

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Kaja TRLEP

**CIMOGRAFSKA ANALIZA AMINOPEPTIDAZNE AKTIVNOSTI V
KALČKIH IN LISTIH FIŽOLA, LEČE IN LUCERNE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**ZYMOGRAPHIC ANALYSIS OF AMINOPEPTIDASE ACTIVITY IN
THE SPROUTS AND LEAVES OF COMMON BEAN, LENTIL AND
ALFALFA**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan doc. dr. Blaž Cigić, za somentorico asist. dr. Mihaela Skrt, za recenzentko pa doc. dr. Polona Jamnik.

Mentor: doc. dr. Blaž Cigić

Somentorica: asist. dr. Mihaela Skrt

Recenzentka: doc. dr. Polona Jamnik

Komisija za zagovor:

Predsednik:

Članica:

Članica:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Kaja Trlep

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.151.6:581.1:582.736.3:633.3(043)=163.6
KG	encimi/fiziologija rastlin/fižol/leča/lucerna/rastlinski ekstrakti/proteolitični encimi/aminopeptidaze/aminopeptidazna aktivnost/cimografija/nativna elektroforeza/fluorogeni substrati
AV	TRLEP, Kaja
SA	CIGIĆ, Blaž (mentor)/ SKRT, Mihaela (somentorica)/ JAMNIK, Polona (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. Oddelek za živilstvo
LI	2011
IN	CIMOGRAFSKA ANALIZA AMINOPEPTIDAZNE AKTIVNOSTI V KALČKIH IN LISTIH FIŽOLA, LEČE IN LUCERNE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 63 str., 9 pregl., 22 sl., 9 pril., 68 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Aminopeptidaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo aminokislin z N-terminalnega konca proteinov. V ekstraktih kalčkov in odraslih rastlin fižola češnjevca, leče in lucerne smo s cimografijo po nativni elektroforezi detektirali večje število aminopeptidaz. Za analizo encimske aktivnosti smo uporabili fluorogene substrate, aminokisline vezane na 7-amino-metilkumarin (AMC). Ugotovili smo, da je v ekstraktih korenin odraslih rastlin najmanjsa aminopeptidazna aktivnost. Aminopeptidza fižola češnjevca, ki hidrolizira Lys-AMC in Ala-AMC, se močneje izraža v listih odrasle rastline kot v kalčku. Nekatere detektirane aminopeptidaze imajo široko substratno specifičnost, saj lahko hidrolizirajo Lys-AMC, Ala-AMC in Phe-AMC. V ekstraktu lucerne smo detektirali eno cisteinsko peptidazo. V ekstraktih kalčkov fižola češnjevca, leče in lucerne smo detektirali po eno serinsko peptidazo inhibirano s fenilmethylsulfonil-fluoridom. Mehanska poškodba listov vpliva na aminopeptidazno aktivnost določeno v ekstraktih listov fižola in leče. Shranjevanje vzorcev na -20 °C je neprimerno, saj se zmanjša aktivnost nekaterih aminopeptidaz.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.151.6:581.1:582.736.3:633.3(043)=163.6
CX enzymes/plant physiology/bean/lentil/alfalfa/leaf extracts/proteolytic enzymes/aminopeptidases/aminopeptidase activity/zymography/native electrophoresis/ /fluorogenic substrates
AU TRLEP, Kaja
AA CIGIĆ, Blaž (supervisor)/ SKRT, Mihaela (co-advisor)/ JAMNIK, Polona (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2011
TI ZYMOGRAPHIC ANALYSIS OF AMINOPEPTIDASE ACTIVITY IN THE SPROUTS AND LEAVES OF COMMON BEAN, LENTIL AND ALFALFA
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIII, 63 p., 9 tab., 22 fig., 9 ann., 68 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Aminopeptidases are enzymes that catalyse the hydrolysis of amino acids from the N-terminus of proteins. With the zymography after native electrophoresis we have detected a large number of aminopeptidases in the sprout extracts and extracts of adult plants of common bean, lentil and alfalfa. Fluorogenic substrates, amino acids linked to the 7-amino-methylcoumarin (AMC), were used for the analysis of aminopeptidase activity. We have found that in the the extracts of the roots of adult plants the aminopeptidase activity is the lowest. Aminopeptidase of common bean, which hydrolyses Lys-AMC and Ala-AMC, is more strongly expressed in the leaves of the mature plant than in the sprouts. Some of the detected aminopeptidases have wide substrate specificity as they can hydrolyse Lys-AMC, Ala-AMC and Phe-AMC. In the alfalfa sprout extract we have detected one cysteine peptidase. In the sprout extracts of common bean, lentil and alfalfa, we have detected one serine peptidase, which is inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride. Mechanical stress influnce the aminopeptidase activity in leaves of common bean and lentil. Storage of samples at temperature -20 °C was found as inappropriate as, the activity of some aminopeptidases is decreased.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 STROČNICE	3
2.1.1 Botanična razvrstitev stročnic	3
2.1.2 Opis posameznih delov stročnice	3
2.1.2.1 Korenina	3
2.1.2.2 List	4
2.1.2.3 Cvet	4
2.1.3 Pridelovalne potrebe stročnic	5
2.1.3.1 Podnebne razmere	5
2.1.3.2 Pridelovalno okolje	5
2.1.3.3 Kolobar in izbor zemljišč	5
2.1.3.4 Gnojenje	6
2.1.3.5 Skladiščenje pridelka	6
2.1.3.6 Stročnice kot vir bioaktivnih snovi	6
2.2 FIŽOL	7
2.2.1 Zgodovina fižola	7
2.2.2 Morfološke in fiziološke lastnosti	7
2.2.3 Rastne razmere	7
2.2.4 Pregled vrst, podvrst in kultivarjev	8
2.3 LEČA	8
2.3.1 Zgodovina leče	8
2.3.2 Morfološke in fiziološke lastnosti	8
2.3.3 Rastne razmere	9
2.3.4 Pregled vrst, podvrst in kultivarjev	9
2.4 LUCERNA	9
2.4.1 Zgodovina lucerne	9
2.4.2 Morfološke, fiziološke lastnosti in rastne razmere	9
2.5 PREHRANSKE VREDNOSTI FIŽOLA IN LEČE	10
2.6 RASTLINSKE PROTEAZE	11
2.6.1 Razdelitev proteaz	11
2.6.2 Rastlinske aminopeptidaze	12
2.6.2.1 Razdelitev aminopeptidaz	12
2.6.2.2 Aminopeptidaze v metuljnicaх	13
2.6.2.3 Katalični tipi proteolitičnih encimov	14
2.6.2.3.1 Serinske proteaze	14
2.6.2.3.2 Cisteinske proteaze	14

2.6.2.3.3 Metaloproteaze.....	15
2.6.3 Inhibitorji proteaz	15
2.7 CIMOGRAFIJA.....	17
2.7.1 Cimografija s proteinskimi substrati.....	17
2.7.2 Cimografija s sintetičnimi substrati.....	18
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 MATERIALI.....	20
3.1.1 Izbor rastlinskega materiala.....	20
3.1.2 Spojine	21
3.1.3 Raztopine.....	22
3.1.3.1 Priprava pufrov.....	22
3.1.3.1.1 Pufri za ekstrakcijo proteinov	22
3.1.3.1.2 Pufri za testiranje encimske aktivnosti s cimografijo	22
3.1.3.1.3 Pufra za pripravo gelov.....	23
3.1.3.1.4 Pufra za elektroforezo	23
3.1.3.1.5 Nanašalna pufra za elektroforezo.....	24
3.1.3.2 Fluorogeni substrati.....	24
3.1.3.2.1 Priprava fluorogenih substratov in raztopin za analizo aminopeptidazne aktivnosti s cimografijo	24
3.1.4 Aparature	25
3.1.4.1 Elektroforezni sistem	25
3.1.4.2 Kamera za slikanje in dokumentiranje gelov	25
3.1.4.3 Spektrofotometer.....	26
3.1.4.4 Druge aparature in ostali laboratorijski pribor	26
3.2 METODE	26
3.2.1 Izvedba procesa kaljenja.....	26
3.2.2 Vzorčenje.....	27
3.2.3 Homogenizacija rastlinskega materiala in priprava ekstraktov	27
3.2.4 Cimografija	28
3.2.4.1 Priprava gelov za nativno elektroforezo.....	28
3.2.4.2 Nativna elektroforeza	29
3.2.4.3 Analiza nativnih poliakrilamidnih gelov	29
3.2.4.3.1 Analiza aminopeptidazne aktivnosti s posameznimi fluorogenimi substrati v prisotnosti reducenta DTT	30
3.2.4.3.2 Analiza metaloproteaz z inhibitorjem EDTA in v prisotnosti Ca^{2+} in Zn^{2+} ionov	30
3.2.4.3.3 Analiza serinskih proteaz z inhibitorjem PMSF	30
3.2.4.3.4 Analiza cisteinskih proteaz z aktivatorjem DTT in inhibitorjem IA.....	31
3.2.4.4 NaDS elektroforeza	31
3.2.4.4.1 Priprava gelov za NaDS-elektroforezo	31
3.2.5 Določanje vsebnosti proteinov v celičnih ekstraktih po Bradfordovi metodi	32
3.2.6 Stabilnost shranjenih ekstraktov	33
3.2.7 Določanje vsebnosti vode	33
3.2.8 Izpostavitev listov rastlin mehanskemu stresu.....	33
4 REZULTATI	34
4.1 PRELIMINARNA CIMOGRAFSKA ANALIZA AMINOPEPTIDAZNE AKTIVNOSTI V RAZLIČNIH METULJNICAH	34
4.2 DELEŽ SUHE SNOVI TER VSEBNOST PROTEINOV IN AMINOPEPTIDAZNA AKTIVNOST V EKSTRAKTIH IZ FIŽOLA, LEČE IN LUCERNE	38
4.2.1 Vsebnost suhe snovi in topnih proteinov v delih kalčka in odrasle rastline	38

4.2.2 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti z izbranimi substrati v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov	39
4.2.2.1 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti s Phe-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov	39
4.2.2.2 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti z Lys-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov	40
4.2.2.3 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti z Ala-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov	42
4.2.2.4 Cimografska analiza peptidazne aktivnosti z N- α - benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov	43
4.2.3 Cimografska analiza aminopeptidaz z mešanico substratov v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov	44
4.3 CIMOGRAFSKA ANALIZA KATALITIČNEGA TIPA AMINOPEPTIDAZ	45
4.3.1 Vpliv jodoacetamida in reducenta DTT na aminopeptidazno aktivnost	45
4.3.2 Vpliv inhibitorja PMSF na aminopeptidazno aktivnost	46
4.3.3 Vpliv EDTA in kovinskih ionov na aminopeptidazno aktivnost	48
4.4 VPLIV MEHANSKEGA STRESA NA AMINOPEPTIDAZNO AKTIVNOST V LISTIH ..	49
4.5 VPLIV NATRIJEVEGA DODECILSULFATA NA DOLOČANJE AMINOPEPTIDAZNE AKTIVNOSTI S CIMOGRAFIJO	50
4.6 VPLIV SHRANJEVANJA EKSTRAKTOV NA AMINOPEPTIDAZNO AKTIVNOST DOLOČENO S CIMOGRAFIJO	51
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	52
5.1 RAZPRAVA	52
5.2 SKLEPI	55
6 POVZETEK.....	57
7 VIRI.....	59
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Energija v kcal v 100 g očiščenega fižola in leče (Černe in sod., 1992).....	10
Preglednica 2: Hranilna vrednost fižola in leče v g/100 g (Černe in sod., 1992).....	10
Preglednica 3: Količina aminokislin v fižolu in leči v mg/100 g (Černe in sod., 1992) ...	10
Preglednica 4: Uporabljene rastline.....	20
Preglednica 5: Uporabljene spojine in njihovi proizvajalci.....	21
Preglednica 6: Fluorogeni substrati (proizvajalec Biosynth) za cimografijo in njihove molske mase v g/mol	24
Preglednica 7: Spojine za pripravo gelov za nativno elektroforezo	28
Preglednica 8: Spojine za pripravo gelov za NaDS-elektroforezo	32
Preglednica 9: Vsebnost suhe snovi, delež topnih proteinov v suhi snovi in koncentracija proteinov v ekstraktu za posamezne dele kalčka in odrasle rastline	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Cvetni diagram metuljnici (Černe, 1997).....	4
Slika 2: Zasnova za strok (Černe, 1997).....	5
Slika 3: Kamera CAM-GX-CHEMI HR system, proizvajalec Syngene.....	25
Slika 4: Različne faze kaljenja (Fink, 1993)	27
Slika 5: Način vpenjanja dveh stekelc za vlivanje gelčkov na nosilec in vstavitev glavnika ob dodatku zbiralnega gela (Gotar, 2009)	29
Slika 6: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Glu-AMC v ekstraktu poganjka in korenine kalčka vzorcev leče (1), pire (2), boba (3), graha (4), čičerike (5), soje (7), ovsu (8), vigne (9), lucerne (10) ter kličnega lista in endosperma vzorca čičerike (6).....	35
Slika 7: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Phe-AMC v ekstraktu poganjka in korenine kalčka vzorcev leče (1), pire (2), boba (3), graha (4), čičerike (5), soje (7), ovsu (8), vigne (9), lucerne (10) ter kličnega lista in endosperma vzorca čičerike (6).....	35
Slika 8: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Ala-AMC v ekstraktu poganjka in korenine kalčka vzorcev leče (1), pire (2), boba (3), graha (4), čičerike (5), soje (7), ovsu (8), vigne (9), lucerne (10) ter kličnega lista in endosperma vzorca čičerike (6)	36
Slika 9: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Lys-AMC v ekstraktu poganjka in korenine kalčka vzorcev leče (1), pire (2), boba (3), graha (4), čičerike (5), soje (7), ovsu (8), vigne (9), lucerne (10) ter kličnega lista in endosperma vzorca čičerike (6).....	36
Slika 10: Aminopeptidazna aktivnost na substrat N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktu poganjka in korenine kalčka vzorcev leče (1), pire (2), boba (3), graha (4), čičerike (5), soje (7), ovsu (8), vigne (9), lucerne (10) ter kličnega lista in endosperma vzorca čičerike (6).....	37
Slika 11: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Phe-AMC v ekstraktih leče (1, 2, 3 in 4), fižola češnjevca (5, 6, 7 in 8) ter lucerne (9, 10, 11, 12)	39
Slika 12: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Lys-AMC v ekstraktih leče (2, 3, 4 in 5), fižola češnjevca (6, 7, 8 in 9) ter lucerne (10, 11, 12 in 13)	40
Slika 13: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Ala-AMC v ekstraktih leče (2, 3, 4 in 5), fižola češnjevca (6, 7, 8 in 9) ter lucerne (10, 11, 12 in 13)	42
Slika 14: Peptidazna aktivnost na substrat N- α - benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih leče (2, 3, 4 in 5), fižola češnjevca (6, 7, 8 in 9) ter lucerne (10, 11, 12 in 13).	43

Slika 15: Aminopeptidazna aktivnost na mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC Ala-AMC in peptidazna aktivnost na N- α - benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih leče (1, 2, 3 in 4), fižola češnjevca (5, 6, 7 in 8) ter lucerne (9, 10, 11, 12). 44

Slika 16: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α - benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih celotnih kalčkov fižola češnjevca (1, 4), leče (2, 5) ter lucerne (3, 6). Encimska aktivnost v vzorcih 1-3 je bila določena v prisotnosti 5 mM DTT. Vzorcem 4-6 je bil pred nanosom na elektroforezni gel dodan jodoacetamid. Encimska aktivnost v vzorcih 4-6 je bila določena brez dodanega DTT..... 45

Slika 17: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α - benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih fižola češnjevca (1, 4), leče (2, 5) ter lucerne (3, 6). Vzorcem 1-3 je bil dodan pred nanosom DMSO (kontrola), vzorcem 4-6 smo pred nanosom na elektroforezni gel dodali v DMSO raztopljen PMSF. Encimska aktivnost vseh vzorcev je bila določena brez dodanega PMSF v reakcijski pufer..... 46

Slika 18: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α - benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih fižola češnjevca (1, 4), leče (2, 5) ter lucerne (3, 6). Vzorcem 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DMSO (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali v DMSO raztopljen PMSF. 47

Slika 19: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α - benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih fižola češnjevca (1, 4), bleče (2, 5) ter lucerne (3, 6). Pri določevanju aminopeptidazne aktivnosti vzorcev 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT in kompleksant kovinskih ionov EDTA. 48

Slika 20: Encimska aktivnost v ekstraktih listov rastlin izpostavljenih mehanskemu stresu (1, 3, 6) in kontrola (2, 4, 7) za lečo (1, 2), fižol češnjevec (3, 4) in lucerno (6, 7) določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in Met-AMC..... 49

Slika 21: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α - benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih kalčkov lucerne (1, 2), leče (3, 4) ter fižola češnjevca (5, 6). Vzorce smo pred nanosom na elektroforezni gel redčili z nanšalnim pufrom, ki je vseboval NaDS (1, 3, 5) in s pufrom, ki ni vseboval NaDS (2, 4, 6). Elektroforeza je potekala pri denaturirajočih pogojih v prisotnosti NaDS. Protenine smo po končani elektroforezi in pred analizo encimske aktivnosti renaturirali s tritonom X-100.. 50

Slika 22: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α - benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih kalčkov leče (2-5), lucerne (6-9) ter fižola češnjevca (10-13). Ekstrakte kalčkov smo pred analizo encimske aktivnosti hranili 14 dni na -80 °C (2, 6, 10) , 10 dni na -20 °C (3, 7, 11) , 24 ur na +4 °C (4, 8, 12) in 24 ur na +20 °C (5, 9, 13). 51

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje skupnih proteinov po Bradfordu.

Priloga B: Izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 595 nm pri določitvi vsebnosti proteinov v ekstraktih posameznih delov rastlin.

Priloga C: Primer izračuna masne koncentracije topnih proteinov (γ).

Priloga D: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC in Ala-AMC v ekstraktih fižola češnjevca (1, 4), leče (2, 5) ter lucerne (3, 6). Pri določevanju aminopeptidazne aktivnosti vzorcev 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT in $ZnCl_2$.

Priloga E: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC in Ala-AMC v ekstraktih fižola češnjevca (1, 4), leče (2, 5) ter lucerne (3, 6). Pri določevanju aminopeptidazne aktivnosti vzorcev 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT in $CaCl_2$.

Priloga F: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Gly-AMC v ekstraktih poganjka in korenine kalčka skupaj vzorcev fižola češnjevca (1), lucerne (4), leče (5), soje (6), čičerike (7), ter kličnega lista in endosperma vzorca fižola (2).

Priloga G: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Met-AMC v ekstraktih poganjka in korenine kalčka skupaj vzorcev fižola češnjevca (1), lucerne (4), leče (5), soje (6), čičerike (7), ter kličnega lista in endosperma vzorca fižola (2).

Priloga H: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Trp-AMC v ekstraktih poganjka in korenine kalčka skupaj vzorcev fižola češnjevca (1), lucerne (4), leče (5), soje (6), čičerike (7), ter kličnega lista in endosperma vzorca fižola (2).

Priloga I: Gel po 30 minutnem spiranju z destilirano vodo po končani analizi aminopeptidazne aktivnosti v ekstraktih z mešanico fluorogenih substratov.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A ₅₉₅	absorbanca pri valovni dolžini 595 nm
Ala-AMC	L-alanin-7-amido-4-metilkumarin (ang. L-alanine-7-amido-4-methylcoumarin)
AMC	7-amino-4-metilkumarin (ang. 7-amino-4-methylcoumarin)
APS	amonijev persulfat
DMSO	dimetilsulfoksid
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
Glu-AMC	L-glutaminska kislina-alfa-7-amido-4-metilkumarin (ang. L-glutamic acid-alpha-7-amido-4-methylcoumarin)
Gly-AMC	glicin 7-amido-4-metilkumarin (ang. glycine 7-amido-4-methylcoumarin)
HCl	klorovodikova kislina
IA	jodoacetamid
Lys-AMC	L-lizin-7-amido-4-metilkumarin (ang. L-lysine-7-amido-4-methylcoumarin)
m	masa proteinov
Met-AMC	L-metionin-7-amido-4-metilkumarin (ang. L-methionine-7-amido-4-methylcoumarin)
N-α- benzoyl-Arg-AMC	N-alfa-CBZ- L-Arginin 7-amido-4- metilkumarin (ang. N-alpha- CBZ-L-Arginine 7-amido-4-methylcoumarin)
NaDS	natrijev dodecil sulfat
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
Phe-AMC	L-fenilalanin-7-amido-4-metilkumarin (ang. L-phenylalanine-7-amido-4-methylcoumarin)
PMSF	fenilmetylsulfonil-fluoride (ang. phenylmethylsulfonyl fluoride)

PVP	polivinilpirolidon
s.m.	masa svežih rastlin
s.s.	masa suhe snovi
SS	suha snov
TEMED	N,N,N',N' - Tetrametil-etenomediamin
Tris	Tris-hidroksimetil – aminometan
Trp-AMC	L-triptofan-7- amido-4-metilkumarin (ang. L-tryptophan 7-amido-4-methylcoumarin)
VV	vsebnost vode
γ	masna koncentracija (mg/ml)

1 UVOD

Aminopeptidaze so encimi, ki jih uvrščamo v posebno skupino eksopeptidaz, ker odcepljajo aminokisline od proteinskega in peptidnega substrata z N-terminalnega konca. So široko razširjene v rastlinskem in živalskem svetu in jih lahko najdemo v mnogih subcelularnih organelih, citoplazmi in kot komponente membrane. Za nekatere od njih so ugotovili zelo pomembne celične funkcije in so danes predmet številnih raziskav, saj je proteoliza vpletena v fiziologijo in razvoj rastlin (Taylor, 1993).

Cimografija je preprosta in občutljiva dvostopenjska tehnika za ločevanje in identifikacijo encimov v encimsko aktivnih bioloških vzorcih (Heussen in Dowdle, 1980). Vključuje ločevanje proteinov z elektroforezo, ki ji sledi analiza encimskih aktivnosti v gelu.

Različne aminopeptidaze so bile izolirane iz različnih rastlin. V literaturi smo zasledili objave o aminopeptidazah v nekaterih stročnicah, kot so grah, fižol, soja, ipd., prav tako pa so objavljene raziskave rastlinskih aminopeptidaz glede na substrat, ki ga cepijo in njihove katalitične lastnosti.

Mehanski stres in tudi druge oblike stresa različno vplivajo na aminopeptidazno aktivnost, saj pride do razgradnje proteinov, ki vodi do predčasnega staranja rastlinskih tkiv in nenadzorovane proteolize, kar ima za rastlino negativne posledice. Po drugi strani ta proces rastlinam omogoča spreminjanje vsebnosti proteinov v razmerah, ki zahtevajo spremembe celične presnove. Regulacija razgradnje proteinov je zato eden od temeljnih mehanizmov v odzivu rastlin na stres (Vrhovnik, 2007).

Shranjevanje ekstraktov je eden ključnih dejavnikov pod kakšnimi pogoji shranjevati ekstrakte za določevanje aminopeptidaz, ker so encimi odvisni od temperature in ima vsak encim svojo optimalno temperaturo delovanja, prav tako pH in izoelektrično točko.

1.1 NAMEN DELA

- preliminarna karakterizacija aminopeptidaz v metuljnicah,
- analiza aminopeptidazne aktivnosti s fluorogenimi substrati v poganjku in korenini kalčka skupaj, kličnem listu in endospermu skupaj, korenini in listu odraslih rastlin fižola, leče in lucerne,
- karakterizacija aminopeptidaz glede na afiniteto do posameznih fluorogenih substratov in določevanje katalitskega tipa,
- ugotavljanje vpliva mehanskega stresa in shranjevanja na aminopeptidazno aktivnost.

1.2 HIPOTEZE

- Predviedvamo, da bomo s cimografijo detektirali različne aminopeptidaze, ki se izražajo v kalčkih izbranih metuljnic in trav.
- Pričakujemo, da bomo v različnih delih iste rastline detektirali različne aminopeptidaze.
- Menimo, da bodo inhibitorji vplivali na aminopeptidazno aktivnost.
- Pričakujemo, da bo mehanski stres vplival na aminopeptidazno aktivnost v listih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 STROČNICE

Stročnice, imenovane tudi metuljnice ali leguminoze, razvijejo pokončna, razvezjana in posamezne vrste tudi plezajoča steba. V to skupino spadajo številne rastline, od katerih so pri nas najbolj razširjene grah, bob, soja, fižol, leča. Značilno zanje je, da vsebujejo veliko beljakovin in jih po vsebnosti hranil prištevamo med najbogatejše zelenjavnice. Uporaba stročnic v prehrani sega v prazgodovinski čas. Najdaljšo tradicijo v Evropi in sploh v Sredozemlju ima gojenje boba, graha in leče. Začetek gojenja fižola v Evropi pa sega v novejše obdobje, saj je bil prinesen iz Amerike po njenem odkritju.

Vse stročnice vsebujejo veliko beljakovin, maščob in ogljikovih hidratov in v sledovih tudi vitamine. Jedi iz stročnic so lahko prebavljiva in okusna hrana predvsem za zdrave ljudi. Za ljudi, ki bolehajo na želodcu, črevesju, ledvicah, srcu ali imajo sladkorno bolezen, pa niso primerne (Osvald in Kogoj Osvald, 1994).

Rastline iz družine stročnic so razširjene tako v zmernem in hladnem podnebju, kot tudi v subtropskih in tropskih območjih. Lahko so eno- ali večletne, zelnate ali lesnate rastline (Černe, 1997).

2.1.1 Botanična razvrstitev stročnic

Na podlagi botanične klasifikacije razvrščamo stročnice takole:

oddelek *Spermatophya* – semenovke
pododdelek *Magnoliophytina* (*Angiospermae*)- kritozemenne
razred *Magnoliatae* (*Dicotyledonae*)- dvokaličnice
podrazred *Rosidae* (*Rosiflorae*)
nadred *Rosanae*
red *Fabales*
družina Fabaceae (*Leguminosae*)-stročnice
(Černe, 1997)

2.1.2 Opis posameznih delov stročnice

2.1.2.1 Korenina

Na koreninah vseh stročnic so v majhnih gomoljčkih nitrifikacijski bakterije iz rodu *Rhizobium*, ki vežejo dušik iz zraka in ga dajejo na voljo rastlini, v zameno pa dobivajo organske snovi iz rastline. Bakterije so sposobne vezati dušik samo na tistih vrstah stročnic, za katere so ugotovljeni simbiotski odnosi. Na fižolu živi v simbiozi *Rhizobium phaseoli*, na lucerni pa *Rhizobium meliloti*. Stročnice izredno zboljšujejo tla, zato jih

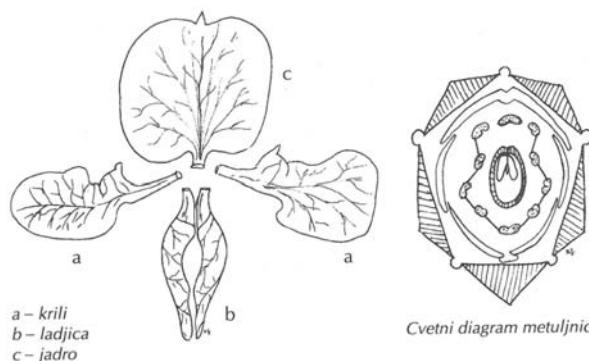
uporabljamo tudi za zeleno gnojenje. Zaradi sožitja z bakterijami iz rodu *Rhizobium* uspešno rastejo na slabših tleh, ki morajo biti zračna, v njih ne sme zastajati voda in mora imeti primeren pH 5,5 do 6,7 (Černe, 1997).

2.1.2.2 List

Liste imajo pernato sestavljenje, nekatere imajo preobražene tudi v vitice, s katerimi se oprijemajo opore. Na steblu so dobro razviti prilisti, ki so lahko tudi večji od posameznih lističev (Černe, 1997).

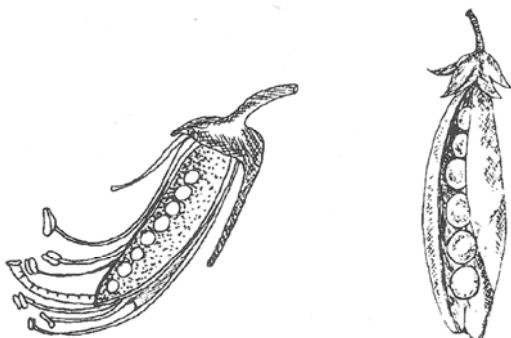
2.1.2.3 Cvet

V cvetu so venčni listi zgrajeni v obliki metulja, zato jim rečemo tudi metuljnice. Spodnja zrasla venčna lista imenujemo ladjica, stranska lista so krilca, zgornje največje in razširjeno je zastavica ali jadro.



Slika 1: Cvetni diagram metuljnic (Černe, 1997)

Po samooploditvi in deloma pri nekaterih stročnicah tudi po oploditvi s tujim cvetnim prahom se razvije strok, ki se odpira po hrbtni in trebušni strani. Semenske zasnove so prirastele na rob plodničnega lista, to je na trebušnem šivu. V kličnih listih so shranjene rezervne snovi (Osvald in Kogoj Osvald, 1994).



Slika 2: Zasnova za strok (Černe, 1997)

2.1.3 Pridelovalne potrebe stročnic

Pridelovanje je pogojeno z izborom primernih tehnik, vsaj 3- do 4-letnega kolobarjenja ter pravilne oskrbe z vodo in hranili. Upoštevati moremo lastnosti stročnic, da se same oskrbujejo z dušikom. Za dobro rast in kakovosten pridelek je pomembno, da izberemo kakovostna tla ter dobro začetno gnojenje z dušikom in v času rasti, s primerno oskrbo z manjkajočimi hranili, z gnojenjem s trdnimi gnojili (Černe, 1997).

2.1.3.1 Podnebne razmere

Stročnice so topotno manj (grah, bob) do srednje zahtevne (fižol) zelenjadnice. Za rast in razvoj je optimalna temperatura od 15 do 18 °C. Uspešno rastejo v zmerno vlažnem podnebju, kjer dajejo ob primerni oskrbi visoke in kakovostne pridelke (Osvald in Kogoj Osvald, 1994).

2.1.3.2 Pridelovalno okolje

Stročnice pridelujemo na prostem za poletno, sezonsko oskrbo trga ter za skladiščenje, nekatere izmed njih (visok fižol za stročje) pa v zavarovanih prostorih. Izberemo primerno rastišče, odvisno od zahtevnosti vrste in sorte. Da bi pridelali kakovostno in časovno načrtovan pridelek stročnic, se odločamo za ukrepe pospeševanja rasti z vzgojo sadik in za prekrivanje tal ter nasada s folijami (Osvald in Kogoj Osvald, 1994).

2.1.3.3 Kolobar in izbor zemljišč

Na isto površino sejemo metuljnice na vsake 3 do 4 leta. Za pridelovanja fižola, boba izberemo lažja do srednje težka, odcedna, kakovostna in dobro pognojena tla s pH 6,5 (5,5 do 7,0). Za poletno in jesensko pridelovanje fižola izberemo srednje težka tla z dobro sposobnostjo zadrževanja vlage (Černe, 1997).

2.1.3.4 Gnojenje

Stročnice ne prenašajo gnojenja s svežim hlevskim gnojem, zato jih sadimo na drugo poljino. Gnojimo jih lahko s kompostiranim hlevskim gnojem ali kompostom (Osvald in Kogoj Osvald, 2003).

2.1.3.5 Skladiščenje pridelka

Stročnice pospravljamo, ko so primerno razvite oziroma tehnološko zrele. Pospravljamo mlade stroke (fižol), stroke z že razvitimi zrni v voščeni zrelosti (fižol, bob) ali zrna v polni zrelosti (fižol za zrnje, soja).

Pridelke skladiščimo v hladnih in vlažnih skladiščih 2 do 3 dni pri temperaturi 0 do 6 °C, v hladilnici pa pri 0 do 1 °C ter 95 % relativni vlagi 3 tedne. Pridelke suhega zrna skladiščimo tudi daljše obdobje v suhih in hladnih skladiščih (Osvald in Kogoj Osvald, 2003).

2.1.3.6 Stročnice kot vir bioaktivnih snovi

V cvetju, stročju, zrnju in luščinah fižola je glukokinin, ki deluje podobno kot inzulin in tako zmanjšuje količino sladkorja v krvi. Snovi v fižolu pospešujejo izločanje seča, vežejo, raztopljujo in odvajajo sečno kislino iz telesa, zato ga je priporočljivo uživati pri boleznih ledvic in mehurja. Fižol uspešno zmanjšuje tudi revmatizem, išias, živčne bolezni, zaprtje, težave z jetri, slabokrvnost, premočno bitje srca in visok krvni tlak (Černe, 1997).

Iz leče narejena kaša pomaga pri urejanju prebave, pri otrocih pa odpravlja gliste. Uporabljamo jo tudi za lajšanje revmaticnih bolečin in podobno kot druge stročnice pri zdravljenju kože, predvsem ekcemov, oteklin in čirov (Černe, 1997).

Lucerna vsebuje izoflavone, kumarine, alkaloide, vitamine in porfirine. Izoflavoni in kumarini delujejo podobno kot estrogeni, zato jo lahko s pridom uporabljamo za zdravljenje težav z menstruacijo in v menopavzi. V telesu deluje kot raztrupljevalec, ker vsebuje veliko klorofila (slabokrvnost). Pomaga pri sluzničnih razjedah, saj je alkalna in nevtralizira želodčno kislino (zgaga). Pomaga imunskemu sistemu in preprečuje prezgodnje staranje, zdravi težave s prostato in celo povečuje nastajanje mleka pri doječih materah. Lucerna je odlična za prebavo, saj vsebuje tudi veliko število encimov (Černe, 1997).

2.2 FIŽOL

2.2.1 Zgodovina fižola

V Evropi smo ga začeli pridelovati šele po odkritju Amerike, kjer so ga Inki pridobivali že pred 7000 leti, zlasti v Peruju, Mehiki, Gvatemali in Kostariki.

Nekatera indijska plemena so ga sadila ob koruzi. V Braziliji, Mehiki in Venezuela gojijo predvsem fižol s črnim semenom, v Kolumbiji z rdečim, v Peruju z rumenim semenom.

V Sloveniji gojimo številne domače kultivarje, med njimi prevladujejo rdeče pisani kultivarji in beli kultivarji (Osvald in Kogoj Osvald, 2003).

2.2.2 Morfološke in fiziološke lastnosti

Vrsta *Phaseolus vulgaris* L. je najbolj razširjena vrsta enoletnih zelnatih fižolov. Je pomembna vrtnina, ki vsebuje zelo veliko beljakovin (1 do 3% v svežem stroku in 20 do 24% v suhem zrnu) in zato v vegetarijanski prehrani vsaj deloma nadomešča meso (Černe, 1997).

Korenine prodrejo zelo globoko v zemljo, zelo dobro imajo razvite stranske korenine. Steblo fižola je tanko, okroglo in šestrobo. Po višini steba razdelimo kultivarje v nizke ali grmičarje (30 do 50 cm), srednje visoke ali dračarje (50 do 130 cm) in visoke ali preklarje (150 do 600 cm).

Na steblu so izmenično razporejeni listi s prilisti. Po vzniku se najprej razvijeta dva srčasta in celoroba lista, vsi naslednji listi so tridelni večinoma srčaste oblike, porasli z drobnimi dlačicami.

Cvetovi so pri fižolu združeni v socvetje in so dvospolni. Ti so beli, rumeni, rdeči ali vijolični. Kultivarji z obarvanim cvetom imajo obarvano seme.

Plod je nitast ali breznitni strok zeleno, rumeno ali pisano obarvan, ki se razvije 10 do 15 dni po cvetenju. Pri sortah, ki jih predelujemo, se zgodaj razvije luskinasta opna (notranji otrdeli del osemenja), pri sortah, ki jih pridelujemo za stročje, se luskinasta opna oblikuje počasneje. Sorte za stročje so praviloma brez niti, sorte za pridelavo zrnja pa so največkrat nitaste.

Seme fižola je različnih barv (od bele do rumene, vijoličaste do črne barve) in različnih oblik (ledvičasto, valjasto, jajčasto) (Černe, 1997).

2.2.3 Rastne razmere

Fižol zahteva toplo in vlažno podnebje. Slabo prenaša vročino in sušo, saj ta skrajšuje čas rasti, s tem pa količino pridelka in seveda njegovo kakovost. Ker fižol lahko raste od setve do fiziološke zrelosti 50 do 150 dni, v hladnejših krajih gojimo predvsem zgodnje kultivarje, ki prej končajo rast. Kultivarji visokega fižola so glede topote in vlage veliko zahtevnejši kot kultivarji nizkega, ki imajo običajno tudi krajšo vegetacijsko dobo. Fižol gojimo na različni nadmorski višini. V Mehiki uspeva do nadmorske višine 2800 m, v Gvatemali do 3200 m v Sloveniji uspešno gojimo fižol do nadmorske višine 1300 m. Fižol zelo slabo prenaša vetrovne lege, ker veter poškoduje liste in cvetove.

Minimalna temperatura za vznik fižola je 9 do 12 °C, fižol začne cveteti pri temperaturah 18 do 25 °C, jeseni pa prenesejo odrasle rastline temperaturo 0 °C. Visoke temperature vplivajo na skrajšanje strokov, manjše število zrn v stroku in manjšo maso semena. Fižol potrebuje tudi veliko vlage v tleh, zato fižol pri poznejših setvah namakamo že ob setvi, če zemlja ni vlažna. Kasneje se poslužujemo kapljičnega namakanja po cvetenju, kar ugodno vpliva na povečanje pridelka (Osvald in Kogoj Osvald, 2003).

2.2.4 Pregled vrst, podvrst in kultivarjev

- vrsta *Phaseolus vulgaris* L. – navadni fižol, fižol za zrnje
- podvrsta *Phaseolus vulgaris* L. spp. *vulgaris* var. *nanus* (L.) Aschers f. *sine fibris* – nizki stročji fižol,
Phaseolus vulgaris L. ssp. *vulgaris* var. *nanus* (L.) Aschers f. *fibriferis* - nizki fižol za zrnje
- podvrsta *Phaseolus vulgaris* L. spp. *vulgaris* var. *Intermedius* – srednje visoki fižol
- podvrsta *Phaseolus vulgaris* L. spp. *vulgaris* var. *Vulgaris* (*Phaseolus vulgaris* L. var. *Communis* Aschers)- visoki stročji fižol, fižol preklar, stročnik

Za naše analize smo uporabili nizki fižol za zrnje, kamor spadajo:

- Češnjevec = češnjevac, tršnjevac, ribničan, zorin, gradištanac...
 - Junički = dečanski ali molnički pasulj, slavonski zeleni, tetovac, biser, galeb...
- (Černe, 1997)

2.3 LEČA

2.3.1 Zgodovina leče

Leča je ena prvih rastlin, ki jih je človek začel gojiti. Leča izvira iz Sredozemlja. V Bosni, Švici in na Madžarskem so našli lečo iz kamene dobe. V Mali Aziji so lečo gojili 8000 do 10 000 let pred našim štetjem (Osvald in Kogoj Osvald, 1994).

2.3.2 Morfološke in fiziološke lastnosti

Leča (*Lens culinaris Medicus*) vsebuje veliko beljakovin, ogljikovih hidratov, do 2 % olja, vitamine iz skupine B, železo in fosfor.

Leča je enoletna zelnata rastlina grmaste oblike, mehko dlakava. Razvije plitvi koreninski sistem, korenine so slabo razvejane.

Steblo je pokončno, do 50 cm visoko, štirirobo, poraslo s kratkimi dlačicami zelene ali vijolične barve.

Listi so parno pernati, na spodnjih so dva do trije pari listov, ki se končujejo s konico, zgornji listi so sestavljeni iz 8 parov, ki se končujejo z vitico. Listi so svetlo zeleni, poldogovate ovalne oblike, prilisti pa so pri osnovi pogosto nazobčeni.

Strok je romboiden, sploščen, gladek, svetlo ali temno siv in vsebuje 1 do 3 semena. Ta so okrogle, sploščena, zelene, sive črne ali rdečkaste barve. Glede na debelino semen razlikujemo drobno in debelozrnato lečo (Černe, 1997).

2.3.3 Rastne razmere

Leča dobro uspeva tudi na slabših tleh. Leča je rastlina hladne klime, zato ni primerna za vlažno in tropsko podnebje. Kljub temu pomladi ne prenaša nizkih temperatur, pri - 6 °C rastlina propade.

Leča je dobro prilagojena sušnim razmeram, prav tako dobro uspeva na ves dan osončenem zemljišču.

Uspeva na različnih tipih tal, celo na nekoliko alkalnih. Vecje pridelke dajejo na lahki do srednje težki zemlji, tudi peščeni (Osvald in Kogoj Osvald, 1994).

2.3.4 Pregled vrst, podvrst in kultivarjev

Lens culinaris Medik. Spp. *macroisperma*- debelozrnata leča, ki zraste do 70 cm visoko, beli cvetovi imajo modre žilnice, premer semen pa je do 8 mm. Debelo zrnje imajo večinoma sredozemski kultivarji, gojijo pa jo tudi v severni Ameriki. *Lens culinaris* Medik. Spp. *microperma*- drobnozrnata leča, ki zraste do 40 cm visoko, ima modrikaste cvetove in do 5 mm veliko seme. Drobno zrnje imajo predvsem indijske kulture, gojijo jih tudi v Afganistanu in Iranu (Černe, 1997).

2.4 LUCERNA

2.4.1 Zgodovina lucerne

Imenujemo jo tudi alfalfa ali nemška detelja, ker je k nam prišla iz Nemčije približno leta 1750. Med metuljnicami je ena najstarejših. Najprej so jo pridobivali v Perziji, odkoder so jo prinesli v Grčijo in nato k starim Rimljancem, ki so jo cenili predvsem kot krmno rastlino za prehrano konj. Pozneje so jo Arabci prinesli v Španijo, od tod se je razširila v Italijo, Francijo in Nemčijo (Osvald in Kogoj Osvald, 2003).

2.4.2 Morfološke, fiziološke lastnosti in rastne razmere

Lucerna (*Medicago sativa* L.) za prehrano živali, saj zagotavlja velik pridelek kakovostne beljakovinske krme. Lucerna je večletna metuljnica, ki vsebuje veliko hraničnih snovi.

Za optimalno rast potrebuje lucerna rahla tla z ugodnim vodno-zračnim razmerjem. Po teksturni sestavi tej rastlini odgovarjajo ilovnata peščena tla, ki imajo pH okoli 7,0. Koreninski sistem doseže globino do 2 m.

Setev lucerne lahko izvedemo v spomladanskem ali jesenskem roku. Največja nevarnost pri zgodnji spomladanski setvi je nizka temperatura –6 °C, pri kateri mlade rastlinice lucerne pomrznejo.

V sedanjem času jo predvsem cenimo za nakaljevanje semena, kalčke uživamo surove ali pripravljene v različnih jedeh (Černe, 1997).

2.5 PREHRANSKE VREDNOSTI FIŽOLA IN LEČE

Preglednica 1: Energija v kcal v 100 g očiščenega fižola in leče (Černe in sod., 1992)

Stročnice	kcal
Fižol, stročji	31 – 46
Fižol, zrnje	322 – 339
Leča, suha	337-339

Preglednica 2: Hranilna vrednost fižola in leče v g/100 g (Černe in sod., 1992)

Stročnice	voda	surove beljakovine	surove maščobe	ogljikovi hidrati	vlaknine	minerali
Fižol, stročji	86- 94	1,2 – 3,0	0,1 – 0,4	2,9 – 7,7	0,9 – 2,0	0,7 – 0,8
Fižol, zrnje	11 – 17	20 – 24	1,3 - 2,0	47 – 62	3,9 -4,0	3,9
Leča, suha	12-13	22-26	1,0 – 1,9	47 – 60	3,7 – 4,0	3,0 – 3,3

Preglednica 3: Količina aminokislin v fižolu in leči v mg/100 g (Černe in sod., 1992)

Aminokisline	Fižol, stročji	Fižol, zrnje	Leča, suha
Tirozin	24-70	450-1260	420-850
Treonin	84-86	550-1140	560-1170
Triptofan	24-43	85-350	41-470
Lizin	100-130	1130-2020	1150-1740
Histidin	39-48	320-780-	400-600
Arginin	91-97	1000-1900	1110-2180
Izolevcin	100	920-1430	1020-1530
Levcin	120-140	1530-1810	1270-200
Valin	110	1020-1520	1130-1520
Metionin	11-53	110-390	94-380
Cistein	220	130-430	71-420
Fenilalanin	28-78	700-1570	880-1210

2.6 RASTLINSKE PROTEAZE

Encime, ki katalizrajo hidrolizo peptidne vezi, imenujemo peptidaze (tudi proteaze, proteaze ali proteolitični encimi; omenjene pojme bomo v diplomski nalogi izmenično uporabljali). Proteoliza je encimska razgradnja beljakovin, pri kateri pride do hidrolize ene ali več peptidnih vezi s peptidazami. Proteaze v splošnem sodelujejo predvsem pri presnovi proteinov in zagotavljajo vir aminokislin ter pri regulaciji aktivnosti s proteolitičnim razcepom (Rawlings in sod., 2006). Peptidaze razdelimo na endopeptidaze, ki cepijo proteine znotraj peptidnih verig, eksopeptidaze pa na njihovih koncih. Eksopeptidaze pa lahko razdelimo še na: aminopeptidaze, ki cepijo peptide na N – koncu, in karboksipeptidaze, ki cepijo peptide na C-koncu. Aktivnost proteaz je odvisna od fiziološkega stanja rastlin.

Rastlinske proteaze so predmet številnih raziskav, saj proteoliza omogoča rastlinam spremembo vsebnosti proteinov med razvojem in prilagoditvi na nove pogoje v okolju (Vierstra, 1996).

Predstavljam kar približno 2 % genoma vseh živih organizmov in so izrednega pomena v medicini in biotehnologiji (Turk, 2006). V zadnjih letih se povečuje vloga proteaz v kliničnih, farmacevtskih in industrijskih aplikacijah (proizvodnja sira, mehčanje mesa, strojenje usnja itd.) (Demir in sod., 2008).

2.6.1 Razdelitev proteaz

Obstaja več kriterijev za razvrščanje proteaz, zaradi njihove velike raznolikosti. Najbolj uveljavljena načina razdelitve sta tista:

- ki ju predlaga komisija za encime EC (angl. Enzyme commission, kasneje preimenovana v Nomenclature committee od the International Union of Biochemistry and Molecular Biology oz. NC-IUBMB) (NC-IUBMB, 2007) in
- razdelitev po spletni podatkovni bazi MEROPS (Rawlings in sod., 2006).

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).

Po pravilih encimske nomenklature - IUB Nomenclature commitee, 1986 - so proteaze razdeljene med:

- endopeptidaze, ki jih na osnovi različnega katalitskega mehanizma delimo na serinske proteaze, cisteinske proteaze, aspartatne proteaze, metaloproteaze, treoninske proteaze in proteaze z neznanim mehanizmom delovanja,
- eksopeptidaze, ki so razdeljene glede na specifičnost odcepljanja različno velikih fragmentov z amino ali karboksilnega terminalnega konca polipeptidne molekule pa vključuje aminopeptidaze, dipeptidaze, dipeptidil peptidaze, tripeptidil peptidaze, peptidil peptidaze, karboksipeptidaze in omega peptidaze (Barrett in McDonald, 1986).

Klasifikacija po Rawlingsu in Barrettu (1993) upošteva, da imajo nekateri encimi tako endo- kot eksopeptidazno aktivnost in evolucijsko povezanost encimov oziroma struktурno podobnost:

- izvor: mikrobne, rastlinske, živalske;
- mesto delovanja: zunajcelične in znotrajcelične;
- mesto cepitve peptidne vezi: eksoproteaze (cepijo peptidno vez blizu N ali C terminalnega konca polipeptidne verige substrata) in endoproteaze (cepijo notranje peptidne vezi v polipeptidni verigi s tendenco delovanja strani od N in C koncev);
- kemična narava katalitičnega mesta: katalitski tip proteaze se nanaša na kemijsko skupino odgovorno za katalizo hidrolize peptidne vezi. Poznamo 6 specifičnih tipov katalitičnih tipov: serinske, treoninske, cisteinske, aspartatne, glutaminske in metaloproteaze. Pri proteazah serinskega, treonskega in cisteinskega tipa ima vlogo nukleofilna reaktivna skupina stranske verige aminokisline v aktivnem mestu (Ser, Thr, Cys), ki je lahko hidroksilna skupina (serinske in treoninske proteaze) ali sulfhidrilna skupina (cisteinske proteaze). Pri aspartatnih in metalo-proteazah je nukleofil ponavadi aktivna molekula vode. Glutaminske proteaze so prepoznali šele leta 2005 in še niso podrobno proučene (Gotar, 2009).
- molekulska struktura in homologija: odvisna od dostopnosti aminokislinskih zaporedij in 3-D struktur; podlaga za določanje evolucijske sorodnosti (Rao in sod., 1998; Rawlings in sod., 2009).

2.6.2 Rastlinske aminopeptidaze

Kot smo omenili, so aminopeptidaze po eni klasifikaciji proteolitičnih encimov uvrščene v posebno skupino eksopeptidaz; odcepljajo aminokisline od proteinskega in peptidnega substrata z N-terminalnega konca.

So široko razširjene v rastlinskem in živalskem svetu in jih lahko najdemo v mnogih subcelularnih organelih, citoplazmi in kot komponente membrane. Za nekatere od njih so ugotovili zelo pomembne celične funkcije (Taylor, 1993).

2.6.2.1 Razdelitev aminopeptidaz

Obstaja več različnih kriterijev za delitev aminopeptidaz :

- glede na število aminokislin, ki jih odcepijo iz substrata; aminopeptidaze, aminodipeptidaze, aminotripeptidaze,
- glede na afiniteto do posameznih aminokislin;
 primer je levcin-aminopeptidaza (LAP), ki odceplja levcin in nekatere druge hidrofobne aminokislinske ostanke, poleg nje pa so bile opisane tudi Arg-, Met-, Asp-, Ala-, Glu-, Pro- in Cys- itd. aminopeptidaze,
- glede na lokalizacijo;
 nekatere aminopeptidaze so sekretorni encimi, večina pa jih ostane v celici. Lahko so citosolni ali pa so vezani na membrano. Nekatere so bile odkrite v organelih; na primer v jedru, lizosomih, mitohondrijih in kloroplastih (Liu in Jagendorf, 1986);
- glede na vsebnost kovinskega iona, ki sodeluje v katalitičnem mehanizmu;

na primer mnoge LAP vežejo dva Zn^{2+} na podenoto, znane so metionin aminopeptidaze, ki za svojo aktivnost potrebuje Co^{2+} ione;

- glede na pH območje, pri katerem ima encim največjo aktivnost; poznamo kisle, bazične in nevtralne aminopeptidaze,
- glede na občutljivost encima na različne inhibitorje (Vrhovnik, 2007).

2.6.2.2 Aminopeptidaze v metuljnicah

V literaturi smo zasledili nekatere objave v katerih avtorji poročajo o aminopeptidazah v metuljnicah. V pričuječem odstavku so predstavljene nekatere značilnosti (substratna specifičnost, proteolitičen tip, molska masa, tkivo ali razvojna faza rastline) identificiranih encimov.

Fenilalaninska aminopeptidaza je bila izolirana iz nekaj tednov stare rastline graha. Molska masa encima je 60 kDa, pH optimum jepri pH 7,0 in temperturni optimum pri 37 °C. Encim učinkovito hidrolizira aminopeptidazne susbtrate, ki imajo na N-terminalnem koncu aminokisline Phe, Tyr, Trp, Leu (Pyrzyna in sod., 2010).

V peroksisomih iz listov graha (*Pisum sativum*) so identificirali leucinsko aminopeptidazo (LAP; hidrolizira substrate, ki imajo na N-terminalnem koncu Leu), katero so okarakterizirali kot serinsko proteazo z največjo aktivnostjo pri pH 7,5 in s pI 5,3. Njena molekulska masa je 56,8 kDa. V peroksisomih listov graha so identificirali še eno dodatno LAP (Palma in sod. 2002).

Biokemijsko je najbolj okarakterizirana heksamerna LAP iz semen navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*), ki pripada metalopeptidazam (Sopanen in Mikola, 1975; Mikkonen, 1992). Za razliko od več rastlinskih LAP, ki so homoheksamerni encimi, je fižolova LAP heteroheksamerna. Sestavljena je iz podenot, ki so velike 66 kDa oz. 58 kDa (Mikkonen, 1992).

Iz kotiledona črnega fižola (*Vigna unguiculata* L.) so bile izolirane tri aminopeptidaze, ki so učinkovito hidrolizirale substrate z aminokislinskim arginin, fenilalanin, alanain in glicin vezanimi na naftilamin (Wynn in Murray, 1985).

V kličnih listih soje (*Glycine max*) so odkrili monomerno aminopeptidazo z molekulsko maso 85 kDa, ki za svojo aktivnost potrebuje proste –SH skupine. Podobna je ostalim rastlinskim aminopeptidazam iz semen in se od njih razlikuje po afiniteti do specifičnih substratov in po encimski aktivnosti. Največjo aktivnost daje z naftilamidi hidrofobnih in aromatskih aminokislín: fenilalanina, triptofana, tirozina in levcina (Couton in sod. 1991).

Več objav se nanaša na aminopeptidazne aktivnosti v kličnih listih pri kalitvi, tako so aminopeptidaze identificirali npr. v volčjem bobu *Lupinus alba* (Duarte in sod., 1993), bobu *Vicia faba* (Kirmizi in Guleryuz, 2006) in indijskem fižolu *Dolichos lablab* (Ramakrishna in Rao, 2006). Vendar ustreznih aminopeptidaz niso izolirali oz. jih bolj podrobno okarakterizirali.

Encime, ki učinkovito razgrajujejo substrate kjer je na N-terminalu aminokislina leucin so izolirali tudi iz nekaterih drugih virov. LAP so izolirali iz krompirjevega gomolja. Encim ima molsko maso 90 kDa z izoelektrično točko 5,45 ter optimum pri 45 °C in pH 9,0. Iz kotiledona jojobe (*Simmondsia chinensis*) so s substratom levcin-nitroanilid izolirali aminopeptidazo, katere molska masa je 14 kDa, z optimalnim delovanjem pri pH 6,9 in z izoelektrično točko 4,5 (Johanson in Storey, 1985).

2.6.2.3 Katalični tipi proteolitičnih encimov

2.6.2.3.1 Serinske proteaze

Serinske proteaze so v rastlinah med vsemi proteolitičnimi encimi najštevilčnejše. Večina serinskih proteaz je izolirana iz bakterij (Rawlings in sod., 2006). V aktivnem mestu teh encimov je aminokislina serin, ki je v kemijskem smislu, zaradi nukleofilnega karakterja OH- skupine, odločilna za cepitev peptidne vezi. Katalični mehanizem vključuje tudi donor protona, običajno histidinski ostanek, vendar ne vedno, za razliko od cisteinskih peptidaz. Poleg njiju je za katalizo potreben tudi tretji aminokislinski ostanek, ki verjetno stabilizira potrebno orientacijo imidazolnega obroča histidina. To je velikokrat aspartat, lahko pa tudi še en histidin. Se pravi, da gre za katalitično triado. V nekaterih klanih ima vlogo protonskega donorja lizinski ostanek in tretji katalitični ostanek ni potreben. Kot pri cisteinskem katalitičnem tipu, se tudi v reakcijah, ki jih katalizirajo serinske proteaze tvori acil-encimski intermediat (Gotar, 2009).

2.6.2.3.2 Cisteinske proteaze

Cisteinske proteaze izvirajo iz različnih evolucijskih poti, razdeljene pa so v šest klanov z dvema podklanoma (Rawlings in sod., 2008). Za proteaze tega katalitičnega tipa je karakteristično, da je nukleofil, ki napade peptidno vez, SH- skupina cisteinskega ostanka. Torej se ta katalitičen tip zelo razlikuje od aspartatnih, glutamatnih in metalopeptidaz, v katerih je nukleofil aktivirana molekula vode. Za serinske in treoninske proteaze enako velja, da je nukleofil v katalitičnem mestu del aminokisline iz peptidne verige encima. Katalični mehanizem cisteinskih peptidaz poleg tega vključuje tudi donor protona. Do sedaj so za vse cisteinske proteaze ugotovili, da je to histidinski ostanek. Za katalitično delovanje pri nekaterih družinah zadostuje cisteinski in histidinski ostanek, ponekod pa je potreben tudi tretji ostanek. Sorodnost s serinskimi peptidazami se kaže tudi v tem, da oba tipa peptidaz na njuni reakcijski poti tvorita kovalentne acil-encimske intermediate (Rogers in sod., 1985).

Prva peptidaza, ki so jo dejansko določili kot cisteinsko, je papain, široko specifična cisteinska proteaza, ki je ena najbolj pogosto uporabljenih encimov v različnih industrijah (Sathish in sod., 2009). Papain spada v poddružino CA1, ki sicer vsebuje večinoma endopeptidaze, sem pa uvrščamo tudi najbolj poznano rastlinsko aminopeptidazo aleurain iz clana CA, ki vsebuje več kot 20 družin (Polgár, 2004) v poddružino CA1 uvrščajo tudi cisteinsko proteazo (HvCP3), ki je bila raziskana v zelenih listih ječmena (*Hordeum vulgare* L.) (Watanabe in sod., 2009), OsCP iz riža (*Oryza sativa*) (Tian in sod., 2009), SPCP1 iz starih listov sladkega krompirja (*Ipomoea batatas*) (Chen in sod., 2009), AtGC1 iz navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) (Ludidi in sod., 2006), iz bele detelje (*Trifolium repens*) (Asp in sod., 2004), iz črne jelše (*Alnus glutinosa*), iz grahovca (*Astragalus sinicus*), iz korenja (*Daucus carota*) (Chen in sod., 2009).

2.6.2.3.3 Metaloproteaze

Katalitičnemu tipu metaloproteaz pripada večina do zdaj znanih aminopeptidaz. Od šest katalitičnih tipov so metaloproteaze najbolj raznolike, tako po strukturi kot funkciji (Schaller, 2004). Najpogostejsa kovina najdena v metaloproteazah je cink, v nekaterih encimih pa se namesto njega nahajajo kobalt, mangan, nikelj ali baker. Kovinski ion je vezan na protein s pomočjo aminokislinskih ligandov, običajno s tremi in to z ostanki histidina, glutaminske kisline, asparaginske kisline ali lizina. Poleg kovinskih ligandov je za katalitično delovanje potreben vsaj še en aminokislinski ostanek, v mnogih metalopeptidazah je to glutaminska kislina. Cink s svojo zapolnjeno d-orbitalo nima oksidacijsko-reduksijskih lastnosti značilnih za sosednje prehodne kovine. Zato je v biološkem okolju, čigar redoks potencial se stalno spreminja, cink stabilen kovinski ion (Gomis-Ruth, 2003).

2.6.3 Inhibitorji proteaz

Proteaze so vključene v številne pomembne znotrajcelične in zunajcelične procese. Encimi, ki razgrajujejo proteine, so lahko potencialno škodljivi, zato mora biti njihovo delovanje uravnano. Obstaja več različnih mehanizmov za uravnavanje prekomerne proteolitične aktivnosti. Med pomembnejše regulatorje proteolitične aktivnosti encimov uvrščamo interakcije encimov s proteini, ki jih inhibirajo. Proteazni inhibitorji tvorijo kompleks s tarčnimi proteazami in jih lahko inaktivirajo (Rawlings in Berrett, 1993). Med pomembnimi mehanizmi uravnavanja encimske aktivnosti so še: regulacija encimske aktivnosti z delno proteolizo neaktivnih prekurzorjev, z lokalizacijo proteaz, s posttranslacijskimi modifikacijami in s spremembami pH (Turk in sod., 1997).

Inhibitorji proteaz so prisotni v rastlinskih in živalskih tkivih, mikroorganizmih, glivah in praživalih. Lahko se nahajajo zunajcelično ali znotrajcelično. Večina endogenih inhibitorjev je kompetitivnih, kar pomeni, da se v aktivno mesto vežejo reverzibilno ter zmanjšajo ali preprečijo razgradnjo substrata. Del molekule inhibitorja, ki predstavlja reaktivno mesto in se poveže z encimom, se prilega aktivnemu mestu encima in se zato specifično in reverzibilno veže na encim. Kompleks encim – inhibitor je dodatno stabiliziran s številnimi vodikovimi, ionskimi in hidrofobnimi interakcijami in le počasi disociira (Barret, 1986; Bode in Huber, 1991).

Inhibitorje lahko razdelimo po reakcijskem mehanizmu, izvoru in strukturni podobnosti. Leta 1980 sta Laskowski in Kato delila inhibitorje glede na tip proteaz, ki jih inhibirajo na: inhibitorje serinskih proteaz, inhibitorje cisteinskih proteaz, inhibitorje aspartatnih proteaz in inhibitorje metaloproteaz (Laskowski in Kato, 1980). Vendar nekateri inhibitorji interagirajo tudi z različnimi tipi proteaz.

Salvesen in Nagase sta leta 1989 predlagala delitev proteaznih inhibitorjev glede na specifičnost. Razdelila sta jih na tri razrede: inhibitorje, ki reagirajo z več kot enim tipom proteaz, inhibitorje specifične le za en tip proteaz in inhibitorje, ki so visokoselektivni le za en encim (Laskowski in Kato, 1980; Salvesen in Nagase, 1989).

S povečanjem števila odkritij na področju inhibitorjev proteaz so v bazi podatkov MEROPS, ki je v začetku vsebovala samo proteaze dodali novo bazo, ki temelji na enotni klasifikaciji proteaznih inhibitorjev. V sistemu MEROPS so inhibitorne enote proteaznih inhibitorjev dodeljene v družine na osnovi podrobnosti aminokislinski zaporedij in nato na osnovi 3D struktur v 26 klanov (Rawlings in sod., 2009).

Za inhibitorje serinskih proteaz, ki so najštevilčnejši, so potrdili vlogo obrambnih snovi. Ti proteini so prisotni v majhnih količinah, ustreznih za zaščito pred plenilci. Vsi rastlinski inhibitorji serinskih proteaz so kompetitivni inhibitorji in delujejo po podobnem mehanizmu. Po Laskowskem jih delimo v 13 družin.

Inhibitorje cisteinskih proteaz so izolirali iz riža, avokada, papaje, limskega fižola, ambrozije in krompirja (Lawrence in Koudal, 2002). Delimo jih na endogene in eksogene inhibitorje. Slednje lahko delimo na kovalentne in nekovalentne inhibitorje, kovalentni pa se še naprej delijo na reverzibilne in ireverzibilne. Najbolj raziskan med irevezibilnimi inhibitorji so epoksisukcinilni inhibitorji, ki so se razvili iz naravnega inhibitorja trans-epoksi sukcinil-L-levcilamido-(4-gvanizino)-butan (E-64), ki so ga izolirali iz plesni *Aspergillus japonicus*. E-64 je splošni ireverzibilni inhibitor cisteinskih proteaz, ki se veže v aktivno mesto v nasprotni smeri kot se veže substrat (Ren in sod., 1996). Iz krompirja so izolirali tudi inhibitorje aspartatnih proteaz. Rastline so razvile vsaj dve družini metaloproteaz, ki so jih izolirali iz paradižnika in krompirja (Lawrence in Koudal, 2002).

Pyrzyna in sodelavci so dokazovali fenilalanin aminopeptidaze v tri tednu starem grahu, kjer so kot inhibitorje cisteinskih proteaz uporabili poliheksameten bigvanid hidroklorid (pHMB) in E-64 in inhibitorje serinskih proteaz, diizopropilfluorofosfat (DFP) in fenilmethylsulfonyl-fluoride (PMSF) (Pyrzyna in sod., 2010). Prav tako pa so Szawłowska in sodelavci dokazovali prolil aminopeptidaze v tri dni starih poganjkih sadik tritikala (križanica med pšenico in ržo) in so kot inhibitorje serinskih proteaz uporabljali DFP in PMSF (Szawłowska in sod., 2011). Različne inhibitorje proteolitičnih encimov se lahko dodaja v ekstrakcijske pufre, da na ta način preprečimo proteolitično aktivnost in poškodbe proteinov, ki jih želimo izolirati (Müllertz, 1974).

Poleg sintetičnega inhibitorja E-64, na aktivnost encimov, ki imajo v aktivnem mestu cistein vpliva tudi jodoacetamid, ki se kovalentno poveže s SH skupino cisteina in na ta način inhibira aktivnost cisteinskih proteaz (Manoj, 2007). Pogostokrat se med homogenizacijo SH skupina cisteina, ki je v aktivnem mestu encima, delno oksidira. Za polno aktivnost cisteinskih proteaz je potrebno v izolacijski pufer ter v medij v katerem poteka določevanje encimske aktivnosti dodati reducente kot so 2-merkaptoetanol, glutation, ditiotreitol ali ditioeritriol (Cleland, 1964).

Na aktivnost proteolitičnih encimov, ki imajo v aktivnem mestu vezane dvovalentne kovinske ione lahko vplivamo s kelatorji kot so EDTA in 1,10-fenantrolin (Laeeremans in sod., 2005). Zaradi močnih kompleksov, ki jih tvorijo s kovinami, se poveča delež proteolitičnih encimov brez kovinskih kofaktorjev. Takšni encimi posledično niso aktivni.

2.7 CIMOGRAFIJA

Cimografija je preprosta in občutljiva dvostopenjska tehnika za ločevanje in identifikacijo encimov v encimsko aktivnih bioloških vzorcih, ki je bila uvedena pred več kot 20 leti (Heussen in Dowdle, 1980). Vključuje ločevanje proteinov z elektroforezo, ki ji sledi analiza encimskih aktivnosti v gelu. Prednost cimografije pred ostalimi elektroforetskimi analizami je, da lahko po separaciji identificiramo proteine, ki imajo encimsko aktivnost na substrat vključen v gel. Metoda je primerna za identifikacijo in spremeljanje encimskih aktivnosti v kompleksnih bioloških in kliničnih vzorcih ter načrtovanju čiščenju oz. izolacije encimov (Kaberdin in McDowall, 2003).

2.7.1 Cimografija s proteinskimi substrati

Opisanih je več postopkov za zaznavo proteolitičnih encimov po gelski elektroforezi. Proteine v ekstraktu ločimo na poliakrilmidnem gelu pod nativnimi ali denaturirajočimi pogoji, kjer nato pod kontroliranimi pogoji hidrolizirajo proteinski ali sintetični substrat. Če ločene proteaze med elektroforezo ohranijo katalitično aktivnost, jih lahko zaznamo z ustreznim postopkom, ki temelji na barvanju proteinov ali bolj specifičnih reakcijah. Metode gelske elektroforeze za preučevanje proteolitičnih encimov lahko razdelimo na dve skupini: pri prvi proteaze zaznamo in situ po elektroforezi, pri drugi jih zaznamo po prenosu z gela na gel s substratom ali na nitrocelulozno membrano. Metode lahko razdelimo tudi glede na vrsto uporabljenega substrata, ki je odvisna od količine informacij o vzorcu, stopnje specifičnosti, potrebe med encimsko analizo, in posebnih ciljev, ki jih želimo doseči. Na voljo so številni postopki za elektroforetsko analizo proteaz z uporabo proteinskih substratov. V večini primerov gre za ločevanje proteaz na NaDS-poliakrikamidnem gelu z vključenim proteinskim substratom. Po migraciji proteine renaturiramo z odstranitvijo NaDS iz gela in proteazam omogočimo hidrolizo proteina v gelu, ki je potopljen v ustrezni aktivacijski pufer. Po barvanju proteinov vidimo na gelu, kjer je potekla proteoliza, svetle lise na temnem ozadju (Michaud, 1998).

Poceni in komercialno dostopni proteini kot so želatina, kazein, goveji serumski albumin ali hemoglobin so najpogostejsi substrati za zaznavo elektroforetsko ločenih proteaz. Ločene proteaze lahko detektiramo tudi tako, da po prenosu hidrolizirajo substrat v novem matriksu (če je protein vključen v indikatorski gel ali fiksiran na trdo membrano). Čeprav proteina, kot sta želatina in kazein nista naravna substrata za večino proteaz, sta uporabna za elektroforetsko karakterizacijo proteolitičnih encimov v velikem številu bioloških vzorcev (Michaud, 1998; Frederiks in Mook, 2004).

Najbolj razširjen postopek za zaznavo proteaz je postopek poliakrilamidne gelske elektroforeze (PAGE) z želatino. Ta tehnika je enostavna, občutljiva ter uporabna za preučevanje različnih proteolitičnih sistemov v številnih bioloških procesih. Želatino hidrolizirajo številne proteaze in proteolitični vzorci so običajno zelo ponovljivi (Kleiner in Stetlerstevenson, 1994; Leber in Balkwill, 1997), mogoč pa je tudi razvoj specifičnih standardov uporabnih za kalibracijo (Makowski in Ramsby, 1996).

PAGE z želatino pa ima, kljub uporabnosti pri proučevanju različnih bioloških procesov, določene omejitve. Po dodatku NaDS nekateri encimi in proteaze izgubijo aktivnost, sistem je v prvi vrsti prilagojen zaznavi endopeptidaz in, kljub temu da želatino hidrolizirajo številne med njimi, jo nekatere endopeptidaze v surovih ekstraktih ne prepoznajo kot substrat (Michaud in Asselin, 1995). Prav tako je določitev molekulske mase proteaz vprašljiva, saj vključitev želatine v poliakrilamidne gele zmanjša hitrost migracije za 15 do 20 %. Poleg tega se želatina med elektroforeznim potovanjem različno veže na očiščene proteaze in na proteaze v kompleksnih ekstraktih (Hummel in sod., 1996), zaradi česar lahko nastanejo na ozadju gela sledi hidrolize in lahko precenimo število proteaznih oblik. Da bi se temu izognili, lahko substrat vključimo v gel z difuzijo po nereducirajoči NaDS-PAGE, s čimer preprečimo interakcije proteaz-protein med potovanjem in lažje ocenimo molekulsko maso proteaz (Garciacarreno in sod., 1993).

2.7.2 Cimografija s sintetičnimi substrati

Sintetični substrati so zelo uporabni za zaznavo specifičnih tipov proteaz in za ugotavljanje njihovih karakteristik. Običajno so substrati sintetizirani s fuzijo specifičnih substituentov na amino- ali karboksi- skupino aminokislinske verige. Sintetične substrate lahko glede na položaj substituenta razdelimo na dve skupini: endoproteazni substrati, kjer sta amino- in karboksi- konec blokirana in nista na voljo eksoproteazam, ter eksoproteazi substrati, pri katerih je en konec blokiran; karboksi- konec za aminopeptidaze in amino- konec za karboksipeptidaze.

Najpogostejsi substrati, dodani za blokado amino- konca so benzoilna (Bz), benzoiloksikarbonilna (Z), acetilna (Ac), sukcinilna (Suc), O-aminobenzoilna (ABz) in furilakriloilna (Fa) funkcionalna skupina.

Na karboksi- konec so dodane skupine, ki dajo substratu večinoma kromogene ali fluorogene lastnosti. Najpogostejsi med kromogenimi substituenti je 4-nitroanilid (pNA), med fluorogenimi substituenti pa 7-amino-4-metilkumarin (AMC). Substituent, ki je lahko kromogen ali fluorogen, odvisno od postopka, ki ga uporabljam za zaznavo aktivnosti je 2-naftilamid (β NA) (Gotar, 2009).

Za proučevanje proteaz, posebno endo- in aminopeptidaz, po gelski elektroforezi je na voljo veliko sintetičnih substratov. Nekateri substrati so relativno nespecifični in omogočajo zaznavo proteaz le na nivoju družine, medtem ko drugi omogočajo zaznavo specifičnih proteaz in so uporabni pri spremljanju določenih vrst proteaz v ekstraktih (Weder in Kaiser, 1995).

Zaradi raznolikosti proteolitičnih encimov v živih celicah in velikega števila nekarakteriziranih proteaz je potrebno proteazno specifičnost za substrat potrditi za vsak biološki sistem posebej (Michaud, 1998).

Pri proučevanju aminopeptidaz so večino raziskav naredili na levcinskih aminopeptidazah iz živalskih in rastlinskih tkiv (Matsui in sod., 2006). Sprva so za substrat uporabljali aminokisline, označene z β -naftilaminom, vendar so jih kasneje zaradi toksičnosti

zamenjali z aminokislinami, označenimi s 4-nitroanilidi (Hou in sod., 1999; Božić in Vujačić, 2005). Pri obeh tehnikah je potrebno nadaljnje procesiranje za zaznavo aminopeptidaz, zaradi česar pride do irreverzibilne izgube encimske aktivnosti. Redko so uporabili tudi aminokisline, označene z AMC, pri katerih se po hidrolizi amidne vezi sprosti fluorescentni AMC (Konopka in Zakharova, 2002). Takšni substrati so občutljivejši in omogočajo neposredno analizo brez fiksacije produkta. Budič in sod. (2009) so metodo podrobno razdelali za določanje aminopeptidaz in optimizirali pogoje, pod katerimi se cimografija lahko uporabi za kvantitativno določanje AP v ekstraktih. Ker substrat dodamo po elektroforezi, lahko isti gel analiziramo z različnimi substrati. S sintetičnimi substrati lahko po elektroforezi zaznamo specifične skupine proteaz v surovih in slabo karakteriziranih ekstraktih, hitro določimo njihovo specifičnost za substrat, učinkovito zaznamo eksopeptidaze in se izognemo motnjam, ki jih substrat povzroča med samo elektroforezo (Budič in sod., 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Izbor rastlinskega materiala

Različne rastline imajo različno aminopeptidazno aktivnost. Da smo naredili ožji izbor, smo izvajali nativno elektroforezo na kalčkih različnih rastlin. Tako smo uporabili kalčke fižola, soje, čičerike, pire, leče, pšenice, lucerne, ječmena, boba, graha in vigne. V ožji izbor za nadaljnje analize smo izbrali fižol češnjevec, lečo, lucerno.

Preglednica 4: Uporabljene rastline

	VRSTA	SORTA/KULTIVAR	PROIZVAJALEC
Fižol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Češnjevec	Semenarna Ljubljana
Soja	<i>Glycine max</i>	Rumena*	Kalček d.o.o.
Čičerika	<i>Cicer arietinum</i>	Evropski kultivar*	Kalček d.o.o.
Pira	<i>Triticum spelta</i>	Neznano*	Žito d.d.
Leča	<i>Lens culinaris</i>	Zelena*	Žito d.d.
Pšenica	<i>Triticum spp.</i>	Neznano*	Žito d.d.
Lucerna	<i>Medicago sativa</i>	Kultivar za nakaljevanje semen*	GEO-bavicchi (Kalček d.o.o.)
Ječmen	<i>Hordeum vulgare</i>	Neznano*	Žito d.d.
Bob	<i>Vicia faba</i>	Aquadulce	Semenarna Ljubljana
Grah	<i>Pisum sativum</i>	Kelvedon Wondeer	Semenarna Ljubljana
Vigna	<i>Vigna unguiculata</i>	Sesquipedalis	Semenarna Ljubljana

*Sorta/kultivar nista definirana

3.1.2 Spojine

Preglednica 5: Uporabljene spojine in njihovi proizvajalci

Spojine	Proizvajalec
β-merkatoetanol	Sigma, ZDA
10 % APS: amonijev persulfat	Sigma, ZDA
DTT: ditiotreitol	Sigma, ZDA
Glicerol	Carlo Erba, Italija
BSA: goveji serumski albumin	Sigma, ZDA
PVP: polivinilpirolidon X-100	Sigma, ZDA
reagent Bio-Rad	Bio Rad, ZDA
TEMED: N,N,N',N'- Tetrametil-etenenediamin	Sigma, ZDA
Tris: Tris-hidroksimetil - aminometan	Merck, Nemčija
PHE-AMC: L-Fenilalanin 7-amido-4-metilkumarin	Biosynth, Švica
N-α- benzoyl-ARG-AMC: N-alfa-CBZ-L-Arginin 7-amido-4-metilkumarin hidroklorid	Biosynth, Švica
GLU-AMC: L-Glutaminska kislina alfa-(7-amido-4-metilkumarin)	Biosynth, Švica
GLY-AMC: Glicin 7-amido-4-metilkumarin hidrobromid	Biosynth, Švica
TRP-AMC: L-Tryptofan 7-amido-4-metilkumarin hidroklorid	Biosynth, Švica
ALA-AMC: L-Alanin 7-amido-4-metilkumarin	Biosynth, Švica
MET-AMC: L- Metionin 7-amido-4-metilkumarin	Biosynth, Švica
LYS-AMC: L-Lizin 7-amido-4-metilkumarin	Biosynth, Švica
DMSO: Dimetilsulfoksid	Merck, Nemčija
PMSF Fenilmetansulfonil flourid	Sigma, ZDA
Tekoč dušik	Messer griesheim APOLLO
37 % klorovodikova kislina	Merck, Nemčija
Glicin	Merck, Nemčija
Akrilamid/ bisakrilamid (37,5:1)	Roth, Nemčija
Milli-Q voda	
Etanol	Merck, Nemčija
Bromfenolmodro	Sigma, ZDA
Simply Blue™	Invitrogen
NaDS: natrijev dodecil sulfat	Sigma, ZDA
Proteinski standardi za NaDS elektroforezo; Pierce 3-Color Prestained Protein MW Marker	Thermo Scientific
IA: jodoacetamid	Sigma, ZDA

3.1.3 Raztopine

3.1.3.1 Priprava pufrov

3.1.3.1.1 Pufri za ekstrakcijo proteinov

- Priprava 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 brez reducenta:

Pripravili smo ga iz 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 (Priprava opisana v točki 3.1.3.1.2)

- Priprava 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 z reducentom

V 10 ml 50 mM Tris-HCl smo dodali 7 µl reducenta β-merkaptetoanola.

3.1.3.1.2 Pufri za testiranje encimske aktivnosti s cimografijo

- a) Priprava 250 mM Tris-HCl, pH 7,0:

Zatehtali smo 15,14 g topnjence Tris in ga raztopili v 350 ml milli-Q vode. S pH-metrom smo uravnali pH raztopine na 7,0 s HCl in nato z Milli-Q- vodo dopolnili do 500 ml.

- b) Priprava 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 5 mM DTT

V 30 ml 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 smo dodali 0,3 ml 500 mM DTT raztopljenega v Milli-Q vodi.

- c) Priprava 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 24 mM IA

V 30 ml 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 smo dodali 1,5 ml 500 mM IA.

- d) Priprava 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 5 mM DTT

V 60 ml 50 mM Tris-HCl smo dodali 0,6 ml 500 mM DTT raztopljen v Milli-Q vodi.

- e) Priprava 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 1 mM PMSF

V 60 ml 50 mM Tris-HCl smo dodali 0,6 ml 100 mM PMSF raztopljen v etanolu.

- f) Priprava 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 + etanol

V 60 ml 50 mM Tris-HCl smo dodali 0,6 ml etanola.

- g) Priprava 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 5 mM PMSF

V 60 ml 50 mM Tris-HCl smo dodali 1,2 ml 250 mM PMSF raztopljen v DMSO.

- h) Priprava 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 2 % DMSO

V 60 ml 50 mM Tris-HCl smo dodali 1,2 ml 100 % DMSO.

i) Priprava 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 5 mM CaCl₂.

V 30 ml 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 smo dodali 0,5 ml 300 mM CaCl₂.

j) Priprava 250mM Tris-HCl, pH 7,0 + 0,1 mM ZnCl₂.

V 30 ml 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 smo dodali 0,5 ml 6 mM ZnCl₂.

k) Priprava 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 5 mM EDTA

V 30 ml 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 smo dodali 0,3 ml 500 mM EDTA.

3.1.3.1.3 Pufra za pripravo gelov

- Priprava pufra za ločevalni gel: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8:

Zatehtali smo 18,17 g topljenca Tris in ga raztopili v 350 ml Milli-Q vode. Na pH-metru smo uravnali pH raztopine na 8,8 s HCl in nato z Milli-Q- vodo dopolnili do 500 ml.

- Priprava pufra za zbiralni gel: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8:

Zatehtali smo 6,06 g topljenca Tris in ga raztopili v 350 ml Milli-Q vode. S pH-metrom smo uravnali pH raztopine na 6,8 s HCl in nato z Milli-Q- vodo dopolnili do 500 ml.

3.1.3.1.4 Pufra za elektroforezo

- Priprava 1x elektroforeznega pufra:

Pripravili smo 10x elektroforezni pufer tako, da smo raztopili 30,30 g Tris, 144 g glicin in do 1000 ml dopolnili z Milli-Q vodo. 1x elektroforezni pufer smo pripravili iz 10x elektroforeznega pufra tako, da smo le-tega razredčili z Milli-Q vodo v volumskem razmerju 1:9.

- Priprava 1x NaDS elektroforeznega pufra:

Pripravili smo 10x elektroforezni pufer tako, da smo raztopili 30,30 g Tris, 144 g glicin, 10 g 10 % (w/v) NaDS in do 1000 ml dopolnili z Milli-Q vodo. 1x NaDS elektroforezni pufer smo pripravili iz 10x NaDS elektroforeznega pufra tako, da smo le-tega razredčili z Milli-Q vodo v volumskem razmerju 1:9.

3.1.3.1.5 Nanašalna pufra za elektroforezo

- Priprava nanašalnega pufra za nativno elektroforezo:

5,55 ml Milli-Q vode
1,25 ml 0,5M Tris-HCl, pH 6,8
2,5 ml glicerola
0,2 ml 0,5 % (w/v) bromfenol modro

- Priprava nanašalnega pufra za NaDS-elektroforezo:

5,55 ml Milli-Q vode
1,25 ml 0,5M Tris-HCl, pH 6,8
2,5 ml glicerola
0,2 ml 0,5 % (w/v) bromfenol modro
2,0 ml 10 % (w/v) NaDS

3.1.3.2 Fluorogeni substrati

3.1.3.2.1 Priprava fluorogenih substratov in raztopin za analizo aminopeptidazne aktivnosti s cimografijo

Preglednica 6: Fluorogeni substrati (proizvajalec Biosynth) za cimografijo in njihove molske mase v g/mol

Substrat	Molska masa (g/mol)
PHE-AMC	436,38
N- α - benzoyl-Arg-AMC	658,15
GLU-AMC	304,30
GLY-AMC	313,15
TRP-AMC	397,86
ALA-AMC	360,29
MET-AMC	420,40
LYS-AMC	363,40

Vse fluorogene substrate smo pripravljali tako, da smo jih raztopili v 100 % DMSO do koncentracije 100 mM. Tako pripravljene raztopine fluorogenih substratov smo do uporabe shranili na – 20 °C.

V pufre, katerih priprava je opisana pod točko 3.1.3.1.2, smo dodali fluorogene substrate raztopljene v DMSO, da je bila njihova končna koncentracija 0,1 mM.

Za analizo aminopeptidazne aktivnosti smo dodali v raztopine posamezne substrate ali zmes substratov.

Različice raztopine, ki smo jih uporabljali za analize aminopeptidazne aktivnosti:

- a) V 30 ml ustreznega pufra (točka 3.1.3.1.2) smo dodali 0,030 ml 100 mM posameznega fluorogenega substrata (preglednica 6), da je bila njihova končna koncentracija 0,10 mM.

- b) V 30 ml ustreznega pufra (točka 3.1.3.1.2) smo dodali 100 mM: 0,015 ml PHE-AMC; 0,015 ml LYS-AMC; 0,015 ml ALA-AMC, da smo dobili mešanico fluorogenih substratov. Končna koncentracija vsakega od aminopeptidaznih substratov v mešanici je bila 0,05 mM.
- c) V 30 ml ustreznega pufra (točka 3.1.3.1.2) smo, poleg mešanice substratov iz točke b, dodali še 0,030 ml 100 mM N- α -benzoyl-Arg-AMC, do končne koncentracije 0,10 mM.

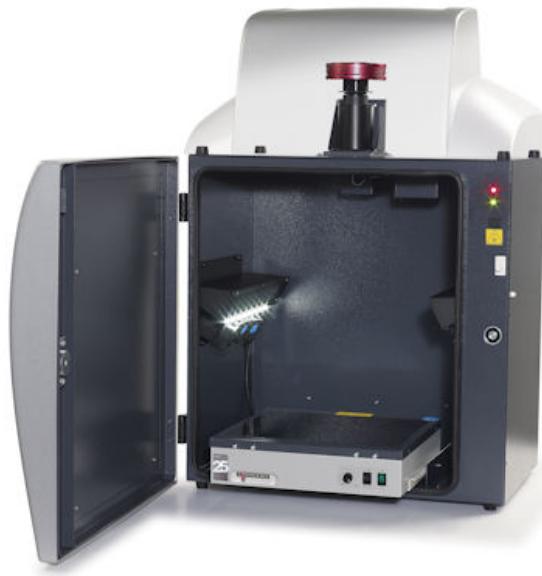
3.1.4 Aparature

3.1.4.1 Elektroforezni sistem

Elektroforezo smo izvajali z aparaturom proizvajalca Mini-Protean 3, proizvajalca Bio-Rad.

3.1.4.2 Kamera za slikanje in dokumentiranje gelov

Uporabljali smo kamero CAM-GX-CHEMI HR sistem, proizvajalca Syngene v Laboratoriju za proteomiko na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil.



Slika 3: Kamera CAM-GX-CHEMI HR system, proizvajalec Syngene
(Syngene, 2011)

3.1.4.3 Spektrofotometer

Za določanje koncentracije proteinov smo uporabljali spektrofotometer znamke Hewlett packard, ZDA model 8453 in polistirenske kivete širine 1 cm.

3.1.4.4 Druge aparature in ostali laboratorijski pribor

Aparature: centrifuga, grelna kuhalna plošča, hladilnik, skrinja, stresalnik, mešalo, pH-meter, tehtnica, sušilnik.

Laboratorijski pribor: mikrocentrifugirke, epruvete, pipete, terilnica, pestič, erlenmajerica, čaša, bučka, centrifugirke.

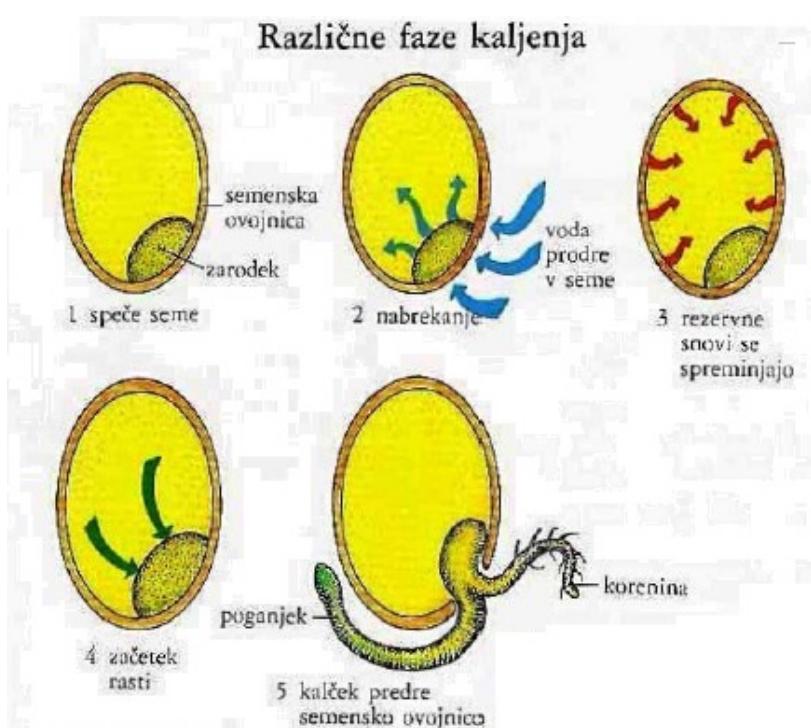
3.2 METODE

3.2.1 Izvedba procesa kaljenja

Poznamo različne vrste kaljenja: kaljenje v kozarcih za vlaganje, kaljenje v skledi ali plastičnem cedilu, kaljenje v zračenem valju, kaljenje v kalilnikih, kaljenje na pladnju, kombinirano kaljenje v kozarcu in na pladnju, kaljenje na splavu, kaljenje v lončenih podstavkih, kaljenje na brisači, prosto improvisirano kaljenje, kaljenje pod obtežitvijo (Cortese, 2009).

Sami smo se odločili za kaljenje v skledi ali plastičnem cedilu. Vsa uporabljena semena smo preko noči (približno 10 ur) namočili v vodovodni vodi. Odcejena semena smo pretresli na perforiran PVC (polivinil klorid) krožnik. Luknjice, ki smo jih naredili s šilom, so omogočale odtekanje vode. Krožnik s semenami smo prenesli na košček vpojne pomivalke, položen na drug plastičen krožnik.

Krožnike s semenami smo pokrili z listi papirja in tako upočasnili izhlapevanje. Kalitev semen je potekala pri sobni temperaturi (20-22 °C). Na vsakih 8 ur smo kaleča semena spirali z večjo količino vodovodne vode, da bi se izognili bakterijski okužbi in izsušitvi semen. Kalčke smo vzorčili po dveh do treh dneh od takrat, ko smo končali z namakanjem.



Slika 4: Različne faze kaljenja (Fink, 1993)

3.2.2 Vzorčenje

Po končani kalitvi smo kalčke vzorčili. Za različne analize smo uporabili celotne kalčke, ali posamezne dele kalčkov.

Pri ločenem vzorčenju smo kalček razdelili na dva dela. Ločeno smo zbirali dele kalčka, ki so prebili semensko ovojnico (poganjek in korenina) ter dele kalčka, ki so ostali znotraj semenske ovojnice (klični list in endosperm). Vzorčili smo v paralelkah.

3.2.3 Homogenizacija rastlinskega materiala in priprava ekstraktov

S homogenizacijo in pripravo ekstraktov želimo izločiti iz celice ali celičnih komponent proteine v topni obliki.

Postopek priprave ekstraktov:

V terilnico smo nalili tekočega dušika in vanjo stresli stehtane vzorce (približno 0,3 g). Vzorce smo štirikrat prelili s tekočem dušikom in jih trli s pestičem, da smo dobili fin prah. Prahu smo dodali 0,2 g polivinilpirolidona (PVP) in vse skupaj premešali. Nato smo na vzorec prelili samo ohlajen ekstrakcijski pufer 50 mM Tris-HCl, pH=7,0 (razmerje: 1 g rastlinskega materiala : 5 ml 50 mM Tris HCl s pH =7,0) ali pa smo le temu dodali še reducent β -merkaptoetanola (7 μ l β -merkaptoetanola/10 ml 50 mM pufra). Suspenzijo smo premešali in jo 1 ml odpipetirali v centrifugirke in centrifugirali 15 min na 13200 g v

centrifugi, ohlajeni na 4 °C. Po centrifugiraju smo supernatant ločili od usedline in naredili paralelke za nadaljnjo uporabo. Zamrznili smo jih v tekočem dušiku in jih shranili na -80 °C.

3.2.4 Cimografija

Cimografija je metoda, ki jo izvedemo v dveh korakih. Vključuje ločevanje proteinov z elektroforezo, nato sledi analiza encimskih aktivnosti v gelu. Je učinkovita metoda za ločevanje in detekcijo encimov v encimsko aktivnih bioloških vzorcev (Kaberdin in McDowall, 2003).

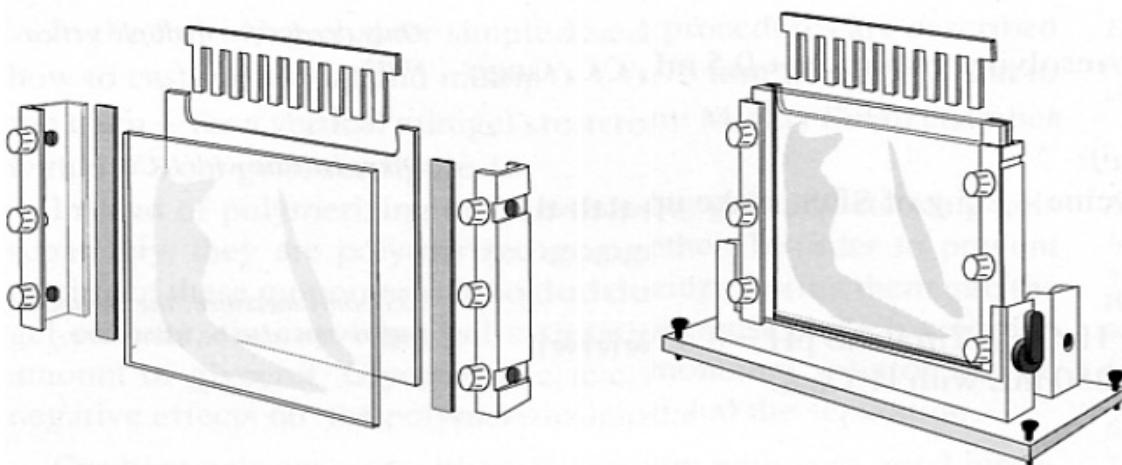
3.2.4.1 Priprava gelov za nativno elektroforezo

Z etanolom smo dobro obrisali stekelca in jih vpeli na nosilce za vlivanje gelov. V 50 ml centrifugirki smo najprej pripravili raztopino za ločevalni gel (preglednica 7), dobro premešali in ga s pipeto po robu med obema stekelcema počasi ulivali do primerne višine plošč. Na vrh ulitega ločevalnega gela smo dolili mili Q vodo, da se je izravnala linija gela in da se gel ni osušil in popokal. Nosilce in stekelca skupaj smo pokrili z aluminijasto folijo in pustili na sobni temperaturi 1 uro.

Po eni uri smo odlili vodo med stekelcema. Nato smo si pripravili mešanico za zbiralni gel (preglednica 7), zopet dobro premešali in vlili do vrha stekelc nad ločevalni gel. V zbiralni gel smo takoj namestili glavnice in pazili, da se pod zobec glavnička niso ujeli mehurčki zraka. Počakali smo vsaj 1,5 h, da je gel polimeriziral.

Preglednica 7: Spojine za pripravo gelov za nativno elektroforezo

Spojine	4 % ZBIRALNI GEL	8 % LOČEVALNI GEL
	Pufer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	Pufer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Mili Q voda	6,2 ml	4,8 ml
Pufer	2,5 ml	2,5 ml
Akrilamid/bisakrilamid (37,5:1)	1,3 ml	2,7 ml
10 % (w/v) APS	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,001 ml	0,005 ml



Slika 5: Način vpenjanja dveh stekelc za vlivanje gelčkov na nosilec in vstavitev glavnička ob dodatku zbiralnega gela (Gotar, 2009).

3.2.4.2 Nativna elektroforeza

Ko so geli polimerizirali, smo odstranili glavničke in v prazne žepke nanesli 1x nativni elektroforezni pufer. Vzorce smo odtalili in zmešali z nanašalnim pufrom (točka 3.1.3.1.5) v razmerju 1:1. Vzorce smo nato nanašali v žepke za nanos vzorca na vrhu gela. Po končanem nanosu smo v elektroforetsko posodo nalili 1x elektroforezni pufer s pH = 8,3, pri katerem je večina proteinov negativno nabita in potujejo proti anodi. Celotno kadičko smo potopili v led in elektrodi priklopili na vir napetosti približno 200 V in na konstanten tok 25 mA/gel.

V električnem polju vsak protein potuje z njemu lastno elektroforetsko mobilnostjo, vendar počasneje od nanašalnega pufra z barvilom bromfenol modro, saj nam le-ta kaže fronto in pomaga ugotoviti kdaj proteini končajo potovanje po gelu in s tem nam naznani, kdaj lahko zaključimo z elektroforezo. Ponavadi je nanašalni pufer zapustil gel po 30 minutah, elektroforezo pa smo prekinili 5 minut kasneje, da so se posamezne proteaze med seboj dovolj dobro ločile, kar nam je omogočilo lažjo analizo gela z računalniškim programom.

3.2.4.3 Analiza nativnih poliakrilamidnih gelov

Po izteku elektroforeze smo gel dali v kadičko s 30 ml 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 s 500 mM DTT in stresali na sobni temperaturi na stresalniku Labnet GYROTWISTER pri 50 obratih/minuto 10 minut.

Nato smo izvajali številna testiranja aminopeptidazne aktivnosti z različnimi pufri za testiranje encimske aktivnosti (točka 3.1.3.1.2) in fluorogenimi substrati, tako posameznimi kot tudi v mešanici le-teh (točka 3.1.3.2.1).

Vsa testiranja aminopeptidazne aktivnosti smo izvajali tako, da smo gel inkubirali s substratom 10 minut. Izvajali smo posamezno in zaporedno barvanje gelov. Pri zaporedni inkubaciji smo med analizami gel spirali 30 minut v Milli-Q vodi.

Po končani inkubaciji smo gel prenesli v UV trasiluminator in nastavili parametre zajemanja podatkov z CAM-GX-CHEMI HR sistemom.

Nastavitev:

- Eksitacija: EPI-long wave-UV
- Emisijski filter: Short wave band
- Resolucija zajemanja podatkov: 5,5 mega pikslov
- Zaslonka: 1.2
- Zoom: 12,6
- Fokus: 130
- Čas zajemanja podatkov: 5 sekund, 10 sekund, 20 sekund

Ostalih nastavitev med analizami nismo spremenjali. V nadaljnjih točkah so opisani podrobnejši postopki analiz.

3.2.4.3.1 Analiza aminopeptidazne aktivnosti s posameznimi fluorogenimi substrati v prisotnosti reducenta DTT

Za analizo substratne specifičnosti smo v pufer za testiranje encimske aktivnosti (točka 3.1.3.1.2 b) dodali posamezne fluorogene substrate raztopljene v DMSO kot je opisano v točki 3.1.3.2.1 a.

3.2.4.3.2 Analiza metaloproteaz z inhibitorjem EDTA in v prisotnosti Ca^{2+} in Zn^{2+} ionov

Za določanje metalo proteaz smo uporabljali različne pufre za testiranje encimske aktivnosti (točka 3.1.3.1.2 b, i, j, k) z reducentom 500 mM DTT in dodanimi fluorogenimi substrati (točka 3.1.3.2.1 b, c)

3.2.4.3.3 Analiza serinskih proteaz z inhibitorjem PMSF

Za določanje serinskih proteaz smo porabljali različnimi pufre za testiranje encimske aktivnosti (točka 3.1.3.1.2 d, e, f, g, h) in z dodanimi fluorogenimi substrati (točka 3.1.3.2.1 b, c).

Uporabljali smo dva načina analiz serinskih proteaz:

- 100 mM PMSF raztopljen v etanolu

Po končani elektroforezi smo gel spirali v pufru (točka 3.1.3.1.2 e) 30 minut. Nato smo gel inkubirali v raztopini: 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 in zmes fluorogenih substratov (točka 3.1.3.2.1 c), kateremu smo dodali 0,3 ml 100 mM PMSF raztopljenega v etanolu. Po 10 minut inkubiranja smo gel slikali in ga nato ponovno spirali v pufru (točka 3.1.3.1.2 d) 20 minut. Po preteklem času smo gel inkubirali v 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 in zmesi fluorogenih substratov (točka 3.1.3.2.1 c).

Vzporedno smo izvajali tudi kontrolo, pri katerem je postopek enak zgornjemu, le da smo uporabljali etanol brez PMSF.

- 250 mM PMSF raztopljen v DMSO

V tej točki smo izvajali dve različni analizi.

V prvem postopku smo postopali enako kot pri 100 mM PMSF raztopljenemu v etanolu, le da je DMSO zamenjal etanol.

V drugem postopku pa smo izvajali tako, da smo k vzorcem ekstrakta pred elektroforezo dodali 0,01 ml 250 mM PMSF raztopljen v 100 % DMSO v drugo paralelko, pa smo dodali samo 0,01 ml 100 % DMSO. Tako pripravljene vzorce ekstraktov smo nanesli na en gel, na drug gel pa ekstrakte z DMSO, ki so nam je služili kot kontrola. Pred začetkom nanašanja vzorcev na gele smo počakali 30 minut, da je potekla kovalentna vezava PMSF na serinske proteaze.

Po končani elektroforezi smo gele inkubirali v pufru (točka 3.1.3.1.2 a) z mešanico fluorogenih substratov (točka 3.1.3.2.1 c).

3.2.4.3.4 Analiza cisteinskih proteaz z aktivatorjem DTT in inhibitorjem IA

K vzorcem ekstrakta smo pred elektroforezo dodali 0,025 ml 500 mM IA, v drugo paralelko pa smo dodali samo 0,025 ml Milli-Q vode. Tako pripravljene vzorce ekstraktov smo nanesli na en gel, na drug gel pa ekstrakte z Milli-Q vodo, ki nam je služil kot kontrola. Pred začetkom nanašanja vzorcev na gele, smo počakali 30 minut, da se je IA kovalentno vezal na cisteinske aminokislinske preostanke.

Po končani elektroforezi smo gele inkubirali v pufru (točka 3.1.3.1.2 a) z mešanico fluorogenih substratov (točka 3.1.3.2.1 c). Po slijanju gela smo le-tega spirali 30 minut v Milli-Q vodi in ga ponovno inkubirali v pufru (točka 3.1.3.1.2 a) z mešanico fluorogenih substratom (točka 3.1.3.2.1 c) z dodatkom 500 mM DTT.

3.2.4.4 NaDS elektroforeza

Pri tej vrsti elektroforeze smo v 10x elektroforezni pufer dodali 10 % NaDS (5,0 g), prav tako smo 10 % NaDS dodali v raztopino za pripravo gelov (0,1 ml) in v pufer za nanos vzorca (2,0 ml).

Pri tej vrsti elektroforeze se proteini zaradi prisotnosti NaDS denaturirajo. Negativno nabiti proteini se v električno nabitem polju premikajo proti pozitivno nabiti anodi. Vsi proteini imajo zaradi NaDS enako razmerje naboj: masa, zato se na gelu ločijo po velikosti.

3.2.4.4.1 Priprava gelov za NaDS-elektroforezo

Pri pripravi gelov za to vrsto elektroforeze smo postopali isto kot pri pripravi gelov za nativno elektroforezo (postopek opisan v točki 3.2.4.1), s to razliko, da smo v 8 % ločevalni in 4 % zbiralni gel dodali še 0,1 ml 10 % (v/w) NaDS reagenta, ki je denaturant.

Preglednica 8: Spojine za pripravo gelov za NaDS-elektroforezo

Spojine	4 % ZBIRALNI GEL	8 % LOČEVALNI GEL
	Pufer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	Pufer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Mili Q voda	6,1 ml	4,7 ml
Pufer	2,5 ml	2,5 ml
Akrilamid/bisakrilamid (37,5:1)	1,3 ml	2,7 ml
10 % (w/v) NaDS	0,1ml	0,1ml
10 % APS	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,001 ml	0,005 ml

3.2.5 Določanje vsebnosti proteinov v celičnih ekstraktih po Bradfordovi metodi

Uporabili smo enostavno in natančno metodo za kvantitativno določanje proteinov z reagentom proizvajalca Bio-Rad. Metoda temelji na vezavi barvila Coomasie Brilliant Blue G-250 pri nizkem pH na bazične in aromatske aminokislinske ostanke proteinov v vzorcu, predvsem na arginin manj na lizin in histidin (Drobnič-Košorok, 1997). Pri tem pride do premika valovne dolžine absorpcijskega maksimuma barvila od 465 nm na 595 nm. Kompleks barvilo - protein, ki nastane med reakcijo, je obstojen le v določenem časovnem intervalu (30 minut), mi pa smo meritve naredili 10 minut po dodatku reagenta.

Postopek:

Najprej smo reagent Bio-Rad razredčili z Milli-Q vodo v volumskem razmerju 1:4. Nato smo tako razredčeno raztopino filtrirali.

Pripravili smo umeritveno krivuljo, s pomočjo katere določujemo koncentracijo proteinov v vzorcu (mg/ml). To smo naredili iz raztopin govejega serumskega albumina (BSA) s koncentracijami v območju 0,2-1,0 mg/ml. Pri izračunu vsebnosti proteinov v rastlinah, ki smo jih izrazili kot maso proteinov na suho snov rastlin, smo upoštevali način priprave ekstraktov (razredčitve).

Vzorce smo odmrznili in premešali na vrtinčniku. Za en vzorec smo potrebovali tri epruvete, v kateri smo najprej vzorec razredčili na petkratno razredčitev (0,5 ml vzorca + 2 ml 50 mM Tris-HCl-ekstrakcijski pufer) in premešali na vrtinčniku. Potem smo iz te epruvete po trikrat odpipetirali 0,025 ml razredčenega vzorca in dodali 1,25 ml razredčenega Bio-Rad reagenta ter vse skupaj dobro premešali na vrtinčniku. Po 10 minutah inkubacije na sobni temperaturi smo izmerili absorbanco pri 595 nm proti slepemu vzorcu, kjer je bila namesto ekstrakta destilirana voda.

3.2.6 Stabilnost shranjenih ekstraktov

Za preverjanje stabilnosti ekstraktov smo naredili poskus tako, da smo po ekstrahiranju kalčka in semena skupaj odpipetirali v mikrocentrifugirke 4 paralelke po 20 µl. Eno paralelko smo zamrznili na -80 °C, ta nam je služila za kontrolo. Drugo paralelko smo dali v skrinjo na -20 °C za 10 dni. Tretjo paralelko smo dali za 24 h v hladilnik. Četrto paralelko pa smo za 24 h dali na sobno temperaturo. Po 24-ih urah smo naredili nativno elektroforezo in opazovali ali se ekstraktom istih rastlin po shranjevanju na določeni temperaturi spreminja aminopeptidazna aktivnost.

3.2.7 Določanje vsebnosti vode

Vsebnost vode smo določali v kalčku, endospermu, kalčku in endospermu skupaj, listu in koreninah. Te dele rastlin smo zatehtali v predhodno stehtano mikrocentrifugirko z zamaškom. Tako smo določili maso svežih delov rastlin (s.m.). Nato smo odprli zamaške na mikrocentrifugirkah in jih dali sušit v sušilnik znamke Memmert na 105 °C za 3 h do konstantne mase. Po končanem sušenju smo mikrocentrifugirko ponovno stehtali, ter tako določili suho snov (s.s.). Vsebnost vode smo izračunali s pomočjo enačbe (1):

$$VV = \frac{s.m. - s.s.}{s.m.} \cdot 100\% \quad \dots (1)$$

VV: vsebnost vode

s.m.: mokra snov

s.s.: suha snov

3.2.8 Izpostavitev listov rastlin mehanskemu stresu

Za preverjanje vpliva stresa smo liste odraslih rastlin ranili s smirkovim papirjem dimenzijs P120. Rastline smo potem zalili in jih pustili rasti na sobni temperaturi. Po dveh dneh smo poškodovane liste vzorčili in analizirali na prisotnost aminopeptidaz. Pri lucerni je bilo zelo malo materiala, zato smo se odločili za ekstrakcijo direktno v mikrocentrifugirki, kjer je bil vzorec zatehtan. Tako smo tekoči dušik vlivali v mikrocentrifugirko in nato trli zmrznen material s stekleno palčko. Vsi nadaljnji postopki so enaki kot pri običajni ekstrakciji.

Vpliv stresa na aminopeptidazno aktivnost smo preverjali z nativno elektroforezo, prav tako smo proteine kvantitativno ovrednotili z določanjem po Bradfordu (postopek opisan v točki 3.2.5).

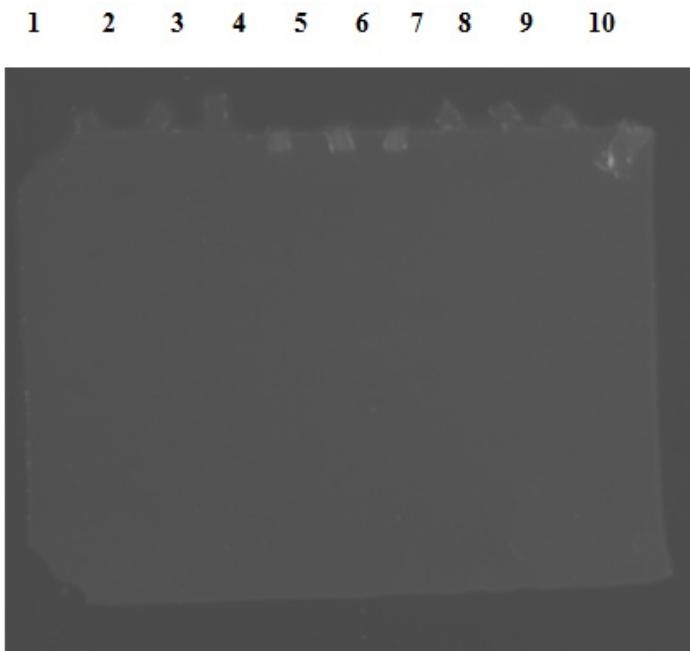
4 REZULTATI

Eksperimentalni del diplomske naloga je temeljil na študiji aminopeptidazne aktivnosti v ekstraktih pripravljenih iz kalčkov in listov rastlin s cimografijo. Dela smo se lotili tako, da smo aminopeptidazno aktivnost določali v različnih metuljnicah. Na osnovi pridobljenih rezultatov smo se odločili podrobnejše analizirati aminopeptidazno aktivnost fižola, leče in lucerne. Ovrednotenje aminopeptidazne aktivnosti smo izvajali s posameznimi substrati in mešanico substratov v izbranih delih kalčka ter v listih odrasle rastline. Za določitev katalitskega tipa aminopeptidaz smo uporabili različne inhibitorje in aktivatorje. Po Bradfordovi metodi smo določili koncentracijo proteinov v ekstraktih. Delo smo nadaljevali z določevanjem vpliva različnih temperaturnih pogojev shranjevanja na stabilnost aminopeptidaz v ekstraktih. Preverili smo tudi, kako povzročitev mehanskega stresa vpliva na določeno aminopeptidazno aktivnost.

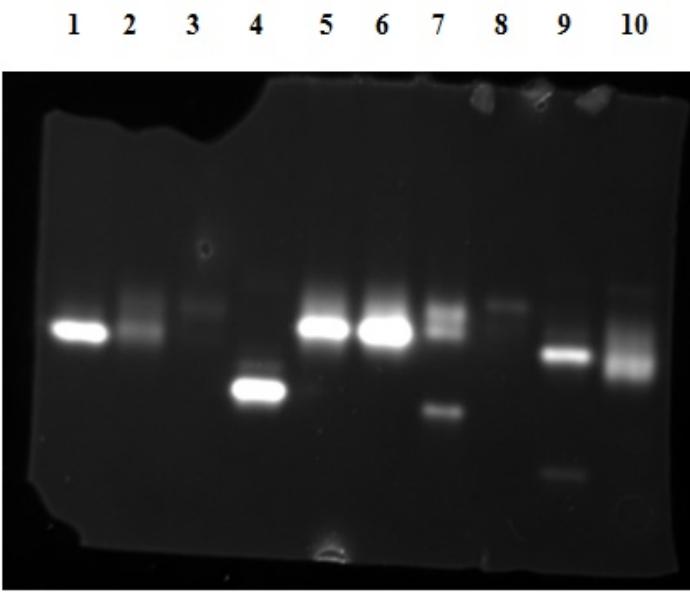
Cimografija, kot metoda določevanja encimske aktivnosti, je že dodobra uveljavljena. Kljub širokim možnostim, ki jih ponuja, je opisanih le nekaj primerov njene uporabe v fizioloških študijah in študijah karakterizacije encimov. Pričagoča diplomska naloga je eden od poskusov v smeri tovrstnih raziskav. Vsi rezultati cimografskih analiz v nalogi so tako zgolj kvalitativne narave in so zato rezultati podani kot število aminopeptidaz, ki smo jih določili pri posameznih pogojih.

4.1 PRELIMINARNA CIMOGRAFSKA ANALIZA AMINOPEPTIDAZNE AKTIVNOSTI V RAZLIČNIH METULJNICAH

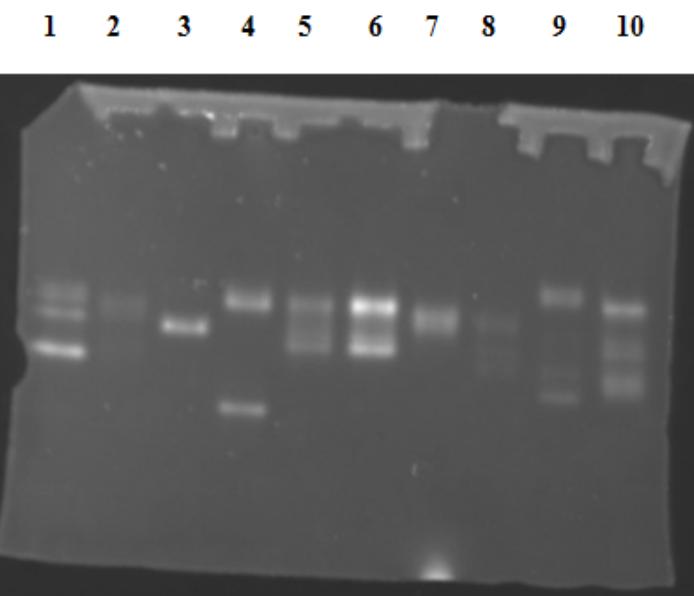
Začetek eksperimentalnega dela smo posvetili iskanju metuljnic (testirali smo tudi dve travi), ki bi jih uporabili za nadaljnjo analizo. Te rastline so bile leča, pira, bob, grah, čičerika, soja, oves, vigna in lucerna. Prav tako pa smo uporabili različne vrste substratov: Phe-AMC, Ala-AMC, Lys-AMC, Glu-AMC, N- α -benzoyl-Arg-AMC. V nadaljevanju so prikazani cimogrami teh analiz.



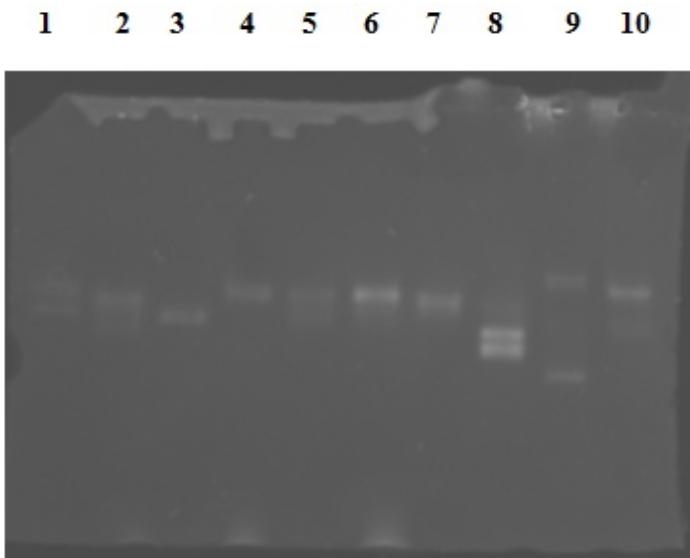
Slika 6: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Glu-AMC v ekstraktu poganjka in korenine kalčka vzorcev leče (1), pire (2), boba (3), graha (4), čičerike (5), soje (7), ovsa (8), vigne (9), lucerne (10) ter kličnega lista in endosperma vzorca čičerike (6).



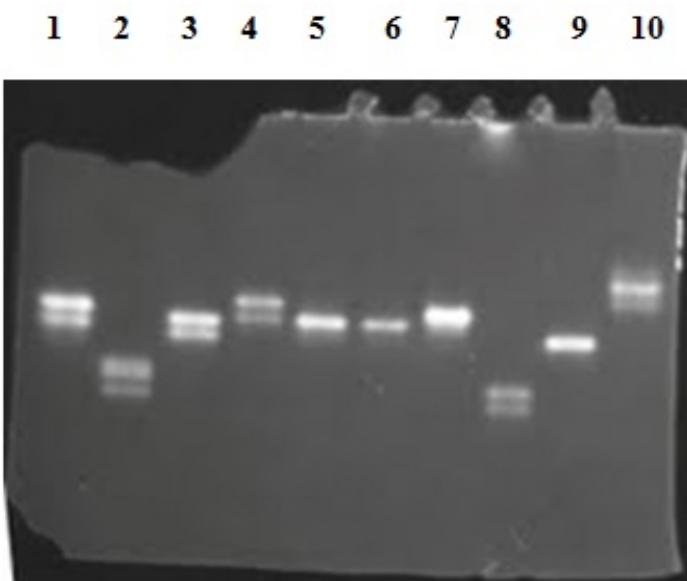
Slika 7: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Phe-AMC v ekstraktu poganjka in korenine kalčka vzorcev leče (1), pire (2), boba (3), graha (4), čičerike (5), soje (7), ovsa (8), vigne (9), lucerne (10) ter kličnega lista in endosperma vzorca čičerike (6).



Slika 8: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Ala-AMC v ekstraktu poganjka in korenine kalčka vzorcev leče (1), pire (2), boba (3), graha (4), čičerike (5), soje (7), ovsra (8), vigne (9), lucerne (10) ter kličnega lista in endosperma vzorca čičerike (6).



Slika 9: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Lys-AMC v ekstraktu poganjka in korenine kalčka vzorcev leče (1), pire (2), boba (3), graha (4), čičerike (5), soje (7), ovsra (8), vigne (9), lucerne (10) ter kličnega lista in endosperma vzorca čičerike (6).



Slika 10: Aminopeptidazna aktivnost na substrat N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktu poganjka in korenine kalčka vzorcev leče (1), pire (2), boba (3), graha (4), čičerike (5), soje (7), ovsu (8), vigne (9), lucerne (10) ter kličnega lista in endosperma vzorca čičerike (6).

Pri analizah aminopeptidazne aktivnosti s posameznimi substrati opazimo pri vseh stročnicah različno encimsko aktivnost. Izjema je le Glu-AMC, kjer pri nobenih rastlinah ni zaznati aminopeptidaz, zato Glu-AMC nismo uporabili za nadaljnje analize aminopeptidazne aktivnosti.

Podrobnejši pregled gelov, ki smo jih analizirali s Phe-AMC razkrije, da so pri leči (1), grahu (4) in čičeriki (5, 6) prisotne aminopeptidaze z veliko aktivnostjo. Pri analizi s Ala-AMC lahko pri vseh vzrocih potrdimo encimsko pestrost, pri leči (1) in lucerni (10) lahko zaznamo kar tri aminopeptidaze. Z Lys-AMC smo zaznali slabšo encimsko aktivnost. Opazimo lahko tudi, da se lise pozicijsko razlikujejo glede na Phe-AMC, še posebej se to odraža pri bobu (3), grahu (4) in vigni (9). Rezultati analiz z N- α -benzoyl-Arg-AMC se od ostalih substratov najbolj razlikujejo glede mobilnosti encimov.

Za nadaljnje analize smo izbrali lečo, lucerno in fižol. Pri leči in lucerni smo sami opazili pestrost rezultatov, zato smo ti dve stročnici žeeli še podrobnejše analizirati. Zaradi objavljenih raziskav o različnih aminopeptidazah v fižolu smo tudi tega vključili v našo študijo (Budič in sod., 2009; Gotar, 2009).

Zaradi pestre encimske aktivnosti smo izbrali substrate Lys-AMC, Phe-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC, ki nam je edini dajal rezultate o endopeptidazah. Z ostalimi tremi smo analizirali aminopeptidaze.

4.2 DELEŽ SUHE SNOVI TER VSEBNOST PROTEINOV IN AMINOPEPTIDAZNA AKTIVNOST V EKSTRAKTIH IZ FIŽOLA, LEČE IN LUCERNE

4.2.1 Vsebnost suhe snovi in topnih proteinov v delih kalčka in odrasle rastline

Preglednica 9: Vsebnost suhe snovi, delež topnih proteinov v suhi snovi in koncentracija proteinov v ekstraktu za posamezne dele kalčka in odrasle rastline

VZORCI	γ topnih proteinov (g/l)	% SS	% topnih proteinov/ SS
LEČA poganjek in korenina kalčka skupaj	1,47	14,7	5,85
LEČA klični list in endosperm	3,89	48,9	4,39
LEČA celoten kalčke (poganjek, korenina, klični list in endosperm)	2,93	28,4	5,89
LEČA list odrasle rastline	1,46	13,4	6,39
LEČA list odrasle rastline pod stresom	2,16	*	1,36**
LEČA korenina odrasle rastline	0,38	10,1	2,23
FIŽOL poganjek in korenina kalčka skupaj	2,32	16,0	8,47
FIŽOL klični list in endosperm	2,57	56,9	2,46
FIŽOL celoten kalčke (poganjek, korenina, klični list in endosperm)	2,61	36,8	3,99
FIŽOL list odrasle rastline	2,45	15,8	9,06
FIŽOL list odrasle rastline pod stresom	2,31	*	1,46**
FIŽOL korenina odrasle rastline	0,38	13,0	1,70
LUCERNA poganjek in korenina kalčka skupaj	0,65	10,2	3,78
LUCERNA klični list in endosperm	4,55	41,7	6,09
LUCERNA celoten kalčke (poganjek, korenina, klični list in endosperm)	2,75	12,6	12,84
LUCERNA list odrasle rastline	*	*	*
LUCERNA list odrasle rastline pod stresom	0,57	*	0,36**
LUCERNA korenina odrasle rastline	0,30	3,3	5,41

* ni podatka zaradi pomanjkanja rastlinskega materiala

** podatek za % topnih proteinov/ mokro snov

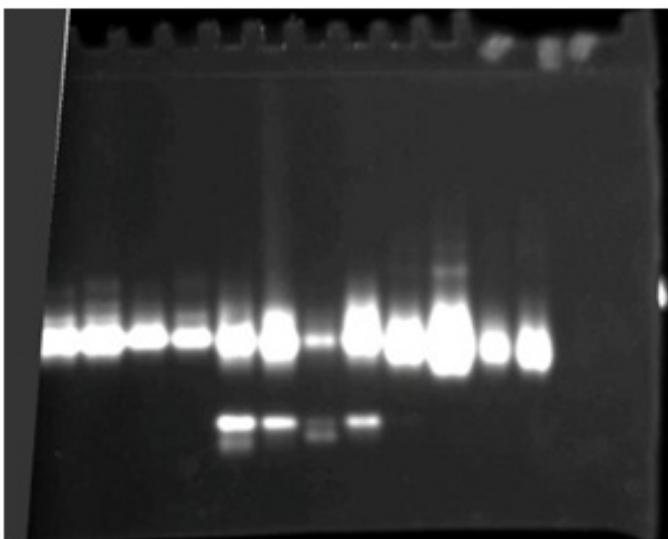
Primer izračuna masne koncentracije topnih proteinov (γ) je prikazan v prilogi C.

4.2.2 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti z izbranimi substrati v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov

V nadaljevanju so prikazani rezultati cimografskih analiz aminopeptidazne aktivnosti s posameznimi substrati (Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC, N- α - benzoyl-Arg-AMC) v izbranih ekstraktih posameznih delov rastlin (poganjek in korenina kalčka skupaj, klični list in endosperm, korenine in liste odrasle rastline).

4.2.2.1 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti s Phe-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Slika 11: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Phe-AMC v ekstraktih leče (1, 2, 3 in 4), fižola češnjevca (5, 6, 7 in 8) ter lucerne (9, 10, 11, 12). Pri vsaki rastlini smo analizirali poganjek in korenino kalčka skupaj (1, 5, 9), klični list in endosperm skupaj (2, 6, 10), korenine odrasle rastline (3, 7, 11) in liste odrasle rastline (4, 8, 12). Nanašali smo 7 µl ekstraktov s polovično koncentracijo proteinov, ki so prikazane v preglednici 9.

Določevanje aminopeptidazne aktivnosti s substratom Phe-AMC v ekstraktih leče (žepki 1,2,3 in 4) prikazuje slika 11, s katere je razvidno, da s tem substratom zaznamo najmanj štiri aminopeptidaze, od katerih ima aminopeptidaza z največjo mobilnostjo tudi največjo encimsko aktivnost. Vzorci se razlikujejo tudi v relativni vsebnosti aminopeptidaz, ki hidrolizirajo Phe-AMC. Primerjava ekstrakta korenin (3) in listov (4) razkrije, da je v slednjem relativno več aminopeptidaze z drugo največjo mobilnostjo. Iz primerjave ekstrakta korenine in kalčka (1) z ekstraktom kličnih listov in endosperma (2) je razvidno, da je v slednjem relativno več aminopeptidaz z manjšo mobilnostjo.

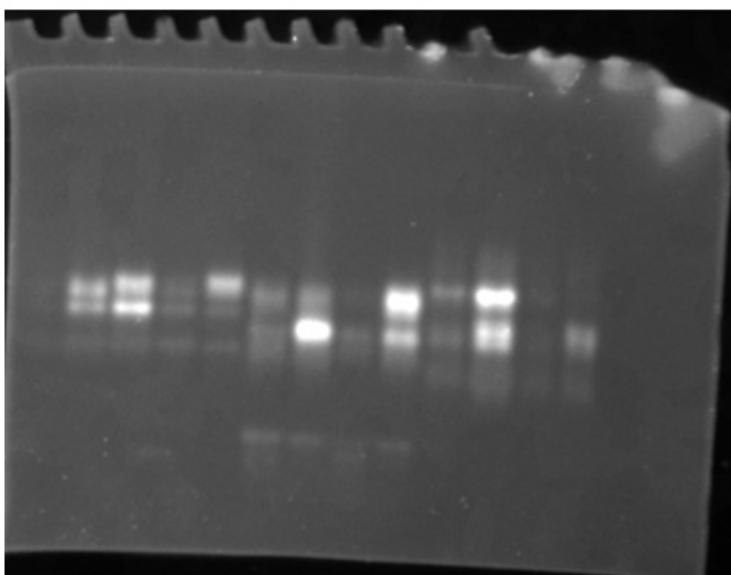
Tako vsebnost aminopeptidaz kot njihov profil v posameznih ekstraktih fižola češnjevca se močno razlikuje. Pri poganjku in korenini kalčka (5) ter korenini odrasle rastline (7) smo določili najmanj tri aminopeptidaze, medtem ko v ekstraktih kličnih listov in endosperma

(6) ter listov (8) nismo zaznali aminopeptidaze z največjo mobilnostjo. Zaradi relativno velikega nanosa vzorca in močno izražene aktivnosti je na področju aminopeptidaze z najmanjšo mobilnostjo relativno velika lisa. Posledično je možno, da sta tudi v vzorcih 6 in 8 prisotni več kot dve aminopeptidazi. Od vzorcev odstopa predvsem ekstrakt korenine, saj je tu koncentracija encima z najmanjšo mobilnostjo precej manjša kot v ostalih ekstraktih. To pa je tudi edini ekstrakt, kjer je aktivnost aminopeptidaze z največjo mobilnostjo večja kot aktivnost aminopeptidaze s srednjo mobilnostjo. Aminopeptidaza z največjo mobilnostjo v vzorcu 7 ni na enaki poziciji kot aminopeptidaza v vzorcu 5, kar najverjetneje pomeni, da sta to dva različna encima.

V vseh ekstraktih lucerne smo detektirali najmanj eno amnipeptidazo z močno izraženo fenilalanin-aminopeptidazno aktivnostjo. Zaradi močno izražene aktivnosti na širšem področju (velika lisa) ne moremo izključiti možnosti, da je susbtrat hidroliziralo več aminopeptidaz s podobno mobilnostjo. Pri vzorcih 9 in 10, kjer smo analizirali ekstrakte kalčkov, smo zaznali še dve aminopeptidazi z manjšo mobilnostjo.

4.2.2.2 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti z Lys-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Slika 12: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Lys-AMC v ekstraktih leče (2, 3, 4 in 5), fižola češnjevca (6, 7, 8 in 9) ter lucerne (10, 11, 12 in 13). Pri vsaki rastlini smo analizirali poganjek in korenino kalčka skupaj (2, 6, 10), klični list in endosperm skupaj (3, 7, 11), korenine odrasle rastline (4, 8, 12) in liste odrasle rastline (5, 9, 13). Nanašali smo 7 µl ekstraktov s polovično koncentracijami proteinov, ki so prikazane v preglednici 9.

Analiza aminopeptidaz s substratom Lys-AMC je bilo izvedena z zaporednim barvanjem po inkubaciji v Phe-AMC. Kljub spiranju z destilirano vodo po analizi s Phe-AMC nismo uspeli odstraniti vsega razgrajenega substrata. Določene lise, ki so značilne samo za

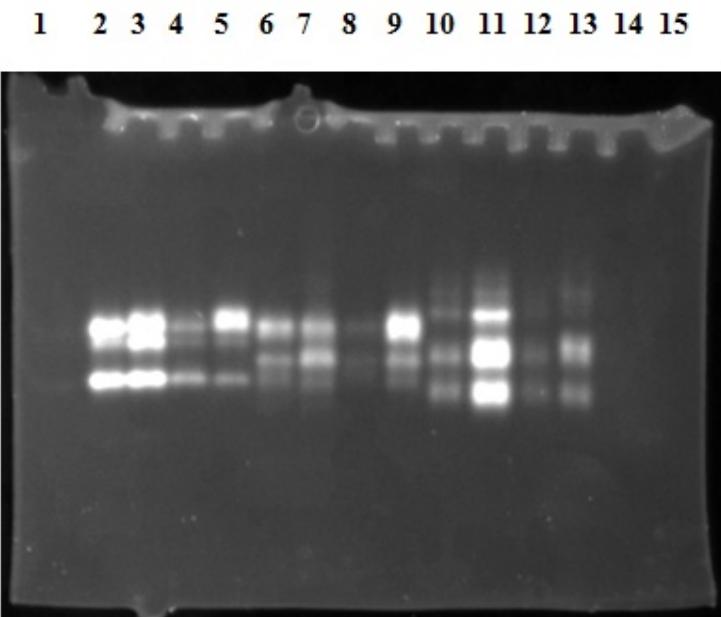
encime s Phe-AMC aktivnostjo (npr. aminopeptidaze z veliko mobilnostjo v ekstraktih fižola), smo detektirali tudi po barvanju z Lys-AMC. Da je rezultat eksperimentalni artefakt, trdimo na osnovi preliminarnih eksperimentov, ki smo jih izvedli s celotnimi kalčki. Pri vseh naslednjih eksperimentih smo po končanem spiranju z vodo v primeru zaporednega barvanja testirali, ali se je nerazgrajen susbtrat v celoti spral z gela. V primeru, če smo opazili fluorescenco na poziciji encimov, smo nadaljevali s spiranjem. Na podlagi tega smo se odločili, da bom pri zgornjem gelu komentirala le lise, ki ponazarjajo bolj izraženo encimsko aktivnost.

Pri vzorcih leče (2, 3, 4 in 5) smo zaznali dve relativno močno izraženi aminopeptidazi, ki razgrajujeta Lys-AMC. To sta lisi z najmanjšo mobilnostjo. Največja koncentracija teh aminopeptidaz je v vzorcu 3, sledi vzorec 2 in nato vzorec 5. V listih odrasle rastline (5), je tudi drugačen profil, saj je aktivnost aminopeptidaze z najmanjšo mobilnostjo največja.

V ekstraktih fižola češnjevca (6, 7, 8 in 9) smo zaznali podoben aminopeptidazni profil kot pri vzorcih leče. Podobnost z lečo je tudi ta, da je v ekstraktih listov (9) največja aktivnost aminopeptidaze z najmanjšo mobilnostjo, v ekstraktu kličnega lista in endosperma (7) pa je največja aktivnost aminopeptidaze z manjšo mobilnostjo.

Posamezni ekstrakti lucerne se med seboj zelo razlikujejo v aktivnosti. Pri poganjku in koreninah kalčka (10) ter kličnem listu in endospermu (11) smo zaznali enak aminopeptidazni profil, le da je aktivnost encimov v vzorcu (11) znatno večja. V ekstraktu odrasle korenine (12) je encimska aktivnost na meji detekcije, kar se sklada z majhno koncentracijo proteinov v vzorcu. Za razliko od listnih ekstraktov leče in fižola pri lucerni (13) nismo zaznali močno izražene aminopeptidaze z majhno mobilnostjo.

4.2.2.3 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti z Ala-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov



Slika 13: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Ala-AMC v ekstraktih leče (2, 3, 4 in 5), fižola češnjevca (6, 7, 8 in 9) ter lucerne (10, 11, 12 in 13). Pri vsaki rastlini smo analizirali poganjek in korenino kalčka skupaj (2, 6, 10), klični list in endosperm skupaj (3, 7, 11), korenine odrasle rastline (4, 8, 12) in liste odrasle rastline (5, 9, 13). Nanašali smo 7 µl ekstraktov s polovičnimi koncentracijami proteinov, ki so prikazane v preglednici 9.

Iz rezultatov prikazanih na sliki 13 je s substratom Ala-AMC razvidno, da pri leči zaznamo tri aminopeptidaze. Pri vzorcih (2) in (3) je dokumentirana največja koncentracija encimov, vendar ima pri vzorcu (3) encim s srednjo mobilnostjo največjo koncentracijo v primerjavi z ostalimi deli rastline. Ponovno je pri vzorcu korenine odrasle rastline (4) zaznati najmanjšo koncentracijo encimov. V ekstraktu lista leče (5) pa ima največjo aktivnost aminopeptidaza z najmanjšo mobilnostjo.

V vseh štirih delih rastline fižola češnjevca zaznamo tri aminopeptidaze. Pozicija in koncentracija encimov v vzorcih 6 in 7 sta zelo podobni, velika razlika je pri koreninah odrasle rastline (8), kjer so zaznani encimi na meji detekcije. Od vseh delov češnjevca je najizrazitejša aktivnost encima z najmanjšo mobilnostjo v listnih ekstraktih odrasle rastline (9).

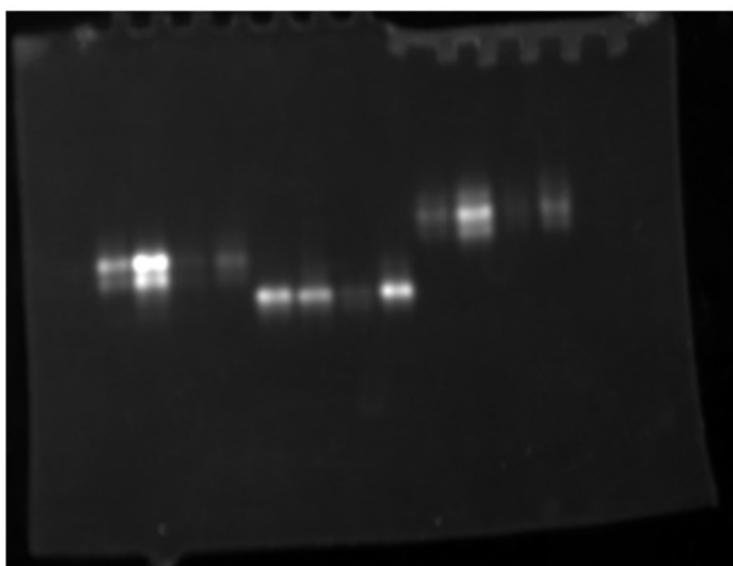
Pri vseh vzorcih lucerne opazimo tri aminopeptidaze. Izpostavila bom le klični list in endosperem (11), ki je v primerjavi z ostalimi deli lucerne encimsko najaktivnejši in korenino odrasle rastline (12), kjer smo določili najmanjšo vsebost aminopeptidaz z Ala-AMC.

Podrobnejši pregled gelov, ki smo jih analizirali z Lys-AMC in Ala-AMC razkrije, da so relativne pozicije posameznih encimov na gelu zelo podobne. Ključna razlika je ta, da s

substratom Ala-AMC bolje zaznamo aminopeptidaze z večjo mobilnostjo. Možno je, da z obema substratoma zaznamo enake encime, ter da se encimi razlikujejo le v kinetičnih parametrih (K_M in k_{cat}) za pretvorbo obeh substratov, ter posledično v relativni intenziteti lis pri posameznih vzorcih.

4.2.2.4 Cimografska analiza peptidazne aktivnosti z N- α - benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



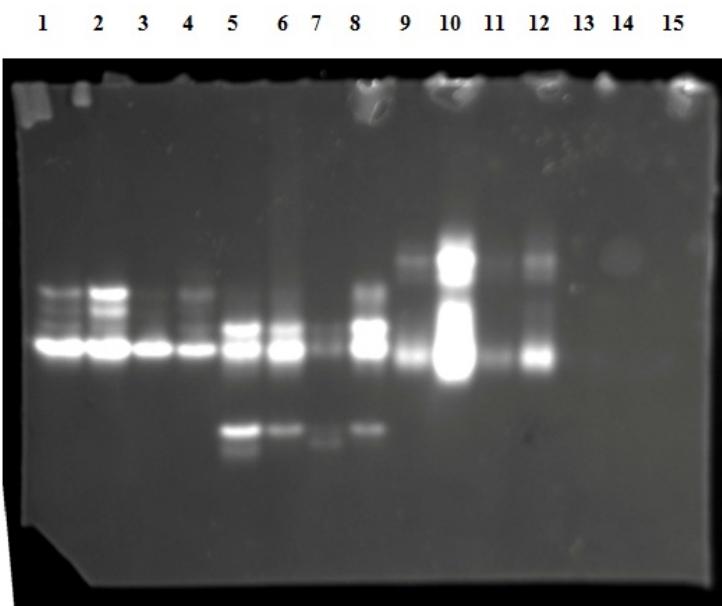
Slika 14: Peptidazna aktivnost na substrat N- α - benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih leče (2, 3, 4 in 5), fižola češnjevca (6, 7, 8 in 9) ter lucerne (10, 11, 12 in 13). Pri vsaki rastlini smo analizirali poganjek in korenino kalčka skupaj (2, 6, 10), klični list in endosperm skupaj (3, 7, 11), korenine odrasle rastline (4, 8, 12) in liste odrasle rastline (5, 9, 13). Nanašali smo 7 μ l ekstraktov s polovičnimi koncentracijami proteinov, ki so prikazane v preglednici 9.

Peptidazna aktivnost na substrat N- α - benzoyl-Arg-AMC pri posameznih vzorcih leče je pokazala dve peptidazi. Lise so pri vseh vzorcih na enakih pozicijah, kar kaže, da so najverjetneje prisotni enaki encimi. Koncentracija je največja v ekstraktu kličnih listov in endosperma (3), najmanjša pa v ekstraktu korenine odrasle rastline (4).

Eno peptidazo smo določili v ekstraktih češnjevca, kjer je pri vzorcu (8) najmanjša aktivnost. V ekstraktu kličnih listov in endosperma (7) in listov odrasle rastline (9) je najverjetneje prisotna še ena peptidaza z manjšo mobilnostjo, katere koncentracija pa je na meji detekcije.

Pri vzorcih lucerne dokumentiramo najmanj eno aminopeptidazo, katere koncentracija se v posameznih ekstraktih razlikuje. Poleg omenjene proteaz smo v vzorcih 10, 11 in 13 zaznali še dve relativno difuzni lisi, z večjo in manjšo mobilnostjo, ki bi bili lahko nastali kot rezultat hidrolize še dveh peptidaz.

4.2.3 Cimografska analiza aminopeptidaz z mešanico substratov v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov



Slika 15: Aminopeptidazna aktivnost na mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC Ala-AMC in peptidazna aktivnost na N- α - benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih leče (1, 2, 3 in 4), fižola češnjevca (5, 6, 7 in 8) ter lucerne (9, 10, 11, 12). Pri vsaki rastlini smo analizirali poganjek in korenino kalčka skupaj (1, 5, 9), klični list in endosperm skupaj (2, 6, 10), korenine odrasle rastline (3, 7, 11) in liste odrasle rastline (4, 8, 12). Nanašali smo 10 μ l ekstraktov s polovičnimi koncentracijami proteinov, ki so prikazane v preglednici 9.

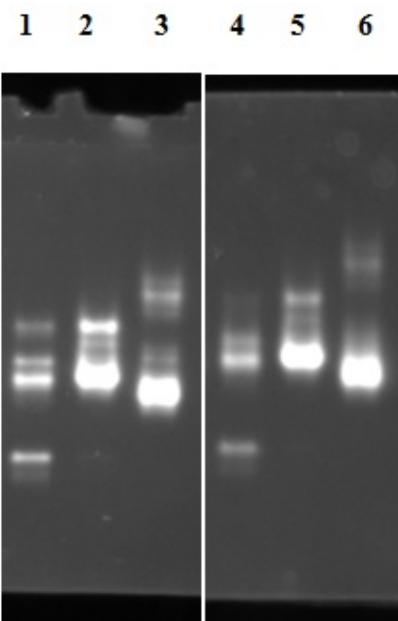
Rezultati analize ekstraktov z različni substrati so pokazali, da so v praktično v vseh vzorcih prisotne aminopeptidaze, ki razgrajujejo Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in proteaze, ki razgrajujejo N- α - benzoyl-Arg-AMC. Pri koreninah smo zaznali nizko encimsko aktivnost, kar se opazi predvsem pri češnjevcu in lucerni, kar je najverjetnejše posledica nizke koncentracije proteinov.

Ker bi bile analize s posameznimi substrati preobsežne, smo zmanjšali število eksperimentov tako, da smo v raztopino za analizo proteolitične aktivnosti dodali več različnih substratov. Takšno raztopino smo uporabljali pri določevanju katalitičnega tipa aminopeptidaz, vplivu mehanskega stresa na aktivnost encimov ter določevanju temperaturne stabilnosti ekstraktov.

Rezultati proteolitične aktivnosti za posamezne ekstrakte leče, češnjevca in lucerne so prikazane na sliki 15. Detektirano število lis lahko pripišemo široki substratni specifičnosti nekaterih aminopeptidaz, ki lahko razgrajujejo več substratov kot so predhodno že opazili (Budič in sod., 2009). Takšen rezultat je lahko posledica močno izražene aktivnosti različnih encimov s podobno mobilnostjo, kar v končni fazi odraža v »zlivaju« več šibkejših lis v eno močnejšo. V določenih primerih smo z mešanico substratov določili manjše število lis kot pa z uporabo čistega substrata (npr. leča Ala-AMC vzorec 11).

4.3 CIMOGRAFSKA ANALIZA KATALITIČNEGA TIPA AMINOPEPTIDAZ

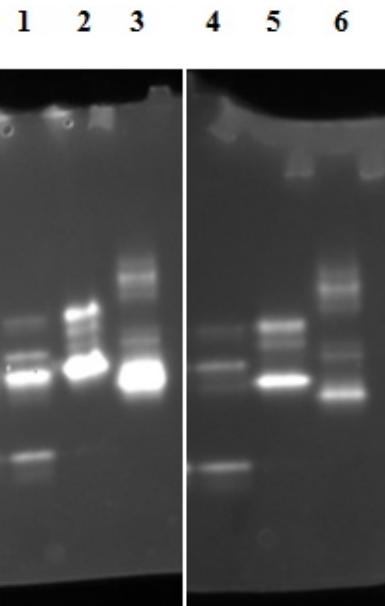
4.3.1 Vpliv jodoacetamida in reducenta DTT na aminopeptidazno aktivnost



Slika 16: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih celotnih kalčkov fižola češnjevca (1, 4), leče (2, 5) ter lucerne (3, 6). Encimska aktivnost v vzorcih 1-3 je bila določena v prisotnosti 5 mM DTT. Vzorcem 4-6 je bil pred nanosom na elektroforezni gel dodan jodoacetamid. Encimska aktivnost v vzorcih 4-6 je bila določena brez dodanega DTT.

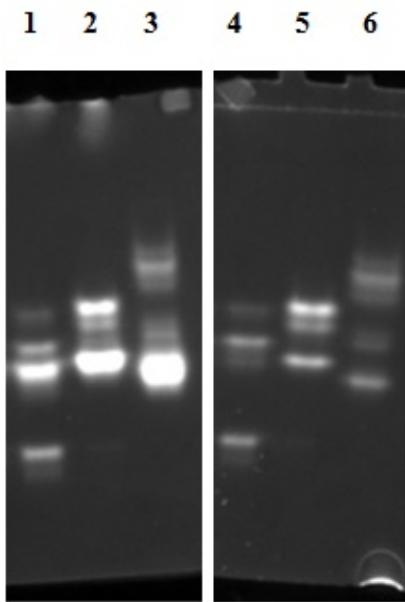
Z dodatkom jodoacetamida v ekstrakt smo želeli preveriti, ali je za katero od aminopeptidaz prosti cistein ključen za encimsko aktivnost. V kontrolnem eksperimentu smo dodali reducent DTT, s katerim smo reducirali morebitne delno oksidirane cisteine ter tako dosegli polno encimsko aktivnost. Iz rezultatov predstavljenih na sliki 16 je razvidno, da ima inhibitor cisteinskih peptidaz, jodoacetamid, majhen vpliv na encimsko aktivnost. Pri encimihi z najmanjšo mobilnostjo je mogoče opaziti, da je njihova aktivnost v primeru inkubacije v prisotnosti jodoacetamida manjša. Ker pa še vedno zaznamo ustrezone lise, ne moremo z gotovostjo trditi, da so ti encimi cisteinske proteaze. Edina lisa, ki jo po inkubaciji z jodoacetamidom ne zaznamo več, ustreza encimu iz lucerne z drugo največjo mobilnostjo (3).

4.3.2 Vpliv inhibitorja PMSF na aminopeptidazno aktivnost



Slika 17: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih fižola češnjevca (1, 4), leče (2, 5) ter lucerne (3, 6). Vzorcem 1-3 je bil dodan pred nanosom DMSO (kontrola), vzorcem 4-6 smo pred nanosom na elektroforezni gel dodali v DMSO raztopljen PMSF. Encimska aktivnost vseh vzorcev je bila določena brez dodanega PMSF v reakcijski pufer.

Iz rezultatov prikazanih na sliki 17 je razvidno, da PMSF, ki je ireverzibilni inhibitor serinskih peptidaz, vpliva na aktivnost določenih encimov. V vzorcih fižola češnjevca, leče in lucerne se je zmanjšala intenziteta lise, ki je v vsakem od analiziranih vzorcev najmočnejša. Ker se intenziteta ustreznih lis le zmanjša in še vedno določimo encimsko aktivnost inhibiranih encimov, se na določen delež encimov v reakcijski mešanici PMSF ni ireverzibilno vezal. Za ekstrakt kalčkov leče, lahko ugotovimo, da PMSF vpliva na aktivnost še ene od aminopeptidaz, saj šibka lisa, ki ustreza encimu z drugo največjo mobilnostjo (2), po inkubaciji s PMSF ni več vidna (5).

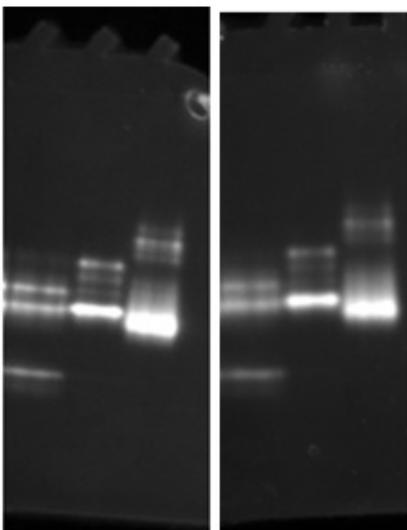


Slika 18: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih fižola češnjevca (1, 4), leče (2, 5) ter lucerne (3, 6). Vzorcem 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DMSO (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali v DMSO raztopljen PMSF.

Ker je dodatek PMSF v alikvot ekstrakta pred elektroforezo rezultiral le v zmanjšani aktivnosti nekaterih encimov, smo žeeli preveriti ali z dodatkom PMSF v reakcijsko mešanico skupaj s substratom dosežemo bolj izraženo inhibicijo encimske aktivnosti. Iz rezultatov prikazanih na sliki 18 je razvidno, da inhibicija še vedno ni popolna, čeprav je bolj učinkovita kot v primeru dodatka PMSF v ekstrakt pred elektroforezo. Čeprav popolne inhibicije pri eksperimentalnih pogojih nismo zagotovili, lahko z veliko verjetnostjo sklepamo, da vzorci stročnic vsebujejo najmanj eno aminopeptidazo serinskega katalitičnega tipa.

4.3.3 Vpliv EDTA in kovinskih ionov na aminopeptidazno aktivnost

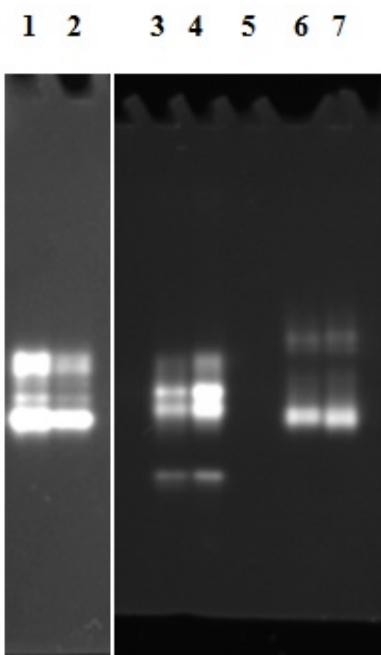
1 2 3 4 5 6



Slika 19: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih fižola češnjevca (1, 4), bleče (2, 5) ter lucerne (3, 6). Pri določevanju aminopeptidazne aktivnosti vzorcev 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT in kompleksant kovinskih ionov EDTA.

Z eksperimentom prikazanim na sliki 19 smo žeeli preveriti, če EDTA, ki je kompleksant kovinskih ionov, vpliva na encimsko aktivnost. S slike je razvidno, da v nobenem od treh ekstraktov kalčkov ni bistvenih sprememb v intenziteti lis v primeru določevanja encimske aktivnosti v prisotnosti EDTA. Seveda pa je tudi možno, da so kovinski ioni tako močno vezani v aktivno mesto encima, da jih z EDTA nismo mogli odstraniti. Posledično ne moremo zagotovo trditi, da kakšna od detektiranih aminopeptidaz ni metalopeptidaza.

4.4 VPLIV MEHANSKEGA STRESA NA AMINOPEPTIDAZNO AKTIVNOST V LISTIH

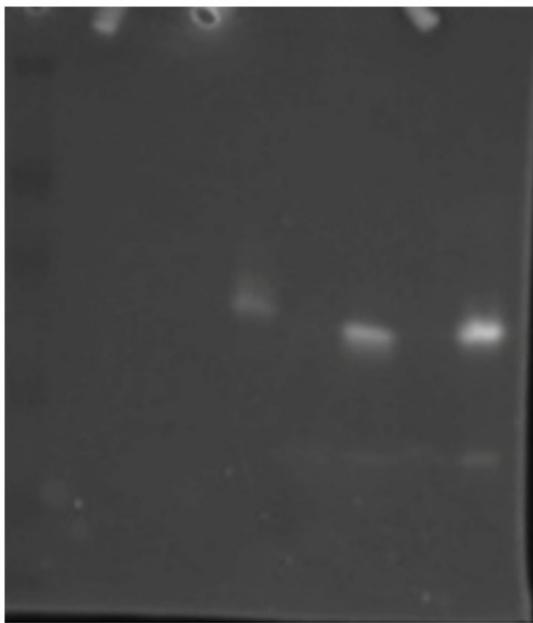


Slika 20: Encimska aktivnost v ekstraktih listov rastlin izpostavljenih mehanskemu stresu (1, 3, 6) in kontrola (2, 4, 7) za lečo (1, 2), fižol češnjevec (3, 4) in lucerno (6, 7) določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in Met-AMC.

S povzročitvijo mehanskega stresa na listih odraslih rastlin (poškodba spodnje strani listov s smirkovim papirjem) smo želeli preveriti, ali se aminopeptidazna aktivnost spremeni. S slike 20 lahko opazimo, da smo z mehanskim stresom le malo vplivali na encimsko aktivnost aminopeptidaz lucerne, medtem ko so razlike med stresom in kontrolo za lečo in fižol češnjevec velike. Pri leči v stresu (1) opazimo povečano aktivnost vseh aminopeptidaz, še posebej tistih z večjo manjšo mobilnostjo. Pri fižolu češnjevcu (3) pa se ravno nasprotno aktivnost aminopeptidaz, kot rezultat stresa, zmanjša. S to analizo smo prišli do zanimivih rezultatov, saj vsaka rastlina odraža različno encimsko aktivnost, ko je izpostavljena stresu.

4.5 VPLIV NATRIJEVEGA DODECILSULFATA NA DOLOČANJE
AMINOPEPTIDAZNE AKTIVNOSTI S CIMOGRAFIJO

1 2 3 4 5 6 7

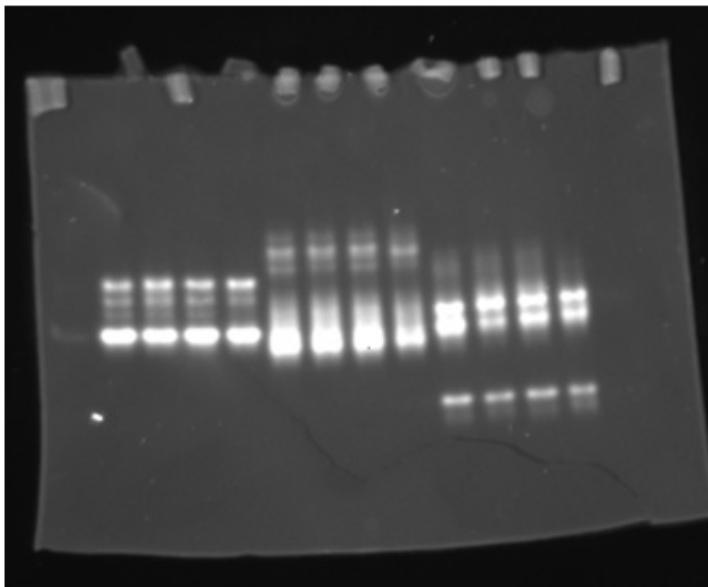


Slika 21: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih kalčkov lucerne (1, 2), leče (3, 4) ter fižola češnjevca (5, 6). Vzorce smo pred nanosom na elektroforezni gel redčili z nanšalnim pufrom, ki je vseboval NaDS (1, 3, 5) in s pufrom, ki ni vseboval NaDS (2, 4, 6). Elektroforeza je potekala pri denaturirajočih pogojih v prisotnosti NaDS. Proteinine smo po končani elektroforezi in pred analizo encimske aktivnosti renaturirali s tritonom X-100.

Iz rezultatov prikazanih na sliki 21 je razvidno, da NaDS, ki je denaturant negativno vpliva na določeno encimsko aktivnost. Tudi dodatek tritona X-100, ki se uporablja za renaturacijo denaturiranih proteinov ne rezultira v reaktivaciji aminopeptidaz, če smo ekstrakt pred elektroforezo redčili s pufrom, ki je vseboval NaDS. V primeru, ko smo vzorec redčili pred nanosom s pufrom, ki ni vseboval NaDS, smo za vzorca leče in fižola zaznali določene aminopeptidaze. Glede na relativne pozicije aminopeptidaz pri fižolu lahko sklepamo, da je omenjena aktivnost bolj rezultat encimov, ki se niso denaturirali med elektroforezo, kot pa rezultat renaturacije s tritonom-X100. Podrobnejši pregled gela razkrije, da je pri fižolu zelo šibka lisa na položaju aminopeptidaze z veliko mobilnostjo, tudi če smo v vzorec dodali NaDS. Da bi preverili, ali gre za renaturacijo encima, ali pa le za nepopolno denaturacijo z NaDS, smo vzorec kateremu je dodane NaDS segrevali na 95 °C. V tem primeru (rezultati niso pokazani) nismo določili encimske aktivnosti, kar je dodaten argument, da s tritonom-X100 pri uporabljenih pogojih nismo uspeli renaturirati nobene aminopeptidaze.

4.6 VPLIV SHRANJEVANJA EKSTRAKTOV NA AMINOPEPTIDAZNO AKTIVNOST DOLOČENO S CIMOGRAFIJO

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Slika 22: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih kalčkov leče (2-5), lucerne (6-9) ter fižola češnjevca (10-13). Ekstrakte kalčkov smo pred analizo encimske aktivnosti hranili 14 dni na -80 °C (2, 6, 10), 10 dni na -20 °C (3, 7, 11), 24 ur na +4 °C (4, 8, 12) in 24 ur na +20 °C (5, 9, 13).

Analiza rezultatov na sliki 22 razkrije, da v ekstraktih leče ne zaznamo večjih razlik med vzorci po 10 dnevnom shranjevanju na -80 °C, -20 °C in 24 urnem shranjevanju na +4 °C. Izjema je vzorec, ki smo ga 24 ur hranili na sobni temperaturi, saj se je tu aktivnost aminopeptidaze z drugo največjo aktivnostjo precej zmanjšala. Podobno kot za lečo lahko ugotovimo tudi za lucerno, saj le pri +4 °C zaznamo manjšo aktivnost dveh encimov. Za razliko od ostalih dveh metuljnic je pri fižolu češnjevcu edino temperatura -80 °C primerna za shranjevanje. Po 10 dneh na -20 °C se je močno zmanjšala aktivnost ene od aminopeptidaz (srednja mobilnost), medtem ko pri shranjevanju opazimo močno zmanjšano aktivnost encima z najmanjšo mobilnostjo. Posledično smo vse vzorce katerim smo določevali aminopeptidazno aktivnost, shranjevali na -80 °C, da bi v čim večji meri ohranili encimsko aktivnost.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Diplomsko delo smo zastavili zelo široko, saj smo s cimografijo testirali aminopeptidazno aktivnost v ekstraktih kalčkov večjega števila metuljnic in dveh trav. Preliminarni rezultati so pokazali, da smo z izjemo Glu-AMC zaznali aminopeptidazno aktivnost praktično z vsemi substrati. Na osnovi preliminarnih rezultatov smo skrčili število uporabljenih substratov in rastlin, ki smo jih vključili v analizo. Izbrali smo substrate z majhno hidrofobno aminokislino (Ala-AMC), z veliko hidrofobno aminokislino (Phe-AMC) in substrat z bazično aminokislino (Lys-AMC). Substrata s kislo aminokislino (Glu-AMC) nismo vključili v raziskave, saj z njim nismo zaznali aminopeptidazne aktivnosti v nobenem ekstraktu. Izbrali smo tudi substrat, s katerim zaznamo endopeptidazno aktivnost (N- α -benzoyl-Arg-AMC).

Pri fižolu, leči, lucerni, soji in čičeriki smo izvajali tudi analize aminopeptidazne aktivnosti s substrati Gly-AMC, Met-AMC in Trp-AMC (priloge F, G H). Pri vseh omenjenih stročnicah je bila aminopeptidazna aktivnost majhna, zato teh fluorogenih substratov nismo vključili v nadaljne analize.

Izbor rastlin je temeljal na »pestrosti« aminopeptidazne aktivnosti. Predvsem na osnovi rezultatov z Ala-AMC (slika 8) smo se odločili, da bomo podrobnejše preučili encimsko aktivnost v leči in lucerni, saj smo s tem substratom zaznali najmanj tri aminopeptidaze. Dodatno smo v izbor vključili fižol, saj je znano, da ta vsebuje večje število aminopeptidaz (Budič in sod., 2009; Gotar, 2009).

Analiza aminopeptidazne aktivnosti v posameznih delih kalčka in odrasle rastline je razkrila, da se nekatere aminoepitide tkivno specifično izražajo. Razlike so še najmanjše pri lucerni, kjer prihaja predvsem do razlik v skupni aminopeptidazni aktivnosti in manj v profilu aminopeptidaz. Skupna aminopeptidazna aktivnost je v veliki meri odvisna od koncentracije topnih proteinov, ki je najmanjša v ekstraktih korenin, kjer je posledično tudi najmanjša aminopeptidazna aktivnost. Edino večjo razliko v aminopeptidaznem profilu lahko opazimo pri aminoepitidazi s tretjo največjo mobilnostjo, ki jo zaznano z Ala-AMC (tudi z Lys-AMC). Relativna aktivnost (primerjava s celotno aktivnostjo na določen substrat v nekem ekstraktu) je precej večja v ekstraktih kalčkov kot v ekstraktih korenin ali listov (slika 12 in slika 13).

Pri fižolu in leči so razlike v profilu ekstraktov precej večje. Izstopa predvsem aminopeptidaza z majhno mobilnostjo, ki hidrolizira Ala-AMC in Lys-AMC. Ta se v primerjavi z drugi aminopeptidazami relativno močno izraža v listih odraslih rastlin (slika 12 in slika 13). Zanimiva je tudi primerjava ekstraktov korenine in poganjka kalčka skupaj ter kličnega lista in endosperma skupaj. Analiza s substratom Lys-AMC (slika 12) je razkrila, da je v ekstraktu kličnega lista in endosperma fižola zelo velika aktivnost ene od aminopeptidaz (srednja mobilnost), katere koncentracija je zelo majhna v ekstraktu korenine in poganjaka kalčka. Pri fižolu lahko opazimo zelo velike razlike tudi pri oben

encimih z veliko mobilnostjo, ki ju zaznamo s Phe-AMC, saj njuno razmerja v vsakem od analiziranih ekstraktov drugačno (slika 11). Enako kot za lucerno lahko za lečo in fižol ugotovimo, da je aminopeptidazna aktivnost najmanjša v ekstraktih korenin.

Zaradi poenostavitev eksperimentalnega dela, smo za vse nadaljnje eksperimente uporabili mešanico substratov, saj smo na ta način lahko analizirali vse aminopeptidaze, ki razgrajujejo substrate v mešanici v enem eksperimentu. Z mešanico substratov smo tudi analizirali tip proteolitične aktivnosti z uporabo različnih inhibitorjev.

Z inhibitorjem serinskih proteaz PMSF smo v ekstraktu kalčkov leče, fižola in lucerne določili po eno aminopeptidazo na katere aktivnost vpliva PMSF (slika 17 in slika 18). Eksperiment smo izvedli na dva načina; tako da smo dodali veliko koncentracijo PMSF v vzorec pred elektroforezo, ali pa da smo dodali PMSF skupaj s substratom v reakcijski medij. V obeh primerih smo detektirali iste encime, ki jih PMSF inhibira, vendar je bila inhibicija bolj učinkovita, ko smo PMSF dodali v reakcijski pufer. Možno, je da se PMSF ni kovalentno vezal na vse molekule encimov v ekstraktu. PMSF je tudi kemijsko nestabilen v vodnih raztopinah (Pyrzyna in sod., 2010), zato se je lahko med inkubacijo z vzorcem pred elektroforezo razgradil. Z jodoacetamidom, ki se kovalentno veže na cistein in je posledično inhibitor proteaz cisteinskega katalitičnega tipa, smo vplivali le na aktivnost ene aminopeptidaze v ekstraktu lucerne, katere aktivnosti po dodanem jodoacetamidu nismo več določili. Fižol in leča ne vsebujeta cisteinskih aminopeptidaz, ki razgrajujejo uporabljeni v analizi uporabljeni substrate. Milimolarne koncentracije EDTA in Ca^{2+} (priloga E) ter mikromolarne koncentracije Zn^{2+} (priloga D) ne vplivajo na encimsko aktivnost analiziranih aminopeptidaz v prisotnosti EDTA. Ceprav aminopeptidaz, ki bi jih uvrščali med metaloproteaze nismo zaznali, ne moremo nedvoumno trditi, da jih leča, fižol in lucerna ne vsebujejo.

V okviru diplomske naloge smo z mešanicami substratov testirali tudi vpliv mehanskega stresa na aminopeptidazno aktivnost (stresirane liste odraslih rastlin smo poškodovali s smirkovim papirjem in po 48 h pripravili ekstrakte listov). Analiza rezultatov (slika 20) razkrije, da mehanski stres na vsako od rastlin vpliva drugače. Pri fižolu češnjevcu smo v stresu opazili povečano aminopeptidazno aktivnost, pri leči zmanjšanje, pri lucerni pa stres ni vplival na aminopeptidazno aktivnost. Mehanski stres lahko rezultira v preveliki stopnji poškodb in celični smrti kar bi lahko povezovali z rezultati, ki smo jih opazili pri leči, ali pa mobilizaciji celičnih mehanizmov, ki rezultirajo v povečani metabolni aktivnosti (Vierstra, 1996), kar bi lahko povezovali z rezultati, ki smo jih opazili pri fižolu češnjevcu. Za poglobljene zaključke bi bilo potrebno opraviti več eksperimentov, saj je bilo število rastlin vključenih v ta poizkus, relativno majhno.

Poleg karakterizacije aminopeptidazne aktivnosti v ekstraktih metuljnic smo se v okviru diplomske naloge ukvarjali tudi z nekaterimi tehnični rešitvami in pogoji pri katerih smo izvajali analize. Namen takšnih eksperimentov je bil, da smo zagotovili čim boljše eksperimentalne podatke in minimizirali sistematične napake.

Opazili smo, da so nekateri lise na nekaterih gelih zelo difuzne. Pri elektroforezi se sprošča toplota zaradi upornosti gela. Pri višji temperaturi, je difuzija večja, kar rezultira v širših lisah. V diplomi smo nekatere eksperimente opravili brez hlajenja (takrat so lise bolj difuzne), pri eksperimentih proti koncu diplomske naloge pa smo kadičko za elektroforezo

obdali z ledom, kar je rezultiralo v diskretnejših lisah in boljši resoluciji. Poizkusili smo tudi z dodatkom kock zmrznjenega elektroforeznega pufra v kadičko, kar je bilo manj učinkovito kot inkubacijo celotne kadičke v ledu. Lise so bile diskretne, vendar hitrost potovanja ni bila enakomerna po celotni površini gela (lise so bile obrnjene postrani-ene v levo, druge v desno).

Kot so predhodno ugotovili (Budič in sod. 2009) se lahko produkt AMC kakor tudi substrat spereta iz gela, kar omogoča zaporedno analizo z več substrati. To je tudi ena od ključnih prednosti cimografije na osnovi AMC substratov v primerjavi z nekaterimi kromogenimi substrati (Božič in Vujačić, 2005). Pri preliminarnih eksperimentih smo ugotovili, da je potrebno 30 minut ali več, da se produkt popolnoma spere iz gela. Učinkovitost spiranja pred naslednjim barvanjem smo v večini eksperimentov (razen na začetku diplomske naloge) testirali tako, da smo poslikali spran gel in preverili, ali se je ves produkt spral (priloga I).

Nekateri avtorji poročajo, da se proteaze, ki jih predhodno denaturirajo z NaDS lahko renaturirajo z detergentom Triton X-100 (Michaud, 1998). Prednost NaDS elektroforeze je, da iz elektroforetske mobilnosti in primerjave s standardi lahko sklepamo na molsko maso proteinov. V okviru diplomske naloge aminopeptidaz, ki smo jih denaturirali z NaDS nismo mogli več renaturirati. Ugotovili pa smo, da nepolna denaturacija (majhna koncentracija NaDS, brez segrevanja), lahko rezultira v ohranjeni encimski aktivnosti. V tem primeru imajo encimi najverjetneje enako elektroforetsko mobilnost kot pri nativni elektroforezi (slika 21).

Večina eksperimentov, ki smo jih opravili je bila kvalitativne narave, saj intenzitete elektroforetskih lis nismo vrednotili z ustrezno programsko opremo. Cimografija, ki temelji na AMC pa je v svoji osnovi kvantitativna tehnika (Budič in sod. 2009), zato je izjemno pomembno, da za shranjevanje izberemo takšne pogoje pri katerih se vzorec (aminopeptidazna aktivnost) ne bo spreminjal. Pogostokrat pri različnih analizah pripravimo večje število vzorcev, ki jih zamrznemo in nato do analize hranimo v zamrzovalniku. Ugotovili, smo, da so nekatere aminopeptidaze metuljnic nestabilne, če jih kratek čas (10 dni) shranjujemo na -20 °C (v primerjavi z -80 °C). Tudi shranjevanje pri sobni temperaturi preko noči ni primerno, saj enako kot pri -20 °C opazimo, da se aktivnost nekaterih aminopeptidaz pri teh pogojih shranjevanja zmanjša.

5.2 SKLEPI

- V ekstraktih kalčkov izbranih stročnic in trav smo detektirali aminopeptidaze, ki so hidrolizirale substrate Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC; Met-AMC, Trp-AMC in Gly-AMC. Nobena od aminopeptidaz v ekstraktih ni v zadostni meri razgrajevala substrata Glu-AMC, da bi to lahko zaznali na gelu.
- Cimografsko analizo po nativni elektroforezi smo uspešno uporabili za ločevanje in detekcijo aminopeptidaz, ki hidrolizirajo Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC, v ekstraktih različnih delov kalčka in odraslih rastlin fižola, leče in lucerne. Posamezni ekstrakti so se razlikovali tako po koncentraciji aminopeptidaz kot po številu.
- Najmanjši delež suhe snovi (3,3-13,0 %) in najmanjšo koncentracijo topnih proteinov v ekstraktu (0,30-0,38 g/l) smo določili za korenine odraslih rastlin, največji delež suhe snov (41,7-56,9 %) in največjo koncentracijo topnih proteinov v ekstraktu (2,57-4,55 g/l) pa za klični list in endosperm.
- V vseh treh metuljnicah smo v ekstraktih korenin zaznali najmanje encimske aktivnosti. Največjo encimsko aktivnost smo določili v ekstraktih listov fižola češnjevca in leče, pri lucerni pa smo največjo aktivnost zaznali v ekstraktu kličnega lista in endosperma skupaj.
- Od testiranih substratov smo s Phe-AMC zaznali največjo encimsko aktivnost (intenziteta lis). S substratoma Lys-AMC in Ala-AMC smo najverjetneje zaznali enake encime, ki se razlikujejo v relativni substratni specifičnosti.
- Pri vzorcu lucerne smo zaznali eno cisteinsko aminopeptidazo.
- V izbranih metuljnicah prisotnosti metaloproteaz pri pogojih analize nismo potrdili.
- PMSF, ki je ireverzibilni inhibitor serinskih proteaz, je inhibiral najmanj eno aminopeptidazo, prisotno v ekstraktih kalčkov fižola češnjevca, leče in lucerne. Inhibicija je bila učinkovitejša, če smo PMSF dodali v pufer s substratom, kot pa če smo inhibitor dodali ekstraktu pred nanosom na elektroforezni gel.
- Pod vplivom mehanskega stresa se aktivnost aminopeptidaz v listih stresiranih rastlin zmanjša (ekstrakt leče), poveča (ekstrakt fižola češnjevca) ali ostane nespremenjena (ekstrakt lucerne).
- S cimografsko analizo po NaDS elektroforezi kljub inkubaciji v prisotnosti Tritona X-100 nismo uspeli zaznati aminopeptidazne aktivnosti. Pri nepopolni denaturaciji (brez segrevanja, ali NaDS samo v elektroforeznem pufru) smo zaznali aminopeptidazno aktivnost v ekstraktih fižola češnjevca.

- Pogoji shranjevanja vplivajo na aminopeptidazno aktivnost predvsem v ekstraktih fižola. Zmanjšanje aminopeptidazne aktivnosti smo zaznali po 10 dnevnom shranjevanju na -20 °C (aminopeptidaza s srednjo mobilnostjo), kakor tudi po 24 urni inkubaciji na je +20 °C (aminopeptidaza z manjšo mobilnostjo).

6 POVZETEK

Z raziskavo smo žeeli podrobnejše okarakterizirati aminopeptidaze, ki se izražajo v različnih delih kalčka in odraslih rastlin nekaterih stročnic. Encimi aminopeptidaze so pomembni pri presnovi proteinov in regulaciji njihovega delovanja.

V preliminarnih analizah smo analizirali aminopeptidaze v kalčkih metuljnic leče, boba, graha, čičerike, soje, vigne, lucerne in fižola, kakor tudi v kalčkih trav (pira, oves). S substrati Phe-AMC, Ala-AMC, Lys-AMC, Glu-AMC, N- α -benzoyl-Arg-AMC, Gly-AMC, Met-AMC, Trp-AMC smo analizirali aminopeptidaze po nativni elektroforezi. V vseh analiziranih rastlinah smo potrdili prisotnost aminopeptidaz. Za nadaljnje analize smo uporabili metuljnice fižol, lečo in lucerno.

Vzgojili smo fižol, lečo in lucerno ter pripravili ekstrakte poganjka in korenine kalčka skupaj, kličnih listov in endosperma, korenin odraslih rastlin ter listov odraslih rastlin. Aminopeptidaze v ekstraktih, smo po nativni elektroforezi analizirali s posameznimi substrati (Phe-AMC, Ala-AMC, N- α -benzoyl-Arg-AMC in Lys-AMC) ali z mešanico teh substratov.

Na osnovi elektroforetske mobilnosti lahko predvidevamo, da smo s substratom Lys-AMC in Ala-AMC v večini primerov zaznali enake aminopeptidaze. S Phe-AMC smo pri ekstraktih fižola zaznali aminopeptidazi z veliko mobilnostjo, ki drugih uporabljenih substratov nista razgrajevali.

V ekstraktih korenin odraslih rastlin fižola, leče in lucerne je bila aminopeptidazna aktivnost najmanjša, kar se sklada z najmanjšo vsebnostjo proteinov v teh ekstraktih, ki smo jih določili z metodo po Bradfordu.

V ekstraktih poganjka in korenine kalčka skupaj ter kličnega lista in endosperma skupaj je v večini primerov večja aminopeptidazna aktivnost kot v listih. Izjema je aktivnost aminopeptidaze (majhna mobilnost), ki hidrolizira Ala-AMC in Lys-AMC v ekstraktih fižola. Koncentracija tega encima je v ekstraktih listov precej večja kot v ekstraktih posameznih delov kalčka. Tudi v ekstraktu leče smo detektirali aminopeptidazo s podobno substratno specifičnostjo, kjer je večja relativna aktivnost (v primerjavi z ostalimi encimi, ki hidrolizirajo Lys-AMC in Ala-AMC) v ekstraktih listov kot v ekstraktih kalčkov.

Poskušali smo tudi določiti katalitične tipe detektiranih aminopeptidaz. Z jodoacetamidom, ki se kovalentno veže na cistein smo preverili, ali je za katero od aminopeptidaz prosti cistein ključen za encimsko aktivnost. Jodoacetamid je inhibiral eno cisteinsko aminoepitidazo v ekstraktu kalčkov lucerne.

Serinske proteaze smo analizirali s PMSF, ki smo ga dodali v ekstrakt pred nanosom na gel, ali pa smo z njim prepojili substrat po elektroforezi. V obeh primerih smo v ekstraktih vse treh rastlin detektirali po eno aminopeptidazo, serinskega katalitičnega tipa. Inhibicija je bila učinkovitejša, ko smo z inhibitorjem prepojili gel po elektroforezi.

Dodatek EDTA v pufer s substratom ni zmanjšal encimske aktivnosti. Tudi v primeru dodatka Zn^{+2} in Ca^{2+} v pufer s substratom nismo zaznali povečanja ali zmanjšanja aminopeptidazne aktivnosti. Na osnovi rezultatov lahko sklepamo, da pri pogojih analize nismo detektirali nobene metaloproteaze.

Mehanski stres in tudi druge oblike stresa različno vplivajo na aminopeptidazno aktivnost. Ta se lahko poveča, zmanjša ali ostane nespremenjena. Vse tri možne odzive na stres smo tudi sami zaznali na nivoju aminopeptidaz. Aktivnost encimov se je tako zmanjšala pri leči, povečala pri fižolu, pri lucerni pa je aktivnost encimov ostala nespremenjena.

Pogoji shranjevanja imajo velik vpliv na stabilnost aminopeptidaz. Za določene vzorce (fižol) smo tudi po shranjevanju na -20 °C zaznali zmanjšanje encimske aktivnosti v primerjavi s shranjevanjem na -80 °C. Vzorce je potrebno čimprej zamrzniti in shraniti pri -80 °C, ali pa čimprej opraviti analizo aminopeptidazne aktivnosti.

7 VIRI

- Asp T., Bowra S., Borg S., Bach Holm P. 2004. Cloning and characterisation of three groups of cysteine protease genes expressed in the senescing zone of white clover (*Trifolium repens*) nodules. *Plant Science*, 167, 4: 825-837
- Barrett A.J. 1986. The classes of proteolytic enzymes. V: Plant proteolytic enzymes. Dalling M.J. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 2-16
- Barrett A.J., McDonald J.K. 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochemical Journal*, 237, 3: 935-935
- Bode W., Huber R. 1991. Ligand binding: Proteinase-protein inhibitor interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 1, 1: 45-52
- Božić N., Vujičić Z. 2005. Detection and quantification of leucyl aminopeptidase after native electrophoresis using leucine-p-nitroanilide. *Electrophoresis*, 26, 12: 2476-2480
- Budič M., Kidrič M., Meglič V., Cigić B. 2009. A quantitative technique for determining proteases and their substrate specificities and pH optima in crude enzyme extracts. *Analytical Biochemistry*, 388, 1: 56-62
- Chen H.J., Huang G.J., Chen W.S., Su C.T., Hou W.C., Lin Y.H. 2009. Molecular cloning and expression of a sweet potato cysteine protease SPCP1 from senescent leaves. *Botanical Studies*, 50, 2: 159-170
- Cleland W.W. 1964. Dithiothreitol: A new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*, 3, 4: 480–482
- Cortese D. 2009. Kalčki: živahna semena. Ljubljana, Kmečki glas: 144 str.
- Couton J.M., Sarath G., Wagner F.W. 1991. Purification and characterization of a soybean cotyledon aminopeptidase. *Plant Science*, 75, 1: 9-17
- Černe M. 1997. Stročnice. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 140 str.
- Demir Y., Güngör A. A., Duran E. D., Demir N. 2008. Cysteine protease (capparin) from capsules of caper (*Capparis spinosa*). *Food Technology and Biotechnology*, 46, 3: 286-291
- Drobnič-Košorok M. 1997. Eksperimentalne metode v biokemiji: učbenik s praktičnimi primeri. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta: 132 str.
- Duarte I.C., Ricardo C.P.P., Duquemagalhaes M.C. 1993. Peptide-hydrolases in cotyledons of germinating lupin. *Phytochemistry*, 33: 35-40

- Fink A. 1993. Poganjki in kalčki: vse leto sveža zelenjava. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 97 str.
- Frederiks M.W., Mook R.F.O. 2004. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on *in situ* zymography of gelatinases: Review and protocols. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52, 6: 711-722
- García-Carreño F.L., Dimes L.E., Haard N.F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 214, 1: 65-69
- Gomis-Rüth F.X. 2003. Structural aspect of the matzincin clan of metalloendopeptidases. *Molecular Biotechnology*, 24, 2: 157-202
- Gotar A. 2009. Vpliv suše na fenilalanin-aminopeptidazno aktivnost v ekstraktih fižolovih listih. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 65 str.
- Heussen C., Dowdle E.B. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry*, 102, 1: 196-202
- Hou W.C., Chen H.J., Chen T.E., Lin Y.H. 1999. Detection of protease activities using specific aminoacyl or peptidyl *p*-nitroanilides after sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis and its applications. *Electrophoresis*, 20, 3: 486-490
- Hummel K.M., Penheiter A.R., Gathman A.C., Lilly W.W. 1996. Anomalous estimation of protease molecular weights using gelatin-containing SDS-PAGE. *Analytical Biochemistry*, 233, 1: 140-142
- Johnson R., Storey R. 1985. Aminopeptidase activity from germinated jojoba cotyledons. *Plant Physiology*, 79, 3: 641-645
- Kaberdin V.R., McDowall K.J. 2003. Expanding the use of zymography by the chemical linkage of small, defined substrates to the gel matrix. *Genome Research*, 13: 1961-1965
- Kirmizi S., Gülcü G. 2006. Protein mobilization and proteolytic enzyme activities during seed germination of broad bean (*Vicia faba* L). *Zeitschrift fur Naturforschung C-A, Journal of Biosciences*, 61, 3/4: 222-226
- Kleiner D.E., Stetlerstevenson W.G. 1994. Quantitative zymography: Detection of picogram quantities of gelatinases. *Analytical Biochemistry*, 218, 2: 325-329
- Konopka A., Zakharova T. 2002. Evaluation of methods to solubilize and analyze cell-associated ectoenzymes. *Journal of Microbiological Methods*, 51, 3: 273-282
- Laskowski M. Jr., Kato I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, 49, 1: 593-626

- Lawrence P.K., Koudal K.R. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. Electronic Journal of Biotechnology, 5, 1, doi: 10.2225/vol5-issue1-fulltext-3: 13 str.
- Laeremans H., Demaegdt H., De Backer J., Le M.T., Kersemans V., Michotte Y., Vauquelin G., Vanderheyden P.M. L. 2005. Metal ion modulation of cystinyl aminopeptidase. Biochemical Journal, 390: 351–357
- Leber T.M., Balkwill F.R. 1997. Zymography: A single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. Analytical Biochemistry, 249, 1: 24-28
- Ludidi N., Abrahams G., Gehring C. 2006. AtGC1, a dual function *Arabidopsis thaliana* protein with guanylyl and cysteine protease activity. Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology, 143, Suppl. 1: S179-S179
- Makowski G.S., Ramsby M.L. 1996. Calibrating gelatin zymograms with human gelatinase standards. Analytical Biochemistry, 236, 2: 353-356
- Manoj K. P., Lu J., Tan K.S.W. 2007. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-κB-dependent manner. Eukaryotic cell, 7, 3: 435-443
- Matsui M., Fowler J.H., Walling L.L. 2006. Leucine aminopeptidases: Diversity in structure and function. Biological Chemistry, 387, 12: 1535-1544
- Michaud D. 1998. Gel electrophoresis of proteolytic enzymes. Analytica Chimica Acta, 372, 1: 173-185
- Michaud D., Asselin A. 1995. Application to plant-proteins of gel-electrophoretic methods. Journal of Chromatography A, 698, 1-2: 236-279
- Mikkonen A. 1992. Purification and characterization of leucine aminopeptidase from kidney bean cotyledons. Physiologia Plantarum, 84, 3: 393-398
- Müllertz S. 1974. Different molecular forms of plasminogen and plasmin produced by urokinase in human plasma and their relation to protease inhibitors and lysis of fibrinogen and fibrin. Biochemical Journal, 143, 2: 273-283
- NC-IUBMB. 2007. Enzyme nomenclature. London, NC-IUBMB-Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology: 2 str.
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (junij 2011)
- Osvald J., Kogoj Osvald M. 1994. Pridelovanje zelenjave na vrtu. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 158 str.

Osvald J., Kogoj Osvald M. 2003. Integrirano pridelovanje zelenjave. Ljubljana, ČZD
Kmečki glas: 265 str.

Palma J.M., Sandalio L.M., Javier Corpas F., Romero-Puertas M.C., McCaethy I., del Rio
L.A. 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: Role of
peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 6-8: 521-530

Polgár L. 2004. Catalytic mechanisms of cysteine peptidases. V: *Handbook of proteolytic enzymes*. 2nd ed. Vol. 2: Cysteine, serine and threonine peptidases. Barret A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F (eds.). London, Elsevier: 1072-1079

Pyrzyna M., Szawłwska U., Bielawski W., Zdunek-Zastocka E. 2010. Purification,
biochemical characterisation, and mass spectrometry analysis of phenylalanine
aminopeptidase from the shoots of pea plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 2: 609-
617

Ramakrishna V., Ramakrishna R. P. 2006. Storage protein degradation in germinating
Indian bean (*Dolichos lablab* L. var. *lignosus*) seeds. *Seed Science and Technology*, 34,
1: 161-168

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. 1998. Molecular and
biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology
Reviews*, 62, 3: 597-605

Rawlings N.D., Barrett A.J. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290, 1: 205-218

Rawlings N.D., Morton F.R., Barrett A.J. 2006. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic
Acids Research*, 34: 270-272

Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., Kong J., Barrett A.J. 2009. MEROPS: the
peptidase. Cambridge, Wellcome Trust Sanger Institute: database
<http://merops.sanger.ac.uk/index.htm> (september 2011)

Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., Kong J., Barrett A.J. 2008. MEROPS: the
peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 36, 1: 320-325

Ren W.P., Fridman R., Zabrecky J.R., Morris L.D., Day N.A., Sloane B.F. 1996.
Expression of functional recombinant human procathepsin B in mammalian cells.
Biochemical Journal, 319, 3: 793-800

Rogers J.C., Dean D., Heck G.R. 1985. Aleurain: A barley thiol protease closely related to
mammalian cathepsin H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United
States of America*, 82, 19: 6512-6516

Salvesen G., Nagase H., 1989. Inhibition of proteolytic enzymes. V: *Proteolytic enzymes:
A practical approach*. Benyou R.J. (ed.). Oxford, IRL Press: 259 str.

- Sathish H.A., Kumar P.R., Pakash V. 2009. The differential stability of the left and right domains of papain. *Process Biochemistry*, 44, 7: 710-716
- Schaller A. 2004. A cut above the rest: The regulatory function of plant proteases. *Planta Medica*, 220, 2: 183-197
- Sopanen T., Mikola J. 1975. Purification and partial characterization of barley leucine aminopeptidase. *Plant Physiology*, 55, 5: 809-814
- Syngene. 2011. Gel imaging for fluorescence application, CAM-GX-CHEMI HR system. A division of synoptics Ltd. Cambridge, Syngene: 1 str. <http://www.syngene.com/g-box/> (oktober 2011)
- Szawłowska U., Zdunek-Zastocka E., Bielawski W. 2011. Biochemical characterisation of prolyl aminopeptidase from shoots of triticale seedlings and its activity changes in response to suboptimal growth conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 11: 1342-1349
- Taylor A. 1993. Aminopeptidases: structure and function. *FASEB Journal*, 7, 2: 290-298
- Tian L.H., Zhang L., Zhang J., Song Y., Guo. Y. 2009. Differential proteomic analysis of soluble extracellular proteins reveals the cysteine protease and cystatin involved in suspension-cultures cell proliferation in rice. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, 1794, 3: 459-467
- Turk B. 2006. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 9: 785-799
- Turk B., Turk V., Turk D. 1997. Structural and functional aspects of papain like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biological Chemistry*, 378, 3-4: 141-150
- Vierstra R.D. 1996. Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology*, 32, 1-2: 275-302
- 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.
- Watanabe Y., Matsushima S., Yamaguchi A., Shioi Y. 2009. Characterization and cloning of cysteine protease that is induced in green leaves of barley. *Plant Science*, 176, 2: 264-271
- Weder J.K.P., Kaiser K.P. 1995. Fluorogenic substrates for hydrolase detection following electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 698, 1-2: 181-201
- Wynn E.K., Murray D.R. 1985. Aminopeptidases isolated from cotyledons of Cowpea, *Vigna unguiculata*. *Annals of Botany*, 56, 1: 55-60

ZAHVALA

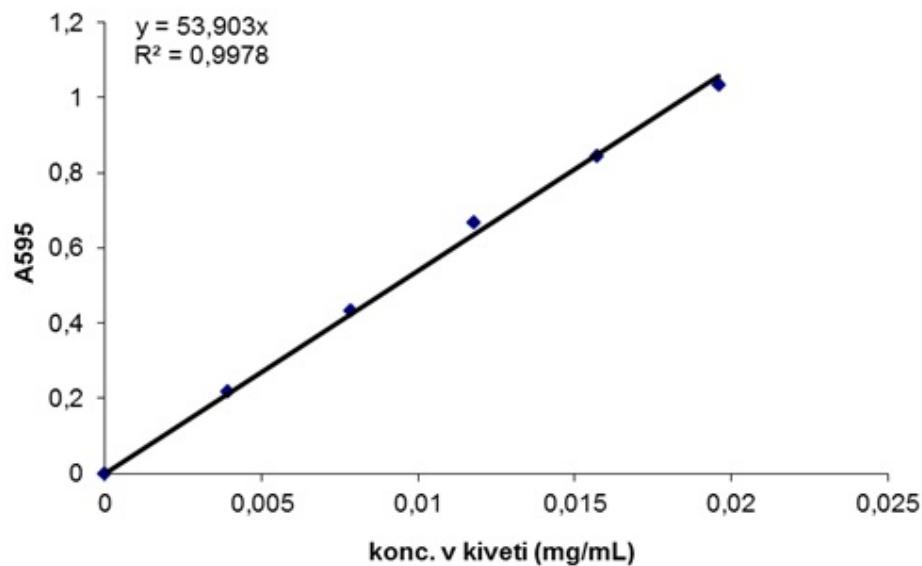
Za vso strokovno pomoč in potrežljivost pri nastajanju te diplome se iskreno zahvaljujem doc. dr. Blažu Cigiću. Hvala za odlično mentorstvo!

Zahvaljujem se tudi somentorici asist. dr. Mihaeli Skrt za njeno pomoč in izredno prijaznost.

Hvala doc. dr. Poloni Jamnik za recenzijo diplomskega dela.

Posebna zahvala gre staršem in sošolki Vesni Oprešnik, ki so mi v vseh letih študija stali ob strani in me vzpodbjali.

PRILOGE



Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje skupnih proteinov po Bradfordu

Priloga B: Izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 595 nm pri določitvi vsebnosti proteinov v ekstraktih posameznih delov rastlin

VZORCI	A ₅₉₅
LEČA poganjek in korenina kalčka skupaj	0,31075
LEČA klični list in endosperm	0,82402
LEČA celoten kalčke (poganjek, korenina, klični list in endosperm)	0,61890
LEČA list odrasle rastline	0,30847
LEČA list odrasle rastline pod stresom	0,45609
LEČA korenina odrasle rastline	0,20222
LUCERNA poganjek in korenina kalčka skupaj	0,13829
LUCERNA klični list in endosperm	0,96198
LUCERNA celoten kalčke (poganjek, korenina, klični list in endosperm)	0,58224
LUCERNA list odrasle rastline	*
LUCERNA list odrasle rastline pod stresom	0,12024
LUCERNA korenina odrasle rastline	0,15806
FIŽOL poganjek in korenina kalčka skupaj	0,49052
FIŽOL klični list in endosperm	0,54394
FIŽOL celoten kalčke (poganjek, korenina, klični list in endosperm)	0,55150
FIŽOL list odrasle rastline	0,51819
FIŽOL list odrasle rastline pod stresom	0,19848
FIŽOL korenina odrasle rastline	0,48901

* ni podatka zaradi pomanjkanja rastlinskega materiala

Priloga C: Primer izračuna masne koncentracije topnih proteinov (γ)

1. LEČA poganjek in korenina kalčka skupaj

$$A_{595}=0,31075$$

$$\text{Topnih proteinov} = \frac{A_{595}}{53,908} \cdot R_{f1} \cdot R_{f2}$$

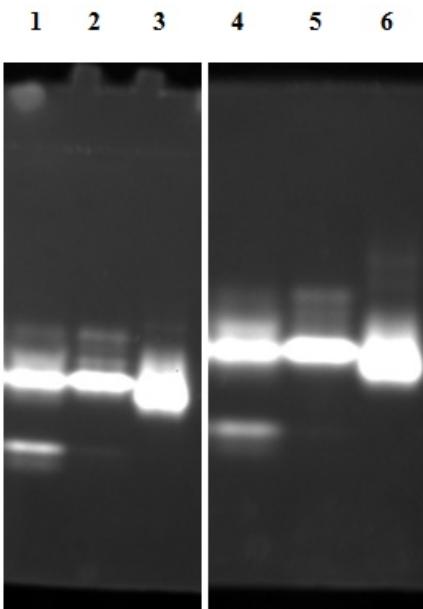
$$\text{Topnih proteinov} = \frac{0,31075}{53,908} \cdot 51 \cdot 5 = 1,471 \text{ mg/ml}$$

2. LEČA korenina odrasle rastline

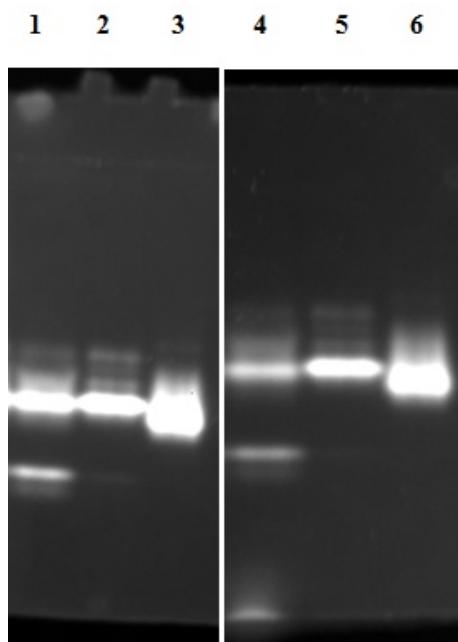
$$A_{595}=0,20222$$

$$\text{Topnih proteinov} = \frac{A_{595}}{53,908} \cdot R_{f1} \cdot R_{f2}$$

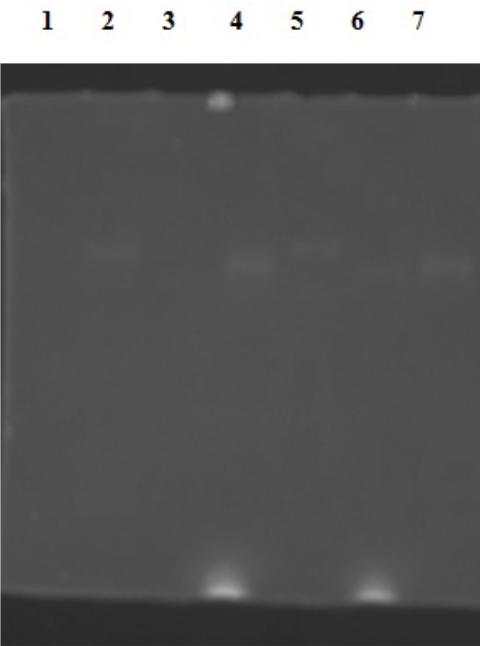
$$\text{Topnih proteinov} = \frac{0,20222}{53,908} \cdot 51 \cdot 2 = 0,389 \text{ mg/ml}$$



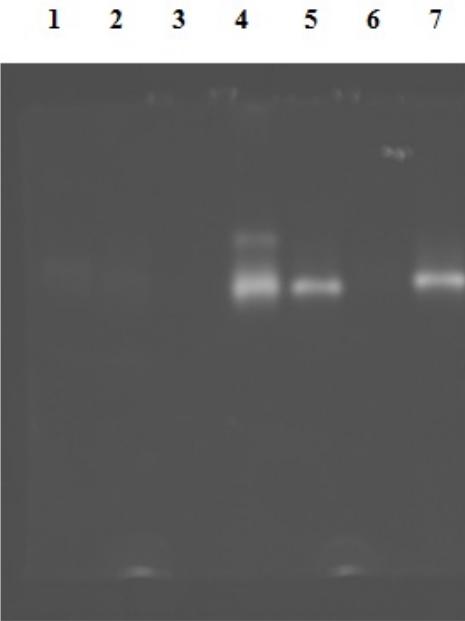
Priloga D: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC in Ala-AMC v ekstraktih fižola češnjevca (1, 4), leče (2, 5) ter lucerne (3, 6). Pri določevanju aminopeptidazne aktivnosti vzorcev 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT in ZnCl₂.



Priloga E: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC in Ala-AMC v ekstraktih fižola češnjevca (1, 4), leče (2, 5) ter lucerne (3, 6). Pri določevanju aminopeptidazne aktivnosti vzorcev 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT in CaCl₂.

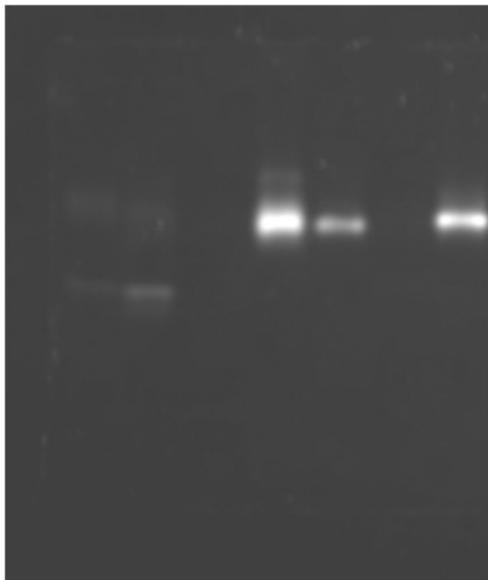


Priloga F: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Gly-AMC v ekstraktih poganjka in korenine kalčka skupaj vzorcev fižola češnjevca (1), lucerne (4), leče (5), soje (6), čičerike (7), ter kličnega lista in endosperma vzorca fižola češnjevca (2).



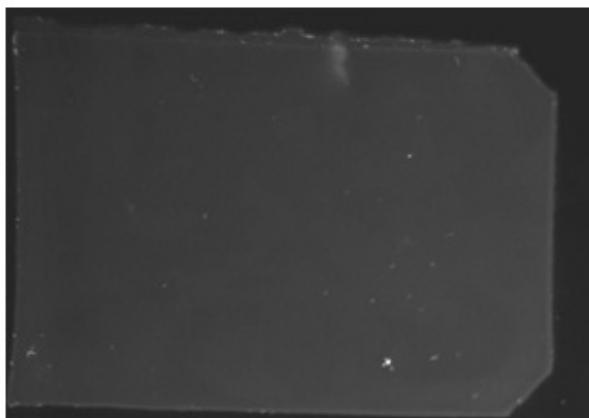
Priloga G: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Met-AMC v ekstraktih poganjka in korenine kalčka skupaj vzorcev fižola češnjevca (1), lucerne (4), leče (5), soje (6), čičerike (7), ter kličnega lista in endosperma vzorca fižola češnjevca (2).

1 2 3 4 5 6 7



Priloga H: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Trp-AMC v ekstraktih poganjka in korenine kalčka skupaj vzorcev fižola češnjevca (1), lucerne (4), leče (5), soje (6), čičerike (7), ter kličnega lista in endosperma vzorca fižola češnjevca (2).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Priloga I: Gel po 30 minutnem spiranju z destilirano vodo po končani analizi aminopeptidazne aktivnosti v ekstraktih z mešanicami fluorogenih substratov.