar omogoča učinkovitejši transport kisika znotraj korenin, ki je pomemben za pretvorbo 1-aminociklopropan-1-karboksilne kisline (ACC) v etilen.

Razvoj adventnih korenin na obstoječem koreninskem sistemu, pa je še en način fiziološke prilagoditve na poplavo, ki izboljša resorbcijo v vodi raztopljenih ionov in omogoča boljše dostopnost gibberelinov in citokininov iz korenin, za liste rastline (Arteca R.N., 1997).

#### 2.1.1.2.2.1 Odziv na poplavljanje

Pri poplavljanju metabolizem rastline preide iz oksidativne fosforilacije, kjer je končni prejemnik elektronov kisik, v anaerobno respiracijo, kjer je končni prejemnik elektronov piruvat. Nekatere rastline (paradižnik, koruza in riž) med poplavo kažejo metabolni fenomen imenovan Pasteurjev efekt, pri čemer glukoza oz. saharoza iz floema potuje od mesta aerobne respiracije do poplavljenih organov (korenin), ki favorizirajo anaerobno respiracijo. Glavna produkta anaerobnega metabolizma sta laktat oz. preko acetaldehida sintetizirani etanol, v manjši meri pa se nalagajo tudi nekatere aminokisliline, ki nastanejo s transaminacijo iz ustreznih  $\alpha$ -ketokislin, in sukcinat ter  $\gamma$ -aminobutirat.

Procese, ki spremljajo sintezo glavnih dveh produktov anaerobne respiracije razlagata dve hipotezi. Davies-Robertsova hipoteza (imenovana tudi pH-stat hipoteza) trdi, da je pH vrednost citosola tisti dejavnik, ki (pri neki določeni pH vrednosti) ustavi delovanje laktat dehidrogenaze, kar ima za posledico, da prične delovati piruvat-dekarboksilaza (ki optimalno deluje v območju kislih pH vrednostih), pri čemer nastaja acetaldehid in nato iz njega etanol. Sinteza etanola, ki ne disociira kot kislina (npr. laktat) naj bi prispevala k temu, da se rastlinska celica izogne škodljivim posledicam, ki jih bi lahko povzročila znižana pH-vrednost citosola. Druga hipoteza trdi, da povečana koncentracija piruvata v citosolu zavre delovanje piruvat-dehidrogenaze (ki sicer tvori acetyl-CoA pri aerobni respiraciji v mitohondrijih) in favorizira delovanje piruvat dekarboksilaze v citosolu in posledično produkcijo etanola. Poudariti velja, da se hipotezi nujno ne izključujeta in imata lahko obe, pri različnih rastlinskih vrstah, večji oz. manjši pomen pri produkciji etanola. Dokazano je bilo, da so na poplavo odporne rastline (npr. koruza), sposobne stimulirati alkoholno vrenje in se na ta način izogniti acidozi citoplazme. Koruza brez encima alkohol-dehidrogenaze je manj odporna na poplavo, kot koruza z genom za omenjeni encim (Bray in sod., 2000). Sinteza proteinov pri koruzi je tudi do 70 % manjša od normalne, kar pomeni ustavitev izražanja večine genov, ki se sicer izražajo pri normalnih pogojih. Povečano je izražanje genov za npr.: encime za pretvorbo škroba v saharozo, encime glikolize in alkoholnega vrenja. Številni geni, ki kodirajo izoformne encime (npr. alkohol-dehidrogenazo in gliceraldehid-3-fosfat-

dehidrogenazo), se ob pomanjkanju kisika izražajo drugače kot pri normalnih pogojih, zaradi razlik v zaporedju nukleotidov njihovih promotorjev.

Odkrili so genski element oz. zaporedje ARE (anaerobic response element), ki predstavlja promotor številnih genov, ki se izražajo ob pomanjkanju kisika.

Etilen,  $\text{Ca}^{2+}$  ter delovanje celulaze in ksiloglukanaze povzroči celično smrt znotraj koreninskega korteksa in na ta način prispevajo k nastanku t.i. zračnega tkiva (Bray in sod., 2000). Pri nekaterih vrstah (npr. paradižnik) etilen povzroča vihanje listov, medtem ko se pri rižu kaže učinek etilena predvsem v podaljševanju stebela (to naj bi zagotovilo listom dostop do kisika nad gladino vode). Vihanje listov pri paradižniku, je pojasnjeno z dejstvom, da se sinteza ACC v koreninah poveča do te mere, da se vsa ACC ne more pretvoriti z ACC oksidazo v etilen in se prenese v liste, kjer pretvorba v etilen lahko poteče. Posledica je vihanje listov. Dokazano je bilo, da so se listi paradižnika, transformiranega z genom, ki je komplementaren antisense genu mRNA ACC-oksidade precej manj vihali pri poplavi, kot tisti pri navadnem paradižniku (Bray in sod., 2000).

## 2.2 CISTEINSKE PEPTIDAZE IN NJIHOVI INHIBITORJI V RASTLINAH

Cisteinske peptidaze so tiste peptidaze, pri katerih se tiolna skupina aminokislina cisteina, aktivira na ta način, da odda proton bližnji aminokislini histidinu. Ti dve aminokislini skupaj predstavljata t.i. katalitični dvojček peptidaze. Izjemoma je poleg omenjenih aminokislinskih ostankov včasih potreben še tretji (Asp), ki služi pravilni orientaciji imidazolnega obroča histidina. Najbolj poznana cisteinska peptidaza je papain.

### 2.2.1 Proteolitični encimi in njihova razdelitev

Proteine, ki so posredno ali pa neposredno vključeni v cepitev peptidne vezi drugih proteinov oz. peptidov (t.j. kažejo proteolitično aktivnost), lahko imenujemo peptidaze, proteaze oz. proteinaze, ali pa kar najbolj splošno proteolitični encimi. Priporoča se uporaba izraza peptidaze, zato bomo v tem diplomskem delu uporabljali ta izraz, kot splošen izraz za proteolitične encime (Barrett A.J., 1998).

Zaradi velike raznolikosti proteolitičnih encimov, tako glede strukture, katalitičnega mehanizma, ali možnih vlog, poznamo tudi več različnih načinov njihovega razvrščanja; oz. jih razvrščamo na podlagi različnih kriterijev. Najbolj uveljavljena načina razdelitve encimov sta tisti, ki ga predlaga komisija za encime EC (angl. Enzyme commission, kasneje preimenovana v Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology oz. NC-IUBMB) (NC-IUBMB, 2007) in tisti, ki ga upošteva spletna podatkovna baza MEROPS (MEROPS, 2007, Rawlings in sod., 2006). Preprosto rečeno podatkovna baza MEROPS upošteva encimski mehanizem kot glavni kriterij za klasifikacijo vseh proteolitičnih encimov, medtem ko EC uporablja ta kriterij zgolj kot enega izmed kriterijev (pri endopeptidazah) (NC-IUBMB, 2007, MEROPS, 2007, Rawlings in sod., 2006). Glavni kriterij razdelitve proteolitičnih encimov po EC, je mesto cepitve peptidne vezi, ki jo cepi encim pri substratu; in sicer razlikujemo eksopeptidaze, ki cepijo proteine bodisi z amino bodisi s karboksi konca peptida, in endopeptidaze, ki cepijo proteine na specifičnih mestih znotraj substrata (t.j. daleč od začetne amino oz. končne karboksilne skupine).

Eksopeptidaze se dalje delijo glede na to ali cepijo substrat z amino ali s karboksi konca, na aminopeptidaze in karboksipeptidaze. Aminopeptidaze (so tiste, ki odcepijo eno aminokislino z amino konca substrata) razločujemo (glede na dolžino peptida, ki ga odcepijo od substrata z

amino konca) od dipeptidil-peptidaz (odcepijo dipeptid) in tripeptidil-peptidaz (odcepijo tripeptid), medtem ko pri karboksipeptidazah (ki odcepijo eno aminokislino s karboksi konca peptida), ločujemo le te od peptidil-dipeptidaz (odcepijo dipeptid s karboksi konca substrata). Posebni skupini eksopeptidaz sta dipeptidaze, ki cepijo zgolj dipeptide in omega peptidaze, ki odstranjujejo substituirane, ciklizirane in izopeptide s konca substrata.

Pri razdelitvi endopeptidaz, EC uporablja enake kriterije, kot jih spletna podatkovna baza MEROPS za vse encime; in sicer deli tovrstne encime glede na aminokislino, ki določa katalitični tip encimske reakcije. Poznamo: serinske, cisteinske, treoninske, aspartatne, glutamatne in metalo endopeptidaze, ter endopeptidaze neznanega katalitičnega tipa. Katalitično delovanje prvih treh je osnovano na reakciji encima (s substratom) s hidroksilno oz. sulfhidrilno skupino, ki igra pri tem vlogo nukleofilnega reagenta, medtem ko preostale tri skupine v ta namen uporabljajo molekulo vode, ki jo aktivirajo in se z njo (posredno) vežejo na substrat. Med endopeptidaze neznanega katalitičnega tipa spadajo vse tiste endopeptidaze, katerih katalitičnega delovanja ne poznamo. Klasifikacija, uporabljena v podatkovni bazi MEROPS, deli peptidaze posameznega katalitičnega tipa dalje v družine (na podlagi statistično značilnih podobnosti v njihovem aminokislinskem zaporedju) in v skupne klane, če imajo ti podobno tridimenzionalno strukturo (oz. jih imamo za homologne), četudi njihovega aminokislinskega zaporedja ne poznamo. Število klanov v posamezni družini, je tako pokazatelj strukturne raznolikosti encimov, ki sodijo v isto družino (MEROPS, 2007, Rawlings in sod., 2006).

Encimi, katerim smo v tem diplomskem delu namenili največ pozornosti, so cisteinske peptidaze, pri čemer pa je treba poudariti, da pri načinu razvrščanja, kakršnega uporablja EC, v to skupino sodijo izključno encimi, ki so po svojem delovanju endopeptidaze. Pri razvrščanju, kot ga uporablja spletna podatkovna baza MEROPS, pa v to skupino spadajo tako endo, kot ekso peptidaze, saj je edini pogoj za razvrstitev v skupino cisteinskih peptidaz, aminokislina cistein v aktivnem mestu encima, ki določa način katalize. Upoštevajoč razvrstitev po MEROPS, cisteinske peptidaze razdelimo v več klanov (CA, PA (C), CD, CE, CF, CH, CL, CM, CN in CX). Našteti bom skušal le peptidaze iz omenjenih klanov, ki so bile izolirane iz rastlin in pa tiste iz drugih organizmov, katerih homologne sekvence najdemo tudi v rastlinah (MEROPS, 2007, Rawlings in sod., 2006).

Klan CA (opis glej v poglavju niže) vsebuje družine: C1 (papainu podobne peptidaze), C2 (kalpain), C12 (Ubikvitin hidrolaze, ki cepijo s C-konca), C19 (izopeptidaze T), C54 (autofagin-1), C65 (otubain-1; človeška (*Homo sapiens*) peptidaza, ki odceplja ubikvitin) in C78 (UfSP1 peptidaza iz mišic) (MEROPS, 2007, Rawlings in sod., 2006).

Za klan CD je značilna posebna  $\alpha/\beta$  sekundarna struktura in dejstvo, da je za delovanje peptidaz, pripadajočih temu klanu, pomemben zgolj katalitični dvojček v vezavnem mestu (ki nastopa v obrnjenem zaporedju: His, Cys), ne pa tudi aminokislina ob njem, ki pri ostalih klanih igrajo pomembno vlogo pri vezavi encima na substrat. Rastlinske peptidaze iz tega klana predstavljajo družine: C14, ki jo imenujemo tudi kaspaze, C13, imenovano legumaini in C50, ki predstavlja separaze (MEROPS, 2007, Rawlings in sod., 2006).

V klan CE uvrščamo peptidaze, ki imajo katalitično aktivno mesto sestavljeno iz zaporedja aminokislin: His, Glu ali Asp, Gln in Cys. Nekatere peptidaze iz tega klana so specializirane za cepitev peptidov tipa Gly-Gly+Xaa (simbol plus označuje mesto cepitve). Povezavo med rastlinami in omenjenim klanom, predstavlja družina C48 (Ulp1 endopeptidaze).

Klan CF vsebuje peptidaze, katerih katalitično mesto sestavlja aminokislinsko zaporedje: Glu, Cys, His. Vsebuje eno samo družino (C15) piroglutamil-peptidaz I. Predstavniki ostalih klanov, naštetih na začetku tega poglavja, zaenkrat še niso bili odkriti pri rastlinah, zato jih ne bom podrobneje opisoval. Omenil bi le še nekaj t.i. peptidaz mešanega katalitičnega tipa, ki so značilne za rastline (MEROPS, 2007, Rawlings in sod., 2006).

V klan PA(C) sodijo peptidaze, katerih katalitično mesto predstavljata dve možni aminokislinski zaporedji: His, Asp oz. Glu, Cys oz. Ser in pa: His, Cys. Glede na tridimenzionalno strukturo, peptidaze iz tega klana spominjajo na kimotripsin A, ki je serinska peptidaza (družina S1), vendar pa so hkrati podobne 3C pikornainu virusnega hepatitisa A, ki sicer lahko deluje bodisi kot cisteinska bodisi kot serinska peptidaza (Polgár, 2004).

Klan PB predstavlja peptidaza T1A in njej homologni, biološko neaktivni proteini. Edini predstavnik tega klana, ki ga povezujemo z načinom katalize, ki je značilen za cisteinske peptidaze, je prekursor človeške amidofosforibozil-transferaze (družina C44).

Klan PC predstavljajo peptidaze mešanega katalitičnega tipa, ki imajo aktivno mesto sestavljeno iz zaporedja: Cys oz. Ser, His, Glu. Peptidaza lahko predstavlja nukleofilni reagent bodisi s svojim cisteinskim bodisi s serinskim aminokislinskim ostankom. V povezavi z rastlinami velja omeniti predvsem družini C26 (gama-glutamil hidrolazo) in C56 (Pfp1 peptidazo) (MEROPS, 2007, Rawlings in sod., 2006).

### 2.2.2 Inhibitorji rastlinskih peptidaz

Inhibitorje iz rastlin lahko razdelimo v družine: IA (tipični predstavnik je peptidazni inhibitor II iz krompirja), IC (tipični predstavnik je tripsinski inhibitor iz soje z mehanizmom delovanja tipa Kunitz), ID (alfa-1-peptidazni inhibitor), IE (tripsinski inhibitor MCT I-II in metalokarboksipeptidazni inhibitor iz krompirja), IG (eglin c), IH (ovocistatin in fitocistatin iz družine I25), IJ (tripsinski inhibitor alfa amilaze iz indijske prosenke), JD (tripsinski inhibitor 2 iz soje), JE (serinski inhibitor karboksipeptidaze Y enak tistemu iz *Saccharomyces cerevisiae*) in JF (s predstavnikoma I12 in I29) (MEROPS, 2007, Rawlings in sod., 2006).

Najbolj poznani inhibitorji peptidaz iz fižola so tisti iz družin I12 in I29. Predstavniki družine I12 delujejo kot inhibitorji tripsina in kimotripsina oz. vseh serinskih endopeptidaz iz klana PA. Inhibitorji cisteinskih peptidaz s poznano biološko vlogo so dokazano tisti iz družine I29, ki v naravi nastopajo kot propeptidi katepsinov in imajo, po odcepitvi od omenjenega encima, nanj zaviralni učinek, in pa tisti iz družine I25 (MEROPS, 2007, Rawlings in sod., 2006).

Poleg zgoraj naštetih inhibitorjev, ki jih najdemo v podatkovni bazi MEROPS, lahko v literaturi najdemo še vrsto drugih inhibitorjev, ki zaenkrat še niso okarakterizirani do te mere kot že prej omenjeni, pa vendar dovolj, da jim lahko pripišemo pomembno vlogo v posameznem organizmu, kot je npr. FSCPI 5,5, endogeni inhibitor iz semen fižola (Popovič in sod., 1998).

### 2.2.3 Značilnosti rastlinskih cisteinskih peptidaz

V tem poglavju bom naštel nekatere izmed tistih peptidaz, ki imajo dokazano biološko aktivnost v rastlinah.

Repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*), ki je modelni organizem za vse višje rastline, ima 678 genov, ki vsebujejo zapis za aktivne proteolitične encime in 148 genov, ki kodirajo njim homologne, biološko neaktivne proteine. Skupno število genov, ki kodirajo sestavo aktivnih cisteinskih peptidaz v tej rastlini je 114. V fižolu (*Phaseolus spp.*) poznamo šest papainu podobnih cisteinskih peptidaz, ki jih uvrščamo v družino C1. Med njimi so npr.: vinjain, brasikain, glicianin in pseudozain. Ti so po svoji tridimenzionalni strukturi med seboj podobni in jih uvrščamo v klan CA. Poleg teh poznamo še dve cisteinski peptidazi iz družine C13 (to sta legumain  $\alpha$  in  $\beta$ ), ki spadata v klan CD. Afriške vijolice (*Saintpaulia ionantha spp.*) v

omenjeni podatkovni bazi ni mogoče najti, kar pomeni, da zaenkrat še ni poznanih peptidaz iz tega organizma (MEROPS, 2007, Rawlings in sod., 2006).

Papain je najbolj poznana rastlinska cisteinska peptidaza, po kateri se tudi imenuje družina papainu podobnih peptidaz (družina C1, klan CA).

Značilnosti encimov iz te družine so:

- V organizmu se pojavljajo v obliki cimogenov velikosti 40-50 kDa (prepropeptid), ki dozori v delujoči encim velikosti 22-35 kDa.
- Delujejo v kislem območju pH-vrednosti in lahko cepijo širok spekter substratov.
- Občutljivi so na inhibitorje E-64, leupeptin, cistatin in TPCK in zahtevajo prisotnost reducentov za uspešno delovanje (Beers in sod., 2000).

V aktivnem mestu papainu podobnih peptidaz, sta aminokislini Cys in His. Poznani sta tudi obe aminokislini ob vezavnem mestu; in sicer Gly pred katalizirajočim Cys in Asn, ki sledi delujočemu His. Pri sesalcih poznamo takšno strukturo vezavnega mesta predvsem pri katepsinih B, H in K, ki vsi spadajo v klan CA, pod družino C1 (MEROPS, 2007, Rawlings in sod., 2006).

Lastnosti legumainov so:

- V večini primerov so to endopeptidaze, skoraj izključno aktivne pri cepitvi peptidnih vezi za aminokislino asparagin. Kažejo dobro aktivnost na substrat Z-Ala-Ala-Asn-NHMec, z maksimumom aktivnosti pri pH vrednostih med 4 in 6.
- Aktivno mesto predstavlja dvojček His158, ki mu sledi Cys200; poznan je tudi tipičen vzorec aminokislin ob vezavnem mestu. Po svoji tridimenzionalni strukturi, so ti encimi podobni kaspazam iz družine C 14 in jih uvrščamo v skupen klan CD. Katalitično delovanje katalizirajočega dvojčka, se razlikuje od tistega iz klana CA (Polgar, 2004).
- Občutljivi so na inhibitorje, ki blokirajo tiolno skupino; npr.: iodoacetamid, N-etilmaleimid, ovocistatin in ne na E-64 in leupeptin, kot velja za peptidaze iz družine C1 (MEROPS, 2007, Rawlings in sod., 2006).

Dve cisteinski peptidazi FLCP-1 in FLCP-3, z molekulskima masama prva 30 in druga 25,1kDa, sta bili izolirani iz listov rastline *Phaseolus vulgaris* L., posajene na polju (Popovič in sod., 1998). Katalitičen tip omenjenih peptidaz je bil določen na podlagi dejstva, da sta oba encima za svoje delovanje potrebovala prisotnost reducenta in da je bilo njuno delovanje močno zavrtlo ob prisotnosti za cisteinske peptidaze tipičnih inhibitorjev. Dvojna izoelektrična točka prvega, je bila pri pI 4,85 in 4,45, pri drugem pa pri pI 4,5 in 4,3. Aktivnost obeh peptidaz na substrat Z-Phe-Arg-MCA je bila največja v območju bazičnih pH vrednosti; in sicer za prvega pri pH 9,5 in pri drugem v območju pH vrednosti med 7,5 in 9.

## 2.2.4 Vloga cisteinskih peptidaz pri razvoju rastlin

Predpostavka, da je vsak celični proces do neke mere pogojen z uravnavanjem proteolitične aktivnosti (Callis, 1995), nas napeljuje na dejstvo, da so tudi fiziološke prilagoditve na spremembe v okolju, osnovane na encimskih mehanizmih, ki potekajo na molekularnem nivoju.

Endopeptidaze naj bi, zaradi specializiranega katalitičnega delovanja, imele vlogo regulatorjev tako na nivoju regulacije izražanja genov, kot tudi na nivoju katalitičnih procesov metabolizma celice (Schaller, 2004).

Ena takšnih cisteinskih peptidaz je zagotovo legumain, za katerega so najprej ugotovili udeležnost pri procesih kalitve semen, kasneje pa so povezali njegovo delovanje še s procesi staranja (senescence) oz. z zaključnimi procesi programirane celične smrti (Kinoshita in sod., 1999; Schlereth in sod., 2001; Müntz in sod., 2002; Müntz in Shutov, 2002; Shimada in sod., 2003).

K razumevanju vloge legumaina, je pripomoglo predvsem odkritje legumainu sorodnih cisteinskih peptidaz v kalečih semenih repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) (Hara-Nishimura in sod., 1993; Ishii, 1994), za katere so dokazali (Hara-Nishimura in sod., 1993, Yamada in sod., 1999), da so vključeni v razgradnjo proteinov, shranjenih v vakuoli in jih zato poimenovali VPE (Vacuolar processing enzymes). Dokazali so še specifično lastnost teh encimov, da cepijo 11S globuline in 2S albumine na določenem mestu za aminokislino asparagin. Tako procesirani proteini se nato v vakuolah združijo v multimerne strukture in se v tej obliki skladiščijo. Kasneje so (Kinoshita in sod., 1995, 1999; Gruis in sod., 2002) izolirali štiri podvrste (homolognih) encimov tega tipa in jih razdelili na semenske ( $\beta$  in  $\delta$  VPE) ter vegetativne ( $\alpha$  in  $\gamma$  VPE). Rojo (Rojo in sod., 2003) je dokazal, da je  $\gamma$  VPE nujno potreben za razgradnjo karboksipeptidaze Y (AtCPY), med procesom senescence listov repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*).

Ime VPE kaže na vlogo pri razgradnji proteinov, vendar pa so ti encimi neposredno odgovorni zgolj za skladiščenje 11S globulinov in 2S albuminov v vakuolo, saj so (Shimada in sod., 2003, Gruis in sod., 2004) ugotovili, da se v kalečem repnjakovcu, ki mu manjkajo geni za vse štiri VPE (angl. quadruple  $\alpha, \beta, \gamma$  and  $\delta$  VPE knockout), količina založnih proteinov, dostopnih za razgradnjo ne zmanjša, vendar pa se ti pri omenjenih poskusnih rastlinah le izjemoma naložijo v založne organe in še takrat ne v obliki 11S globulinov in 2S albuminov. Pri senescenci, ki se pojavi tudi pri stresu zaradi pomanjkanja oskrbe z vodo, imajo legumaini posredno vlogo, na kar kažejo tudi naslednje objave.

Müntz in sod. (2002) so ugotovili, da 11S globulini v vakuolah semen boba (*Vicia spp.*), postanejo dostopni peptidazi B (legumainu) šele po delni destabilizaciji z omejeno proteolizo. Legumain so izolirali še iz *Vigna spp.* (Okamoto in sod., 1999), za katerega so dokazali, da aktivira (s cepitvijo peptidne vezi za aminokislino asparagin) proencim proSH-EP, ki je odgovoren za razgradnjo že prej omenjenih založnih globulinov. Proencim SH, sta (Okamoto in Minamikawa, 1998) okarakterizirala kot papainu podobno cisteinsko peptidazo s sekvenco KDEL na repu, ki deluje kot signalni peptid za vezavo na ER, od koder se potem v 200-500nm velikih veziklih (imenovanih ricinosomi), sprosti v citosol, kjer razgrajuje sestavine citosola, v zaključnih procesih celične smrti (Schmid in sod. 1998, 1999 in 2001). Pričujoča povezanost legumainu podobnih encimov s papainu podobnimi cisteinskimi peptidazami, kjer prvi pogojuje nastanek oz. delovanje drugega, samo kaže na zapletenost katalitičnih procesov, značilnih za različna življenjska obdobja rastline.

## 2.3 CISTEINSKE PEPTIDAZE IN ODZIV RASTLIN NA STRES

### 2.3.1 Biotski stres

Rastline se neprestano branijo pred napadi bakterij, virusov, gliv, nevretenčarjev in celo drugih rastlin. Zaradi svoje nezmožnosti, da bi ubežale pred škodljivci iz okolja, so morale tekom evolucije razviti učinkovito obrambo, ki vključuje tako prirojene zaščitne lastnosti

posamezne rastlinske celice, kot tudi mehanizme, ki omogočajo sintezo zaščitnih spojin, ob napadu patogenih organizmov. Dobra stran nepremičnosti rastlin je dejstvo, da v naravi živeče rastline med seboj težje izmenjujejo patogene organizme, česar pa ne moremo trditi za kulturne rastline, ki ponavadi rastejo tesno skupaj.

Rastlinski patogeni organizmi preživijo cel življenjski krog oz. vsaj del le tega, znotraj rastline, kar ima za posledico spremembe na rastlini sami.

Virusi, ki vsebujejo virulentne gene (večinoma so to enoverižni ((ss) positive sense) RNA virusi, ki se razširjajo skozi plazmodezme in po floemu in povzročajo klorozo tkiva, nekrozo (venenje), vzorce mozaika na listih in zaostajanje v razvoju rastlin.

Glive so lahko nekrotrofične (npr. rodova *Phythium* in *Botrytis*), biotrofične (izkoriščajo žive rastlinske celice) npr. *Cladosporium fulvum* pri paradižniku ali pa hemibiotrofične vrste, ki najprej razvijejo biotrofični način prehranjevanja, kasneje pa presedlajo na nekrotrofičnega (npr. *Phytophthora infestans*, znani povzročitelj krompirjeve rje-krompirjeva lakota na Irskem).

Bakterijski fitopatogeni se razširjajo po apoplastu in ksilemu rastline in z izločanjem toksinov, ekstracelularnih polisaharidov in encimov, ki razgrajujejo celično steno, povzročajo gnitje, pegavost, venenje, rakaste tvorbe in rjo. Večinoma so to gram negativne paličaste bakterije iz rodov *Pseudomonas*, *Xanthomonas* in *Erwinia*.

Nematodi (nečlenarji) so biotrofi, ki z želom predrejo celično steno koreninske povrhnjice, kar povzroča spremembe metabolizma rastline ali pa spremembe v zgradbi koreninskega sistema. Najbolj poznani nematodi so endoparaziti iz družine *Heteroderidae* (rodova *Heterodera* in *Globodera*) in pa rod *Meloidogyne*.

Številni insekti ne povzročajo le škode v smislu izčrpavanja rastlin, ampak povzročajo infekcije kot prenašalci patogenih organizmov (zlasti virusov) in pa poškodbe, ki nastanejo tekom hranjenja na rastlini, ki predstavljajo naselitvena mesta za patogene organizme iz okolja. Lahko sesajo rastlinski sok, ali pa žvečijo liste (npr. koloradski hrošč in kobilice).

Rastline se lahko ubranijo pred naselitvijo patogenih organizmov na več načinov. Eden izmed načinov obrambe, ki med drugim vključuje tudi tvorbo t.i. PR proteinov (ang. pathogenesis related proteins) je obramba s preobčutljivostnim odgovorom, pri kateri rastlina uniči lastno tkivo (načrtovana, lokalizirana celična smrt) v bližini mesta infekcije in jo s tem omeji. Proteinov povezanih s patogenezo (PR) je štirinajst vrst in vključujejo tako encime za razgradnjo celične stene patogenih organizmov, kot tudi protimikrobne polipeptide.

Pomembne spojine obrambnega mehanizma rastline so tudi inhibitorji peptidaz, ki jih rastline izločajo z namenom, da zavrejo delovanje prebavnih encimov patogenega organizma in s tem onemogočijo uspešno izkoriščanje lastnih celičnih struktur in hranil. Vendar je ta odnos kompleksen, saj so mnogi škodljivci razvili mehanizme, ki delovanje rastlinskih inhibitorjev izničijo. Takšen je npr. odnos med koloradskim hroščem (*Leptinotarsa decemlineata*) in krompirjem (*Solanum tuberosum*), pri katerem inhibitorji rastline sprožijo prilagoditev prebavnega trakta omenjenega škodljivca na ta način, da ta prične izdelovati nove cisteinske peptidaze imenovane intestaini, ki so bodisi odporne na inhibitorje iz rastline bodisi so jih sposobne cepiti in na ta način izničiti njihovo delovanje (Gruden in sod., 2003).

### 2.3.2 Abiotski stres

Uvodoma naj povem, da je del cisteinskih peptidaz, ki se pojavljajo pri rastlinah, izpostavljenih abiotskemu stresu, opisanih že v poglavju 2.2.4. Razlog za to je dejstvo, da so nekatere peptidaze vključene tako v razvojne procese rastlin (kalitev semen), kot tudi v poznejše degenerativne procese v listih, ki spremljajo pojav senescence (glej poglavje 2.2.4).



Poudariti je treba, da senescenca nastopi bodisi na koncu življenjskega obdobja rastline (tudi če je ta ves čas izpostavljena idealnim pogojem) bodisi se pojavi prezgodaj zaradi pomanjkanja vode. Ugotovljeno je bilo, da so za senescenco značilni encimi, odgovorni tudi za prezgodnje staranje rastline, ki nastopi ob pomanjkljivi oskrbi rastline z vodo, zato bom na tem mestu navedel podatke, znane za cisteinske peptidaze, ki so značilne za senescenco. Večina peptidaz, ki pričnejo delovati v procesih programirane celične smrti, se tekom glavnega rastnega obdobja nahaja v rastlini v obliki cimogenov (oz. v neaktivni obliki), kar je bilo ugotovljeno tudi za večino papainu podobnih cisteinskih peptidaz (glej poglavje 2.2.3). Eden izmed možnih vzrokov za boljšo odpornost na sušo je tudi ta, da lahko rastlina poleg peptidaz, povezanih s celično smrtjo, sintetizira še inhibitorje, ki zavirajo delovanje le teh. Inhibicija nezaželene proteolize lahko poteče že na nivoju izražanja proteinov na ta način da se gen za encim sploh ne izrazi (inhibicija na nivoju genske ekspresije). Verjetno imajo bolj odporne vrste večjo zmožnost prilagajanja mehanizma izražanja proteinov, kot tiste manj odporne in se izognejo sintezi že prej omenjenih »škodljivih peptidaz«, medtem ko je za manj odporne takšna sinteza nujna. Številni genski elementi, izraženi ob uvedbi suše kažejo na to drugo možnost, kot bolj verjetno, ni pa izključeno da lahko neka rastlina uporablja oba navedena načina prilagoditve.

Pojav senescence v listih je bil na nivoju genske ekspresije, najprej raziskan pri enokaličnicah, kot so npr.: pšenica, ječmen, koruza in riž (Huffaker, 1990; Feller in Fischer, 1994), medtem ko je bil pri nekaterih pomembnih dvokaličnicah, kot so npr.: soja (*Glycine max*), fižol (*Phaseolus vulgaris*) in (*Vigna mungo*), ta pojav sprva raziskan pretežno na nivoju encimskih reakcij. Večina peptidaz izoliranih iz suhih listov naštetih organizmov, kaže lastnosti cisteinskih peptidaz, ki jih uvrščamo v družini C1 in C13. Poudariti je treba, da to niso edine peptidaze izolirane iz rastlin v obdobju senescence, pač pa sta ti dve družini peptidaz tisti, za kateri lahko z veliko gotovostjo trdimo, da se vedno pojavljata med senescenco v rastlinah. Poleg tega sta ti zaenkrat edini dovolj natančno okarakterizirani (s katalitičnim delovanjem, z aminokislinskim zaporedjem, s tridimenzionalno strukturo in substratno specifičnostjo), medtem ko o ostalih peptidazah, izoliranih iz rastlin med senescenco, lahko govorimo le kot o izjemah, značilnih za posamezen organizem (npr. pri encimskih študijah zgoraj naštetih organizmov se pojavljajo encimske aktivnosti z optimalnim delovanjem pri nevtralnem pH vrednostih, ki jih zaenkrat ni moč pripisati točno določeni družini encimov). Poleg tega obstajajo posamezni primeri papainu podobnih peptidaz v ječmenu, ki kažejo netipično substratno specifičnost za cepitev peptidov, na mestih za nevtralnimi aminokislinami Gln (Phillips in Wallace, 1989) in Arg (Fischer in sod., 2000) in pa tudi nekatere, ki cepijo substrat (gledano z amino konca) pred nepolarnimi in aromatskimi kislinami, kot so npr: Phe, Leu in Val in hkrati kažejo manjšo specifičnost za aminokislino pred mestom cepitve (Davy in sod., 1998, 2000).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Rastlinski material

Liste rastline *Phaseolus vulgaris* L., cv. Zorin, smo pobirali z rastlin, posajenih na polju Kmetijskega inštituta Slovenije (v Jablah) in v rastni komori Inštituta »Jožef Stefan« v Ljubljani.

Odrasle rastline *Saintpaulia Ionantha* L., in semena rastlin *Phaseolus vulgaris* L., cv. Zorin, ki smo jih vzgajali v rastni komori, smo dobili v Semenarni Ljubljana, d.d.

##### 3.1.1.1 Kalitev semen

Semena smo pet minut sterilizirali v vodni raztopini (50/50 v/v) Na-hipoklorita (Varikina, Šampionka Renče), jih dobro sprali z destilirano vodo in jih za dve uri pustili namočena v njej (v temi), da so nabrekli. Sterilizirane petrijevke smo po dnu podložili z vato in filtrirnim papirjem in oboje navlažili z destilirano vodo. Semena smo položili na filtrirni papir, petrijevke pa postavili v temo (na 26-28 °C), dokler se niso razvili kalčki, velikosti okoli 1-2 cm. Kaleča semena smo posadili v plastične lončke premera 10 cm, v mešanico zemlje za lončnice (Florabella, Klasmann-Dielmann, Nemčija) in vermikulita (50/50 v/v).

##### 3.1.1.2 Vzgoja rastlin pod kontroliranimi pogoji

Rastline so rasle pod naslednjimi pogoji: 16 urna osvetljenost z močjo 121,3 W/m<sup>2</sup>, pri dnevni temperaturi 25-27 °C, ponoči pa med 21 °C in 23 °C (8 ur). Relativna vlažnost je bila na začetku eksperimenta 70 %. Ob uvedbi sušnih pogojev smo jo naravnali na 40-50 %, pri uvedbi pogojev poplave pa na 80 %. Rastline smo vsak dan zalivali z navadno vodo do enake skupne teže. Po devetnajstih dneh rasti smo rastline, namenjene preučevanju vpliva pomanjkanja vode, prenehali zalivati (pet dni pred pobiranjem listov), medtem ko smo kontrolne rastline še naprej redno zalivali do odvzema listov, ki smo ga izvajali istočasno pri obeh skupinah rastlin. Rastline namenjene preučevanju poplave so rasle skupaj s kontrolnimi 12 dni, nakar so bile izpostavljene poplavi 8 dni preden smo jim odvzeli liste, kar smo istočasno storili tudi na kontrolnih rastlinah.

Poplavo smo simulirali na ta način, da smo pet rastlin posadili v manjše korito s preluknjanim dnom in tega nato postavili v večji pladenj, ki je bil napolnjen z vodo. Gladina vode je bila tik nad nivojem zemlje v koritu. Drug način uvedbe poplave je bil ta, da smo pet rastlin posadili v manjši pladenj, ki ni imel preluknjanega dna in tega nato postavili v večji pladenj z vodo (na isti način kot korito v prejšnjem primeru).

### 3.1.1.3 Vzgoja fižola na polju

Vzgoja fižola, ki smo ga potrebovali za preučevanje encimske aktivnosti, ki poteka pri rasti fižola v naravi, smo uporabljali liste omenjene rastline, ki je bila posajena na polju v Jablah, po dve semeni skupaj v razmaku po 20 cm med posameznimi pari. Fižol je rasel od konca maja do začetka julija. Poskus smo izvajali na drugih, tretjih in četrth listih rastlin, ki smo jih takoj po odvzemu, dali na led in jih po prevozu na institut »Jožef Stefan« shranili pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.1.4 Vzgoja afriške vijolice

Pogoji v rastni komori, kamor smo prenesli afriške vijolice, so bili enaki kot pri gojenju fižola, opisanega v poglavju 3.1.1.2. Rastline smo, skupaj z zemljo, v kateri so rasle, položili na mah, ki je ležal v plastičnih kadičkah, podloženih s filtrirnim papirjem, na katerem je bilo nekaj zemlje. Po sedmih dneh aklimatizacije, med katero smo vse rastline redno pršili z vodo in na ta način vzdrževali vlažnost podlage. Tiste, ki smo jih izpostavili suši, smo po sedmih dneh prenehali vlažiti.

Afriške vijolice so bile izpostavljene suši dva tedna do mesec dni. Liste, ki smo jih uporabljali za pripravo ekstrakta, smo odrezali od rastline (razdelili smo jih v tri kategorije: listi iz roba rozete, srednji listi in listi iz sredice rozete) in jih zamrznili v tekočem dušiku ter jih shranili pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 3.1.2 Priprava listov za poskuse

### 3.1.2.1 Priprava ekstrakta iz listov fižola

Postopek:

Ekstrakt pripravimo iz listov fižola, ki jih po pobiranju z rastlin, takoj zamrznemo. Dve terilnici (eno za drobljenje in eno za ekstrakcijo) ohladimo na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Stehtamo zmrznjene liste, jih damo v manjšo terilnico, prelijemo s tekočim dušikom in kar se da hitro zmeljemo v čimbolj droben prah. Prah prenesemo v drugo terilnico s plastično žličko, kjer ga zmešamo z ekstrakcijskim pufrom (50 mM Tris-HCL; pH 7,5; 4 ml/g listov), z dodatkom PVP-ja (2,5 g/g listov) ter vse skupaj homogeniziramo. Ponekod puftru dodamo še DTT; do končne skupne koncentracije 10 mM (pri preučevanju vpliva reducenta). Homogenat nato precedimo preko dvojnega sloja pleničnih predlog (Tosama). Ekstrakcijo proteinov zaključimo s centrifugiranjem pri  $14000\times g$  (20 min), po katerem odvezamemo supernatant, ki ga zamrznemo v tekočem dušiku in nato shranimo pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.2.2 Priprava ekstrakta iz listov afriške vijolice

Postopek:

Listni ekstrakt iz vijolice pripravimo na enak način kot ekstrakt iz listov fižola; glej poglavje 3.1.2.1.

### 3.1.3 Kemikalije

Večina kemikalij, ki smo jih uporabljali je bila p.a., proizvajalcev Serva, Merck in Carlo Erba. Proizvajalci encimskih substratov in inhibitorjev so navedeni v preglednici št.1.

Preglednica 1: Proizvajalci uporabljenih substratov in inhibitorjev

Substrat	Proizvajalec
BAPNA	Sigma
Azokazein	Fluka BioChemica
Z-Phe-Arg-pNA	Bachem
Z-Arg-Arg-pNA	Bachem
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	Bachem
LPNA	Bachem
Inhibitor	
Pefabloc SC	Boehringer
EDTA	Sigma
E-64	Peptide Research Institute (Osaka)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Določanje vsebnosti proteinov v ekstraktu

Princip:

Količino proteinov v ekstraktu, določamo z metodo po Bradford-ovi, ki temelji na vezavi barvila Coomassie Brilliant Blue G-250, na aromatske aminokislinske ostanke (pri kislem pH). Obarvane kompleksne spojine, ki pri tem nastanejo, imajo absorpcijski maksimum pri 595 nm. Omenjeni produkti reakcije so obstojni samo določen čas. Koncentracijo proteinov določimo na podlagi povprečne vsebnosti aromatskih aminokislin v proteinih. Pri našem določanju smo uporabljali kar umeritveno krivuljo, ki predstavlja absorbanco različnih razredčitev standardnega govejega serumskega albumina znane koncentracije, pri 595 nm.

Postopek:

Istočasno odpipetiramo v eno epruveto 800  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O in 200  $\mu$ l barvila, kar nam služi kot slepi poskus absorpcije barvila (brez pristnosti proteinov v raztopini) ter v serijo treh epruвет (vzporednih poskusov), v vsako: 750  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, 50  $\mu$ l raztopine proteinov. Nato v vsako izmed teh treh, v enakih časovnih razmikih, 200  $\mu$ l barvila Coomassie Blue.

Epruvete (po dodatku barvila), v enakem zaporedju kot pri dodajanju barvila, dobro premešamo na vrtničniku in pustimo 10 min pri sobni temperaturi, da poteče vezava barvila.

Absorbanco merimo na ta način, da najprej izmerimo slepi poskus in instrument umerimo na vrednost nič, ter nato v enakih časovnih razmikih, kot pri dodajanju barvila, izmerimo še vzporedne poskuse.

Vrednosti absorbance naneseemo na umeritveno krivuljo, od koder odčitamo ustrezno koncentracijo proteinov, ki jo kasneje uporabimo za izračun specifičnih aktivnosti.

### 3.2.2 Določanje encimske aktivnosti v svežem ekstraktu

#### 3.2.2.1 Določanje aktivnosti z azokazeinom

Azokazein je derivat naravnega proteina kazeina (produkta kravje mlečne žleze), pri katerem so stranske verige tirozina in histidina, povezane s sulfanilamidom v alkalnem, z dvojno dušikovo vezjo. Takšna vezava daje omenjenemu proteinu intenzivno rumeno barvo.

Princip:

Rezultat proteolitične razgradnje azokazeina so peptidi, ki so topni v 50 % (w/w) TCA in katerih koncentracijo lahko izmerimo kot absorbanco pri 340 nm, medtem ko je ne razgrajeni azokazein v omenjeni raztopini netopen in ga od nje zlahka ločimo s centrifugiranjem.

Postopek določanja encimske aktivnosti:

V dve mikrocentrifugirki odpipetiramo 300  $\mu$ l 250 mM puфра, s pH vrednostjo pri kateri določamo encimsko aktivnost, 300  $\mu$ l ekstrakta (1/40 v/v), razredčenega z 20 mM PP; pH 7,5. V eno mikrocentrifugirko, ki nam bo služila kot test odpipetiramo še 300  $\mu$ l azokazeina (0,4 % w/w), ne pa tudi v mikrocentrifugirko, ki nam bo služila za slepo probo. Obe mikrocentrifugirki inkubiramo 3 h pri 37 °C. Inkubacijo prekinemo z dodatkom 200  $\mu$ l TCA (50% w/w) v obe mikrocentrifugirki ter v tisto, ki nam služi kot slepa proba, odpipetiramo še 300  $\mu$ l azokazeina (0,4 % w/w). Obe mikrocentrifugirki postavimo na led za 30 min, da poteče obarjanje ne razgrajenega azokazeina. Oborine se dokončno znebimo s centrifugiranjem (20000 $\times$ g z Eppendorf 5410 centrifugo), po katerem supernatanta prelijemo v novi mikrocentrifugirki, ki ju nato, tik preden merimo absorbanco raztopine v njih, še enkrat centrifugiramo (pri enakem večkratniku težnostnega pospeška).

Absorbanco merimo v 1 cm široki plastični kiveti pri 340 nm s spektrofotometrom (Perkin-Elmer, lambda 18), na ta način, da najprej izmerimo absorbanco slepega poskusa, ki jo nato odštejemo od absorbance vzorca, kjer je potekla hidroliza. Razlika ( $\Delta A_{340}$ ) je premo sorazmerna koncentraciji produktov encimske razgradnje in posledično proteolitični aktivnosti. Ponekod smo rezultate podali v obliki specifične aktivnosti, ki smo jo definirali kot  $\Delta A_{340}/(\text{mg proteinov} \times \text{h})$ .

Encimsko aktivnost v listnem ekstraktu iz St. Paulie, smo določali po enakem postopku, le da smo v reakcijsko zmes, dodali naslednje količine reaktantov: 300  $\mu$ l 250 mM puфра (Na-Acetat s pH 5 in Tris-HCl s pH 8; oba z dodatkom  $\beta$ -MeOH (1/100 v/v)), 300  $\mu$ l azokazeina (0,4 % w/w), 300  $\mu$ l nerazredčenega ekstrakta in 200  $\mu$ l TCA (50 % w/w).

### 3.2.2.2 Določanje encimske aktivnosti z Z-Phe-Arg-pNA

Za določanje aktivnosti smo uporabili tudi sintetični, ne proteinski substrat Z-Phe-Arg-pNA; t.j. dipeptid, ki ima na amino koncu vezano benzoilno skupino, na karboksilni skupini pa paranitroanilin. Ker omenjeni substrat nima prostih skupin za eksopeptidaze, je primeren za določanje endopeptidaz, ki cepijo samo določene peptidne vezi znotraj peptidne verige proteinov.

Princip:

Proteolitični encimi cepijo amidno vez med argininom in paranitroanilinom, kar ima za posledico odcepitev para-nitroanilina, katerega koncentracija je premo sorazmerna absorbcanci vpadne svetlobe z valovno dolžino 405 nm.

Postopek:

Encimsko aktivnost smo določali na več načinov, saj smo skušali ugotoviti optimalno razmerje med reaktanti ter takšno razmerje nato uporabiti za izdelavo pH diagrama. Za preizkus aktivnosti ekstrakta iz listov fižola, na različne substrate, smo torej pripravili reakcijsko mešanico na sledeč način: 420 $\mu$ l 100 mM pufru Tris-HCl, s pH vrednostjo 7,8, 50  $\mu$ l nerazredčenega ekstrakta in 30  $\mu$ l 1 mM raztopine posameznega substrata. V slepem poskusu smo poleg tega dodali še 300  $\mu$ l 200 mM HCl (prekinjevalca). Oboje, slepi in pravi poskus, smo potem inkubirali pri 37 °C, 30 min in nato še v pravi poskus dodali prekinjevalec. Reakcijske produkte v raztopini, ki smo jih želeli izmeriti, smo ločili od oborine s centrifugiranjem pri 20000 $\times$ g (z Eppendorf 5410 centrifugo). Nato smo izmerili razliko med absorbancama slepega in pravega poskusa pri valovni dolžini 405 nm.

Pri preizkusu encimske aktivnosti ekstraktov iz St. Paulie, je bil princip enak, le da je reakcijska zmes vsebovala naslednje količine reaktantov:

- a) Pri določanju aktivnosti na substrat BAPNA: 25  $\mu$ l pufru 250 mM Tris-HCl, s pH-vrednostjo 8,5, 100  $\mu$ l nerazredčenega ekstrakta, 375  $\mu$ l 1 mM substrata ter 200  $\mu$ l 200 mM HCl (prekinjevalca). Čas inkubacije pri 37 °C, je bil v tem primeru 1 h.
- b) Pri določanju aktivnosti na substrat LPNA: 275  $\mu$ l pufru 250 mM Tris-HCl, s pH-vrednostjo 8,5, 25  $\mu$ l nerazredčenega ekstrakta, 250  $\mu$ l 4 mM substrata ter 250  $\mu$ l 1M HClO<sub>4</sub> (prekinjevalca).
- c) Pri določanju aktivnosti na ostale substrate (glej preglednico 6 v poglavju rezultati): 370  $\mu$ l 250 mM pufru Tris-HCl, s pH-vrednostjo 8,5, 100 $\mu$ l nerazredčenega ekstrakta, 30  $\mu$ l 1 mM substrata ter 500  $\mu$ l 200 mM HCl (prekinjevalca).

### 3.2.3 Izdelava pH diagrama

pH diagram encimske aktivnosti, je v krivuljo povezana množica točk, ki predstavljajo aktivnost na določen substrat, pri različnih pH vrednostih.

Za izdelavo pH diagramov smo uporabljali dva substrata: azokazein in Z-Phe-Arg-pNA. Z obema smo določali aktivnosti različnih listnih ekstraktov od pH 5 do pH 10,5, na vsake pol enote pH vrednosti.

Encimsko aktivnost, smo določali po enakem principu, kot v poglavjih določanje encimske aktivnosti z azokazeinom in določanje encimske aktivnosti s paranitro-anilidi, pri čemer smo za vzdrževanje pH-vrednosti uporabljali naslednje pufre: za pH 5 acetatni pufer, za pH 5,5

acetatni pufer oz. pufer MES, od pH 6 do vključno pH 6,5 pufer MES, od pH 7 do vključno pH 8,5 Tris-HCl pufer in od pH 9 do vključno pH 10,5 Glicin. Vsi pufri so imeli koncentracijo 250 mM.

Pri meritvah z azokazeinom smo, v 300  $\mu$ l vsakega izmed zgoraj navedenih pufrov, odpipetirali naslednje količine reagentov: 300  $\mu$ l azokazeina (0,4 % w/w), 300  $\mu$ l ekstrakta, zredčenega (1/20 v/v) z dH<sub>2</sub>O in 200  $\mu$ l TCA (50 % w/w).

Pri meritvah z Z-Phe-Arg-pNA pa, v 250  $\mu$ l vsakega izmed teh pufrov: 200  $\mu$ l 1 mM Z-Phe-Arg-pNA, 50  $\mu$ l nerazredčenega ekstrakta in 500  $\mu$ l 200 mM HCl.

Najprej smo izdelali oba diagrama, za listni ekstrakt iz cv. Zorin-polje z dodanim reducentom ( $\beta$ -MeOH; 1/100 v/v) in za enak ekstrakt, brez dodatka reducenta.

Potem smo izdelali še oba diagrama za ekstrakt cv. Zorin-kontrola in za ekstrakt cv. Zorin-poplava.

Namen izdelave pH diagrama je v tem, da za bolj ali manj splošne skupine encimov, ki katalizirajo razgradnjo obeh uporabljenih substratov, določimo tiste pH vrednosti, pri katerih so ti encimi najbolj aktivni in na podlagi tega sklepamo na encimsko aktivnost peptidaz v organizmu *Phaseolus Vulgaris* cv. Zorin, ki ga izpostavimo vodnemu stresu.

### 3.2.4 Določanje deleža inhibicije encimske aktivnosti z različnimi inhibitorji

Princip:

Princip metode inhibicije peptidaz iz ekstrakta je osnovan na primerjavi dveh encimskih aktivnosti; aktivnosti encimske reakcije brez inhibitorja in aktivnosti enake reakcije ob prisotnosti inhibitorja.

Inhibitorji, ki smo jih uporabili za določanje deleža inhibicije so: E-64 (inhibitor cisteinskih peptidaz), Pefabloc SC (inhibitor serinskih peptidaz) in EDTA (inhibitor metalo-peptidaz). Mehanizmi inhibicije uporabljenih inhibitorjev se med seboj razlikujejo (nekateri inhibitorji se vežejo na aktivna mesta encimov, drugi delujejo posredno na encime) in so splošno poznani, zato jih ne bomo podrobneje obravnavali.

Postopek:

V treh mikrocentrifugirkah pripravimo raztopine inhibitorjev v ekstraktu, na ta način, da v vsako odpipetiramo 50  $\mu$ l ekstrakta in nato v prvo 2  $\mu$ l 1 mM E-64, v drugo 2,5  $\mu$ l 4 mM Pefabloc-a in v tretjo 1,25  $\mu$ l 100mM EDTA. Potem pripravimo še dve mikrocentrifugirki za slepo probo in kontrolo, tako da v obe odpipetiramo po 50  $\mu$ l ekstrakta in nato vseh pet skupaj inkubiramo 30 min pri 20 °C.

Medtem pripravimo drugo skupino petih mikrocentrifugirk, v katere odpipetiramo po 250  $\mu$ l 250 mM pufera s pH vrednostjo, pri kateri določamo delež inhibicije, in nato v štiri izmed njih še 200  $\mu$ l 1 mM Z-Phe-Arg-pNA. Iz vsake mikrocentrifugirke, ki smo jo inkubirali, smo prenesli vsebino v eno izmed mikrocentrifugirk iz druge skupine. Ena iz te skupine ne vsebuje substrata in ga moramo vanjo dodati po tem, ko vse mikrocentrifugirke inkubiramo 10 min pri 37 °C in jim dodamo 500  $\mu$ l 0,200 mM HCl (prekinjevalec).

Vse mikrocentrifugirke nato centrifugiramo pri 20000 $\times$ g (Eppendorf 5410 centrifugo) in izmerimo absorbanco supernatantov pri valovni dolžini 405nm.

Določanje deleža inhibicije encimske aktivnosti na azokazein, poteka na enak način kot za Z-Phe-Arg-pNA, s to razliko, da v tri mikrocentrifugirke odpipetiramo po 1000  $\mu$ l ekstrakta (razredčenega v razmerju 1/20 v/v s 50 mM pufrom Tris-HCL; pH 7,5) in nato v prvo 20  $\mu$ l 4mM Pefabloc SC, v drugo 15  $\mu$ l 1 mM E-64 in v tretjo 1,25  $\mu$ l 100mM EDTA. Posebej dve mikrocentrifugirki napolnimo, vsako s 300  $\mu$ l že omenjenega ekstrakta in nato vseh pet skupaj inkubiramo 30 min pri 20 °C.

Enako kot pri prejšnjem poskusu, pripravimo drugo skupino petih mikrocentrifugirk, v katere odpipetiramo po 300  $\mu$ l 250 mM puфра s pH vrednostjo, pri kateri določamo delež inhibicije, in nato v štiri izmed njih še 300  $\mu$ l 0,4 % w/w raztopine azokazeina.

Inkubacija poteka 3 h, pri 37 °C in jo končamo z dodatkom 200  $\mu$ l TCA (50 % w/w) v vse epice. Paziti moramo, da dodamo substrat še v slepo probo. Produkta encimske reakcije potem z obarjanjem (30 min na ledu) in dvakratnim centrifugiranjem (pri 20000 $\times$ g) ločimo od oborine in jih izmerimo kot absorbanco supernatanta pri valovni dolžini 340 nm.

Delež inhibicije določimo na ta način, da od absorbance kontrolnega poskusa odštejemo slepo probo in nato absorbance poskusov z inhibitorji izrazimo kot delež te razlike, v odstotkih.

Zaradi specifičnosti posameznih inhibitorjev, nam lahko delež inhibicije služi kot ocena profila proteolitične aktivnosti v organizmu *Phaseolus Vulgaris*, cv. Zorin, pri različnih pogojih rasti (pri naravnih pogojih na polju, med poplavo in med kontroliranimi pogoji).



## 4 REZULTATI

V prvem delu tega poglavja so podani rezultati raziskav listnih ekstraktov iz rastlin fižola sorte Zorin, ki je rasel na polju ter listnih ekstraktov iz rastlin iste sorte, gojenih pod kontroliranimi pogoji suše, poplavljanja in pod optimalnimi pogoji oskrbe z vodo. Drugi del rezultatov se nanaša na raziskave listnih ekstraktov rastlin afriške vijolice, ki so rasle pod kontroliranimi pogoji suše in optimalne oskrbe z vodo. Razčlenitev listnih ekstraktov na tiste z reducentom in tiste brez reducenta je pri poskusih, pri katerih smo preučevali aktivnost cisteinskih peptidaz, namenoma poudarjena, saj se le te ob dodatku reducenta aktivirajo.

### 4.1 VPLIV SUŠE NA CISTEINSKE PEPTIDAZE IZ LISTOV FIŽOLA SORTE ZORIN

#### 4.1.1 Izbira substratov in eksperimentalnih pogojev

Najprej smo preučevali proteolitično aktivnost ekstrakta iz listov rastlin, ki so rasle na polju (preglednica 2). Substrate za ta poskus smo izbrali na podlagi dognanj iz diplomskega dela Maje Šoštarič (2005), ter člankov avtorjev Hieng in sod. (2004) in Popovič in sod. (1998). Cilj je bil izbrati substrat, primeren za preučevanje proteolitične aktivnosti tega ekstrakta, v širšem območju pH vrednosti. Hkrati smo hoteli karseda dobro določiti aktivnost cisteinskih peptidaz.

Sklepali smo, da bi nam določanje aktivnosti s substratom, s katerim smo določili veliko razliko med specifičnima aktivnostma ekstrakta z in brez dodanega reducenta, omogočilo natančno določiti aktivnosti cisteinskih peptidaz.

Preglednica 2: Vsebnost proteinov (mg/ml) in specifična aktivnost ( $\Delta A_{405} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ; oz.  $\Delta A_{340} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  za azokazein) ekstraktov iz listov rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin, ki so rasle na polju, določena s šestimi različnimi substrati.

ekstrakt	Proteini	BAPNA pH 7,8	LPNA pH 7,8	Z-Phe- Arg- pNA pH 7,8	Z- Arg- Arg- pNA pH 7,8	Suc-A- A-Pro- Phe- pNA pH 7,8	Azo- kazein pH 7,8	Azo- kazein pH 5
brez reducenta	2,87	0,078	0,19	0,012	0,025	0,022	1,60	1,32
z reducentom	2,84	0,073	0,15	0,036	0,037	0,0086	1,31	1,28

Največje razlike med specifično aktivnostjo ekstrakta pripravljenega brez reducenta (A) in tistega, v katerem je reducent bil prisoten (B), smo določili s substratoma Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA in Z-Phe-Arg-pNA, medtem ko smo s pomočjo ostalih substratov, določili le manjše razlike, ki so lahko v območju eksperimentalne napake. Poleg tega je bila aktivnost na Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA veliko nižja v ekstraktu B, kar pomeni, da s tem substratom ne detektiramo cisteinskih peptidaz.

Na osnovi teh rezultatov smo se odločili, da bomo delo nadaljevali s substratoma Z-Phe-Arg-pNA in azokazein. Pri izbiri smo, poleg večje aktivnosti v ekstraktu ob prisotnosti reducenta, upoštevali tudi dejstvo da so Popovič in sod. (1998), uspešno uporabili substrat Z-Phe-Arg-MCA, za določanje aktivnosti v postopku izolacije cisteinskih peptidaz. Za azokazein smo se odločili navkljub temu, da ni bilo signifikantnih razlik v prid aktivnosti ekstrakta z reducentom. Azokazein je namreč splošen substrat za različne endopeptidaze in bi nam lahko služil kot neka vrsta kontrole, saj bi ob morebitnem sovpadanju oz. ne sovpadanju vrhov aktivnosti pri obeh substratih, lažje presodili, v kakšni meri je to moč pripisati delovanju cisteinskih peptidaz oz. v kakšni meri je to aktivnost moč pripisati drugim endopeptidazam (npr. serinskim endopeptidazam in metalopeptidazam).

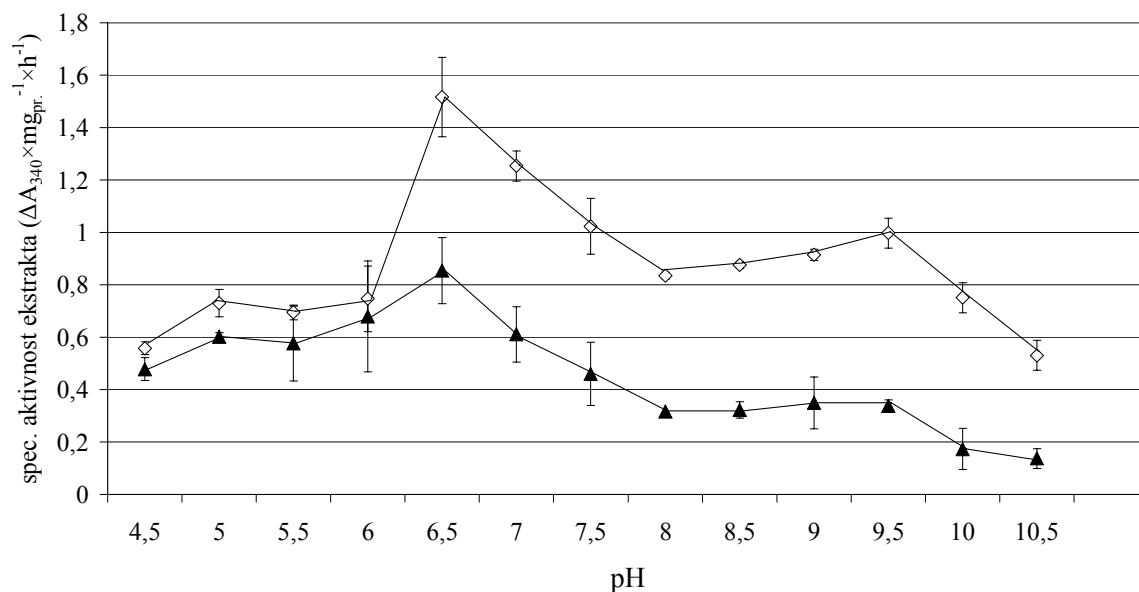
S pomočjo teh dveh substratov smo izdelali diagram odvisnosti proteolitične aktivnosti listnih ekstraktov od pH, da bi ugotovili pri katerem pH je aktivnost največja.

#### 4.1.2 Endopeptidazne aktivnosti listnih ekstraktov na azokazein

V tem delu diplomske naloge, smo se pri načrtovanju eksperimentov oz. določanju azokazeinolitične aktivnosti, oprli na dognanja iz diplomske naloge M. Šoštarč (2005).

##### 4.1.2.1 Aktivnosti v listih rastlin, ki so rasle na polju

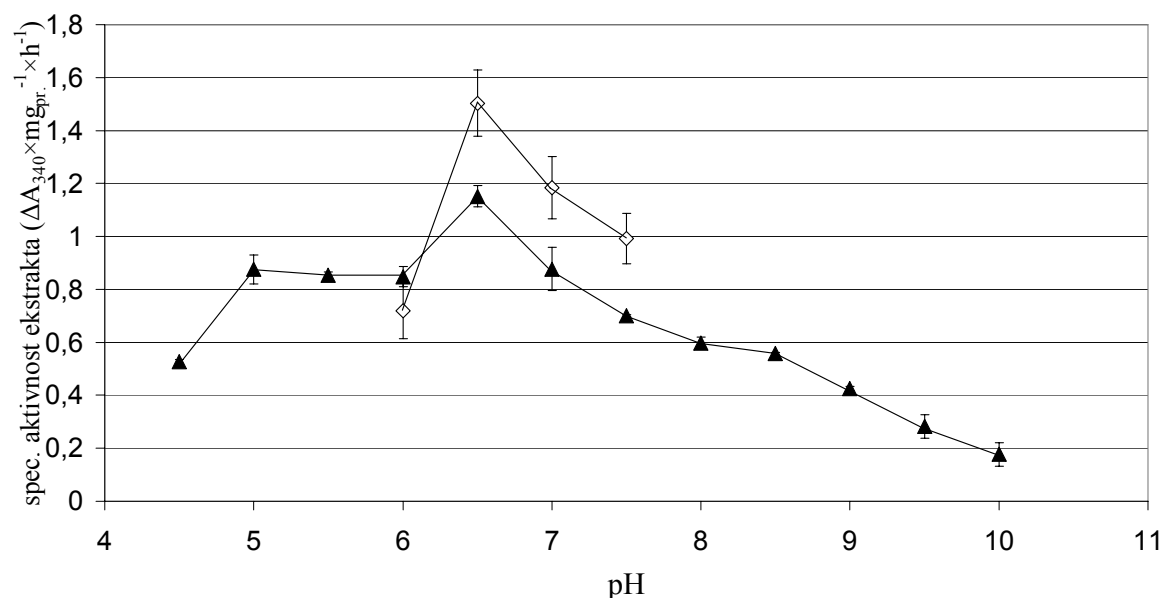
Najprej smo določili pH profil aktivnosti na azokazein ekstraktu, ki smo ga pripravili s pufrom, v katerem je bil prisoten reducent DTT (slika 1). Opazimo lahko povečano aktivnost pri pH vrednostih: 5, 6,5, 8,5 in 9,5. Potem smo izmerili še aktivnosti ekstrakta, ki smo ga pripravili s pufrom, v katerem ni bilo reducenta DTT (slika 1). Pričakovali smo, da bo v primeru prisotnosti cisteinskih peptidaz vsaj pri določenih pH vrednostih izmerjena aktivnost brez dodanega reducenta nižja. Ugotovili pa smo, da so aktivnosti ekstrakta brez reducenta povsod višje od aktivnosti ekstrakta z reducentom in da posamezni vrhovi aktivnosti nastopijo v obeh primerih pri istih pH vrednostih.



Slika 1: pH profil specifičnih azokazeinolitičnih aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin, ki so rasle na polju. Brez reducenta (◇) in z reducentom (▲).

Čeprav se izmerjene vrednosti specifičnih aktivnosti na azokazein iz slike 1 ne ujemajo povsem s tistimi iz preglednice 2, pa so razlike med specifičnimi aktivnostmi ekstrakta brez reducenta in z dodanim reducentom, v obeh poskusih primerljive. Razloge za razlike v meritvah lahko iščemo tudi v dejstvu, da smo določali proteolitično aktivnost štirim ekstraktom z različno vsebnostjo proteinov, čeprav smo pridobili vse štiri iz iste populacije rastlin. Poleg tega obstaja velika verjetnost, da je bila zastopanost listov različne starosti v posameznih vzorcih, ki smo jih uporabili za pripravo listnih ekstraktov rastlin s polja neenakomerna, kar lahko pomembno vpliva na celotno proteolitično aktivnost (Šoštarč, 2005).

Ker je bila večja aktivnost v ekstraktu brez reducenta nepričakovana, smo ta rezultat želeli preveriti na ta način, da smo ekstrakta z in brez reducenta redčili s pufrom brez dodatka reducenta. Reducent je bil torej dodan le enemu izmed ekstraktov, med postopkom ekstrakcije topnih proteinov. Pred inkubacijo smo ekstrakt dvajsetkrat redčili, in s tem koncentracijo reducenta zmanjšali. Rezultati tega poskusa so prikazani na sliki 2.



Slika 2: pH profil specifičnih azokazeinolitičnih aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin, ki so rasle na polju. Brez reducenta (◇) in z dodatkom reducenta med ekstrakcijo (▲). Oba ekstrakta sta bila pred inkubacijo redčena s pufrom brez dodanega reducenta.

Ugotovili smo, da dodatek reducenta med ekstrakcijo, povzroči znižanje aktivnosti ekstrakta na azokazein v območju od pH 6,5 do 7,5. Pri pH 9,5 nismo zaznali vrha aktivnosti ekstrakta z reducentom, kakršnega smo določili v poskusu prikazanem na sliki 1.

#### 4.1.2.2 Vpliv inhibitorjev na azokazeinolitično aktivnost ekstraktov iz rastlin fižola sorte Zorin, ki so rasle na polju

Za preučevanje vpliva inhibitorjev na delovanje encimov v listnem ekstraktu, smo uporabili tri encimske inhibitorje; in sicer: Pefabloc SC (inhibitor serinskih peptidaz), E-64 (inhibitor cisteinskih peptidaz) in EDTA (inhibitor metalopeptidaz).

Poskus smo izvedli z istima ekstraktoma, kot pri poskusu določanja aktivnosti v širšem pH območju (slika 1), pri čemer smo določali delež inhibicije pri tistih pH vrednostih, kjer smo predhodno določili lokalne maksimume aktivnosti (pH 5, 6,5, 8,5 in 9,5).

Rezultati tega poskusa so podani v preglednici 3, kjer posamezne vrednosti povedó, za kolikšen delež (v odstotkih) se zmanjša proteolitična aktivnost, če v reakcijsko mešanico dodamo inhibitor; oz.  $\{1-(\Delta A_{\text{inh.}}/\Delta A_{\text{kontr.}})\} \times 100$ .

Preglednica 3: Delež inhibicije (%) azokazeinolitične aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin, ki so rasle na polju.

pH	5			6,5			8,5			9,5		
	E-64	Pef.	EDTA	E-64	Pef.	EDTA	E-64	Pef.	EDTA	E-64	Pef.	EDTA
Brez reducenta	32	37	6	2	8	32	9	25	3	9	25	0
Z reducentom	21	0	5	12	0	37	5	40	0	0	74	0

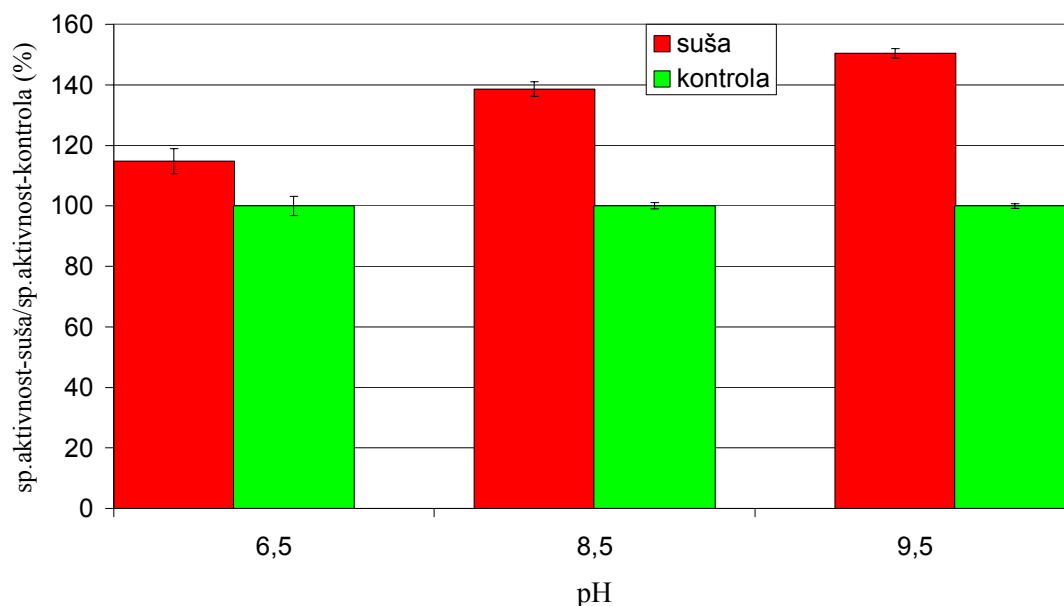
Iz rezultatov iz preglednice 3 je razvidno, da azokazeinolitično aktivnost peptidaz pri pH 5 v ekstraktu brez reducenta, inhibirata Pefabloc SC in E-64, kar kaže na prisotnost serinskih in cisteinskih peptidaz. Slednje so očitno aktivne tudi v odsotnosti reducenta. Pri tem pH je aktivnost metalopeptidaz zelo nizka, saj v prisotnosti EDTA delež inhibicije zanemarljivo majhen. Nasprotno je pri pH 6,5 EDTA edini učinkovit inhibitor. Pri višjih pH vrednostih, pa dosežemo določeno inhibicijo s Pefabloc SC pri pH 8,5, kar pomeni, da so v ekstraktu prisotne serinske peptidaze, aktivne tudi pri tem pH.

E-64 malo inhibira pri pH 8,5 in 9,5, kar vseeno kaže na prisotnost cisteinskih peptidaz. Ti rezultati pomenijo, da so v ekstraktu fižolovih listov prisotne serinske, metalo- in cisteinske peptidaze, ki so maksimalno aktivne pri različnih pH.

Rezultati študije vpliva reducenta na inhibicijo azokazeinolitične kažejo, da serinske peptidaze v ekstraktu pripravljenim z reducentom (preglednica 3), pri kislih pH niso aktivne ali pa so razgrajene.

#### 4.1.2.3 Vpliv pomanjkanja vode na azokazeinolitično aktivnost endopeptidaz v listnih ekstraktih fižola sorte Zorin

Poskus je vključeval primerjalno določanje aktivnosti ekstrakta iz listov sorte Zorin, ki je rasla pod pogoji suše, z aktivnostjo ekstrakta iz kontrolnih rastlin, pri pH vrednostih: 6,5, 8,5 in 9,5. Rezultati tega poskusa so podani na sliki 3, kot specifične aktivnosti ekstraktov v odvisnosti od pH.



Slika 3: Relativne specifične azokazeinoliticheske aktivnosti (%) v listnem ekstraktu iz rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin, ki so bile izpostavljene suši (rdeča) in v ekstraktu iz kontrolne skupine rastlin (zelena).

Specifična aktivnost endopeptidaz na azokazein, je v ekstraktu iz sušnih rastlin večja od tiste v ekstraktu iz kontrolnih rastlin, pri vseh obravnavanih pH vrednostih.

Pri pH 6,5 je ta razlika majhna, medtem ko je pri bazičnih pH že značilno večja. Ker smo želeli določiti, kateri razredi peptidaz so aktivni v omenjenih dveh ekstraktih, smo izvedli poskus z inhibitorji.

#### 4.1.2.4 Vpliv inhibitorjev na azokazeinolitichesko aktivnost listnega ekstrakta iz rastlin, ki so bile izpostavljene suši in ekstrakta iz kontrolnih rastlin

Delež inhibicije azokazeinoliticheske aktivnosti, smo določali s pomočjo enakih inhibitorjev in pri istih pH vrednostih, kot v poglavju 4.1.2.2. Rezultati teh poskusov so podani v preglednici 4, kot odstotek inhibicije azokazeinoliticheske aktivnosti, z izbranim inhibitorjem, pri določenem pH.

Preglednica 4: Delež inhibicije (%) azokazeinoliticheske aktivnosti listnega ekstrakta iz rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin, ki so rasle pod pogoji suše in ekstrakta iz kontrolnih rastlin.

pH	5			6,5			8,5			9,5		
	E-64	Pef.	EDTA	E-64	Pef.	EDTA	E-64	Pef.	EDTA	E-64	Pef.	EDTA
suša	4	4	*N.D.	N.D.	11	4	0	18	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
kontrola	23	9	N.D.	N.D.	0	5	2	12	N.D.	0	0	N.D.

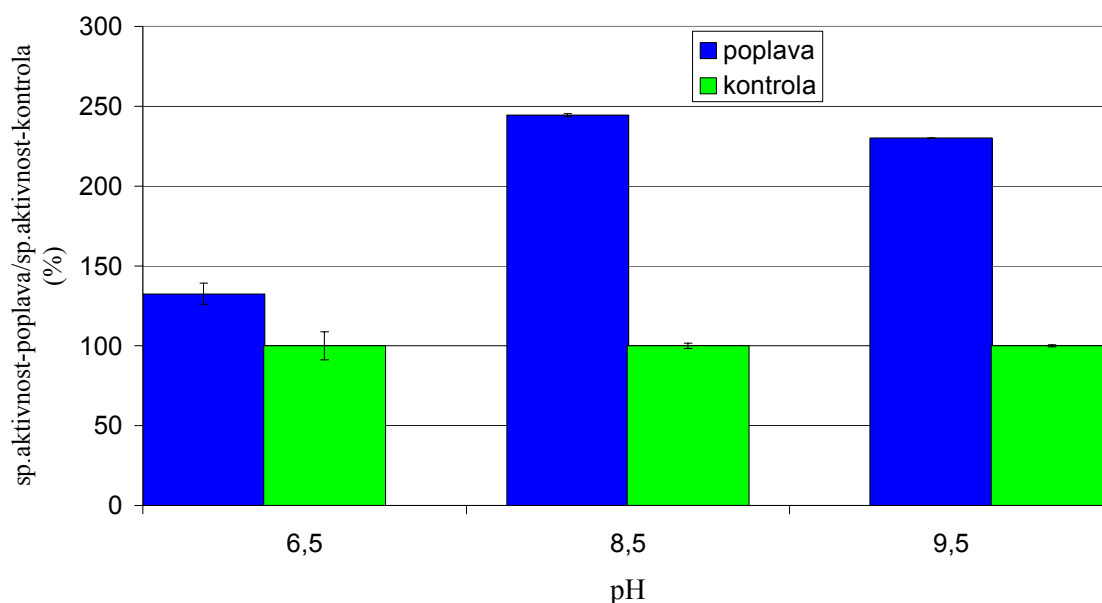
\*N.D.-nismo določali

Iz preglednice je razvidno, da pri pH 5 E-64 inhibira azokazeinolitichesko aktivnost v večji meri v ekstraktu iz normalno zalivanih rastlin, kot v ekstraktu iz sušnih rastlin. Ravno obratno velja

za Pefabloc SC, ki v večji meri inhibira azokazeinolitično aktivnost v ekstraktu iz sušnih rastlin, kot v ekstraktu iz kontrolnih rastlin. Pri pH 8,5 je v ekstraktu iz kontrolnih rastlin aktivnost inhibirana s Pefabloc SC in minimalno z E-64. Pri ekstraktu iz sušnih rastlin pa je pri tem pH uspešen inhibitor edino pefabloc SC, vendar le v manjši meri inhibira aktivnost serinskih peptidaz.

#### 4.1.2.5 Vpliv poplavljanja na azokazeinolitično aktivnost endopeptidaz v listnih ekstraktih iz fižola sort Zorin in Češnjevce

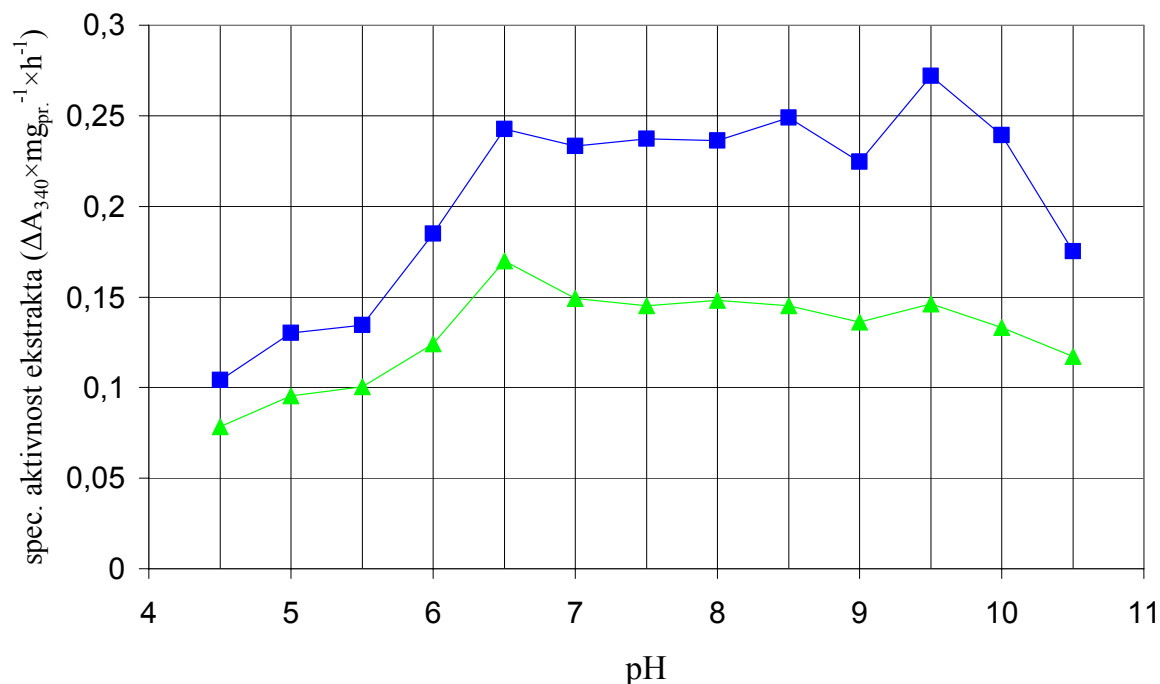
Najprej smo preučevali vpliv poplavljanja na sorto Zorin. Določali smo azokazeinolitično aktivnost ekstraktov iz listov rastlin, ki so rasle pod pogoji poplavljanja in ekstraktov iz kontrolnih rastlin. Aktivnost smo določali pri pH vrednostih 6,5, 8,5 in 9,5, kot v prejšnjem poglavju. Rezultati so podani na sliki 4, kot specifične aktivnosti ekstraktov v odvisnosti od pH.



Slika 4: Relativne specifične azokazeinolitične aktivnosti (%) v listnem ekstraktu iz rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin, ki so rasle pod pogoji poplave (modra) in v ekstraktu iz kontrolnih rastlin (zelena).

Pri vseh pH so specifične aktivnosti ekstraktov iz rastlin, ki so bile izpostavljene poplavi, večje kot specifične aktivnosti ekstraktov iz kontrolnih rastlin.

Želeli smo preveriti, ali je azokazeinolitična aktivnost tudi pri sorti Češnjevce enaka oz. vsaj podobna tisti pri sorti Zorin in ali ima poplavljanje podoben vpliv na to aktivnost kot pri sorti Zorin. Zato smo določili pH profil aktivnosti listnima ekstraktoma iz sorte Češnjevce, ki sta bila pripravljena, eden iz rastlin, ki so rasle pod pogoji poplavljanja in eden iz kontrolne skupine rastlin. Rezultati so prikazani na sliki 5.



Slika 5: pH profil specifične azokazeinolitične aktivnosti listnega ekstrakta iz rastlin *P. vulgaris* cv. Češnjevec, ki so bile izpostavljene poplavi (■) in ekstrakta iz rastlin iste sorte, ki je rasla pod optimalnimi pogoji oskrbe z vodo (▲).

Posamezne maksimalne vrednosti pri sorti Češnjevec, se pojavijo pri istih pH vrednostih, kot pri pH profilu ekstraktov iz rastlin sorte Zorin (slika 1), ki so rasle na polju, čeprav so specifične aktivnosti ekstraktov iz rastlin sorte Zorin, ki so rasle na polju, povsod precej večje od specifičnih aktivnosti ekstraktov iz rastlin sorte Češnjevec, ki so bile izpostavljene poplavljanju. Vendar pa med specifičnimi aktivnostmi ekstraktov, pripravljenih iz listov rastlin sort Zorin in Češnjevec, gojenih pod kontroliranimi pogoji ni pomembnih razlik, razen v specifični aktivnosti pri pH 6,5, kjer so specifične aktivnosti listnih ekstraktov iz sorte Češnjevec, praviloma nižje od specifičnih aktivnosti ekstraktov iz sorte Zorin.

Iz slik 4 in 5 je razvidno, da je tako pri ekstraktih sorte Zorin, kot tudi pri sorti Češnjevec, azokazeinolitična aktivnost ekstraktov iz poplavljenih rastlin, povsod večja od aktivnosti ekstraktov iz kontrolnih rastlin.

#### 4.1.2.6 Vpliv inhibitorjev na azokazeinolitično aktivnost ekstrakta iz fižola sorte Zorin, ki je bila izpostavljena poplavi in ekstrakta iz kontrolnih rastlin

Ugotoviti smo nameravali v kolikšni meri prispevajo posamezni razredi peptidaz, ki smo jih preučevali v poglavju 4.1.2.2, k azokazeinolitični aktivnosti listnega ekstrakta iz rastlin, ki so rasle pod pogoji poplavljanja ter koliko k ekstraktu iz kontrolnih rastlin sorte Zorin. V ta namen smo določili delež inhibicije azokazeinolitične aktivnosti z enakimi inhibitorji in pri istih pH vrednostih, kot pri preučevanju ekstraktov iz rastlin, ki so rasle pod sušnimi pogoji.

Preglednica 5: Delež inhibicije (%) azokazeinolitične aktivnosti listnega ekstrakta iz rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin, ki so bile izpostavljene poplavi in ekstrakta iz kontrolnih rastlin.

pH	5			6,5			8,5			9,5		
	E-64	Pef.	EDTA	E-64	Pef.	EDTA	E-64	Pef.	EDTA	E-64	Pef.	EDTA
poplava	20	6	*N.D.	N.D.	9	22	3	10	N.D.	1	4	N.D.
kontrola	0	0	N.D.	N.D.	4	27	17	28	N.D.	5	9	N.D.

\* N.D.-nismo določali

Iz rezultatov prikazanih v preglednici 5 je razvidno, da pri pH 5, v ekstraktu iz kontrolnih rastlin ni inhibicije azokazeinolitične aktivnosti z E-64 in Pefabloc SC, medtem ko je v ekstraktu rastlin podvrženih poplavi aktivnost delno inhibirana z E-64 in Pefabloc SC. Pri pH 6,5 je pri obeh ekstraktih inhibirana zlasti aktivnost metalopeptidaz z EDTA. Pri pH 8,5 in 9,5 smo določili manjšo inhibicijo s Pefabloc SC in E-64, tako v ekstraktu iz poplavljenih rastlin kot v ekstraktu iz kontrolnih rastlin.

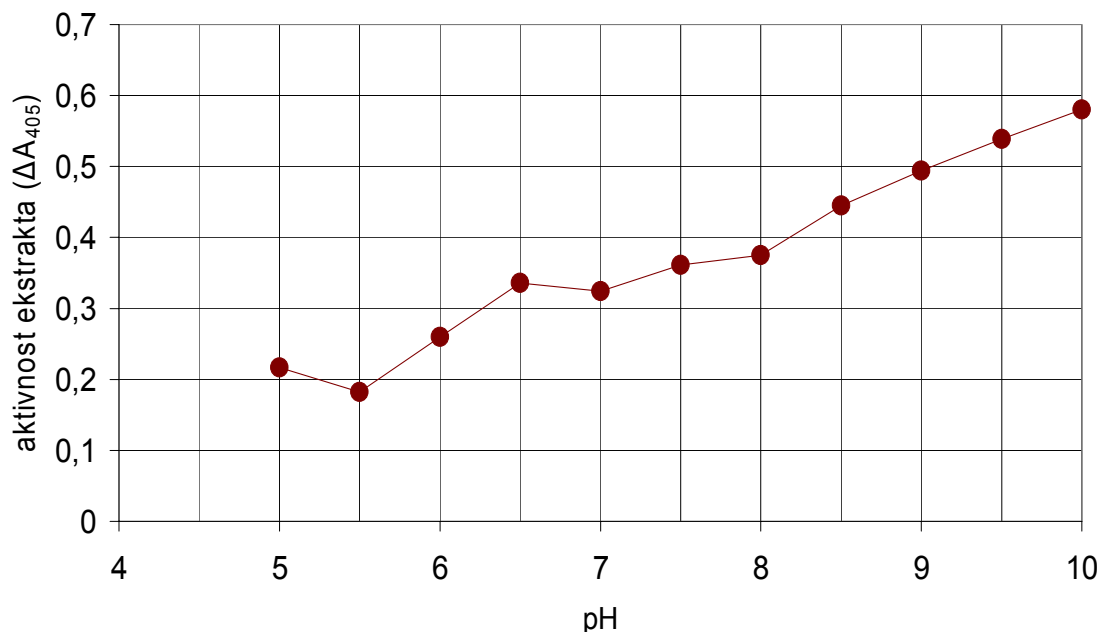
#### 4.1.3 Endopeptidazne aktivnosti listnih ekstraktov iz fižola sorte Zorin, na Z-Phe-Arg-pNA

V tem poglavju so podani rezultati testiranja endopeptidazne aktivnosti ekstraktov iz listov rastlin, ki so rasle na polju, ekstraktov iz rastlin, ki so bile izpostavljene stresnim dejavnikom suše in poplave ter ekstraktov iz obeh kontrolnih skupin rastlin, na substrat Z-Phe-Arg-pNA.

##### 4.1.3.1 Aktivnosti v listih rastlin, ki so rasle na polju

Najprej smo določili endopeptidazno aktivnost listnih ekstraktov, v območju od pH 5 do 10. Rezultati tega poskusa so podani na sliki 6.





Slika 6: pH-diagram aktivnosti ekstrakta iz rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin, ki so rasle na polju, na Z-Phe-Arg-pNA; čas inkubacije ekstrakta s substratom je bil 30 min.

Iz rezultatov prikazanih na sliki 6 lahko razberemo, da je vrh aktivnosti pri pH 6,5, aktivnost pa je povečana tudi pri pH 5 in 10.

Ker nismo poznali optimalnih eksperimentalnih pogojev za določanje proteolitične aktivnosti s substratom Z-Phe-Arg-pNA, smo najprej skušali ugotoviti naslednje:

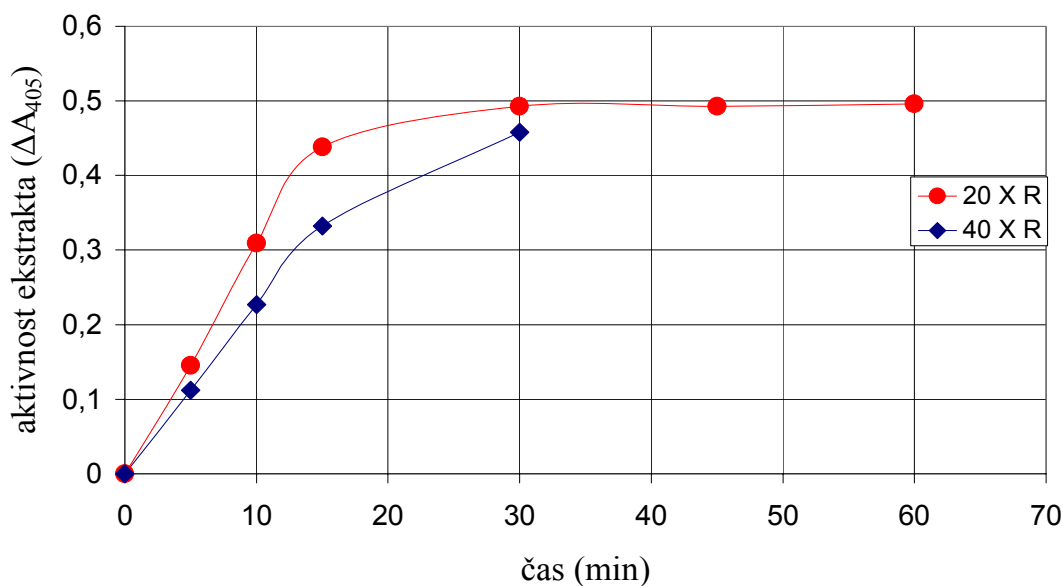
1. Kolikšna je aktivnost pod pH 5 in nad pH 10?
2. Ali smo aktivnost pri pH 10 merili v primernem časovnem območju encimske reakcije in ali je razmerje med reaktanti primerno?

V ta namen smo izvedli poskus merjenja aktivnosti z različnimi razredčitvami ekstrakta pri konstantni koncentraciji substrata in določili encimsko aktivnost ekstrakta pri različnih časih inkubacije (za dve razredčitvi ekstrakta). Rezultati teh poskusov so predstavljeni v preglednici 6 in na sliki 7.

Preglednica 6: Odvisnost specifične aktivnosti ekstrakta iz rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin-polje (na Z-Phe-Arg-pNA), od razredčitve ekstrakta.

Vsebnost proteinov v reakcijski mešanici (mg/ml)				
	0,026 R=80	0,042 R=50	0,084 R=25	0,105 R=20
Specifična aktivnost ( $\Delta A_{405} \times \text{mg}_{\text{pr.}}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ )				
pH 6,5	0,16	0,14	0,12	0,11
pH 9,5	0,25	0,27	0,25	0,28

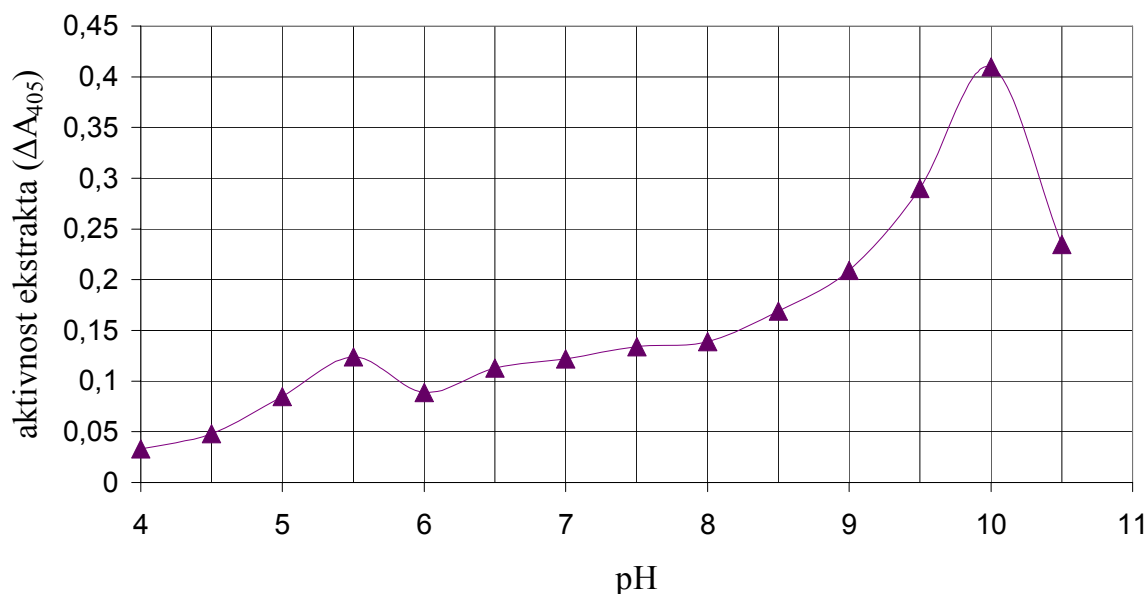
Ugotovili smo, da ni pomembnih razlik med specifičnimi aktivnostmi pri posameznih razredčitvah, ki jih je vključeval poskus.



Slika 7: Časovna odvisnost aktivnosti na Z-Phe-Arg-pNA v listnem ekstraktu iz rastlin, ki so rasle na polju (z dodanim reducentom), pri pH 9,5. Rdeča krivulja predstavlja aktivnosti dvajsetkrat redčenega ekstrakta (0,105 mg/ml proteinov), modra pa aktivnost štiridesetkrat redčenega (0,052 mg/ml proteinov).

Glede na rezultate poskusa na sliki 7, smo se odločili, da bomo skrajšali čas reakcije za določanje aktivnosti iz 30 na 10 min. Naklon krivulje, ki kaže aktivnosti na Z-Phe-Arg-pNA, je linearen le v prvih desetih minutah reakcije, pri obeh razredčitvah. Menili smo namreč, da bi merjenje encimske aktivnosti v tem časovnem intervalu, omogočilo boljšo občutljivost metode za določanje razlik v endopeptidazni aktivnosti na Z-Phe-Arg-pNA. Glede na rezultate podane v preglednici 6 smo se odločili, da bomo nadaljnje poskuse opravili z ekstraktom, ki ga bomo redčili tako, da je končna količina proteinov (0,105 mg/ml).

Tako smo poskus, ki ga prikazuje slika 6 ponovili, le da smo uporabili krajši čas inkubacije ekstrakta s substratom, in območje pH razširili od 4 do 10,5. Rezultati tega poskusa so podani na sliki 8.



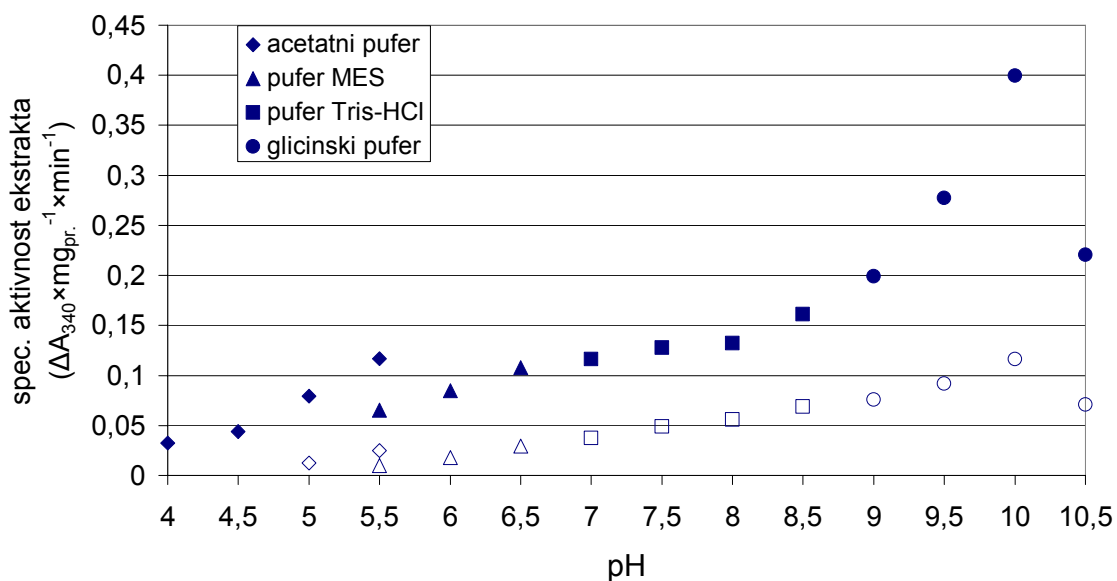
Slika 8: pH-diagram aktivnosti na Z-Phe-Arg-pNA v listnem ekstraktu iz rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin, ki mu je bil med ekstrakcijo dodan reducent. Čas inkubacije ekstrakta s substratom je bil 10 min.

Pri ponovljenem poskusu smo ugotovili dva izrazita vrhova aktivnosti pri pH 5,5 in 10. Zanimalo nas je:

1. Ali je vrh pri pH 5,5 le rezultat uporabe različnih pufrov (acetatni pufer pri pH 5,5 in MES pufer pri 6)?

2. Ali je aktivnost enakega ekstrakta brez dodanega reducenta podobna zgornji?

V ta namen smo pri pH 5,5 posebej določili aktivnost z dvema različnima pufroma in izdelali pH-diagram še za ekstrakt (brez reducenta). Rezultati tega poskusa so prikazani na sliki 9.



Slika 9: pH profil aktivnosti na Z-Phe-Arg-pNA v listnem ekstraktu iz rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin-polje, kateremu smo dodali reducent (polni znaki) in brez dodatka reducenta (prazni znaki). Romb predstavlja uporabo acetatnega pufera, trikotnik pufera MES, kvadrat pufera TRIS-HCl in krog glicinskega pufera.

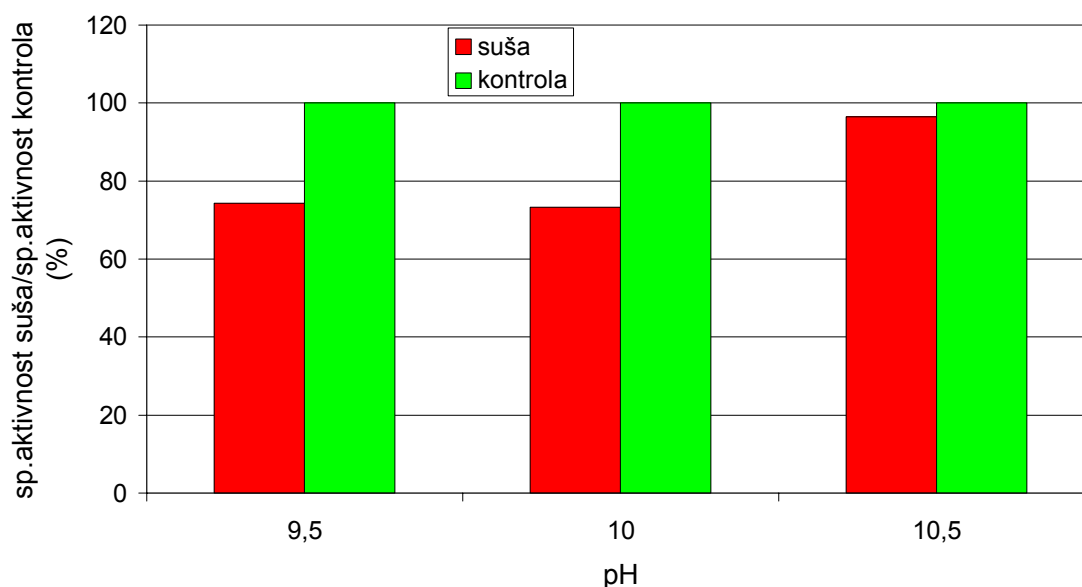
Specifične aktivnosti ekstrakta z reducentom, so večje od aktivnosti ekstrakta brez reducenta, pri vseh pH vrednostih (slika 9). Vrhovi aktivnosti pri ekstraktu brez reducenta, sovpadajo s tistimi pri ekstraktu z reducentom.

Vpliv uporabe acetatnega pufra pri pH 5,5 je očiten tako pri ekstraktu brez dodanega reducenta, kot pri tistem z dodanim reducentom, medtem ko uporaba pufra MES ne povzroči povečanja absorbance reakcijske mešanice pri tej pH vrednosti.

Za vrh pri pH 5,5 smo ugotovili, da je le navidezen in je posledica nespecifične aktivacije z acetatom.

#### 4.1.3.1.1 Aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin fižola sorte Zorin, ki so bile izpostavljene suši in poplavi, ter kontrolnih rastlin, na Z-Phe-Arg-pNA.

Aktivnosti smo določali pri pH vrednostih: 9, 10 in 10,5. Najprej smo določili aktivnost listnemu ekstraktu iz rastlin, ki so bile izpostavljene suši in ekstraktu iz kontrolnih rastlin. Rezultati poskusa so prikazani na sliki 10.

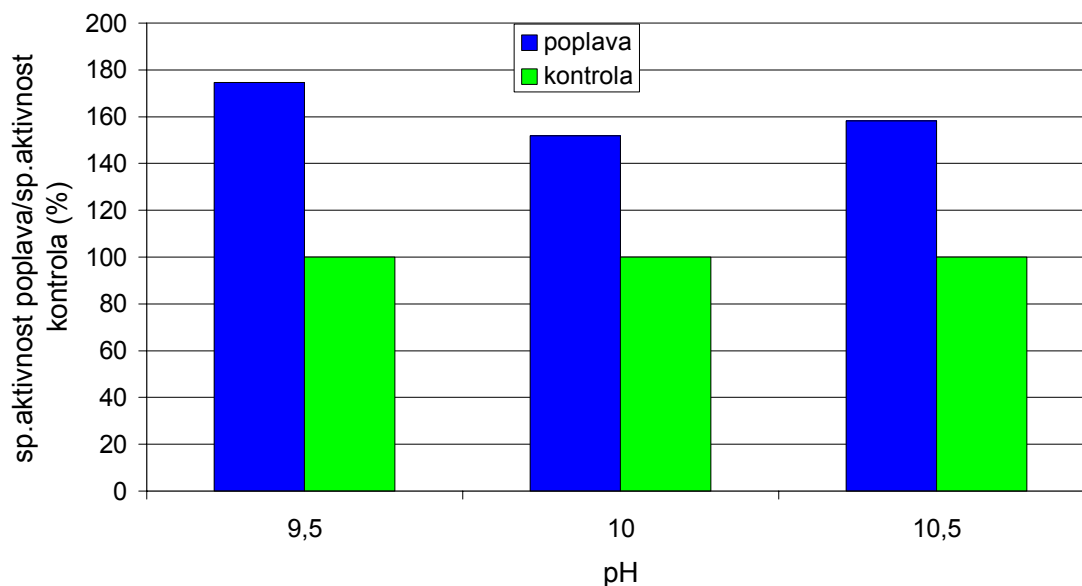


Slika 10: Relativne specifične aktivnosti (%) listnih ekstraktov iz rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin, izpostavljenih sušnim pogojem (rdeča), v primerjavi s kontrolo (zelena), na Z-Phe-Arg-pNA.

Rezultati kažejo na to, da je aktivnost na Z-Phe-Arg-pNA, v listih pod pogoji suše, nižja od tiste ki jo določimo pri optimalnih pogojih oskrbe z vodo, pri vseh obravnavanih pH vrednostih.

#### 4.1.3.1.2 Aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin, ki so bile izpostavljene poplavi in kontrolnih rastlin, na Z-Phe-Arg-pNA.

V tem poskusu smo določili aktivnost listnemu ekstraktu iz rastlin, ki so bile izpostavljene poplavi in ekstraktu iz kontrolnih rastlin. Rezultati poskusa so prikazani na sliki 11.



Slika 11: Relativne specifične aktivnosti (%) listnih ekstraktov iz rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin, izpostavljenih pogojem poplavljanja (modra), v primerjavi s kontrolo (zelena), na Z-Phe-Arg-pNA.

Rezultati kažejo na to, da je aktivnost na Z-Phe-Arg-pNA, v listih pod pogoji poplavljanja, večja od tiste ki jo določimo pri optimalnih pogojih oskrbe z vodo, pri vseh obravnavanih pH vrednostih.

#### 4.1.3.2 Vpliv inhibitorjev na endopeptidazno aktivnost na Z-Phe-Arg-pNA, v listnih ekstraktih iz rastlin fižola sorte Zorin

Vpliv inhibitorjev na delovanje endopeptidaz iz listnega ekstrakta sorte Zorin, smo preučevali s pomočjo encimskih inhibitorjev: Pefabloc SC (inhibitor serinskih peptidaz), E-64 (inhibitor cisteinskih peptidaz) in EDTA (inhibitor metalopeptidaz) in substrata Z-Phe-Arg-pNA, pri pH 10. Rezultati tega poskusa so podani v preglednici 7, kjer posamezne vrednosti predstavljajo delež (v odstotkih), za katerega se zmanjša encimska aktivnost po dodatku ustreznega inhibitorja.

Preglednica 7: Delež inhibicije aktivnosti (%) ekstraktov iz rastlin *P. vulgaris* cv. Zorin, na Z-Phe-Arg-pNA.

pH	10		
	E-64	pefabloc	EDTA
Polje	69	15	0
Suša	19	7	N.D.
kontrola suše	56	15	N.D.
poplava	29	21	N.D.
kontrola poplave	38	15	N.D.

\*N.D.-nismo določali

Rezultati v preglednici 7 prikazujejo močno inhibicijo aktivnosti na Z-Phe-Arg-pNA z E-64, pri pH 10. EDTA nima vpliva na aktivnost peptidaz v tem ekstraktu, iz česar lahko sklepamo, da metalopeptidaze pri tem pH ne razgrajujejo uporabljenega substrata.

Aktivnosti ekstraktov iz rastlin, ki so rasle pod pogoji suše, poplave in pod optimalnimi pogoji oskrbe z vodo, smo določali pri pH 10, saj smo v predhodnih poskusih ravno pri tem pH, določili največjo aktivnost na Z-Phe-Arg-pNA. Uporabili smo zgolj inhibitorja pefabloc SC in E-64, saj z EDTA nismo zaznali inhibicije encimske aktivnosti v ekstraktu iz listov rastlin, ki so rasle na polju (preglednica 7).

Rezultati v preglednici 7 kažejo na to, da je endopeptidazna aktivnost na Z-Phe-Arg-pNA, v ekstraktu iz kontrolnih rastlin bolj inhibirana z inhibitorjema E-64 in Pefabloc SC kot pa v ekstraktu iz rastlin, ki so bile izpostavljene sušnim pogojem. Poudariti velja, da je endopeptidazna aktivnost na Z-Phe-Arg-pNA, v precej večji meri inhibirana z E-64, kot pa s Pefabloc SC tako v ekstraktu iz rastlin, ki so rasle pod pogoji suše kot tudi v ekstraktu iz kontrolnih rastlin. Enako velja za endopeptidazno aktivnost na Z-Phe-Arg-pNA, v ekstraktih iz rastlin, ki so bile izpostavljene pogojem poplavljanja in pripadajoče kontrolne skupine rastlin, le da je razlika med inhibicijo z E-64 in Pefabloc SC, manjša pri kontrolnih rastlinah. Sklepamo lahko torej, da pri izbranih pogojih Z-Phe-Arg-pNA razgrajujejo predvsem cisteinske peptidaze in manj serinske peptidaze.

#### 4.2 ENDOPEPTIDAZNA AKTIVNOST V LISTNIH EKSTRAKTIH AFRIŠKE VIJOLICE

V tem poglavju so prikazani rezultati določanja aktivnosti listnim ekstraktom iz afriške vijolice, pri čemer smo, kot pri fižolu, preučevali predvsem cisteinske peptidaze.

V ta namen smo najprej določili aktivnost listnih ekstraktov brez in z dodatkom reducenta, na različne substrate, da bi izbrali najbolj primerne za določanje cisteinskih peptidaz (preglednica 8).

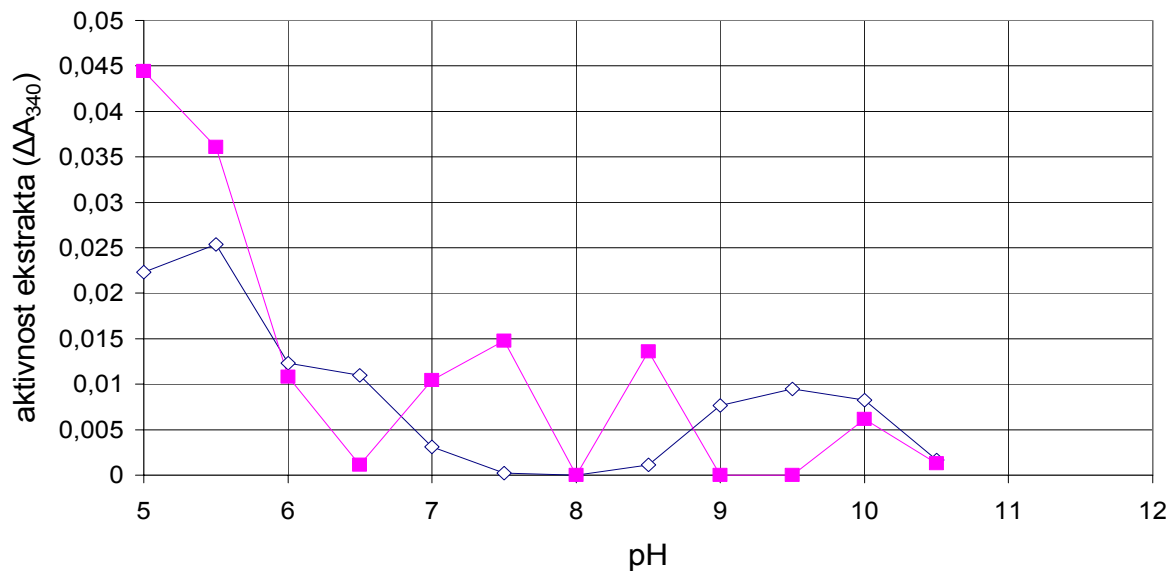
Nabor substratov, ki jih je zajemal ta poskus, je vseboval tudi substrata APNA in BAPNA, ki jih je v diplomskem delu Maja Šoštarč (2005), uporabila za določanje proteolitične aktivnosti v listnih ekstraktih iz rastlin afriške vijolice, ter azokazein in Z-Phe-Arg-pNA, ki smo ju uporabljali za določanje proteolitične aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin fižola.

Preglednica 8: Vsebnost proteinov (mg/ml) ter specifične aktivnosti;  $\Delta A_{405} \times \text{mg}_{\text{pr}}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  za p-NA substrate in  $\Delta A_{340} \times \text{mg}_{\text{pr}}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  za azokazein, v listnih ekstraktih iz rastlin *S. ionantha*.

Substrat Ekstrakt	Proteini (mg/ml)	BAPNA sp.akt	LPNA sp.akt	Z-Phe- Arg-pNA sp.akt	Z-Arg- Arg-pNA sp.akt	Suc-A-A- Pro-Phe- pNA sp.akt	Azo- kazein pH 5 sp.akt	Azo- kazein pH 8 sp.akt
Z red.	0,31	0,032	0,58	0	0	0	0,4	0,21
Brez red.	0,18	0,028	0,39	0	0	0	0,074	0,077

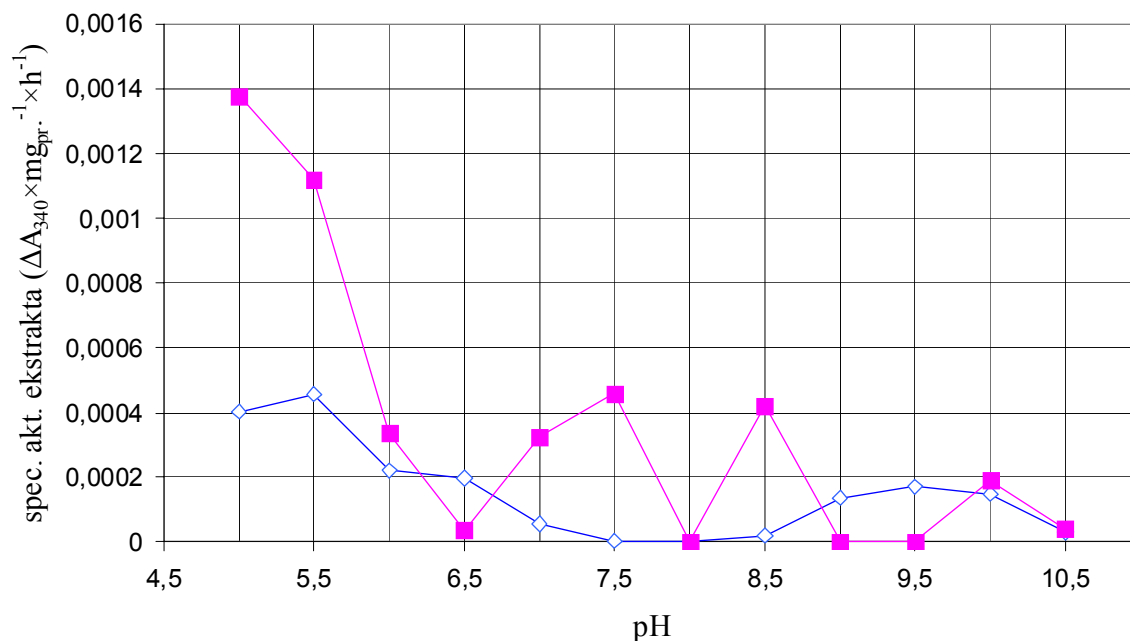
Na podlagi rezultatov, prikazanih v zgornji preglednici, smo se odločili, da bomo listne ekstrakte vijolice testirali s pomočjo substrata azokazein. Substrata Z-Phe-Arg-pNA nismo uporabili za določanje aktivnosti, saj je bila aktivnost ekstraktov iz vijolice na ta substrat, enaka nič, kot tudi za substrata Z-Arg-Arg-pNA in Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA.

V nadaljevanju smo izdelali pH profil za ekstrakta z in brez dodanega reducenta. Rezultati so prikazani na sliki 12, kjer posamezne točke na krivulji predstavljajo absorbanco pri 340nm v odvisnosti od pH.



Slika 12: pH profil azokazeinolitичne aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin *S. ionantha*, z (■) in brez dodanega reducenta (◇).

Na sliki 12 lahko opazimo majhne absorbance, ki jih izmerimo pri določanju azokazeinolitичne aktivnosti listnih ekstraktov afriške vijolice. Izmerjene absorbance so pri pH vrednostih nad 5,5 zelo majhne in praktično na meji detekcije. Opazimo lahko tudi, da je aktivnost ekstrakta z reducentom pri pH 6,5 in 9,5 nižja od aktivnosti ekstrakta brez reducenta in je praktično zanemarljiva. Na sliki 13 so prikazane še specifične azokazeinolitичne aktivnosti v odvisnosti od pH.



Slika 13: pH profil specifičnih azokazeinolitčnih aktivnosti listnih ekstraktov iz rastlin *S. ionantha*, z (■) in brez dodanega reducenta(◇).

Glede na to, da sta aktivnosti ekstraktov na azokazein pri 5,5 skoraj enaki, lahko ugotovimo, da so vrhovi v poskusu, ki jih prikazuje slika 13, najverjetneje posledica eksperimentalne napake, ki izvira iz relativno slabe občutljivosti te metode za določanje endopeptidazne aktivnosti v listnih ekstraktih afriške vijolice.



## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V okviru diplomske naloge smo z uporabo različnih substratov in inhibitorjev peptidaz proučevali vpliv oskrbe z vodo na proteolitično aktivnost v listih fižola (*Phaseolus vulgaris* cv. Zorin) in afriške vijolice (*Saintpaulia ionantha*). Iz dosedanjih raziskav povezanih z vplivom suše na proteolitično aktivnost v listih fižola, je mogoče razbrati, da suša vpliva na aktivnost serinskih endopeptidaz in eksopeptidaz (Hieng in sod., 2004, Šoštarič 2005 in Vrhovnik 2007), manj pa je znanega o vplivu vodnega stresa na aktivnost cisteinskih peptidaz, katerim smo v diplomski nalogi tudi namenili največ pozornosti.

Z namenom, da bi zajeli čim večji spekter proteolitične aktivnosti smo uporabili tako splošen substrat azokazein kot nekatere kromogene substrate, za katere je bilo predhodno ugotovljeno, da jih peptidaze v fižolovih listih lahko hidrolizirajo (Hieng in sod., 2004; Šoštarič, 2005, Popovič in sod., 1998). Iz rezultatov prikazanih v preglednici 2 je razvidno, da povečano proteolitično aktivnost pri pH 7,8 v prisotnosti reducenta določimo le z uporabo substratov Z-Phe-Arg-pNA in Z-Arg-Arg-pNA. Pri azokazeinu nismo opazili povečanja proteolitične aktivnosti pri uporabi reducenta, vendar smo se kljub temu odločili, da podrobneje raziščemo pH odvisnost proteolitične aktivnosti na azokazein in ugotovimo, ali pri kateri od izmerjenih pH-vrednosti določimo povečano aktivnost v prisotnosti reducenta.

Rezultati eksperimentov, ki so prikazani na slikah 1 in 2 so dokaj presenetljivi, saj pri praktično nobenem pH-ju ne določimo večje azokazeinolitične aktivnosti v prisotnosti reducenta. Izmerjene specifične aktivnosti v prisotnosti reducenta so celo manjše in v alkalnem pH-ju predstavljajo manj od 50 % proteolitične aktivnosti, določene brez reducenta. Znano je, da dodatek reducenta največkrat ne zmanjša splošne proteolitične aktivnosti, saj pride le do aktivacije cisteinskih peptidaz, medtem ko se aktivnost peptidaz ostalih katalitičnih tipov ne zmanjša.

Kljub nepričakovanim razlikam v proteolitični aktivnosti pa lahko ugotovimo, da je profil aktivnosti podoben, saj tako v prisotnosti kot odsotnosti reducenta določimo maksimume aktivnosti pri pH 5, pH 6,5, pH 8 in pH 9,5.

Veliko zmanjšanje splošne proteolitične aktivnosti v prisotnosti reducenta bi morda lahko pripisali aktivnosti cisteinskih peptidaz med samim postopkom izolacije ali med triurno inkubacijo, ko smo določali encimsko aktivnost. Povečana aktivnost zaradi dodanega reducenta bi lahko privedla do inaktivacije vseh peptidaz zaradi nespecifične hidrolize, kar bi se v končni fazi lahko odrazilo kot manjša izmerjena encimska aktivnost.

Drugi razlog za nepričakovane rezultate je lahko posledica vpliva kompleksnega matriksa na meritev. Proteolitična aktivnost na azokazein se določa z merjenjem absorbance v območju od 340 do 400 nm po obarjanju večjih peptidov s TCA. Krajši peptidi, ki so produkt hidrolize, se ne oborijo in absorbirajo v omenjenem območju valovnih dolžin. Metoda v primeru enostavnega matriksa ni problematična. Pri rastlinah pa ekstrakt vsebuje velike koncentracije polifenolov, ki jih kljub dodanemu PVP ne moremo v popolnosti odstraniti. Polifenoli kot taki največkrat ne absorbirajo v območju med 340 in 400 nm, kar pa ne velja za oksidirane produkte, ki imajo absorpcijske maksimume pri teh valovnih dolžinah. Zaradi relativno velikega signala slepe probe, ki je pri naših meritvah predstavljala tudi do 80 % celotne absorbance, so lahko majhne razlike v koncentraciji oksidiranih polifenolov veliko prispevale k izmerjeni absorbanci. Na potek oksidacije polifenolov vplivata tako prisotnost reducentov

kot pH (Oszmianski in Lee, 1990). Možno je, da je zaradi majhnih razlik v koncentraciji reducenta med slepo probo in vzorcem, prišlo do razlik v koncentraciji oksidiranih polifenolov in s tem posledično v izmerjeni absorbanci.

Kljub metodološkim problemom, smo tudi pri nadaljnjih eksperimentih uporabljali azokazein, saj je to najprimernejši substrat za hitro določanje splošne proteolitične aktivnosti. Pri študiju vpliva inhibitorjev na izmerjeno encimsko aktivnost pri izbranih pH vrednostih smo ugotovili, da je pefabloc, inhibitor serinskih peptidaz, najbolj učinkovit pri pH 5 in pH 8,5, medtem ko je pri pH 6,5 najbolj učinkovit EDTA, ki inhibira metalopeptidaze. Rezultati inhibicije peptidaz v ekstraktih listov nabranih na polju, kažejo v prisotnosti reducenta dokaj nenavadno sliko, saj E-64, ki je inhibitor cisteinskih peptidaz, zelo malo vpliva na izmerjeno aktivnost pri vseh pH vrednostih. Zelo veliko izmerjeno inhibicijo s pefablocom pri pH 9,5 težko razložimo, posebej ker v odsotnosti reducenta le ta naj ne bi inhibiral proteolitične aktivnosti pri tem pH-ju. Ker smo nameravali zajeti celoten spekter proteolitične aktivnosti, smo vse nadaljnje meritve opravili v prisotnosti reducenta.

Pri določevanju vpliva suše na azokazeinolitično aktivnost v listih fižola smo ugotovili, da je le ta povečana v primeru vodnega stresa kar se sklada z rezultati predhodnih študij (Roy-Macauley in sod., 1992 in Khanna-Chopra in sod., 1999). Pri študiju vpliva inhibitorjev na aktivnost pri izbranih pH vrednostih smo izmerili, da uporabljeni inhibitorji zelo malo vplivajo na proteolitično aktivnost. Pri nobeni pH vrednosti kumulativno nismo določili več kot 30 % inhibicije, čeprav smo uporabili inhibitorje serinskih, cisteinskih in metalopeptidaz.

Pri ugotavljanju vpliva poplavljanja na azokazeinolitično aktivnost smo dobili podobne rezultate kot v primeru suše, saj smo tudi tu v primeru vodnega stresa, ki se je odražal v presežku vode, določili povečanje proteolitične aktivnosti. Podobno kot za sušo tudi v tem primeru lahko trdimo, da z inhibitorji ne moremo zavreti velikega dela proteolitične aktivnosti, saj kumulativno pri nobenem pH-ju ne določimo več kot 40 % inhibicije. Primerjava med kontrolo v primeru suše in poplave pokaže velike razlike tako v specifičnih aktivnostih kot v inhibitornem profilu. Zaradi omenjenih razlik, ki so najverjetneje metodološke narave in ne posledica dejanskega stanja, je zanesljivost pridobljenih podatkov, o vplivu vodnega stresa na azokazeinolitično aktivnost, vprašljiva.

Poleg azokazeina, smo proteolitično aktivnost v širšem pH območju določili tudi s kromogenim substratom Z-Phe-Arg-pNA. Pri uporabi substrata smo najprej optimizirali ustrezno razredčitev ekstrakta in čas inkubacije. Ugotovili smo, da ne smemo uporabiti preveč koncentriranega ekstrakta in predolgega časa inkubacije, saj se lahko substrat prehitro porabi, kar lahko privede do napak v določitvi specifične aktivnosti (slika 6). S skrajšanjem časa inkubacije s 30 minut na 10 minut (sliki 8 in 9) smo dobili pravilne podatke, saj se v teh razmerah substrat še ni porabil. Pri optimizaciji metode smo ugotovili, da je vrh aktivnosti pri pH 5,5, ki smo ga določili v acetatnem pufu artefakt in rezultat nespecifične aktivacije z acetatom, saj z uporabo pufru MES pri omenjenem pH-ju nismo ugotovili povečane encimske aktivnosti. Edini vrh encimske aktivnosti na substrat Z-Phe-Arg-pNA je tako pri pH 10, kar se sklada s podatki iz literature (Popovič in sod., 1998). Iz rezultatov inhibitornih študij je razvidno, da z E-64 inhibiramo največ encimske aktivnosti tako pri kontrolnih rastlinah kot tistih, ki so bile izpostavljene suši, poplavi, ali pa so rasle na polju. Iz omenjenih rezultatov in dejstva, da je proteolitična aktivnost na substrat Z-Phe-Arg-pNA aktivirana z reducentom, lahko predpostavimo, da je vrh pri pH 10 predvsem posledica encimske aktivnosti cisteinskih peptidaz.

Afriška vijolica (*Saintpaulia ionantha*) spada v skupino gesnerjevok, enako kot *Ramonda Serbica*, za katero je značilno, da se lahko rehidrira iz stanja popolne izsušitve. Čeprav Afriška vijolica te sposobnosti nima, smo se odločili, da bomo preverili proteolitično aktivnost in tako pridobili uporabne informacije za študij aktivnosti pri *Ramonda Serbica*, ki je zaradi ekološke ogroženosti zaščiten in redka rastlina.

Proteolizni profil v listnih ekstraktih afriške vijolice (preglednica 8) se zelo razlikuje od ekstraktov fižolovih listov (preglednica 2). Razlika je predvsem pri endopeptidaznih substratih Z-Phe-Arg-pNA, Z-Arg-Arg-pNA in Suc-A-A-Pro-Phe-pNA kjer je bila izmerjena specifična aktivnost v listnih ekstraktih pod mejo detekcije in pri azokazeinu, kjer je bila precej nižja od aktivnosti pri fižolu. Za razliko od endopeptidazne aktivnosti pa je bila aminopeptidazna aktivnost na substrat LPNA pri afriški vijolici precej večja. Zaradi izredno majhnih vrednosti absorbance, ki smo jih določili pri pH profilu azokazeinolitične aktivnosti (slika 12), določene specifične aktivnosti najverjetneje niso realne (slika 13).

## 5.2 SKLEPI

- V ekstraktih listov rastlin fižola (*Phaseolus vulgaris* cv. Zorin), ki so rasle na polju, smo po dodatku reducenta določili povečano proteolitično aktivnost na substrata Z-Phe-Arg-pNA in Z-Arg-Arg-pNA.
- pH profil proteolitične aktivnosti na substrat azokazein v prisotnosti reducenta je podoben tistemu v odsotnosti reducenta. Pri meritvah z dodatkom reducenta smo pri vseh pH vrednostih določili manjšo specifično aktivnost.
- Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili vodnemu stresu, tako poplavi kot suši, smo določili povečano azokazeinolitično aktivnost v primerjavi z ekstrakti iz kontrolnih rastlin.
- Rezultati določevanja profila azokazeinolitične aktivnosti z uporabo inhibitorjev, najverjetneje ne odražajo dejanskega stanja, saj je kumulativna inhibicija v nobenem primeru ne presega 40 %.
- Proteolitična aktivnost v ekstraktih fižolovih listov na substrat Z-Phe-Arg-pNA ima maksimum pri pH 10.
- Encimska aktivnost v ekstraktih fižolovih listov na substrat Z-Phe-Arg-pNA, je v veliki meri inhibirana z E-64, ki je inhibitor cisteinskih peptidaz.
- V ekstraktih afriške vijolice (*Sainpaulia ionantha*) smo v primerjavi s fižolom, z uporabljenimi substrati določili povečano aminopeptidazno aktivnost in zmanjšano endopeptidazno aktivnost.

## 6 POVZETEK

Zaradi osrednje vloge proteolitičnih encimov v stopnjah aktivacije različnih proteinov in njihove razgradnje imajo peptidaze velik pomen v vseh procesih kjer prihaja do sprememb v profilu in koncentraciji različnih proteinov. Takšen primer je tudi vodni stres, posebej pomanjkanje vode, ki je pogostokrat vzrok za slabo letino. V okviru širše raziskave vezane na študij vpliva vodnega stresa na spremembe proteolitične aktivnosti v listih fižola (*Phaseolus vulgaris* cv. Zorin) sta bili predhodno opravljene že dve diplomski nalogi, v katerih so bile osrednji predmet raziskave aminopeptidaze in serinske peptidaze. Iz rezultatov omenjenih študij smo lahko sklepali, da vodni stres vpliva na proteolitično aktivnost. O vplivu vodnega stresa na cisteinske peptidaze, ki se izražajo v listih fižola, pa je na voljo manj podatkov iz literature.

V okviru diplomske naloge smo z uporabo različnih substratov ob dodatku reducenta nameravali identificirati aktivnost cisteinskih peptidaz. Za določanje encimske aktivnosti smo uporabili tako krajše peptidne substrate z vezanim kromoforjem, kot tudi kompleksen substrat azokazein, s katerim smo nameravali zajeti čim širši spekter encimske aktivnosti.

Pred določanjem proteolitične aktivnosti smo morali pripraviti rastlinski material. Fižol smo posadili na polje v razmaku 20 cm med posameznimi pari. Fižol je rasel od maja do začetka junija, ko smo nabrali tretje in četrte liste in jih do analiz shranili na  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rastline, kjer smo proučevali vpliv suše in poplave na proteolitično aktivnost, smo gojili pod kontroliranimi pogoji. Regulirali smo jakost in čas osvetlitve, temperaturo in relativno vlažnost. V vseh eksperimentih smo poskrbeli za ustrezne kontrole, kjer so rastline določen čas rasle pod enakimi pogoji, nakar smo nekatere rastline prenehali zalivati, ali pa jih izpostavili poplavi. Tako kontrolne rastline kot tiste, ki smo jih izpostavili vodnemu stresu, smo vzorčili istočasno ter liste do analize shranili na  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Proteolitično aktivnost s kratkimi kromogenimi substrati smo določali z merjenjem absorbance pri 405 nm, ki je sorazmerna s koncentracijo sproščene p-nitroanilina. Od uporabljenih peptidnih substratov smo le pri dveh, Z-Phe-Arg-pNA in Z-Arg-Arg-pNA, z dodanim reducentom ugotovili povečano encimsko aktivnost v ekstraktih fižolovih listov, ki so rasli na polju.

Pri azokazeinu, kjer smo proteolitično aktivnost določali z merjenjem absorbance pri 340 nm, po dodatku reducenta nismo določili povečane proteolitične aktivnosti. V ekstraktih listov rastlin, ki so rasle na polju, je v območju od pH 4,5 do pH 10 izmerjena specifična aktivnost po dodatku reducenta celo manjša. Z namenom, da bi določili katalitični tip encimske aktivnosti, smo v ekstrakto fižolovih listov dodali inhibitorje peptidaz. Z E-64 smo inhibirali cisteinske peptidaze, z EDTA metalopeptidaze in s pefabloc serinske peptidaze. Rezultati inhibitornih študij kažejo, da je pri pH 5 in pH 8,5 najbolj učinkovit pefabloc, medtem ko se pri pH 6,5 proteolitična aktivnost najbolj zmanjša v prisotnosti EDTA. E-64 ni pri nobenem pH-ju v območju od pH 5 do pH 9,5 najboljši inhibitor azokazeinolitične aktivnosti.

Pri ugotavljanju vpliva vodnega stresa na azokazeinolitično aktivnost smo ugotovili, da se le ta poveča tako pri poplavi kot pri suši v primerjavi z ustrežno kontrolo. Ker tehnične možnosti niso dovoljevale hkratnega gojenja rastlin fižola v suši in poplavi, smo imeli dve kontroli,

vsako pri posameznem vodnem stresu. Čeprav smo imeli kontrolirane pogoje rasti in opravili ekstrakcijo na enak način, smo ugotovili velike razlike med obema kontrolama. Tudi rezultati inhibitornih študij, tako v primeru vodnega stresa kot pri kontrolnih rastlinah, so nepričakovani, saj kumulativna inhibicija pri nobenem pH-ju in ekstraktu ne presega 40 %. Zaradi omenjenih razlik, ki so lahko metodološke narave in/ali posledica biološke diverzitete, je verodostojnost pridobljenih podatkov o vplivu vodnega stresa na azokazeinolitično aktivnost vprašljiva.

Proteolitično aktivnost na substrat Z-Phe-Arg-pNA smo v listih rastlin fižola, ki je rasel na polju ugotavljali v območju od pH 4,5 do pH 10,5. V primerjavi z azokazeinom smo z uporabo kromogenega substrata določili precej večje specifične aktivnosti. Ker se je substrat med testom relativno hitro porabljal, smo morali skrajšati čas inkubacije, da smo dobili pravilne meritve v celotnem pH območju. Ugotovili smo, da je maksimum proteolitične aktivnosti pri pH 9,5. Povečana proteolitična aktivnost pri pH 5,5 v acetatnem pufru je bila rezultat nespecifične aktivacije z acetatom, saj pri uporabi MES pufra pri tem pH-ju nismo določili povečane aktivnosti. Encimska aktivnost na substrat Z-Phe-Arg-pNA je močno inhibirana z E-64 pri rastlinah, ki so rasle na polju, bile izpostavljene suši ali poplavi, kar pomeni, da večino proteolitične aktivnosti lahko pripišemo cisteinskim peptidazam.

Da bi pridobili vpogled v proteolitično aktivnost rastlin iz družine gesnerjevki, smo določali aktivnost v listih Afriške vijolice (*Saintpaulia ionantha*), ki je filogenetsko blizu *Ramonda Serbica*, za katero je značilno, da se lahko rehidrira iz stanja popolne izsušitve. Proteolitična aktivnost v listih Afriške vijolice se precej razlikuje od aktivnosti v listih fižola. V listih Afriške vijolice smo ugotovili večjo vsebnost aminopetidaz, ki razgrajujejo substrat LPNA. Proteolitična aktivnost določena z endopeptidaznimi substrati je bila precej manjša kot pri fižolu.

## 7 VIRI

- Allan A.C., Trewavas A.J. 1994. Abscisic acid and gibberellin perception: inside or out? *Plant Physiology*, 104: 1107-1108
- Arteca R.N. 1997. Flooding. V: *Plant ecophysiology*. Prasad M.N.V. (ed.). New York, Wiley: 151-171
- Barrett A.J. 1998. Introduction. V: *Handbook of proteolytic enzymes*. Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner F. (eds.). San Diego, Academic press: XXVI-XXVIII
- Bartels D., Sunkar R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24: 23-58
- Beers E.P., Woffenden B.J., Zhao C. 2000. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology*, 44: 399-415
- Bray E.A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2,2: 48-54
- Bray E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. 2000. Responses to abiotic stresses. V: *Biochemistry & molecular biology of plants*. Buchanan B., Gruissem W., Jones R. L. (eds.). Rockville, American Society of Plant Physiologists: 1158-1203
- Brzin J., Kidrič M. 1995. Proteinases and their inhibitors in plants: Role in normal growth and response to various stress conditions. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13: 422-467
- Callis J. 1995. Regulation of protein degradation. *Plant Cell*, 7: 845-857
- Close T.J. 1996. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*, 97: 795-803
- Cutler S., Ghassemian M., Bonetta D., Cooney S., McCourt P. 1996. A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science*, 273: 1239-1241
- Davy A., Svendsen I., Sorensen S.O., Sorensen M.B., Rouster J., Meldal M., Simpson D.J., Cameron-Mills V. 1998. Substrate specificity of barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B. *Plant Physiology*, 117: 255-261
- Davy A., Sorensen M.B., Svendsen I., Cameron-Mills V., Simpson D.J. 2000. Prediction of protein cleavage sites by the barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B based on the kinetics of synthetic peptide hydrolysis. *Plant Physiology*, 122: 137-145
- Fischer J., Becker C., Hillmer S., Horstmann C., Neubohn B., Schlereth A., Senyuk V., Shutov A., Muntz K. 2000. The families of papain- and legumain-like proteinases from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: developmental patterns, intracellular localization and functions in globulin proteolysis. *Plant Molecular Biology*, 43: 83-101
- Feller U., Fischer A. 1994. Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13: 241-273
- Gruden K., Popovič T., Cimerman N., Križaj I., Štrukelj B. 2003. Diverse enzymatic specificities of digestive proteases 'intestains', enable Colorado potato beetle larvae to counteract potato defence mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 384, 2: 305-310
- Gruis D.F., Schulze J., Jung R. 2004. Storage protein accumulation in the absence of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases. *Plant Cell*, 16: 270-290
- Hara-Nishimura I., Takeuchi Y., Nishimura M. 1993. Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*. *Plant Cell*, 5: 1653-1659
- Hieng B., Ugrinovič K., Šuštar-Vozlič J., Kidrič M. 2004. Different classes of proteases involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. *Journal of Plant Physiology*, 161: 519-530

- Hsiao T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Reviews of Plant Physiology*, 24: 519-570
- Huffaker R.C. 1990. Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytologist*, 116: 199-231
- Imai R., Chang L., Ohta A., Bray E.A., Takagi M. 1996. A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 170: 243-248
- Ingram J., Bartles D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 377-403
- Ishii S. 1994. Legumain: asparaginyl endopeptidase. *Methods in Enzymology*, 244: 604-615
- Ishitani M., Majumder A.L., Bornhouser A., Michalowski C.B., Jensen R.G., Bohnert H.J. 1996. Coordinate transcriptional induction of myoinositol metabolism during environmental stress. *Plant Journal*, 9: 537-548
- Khanna-Chopra R., Srivalli B., Ahlawat Y.S. 1999. Drought induces many forms of cysteine proteases not observed during natural senescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255: 324-327
- Kinoshita T., Nishimura M., Hara-Nishimura I. 1995. The sequence and expression of the gamma-VPE gene, one member of a family of three genes for vacuolar processing enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 36: 1555-1562
- Kinoshita T., Yamada K., Hiraiwa N., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. 1999. Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant Journal*, 19: 43-53
- Kiyosue T., Yoshida Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is up-regulated by proline but down-regulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 8: 1323-1335
- Knetsch M.L.W., Wang M., Snaar-Jagalska B.E., Heimovaara-Dijkstra S. 1996. Abscisic acid induces mitogen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *Plant Cell*, 8: 1061-1067
- Larcher W. 1987. Stress bei Pflanzen. *Naturwissenschaften*, 74: 158-167
- Ludlow M.M. 1989. Strategies of response to water stress. V: Structural and functional responses to environmental stresses: water shortage. Kreeb K., Richter H., Hinckley T.M (eds.). The Hague, SPB Academic: 269-281
- MEROPS. 2007. MEROPS-the Peptidase Database 7.80. Cambridge, The Wellcome Trust Sanger Institute.  
<http://merops.sanger.ac.uk/> (maj 2007): 2 str.
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida H., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. 1996. A gene encoding mitogen activated protein kinase is modulated simultaneously with genes for a mitogen activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 765-796
- Müntz K., Blattner F.R., Shutov A.D. 2002. Legumains-a family of asparagine specific cysteine endopeptidases involved in poly-peptide processing and protein breakdown in plants. *Journal of Plant Physiology*, 159:1281-1293
- Müntz K., Shutov A.D. 2002. Legumains and their functions in plants. *Trends in Plant Science*, 7: 340-344
- NC-IUBMB. 2007. Enzyme nomenclature. London, NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology)  
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (maj 2007): 2 str.

- Nilsen E.T., Orcutt, D.M. 1996. Abiotic factors. V: The physiology of plants under stress: abiotic factors. New York, Wiley J. & Sons: 278-361
- Okamoto T., Minamikawa T. 1998. A vakuolar cysteine endopeptidase (SH-EP) that digests seed storage globulin: characterization, regulation of gene expression, and posttranslational processing. *Journal of Plant Physiology*, 152: 675-682
- Okamoto T., Yuki A., Mitshuhashi N., Minamikawa T. 1999. Asparaginyl endopeptidase (VmPE-1) and autocatalytic processing synergistically activate the vacuolar cysteine proteinase (SH-EP). *European Journal of Biochemistry*, 264: 223-232
- Oszmianski J., Lee C. Y. 1990. Enzymatic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 1202-1294
- Phillips H.A., Wallace W. 1989. A cysteine endopeptidase from barley malt which degrades hordein. *Phytochemistry*, 28: 3285-3290
- Polgár L. 2004. Catalytic mechanisms of cysteine peptidases. V: Handbook of proteolytic enzymes. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 2.: Cysteine, serine and threonine peptidases. Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. (eds.). London, Elsevier: 1072-1079
- Popovič T., Kidrič M., Puizdar V., Brzin J. 1998. Purification and characterization of two cysteine proteinases from *Phaseolus vulgaris* leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 9: 163-168
- Rawlings N.D., Morton F.R., Barrett A.J. 2006. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 34, D270-D272  
<http://merops.sanger.ac.uk/>
- Rentsch D., Hirner B., Schmelzer E., Frommer W.B. 1996. Salt stress-induced and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell*, 8: 1437-1446
- Rojo E., Zouhar J., Carter C., Kovaleva V., Raikhel NV. 2003. A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 7389-7394
- Roy-Macauley H., Zuily-Fodil Y., Kidrič M., Pham Thi A.T., Viera Da Silva J. 1992. Effect of drought stress on proteolytic activities in *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. *Physiologia Plantarum*, 85: 90-96
- Schaller A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta Medica*, 220: 183-197
- Schlereth A., Standhardt D., Mock H.P., Müntz K. 2001. Stored cysteine proteases start globulin mobilization in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch (*Vicia sativa* L.) seed germination. *Planta Medica*, 212: 718-727
- Schmid M., Simpson D.J., Gietl C. 1999. Programmed cell death in castorbean is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 14159-14164
- Schmid M., Simpson D.J., Kalousek F., Gietl C. 1998. A cysteine endopeptidase with C-terminal KDEL motif isolated from castorbean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta Medica*, 206: 466-475
- Schmid M., Simpson DJ., Sarioglu H., Lottspeich F., Gietl C. 2001. The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 5353-5358
- Schwartz A., Wu W.H., Tucker E.B., Assmann S.M. 1994. Inhibition of inward K<sup>+</sup> channels and stomatal response by abscisic acid: an intracellular locus of phytohormone action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 4019-4023



- Seki M., Narusaka M., Kamiya A., Ishida J., Satou M., Sakurai T., Nakajima M., Enju A., Akiyama K., Oono Y., Muramatsu M., Hayashizaki Y., Kawai J., Carninci P., Itoh M., Ishii Y., Arakawa T., Shibata K., Shinagawa A., Shinozaki K. 2002. Functional annotation of a full-length Arabidopsis cDNA collection. *Science*, 296, 5565: 141-145
- Shimada T., Yamada K., Kataoka M., Nakaune S., Koumoto Y., Kuroyanagi M, Tabata S., Kato T., Shinozaki K., Seki M., Kobajashi M., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. 2003. Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 32292-32299
- Šoštarič M. 2005. Vpliv suše na serinske proteaze v homoiohidričnih in poikilohidričnih rastlinah. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 91 str.
- Torres G.A.M., Pflieger S., Corre-Menguy F., Mazubert C., Hartmann C., Lelandais-Brière C. 2006. Identification of novel drought-related mRNAs in common bean roots by differential display RT-PCR. *Plant Science*, 171: 300-307
- Trewavas A. 2000. Signal perception and transduction. V: *Biochemistry & molecular biology of plants*. Buchanan B., Gruissem W., Jones R.L., (eds.). Rockville, American Society of Plant Physiologists: 930-987
- Vrhovnik M. 2007. Karakterizacija alanin-aminopeptidaze in levcin-aminopeptidaze iz fižolovih listov glede na oskrbo z vodo. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 84 str.
- Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T., Wu R. 1996. Expression of late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Journal of Plant Physiology*, 110: 249-257
- Yamada T., Shimada H., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. 1999. Cucumisin, a serine protease from melon fruits shares structural homology with subtilisin and is generated from a large precursor. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 23725-23731

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem somentorici dr. Marjetki Kidrič za strokovno vodenje in pomoč pri opravljanju raziskovalnega dela, ter za številne predloge in napotke pri vsebinskem oblikovanju tega dela.

Posebej se zahvaljujem doc. dr. Blažu Cigiću za mentorstvo, pomoč pri raziskovalnem delu in koristne nasvete pri pisanju diplomskega dela.

Prav tako se zahvaljujem recenzentu dr. Rajku Vidrihu za nasvete in popravke pri oblikovanju tega diplomskega dela.

Zahvalil bi se tudi vsem zaposlenim na Inštitutu »Jožef Stefan«, ki so kakorkoli prispevali k mojemu raziskovalnemu delu.