
UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mojca VRHOVNIK

**KARAKTERIZACIJA ALANIN-AMINOPEPTIDAZE
IN LEVCIN-AMINOPEPTIDAZE IZ FIŽOLOVIH
LISTOV GLEDE NA OSKRBO Z VODO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

**KARAKTERIZACIJA ALANIN-AMINOPEPTIDAZE IN LEVCIN-
AMINOPEPTIDAZE IZ FIŽOLOVIH LISTOV GLEDE NA OSKRBO
Z VODO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CHARACTERISATION OF ALANINE AMINOPEPTIDASE AND LEUCINE
AMINOPEPTIDASE THAT ARE AFFECTED BY DROUGHT FROM BEAN
LEAVES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

POPRAVKI

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

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

Mentor: doc. dr. Blaž Cigić

Somentor: dr. Marjetka Kidrič

Recenzent: doc. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca Vrhovnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 577.15: 581.15: 635.65(043)=863
- KG encimi/ stres/ suša/ *Phaseolus vulgaris*/ proteolitični encimi/ aminopeptidaze/ alanin-aminopeptidaze/ levcin-aminopeptidase
- AV VRHOVNIK, Mojca
- SA CIGIĆ, Blaž (mentor)/ KIDRIČ, Marjetka (somentorica)/ VIDRIH, Rajko (recezent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2007
- IN KARAKTERIZACIJA ALANIN-AMINOPEPTIDAZE IN LEVCIN-AMINOPEPTIDAZE IZ FIŽOLOVIH LISTOV GLEDE NA OSKRBO Z VODO
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 84 str., 9 pregl., 24 sl., 80 vir.
- IJ sl
- JL sl/en
- AI Aminopeptidaze so encimi, ki katalizirajo cepitev peptidnih vezi z N-terminalnega konca proteinov. Razgradnja proteinov, ki je odvisna od nivoja aktivnosti mnogih proteolitičnih encimov, je eden od mehanizmov odziva rastlin na strese iz okolja. Ugotovili smo, da se v listnih ekstraktih navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*) podvrženega suši, aminopeptidazna aktivnost na substrate prolin-p-nitroanilid, metionin-p-nitroanilid, lizin-p-nitroanilid, levcin-p-nitroanilid, arginin-p-nitroanilid in alanin-p-nitroanilid zmanjša, na fenilalanin-p-nitroanilid pa poveča, medtem ko se pri poplavljjanju aktivnost na vse omenjene substrate poveča, razen na arginin-p-nitroanilid, ki se ne spremeni. Optimizirali smo metodo izolacije dveh aminopeptidaz, ki smo jih poimenovali AAP (alanin-aminopeptidaza aktivna na alanin-p-nitroanilid) in LAP (levcin-aminopeptidaza aktivna na levcin-p-nitroanilid), iz listov *P. vulgaris* sorte Zorin. Uporabili smoobarjanje z amonijevim sulfatom, gelsko izključitveno kromatografijo in ionsko izmenjevalno kromatografijo in jih na ta način medsebojno ločili ter delno očistili. AAP kaže največjo aktivnost na alanin-p-nitroanilid, LAP pa na fenilalanin-p-nitroanilid. Z uporabo različnih inhibitorjev smo pokazali, da tako AAP kot LAP najverjetneje spadata med aminopeptidaze serinskega katalitičnega tipa. Navidezna molekulska masa, določena z gelsko izključitveno kromatografijo, AAP je 83 kDa, LAP pa 72 kDa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 577.15: 581.15: 635.65(043)=863
- CX enzymes/ plant physiology/ stress/ drought/ bean/ *Phaseolus vulgaris*/ proteolytic enzymes/ aminopeptidases/ alanine aminopeptidase/ leucine aminopeptidase
- AU VRHOVNIK, Mojca
- AA CIGIĆ, Blaž (supervisor)/ KIDRIČ, Marjetka (co-advisor)/ VIDRIH, Rajko (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2007
- TI CHARACTERISATION OF ALANINE AMINOPEPTIDASE AND LEUCINE AMINOPEPTIDASE THAT ARE Affected BY DROUGHT FROM BEAN LEAVES
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 84 p., 9 tab., 24 fig., 80 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Aminopeptidases catalyze the cleavage of amino acid residues from the N-terminal end of proteins. Breakdown of proteins, which depends on the levels of activities of a number of proteolytic enzymes, is one of the mechanisms of the response of plants to environmental stress. We have shown that, in leaf extracts of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under water deficit, aminopeptidase activity against phenylalanine-p-nitroanilide increases, while activity against proline-p-nitroanilide, methionine-p-nitroanilide, lysine-p-nitroanilide, leucine-p-nitroanilide, arginine-p-nitroanilide and alanine-p-nitroanilide decreases. In contrast, flooding increased activity against all these substrates except arginine-p-nitroanilide, which remains unchanged. We optimized the method of isolation of two aminopeptidases, which we named AAP (alanine aminopeptidase) and LAP (leucine aminopeptidase) from leaves of *P. vulgaris* cv. Zorin. Ammonium sulphate precipitation, gel exclusion chromatography and ion exchange chromatography enabled us to separate the two enzymes and partially purify them. AAP shows greatest activity against alanine-p-nitroanilide, and LAP against phenylalanine-p-nitroanilide. Use of a variety of inhibitors led to the conclusion that AAP and LAP belong to aminopeptidases of the serine catalytic type. The apparent molecular mass, determined by gel exclusion chromatography, of AAP is 83 kDa and that of LAP 72 kDa.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NAVADEN FIŽOL (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	3
2.1.1 Morfološke in fiziološke karakteristike	3
2.1.2 Pomen za prehrano.....	5
2.1.3 Vpliv oskrbe z vodo na fiziološkem in biokemijskem nivoju	6
2.2 RASTLINSKE AMINOPEPTIDAZE	9
2.2.1 Razdelitev aminopeptidaz.....	10
2.2.1.1 Predstavniki rastlinskih aminopeptidaz glede na katalitski tip.....	11
2.2.1.1.1 Aminopeptidaze, ki pripadajo metalopeptidazam	11
2.2.1.1.2 Aminopeptidaze, ki pripadajo cisteinskim peptidazam	14
2.2.1.1.3 Aminopeptidaze, ki pripadajo serinskim peptidazam.....	15
2.2.2 Aminopeptidaze v družini <i>Fabaceae</i>	15
2.2.3 Vloga rastlinskih aminopeptidaz.....	16
2.2.3.1 Vpliv biotskega in abiotskega stresa na aktivnost aminopeptidaz	18
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 MATERIALI	20
3.1.1 Rastlinski material.....	20
3.1.1.1 Vzgoja fižola na polju in izbor listov za izolacijo aminopeptidaz	20
3.1.1.2 Vzgoja fižola pod kontroliranimi pogoji	20
3.1.1.2.1 Kalitev	20
3.1.1.2.2 Rastni pogoji.....	21
3.1.1.2.3 Izbor fižolovih listov za poskuse	21
3.1.2 Kemikalije	21
3.2 METODE	22
3.2.1 Določanje vsebnosti vlage	22
3.2.2 Homogenizacija rastlinskega materiala in priprava ekstraktov.....	22

3.2.2.1 Priprava ekstrakta iz fižolovih listov	22
3.2.3 Določanje vsebnosti proteinov.....	23
3.2.3.1 Metoda po M. Bradford	23
3.2.3.2 Merjenje absorbance pri valovni dolžini 280 nm	23
3.2.4 Določanje aminopeptidaznih aktivnosti	24
3.2.4.1 Določanje aktivnosti s prekinitvijo reakcije po določenem času	24
3.2.4.2 Kontinuirno določanje encimskih aktivnosti.....	25
3.2.5 Obarjanje proteinov iz listnega ekstrakta z acetonom	26
3.2.6 Obarjanje proteinov z amonijevim sulfatom	26
3.2.7 Gelska izključitvena kromatografija	27
3.2.8 Dializa proteinskih vzorcev.....	28
3.2.9 Tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov (FPLC) z ionsko izmenjavo.....	29
3.2.10 Koncentriranje frakcij iz ionsko izmenjevalne kromatografije.....	30
3.2.11 NaDS- poliakrilamidna elektroforeza.....	31
3.2.12 Ugotavljanje N-terminalnega zaporedja izoliranih aminopeptidaz	31
4 REZULTATI.....	32
4.1 OPTIMIZACIJA POSTOPKA	32
4.1.1 Vsebnost proteinov in aminopeptidazna aktivnost v ekstraktu zamrznjenih listov fižola	32
4.1.2 Obarjanje proteinov z acetonom.....	33
4.1.3 Obarjanje proteinov z amonijevim sulfatom	35
4.1.3.1 Frakcijsko obarjanje proteinov iz ekstrakta listov Zorina 0 % do 90 % amonijevega sulfata	35
4.1.3.2 Frakcijsko obarjanje proteinov iz ekstrakta listov Zorina: 0 → 30 % → 40 % in 0 → 30 % → 50 % amonijevega sulfata	37
4.1.3.3 Frakcijsko obarjanje proteinov iz ekstrakta listov Zorina: 0 → 40 % → 50 % amonijevega sulfata.....	39
4.1.4 Vpliv shranjevanja na aminopeptidazno aktivnost.....	41
4.2 IZOLACIJA AMINOPEPTIDAZ	42
4.2.1 Priprava ekstrakta in obarjanje proteinov z amonijevim sulfatom	42
4.2.2 Gelska izključitvena kromatografija	44
4.2.2.1 Umerjanje kolone	44
4.2.2.2 Gelska izključitvena kromatografija proteinov P ₃₀₋₅₀	47
4.2.2.3 Gelska izključitvena kromatografija proteinov P ₃₀₋₄₀₋₅₀	50

4.2.3 Tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov (FPLC) na koloni z ionskim izmenjevalcem.....	51
4.2.3.1 Ugotavljanje primernega gradienta koncentracije NaCl za elucijo aminopeptidaz, vezanih na anionski izmenjevalec Q Sepharose FF	51
4.2.3.2 Vpliv dialize na vsebnost proteinov in aminopeptidazno aktivnost frakcij, ki jih dobimo pri gelski kromatografiji.....	52
4.2.3.3 Kromatografija frakcij dobljenih po gelskih kromatografijah proteinov iz oborine P ₃₀₋₅₀ in oborine P ₃₀₋₄₀₋₅₀	52
4.2.3.3.1 Kromatografija frakcij S	52
4.2.3.3.2 Kromatografija frakcij L	55
4.2.3.3.3 Kromatografija frakcij D	57
4.2.4 Karakterizacija izoliranih aminopeptidaz	59
4.2.4.1 NaDS-poliakrilamidna elektroforeza.....	59
4.2.4.2 Ugotavljanje aktivnosti na različne sintetične substrate.....	61
4.2.4.2.1 Ugotavljanje aktivnosti na različne sintetične substrate v ekstraktih listov fižola, ki je rasel na polju.....	61
4.2.4.2.2 Ugotavljanje aktivnosti na različne sintetične substrate v frakcijah, ki smo jih dobili po FPLC	62
4.2.4.3 Vpliv specifičnih peptidaznih inhibitorjev na aktivnost.....	62
4.2.4.4 N-terminalno zaporedje vzorcev S ₄ I _L in D ₃ I _S	63
4.3 VPLIV VODNEGA STRESA NA AKTIVNOST AP	64
4.3.1 Vsebnost vlage in topnih proteinov v listih stresiranih rastlin	64
4.3.2 Primerjava aktivnosti AP v listnih ekstraktih sušnih in kontrolnih rastlin	65
4.3.3 Primerjava aktivnosti AP v listnih ekstraktih poplavljenih in kontrolnih rastlin	67
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	69
5.1 RAZPRAVA.....	69
5.2 SKLEPI.....	74
6 POVZETEK.....	75
7 VIRI	78
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nekatere za prehrano pomembne hranilne snovi v g/100g očiščenega fižola (Černe in Vrhovnik,1992)	6
Preglednica 2: Klani in družine metalopeptidaz, ki vsebujejo aminopeptidaze (Rawlings in sod., 2006)	12
Preglednica 3: Proizvajalci uporabljenih encimskih substratov in inhibitorjev	21
Preglednica 4: Vsebnost proteinov (mg/ml) in specifična aminopeptidazna aktivnost, izražena kot $\{\Delta A_{405} / (\text{mg} \times \text{min})\}$; na substrat APNA (AS) in na substrat LPNA (LS) v ekstraktih (A).....	33
Preglednica 5: Delež topnih proteinov, alanin-aminopeptidazne aktivnosti in levcin-aminopeptidazne aktivnosti, ki preostane po shranjevanju	41
Preglednica 6: Aktivnosti na substrata APNA in LPNA, merjene pri 405 nm, tistih proteaz, ki so se eluirale z ionskega izmenjevalca Q Sepharose FF z določenimi koncentracijami NaCl.....	51
Preglednica 7: Vsebnost proteinov (mg/ml), A_{280} in specifična aktivnost na substrata APNA in LPNA v frakcijah, ki jih dobimo pri gelski kromatografiji pred in po dializi....	52
Preglednica 8: Aktivnost encimov v vzorcih S ₂ I _S in D ₄ I _S po FPLC na substrate APNA, LPNA, LysPNA in PhePNA.....	62
Preglednica 9: Vsebnost vlage (VV) v odstotkih (m_1-m_2/m_1 ; m_1 pomeni svežo maso, m_2 pa suho maso lista) in vsebnost proteinov v listih fižola, ki je rasel pod kontroliranimi pogoji (kontrola, suša in poplavljjanje)	64

KAZALO SLIK

Slika 1: Rastlina fižola (Černe, 1997)	3
Slika 2: Cvet fižola (Černe, 1997)	4
Slika 3: a.) Vezava dipeptidne substratne molekule v hipotetično aktivno mesto peptidaze, katere dvovalentni kovinski kation aktivira molekulo vode, preko katere se izvrši nukleofilni napad na peptidno vez. b.) Reakcija, ki kaže kako se dipeptid hidrolitično razcepi v dve aminokislini (Boyer, 2005)	12
Slika 4: Enačba, ki prikazuje tvorbo acil-encimskih intermediatov (EA) (Rawlings in Barrett, 2004).....	14
Slika 5: Umeritvena krivulja, ki smo jo naredili z raztopinami govejega serumskega albumina različnih koncentracij v območju od 1 do 16 µg/ml	33
Slika 6: Obarjanje ekstrakta fižolovih listov, sorte Češnjevec, s 60 % acetonom, 80 % acetonom in 89 % acetonom.....	34
Slika 7: Postopno obarjanje ekstrakta fižolovih listov, sorte Zorin, s 50 %, 70 % in 90 % amonijevim sulfatom	36
Slika 8: Obarjanje ekstrakta fižolovih listov, sorte Zorin, s 30 % amonijevim sulfatom in nato vzporedno s 40 % in 50 % amonijevim sulfatom.....	38
Slika 9: Obarjanje ekstrakta fižolovih listov, sorte Zorin, s 40 % amonijevim sulfatom in nato s 50 % amonijevim sulfatom	40
Slika 10: Obarjanje ekstrakta fižolovih listov, sorte Zorin, z amonijevim sulfatom od 30 % do 50 % nasičenja.....	43
Slika 11: Eluciskji diagram, ki smo ga dobili po gelski izključitveni kromatografiji standardov, modrega dekstrana, govejega serumskega albumina, aldolaze, jajčnega albumina, kimotripsinogena, mioglobina in DNP-alanina	45
Slika 12: Eluciski diagram, ki smo ga dobili po gelski izključitveni kromatografiji, s proteini znanih molekulskeih mas (goveji serumski albumin, jajčni albumin, kimotripsinogen).....	46
Slika 13: Umeritvena krivulja za določitev približnih molekulskeih mas proteinov v vzorcu	47
Slika 14: Elucijski diagrami encimov, ki kažejo aktivnosti na substrata APNA in LPNA, merjeno pri 405 nm in absorbanca pri 280 nm. Na kolono smo nanesli: 4 ml raztopine P ₃₀₋₅₀ (A), 4,2 ml raztopine P ₃₀₋₅₀ (B) in 3,4 ml raztopine P ₃₀₋₅₀ (C).....	49
Slika 15: Elucijski diagram encimov, ki kažeta aktivnost na substrata APNA in LPNA, merjeno pri 405 nm in absorbanca pri 280 nm, na kolono smo nanesli 3,4 ml raztopine oborine P ₃₀₋₄₀₋₅₀	50

Slika 16: FPLC kromatogram, ki smo ga dobili z nanosom (A) 2 ml, (B) 0,5 ml frakcij S ₂ (slika 14B) in (C) 2 ml frakcij S ₄ (slika 15) na kolono Mono Q 5/50 GL in elucijo z gradientom NaCl	54
Slika 17: FPLC kromatogram, ki smo ga dobili z nanosom (A) 2 ml frakcij L ₂ (slika 14B) in (B) 2 ml frakcij L ₄ (slika 15) na kolono Mono Q 5/50 GL in elucijo z gradientom NaCl	56
Slika 18: FPLC kromatogram, ki smo ga dobili z nanosom (A) 2ml frakcij D ₃ (slika 14C) in (B) 3 ml frakcij D ₄ na kolono Mono Q 5/50 GL in elucijo z gradientom NaCl.....	58
Slika 19: NaDS - poliakrilamidna elektroforeza frakcij iz ionskoizmenjevalne kromatografije	60
Slika 20: Primerjava aktivnosti pri treh vrednostih pH na 7 različnih substratov (PhePNA, ProPNA, MetPNA, LysPNA, LPNA, ArgPNA in APNA)	61
Slika 21: Aktivnosti na substrat APNA v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev (EDTA, E-64, PMSF in Pefabloc SC) v vzorcih S ₂ I _S (A) in D ₄ I _S (B).....	63
Slika 22: Specifična aktivnost na substrate Phe-PNA, Met-PNA, Pro-PNA, Lys-PNA, LPNA, Arg-PNA in APNA v listih fižola izpostavljenega suši, izražena v odstotkih od specifične aktivnosti v listih kontrolnih rastlin.....	66
Slika 23: Specifična aktivnost na substrate Phe-PNA, Met-PNA, Pro-PNA, Lys-PNA, LPNA, Arg-PNA in APNA v listih fižola, ki je rasel na polju, izražena v odstotkih od specifične aktivnosti v listih kontrolnih rastlin.....	67
Slika 24: Specifična aktivnost na substrate Phe-PNA, Met-PNA, Pro-PNA, Lys-PNA, LPNA, Arg-PNA in APNA v listih poplavljenega fižola glede na specifično aktivnost na omenjene substrate v kontrolnih listih, izražena v odstotkih (od kontrole).....	68

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AP	aspartatna proteaza (aspartic protease)
APNA	L-alanin-p-nitroanilid (L-alanine-p-nitroanilide)
ArgPNA	L-arginin-p-nitroanilid (L-arginine-p-nitroanilide)
A ₂₈₀	absorbanca pri valovni dolžini 280 nm (absorbance at 280 nm)
A ₄₀₅	absorbanca pri valovni dolžini 405 nm (absorbance at 405 nm)
BSA	goveji serumski albumin (bovine serum albumine)
CP	cisteinska proteaza (cysteine proteases)
Da	dalton (daltone); enota za določanje molekulske mase
DMSO	dimetil sulfoksid (dimethylsulphoxide)
DNP-L-alanin	deoksiribonukleotidfosfat alanin (deoxyribonucleotidephosphate alanine)
DDT	ditiotreitol (dithiothreitol)
EDTA	etielendiamin tetraacetna kislina (ethylenediamine tetra-acetic acid)
E-64	E-64 (L-3-carboxy-2,3-trans-epoxypropionyl-leucylamido (4-guanidino) butane)
FPLC	tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov (Fast Protein Liquid Chromatography)
LPNA	L-levcin-p-nitroanild (L-leucin-p-nitroanilide)
LysPNA	L-lizin-p-nitroanild (L-lysine-p-nitroanilide)
M	molarnost (molarity); enota za množinsko koncentracijo (mol/L)
MP	metaloproteaza (metalloprotease)
MES	morfolinoetansulfonska kislina (morpholino ethanesulphonic acid)
NaDS	natrijev dodecil sulfat (sodium dodecyl sulphate)
PhePNA	L-fenilalanin-p-nitroanild (L-phenyl-p-nitroanilide)
pI	izoelektrična točka (isoelectric point)
PMSF	fenilmethylsulfonil fluorid (phenylmethylsulphonyl fluoride)
ProPNA	L-prolin-p-nitroanild (L-proline-p-nitroanilide)
PP	fosfatni pufer (phosphate buffer)
PVP	polivinilpirolidon (polyvinyl pyrrolidone)
SP	serinska proteaza (serine protease)
TCA	triklorocetna kislina (trichloroacetic acid)
VV	vsebnost vlage (water content)
Ψ _W	vodni potencial (water potential)

1 UVOD

Aminopeptidaze so encimi, ki katalizirajo cepitev peptidnih vezi z N-terminalnega konca proteinov. Skupaj z ostalimi proteazami sodelujejo v razgradnji proteinov, ki je pomembna stopnja v kontroli njihovega delovanja in presnove. Proteolizni encimi imajo velik pomen v procesih kalitve, rasti in razvoja rastlin, vpletene pa so tudi v odziv rastlin na abiotiski in biotski stres. Razgradnja proteinov je namreč bistvena za adaptacijo na spremembe okolja.

O značilnostih in vlogi aminopeptidaz v odzivu rastlin na vodni stres je na voljo zelo malo literarnih podatkov. Vendar lahko predpostavimo, glede na vlogo presnove proteinov v obrambi oz. adaptaciji na sušo in poplavljanje, da so aminopeptidaze vpletene v te procese. Razgradnja proteinov ob vodnem stresu je pomembna zaradi 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 vodni stres.

Objavljeno je, da pomanjkanje vode povzroči zvišanje genskega izražanja in aktivnosti heksamerne levcin-aminopeptidaze v paradižniku *Lycopersicon esculentum*, ki ima molekulsко maso približno 250 kDa in spada med metalopeptidaze. Za ta encim je sicer znano, da sodeluje v obrambi rastline pred mehanskimi poškodbami in napadom patogenov. Pod vplivom suše se spreminjata tudi aktivnosti dveh aminopeptidaz aktivnih proti alanin-*p*-nitroanilidu (APNA) in levcin-*p*-nitroanilidu (LPNA) v listih fižola *Phaseolus vulgaris*.

Dosedanje raziskave kažejo, da ta dva encima nista metalopeptidazi, vendar bolj podrobno nista bili karakterizirani.

Naslednji potreben korak v smeri razumevanja vloge in delovanja omenjenih encimov v odzivu fižola na vodni stres je izolacija in karakterizacija encimov, ki povzročajo opažene aktivnosti. Raziskave molekulskih osnov odziva fižola na vodni stres so zlasti pomembne, ker stročnice zavzemajo osrednji položaj v kmetijstvu in človeški prehrani povsod po svetu. Za navadni fižol (*Phaseolus vulgaris*) je značilna sorazmerno velika vsebnost proteinov, ki vsebujejo esencialne aminokisline, in je tako zdrav nadomestek za meso, poleg tega pa je tudi dober vir vlaknin, mineralov in vitaminov. Že sedaj pa kar 60 % svetovne pridelave fižola poteka v razmerah pomanjkanja vode in verjetno se bo ta delež še povečal. Za hitro spreminjajoče se podnebje postaja karakteristično, da se obdobja suše menjavajo s poplavami. Zato je pomembno pojasniti mehanizme, s katerimi se fižol prilagodi na vodni stres, da bomo lahko izboljšali njegove agronomiske lastnosti in dobili odpornnejše sorte.

1.1 NAMEN DELA

Namen tega diplomskega dela je bil:

- optimizacija metod izolacije alanin-aminopeptidaze (AAP) in levcin-aminopeptidaze (LAP) iz listov fižola (*Phaseolus vulgaris*) sorte Zorin, za katere je bilo predhodno ugotovljeno, da se njihova aktivnost spreminja v suši;
- preliminarna karakterizacija teh aminopeptidaz;
- ugotavljanje vpliva vodnega stresa (suše in poplavljanja) na njihovo aktivnost.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NAVADEN FIŽOL (*Phaseolus vulgaris* L.)

Fižol (*Phaseolus* sp.) spada v družino *Fabaceae*-metuljnic, imenujemo jih tudi stročnice ali leguminoze, ki razvijejo pokončno razvejana in posamezne vrste tudi plezajoča steba. Navadni fižol, fižol za zrnje, se razdeli v tri podvrste, te pa naprej na kultivarje; in sicer:

- *Phaseolus vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *nanus* (L.) Aschers f.sine fibris- nizki stročji fižol, Aschers f. *fibriferis* – nizki fižol za zrnje (sem spadata kultivarja Češnjevec in Zorin s katerima sem delala)
- *Phaseolus vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *Intermedius*- srednje visoki fižol
- *Phaseolus vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *vulgaris* (*Phaseolus vulgaris* L. var. *Communis* Aschers) – visoki stročji fižol, fižol preklar, stročnik (Černe, 1997).

Za fižol je značilno, da vsebuje veliko beljakovin in tudi vsebnost drugih hranilnih snovi je kar visoka, kar vodi k temu, da ga prištevamo med zelenjavnice z največjo prehransko vrednostjo. Zaradi velike vsebnosti beljakovin lahko nadomesti meso, kar tudi v Sloveniji postaja vse bolj aktualno. Zato je pomemben za poljedelstvo in človeško prehrano.

Začetek gojenja fižola v Evropi za razliko od drugih stročnic sega v novejše obdobje, saj je bil prenesen iz Amerike po njenem odkritju.

Fižol je topotno zahtevna rastlina, ki dobro uspeva v območjih z zmerno toplim do toplim podnebjem. Je občutljiv za točo, dež in meglo. Dobro uspeva na srednje globokih, strukturnih, zmerno vlažnih tleh, bogatih z organskimi ostanki. Je enoletnica.



Slika 1: Rastlina fižola (Černe, 1997)

2.1.1 Morfološke in fiziološke karakteristike

Vrsta *Phaseolus vulgaris* L. je najbolj razširjena vrsta enoletnih zelnatih fižolov. Glavno korenino ima bolj slabo razvito v primerjavi s stranskimi koreninami, kjer so gomolji večinoma videti kot izrastki na korenini, v katerih so nitrifikacijske bakterije. Korenine prodro zelo globoko v zemljo, tudi več kot meter.

Steblo fižola je tanko, okroglo, šesterorobo. Posamezno steblo imenujemo vit, vse viti enega grma pa vitje. Vitje z listi in stroki ali tudi brez njih da fižolinko ali fižolovino, tako imenujemo predvsem fižolovo slamo.

Po višini stebla razdelimo kultivarje v:

- nizke ali grmičarje (30 do 50 cm),
- srednje visoke ali dračarje (50 do 130 cm),
- visoke ali preklarje (od 150 do 600 cm).

Nizki kultivarji razvijejo kratke internodije z razvejanim stebлом v naslednjih oblikah:

- pokončen, ozek grm, stroki so ob steblu in višji od tal;
- grm se razrašča bolj na široko, listi in stroki so pri tleh in stran od stebla,
- grmi so kopasti, široki, vrhovi listov zaviti navzdol, stroki pa pri tleh;
- grmi so redki, z vitičastimi stebli, listi so na daljših pecljih, stroki se ne dotikajo tal.

Visoki kultivarji imajo dve obliki rasti:

- vzporedno, pri tej je vitje pri zemlji in na vrhu prekle enako na široko,
- stožčasto, pri kateri je vitje pri tleh širše kot pri vrhu prekle ali natiča.

Na steblu so izmenično razporejeni listki s prilistki. Po vzniku se najprej razvijeta dva srčasta in celoroba lista, vsi naslednji listi pa so trojni ali tridelni, z dolgimi listnimi peclji in prilistki. Srednji listič, kateri je na vrhu nekoliko zašiljen, je vedno močneje razvit kot stranska dva. Listi in lističi pa so gibljivi. Listi so lahko rumenozeleni, svetlozeleni ali temnozeleni. Običajno so dlakavi, na listnih žilah pa so sledovi antociana. Posamezni listi so lahko trikotne, robaste ali okrogle oblike. Listi so lahko majhni ali pa veliki, gladki ali celo mehurjasti, z ravno ali nekoliko izobčeno listno ploskvijo. Listne žile so bolj ali manj debele.

Cvetovi so dvospolni, dolgi 1 do 1,5 cm, izraščajo iz nodijev in so posamični ali dvojni pri tleh, višje na viti so združeni v socvetje s po 3 do 8 cvetovi. Cvetovi so lahko beli, rumeni, bledorožnati, rdeči ali vijolični. Kultivarji, kateri imajo obarvano cvetje, imajo tudi obarvano seme.

Cvet je sestavljen iz čašnih in venčnih listov. Čaša je cevasto zvončasta in s petimi zelenimi listi. Venčni listi so različno obarvani, sestavljeni so iz dveh stranskih kril: zgoraj je jadro ali zastavica, ki je daljša od kril, spodaj pa je iz dveh listov sestavljena ladjica. Devet prašnikov je zraslih v cev, deseti je prost. Plodnica je nadrasla, vrat brazde je spiralno zavit, zgoraj dlakav, v sredini razširjen.



Slika 2: Cvet fižola (Černe, 1997)

Fižol se večinoma samooprašuje (avtogramija), vendar je možno tudi opraševanje s tujim cvetnim prahom, ki ga prenašajo žuželke.

Plod je nitast ali breznitni strok, dolg 10 do 30 cm in širok 2 do 3 cm. Je zelen, rumen ali pisan, raven do ukrivljen, na prerezu pa okrogel, ploščat ali ploščato okrogel.

Seme je 1 do 2 cm dolgo, 0,7 do 1,1 cm široko, bele, rumene, rožnate, rjave, temnordeče, vijolične, modrikaste, sive, črne ali pisane barve, lahko je ob popku obrobljeno z drugo barvo ali ima obarvan popek. Po obliku je lahko ledvičasto, ovalno, jajčasto, okroglo ali elipčasto. Po debelini in teži je seme zelo različno, od velikosti riževega semena do kostanja, zato se masa tisočih semen razlikuje (od 300 do 1000 g). Seme fižola obdrži kalivost tri do štiri leta, odvisno od vlage v semenu in načina shranjevanja.

Če so razmere ugodne, fižol vznikne v 7 do 10 dneh po setvi, kadar so temperature nižje, pa šele po 20 do 22 dneh.

Pri nizkih in zgodnjih kultivarjih je v ugodnih rastnih razmerah potrebno od setve do tehnološke zrelosti 50 do 70 dni. Visoki kultivarji dosežejo tehnološko zrelost v 100 do 130 dneh po setvi.

Fižol začne cveteti od 8. do 9. ure zjutraj, običajno se cvetovi ne zapirajo. Posamezen cvet cvete dva do tri dni. Pri večini kultivarjev se začno cvetovi odpirati od najnižje do najvišje ležečih, pojav imenujemo bazipetalnoccetenje. Pri nekaterih visokih kultivarjih iz Mehike in Kolumbije pa najprej začno cveteti zgornji cvetovi in pozneje spodnji, takšno cvetenje je akropetalno.

Odvisno od števila cvetov v enem socvetju, cvete eno socvetje 10 do 14 dni, celotna rastlina pa 20 do 25 dni. Če začnemo obirati stročje, se pri nizkih kultivarjih podaljša cvetenje na 50 dni, pri visokih kultivarjih pa lahko tudi na 100 dni. Strok se razvije 10 do 15 dni po cvetenju.

2.1.2 Pomen za prehrano

Navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.) je danes tretja najpomembnejša kulturna rastlina, je med najpomembnejšimi stročnicami, ki se uporablja za prehrano ter daleč najpomembnejša med stročnicami za zrnje (Singh, 1999).

Pridelan za stročje in zrnje, je pomemben vir energije, proteinov (1 % do 3 % v svežem stroku in 20 % do 24 % v suhem zrnu), vlaknin, mineralov in vitaminov za milijone ljudi, tako v državah v razvoju kot tudi v razvitih državah.

Ker vsebuje takšno količino beljakovin, v vegeterjanski prehrani vsaj deloma nadomešča meso, sicer pa se beljakovine fižola dopolnjujejo z beljakovinami mesa, jajc, mleka in žitaric. Fižol vsebuje veliko prehranskih vlaknin, ki omogočajo dobro prebavo in občutek sitosti. V črevesju nabreknejo in s tem spodbudijo črevesne aktivnosti. S tem preprečijo zaprtje in vnetna obolenja črevesja. Topne vlaknine nižajo raven holesterola v krvi in upočasnijo prebavo, kar omogoča enakomernejšo raven sladkorja v krvi.

Fižol vsebuje tudi vitamine, predvsem tiste iz skupine B: tiamin, riboflavin in folno kislino ter vitamin E.

Minerali, ki prevladujejo v fižolu pa so fosfor, železo, nikelj in kobalt.

Preglednica 1: Nekatere za prehrano pomembne hrnilne snovi v g/100g očiščenega fižola (Černe in Vrhovnik, 1992)

	voda	beljakovine	mašcobe	ogljikovi hidrati	sladkorji	vlaknine	minerali
stročji fižol	86,3-94,0	1,2-3,0	0,14-0,4	2,91-7,7	2,4	0,87-2,00	0,68-0,80
fižol v zrnju, suh	11,2-16,5	20,0-23,7	1,3-2,0	47,0-61,7	-	3,88-4,00	3,9

Pomembnost te rastline je privedla do ustanovitve mednarodnega konzorcija za izboljšanje njegove kakovosti, pridelka in odpornosti na stres in bolezni (Broughton in sod., 2003).

2.1.3 Vpliv oskrbe z vodo na fiziološkem in biokemijskem nivoju

Stročji fižol vsebuje od 86,3 do 94,5 % vode, medtem ko suh fižol v zrnju vsebuje veliko manj vode in sicer od 11,2 do 16,5 % (Černe in Vrhovnik, 1992). Voda je za vse žive organizme življenskega pomena. Rastlinam omogoča povezavo z okoljem in je splošen notranji dejavnik življenskih procesov, ki se v njih dogajajo. Rastline so sestavljene predvsem iz vode, ki predstavlja 70 - 95 % sveže teže višjih rastlin, pri čemer je delež vode v posameznih rastlinskih organih različen.

Voda ima v rastlinskih celicah in tkivih mnogotere funkcije (Fitter in Haj, 1983; Stevanović in Janković, 2001). Del vode v rastlini se z elektrostatičnimi silami in vodikovimi vezmi, kot vodni ovoj, drži različnih molekulskih in makromolekulskih struktur celice in jih tako stabilizira. Tako vezana voda je na površini molekul v citoplazmi in mikrofibrilah celične stene. Že majhno zmanjšanje vsebnosti te vode privede do velikih sprememb v strukturi protoplazme in s tem tudi v splošnem delovanju celic in tkiv. Njena količina znaša le 5 - 10 % skupne vode v celici.

Voda je neobhodna tudi za odvijanje biokemijskih procesov v celicah oziroma zato, da se obdrži fiziološka funkcionalnost rastline. Njena izredno pomembna funkcija je, da je donor elektronov v Hillovi reakciji pri fotosintezi. Sodeluje tudi v mnogih drugih kemijskih reakcijah v rastlinskih celicah. Voda je tudi medij, ki služi za prenos snovi med rastlinskimi celicami in skozi prevodne elemente ksilema in floema. Je idealno topilo za elektrolite in polarne snovi in je kot taka pomembna pri procesu prenosa organskih in anorganskih snovi po rastlinskem organizmu, s katerimi vzdržuje rast in razvoj rastlin. Te snovi pridejo v rastlino, le če so raztopljljene v vodi in njihov prenos po rastlini je možen le s pomočjo vode (Cowan, 1994; Bohnert in sod., 1995; Heldt, 1997; Stevanović in Janković, 2001).

Voda je torej neposredno vključena v osnovne fiziološke procese v celici. Istočasno zasičenost vakuol rastlinskih celic z vodo omogoča nastanek hidrostatsičnega tlaka ali turgorja, ki je povratni tlak celične stene na celično vsebino. Z njim se ustvarja čvrstost celic in s tem rigidnost listov, korenin in drugih rastlinskih organov. Tako turgor vzdržuje mehansko strukturo hidroskeleta rastline, oziroma rigidnost cele rastline. Kljub temu, da so rastline pretežno sestavljene iz vode, jo je le 1 % vključene v njihovo biomaso. Preostalih

99 % se neprestano na eni strani črpa iz tal, v katerih rastlina raste in na drugi strani z transpiracijo izpareva v okolje.

Pomanjkanje vode in prekomerna oskrba z vodo (poplave) v rastlinskih celicah, ter tako tudi pri fižolu, izzoveta več fizikalnih in biokemijskih sprememb. Navadni fižol spada med homoiohidrične rastline, za katere je značilno, da so sposobne vzdrževati razmeroma stalno vlažnost telesa z dobro uravnavano vodno ekonomijo. Ko pride v okolju do spremembe vlažnosti, celice fižola uravnovesijo vodne odnose z veliko centralno vakuolo. Med krajšimi obdobji omejene preskrbe z vodo v okolju, ko se spremenijo vodni odnosi v rastlini, se protoplazma nasičuje z vodo iz vodne raztopine celične vakuole. Hkrati pa je ta vakuola prepreka za povratne spremembe celične strukture med procesi dehidracije in rehidracije. Celica zaradi nje ni dovolj prožna in tako ne zdrži spremembe zaradi krčenja in širjenja. Listi imajo razvito kutikulo, ki omeji izparevanje vode iz rastlinskega telesa. Z listnimi režami (razporedom in položajem) uravnavajo transpiracijo in imajo tudi razvit močan koreninski sistem (McKersie in Leshem, 1994).

Kar 60 % svetovne pridelave fižola raste v razmerah pomanjkanja vode. Suša je drugi največji stresni dejavnik, takoj za rastlinskimi boleznimi, ki znižujejo pridelek. Opazovanja na polju, v rastlinjaku in poskusi v kontroliranem okolju so pokazali, da je vrsta *P. vulgaris* razmeroma občutljiva na sušo v primerjavi z ostalimi zrnatimi stročnicami (Costa Franca in sod., 2000; Cruz de Carvalho in sod., 1998; Schneider in sod., 1997; Singh, 1999).

Sušni stres povzroči poškodbe na ravni celičnih membran in zato se poveča njihova propustnost. Če je stres močnejši, lahko celo razpadejo celični organeli oziroma celica izgubi enovitost. Zato je za rastline pomembna tista strategija odpornosti, ki omogoča ohranitev membranske enovitosti. Ob sušnem stresu se spremeni hidratacijski ovoj celičnih membran in s tem se spremenijo tudi lastnosti njihovih makromolekul in anorganskih ionov (Bohnert in sod., 1995).

Pri vrsti *P. vulgaris* so celične membrane eden od prvih delov celice, na katere vpliva pomanjkanje vode. Ohranitev membranske enovitosti in s tem preprečitev iztoka ionov iz celice skozi membrano je eden najbolj pomembnih načinov obrambe pred pomanjkanjem vode. Ugotovili so, da imajo sorte fižola z večjo toleranco na sušo poleg večje odpornosti celičnih membran tudi večjo osmotsko prilagoditev (Costa Franca in sod., 2000; Vasquez-Tello in sod., 1990).

Turgorski pritisk se ob suši zmanjša. Venenje neolesenelih, nadzemnih delov rastline ob izgubi vode je posledica padca turgorja. Če ne pride do porušenja celične enovitosti, se ob ponovnem sprejemu vode turgor spet vzpostavi. Zaradi sprememb celičnega volumna se spremenijo tudi prostorska razmerja med plazmalemo, tonoplastom in membranami celičnih organelov. Spremenijo se tudi koncentracija in dinamični odnosi molekul znotraj celice. Vse to močno vpliva na potek metabolnih procesov v celicah.

Fižol se izogne pomanjkanju vode z mehanizmi, ki vključujejo razvoj ekstenzivnega koreninskega sistema in učinkovito zapiranje listnih rež. Pri opazovanju različnih sort fižola so ugotovili, da je eden prvih učinkov suše na rastline zapiranje listnih rež, ki se dogodi pred detekcijo kakršnegakoli pomanjkanja vode v listih. Mehanizmi s katerimi fižol tolerira pomanjkanje vode, še posebej pri nizkem vodnem stanju rastlin, vključujejo procese na ravni celic. Najbolj pomembna je osmotska prilagoditev in zaščita membranskih sistemov. Osmotska prilagoditev omogoči vzdrževanje rasti korenin ali poganjkov v stresnih razmerah, ker nadzira celični turgor. Struktturna neokrnjenost celičnih

membran je pomembna za preživetje daljših in kratkotrajnih sušnih obdobij. Preživetje sadik oziroma semenskih rastlin in rastlin med vegetativno fazo pa je pomembno za donos pridelka ob suši (Costa Franca in sod., 2000). Cruz de Carvalho in sod. (1998) so ugotovili, da signal iz korenin pri vrstah *P. vulgaris* in *V. unguiculata* opozarja rastni poganjek o pomanjkanju vode.

Eden od fizioloških pokazateljev oskrbe z vodo je skupni vodni potencial (Ψ_w), s katerim izražamo energetski status vode v celicah. Le-ta je v rastlinskih tkivih negativen, ker ne gre nikoli za čisto vodo, temveč so v njej raztopljene številne substance. Vrednost vodnega potenciala zavisi od okolja v katerem rastlina raste. Ob suši se Ψ_w v rastlinskih celicah zmanjša, ob poplavah pa poveča. V fižolovih listih, ki so dobro preskrbljeni z vodo, je Ψ_w okoli -0,33 do -0,45 MPa (Hieng in sod. 2004). Ob naraščajočem pomanjkanju vode se Ψ_w zmanjšuje, vendar je pri različnih sortah fižola hitrost njegovega padanja različna (Hieng in sod. 2004), kar govorji o različnem odzivu glede zapiranja listnih rež in zmanjšanja transpiracije. Ψ_w v že zelo uvelih fižolovih listih je -1,5 MPa in ker je pri takih rastlinah zmanjšan turgorski pritisk, je zmanjšana rast celic in tako tudi vseh rastlinskih organov (Šoštarič, 2005). Vendar se pri tem Ψ_w rastline ob ponovnem zalivanju še lahko opomorejo, kar pa več ni mogoče, ko Ψ_w pade pod -2,00 MPa (Hieng in sod. 2004).

Med osmotskim prilagajanjem pride do kopičenja topljencev, ki močno zmanjšajo osmotski potencial in tudi vodni potencial rastlinske celice. Tem topljencem pravimo osmotsko aktivne substance ali osmotiki. Zaradi zmanjšanja osmotskega potenciala, se poveča razlika v vodnem potencialu med celico in zunanjem okolju, posledica tega pa je povečano osmotsko prehajanje vode iz okolja v celico. Z osmoregulacijo, se ob pomanjanju vode v okolju, ohranja celični turgor, tako da je omogočen nadaljnji potek metabolnih procesov. Med anorganskimi osmotiki so pomembni K^+ , Na^+ in Cl^- ioni. Med organskimi osmotiki pa: poliolji, ogljikovi hidrati, metilirane kvarterne amonijeve soli, proste aminokisline in organske kisline. Za te organske osmotike velja, da ne povzročajo denaturacije metabolno pomembnih encimov in poškodb ter jih zato imenujemo kompatibilni osmotiki (Morgan, 1984; Živković in sod., 2005).

O odzivu fižola na poplavljjanje je znano, da je navadni fižol *P. vulgaris* občutljiv na poplavljjanje (Withe in Molano, 1994). Ugotovili so, da daljše poplavljjanje po obilnem deževju bolj poškoduje fižol, kot kumarice ali koruzo, njegov razvoj pa je upočasnjen (Wolfe in sod., 1995). Nasadi fižola v mnogih vaseh v Keniji so bili uničeni v poplavah med leti 1997 do 1998 (Takaoka, 2005). Eksperimenti v rastlinjaku so pokazali, da se vrednosti vodnega potenciala, stomatalne prevodnosti, transpiracije in fotosinteze zmanjšujejo s trajanjem tega stresa. Celo enodnevno poplavljjanje zmanjša fotosintezo in negativno vpliva na suho težo rastlin. Po prenehanju stresa se omenjeni fiziološki parametri sicer izboljšujejo, vendar tudi po sedmih dneh rastline ne kažejo transpiracije karakteristične za kontrolo (Singh in sod., 1991). Preživetje fižola pod stresom poplavljanja je slabše, če je do stresa prišlo po cvetenju rastlin, večina rastlin pa preživi, če so poplavljene pred cvetenjem. Doprinos semen je izrazito manjši (Lakitan in sod., 1992). Po drugi strani je gojenje fižola v tleh nasičenih z vodo, ne pa poplavljenih, pokazalo, da je fiziološko zorenje sicer upočasnjeno, vendar je suha teža nadzemnih delov rastlin večja, vodni status in doprinos semen pa izboljšana, čeprav manj kot v primeru soje (White in Molano, 1994).

Vodni stres vpliva tudi na spremembe v izražanju genov. Pomanjkanje vode vpliva na izražanje genov v koreninah navadnega fižola. Toores in sod. je uspel identificirati 24 genov, neposredno povezanih s sušo, v zgodnji sušni fazи se inducirajo geni od PvD1 do PvD20, v pozni sušni fazи pa PvD21, PvD22, PvD28 in PvD29. Med različno izraženimi geni zasledimo tudi tiste, ki kodirajo proteine, tako kot *Pvnced1*, ki kodira 9-cis-epoksikarotenoid-dioksiogenaza (to je encim, ki katalizira ključni korak v biosintezi abscizinske kisline), PvD21 kodira miozin VIII in PvD22, ki kodira kaloz-sintazo (Torres in sod., 2006).

Pomanjkanje vode povzroči v fižolovih listih tudi spremembe nivojev aktivnosti proteolitičnih encimov ali proteaz (Roy-Macauley in sod. 1992; Hieng in sod. 2004; Šoštarič, 2005). To so encimi, ki razgrajujejo proteine in so zelo raznoliki. Nekaj jih je izoliranih tudi iz fižolovih listov in sicer dve cisteinski proteinazi, FLCP-1 in FLCP-3, z molekulsko maso 30 in 25,1 kDa ter serinska proteaza iz klana SC z molekulsko maso 72 kDa (Popovič in sod. 1998 in 2002). Ugotovili so, da na aminopeptidazi, ki pripadata razredu SP, suša oziroma pomanjkanje vode različno vplivata. Aktivnost SP aktivnih na aminopeptidazni substrat LPNA se poveča, medtem ko se aktivnost na aminopeptidazni substrat APNA z ionsko izmenjevalno kromatografijo loči na dva vrhova, ki se v različnih stopnjah pomankanja vode različno spreminjata (Šoštarič, 2005). Hieng in sod. (2004) pa so ugotovili, da se aktivnost dveh različnih aminopeptidaz (substrat APNA in LPNA) pri najbolj občutljivi vrsti fižola Starogorski čern poveča, pri bolj odporni vrsti Tiber pa se ti aktivnosti zelo zmanjšata. Pri Zorinu so bile spremembe aktivnosti zelo majhne. Te študije kažejo na vpletenost aminopeptidaz v odziv fižola na sušo.

2.2 RASTLINSKE AMINOPEPTIDAZE

Aminopeptidaze so encimi, ki v vseh živih organizmih sodelujejo v razgradnji proteinov, torej spadajo v veliko skupino proteolitičnih encimov tj. proteaz.

Rastlinske proteaze so danes predmet številnih raziskav, saj je proteoliza vključena v fiziologijo in razvoj rastline. Proteaze so vključene v ves življenski cikel rastlin, od mobilizacije rezervnih proteinov med kalitvijo semen do iniciacije celične smrti in staranja rastlin (Callis, 1995).

Proteaze ali peptidaze (EC 3.4) so skupina hidrolitičnih encimov, ki cepijo peptidno vez proteinov in peptidov. Peptidna vez, ki je tarča cepitve, je lahko znotraj polipeptidne verige ali pa na njenih koncih. Zato je eden izmed kriterijev za razvrščanje proteaz zasnovan na mestu cepitve peptidne vezi. Po njemu so proteaze razdelili na endopeptidaze (cepijo znotraj polipeptidne verige) in eksopeptidaze (cepijo na koncih polipeptidnih verig) (Barrett, 1986). Aminopeptidaze pripadajo slednji skupini.

Po tej klasifikaciji so endopeptidaze razdelili na osnovi različnih katalitskih mehanizmov na serinske (EC 3.4.21), cisteinske (EC 3.4.22), aspartatne (EC 3.4.23), metaloproteinaze (EC 3.4.24) ter proteaze z neznanim mehanizmom delovanja (EC 3.4.24). Nedavno (Coux in sod. 1996) so okarakterizirali citosolne proteasome in jih uvrstili kot treoninske proteaze (EC 3.4.25). Odkrili so tudi glutamatno endopeptidazo (Fujinaga in sod., 2004). Eksopeptidaze so razdelili glede na specifičnost odcepljanja različno velikih fragmentov z

amino ali karboksilnega terminalnega konca polipeptidne molekule na aminopeptidaze (EC 3.4.11), dipeptidil-peptidaze (EC 3.414), tripeptidil-peptidaze (EC 3.4.-), karboksipeptidaze (EC 3.4.16-18), peptidil-dipeptidaze (EC 3.4.15), dipeptidaze (EC 3.4.13), tripeptidaze (EC 3.4.11.4) in omega peptidaze (EC 3.4.19) (Barrett, 1986).

Raziskave pa so pokazale tudi drugačne možnosti delitve proteaz, saj imajo nekateri encimi tako endo- kot tudi eksopeptidazno aktivnost. Rawlings in Barrett (1993) sta predlagala novo razdelitev, ki upošteva evolucijsko povezanost encimov kot nadgradnjo že obstoječe razdelitve po mehanizmu katalitskega delovanja. Tako je vsaka peptidaza uvrščena v določen tip, glede na kemične skupine, ki sodelujejo pri katalizi. Posamezni tipi so nato razdeljeni v družine, ki jih sestavljajo evolucijsko sorodni encimi glede na celotno aminokislinsko zaporedje ali vsaj del v okolini aktivnega mesta. Družine, med katerimi je opazna evolucijska povezanost vidna v primarni in/ali terciarni strukturi proteina, a ni statistično signifikantna, so združene v klan. V isti družini lahko najdemo tako encime z endo- kot z eksopeptidazno aktivnostjo, to pa zato, ker imajo pri razvrstitvi evolucijska in strukturna podobnost ter katalitski mehanizem delovanja prednost pred substratno specifičnostjo (Rawlings in Barrett, 1993).

2.2.1 Razdelitev aminopeptidaz

Kot smo omenili, so aminopeptidaze po eni klasifikaciji proteolitičnih encimov uvrščene v posebno skupino eksopeptidaz (EC 3.4.11); 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).

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 očutljivost encima na različne inhibitorje kot so:
ubenimeks (bestatin), puromicin itd. (Taylor, 1993).

Po Rawlings-u in Barrett-u (1993) aminopeptidaze razdelimo po katalitičnem mehanizmu, tako kot vse ostale peptidaze, ne glede na mesto cepitve peptidne vezi. Do sedaj je znanih šest katalitičnih tipov peptidaz, v katerih imajo glavno vlogo pri razgradnji peptidne vezi kovinski ion ali aminokislinski preostanki v aktivnem mestu encima. Zato so ti osnovni tipi peptidaz poimenovani: metalopeptidaze, aspartatne peptidaze, glutamatne peptidaze, cisteinske peptidaze, serinske peptidaze in treoninske peptidaze. Obstajajo pa tudi peptidaze, ki jim še niso uspeli določiti katalitičnega mehanizma in jih uvrščajo med peptidaze neznanega katalitičnega tipa.

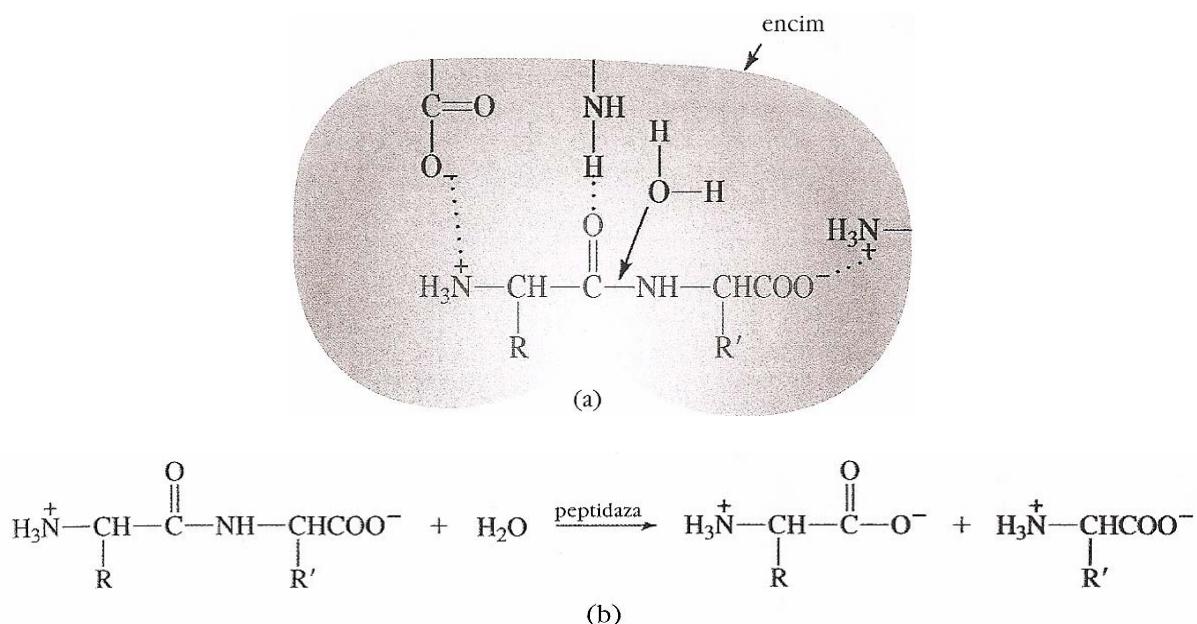
2.2.1.1 Predstavniki rastlinskih aminopeptidaz glede na katalitski tip

Vse do sedaj znane aspartatne peptidaze so endopeptidaze, kar pomeni, da ta katalitski tip ne vsebuje aminopeptidaz. V klanu glutamatnih peptidaz je za zdaj družina G1, ki ravno tako nima aminopeptidaz. Treoninski katalitični tip so odkrili v kompleksnih makromolekularnih endopeptidaznih sistemih in se torej ne nanaša na aminopeptidaze.

2.2.1.1.1 Aminopeptidaze, ki pripadajo metalopeptidazam

Večina do zdaj znanih aminopeptidaz pripada katalitičnemu tipu metalopeptidaz. Pri njih dvovalentni kovinski kation aktivira molekulo vode, preko katere se izvrši nukleofilni napad na peptidno vez (slika 3). Najpogostejša kovina najdena v metalopeptidazah je cink, vendar se namesto njega v nekaterih encimih tega tipa 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.

Delovanje metalopeptidaz je torej večinoma povezano s kemijo cinka. Cink ima izredno prilagodljivo koordinacijsko sfero (elektronsko stukturo), ki mu omogoča doseči širok spekter koordinacijskih števil in s tem geometrij pri tvorbi kompleksov. Če ima cink po vezavi na proteinsko stransko verigo kot ligand pozitiven naboј, potem se lahko v katalizi obnaša kot Lewisova kislina. Če pa se voda vezana na cink spremeni v hidroksid, se cink v tej situaciji obnaša kot baza. Se pravi, da se katalitični cink obnaša amfoterno. Cink s svojo zapolnjeno d-orbitalo nima oksidacijsko-reduksijskih lastnosti značilnih za sosedne prehodne kovine. Zato je v biološkem okolju, čigar redoks potencial se stalno spreminja, cink stabilen kovinski ion.



Slika 3: a.) Vezava dipeptidne substratne molekule v hipotetično aktivno mesto peptidaze, katere dvovalentni kovinski kation aktivira molekulo vode, preko katere se izvrši nukleofilni napad na peptidno vez. Puščica označuje mesto razcepa in kaže, kje peptidno vez napade voda. b.) Reakcija, ki kaže kako se dipeptid hidrolitično razcepi v dve aminokislini. (Boyer, 2005)

Metalopeptidaze so razdeljene v več klanov in mnogo družin, vendar so aminopeptidaze našli samo v nekaterih (preglednica 2).

Preglednica 2: Klani in družine metalopeptidaz, ki vsebujejo aminopeptidaze (Rawlings in sod., 2006)

Klan	Družina	Karakteristični primeri	Primeri rastlin v katerih se nahajajo
MA(E)	M1	Aminopeptidaza N (<i>Homo sapiens</i>)	<i>Oryza sativa</i> , <i>Medicago trunculata</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>
	M61	Glicil aminopeptidaza (<i>Spingomonas capsulata</i>)	/
MF	M17	Levcin aminopeptidaza (<i>Bos taurus</i>)	<i>Hordeum vulgare</i> , <i>Solanum Tuberosum</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>
MG	M24	Metionil aminopeptidaza tip 1 (<i>Escherichia coli</i>)	<i>Oryza sativa</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>
MH	M18	Aminopeptidaza I (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<i>Oryza sativa</i> , <i>Medicago trunculata</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>
	M28	aminopeptidaza (<i>Streptomyces griseus</i>)	<i>Oryza sativa</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>
	M42	Glutamil aminopeptidaza (<i>Lactococcus lactis</i>)	/
MN	M55	D- Aminopeptidaza DppA (<i>Bacillus subtilis</i>)	/
MQ	M29	Aminopeptidaza T (<i>Thermus aquaticus</i>)	<i>Lycopersicon esculentum</i>

Večina metalopeptidaz družine M1 so aminopeptidaze. Družina je široko razprostranjena, prisotna je v večini genomov, ki so jima že določili nukleotidna zaporedja (Rawlings in Barrett, 2004). V njej so poleg aminopeptidaz najdenih v G⁻ in G⁺ bakterijah, cianobakterijah, arhejah, protozojih, glivah in živalih, tudi rastlinske aminopeptidaze. Z N-terminalnega dela peptidne vezi lahko odcepijo različne aminokisline in čeprav je to velikokrat alanin, je poimenovanje »alanin-aminopeptidaze» zavajajoče, saj niso substratno popolnoma specifične. V genomu *A. thaliana* so odkrili štiri homologna nukleotidna zaporedja, ki kodirajo peptidaze te družine, kar se vidi v peptidazni podatkovni zbirki MEROPS (Rawlings in sod., 2006).

Klan MF vključuje aminopeptidaze, ki potrebujejo katalitični kovinski ion za svoje delovanje. Vsebuje samo družino M17 v katero spadajo levcin-aminopeptidaze (LAP) iz bakterij in evkariontov, torej tudi iz rastlin (Kim in Lipscomb, 1993) LAP tega katalitskega tipa so že 1975 izolirali iz ječmenovih in fižolovih semen in jih biokemično okarakterizirali (Mikkonen, 1992). So aktivirane z Mg²⁺ in Mn²⁺ ioni in so termično obstojne peptidaze s pH optimumom v alkalnem (pH 8,5-9,5). Njihova struktura je multimerna in podobna živalskim LAP. Podobne rastlinske LAP so našli še v drugih rastlinah, kot so *A. thaliana* (Bartling in Nosek, 1994) in paradižnik (Gu in Walling, 2000). So homo- ali heteroheksamerni proteini z relativno molsko maso 320-360 kDa.

Večina genomov s popolnoma določenimi nukleotidnimi zaporedji vsebuje eno homologno zaporedje, rastline pa po dva homologna zaporedja, ki kodirata aminopeptidaze te družine. En homolog je kodiran v jedru, drugi pa v genomu kloroplasta. Ta dva homologna zaporedja izvirata iz iste veje evolucijskega drevesa kot homologi najdeni v cianobakterijah. To kaže na možnost, da je prisotnost tega gena v rastlinah rezultat horizontalnega prenosa iz endosimbionta iz katerega izvirajo kloroplasti. Zanimivo je, da genom riža ne vsebuje ustrezne sekvence (Rawlings in sod., 2006).

Potrebno je naglasiti, da so odkrili mnoge druge rastlinske encime, ki hidrolizirajo levcinske kromogene substrate in jih zato imenujemo levcin-aminopeptidaze, vendar je večina monomernih. Zato jih ne smemo zamenjeti za heksamerne LAP (Walling in Gu, 1996).

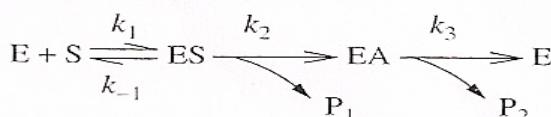
V Klanu MG je za enkrat samo družina M24, ki vsebuje nekaj zelo različnih encimov. Nenavadno je, da ima *Arabidopsis thaliana* 13 homologov metionin-aminopeptidaz, riž pa 6. Teoretično ima lahko rastlina tri metionin-aminopeptidaze, ki jih kodirajo DNA jedra, mitohondrija in kloroplastov, pri tem naj bi zadnji dve bili rezultat horizontalnega prenosa iz endosimbiontov iz katerih so se razvili organeli. Vendar nobeno od rastlinskih zaporedij v primeru teh LAP ni sorodno cianobakterijskim (Rawlings in sod., 2006).

Družina M18 iz klana MH vsebuje aminopeptidazo I iz kvasa, ki je edina bolj podrobno okarakterizirana (Seguí-Real in sod., 1995). Nekaj nukleotidnih zaporedij iz človeške in mišje DNA, kakor tudi iz nekaterih rastlinskih DNA, kaže homologijo s to aminopeptidazo (Rawlings in Barrett, 2004).

2.2.1.1.2 Aminopeptidaze, ki pripadajo cisteinskim peptidazam

Cisteinske peptidaze so v naravi široko razprostranjene in prihajajo iz dokaj različnih evolucijskih poti. Razdeljene so v šest klanov z dvema podklanoma (Rawlings in sod., 2006). Najbolj poznana rastlinska aminopeptidaza je aleurain iz klana CA, ki vsebuje več kot 20 družin. Aleurain je razvrščen v poddružino CA1, ki sicer vsebuje večinoma endopeptidaze in v kateri se nahaja tudi papain, prva peptidaza, ki so jo nedvomno določili kot cisteinsko. Večina študij mehanizmov delovanja je bila narejena s papainom, ki je rastlinska endopeptidaza, ter z njegovimi sorodniki iz klana CA. Vzrok za to so domneve o podobnih katalitičnih mehanizmih cisteinskih peptidaz v drugih klanih, kar pa ni nedvomno potrjeno (Polgár, 2004).

Za peptidaze 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 metalo peptidaz, v katerih je nukleofil aktivirana molekula vode. Za serinske in treoninske peptidaze enako velja, da je nukleofil v katalitičnem mestu del aminokisline iz peptidne verige encima. Katalitični mehanizem cisteinskih peptidaz poleg tega vključuje tudi donor protona. Do sedaj so za vse cisteinske peptidaze, v katerih jim ga je uspelo določiti, ugotovili, da je to histidinski ostanek. Za katalitično delovanje pri nekaterih družinah zadostujeta cisteinski in histidinski ostanek, ponekod pa je potreben tudi tretji ostanek. Sorodnost s serinskimi peptidazami se kaže v tudi tem, da oba tipa peptidaz na njuni reakcijski poti tvorita kovalentne acil-encimske intermediate (slika 4). Njihova tvorba v razgradnji proteinov, katalizirani s papainom, je že dolgo poznana iz kemičnih in kinetičnih študij. Tiolesterski intermediati na reakcijski poti so bili dokazani s spektroskopskimi opazovanji hidrolize kromogenih substratov.



Slika 4: Enačba, ki prikazuje tvorbo acil-encimskih intermediatov (EA), kjer pomeni E- encim, S- substrat, ES- encim-substratni kompleks, P_1 - aminski produkt, P_2 - aciliran produkt, k_{1-} - konstantna hitrost razpada ES, k_{1+} - konstantna hitrost tvorbe ES, k_2 -konstantna hitrost aciliranja in k_3 -konstantna hitrost deaciliranja (Rawlings in Barrett, 2004)

Aleurain je rastlinski ekvivalent sesalskemu katepsinu H. Od večine cisteinskih peptidaz iz papainove naddružine se razlikujeta po tem, da vsebujeta dodatno osemčlensko aminokislinsko verigo, ki je preko disulfidnega mostička povezana s cisteinskim delom v veliki proteazni domeni (Rogers in sod., 1985). Sicer smatrajo, da oba encima lahko delujeta tudi kot endopeptidazi, vendar je njihova eksopeptidazna aktivnost veliko bolj pomembna.

Aleurain je torej prvenstveno aminopeptidaza. Optimalen pH za njegovo delovanje je okoli 5. Hidrolizira tri različne aminopeptidazne substrate, ki spadajo med naftil amide. Vse tri so podobno katalitično učinkovitosti. Encim kaže optimalno aktivnost v temperaturnem

območju od 25 do 30 °C, njegova aktivnost pa zmanjša pri 40 °C (Rogers, 2004). Nahaja se v litičnih vakuolah. V ječmenovem genomu so našli samo eno kopijo gena, ki kodira ta encim. Dejstvo, da je zelo podoben sesalskemu lizosomalnemu katepsinu H in da dve dvokaličnici, *Arabidopsis thaliana* in *Petunia hybrida*, kakor tudi enokaličnica ječmen, vsebujejo zelo ohranjeno obliko aleurina, kaže na njegovo pomembno vlogo v rastlinah (Rogers, 2004).

2.2.1.1.3 Aminopeptidaze, ki pripadajo serinskim peptidazam

Serinske peptidaze so v rastlinah med vsemi proteolitičnimi encimi najštevilčnejše, vendar med njimi ne najdemo bolj podrobno opisanih aminopeptidaz. Nasprosto je opisano malo aminopeptidaz tega katalitičnega tipa, večina 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. Katalitični 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 peptidaze tvori acil-encimski intermediat (slika 4). Do sedaj so odkrili okoli 50 družin serinskih peptidaz, ki so jih razvrstili v 12 klanov. Klan SC vključuje endo- in eksopeptidaze. Med slednjimi so tudi aminopeptidaze. V ta klan spada družina S33, v kateri je prolil-aminopeptidaza iz bakterije *Neisseria gonorrhoeae* (Medrano in sod. 1998). Homologne nukleotidne sekvene so odkrili v več rastlinskih genomih, med drugim pri *Arabidopsis thaliana* in *Oryza sativa* (Rawlings in sod., 2006). Klan SE vključuje večinoma karboksipeptidaze, pa tudi eno bakterijsko aminopeptidazo (Rawlings in sod., 2006). Ta tip encima najdemo tudi v klanu SQ in sicer v družini S58. Z N-terminala cepi alanin (Frere in Van Beeumen, 2004).

Naj na koncu omenimo, da kar nekaj peptidaz še nima znanega katalitičnega mehanizma. Tiste, katerih aminokislinsko zaporedje je znano, so razvrščene v družine. Ko postanejo biokemični podatki dostopni in je katalitični mehanizem za posamezno družino odkrit, jo preimenujejo z ozirom na značilni katalitični tip.

2.2.2 Aminopeptidaze v družini *Fabaceae*

V literaturi smo zasledili malo objav o aminopeptidazah iz fižola oz. rastlin, ki so uvrščene v družino *Fabaceae*. 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. Sestavljen je iz podenot, ki so velike 66 kDa oz. 58 kDa (Mikkonen, 1992). Podobno kot pri živalskih LAP, bestatin inhibira njeno aktivnost. Tako kot LAP iz ječmena, uspešno hidrolizira peptide z Leu in Met na P1 položaju. Aminokisline na položajih P1', P2' in P3' pa vplivajo na hitrost cepitve peptidne verige

(Walling, 2004). Ta encim se v fižolovih semenih nahaja v več izoblikah (Božić in Vujčić, 2005).

V kličnih listih soje (*Glycine max*) so odkrili monomerno aminopeptidazo z molekulsko maso 85 kDa, ki za svojo aktivnost potrebuje proste –SH skupine (Couton in sod. 1991). 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 aminokislin: fenilalanina, triptofana, tirozina in levcina.

V peroksisomih iz listov graha (*Pisum sativum*) so odkrili LAP, katero so okarakterizirali kot serinsko proteazo z največjo aktivnostjo pri pH 7,5 in s pI 5,3. Njena molekulsa masa je 56,8 kDa. Kasneje so v teh organelih odkrili prisotnost še ene LAP (Palma in sod. 2002).

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

2.2.3 Vloga rastlinskih aminopeptidaz

Obstaja veliko objav, v katerih so pokazali vpletenost aminopeptidaznih aktivnosti v različnih stopnjah rasti in razvoja rastlin, kot so kalitev semen, senescenca listov, zorenje plodov in semen, interakcije s patogeni (Walling in Gu, 1996). Aminopeptidaze navadno sodelujejo v končnih fazah razgradnje proteinov, ko hidrolizirajo delno razgrajene oligopeptide, ki nastanejo s cepitvijo peptidnih vezi v proteinih s pomočjo endopeptidaz. Na ta način katalizirajo sproščanje aminokislin. Njihovo vlogo lahko povežemo z dejstvom, da različne stopnje v razvoju rastline oz. njihovih organov, kakor tudi odziv na spremembe okolja, zahtevajo prisotnost različnih proteinov. To pomeni tudi nujnost sprememb v proteinski sestavi. Poleg tega so proteini občutljivi na različne poškodbe, ki privedejo do sprememb v njihovi konformaciji in posledično tudi aktivnosti. Ravno tako lahko pri njihovi biosintezi pride do napak. Take proteine mora rastlina odstraniti. Ker se z razgradnjo proteinov, ki rastlini iz različnih razlogov niso več potrebni ali pa so celo škodljivi, sproščajo aminokisline, so proteolitski encimi, vključno z aminopeptidazami, posredno vključeni tudi v izgradnjo novih proteinov (Schaller, 2004).

Še več, aminopeptidaze ne sodelujejo samo v homeostazni presnovi proteinov, temveč z ostalimi proteazami v selektivni razgradnji regulatornih proteinov kontrolirajo odločilne procese pri rasti rastline, razvoju in njeni obrambi (Taylor, 1993). Na drugi strani so proteaze odgovorne tudi za post-translacijske modifikacije proteinov preko kontrolirane proteolize na zelo specifičnih mestih. Ta specifična proteoliza omogoča zorenje mnogih encimov in je potrebna za združevanje proteinov in celično lokalizacijo, kontrolira aktivnost encimov, regulatornih proteinov in peptidov. Za živalske aminopeptidaze je npr. znano, da so odgovorne za metabolizem regulatornih molekul, kot so hormoni in neurotransmitterji in da tako skrbijo za pravilno regulacijo koncentracije. Sodelujejo tudi v kontroli celičnega cikla. Lahko domnevamo, da imajo tudi v rastlinah podobne vloge

(Taylor, 1993). Judy Callis v svojem preglednem članku (1995) ugotavlja, da je regulirana proteoliza verjetno direktno ali indirektno vpletena v večino celičnih procesov.

Proteaze, torej tudi aminopeptidaze, so tako vpletene mnoge procese rastlinskega življenskega cikla, od mobilizacije in shranjevanja proteinov med klitjem semen, do vstopanja v celično smrt in senescenco (Schaller, 2004).

Aktivnost posameznih aminopeptidaz, tako kot proteaz nasploh, je odvisna od stopnje razvoja in fiziološkega stanja rastlin. Nekatere so aktivne le določen čas v razvoju rastline, npr. med kalitvijo ali med staranjem posameznih organov, medtem ko so druge aktivne skozi celotno življensko obdobje. Specifičnost se kaže tudi v njihovi lokalizaciji, saj se določene pojavijo samo v posameznih rastlinskih organih, tkivih ali celičnih organelih (Brzin in Kidrič, 1995; Vierstra, 1996; Palma in sod., 2002; Schaller, 2004).

Pri pregledu objav v zvezi z aktivnostjo in možno vlogo rastlinskih aminopeptidaz smo zasledili, da imajo mnoge vlogo v kalitvi ali senescenci. Recikliranje vitalnih spojin, še posebno dušikovih, je pomembno za ohranjanje življenja rastline. Staranje listja in kalitev semen sta procesa, ki ponazarjata recikliranje in razkroj proteinov (Ogiwara in sod., 2004). Med mobilizacijo proteinskih rezerv v kalečih semenih in med senescenco ter končno smrtoj skladiščnih organov je veliko vzporednic, saj prvo vodi v drugo, tekom senescence listov npr. pa ravno tako pride do razgradnje proteinov in prenosa prostih aminokislín v plodove, kjer so potrebne za sintezo rezervnih proteinov semen.

Spremembe aminopeptidaznih aktivnosti tekom kalitve semen so opazili pri mnogih rastlinah. V suhih semenih je aktivnost običajno zelo nizka, potem pa se hitro zviša tekom inbibicije in na začetku kalitve. Ugotovili so, da je naraščajoča aktivnost aminopeptidaz povezana z upadanjem količine proteinov med rastjo mladih sadik. V kličnih listih volčjega zoba so po 5 dnevih kalitve, v primerjavi s suhimi semeni in kličnimi listi po 14 dnevih kalitve, odkrili največ molekulskih oblik aminopeptidaz, kar pomeni, da se izrazijo v prvih stopnjah kalitve, nato se njihova aktivnost zmanjša (Duarte in sod., 1993). Podobno so pokazali tudi za LAP aktivnost v bobu (Kirmizi in Guleryuz, 2006), LAP s pH optimumom 6,8 v indijskem fižolu (Ramakrishna in Rao, 2006) in aminopeptidazo z molekulsko maso 75 kDa iz *Vigna radiata* (Yamaoka in sod., 1994). Aktivnost monomerne LAP z molekulsko maso 60 do 90 kDa, ki so jo odkrili v paradižniku, je izražena šele po kalitvi semen, med senescenco in v plastidih etioliranih sadik (Gu in sod., 1996).

Pri senescenci listov so inducirane tudi plastidne proteaze, vključno z aminopeptidazami. Eksperimentalni podatki kažejo, da se razgradnja kloroplastnih proteinov, kot je Rubisko, začne s plastidnimi proteazami, vendar je prispevek teh encimov in drugih proteaz, posebno tistih v litičnih vakuolah, k celotni degradaciji plastidnih proteinov »in vivo» še nejasen (Parrott in sod., 2005).

V listih ovsa je bilo identificiranih pet aminopeptidaz. Aktivnost najbolj aktivne aminopeptidaze je močno padla v času listne rasti. Po skladiščenju proteinov na hladnem je bilo opaziti spremembe v elektroforeznem proteinskem profilu. Iz tega lahko sklepamo, da je prišlo do razgradnje proteinov. Pod temi pogoji so bile nekatere od arginin specifičnih

endopeptidaz povezane s proteinsko verigo, ki vsebuje ribulozabifosfat-karboksilazo, iz česar lahko sklepamo na vlogo v razgradnji proteinov v času odpadanja listov. Aminopeptidaze pa so lahko vpletene v hitro degradacijo peptidov, ki jih dobimo z delovanjem endopeptidaz (van der Valk in sod., 1989).

Metioninske aminopeptidaze dveh tipov, MAP1 in MAP2, so v evkariontih pomembne kot encimi, ki cepijo metionine na N-koncu vsakega *de novo* sintetiziranega proteina. V citoplazmi *Arabidopsis thaliana* so identificirali tri take aminopeptidaze: MAP1A, MAP2A in MAP2B. S pomočjo rastlin z onesposobljenimi geni so ugotovili, da so te aminopeptidaze neophodne za razvoj rastlin po kalitvi, za razliko od gliv in živali, pa sta MAP1A in oba MAP2 tipa med seboj funkcionalno izmenljiva (Ross in sod., 2005).

V *A. thaliana* so odkrili tudi aminopeptidaze občutljive na puromicin, za katere se ve, da sodelujejo v proteolitskih dogodkih bistvenih za celično rast, variabilnost in plodnost širokega spektra organizmov. Mutanta *A. thaliana*, ki nima te aktivnosti, kaže zmanjšano plodnost in ima krajše plodove, z manjšim številom semen kot rastlina, ki vsebuje normalen gen. Ugotovili so, da je aktivnost te aminopeptidaze neobhodna tekom mejoze (Sanchez-Moran in sod., 2004).

Tudi za tiste rastlinske aminopeptidaze, ki so biokemično najbolj karakterizirane, še ni jasno kakšna je njihova vloga. Rastlinska heksamerna LAP, tako kot živalska, je morda pomembna za regulacijo življenske dobe proteinov. Glavno vlogo pri tem imajo aminokislinski ostanki na N-koncih proteinov. Odcepljanje N-končnih aminokislin lahko destabilizira protein ali ne vpliva na njegovo stabilnost. Posledica tega je stabilizacija določenega proteina ali pa razgradnja destabiliziranih proteinov s pomočjo splošnega proteosomskega sistema (Schaller, 2004).

Vloga aleuraina v rastlinskih celicah še ni znana. Dejstvo, da ga imajo vse do zdaj preiskovane rastline, kaže da je njegova funkcija po vsej verjetnosti esencialna za procese v rasti in razvoju. Sintetizira se v obliki cimogena, ki vstopi v litično vakuolo. Opažanja, da zorenje proaleuraina ni avtokatalitično, temveč potrebuje aktivnost neke druge proteaze, kažejo da ta zoritvena proteaza lahko regulira aktivnost aleuraina (Halls in sod., 2005).

2.2.3.1 Vpliv biotskega in abiotskega stresa na aktivnost aminopeptidaz

Stres pri rastlinah povzročijo različni abiotični in biotični dejavniki: pomankanje vode oz. suša, poplava, slanost, zmrzal, vročina, pomankanje kisika, pomankanje mineralov, povečana koncentracija kovin, onesnaženje, mehanske poškodbe, insekti, patogeni mikroorganizmi, invazivne rastlinske vrste. Pojem stresni faktor je v literaturo uvedel Larcher (Larcher, 1987). Na rastlino pogosto ne deluje samo en stresni faktor, temveč več faktorjev skupaj. Zaradi tega je velikokrat zelo težko določiti povezanost posameznega stresnega faktorja in specifičnega odziva rastline. Znano je, da različni stresni faktorji vplivajo na vodno stanje rastlin. Suša, slanost in nizke temperature imajo enak učinek na celičnem nivoju, zato je molekularni mehanizem odziva rastlin na njih podoben. Na primer, več vrst abiotskega stresa sproži nastajanje delno reduciranih oblik kisika, ki so zelo reaktivne in povzročajo različne spremembe na molekularnem nivoju. Te vrste

abiotskega stresa navadno privedejo do prezgodnjega staranja listov (Brzin in Kidrič, 1995). Povečanje odpadanja listov pa vključuje aktivnost proteolitskih encimov, med njimi tudi aminopeptidaz (Huffaker, 1990; Callis, 1995). O vlogi proteaz v abiotskem stresu je malo znanega, več pa je podatkov o njihovem delovanju pri biotskem stresu, zlasti pri obrambi rastlin proti različnim škodljivcem (Brzin in Kidrič, 1995). To velja tudi za aminopeptidaze.

Že omenjene heksamerne LAP, z molekulsko maso od 250 do 300 kDa, imajo lahko tudi vlogo v obrambi rastline pred mehanskimi poškodbami in napadom patogenov. Medtem ko večina rastlin, tako kot večina mikroorganizmov in živali, izraža samo eno vrsto LAP polipeptidov, njihova predstavnika sta LAP-N iz paradižnika in *A. thaliana*, nekatere rastline iz družine *Solanaceae* izražajo tudi drugo obliko LAP, imenovano LAP-A. Le-to inducira mehanske poškodbe in jo sestavljajo podenote s *pI* 5,6-5,9. LAP-N se nahaja v vseh rastlinskih organih in na njeno aktivnost ne vplivajo spremembe v okolju ali hormonski signali. Nasprotno pa se dva paradižnikova gena, ki kodirata LAP-A (*LapA1* in *LapA2*) in sta prisotna v cvetnih organih in sadežih, ne izražata med vegetativno rastjo rastline, razen če je le-ta ogrožena od patogenov, prežvekujočih insektov, ran in stresa zaradi suše ali slanosti. Poleg tega se transkripti LapA akumulirajo v prisotnosti jasmonske kisline, abcizne kisline in sistemin. Zanimivo je, da se *Lap* geni pri krompirju ne odzivajo na sušo. Pri volčji češnji LapA proteine najdemo v ranjenih in zdravih delih rastline (Hilddmann in sod., 1992; Chao in sod., 1999; 2000). Kakšno vlogo pa ima LAP-A v obrambi rastline je še potrebno ugotoviti.

V raziskavi, ki je proučevala vpliv toksične koncentracije CdCl₂ na proteolitsko aktivnost listnih peroksisomov v celicah graha, je bilo opaziti porast v aktivnosti dveh izooblik levcinske-aminopeptidaze pri rastlinah, ki so bile v stiku s kadmijem. To je verjetno posledica senescence, ker kadmij povzroči oz. pospeši staranje listnih peroksisomov (McCarthy I in sod., 2001). Število in aktivnost LAP-az se je spremenilo tudi pri oleandrih (*Nerium oleander*), ki so bili izpostavljeni nizkim temperaturam (Syros T in sod., 2005).

Aktivnosti dveh različnih aminopeptidaz iz listov navadnega fižola, ki cepita alanin-p-nitroanilid (APNA) oz. levcin-p-nitroanilid (LPNA), se spreminja pod vplivom suše. Ugotovljeno pa je, da so te spremembe odvisne od občutljivosti preučevanih sort. V pogojih velikega pomanjkanja vode se v listnih ekstraktih najbolj občutljivih rastlin aktivnosti obeh encimov povečata, medtem ko se pri najbolj odporni sorti zmanjšata. Obe aminopeptidazi se verjetno razlikujeta od prej omenjenih, ki spadajo v metalopeptidaze, saj jih inhibitorji metalopeptidaz ne inhibirajo (Hieng in sod., 2004).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Rastlinski material

Aminopeptidazi smo izolirali iz listov fižola *Phaseolus vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *Nanuns Aschers*, družina *Fabaceae*, ki je rasel na polju. Uporabili smo sorto Zorin, ki spada med nizki fižol in se goji za zrnje. Vpliv vodnega stresa na aminopeptidazno aktivnost smo preučevali na dveh sortah fižola, že omenjenemu Zorinu in na Češnjevcu, ki ravno tako spada med nizki fižol za zrnje, gojili pa smo ju pod kontroliranimi pogoji. Semena fižola smo dobili v Semenarni Ljubljana.

3.1.1.1 Vzgoja fižola na polju in izbor listov za izolacijo aminopeptidaz

Za izolacijo alanin-aminopeptidaze (AAP) in levcin-aminopeptidaze (LAP) smo potrebovali večje količine listov. Pobrali smo jih z rastlin fižola, ki so jih vzgojili na polju Kmetijskega inštituta Slovenije v Jablah. Sadili so po dve zrni skupaj, razdalja med sosednjima paroma zrn pa je bila 20 cm. Fižol je rasel od konca maja do začetka julija in je bil izpostavljen naravnim pogojem. Z zdravih rastlin smo odrezali druge, tretje in četrte sestavljene liste in jih takoj dali na led. Potem smo jih prepeljali na Inštitut Jožef Stefan in jih shranili pri -70 °C.

3.1.1.2 Vzgoja fižola pod kontroliranimi pogoji

Rastline fižola smo gojili v rastni komori Inštituta Jožef Stefan - Odsek za biokemijo in molekularno biologijo, v Ljubljani.

3.1.1.2.1 Kalitev

Pred kalitvijo smo semena fižola pet minut sterilizirali v vodni raztopini varikine (Šampionka Renče) v razmerju 1:1 in jih nato dobro sprali s sterilizirano destilirano vodo. Semena smo potem dve uri pustili v sterilizirani destilirani vodi na temnem, V tem času so semena nabreknila. Nato smo jih položili na filtrirni papir v petrijevkah in jih dva do tri dni pustili kaliti v temi pri temperaturi 26- 28 °C. Petrijevke smo predhodno pripravili tako, da smo v njih položili plast bombažne vate, na njo pa filtrirni papir, vse skupaj navlažili z destilirano vodo in sterilizirali v avtoklavu.

Kalčke, ki so bili zdravi in morfološko približno enaki smo posadili v plastične lončke s premerom 10 cm, napolnjene z mešanico šote (Florabella, Klasmann- Dielmann, Nemčija) in vermiculita v razmerju 1:1. V šoti so bile prisotne hranilne snovi, ki so rastlinam zadostovale za 4 - 6 tednov rasti.

3.1.1.2.2 Rastni pogoji

Rastline fižola so rasle v rastni komori pri naslednjih pogojih: 16 ur osvetljene s tokom fotonov $500 \mu\text{mol} / \text{m}^2$, pri dnevni temperaturi $25 - 27^\circ\text{C}$, nočni temperaturi $19 - 21^\circ\text{C}$ in relativni vlažnosti (RV) zraka na začetku eksperimenta 70 %. Rastline smo vsak dan zalivali do enake teže lončkov. Po 19 dneh smo rastline, ki smo jih izpostavili pomanjkanju vode, prenehali zalivati in RV v komori uravnali na 40 - 50 %.

Za potrebe eksperimenta, v katerem smo preučevali vpliv poplave, smo tri tedne stare rastline, ki smo jih izpostavili poplavi, najprej presadili v globoke plastične kadi in dodali zadosti zemlje, da korenine niso mogle priti na površje. Do konca tretmana smo dolivali toliko vode, da je popolnoma prekrivala zemljo. Relativna vlažnost v komori je bila med 85 in 90 %. Kontrolne rastline smo presadili na enak način, nato smo jih pa zmerno zalivali do konca poskusa.

3.1.1.2.3 Izbor fižolovih listov za poskuse

Za pripravo listnih ekstraktov, v katerih smo določali encimske aktivnosti, smo uporabili liste zdravih, dobro razvitih rastlin. Rastline so bile izpostavljene suši, poplavi in normalnim rastnim pogojem, 3 do 9 dni. Ločeno smo zbirali liste izpostavljene različnim tretmanom in različnih starosti. Takoj po tem ko smo jih odrezali, smo jih zamrznili v tekočem dušiku in jih shranili pri -70°C .

3.1.2 Kemikalije

Večina uporabljenih kemikalij je bila p.a., proizvajalcev Serva, Merck in Carlo Erba. Proizvajalci encimskih substratov in inhibitorjev so navedeni v preglednici 3.

Preglednica 3: Proizvajalci uporabljenih encimskih substratov in inhibitorjev

<i>Substrat</i>	<i>Proizvajalec</i>
APNA (L-alanin-p-nitroanilid)	Bachem
LPNA (L-levcin-p-nitroanilid)	Bachem
ArgPNA (L-arginin-p-nitroanilid)	Bachem
LysPNA (L-lizin-p-nitroanilid)	Bachem
MetPNA (L-metionin-p-nitroanilid)	Bachem
ProPNA (L-prolin-p-nitroanilid)	Bachem
PhePNA (L-fenilalanin-p-nitroanilid)	Bachem
<i>Inhibitor</i>	
Pefabloc SC	Boehringer
PMSF (fenilmethylsulfonil fluorid)	Sigma
EDTA (etilendiamin tetraocetna kislina)	Sigma
E-64(1-3-karboksi-2,3-trans-epoksipropionol-levcilamid butan)	Peptide Research Institute (Osaka)

3.2 METODE

3.2.1 Določanje vsebnosti vlage

Vsebnost vlage (VV) smo določali v enem od listov, ki smo jih vzeli za posamezen poskus. Takoj za tem, ko smo ga odrezali, smo list zaprli v prazno epruveto z zamaškom, ga stehtali in mu tako določili svežo maso (m_1). List smo nato sušili pri 70- 80 °C do konstantne mase, mu tako določili suho maso (m_2) in nato smo izračunali VV (v % od celotne mase lista takoj po odrezu) s pomočjo enačbe 1.

$$VV (\%) = (m_1 - m_2 / m_1) \times 100 \quad (1)$$

3.2.2 Homogenizacija rastlinskega materiala in priprava ekstraktov

Izolacija aminopeptidaz iz listov fižola zahteva posebno pozornost, kajti narava rastlinskega materiala s trdnimi celičnimi stenami, močno obarvanostjo in prisotnostjo organelov, ki vsebujejo velike količine neaktivnega založnega ogljikohidratnega materiala, predstavlja svojevrsten problem. Celične stene preprečujejo dostop do celičnih organelov in citosola, velika količina vlaknin in ogljikovih hidratov zmanjšuje delež proteinov v tkivu (npr. v primerjavi z živalskimi tkivi), prisotnost pigmentov in polifenolov pa povzroča obarvanost rastlinskega materiala in obarjanje proteinov. Pigmente in polifenole lahko delno odstranimo z dodajanjem netopnega polivinilpirolidona (PVP), na katerega se absorbirajo (Brzin in Kidrič, 1995). Ker polifenoli v ekstraktu povzročajo tudi motečo agregacijo proteinov, je dodatek PVP-a in reducenta ditiotreitol (DDT) v pufer za ekstrakcijo zelo pomemben.

Izolacija mora poteči hitro in s čim manjšimi izgubami. Liste smo zato najprej zdrobili v tekočem dušiku in jih ekstrahirali pri 4 °C (na ledu), da bi se izognili izgubam proteinov zaradi proteolize, ki se začne takoj po dezintegraciji tkiva.

3.2.2.1 Priprava ekstrakta iz fižolovih listov

Postopek:

Stehtani vzorec zamrznjenih listov fižola smo stresli v predhodno ohlajeno terilnico, ga prelili s tekočim dušikom in strli v fin prašek. Ta prašek smo prenesli v drugo ohlajeno terilnico, mu dodali PVP (0,1 g PVP/ 1g listov) ter zmes dobro premešali. Ekstracijo smo izvedli z ohlajenim ekstracijskim pufrom (50 mM Tris/ HCl, pH 7,5, v katerem je bil 10 mM DTT). Količina uporabljenega pufra je bila v poskusih s katerimi smo določali aminopeptidazne aktivnosti v različnih vzorcih 4 ml/ 1g listov, pri izolaciji pa 2 ml/ 1g listov. Homogenat smo filtrirali skozi dve plasti pleničnih predlog (Tosama) in dobljeni ekstrakt centrifugirali 15 minut pri 20000 g in 4 °C. Supernatant smo ločili od oborine in ga zamrznili v tekočem dušiku ter ga shranili pri – 70 °C.

3.2.3 Določanje vsebnosti proteinov

3.2.3.1 Metoda po M. Bradford

Princip:

Uporabljali smo postopek proizvajalca Bio-Rad, ki temelji na enostavni in natančni metodi za določanje koncentracije proteinov (Bradford, 1976). Metoda temelji na vezavi barvila Coomassie Brilliant Blue G-250 pri nizkem pH na bazične in aromatske aminokislinske ostanke proteinov v vzorcu, pri čemer 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. Metoda je zelo uporabna, ker je enostavna in ne pride do interakcij z reagenti, ki se uporablajo pri izolaciji.

Postopek:

Vsebnost proteinov v vsakem vzorcu smo določali v dveh ali treh paralelkah. V epruvete smo odpepitirali 750 µl destilirane vode in 50 µl ustrezno razredčenega vzorca. Nato smo dodali 200 µl Bio-Rad koncentriranega barvila (barvilo Coomassie Brilliant blue, 55 % fosforna kislina in 15 % etanol) proizvajalca Bio-Rad in premešali na vrtičniku. Po 10 minutah inkubacije na sobni temperaturi smo izmerili absorbanci pri 595 nm proti slepemu vzorcu, kjer je bila namesto vzorca destilirana voda.

Koncentracijo proteinov v vzorcu (mg/ml) smo izračunali s pomočjo enačbe umeritvene krivulje, ki smo jo naredili z raztopinami govejega serumskega albumina različnih koncentracij v oboju od 1 do 16 µg/ml. Vsebnost proteinov v listih, ki smo jo izrazili kot maso proteinov na suho maso listov, smo izračunali iz koncentracije proteinov v ekstraktu, načina priprave ekstrakta in vsebnosti vlage v listih pred ekstrakcijo.

3.2.3.2 Merjenje absorbance pri valovni dolžini 280 nm

Princip:

Izkoriščamo lastnost aromatskih aminokislin triptofana in tirozina, da absorbirata svetlobo valovne dolžine 280 nm. Omenjene aminokisline se v veliki večini proteinov nahajajo v zelo podobnih deležih, tako da lahko z merjenjem absorbance pri 280 nm določimo približno koncentracijo proteinov v bistrih raztopinah vzorcev. Takšna določitev vsebnosti proteinov pa je nezanesljiva v vzorcih oz. raztopinah, ki vsebujejo druge aromatske spojine, saj te spojine ravno tako absorbirajo svetlobo pri tej valovni dolžini. Zato tudi ni uporabna za določanje koncentracije proteinov v rastlinskih ekstraktih, ki vsebujejo veliko pigmentov.

Merjenje aborbance raztopin proteinov v UV področju je enostavno in hitro. Zelo pomembno je, da s to metodo proteinov ne spremenimo. Ko gre za rastlinske ekstrakte, je le-ta, kljub številnim pomanjkljivostim, uporabna predvsem tedaj, kadar želimo sproti oceniti koncentracijo proteinov kot npr. med elucijo pri gelski izključitveni kromatografiji ali FPLC, ko so pigmenti in ostale moteče snovi že vsaj delno odstranjeni.

Postopek:

V kvarčno kiveto širine 1 cm smo odpipetirali vzorec, kateremu smo nato izmerili absorbanco pri 280 nm. Meritve smo opravili na spektrofotometru Lambda 11 (Perkin-Elmer).

3.2.4 Določanje aminopeptidaznih aktivnosti

Princip:

Aminopeptidazne aktivnosti smo določali s sintetičnimi substrati L-alanin-p-nitroanilid (APNA), L-arginin-p-nitroanilid (ArgPNA), L-levcin-p-nitroanilid (LPNA), L-lizin-p-nitroanilid (LysPNA), L-metionin-p-nitroanilid (MetPNA), L-fenilalanin-p-nitroanilid (PhePNA) in L-prolin-p-nitroanilid (ProPNA). To so kromogeni, sintetični substrati, ki imajo prosto amino skupino in blokirano karboksi skupino preko amidne vezi s p-nitroanilidom. Posledica hidrolizne aktivnosti aminopeptidaz je sproščanje p-nitroanilina, ki ga določimo spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 405 nm. Ker so neočiščeni listni ekstrakti, kakor tudi frakcije pri gelski izključitveni kromatografiji, obarvani in do določene mere absorbirajo svetlobo, pri kateri merimo aktivnost aminopeptidaz, je za vsak test potrebno vključiti slepe probe, ki vsebujejo ekstrakt oz. frakcijo. Razlika med slepo probo in vzorcem je le-ta, da pri slepi probi substrat, ki ga inkubiramo ločeno, dodamo šele po dodatku prekinjevalca.

Aktivnosti smo določali na dva načina: a) pri pH 5,5, pH 7,0 in pH 8,3 ali pH 8,5 s prekinjanjem reakcije po določenem času in merjenjem absorbance pri 405 nm in b) s kontinuirnim merjenjem absorbance pri isti valovni dolžini in pH-ju, ki je bil odvisen od substrata.

3.2.4.1 Določanje aktivnosti s prekinjivo reakcijo po določenem času

Ta postopek smo uporabili pri določanju aktivnosti v neočiščenem listnem ekstraktu in v vseh fazah izolacije AAP in LAP (raztopine oborin po obarjanju z acetonom oz. amonijevim sulfatom, frakcije, ki smo jih dobili pri gelski izključitveni kromatografiji in pri ionski izmenjevalni kromatografiji).

Reagenti:

- pufri: 0,25 M MES (morfolinoetansulfonska kislina) (pH 5,5) in 0,25 M Tris-HCl (pH 7,0 in pH 8,3)
- substrati: 4 mM APNA, ArgPNA, LPNA, LysPNA, MetPNA, PhePNA in ProPNA
- prekinjevalec: 1 M HClO₄

Postopek:

250 µl pufra določenega pH, 250 µl 4 mM raztopine substrata (ki smo jo pripravili iz 8 mM raztopine v DMSO z redčenjam z destilirano vodo) in 50 µl encimskega vzorca, ki smo ga po potrebi ustrezno redčili s 50 mM Tris/ HCl, pH 7,5, v katerem je bil 10 mM DTT ali s 50 mM PP (fosfatni pufer) z 0,12 M NaCl, pH 7, smo inkubirali pri 37 °C v vodni kopeli. Pri določanju na katere substrate kaže neprečiščeni listni ekstrakt vidno aktivnost, smo reakcijsko zmes z neredčenim ekstraktom inkubirali pri treh omenjenih pH-

jih do trenutka, ko je postala vidno obarvana. Potem smo reakcijo prekinili z dodatkom 250 μl 1 M HClO₄. Če niti po dveh urah ni prišlo do vidne hidrolize substrata oz. do sproščanja p-nitroanilida, ki reakcijsko raztopino obarva rumeno, smo inkubacijo ustavili na opisani način. Pri izolaciji AAP in LAP smo vzorce, v katerih smo testirali aktivnosti, 30 minut inkubirali v pufru s pH 8,3. Po prekinitvi reakcije smo vzorce centrifugirali (20000 g, 10 min) in v supernatantu izmerili povečanje absorbance pri 405 nm , glede na slepi vzorec. Aktivnost smo izrazili bodisi kot $\Delta A_{405} \times \text{min}^{-1}$, bodisi kot $\Delta A_{405} \times (\text{mg proteinov})^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

3.2.4.2 Kontinuirno določanje encimskih aktivnosti

Princip:

Kontinuirno merjenje encimskih aktivnosti na različne substrate v odvisnosti od časa smo uporabljali za testiranje dveh delno očiščenih aminopeptidaz iz fižolovih listov. Meritve smo opravili na spektrofotometru Lambda 18 (Perkin-Elmer). Vsi substrati imajo vezan p-nitroanilid, zato aktivnost merimo s spremembo absorbance pri 405 nm.

Z inhibitorji, značilnimi za različne razrede proteolitičnih encimov, smo karakterizirali izolirani AAP in LAP. Uporabili smo: Pefabloc SC, specifični inhibitor SP; fenilmethylsulfonilfluorid (PMSF), ki je prav tako inhibitor SP, vendar z drugačnim mehanizmom delovanja; EDTA, ki inhibira metaloproteaze, E-64, ki inhibira cisteinske proteaze.

Reagenti (končne koncentracije):

- pufer: 50 M Tris-HCl, pH 8,5 (za substrate APNA, LPNA in LysPNA) oz. pH 7,3 (za substrat PhePNA)
- substrati: 1,6 mM APNA v pufru
 - 1,6 mm LPNA v pufru
 - 1,6 mM LysPNA v pufru
 - 0,64 mM PhePNA v pufru
- inhibitorji: 4 mM Pefabloc SC
 - 4 mM PMSF
 - 40 μM E-64
 - 5 mM EDTA

Postopek:

V 700 μl pufra, segretega na 35°C v kiveti za merjenje absorbance, smo dodali 50 μl substrata, ki smo ga pripravili z redčenjem 20 mM raztopine substrata v DMSO s pufrom, in 50 μl vzorca, rahlo premešali ter kiveto vstavili v napravo. Ko smo dobili ustrezni signal, smo odčitali naklon krivulje in standardni odklon.

Z inhibitorji smo preučevali vpliv na aktivnost, ki smo jo izmerili s substratoma APNA in LPNA. V pufer (675 μl) smo dodali vzorec AAP ali LAP (50 μl) in poleg 50 μl substrata APNA ali LPNA še 25 μl inhibitorja ter po določenem času odčitali omenjena parametra.

3.2.5 Obarjanje proteinov iz listnega ekstrakta z acetonom

Princip:

Obarjanje temelji na zmanjšanju vodne aktivnosti. Učinkovitost vode kot topila za nabite, hidrofilne proteinske molekule pada z naraščanjem koncentracije organskega topila. Vzrok je v zmanjšanju dielektrične konstante topila in v delni imobilizaciji vodnih molekul, preko hidratacije na organsko topilo. Urejene vodne molekule okoli hidrofobnih delov na površju proteina namreč lahko zamenjajo molekule organskega topila, kar načeloma pomeni večjo topnost teh delov. Za agregacijo ostanejo elektrostatske in dipolarne sile s katerimi se molekule proteinov povežejo in oborijo iz raztopine. Priobarjanju je pomembna tudi velikost molekul, večja kot je, manjši delež organskih molekul topila je potrebnih za njihovo obarjanje. Večje molekule vzpostavijo aggregate hitreje, ker je možnost, da imajo nabito površino, ki ustreza drugemu proteinu, večja. Topilo, ki ga uporabljamo se mora mešati z vodo v vseh razmerjih, ne sme reagirati s proteini in mora imeti čim večji učinek obarjanja.

Prednost ločevanja z organskimi topili, med katere spada aceton, je v njihovem tališču, ki je nižje od 0 °C. To je pomebno zato, ker lahko obarjanje izvedemo pri temperaturi nižji od 0 °C in tako zmanjšamo denaturacijo proteinov.

Postopek:

Ohlajenim (4 °C) listnim ekstraktom smo postopoma, ob mešanju v zmesi led-NaCl, dodali 60 oz. 80 oz. 89 % volumna 100-odstotnega acetona, predhodno ohlajenega na -70 °C. Mešanico ekstrakta in acetona smo potem dali za dve uri na -20 °C, da so se proteini dobro oborili. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri 20000 g in 4 °C. Oborino smo resuspendirali v 2 ml 50 mM Tris/ HCl, pH 7,5. Suspenziji oborine smo določili vsebnost proteinov po Bradfordovi metodi (3.2.3.1) in izmerili aminopeptidazno aktivnost (3.2.4.1).

3.2.6 Obarjanje proteinov z amonijevim sulfatom

Princip:

Topnost proteinov v vodnih raztopinah je zelo odvisna od vrste in koncentracije soli oziroma od ionske jakosti raztopine. V splošnem velja, da pri majhnih koncentracijah soli topnost proteinov z zvišanjem koncentracije narašča. Do pojava, ki ga imenujemo vsoljevanje pride, ker manjše koncentracije ionov v raztopini zmanjšajo privlačne ionske interakcije med nasprotno nabitim skupinami proteinskih molekul in s tem preprečijo povezovanje v večje skupke ter tako izboljšajo topnost. Pri večjih ionskih jakostih soli se zadeva obrne. Ioni soli in proteini začnejo tekmovati za vodo v raztopini, kar privede do tega, da se solvatacijski plašč okoli proteinov vse bolj tanjša. Zaradi tega se proteini lahko začnejo povezovati med sebo v večje aggregate. Pojav imenujemo izsoljevanje. Bistvene za tvorbo agregatov so interakcije z hidrofobnimi površinami proteinov. Proteini, ki imajo na površini več nepolarnih aminokislin se izsolijo pri manjši ionski jakosti. Razlike v topnosti proteinov lahko izkoristimo za selektivno, frakcionirno obarjanje. Za obarjanje največkrat uporabljamo amonijev sulfat, ki je primeren predvsem zato, ker je dobro topen pri nizkih temperaturah, kjer obarjamo proteine.

Postopek:

Ekstraktom listov oz. raztopinam proteinskih oborin (3.2.5) smo postopoma ob mešanju dodali zatehtane količine amonijevega sulfata (glede na koncentracijo amonijevega sulfata s katero želimo obarjati proteine) in potem mešali še približno 30 minut. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri 20000 g na 4 °C. Oborino smo raztopili v najmanjšem potrebnem volumnu 50 mM Tris/ HCl, pH 7,5 in zopet centrifugirali pri enakih pogojih. Supernatantu smo določili vsebnost proteinov (3.2.3.1) in izmerili aminopeptidazno aktivnost (3.2.4.1) ter ga nato nanesli na kolono za gelsko kromatografijo (3.2.7).

3.2.7 Gelska izključitvena kromatografija

Princip:

Ta metoda se uporablja za ločevanje molekul na osnovi razlik v njihovih velikostih. Stacionarno fazo, imenovano tudi molekularno sito, predstavljajo zelo hidrofilni organski polimeri s tridimenzionalno mrežo por, ki imajo po absorpciji topila lastnosti gela. Ko na tak gel nanesemo zmes snovi in kolono začnemo eluirati, molekule, ki so večje od por, v le-te ne vstopajo, ampak potujejo mimo njih s fronto topila. Molekule, ki so manjše, pa difundirajo v pore in počasneje potujejo po koloni navzdol (Kregar, 1996).

Pri gelski izključitveni kromatografiji se srečamo z naslednjimi definicijami volumnov:

- elucijski volumen (V_e) je volumen topila, s katerim se izloči maksimalna količina topljenca iz kolone;
- prazni ali »void« volumen (V_o) je volumen, ki ga določimo z modrim dekstranom;
- skupni volumen hidratiziranega gela (V_t) je volumen gela v koloni.

Gelska kromatografija je poleg tega, da omogoča separacijo različno velikih bioloških makromolekul, uporabna za določevanje relativne molekulske mase snovi, ki jih ločujemo. V ta namen moramo kolono najprej umeriti s snovmi z znanimi molekulskimi masami.

Postopek:

Priprava gela: Uporabili smo gel Sephadryl S-200 HR (Pharmacia), ki je primeren za ločevanje globularnih proteinov z relativno molekulsko maso od 5 do 250 kDa in sicer v pH območju 2-10.

Kolono s premerom 1,8 cm in višino 116 cm smo napolnili z 295 cm³ gela, ki smo ga predhodno na nuči sprali z 1 M NaCl in nato z elucijskim pufrom (50 mM PP, pH 7 z 0,12 M NaCl) ter ga tudi uravnotežili z omenjenim pufrom.

Umerjanje kolone: Elucijski volumni (V_e) ločevalnih snovi so obratno sorazmerni logaritmu molekulskih mas ($M_r = - \log (V_e / V_o)$). Če kolono umerimo s proteini znanih molekulskih mas in narišemo umeritveno krivuljo, lahko s pomočjo te zvezе določimo tudi približno molekulsko maso proteinov v vzorcu.

Za umeritveno krivuljo smo uporabili po 2,5 mg:

- modrega dekstrana ($M_w = 200$ kDa),
- govejega serumskega albumina ($M_w = 67$ kDa),
- aldolaze ($M_w = 158$ kDa),

- jajčnega albumina ($M_w = 45$ kDa),
- kimotripsinogena ($M_w = 25$ kDa),
- mioglobina ($M_w = 17,8$ kDa),
- DNP-alanin ($M_w = 255$ Da)

in jih raztopili v 5 ml elucijskega pufra. Raztopljene standarde smo nanesli na kolono in počakali, da so poniknili v gel. Takoj za tem smo kolono zaprli, nad gel nalili elucijski pufer in preko črpalke priključili dotok elucijskega pufra. Kolono smo odprli in v predhodno zatehtane prazne epruvete začeli zbirati frakcije, katerih volumen smo uravnali na približno 3,5 ml. Po končani kromatografiji smo zatehtali epruvete s frakcijami in iz razlike teže polne in prazne epruvete določili točen volumen vsake frakcije (predpostavili smo, da je $\phi=1,00$ g/cm³). Ločba standardnih proteinov je potekala pri 4 °C in pretoku 19,20 ml/h. Merili smo absorbanco vsake frakcije pri 280 nm, da smo ugotovili v katerih frakcijah so se eluirali posamezni standardni proteini znanih molekulskih mas in preko tega določili njihove elucijske volumne (V_e). Izključitveni volumen (V_o) smo določili iz V_e modrega dekstrana, ki je skozi gel potoval skupaj s fronto eluenta oz. mobilno fazo. Umeritvena krivulja je odvisnost logaritma molekulske mase standardnih proteinov od razmerja med V_e teh proteinov in V_o .

Kromatografija proteinskih vzorcev: Vzorec, ki ga nanesemo na kolono, lahko predstavlja največ 2 % volumna gela, kar je 5,9 cm³ v našem primeru. Zato smo na kolono nanesli po 3 oz. 4 ml naših vzorcev, ki so bili po obarjanju z amonijevim sulfatom resuspendirani v elucijskem pufru. Pogoji pri katerih je potekala kromatografija so bili enaki kot pri umerjanju kolone. Ravno tako smo izmerili absorbanco frakcij pri 280 nm, nato pa še določili njihove aktivnosti na substrata APNA in LPNA. Frakcijam v katerih so bili vrhovi aktivnosti smo določili V_e in na osnovi njih s pomočjo umeritvene krivulje izračunali molekulske mase encimov AAP in LAP.

Med nanosi posameznih vzorcev smo kolono spirali z večimi količinami pufra.

3.2.8 Dializa proteinskih vzorcev

Princip:

Med dializo majhne molekule difundirajo skozi selektivno prepustno membrano in se tako ločijo od velikih molekul. Dializa se večinoma uporablja za izmenjavo soli oz. pufra v vzorcu, ki vsebuje makromolekule. Vzorec namestimo v membrano, zapremo in potopimo v izbrani pufer. Gonilna sila dialize je razlika v koncentraciji topljencev na obeh straneh membran, zato pride do izenačevanja koncentracije teh topljencev med vzorcem in dializatom, tako da iz vzorca skozi membrano difundirajoioni soli.

Postopek:

Dializno črevo (Serva) določenega premera smo najprej namočili v destilirani vodi in ga nato z notranje in zunanje strani splaknili z destilirano vodo. V tako pripravljeno dializno črevo smo počasi in previdno nalili frakcije, ki smo jih dobili pri gelski kromatografiji, v katerih smo določili aminopeptidazne aktivnosti in črevo namestili v veliko čašo napolnjeno z 20 mM PP, pH 7,0. Volumen pufra je bil približno 100-krat večji od volumna

frakcij. Po 6 urah dialize smo pufer zamenjali z sveže pripravljenim in dializirali še nadaljnjih 12 ur. Dializa je potekala pri stalnem mešanju in pri 4 °C.

3.2.9 Tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov (FPLC) z ionsko izmenjavo

Princip:

Ta metoda se uporablja za hitro ločevanje makromolekul, med katere spadajo tudi proteini. ÄKTA FPLC (Amersham Biosciences) je sistem, ki zagotavlja enostavno delo, saj je računalniško voden. V primerjavi s klasično kromatografijo ima naslednje prednosti:

- zelo hitra ločba, ker poteka pod pritiskom,
- dobra ločljivost,
- velika kapaciteta,
- velika občutljivost metode,
- aparatura ima programator gradiента,
- hitra regeneracija kolone,
- enostavna uporaba.

S FPLC smo ločevali aminopeptidaze na principu ionske izmenjave, zato še nekaj osnov o ionsko izmenjevalni kromatografiji.Ta kromatografija je uporabna za ločevanje električno nabitih substanc. Stacionarno fazo predstavljajo ionski izmenjevalci, katerih osnovna značilnost je, da imajo na inerten nosilec kovalentno vezane kationske ali anionske funkcionalne skupine. Glede na to ločimo anionske izmenjevalce, ki vežejo anione in nosijo pozitivno nabite skupine, ter negativno nabite kationske izmenjevalce, ki vežejo in izmenjujejo katione.

Mehanizem ionske izmenjave sestoji iz več stopenj:

- difuzija iona na površino ionskega izmenjevalca, ki je uravnovešen z začetnim pufrom;
- difuzija iona skozi mrežasto strukturo nosilca do nabite funkcionalne skupine;
- izmenjava ionov na aktivnih mestih ionskega izmenjevalca, kar je ravnotežni proces;
- difuzija zamenjanega iona skozi izmenjevalec na njegovo površino;
- desorbcija z mobilno fazo (eluentom), ki vsebuje protiione z višjo afiniteto ali ima zvišano ionsko jakost ali spremenjen pH.

Jakost vezave določenega iona na aktivno skupino ionskega izmenjevalca je odvisna od števila nabojev, ki jih nosi in od njegove velikosti. Pri ločevanju bioloških makromolekul nastopijo nekatere posebnosti zaradi njihovih specifičnih zgradb. Proteini so amfoterni polielektroliti, ki imajo pozitivno in negativno nabite skupine. Njihov neto naboj je zato odvisen od pH-vrednosti pufra, ki jih obdaja. Kadar je pH-vrednost pufra nižja od izoelektrične točke proteina, ima molekula pozitiven, sicer pa negativen naboj. Ker imamo običajno opraviti z zmesmi proteinov, ki imajo najrazličnejše izoelektrične točke in pH-stabilnosti, se osredotočimo le na tisto, ki pripada proteinu, ki ga želimo izolirati (Kregar, 1996).

Postopek:

Ugotavljanje primernega gradiента koncentracije NaCl za elucijo aminopeptidaz, vezanih na anionski izmenjevalec:

Pri našem delu smo uporabljali močni anionski izmenjevalec (Q Sepharose FF), ki ima sposobnost ločevanja proteinov, katerih molekulska masa seže do 4×10^6 kDa. Stopnjo vezave AAP in LAP na kolono in primerni gradient za njihovo elucijo z gela smo ugotavljali tako, da smo naredili dva predposkusa v mikrocentrifugirkah. Najprej smo manjši količini gela oddekantirali 20 % etanol, v katerem se je gel nahajal v originalni embalaži, in dodali dvakratno količino destilirane vode ter dvakrat sprali. V prvem predposkusu smo pripravili suspenzijo gela z destilirano vodo v razmerju 1:1. v drugem predposkusu pa smo pripravili suspenzijo gela v 50 mM PP, pH 8, da je bilo razmerje med hidratiziranim izmejevalcem in pufrom 1:1. Naprej je postopek enak za oba predposkusa. 600 µl suspenzije gela smo odpipetirali v mikrocentrifugirke in v vsako dodali 200 µl izbrane frakcije, ki smo jo dobili pri gelski kromatografiji. Nežno smo jih premešali in počakali 1-2 minuti, da je potekla vezava proteinov na izmenjevalec, nato pa smo po vrsti v mikrocentrifugirke dodali 400 µl raztopin NaCl ustrezne koncentracije. Zopet smo nežno premešali, počakali 5 minut in centrifugirali pri 20000 g 5 minut. Supernatante smo ločili od oborin in v njih testirali aktivnosti na APNA in LPNA.

Priprava kolone:

Uporabljali smo že predpaketano kolono Mono Q 5/50 GL (Tricorn) za ionsko izmenjevalno kromatografijo, ki je bila napolnjena z močnim anionskim izmenjevalcem Q Sepharose FF.

Po navodilih proizvajalca smo kolono najprej uravnotežili z destilirano vodo, začetnim pufrom A (20 mM PP, pH 7,0) in elucijskim pufrom B (0,5 M NaCl v 20 mM PP, pH 7,0) in še enkrat z začetnim pufrom A. Potem smo kolono testirali na predpisane pogoje, jo sprali z 2 M NaCl in jo ponovno uravnotežili z pufrom A.

Potek kromatografije:

Na uravnoteženo kolono smo nanesli določen volumen vzorca oz. dializiranih frakcij iz gelske kromatografije (od 0,5 do 3,2 ml) v pufru A. Elucijo vezanih proteinov smo izvedli z linearnim gradienptom koncentracije NaCl od 0,0 M do 0,5 M v istem pufru, ki ga je računalniško voden aparat pripravljal avtomatično z ustreznim dodajanjem pufra B pufru A. Nato smo kolono sprali še s pufrom B. V frakcijah z volumnom 1ml smo določali aktivnost na substrata APNA in LPNA. Preko računalnika smo sledili prevodnost in koncentracijo gradienta ter koncentracijo proteinov preko absorbance pri 280 nm. Med posameznimi kromatografijami vzorcev smo kolono spirali z 1 M NaCl.

3.2.10 Koncentriranje frakcij iz ionsko izmenjevalne kromatografije

Princip:

Za koncentriranje majhnih volumnov se uporablja centrifugiranje skozi membrano. Različne oblike posebno oblikovanih epruvet (centrikonov) vsebujejo ultrafiltracijsko membrano. Te centrikone, v katerih se nahaja raztopina proteinov, ki jo želimo skoncentrirati, ustavimo v standardne centrifugalne rotorje in jih centrifugiramo. Voda in

komponente z majhno molekulsko maso prehajajo skozi membrano s pomočjo centrifugalne sile. 1 do 3 ml raztopine lahko skoncentriramo do ~50 µl volumna v manj kot eni uri.

Postopek:

Frakcije, ki smo jih dobili s FPLC in v katerih smo s substratoma APNA in LPNA določili aminopeptidaze, smo skoncentrirali do približno 50 µl v majhnih centrikonih Centrikon Y-10 (Amicon, ZDA), s centrifugiranjem pri 5000 g.

3.2.11 NaDS- poliakrilamidna elektroforeza

Princip:

NaDS-poliakrilamidna elektroforeza (SDS-PAGE) je metoda s katero preverjamo čistost encimov in določamo njihovo molekulsko maso. Najprej disociiramo proteine, ki jih želimo ločevati s to tehniko, na polipeptidne podenote s pomočjo anionskega detergenta Na-dodecilsulfat (NaDS), reducenta β-merkaptoetanola ter visoke temperature. Razvite polipeptidne verige vežejo približno enako količino NaDS na enoto teže (1,4 NaDS/1 g proteina) in dobijo negativni naboj, ki prekrije naboj proteina. Hitrost potovanja skozi zamrežen gel v električnem polju je tako odvisna le od velikosti molekul. Vzporedno na gel nanesemo tudi proteinske standarde z znanimi molekulskimi masami (Kregar, 1996).

Postopek:

Za elektroforezo, ki smo jo izvedli na aparaturi Phast-System (Pharmacia), smo uporabili plošče iz poliakrilamidnega gela (Phast-Gel 8-25), dimenzij $0,45 \times 43 \times 50$ mm, in pufer s pH 6,4 (0,112 M ocetna kislina + 0,112 M Tris). Pred nanosom na gel smo vzorcem dodali enak volumen barvila (0,02 % raztopina bromfenolmodrega v 0,02 M Tris + 2 mM EDTA, pH 8,0), NaDS s končnim delež 5 % in pri vzorcih, ki smo jih reducirali, β-merkaptoetanol s končnim deležem 10 %. Reducirane vzorce smo kuhalili 5 minut pri 100 °C. Tako pripravljene vzorce smo nanesli na gel (3 µl). V enega od žepkov smo dali 3 µl mešanice standardov (Serva). Elektroforeza je potekala 30 minut pri napetosti 250 V v pufru pH 7,5 (0,2 M Tris + 0,55 % NaDS). Po končani elektroforezi smo proteine 30-45 minut barvali z 0,1 % raztopino Coomassie Blue, nato pa gel razbarvali s 30 % metanolom in 10 % ocetno kislino.

3.2.12 Ugotavljanje N-terminalnega zaporedja izoliranih aminopeptidaz

Postopek:

N- terminalno zaporedje proteinov in peptidnih fragmentov smo določili z uporabo avtomatskega sekvenatorja Applied Biosystems Procise 492A (Applied Biosystems).

Vzorec smo po končani ionski kromatografiji na FPLC sistemu podvrgli elektroforezi na ploščah iz poliakrilamidnega gela in po prenosu na PVDF membrano, na katero so se vezali proteini iz vzorca, ustrezne lise skupaj z membrano vstavili v sekvenator, s katerim smo določili N-terminalno aminokislinsko zaporedje proteinov vezanih na membrano.

4 REZULTATI

Namen moje diplomske naloge je bil izolirati alaninaminopeptidaze in levcinaminopeptidaze, za katere je predhodno bilo ugotovljeno, da se njihova aktivnost v listih fižola (*Phaseolus vulgaris* L. cv Zorin) spreminja v suši. Nameravali smo ugotoviti kako suša in poplava vplivata na aminopeptidazno aktivnost. Dve od izoliranih aminopeptidaz smo nameravali delno okarakterizirati.

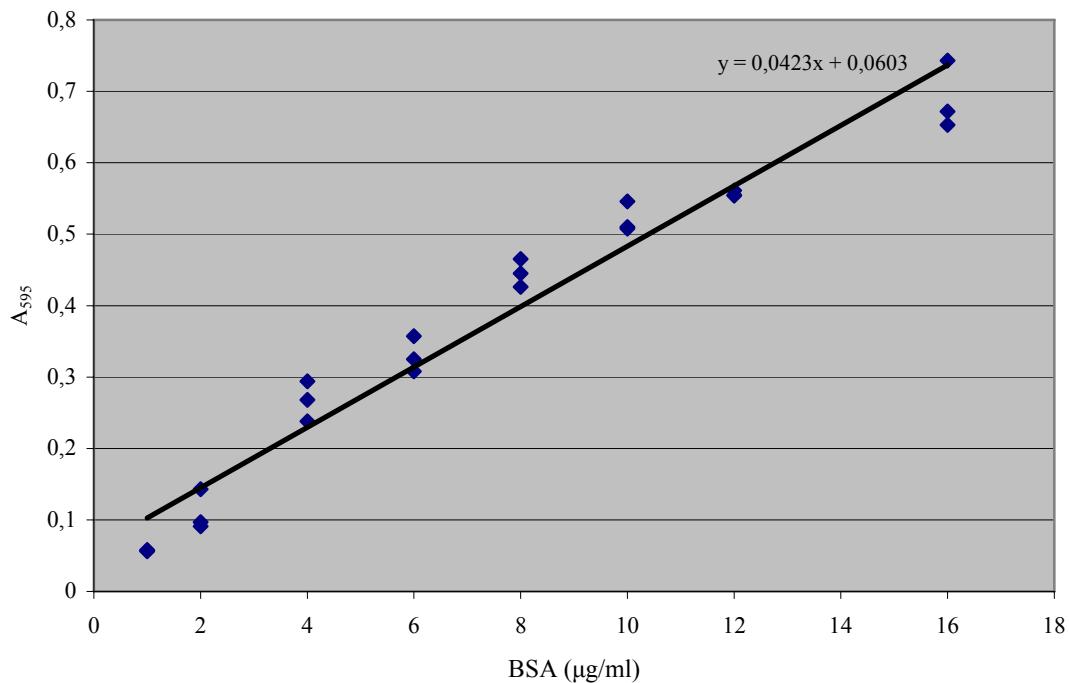
4.1 OPTIMIZACIJA POSTOPKA

Najprej smo vzpostavili primerne eksperimentalne pogoje dela, ki smo jih uporabljali pri izolaciji aminopeptidaz iz listov fižola (*Phaseolus vulgaris* L. cv Zorin).

4.1.1 Vsebnost proteinov in aminopeptidazna aktivnost v ekstraktu zamrznjenih listov fižola

Namen tega dela naloge je bil, da pripravimo ekstrakte iz listov rastlin *Phaseolus vulgaris* L. cv. Češnjevec in cv. Zorin, ki so bili shranjeni v zamrzovalniku -80 °C eno leto, da bi videli če so listi še primerni za izolacijo aminopeptidaz. Ko smo pripravili ekstrakte, smo določili vsebnost proteinov in nato še levcin-aminopeptidazno in alanin-aminopeptidazno aktivnost. Proteine smo določali po metodi po M. Bradford (3.2.3.1) in njihovo koncentracijo določili s pomočjo enačbe umeritvene krivulje (slika 5). Rezultati meritev so prikazani v preglednice 4.

Pri Češnjevcu je bila v primerjavi z Zorinom vsebnost proteinov bila nekoliko manjša, kakor tudi obe aminopeptidazni aktivnosti. Tako pri Češnjevcu kot pri Zorinu pa je večja specifična aminopeptidazna aktivnost na substrat APNA, kot na substrat LPNA.



Slika 5: Umeritvena krivulja, ki smo jo naredili z raztopinami govejega serumskega albumina različnih koncentracij v območju od 1 do 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Koncentracijo proteinov v vzorcu (mg/ml) smo izračunali s pomočjo enačbe umeritvene krivulje.

Glede na te rezultate in primerjavo s prej dobljenimi rezultati v našem laboratoriju (Hieng, 2002), lahko rečemo, da so bili vzorci fižola primerni za izolacijo aminopeptidaz.

Preglednica 4: Vsebnost proteinov (mg/ml) in specifična aminopeptidazna aktivnost, izražena kot $\{\Delta A_{405} / (\text{mg} \times \text{min})\}$; na substrat APNA (AS) in na substrat LPNA (LS) v ekstraktih (A). Za primerjavo so podane tudi določene vrednosti drugih avtorjev (B) (Hieng, 2002)

Sorta fižola	Vsebnost proteinov		AS		LS	
	A	B	A	B	A	B
ZORIN	$3,2 \pm 0,39$	$3,08 \pm 0,64$	$0,601 \pm 0,015$	$0,67 \pm 0,04$	$0,176 \pm 0,036$	$0,24 \pm 0,05$
ČEŠNJEVEC	$2,3 \pm 0,19$	$2,43 \pm 0,13$	$0,469 \pm 0,058$	$0,52 \pm 0,05$	$0,129 \pm 0,007$	$0,28 \pm 0,07$

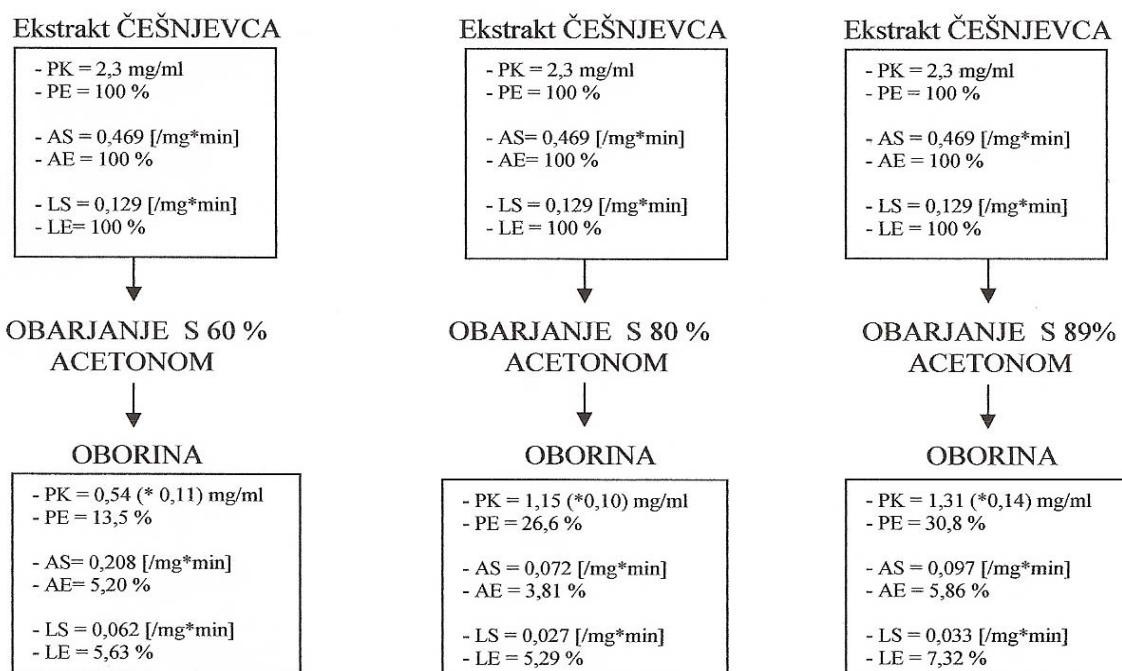
4.1.2 Obarjanje proteinov z acetonom

Za obarjanje z acetonom smo se odločili, da bi odstranili pigmentne in oborili oz. skoncentrirali proteine. Za obarjanje smo uporabljali ekstrakte Češnjevca. Delali smo s tremi koncentracijami acetona, da bi ugotovili s kolikšnim deležem acetona oborimo

največ proteinov. V tej fazi nismo nameravali proteine frakcijsko obarjati, ampak predvsem odstraniti čim večjo količino prisotnih pigmentov.

Odločili smo se, da bomo obarjali z 60, 80 in 89 % acetonom. V vsaki fazi smo določali koncentracijo proteinov (PK), delež (%) oborjenih proteinov v primerjavi z ekstraktom (PE), specifično aktivnost na substrat APNA (AS), delež (%) celotne aktivnosti na substrat APNA v primerjavi z ekstraktom (AE), specifično aktivnost na substrat LPNA (LS) in delež (%) celotne aktivnosti na substrat LPNA v primerjavi z ekstraktom (LE).

Z obarjanjem s 60 % acetonom smo oborili manj proteinov, vendar je bila specifična aminopeptidazna aktivnost večja, iz česar sledi, da je to najprimernejši delež acetona za obarjanje od testiranih (slika 6).



Slika 6: Obarjanje ekstrakta fižolovih listov, sorte Češnjevec, s 60 % acetonom, 80 % acetonom in 89 % acetonom

Iz zgoraj prikazanih rezultatov (slika 6) je razvidno, da pri obarjanju z acetonom izgubimo zelo veliko proteinov in aminopeptidaznih aktivnosti. Pri oborini, ki smo jo dobili po obarjanju s acetonom (60 %), je bila izguba proteinov 86,5 %, izguba specifične aktivnosti na substrat APNA 94,8 % in izguba specifične aktivnosti na substrat LPNA 94,4 %. Pri oborini, ki smo jo dobili po obarjanju s 80 % acetonom, je bila izguba proteinov 73,4 %, izguba specifične aktivnosti na substrat APNA 96,2 % in izguba specifične aktivnosti na substrat LPNA 94,7 %. Oborina, ki smo jo dobili po obarjanju s 89 % acetonom, je imela 69,2 % proteinov manj kot začetni ekstrakt, izguba specifične aktivnosti na substrat APNA je bila 94,1 % in izguba specifične aktivnosti na substrat LPNA 92,7 %. Z acetonom smo odstranili edino klorofil, ostalo pa je veliko drugih pigmentov.

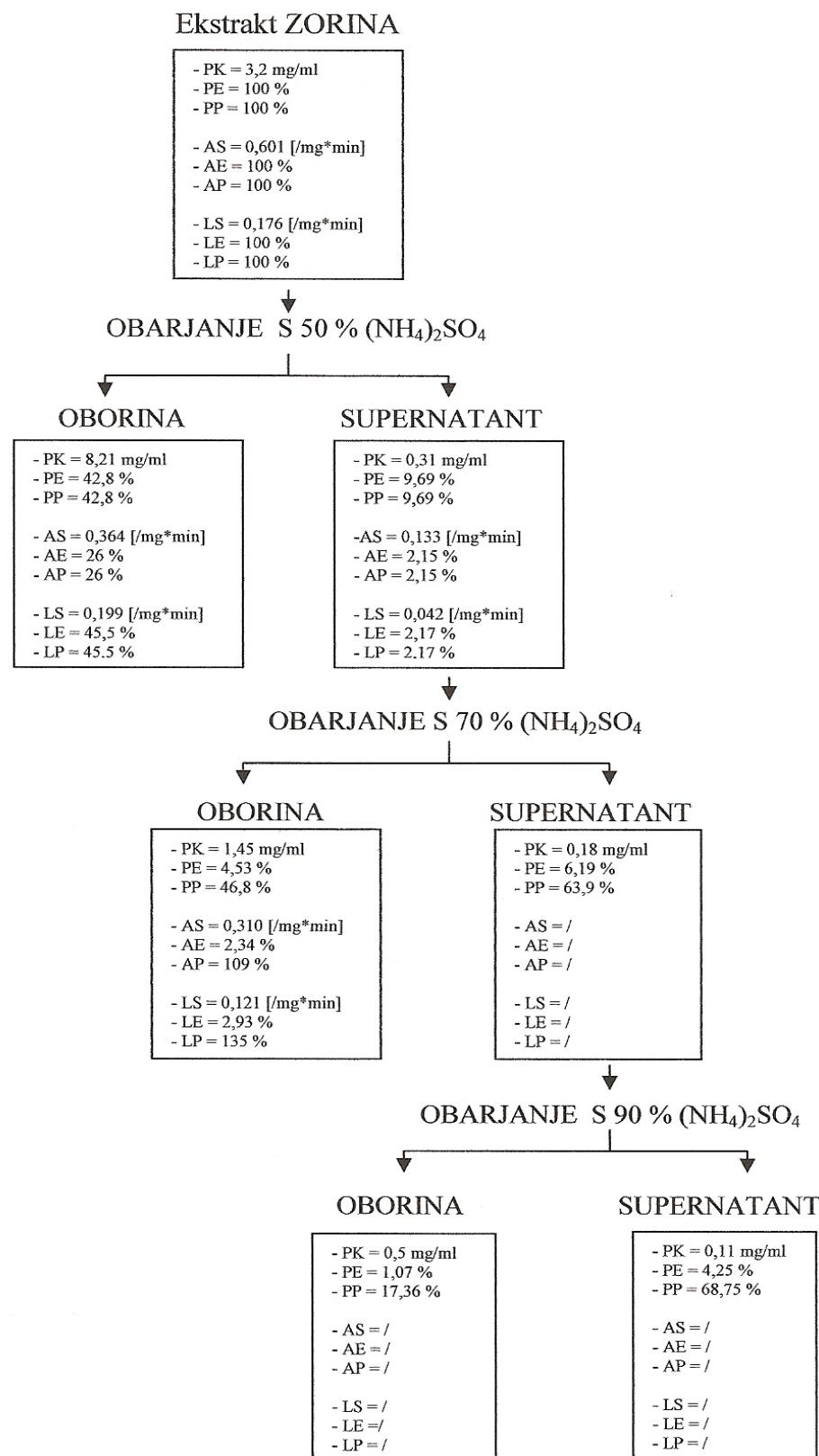
4.1.3 Obarjanje proteinov z amonijevim sulfatom

Ker obarjanje z acetonom ni dalo dobrih rezultatov, smo v nadaljevanju preučili možnost obarjanja proteinov z amonijevim sulfatom, ki jih tudi stabilizira.

4.1.3.1 Frakcijsko obarjanje proteinov iz ekstrakta listov Zorina 0 % do 90 % amonijevega sulfata

Za ta poskus obarjanja smo uporabili ekstrakt Zorina, ker je vseboval več proteinov in imel večjo specifično aminopeptidazno aktivnost kot Češnjevec. Želeli smo ugotoviti s katero koncentracijo amonijevega sulfata dobimo največje količine AAP in LAP ter obenem odstranimo čim več drugih proteinov. Povedano z drugimi besedami, želeli smo določiti tisto koncentracijo amonijevega sulfata pri kateri bo stopnja očiščenja največja obenem pa bodo izgube AAP in LAP najmanjše. V prvi fazi smo hoteli določiti širše koncentracijsko območje amonijevega sulfata s katerim bi se obarjale AAP in LAP. Odločili smo se, da bomo obarjali z 50, 70 in 90 % amonijevim sulfatom. Vsem oborinam in supernatantom, ki smo jih dobili pri tem frakcijskem obarjanju smo določili koncentracije proteinov (PK), delež (%) proteinov od ekstrakta (PE), delež (%) proteinov od predhodnega supernatanta (PP), specifično aktivnost na substrat APNA (AS), delež (%) celotne aktivnosti na substrat APNA v primerjavi z ekstraktom (AE), delež (%) celotne aktivnosti na substrat APNA v primerjavi z predhodnim supernatantom (AP), specifično aktivnost na substrat LPNA (LS), delež (%) celotne aktivnosti na substrat LPNA v primerjavi z ekstraktom (LE), delež (%) celotne aktivnosti na substrat LPNA v primerjavi z predhodnim supernatantom (LP).

Rezultati so prikazani z diagramom obarjanja, podanem v sliki 7.



Slika 7: Postopno obarjanje ekstrakta fižolovih listov, sorte Zorin, s 50 %, 70 % in 90 % amonijevim sulfatom

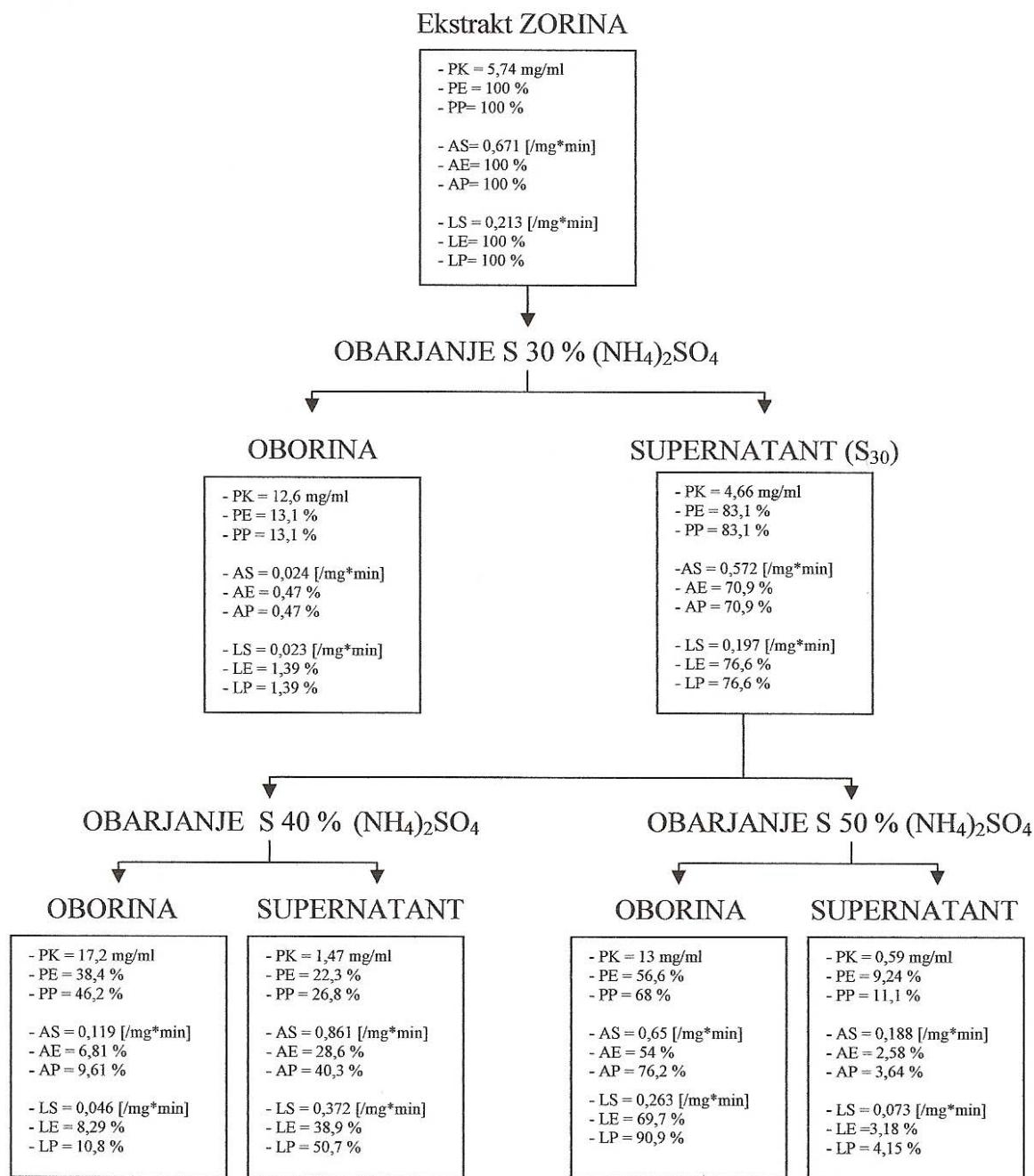
Ker smo že pri obarjanju s 70 % amonijevim sulfatom oborili vse AAP in LAP, nismo določili aktivnosti v supernatantu, ki smo ga dobili po centrifugiraju vzorca po obarjanju s 70 % amonijevim sulfatom. Zato smo pri nadalnjem obarjanju določali samo še vsebnost proteinov. Večino alaninaminopeptidaz in levcinaminopeptidaz smo oborili že pri obarjanju s 50 % amonijevim sulfatom. Zato smo se odločili, da bomo v nadaljevanju poskusili obarjati še z manjšimi deleži amonijevega sulfata.

4.1.3.2 Frakcijsko obarjanje proteinov iz ekstrakta listov Zorina: 0 → 30 % → 40 % in 0 → 30 % → 50 % amonijevega sulfata

V tem eksperimentu smo uporabili bolj koncentriran ekstrakt Zorinovih listov (na 1 g listov Zorina smo dodali 2 ml ekstrakcijskega pufra), da bi tako izboljšali izkoristek obarjanja. Vsi ekstrakti, ki smo jih uporabili v nadaljevanju našega dela, so bili pripravljeni na omenjen način.

Najprej smo proteine iz ekstrakta listov Zorina obarjali s 30 % amonijevim sulfatom, nato pa smo dobljeni supernatant razdelili na dva dela in polovico proteinov obarjali s 40 % amonijevim sulfatom, drugo polovico pa s 50 % amonijevim sulfatom. Za proteine, aktivnost na substrat APNA in aktivnost na substrat LPNA smo uporabljali enake oznake kot pri 4.1.3.1.

Pri obarjanju s 30 % amonijevim sulfatom smo odstranili zelo veliko pigmentov, oborina je bila zelenkasta in se je slabo raztopljal. Raztopina, ki smo jo dobili pri njenem raztopljanju, je bila zelenkasto obarvana. Specifična aminopeptidazna aktivnost v oborini je bila zanemarljiva (sliki 8). Supernatant (S_{30}) je bil rumenkasto obarvan, specifična aminopeptidazna aktivnost v njem pa je bila nekoliko manjša kot v ekstraktu. V supernatantu je ostalo več kot 80 % proteinov iz ekstrakta.



Slika 8: Obarjanje ekstrakta fižolovih listov, sorte Zorin, s 30 % amonijevim sulfatom in nato vzporedno s 40 % in 50 % amonijevim sulfatom

Pri obarjanju proteinov iz (S_{30}) s 40 % amonijevim sulfatom smo odstranili več kot tretjino proteinov, a le malo AAP in LAP, saj so bile aktivnosti v raztopini oborine zanemarljive. Specifična aktivnost v supernatantu pa je bila višja kot v ekstraktu, kar pomeni, da smo na ta način že dosegli določeno stopnjo čiščenja AAP in LAP. Oborina je bila belo-rjava in se je kar dobro raztopljalna. Supernatant je bil rumenkasto obarvan.

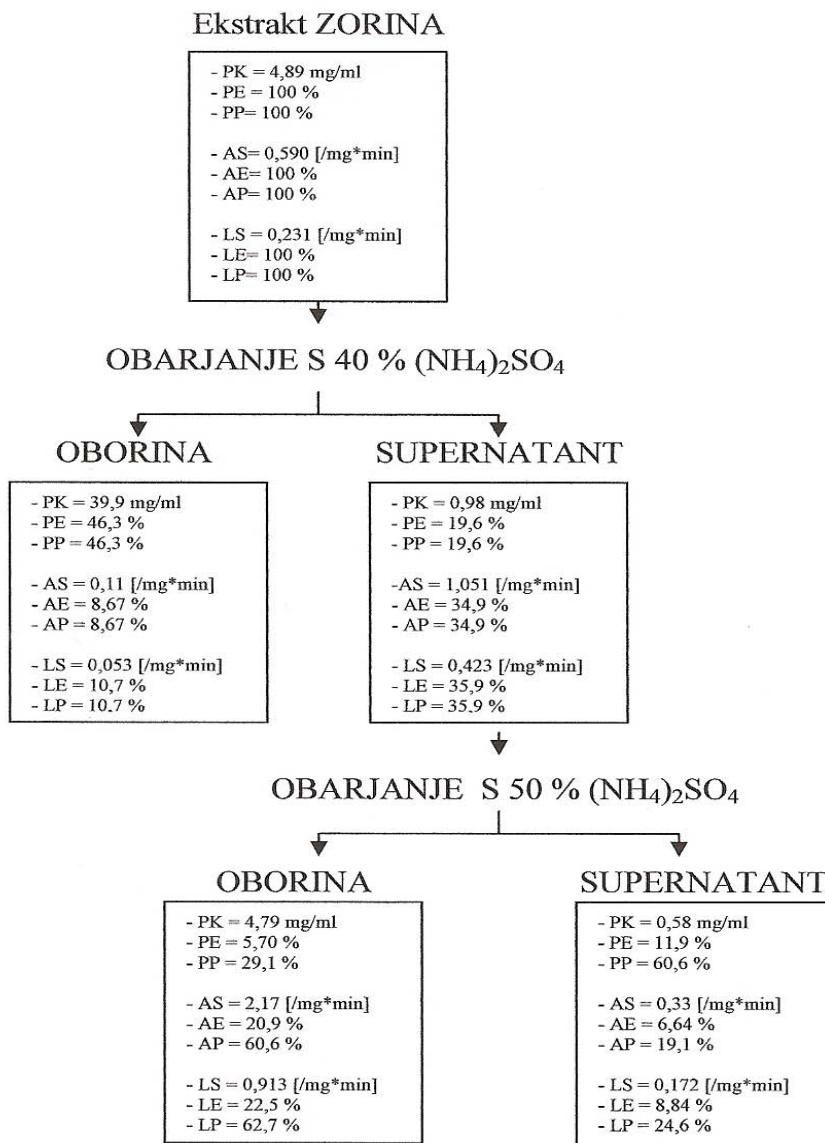
Priobarjanju proteinov iz S₃₀ s 50 % amonijevim sulfatom smo oborili skoraj vse proteine, tako AAP in LAP, kakor tudi tiste, ki so za naš eksperiment nečistoča. Specifična aktivnost AAP in LAP v raztopini oborine je bila približno enaka kot v ekstraktu. Specifična aminopeptidazna aktivnost v supernatantu je bila zanemarljiva. Oborina je bila belo-rjava in se je kar dobro raztapljalna, bilo jo je nekoliko več kot pri obarjanju s 40 % amonijevim sulfatom. Supernatant je bil rumenkasto obarvan, mogoče le za malenkost svetlejši kot pri obarjanju s 40 % amonijevim sulfatom.

4.1.3.3 Frakcijsko obarjanje proteinov iz ekstrakta listov Zorina: 0 → 40 % → 50 % amonijevega sulfata

Namen tega frakcijskega obarjanja je bil ugotoviti ali lahko za prvo stopnjo obarjanja izberemo 40 % amonijev sulfat in ne 30 % kot v predhodnem eksperimentu. V vsaki fazi smo določali enake parametre, kot pri predhodnem eksperimentu. Rezultati so prikazani na diagramu obarjanja (slika 9).

Pri obarjanju s 40 % amonijevim sulfatom se je oborilo okoli 47 % proteinov, kar je v skladu z našimi pričakovanji. Oborilo se je približno enako proteinov kot se jih je pri obarjanju s 30 % in 40 % amonijevim sulfatom skupaj (51 %, slika 8). Specifični aminopeptidazni aktivnosti v raztopini sedimenta sta bili zanemarljivi. Oborina se je dobro raztapljalna, raztopina pa je bila sivo-rumena.

Supernatant je bil rumenkasto obarvan, vseboval je še 20 % proteinov iz ekstrakta. Specifična aktivnost je bila višja kot v ekstraktu, kar pomeni da smo povečali delež aminopeptidaz v primerjavi z vsemi proteini. Po obarjanju s 50 % amonijevim sulfatom je bila specifična aktivnost v raztopini sedimenta še večja kot v supernatantu po obarjanju s 40 % amonijevim sulfatom, kar pomeni relativno veliko vsebnost AAP in LAP. Oborina se je dobro topila in je bila rumenkasto bela. Vendar pri tem obarjanju izmerjena specifična aktivnost AAP in LAP v supernatantu ni bila zanemarljiva.



Slika 9: Obarjanje ekstrakta fižolovih listov, sorte Zorin, s 40 % amonijevim sulfatom in nato s 50 % amonijevim sulfatom

Iz tega in prejšnjega frakcijskega obarjanja lahko sklepamo, da večino AAP in LAP oborimo z amonijevim sulfatom, katerega koncentracija je med 40 % in 50 %. Vendar rezultate še izboljšamo, če najprej v listni ekstrakt dodamo toliko amonijevega sulfata, da je njegova koncentracija 30 % (slika 8). Zato smo se odločili, da bomo kot prvo stopnjo čiščenja encimov uvedli obarjanje s 30 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in nato vzporedno obarjanje s 40 % in 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Obarjali smo tudi supernatant, ki smo ga dobili pri 40 % obarjanju in sicer s 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4.1.4 Vpliv shranjevanja na aminopeptidazno aktivnost

Ta eksperiment smo izvedli z dvema raztopinama proteinov, ki smo jih dobili s frakcijskim obarjanjem ekstraktov listov Zorina z amonijevim sulfatom. V prvi so bili proteini, ki smo jih oborili z deležem te soli med 30 % in 50 % (P1), v drugi pa proteini, ki smo jih oborili z deležem med 40 % in 50 % (P2). Raztopine smo shranili v hladilniku (5 dni) ali zamrzovalniku na -70°C (5 dni, 2 meseca). Po tem času smo določili vsebnost proteinov in specifično aminopeptidazno aktivnost (preglednica 5). Vedeli smo, da se bo pri postopku izolacije aminopeptidaz pojavila potreba shranjevanja vzorcev, zato smo s tem eksperimentom žeeli ugotoviti, kako pogoji shranjevanja vplivajo na vsebnost proteinov in aktivnosti na substrata APNA in LPNA.

Preglednica 5: Delež topnih proteinov, alanin-aminopeptidazne aktivnosti in levcin-aminopeptidazne aktivnosti, ki preostane po shranjevanju. Vrednosti so izražene kot delež začetne vrednosti za raztopine proteinov, ki smo jih oborili z amonijevim sulfatom med 30 % in 50 % (P1) ter 40 % in 50 % (P2)

	P1		P2		
	HLADILNK (5 dni)	- 70° (5dni)	- 70° (2meseca)	HLADILNIK (5 dni)	- 70° (5dni)
protein (%)	47	74	68	50	106
APNA (%)	76	103	104	81	115
LPNA (%)	57	111	121	63	107

Pri shranjevanju v hladilniku se delež proteinov zmanjšal za polovico, tudi pri shranjevanju pri - 70 °C se njihov delež nekoliko zmanjšal, razen pri raztopini P2. Aminopeptidazna aktivnost na substrata APNA in LPNA se je zmanjšala že po petih dneh shranjevanja v hladilniku. Pri shranjevanju na -70 °C ni opaziti zmanjševanja encimske aktivnosti niti po dveh mesecih. Malenkost večjo izmerjeno aktivnost po zmrzovanju, lahko pripisemo selektivnemu obarjanju proteaznih inhibitorjev.

Rezultati tega eksperimenta so pokazali, da je v različnih fazah izolacije, raztopine aminopeptidaz najbolje shraniti pri - 70 °C.

4.2 IZOLACIJA AMINOPEPTIDAZ

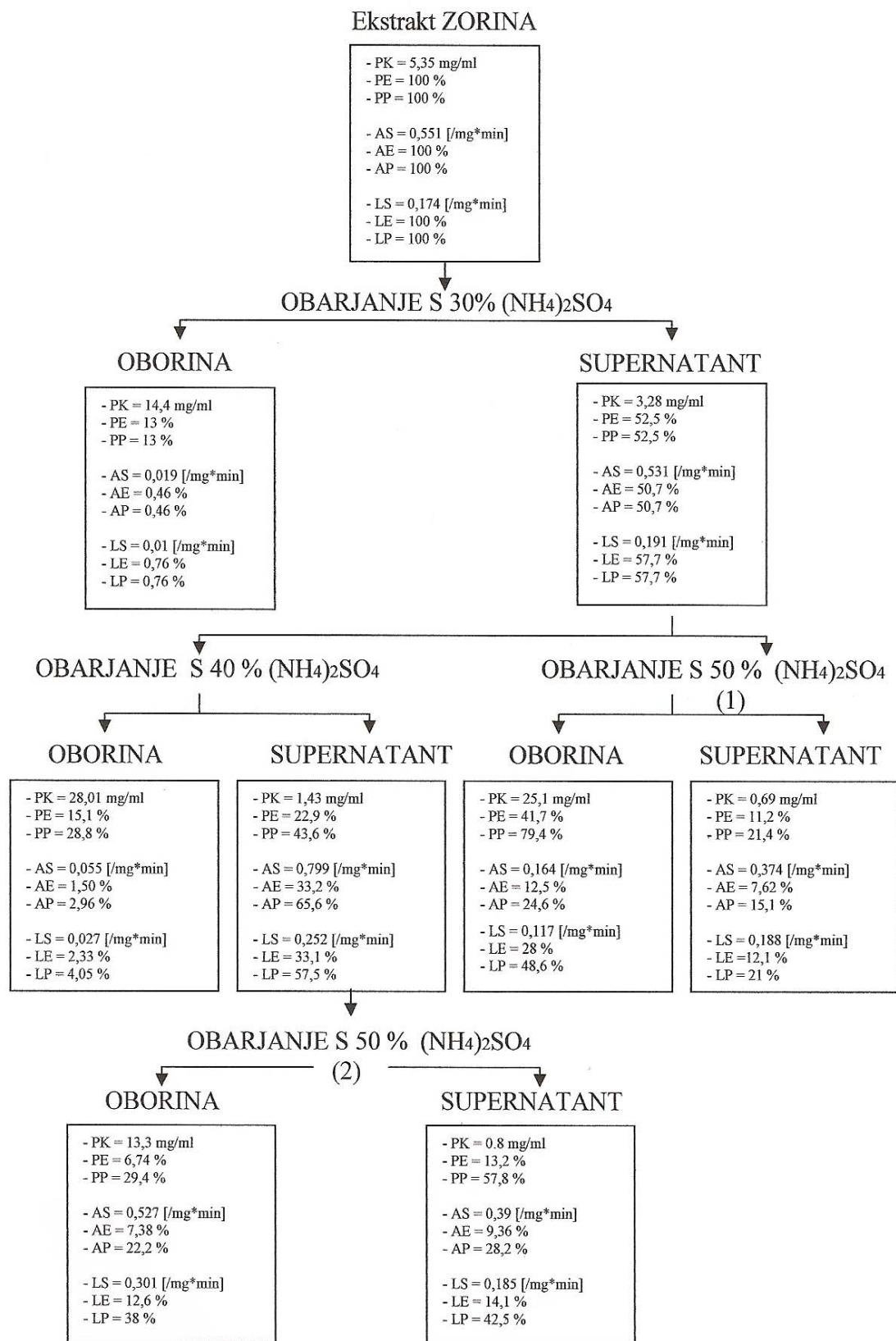
4.2.1 Priprava ekstrakta in obarjanje proteinov z amonijevim sulfatom

Ekstrakt smo pripravili iz 207 g zamrznjenih (-70 °C) listov fižola cv. Zorin. Liste smo homogenizirali z 360 ml ekstrakcijskega pufra in 20 g PVP. Po centrifugiranju smo dobili 304 ml supernatanta. Frakcijsko obarjanje proteinov iz supernatanta smo začeli s 30 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Supernatant smo razdelili na dva dela. Enemu smo takoj dodali $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do 50 % koncentracije in dobili oborjene proteine, ki smo jih označili kot P₃₀₋₅₀. Proteine iz drugega dela supernatanta smo najprej obarjali s 40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nato pa iz dobljenega supernatanta še s 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Raztopino dobljene oborine smo poimenovali P₃₀₋₄₀₋₅₀.

Tudi pri izolaciji aminopeptidaz smo v vsaki fazi določali enake parametre, kot pri 4.1.3.1. Rezultati te stopnje izolacije so podani na sliki 10.

Pri obarjanju proteinov z amonijevim sulfatom do koncentracije 30 % smo odstranili pigmente in za nas nekaj nekoristnih proteinov. Specifična aminopeptidazna aktivnost v oborini je bila zanemarljiva. V supernatantu, sodeč po rezultatih meritve z metodo, ki smo jo uporabili (3.2.3.1) ostane dobrih 50 % proteinov iz ekstrakta. Specifična aktivnost AAP je bila nekoliko nižja kot v ekstraktu, aktivnost LAP pa višja.

Pri obarjanju z amonijevim sulfatom do koncentracije 40 % smo odstranili dobrih 15 % nekoristnih proteinov, kajti aktivnosti AAP in LAP v raztopini oborine sta bili zanemarljivi. Specifična aminopeptidazna aktivnost v supernatantu je bila višja kot v ekstraktu, kar pomeni, da smo nekoristne proteine odstranili z oborino in da je supernatant vseboval večino AAP in LAP.



Slika 10: Obarjanje ekstrakta fižolovih listov, sorte Zorin, z amonijevim sulfatom od 30 % do 50 % nasičenja

V raztopini P₃₀₋₄₀₋₅₀ je bila specifična aktivnost AAP malenkost nižja, LAP pa višja kot v ekstraktu, kar pomeni, da smo oborili želene proteine. Pri P₃₀₋₅₀ sta bili AAP in LAP specifični aktivnosti nižji kot v ekstraktu, kar pomeni, da obarjanje ni bilo tako učinkovito.

4.2.2 Gelska izključitvena kromatografija

S to metodo smo ločevali komponente vzorca na osnovi molekulske mase proteinov. Uporabili smo jo kot naslednjo fazo v izolaciji AAP in LAP. Gelsko izključitveno kromatografijo smo izvedli na koloni z nosilcem Sephadex G-200.

4.2.2.1 Umerjanje kolone

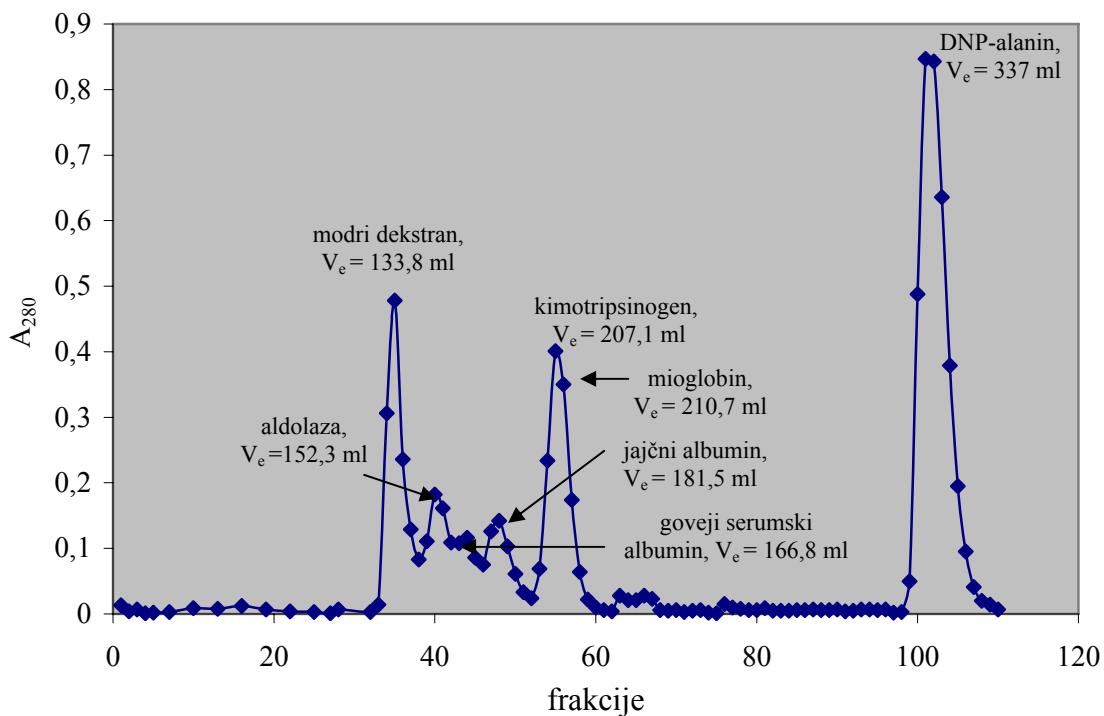
Elucijski volumni (V_e) posameznih proteinov so obratno sorazmerni logaritmu molekulskih mas ($M_r \propto -\log(V_e/V_0)$). Če kolono umerimo s proteini znanih molekulskih mas in narišemo umeritveno krivuljo, lahko s pomočjo te zveze določimo tudi približno molekulsko maso proteinov v vzorcu.

Za umeritveno krivuljo smo uporabili po 2,5 mg:

- modrega dekstrana ($M_w = 200$ kDa),
- govejega serumskega albumina ($M_w = 67$ kDa),
- aldolaze ($M_w = 158$ kDa),
- jajčnega albumina ($M_w = 45$ kDa),
- kimotripsinogena ($M_w = 25$ kDa),
- mioglobina ($M_w = 17,8$ kDa),
- DNP-alanin ($M_w = 255$ Da),

in jih raztopili v 5 ml elucijskega pufra. Raztopino standardov smo nanesli na kolono in počakali, da je poniknila v gel. Takoj za tem smo kolono zaprli, nad gel nalili elucijski pufer in preko črpalke priključili dotok elucijskega pufra. Kolono smo odprli in začeli zbirati frakcije, katerih volumen smo naravnali na 3,5 ml.

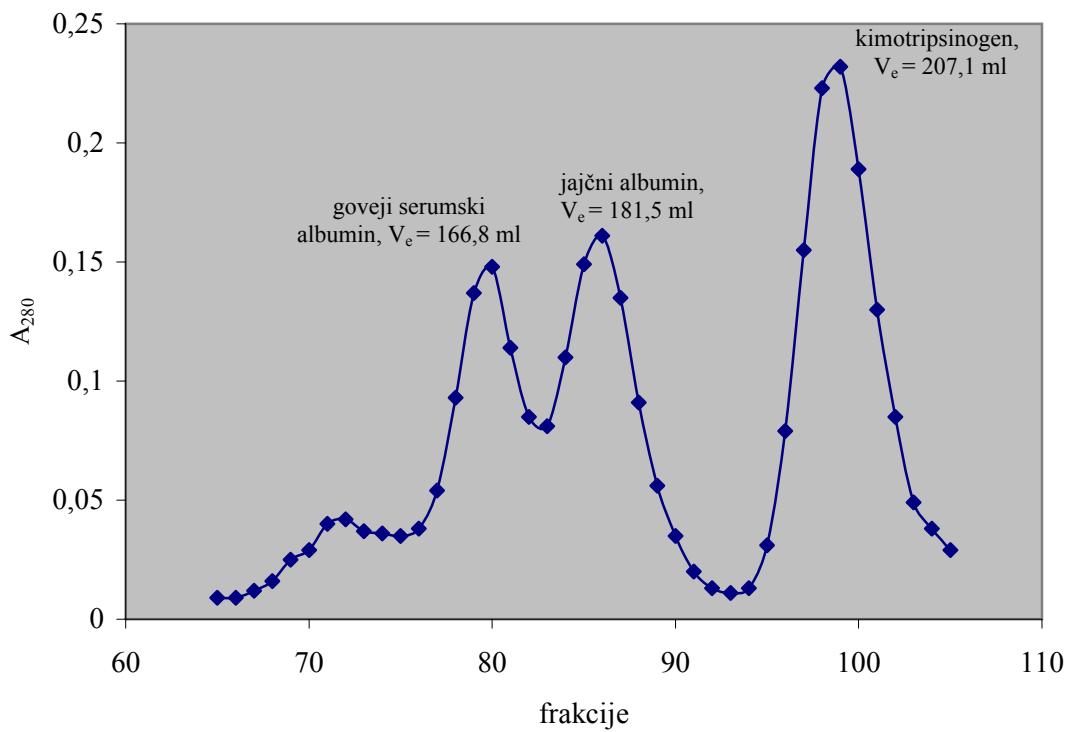
Merili smo absorbenco pri 280 nm, da smo določili približno koncentracijo proteinov v posameznih frakcijah ter tako dobili vrhove aktivnosti posameznih proteinov znanih molekulskih mas (slika 11).



Slika 11: Eluciski diagram, ki smo ga dobili po gelski izključitveni kromatografiji standardov, modrega dekstrana, govejega serumskega albumina, aldolaze, jajčnega albumina, kimotripsinogena, mioglobina in DNP-alanina

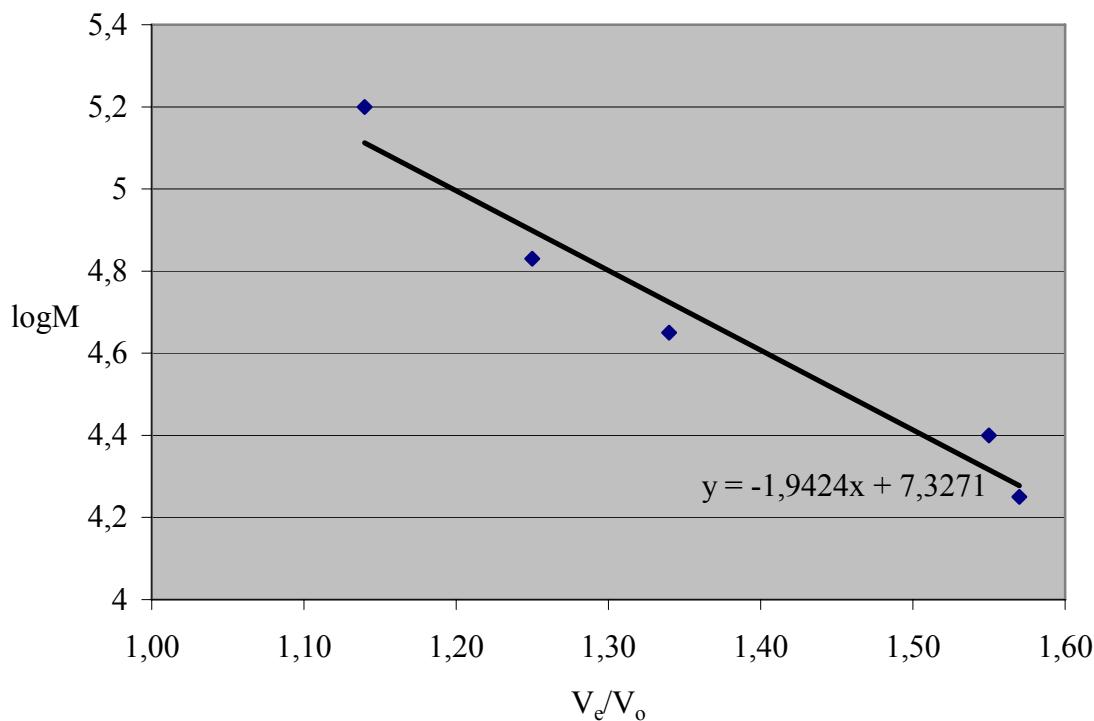
Elucijske volumne smo izračunali na osnovi volumnov frakcij, ki smo jih določili iz razlike mas polne in prazne epruvete za posamezno frakcijo. Izključitveni volumen (V_o) smo določili iz elucijskega volumna modrega dekstrana, ki je skozi gel potoval skupaj s fronto.

Kimotripsinogen in mioglobin se nista dobro ločila. Zato smo se odločili, da bomo ponovili umeritveno krivuljo s tremi proteini; govejim serumskim albuminom, jajčnim albuminom in kimotripsinogenom in tako dobili natančnejši elucijski volumen slednjega.



Slika 12: Eluciski diagram, ki smo ga dobili po gelski izključitveni kromatografiji, s proteini znanih molekulskih mas (goveji serumski albumin, jajčni albumin, kimotripsinogen)

S pomočjo obeh elucijskih diagramov smo dobili umeritveno krivuljo, iz katere smo po nanosu realnih vzorcev lahko odčitali približno molekulsko maso proteinov.



Slika 13: Umeritvena krivulja za določitev približnih molekulskih mas proteinov v vzorcu

4.2.2.2 Gelska izključitvena kromatografija proteinov P₃₀₋₅₀

Najprej smo kromatografirali raztopino oborine P₃₀₋₅₀, ki smo jo dobili zobarjanjem proteinov pri koncentraciji amonijevega sulfata 30-50 %. Razdelili smo jo na tri dele (4 ml, 4,2 ml in 3,4 ml). V prvem poskusu smo na kolono nanesli 4 ml vzorca. Želeli smo ugotoviti, če je ta metoda primerna za nadaljnjo stopnjo očiščenja AAP in LAP. Poleg absorbance pri 280 nm, smo v vsaki frakciji merili tudi aktivnost na substrata APNA in LPNA. Na osnovi elucijskih volumnov frakcij, v katerih je bila aktivnost največja, smo s pomočjo umeritvene krivulje (slika 13) določili približno molekulsko maso AAP in LAP.

Elucijski profil, dobljen z merjenjem A₂₈₀ (slika 14A) je pokazal, da smo z gelsko izključitveno kromatografijo aminopeptidazne aktivnosti na APNA in LPNA ločili od precejšnjega dela ostalih proteinov in/ali obarvanih snovi, delno pa tudi med seboj. Zato smo kromatografirali tudi preostala dva dela raztopine P₃₀₋₅₀. Elucijski diagrami so prikazani na sliki 14A, B in C.

Iz elucijskega diagrama (slika 14A) vidimo, da je bil vrh aktivnosti AAP v frakciji 78 (V_e = 164,8 ml). Aktivnost na LPNA se je eluirala v dveh vrhovih, prvi je bil v frakciji 80 (V_e = 169,0 ml), drugi pa v frakciji 82 (V_e = 173,1 ml).

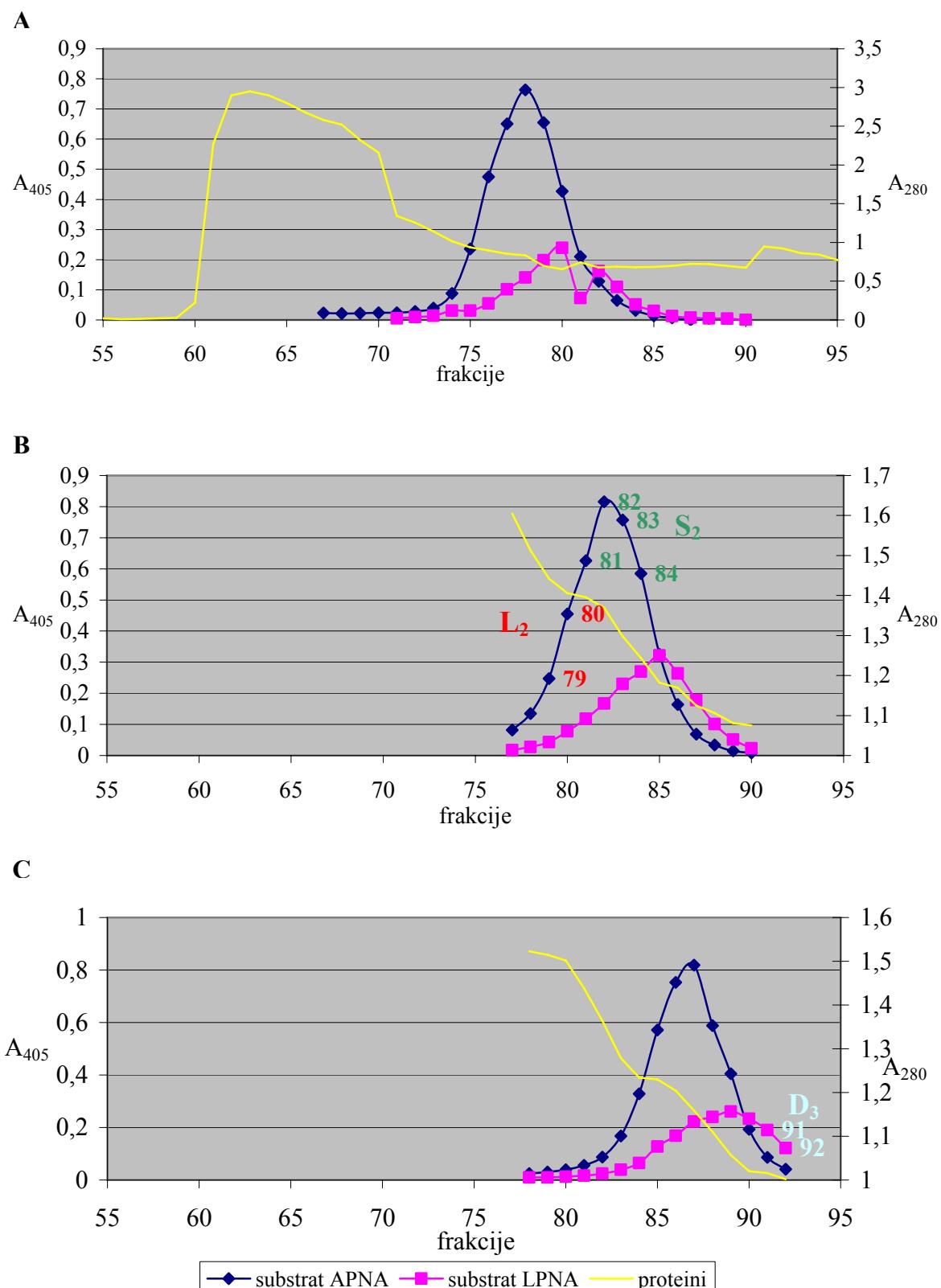
Iz umeritvene krivulje smo odčitali molekulska maso AAP, ki znaša 86 kDa. Molekulska masa aktivnosti na LPNA, ki se je eluirala v prvem vrhu, bi bila 75 kDa, če upoštevamo drugi vrh pa 65 kDa.

Z drugo kromatografijo smo dobili slabšo ločbo LAP (slika 14B). Vrh aktivnosti AAP je bil v frakciji 82 ($V_e = 166,1$ ml) in LAP v frakciji 85 ($V_e = 172,1$ ml). Ocenjeno na osnovi te ločbe je molekulska masa AAP 83 kDa in LAP, z vrhom v frakciji 85; 68 kDa.

Molekulska masa AAP, določena na osnovi tretje kromatografije (slika 14C), je bila 80 kDa, molekulska masa LAP pa 71 kDa.

Posamezne frakcije smo združili, ker so elucijski profili nakazali, da je prisotnih več različnih aminopeptidaz aktivnih na APNA in LPNA. Tako smo se odločili, da bomo posamezne frakcije združili na tak način, da bi dobili vzorce v katerih bi bile AAP in LAP čim bolj ločeni in da bi obenem obdržali čim več aminopeptidaz. Frakcije smo razdelili na leve, desne in srednje in jih ustrezno označili. Tako L_2 pomeni leve frakcije po kromatografiji proteinov iz oborine P_{30-50} in L_4 leve frakcije po kromatografiji proteinov iz oborine $P_{30-40-50}$. D_2 in D_4 so desne, S_2 in S_4 pa srednje frakcije.

Združili in označili smo: frakciji 79, 80 (L_2) in frakcije 81, 82, 83, 84 (S_2) (slika 14B); frakciji 91 in 92 (D_3) (slika 14C) ter jih shranili pri -70°C za nadaljnjo izolacijo.

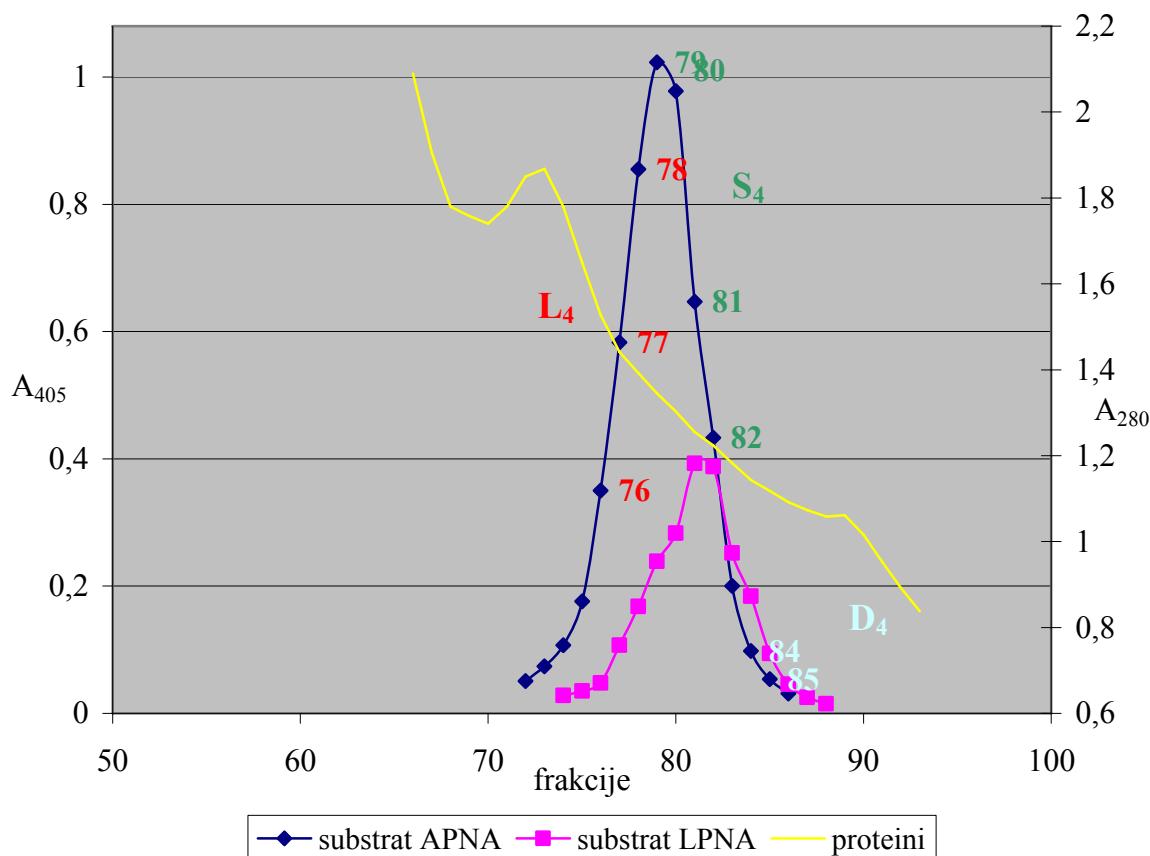


Slika 14: Elucijski diagrami encimov, ki kažejo aktivnosti na substrata APNA in LPNA, merjeno pri 405 nm in absorbanca pri 280 nm. Na kolono smo nanesli: 4 ml raztopine P₃₀₋₅₀ (A), 4,2 ml raztopine P₃₀₋₅₀ (B) in 3,4 ml raztopine P₃₀₋₅₀ (C)

Čeprav prihaja do razlik v številki frakcije v katerih se izločajo maksimalne aktivnosti, so elucijski volumni pri vseh kromatografijah praktično enaki, opažena razlika je posledica tega, da vsaka frakcija ni vsebovala natančno enak volumen vzorca.

4.2.2.3 Gelska izključitvena kromatografija proteinov P₃₀₋₄₀₋₅₀

Kromatografija raztopine oborine proteinov P₃₀₋₄₀₋₅₀ (slika 11) je dala podobne rezultate kot prejšnje tri. Vendar lahko rečemo, da je v tem primeru očiščenost AAP in LAP večja, kar vidimo iz primerjave aktivnosti AAP in LAP (A_{405}) in A_{280} v frakcijah, v katerih smo določali aktivnosti. Na kolono smo nanesli 3 ml raztopine P₃₀₋₄₀₋₅₀.



Slika 15: Elucijski diagram encimov, ki kaže aktivnost na substrata APNA in LPNA, merjeno pri 405 nm in absorbanca pri 280 nm, na kolono smo nanesli 3,4 ml raztopine oborine P₃₀₋₄₀₋₅₀.

Iz elucijskega diagrama (slika 15) vidimo, da je bil vrh aktivnosti AAP v frakciji 79 ($V_e = 165,5$ ml) in LAP v frakciji 81 ($V_e = 169,7$ ml). Iz umeritvene krivulje smo odčitali molekulsko maso AAP, ki znaša 84 kDa. Molekulska masa LAP pa je, ocenjeno na osnovi te kromatografije, 73 kDa.

Združili in označili smo: frakcije 76, 77, 78 (L₄), frakcije 79, 80, 81, 82 (S₄), frakciji 84, 85 (D₄) ter jih shranili pri -70 °C za nadaljnjo izolacijo.

4.2.3 Tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov (FPLC) na koloni z ionskim izmenjevalcem

Kot zadnjo stopnjo čiščenja AAP in LAP, izoliranih iz listov fižola, smo uporabili ionsko izmenjevalno kromatografijo, na FPLC. Ker so že predhodno ugotovili, da se aktivnosti na APNA in LPNA vežejo na anionski izmenjevalec s katerega se potem lahko eluirajo z gradientom koncentracije NaCl (Bidovec, 1999), smo se odločili, da bomo uporabili Q Sepharose FF.

4.2.3.1 Ugotavljanje primernega gradiента koncentracije NaCl za elucijo aminopeptidaz, vezanih na anionski izmenjevalec Q Sepharose FF

Q Sepharose FF smo uporabili v obeh predposkusih za določitev primernega gradienta koncentracije NaCl. Stopnjo vezave AAP in LAP na kolono in primerni gradient za njihovo elucijo z gela smo ugotavljali tako, da smo naredili dva predposkusa v mikrocentrifugirkah, v katerih smo najprej posnemali vezavo proteinov na izmenjevalec, potem pa še spiranje proteinov z izmenjevalca v koloni. Za elucijo proteinov smo uporabili raztopine različnih koncentracij NaCl v pufru s konstantnim pH. Eluirane AAP in LAP smo določili s testiranjem supernatanta na substrata APNA in LPNA.

V prvem predposkuusu smo pripravili suspenzijo gela z destilirano vodo v razmerju 1:1. Uporabili smo frakcijo št. 82 iz gelske kromatografije proteinov P₃₀₋₅₀, prikazane na sliki 14B (4.2.2.2). V drugem predposkuusu pa smo pripravili suspenzijo gela v 50 mM PP, pH 8, da je bilo razmerje med hidratiziranim izmenjevalcem in pufrom 1:1, v tem primeru smo uporabili frakcijo št. 83 iz gelske kromatografije proteinov P₃₀₋₅₀, prikazane na sliki 14B (4.2.2.2). Ostali del postopka je enak za oba predposkusa (3.2.9).

Po eluciji z določenimi koncentracijami NaCl (preglednica 6), smo v eluentih merili aktivnosti na substrata APNA in LPNA.

Preglednica 6: Aktivnosti na substrata APNA in LPNA, merjene pri 405 nm, tistih proteaz, ki so se eluirale z ionskega izmenjevalca Q Sepharose FF z določenimi koncentracijami NaCl. Prikazane so vrednosti frakcije št. 82 (1) in št. 83 (2) iz gelske kromatografije raztopine P₃₀₋₅₀-(1)- prvi predposkus in (2)- drugi predposkus

Raztopina NaCl (M)	ΔA_{405} merjena na substrat APNA (1)	ΔA_{405} merjena na substrat APNA (2)	ΔA_{405} merjena na substrat LPNA (1)	ΔA_{405} merjena na substrat LPNA (2)
0	0,042	0,193	0,019	0,029
0,4	0,841	0,839	0,126	0,136
0,8	1,017	0,978	0,18	0,181
1,2	1,005	0,959	0,174	0,171
1,6	0,978	0,939	0,17	0,179
2	0,96	0,893	0,168	0,168

Iz obeh predposkusov je razvidno, da se pri izbranem pH večina encimske aktivnosti veže na izmenjevalec, ko ne dodamo NaCl. Za elucijo pa je dovolj že 0,4 M NaCl.

4.2.3.2 Vpliv dialize na vsebnost proteinov in aminopeptidazno aktivnost frakcij, ki jih dobimo pri gelski kromatografiji

Predno smo izbrane združene frakcije, ki smo jih dobili pri gelski kromatografiji, nanesli na kolono ionsko izmenjevalne kromatografije, smo jih najprej dializirali napram 20 mM PP, pH 7,0. To pa zato, da smo odstranili NaCl, ki je bil v elucijskem pufru pri gelski kromatografiji in vzorec prevedli v pufer v katerem smo ga nameravali dalje kromatografirati. Z namenom, da bi ugotovili, kakšen vpliv ima dializa, smo pred njo in nato še po njej določili vsebnost proteinov in aminopeptidazno aktivnost (preglednica 7).

Preglednica 7: Vsebnost proteinov (mg/ml), A₂₈₀ in specifična aktivnost na substrata APNA in LPNA v frakcijah, ki jih dobimo pri gelski kromatografiji pred in po dializi. 1 – je oznaka za frakcije S₂ iz gelske kromatografije proteinov iz oborine P₃₀₋₅₀ prikazane na sliki 14B. 2 - je oznaka za frakcije L₂ iz iste gelske kromatografije

Frakcije	Povprečna vrednost proteinov [mg/ml]	A ₂₈₀	specifična aktivnost na substrat APNA [ΔA_{405} /mg proteina *min]	specifična aktivnost na substrat LPNA [ΔA_{405} /mg proteina *min]
1. pred dializo	0,25	1,11	2,58	0,405
1. po dializi	0,20	0,506	2,85	0,467
2. pred dializo	0,29	1,4	1,17	0,179
2. po dializi	0,23	0,687	1,15	0,186

Pri dializi smo izgubili nekaj proteinov, vendar ne encimov, katere smo žeeli očistiti, saj se aktivnosti na substrata APNA in LPNA nista zmanjšali.

4.2.3.3 Kromatografija frakcij dobljenih po gelskih kromatografijah proteinov iz oborine P₃₀₋₅₀ in oborine P₃₀₋₄₀₋₅₀

Združene frakcije iz gelskih kromatografij proteinov iz oborine P₃₀₋₅₀ in oborine P₃₀₋₄₀₋₅₀ (4.2.2.2 in 4.2.2.3) smo po dializi nanesli na kolono Mono Q 5/50 G/L, ki je bila napolnjena z močnim anionskim izmenjevalcem Q Sepharose FF. Elucija je potekala z gradientom NaCl od 0 do 0,5 M v 20 mM PP s pH 7,0. Na koncu smo kolono sprali z 1 M NaCl.

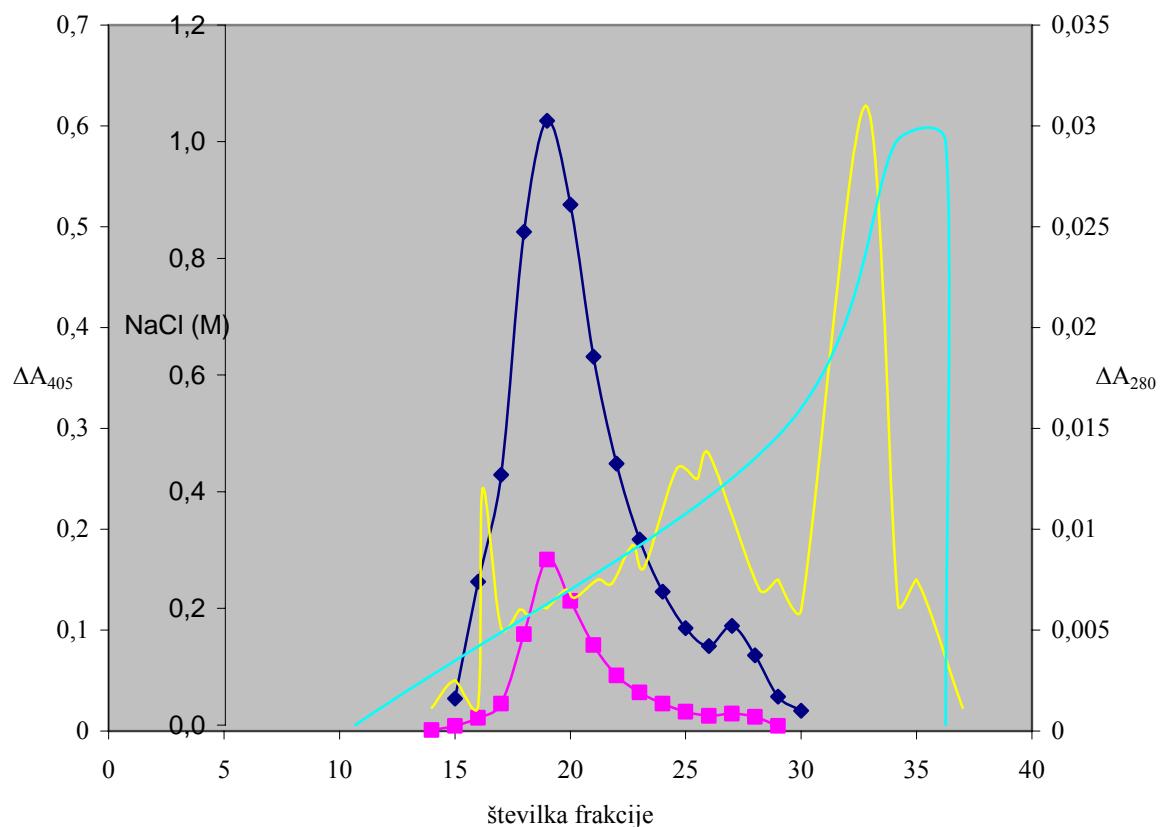
4.2.3.3.1 Kromatografija frakcij S

Na sliki 16A je prikazan elucijski diagram ionsko izmenjevalne kromatografije 2 ml frakcij S₂ (slika 14B). V frakcijah od 15 do 30 smo izmerili aktivnosti na substrata APNA in LPNA. Najvišjo aktivnosti na substrata APNA in LPNA smo izmerili v frakciji št.19, ki se je eluirala z 0,22 M NaCl. Vsebnost proteinov, merjena z absorbanco pri 280 nm, je bila nizka.

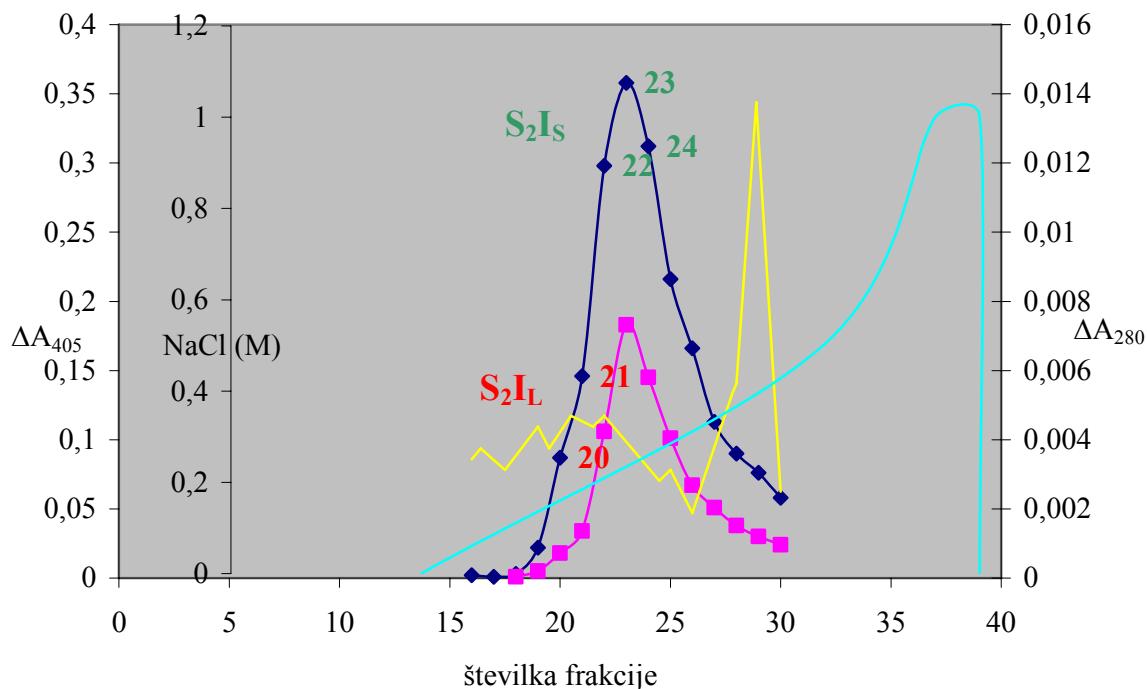
Postopek smo ponovili še z nanosom 0,5 ml. Rezultati so prikazani na sliki 16B. Največjo aktivnost na AAP in LAP smo izmerili v frakciji 23, ki se je eluirala z 0,22 M NaCl. Aktivnost na APNA je bila nekoliko večja. Aktivnost AAP iz prejšnje kromatografije (slika 16A) je skoraj še enkrat večja kot AAP te kromatografije, kar je razumljivo saj je bil tudi volumen nanešenega vzorca večji. Aktivnost LAP pa je nekoliko večja od prejšnje. Vsebnost proteinov, merjena z absorbanco pri 280 nm, je bila še za polovico manjša od predhodne kromatografije.

Nazadnje pa smo kromatografirali 2 ml S₄ frakcij (slika 15). Ugotovili smo, da so aktivnosti na substrata APNA in LPNA bile prisotne v frakcijah od 18 do 35. Kot vidimo iz slike 16C, smo največjo aktivnost na APNA in LPNA izmerili v frakciji 23, ki se je eluirala z 0,22 M NaCl, in je na oba substrata približno enaka. V drugih frakcijah pa je aktivnost na substrat APNA bila večja. Značilno je, da je na elucijskem diagramu, zlasti v primeru aktivnosti na APNA, razvidno več vrhov.

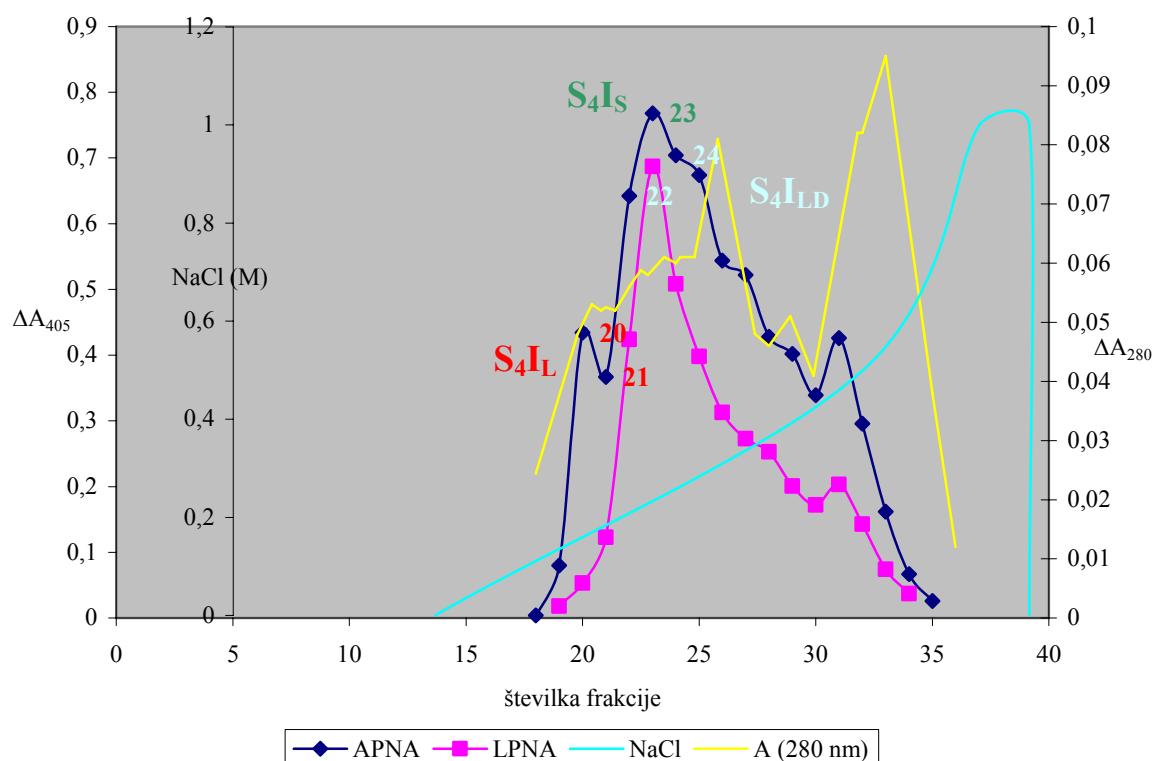
A



B



C

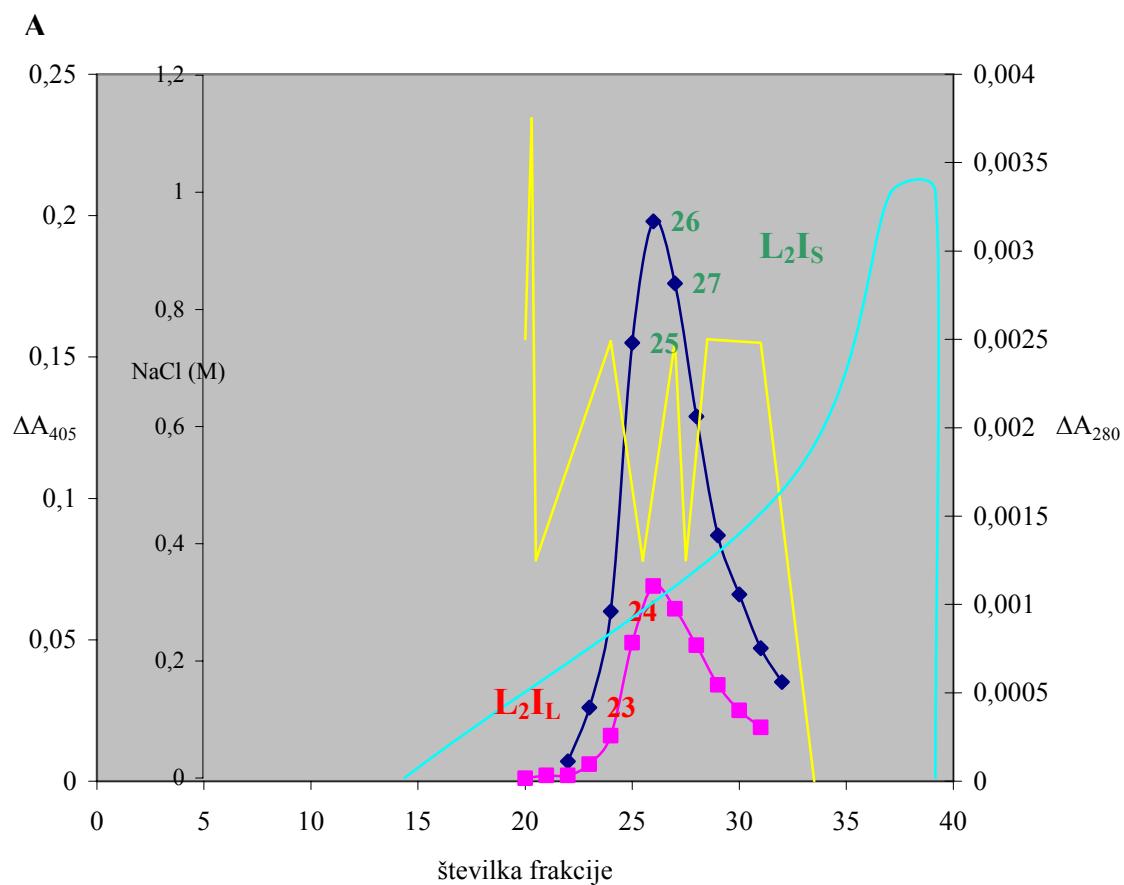


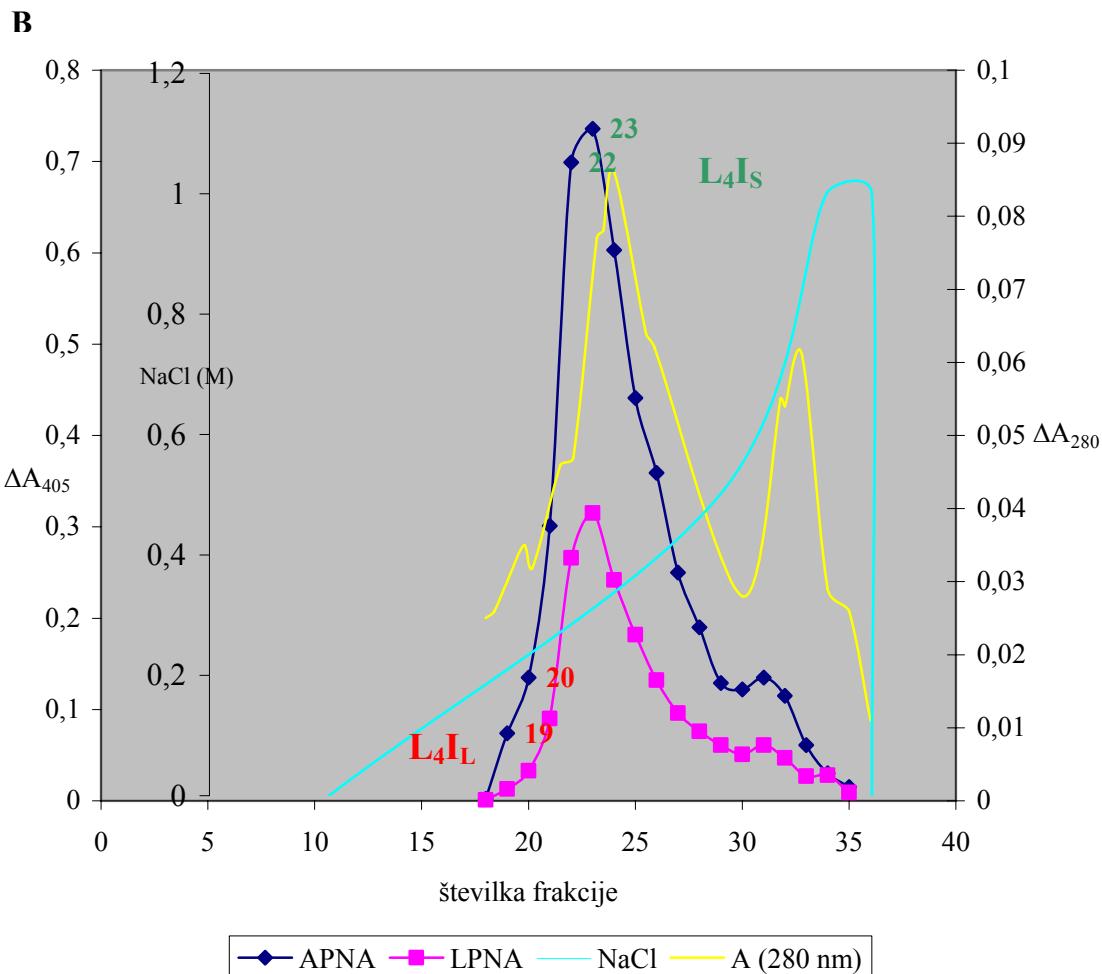
Slika 16: FPLC kromatogram, ki smo ga dobili z nanosom (A) 2 ml, (B) 0,5 ml frakcij S_2 (slika 14B) in (C) 2 ml frakcij S_4 (slika 15) na kolono Mono Q 5/50 GL in elucijo z gradienptom NaCl. Frakcijam smo določili aktivnost na substrata APNA in LPNA.

Za nadaljnje delo smo združili in označili frakcije na enak način kot frakcije dobljene po gelski kromatografiji (4.2.2.2). Tako smo frakcije označili: 20, 21-slika 16B (S_2I_L); 22, 23, 24 – slika 16B (S_2I_S); 20, 21-slika 16C (S_4I_L), 23-slika 16C (S_4I_S); 22, 24-slika 16C (S_4I_{LD}) jih skoncentrirali in shranili pri -70°C .

4.2.3.3.2 Kromatografija frakcij L

Na kolono smo najprej nanesli 2 ml frakcij L_2 (slika 14B) in nato še 2 ml frakcij L_4 (slika 15). Po kromatografiji vzorca L_2 smo v frakcijah iz od 20 do 32 izmerili aktivnost na substrata APNA in LPNA (slika 17A), prav tako pa smo po kromatografiji vzorca L_4 izmerili aktivnost na omenjena substrata v frakcijah od 18 do 35 (slika 17B).





Slika 17: FPLC kromatogram, ki smo ga dobili z nanosom (A) 2 ml frakcij L₂ (slika 14B) in (B) 2 ml frakcij L₄ (slika 15) na kolono Mono Q 5/50 GL in elucijo z gradientom NaCl. Frakcijam smo določili aktivnost na substrata APNA in LPNA.

Kot vidimo iz slike 17A, je bila največja aktivnost na APNA in LPNA pri kromatografiji vzorca L₂ v frakciji 26, ki se je eluirala z 0,31 M NaCl. Vendar pa sta obe aktivnosti relativno majhne. Vsebnost proteinov, merjena z absorbancijo pri 280 nm, je bila zelo nizka.

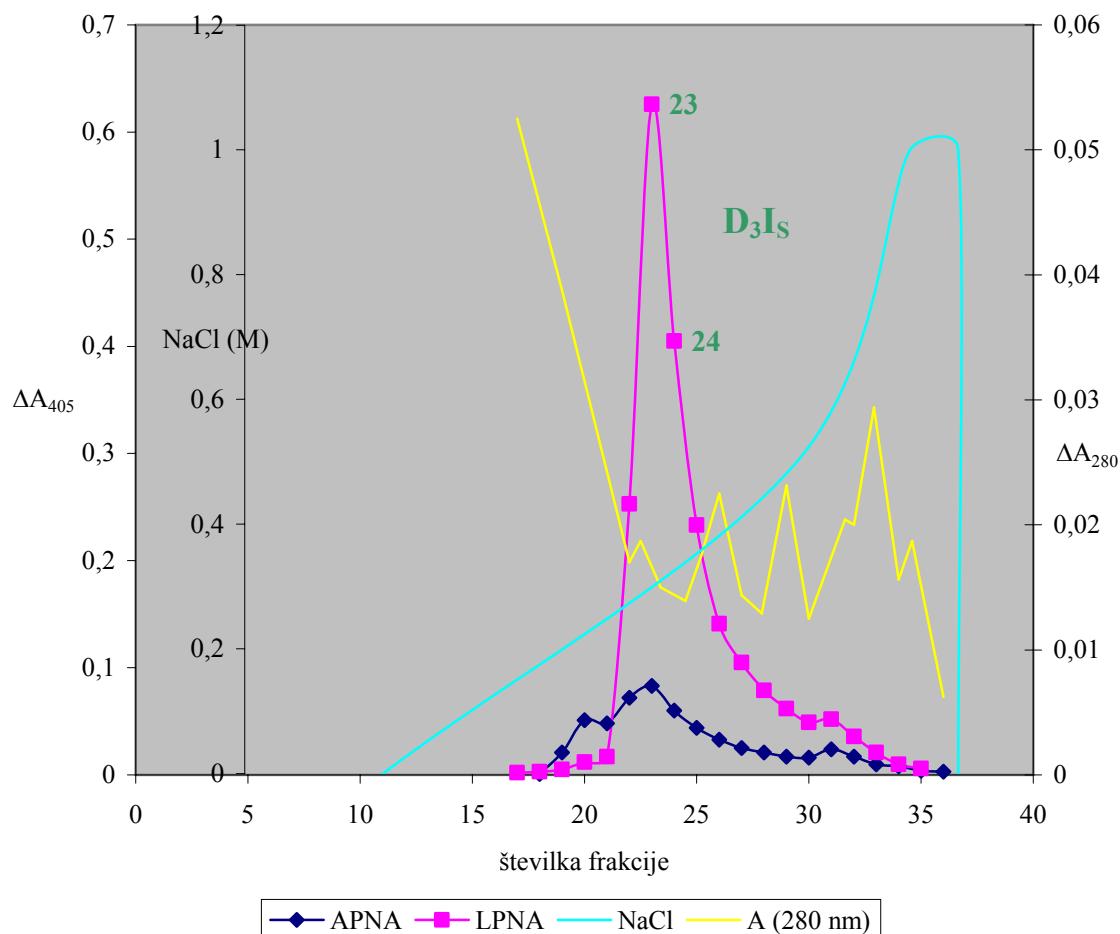
Tudi pri kromatografiji vzorca L₄ sta bili aktivnosti na oba substrata, tako APNA kot LPNA največji v eni frakciji in sicer v frakciji 23, ki se je eluirala z 0,33 M NaCl. Vendar pa je aktivnost na substrat APNA za dobro polovico večja kot na substrat LPNA. Pri kromatografiji vzorca L₂ (slika 17A) je bila aktivnost na oba substrata veliko manjša, vsebnost proteinov, merjena z absorbancijo pri 280 nm, pa približno enaka.

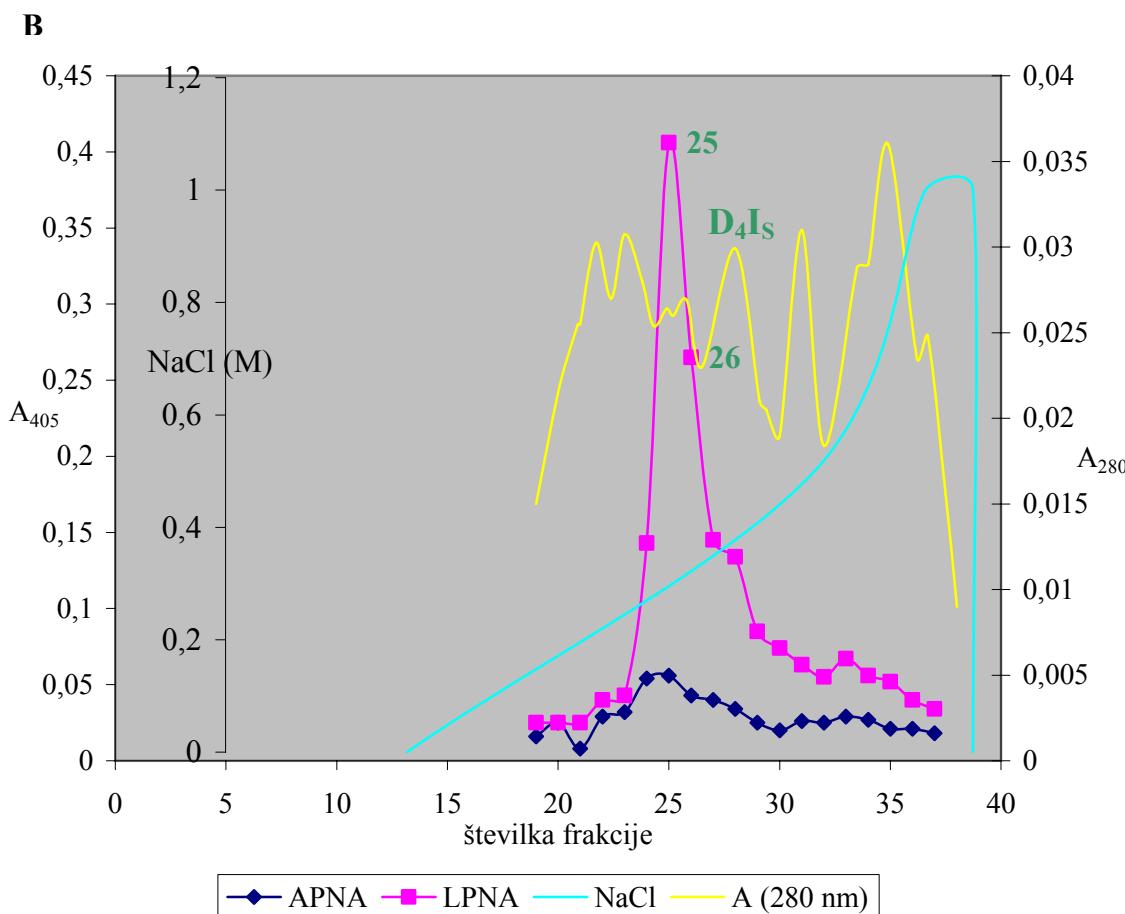
Združili smo frakcije in jih označili: 25, 26, 27 – slika 17A (L₂I_S); 23, 24 – slika 17A (L₂I_L); 19, 20 - slika 17B (L₄I_L), 22, 23 – slika 17B (L₄I_S); jih skoncentrirali in shranili pri -70 °C za nadaljnjo karakterizacijo.

4.2.3.3.3 Kromatografija frakcij D

Na kolono smo najprej nanesli 2 ml frakcij D₃ (slika 14C) in nato še 3 ml frakcij D₄ (slika 15). Z diagrama, ki je prikazan na sliki 18A, je razvidno, da smo po kromatografiji vzorca D₃, aktivnost na substrata APNA in LPNA, izmerili v frakcijah od 17 do 36, po kromatografiji vzorca D₄ pa smo aktivnost merili v frakcijah 19 do 37.

A





Slika 18: FPLC kromatogram, ki smo ga dobili z nanosom (A) 2ml frakcij D₃ (slika 14C) in (B) 3 ml frakcij D₄ na kolono Mono Q 5/50 GL in elucijo z gradientom NaCl. Frakcijam smo določili aktivnost na substrata APNA in LPNA.

Pri kromatografiji vzorca D₃, imata tako AAP kot LAP največjo aktivnosti v frakciji 23, ki se je eluirala z 0,3 M NaCl. Vendar pa je aktivnost na substrat APNA v primerjavi z aktivnostjo na substrat LPNA zanemarljiva. Vsebnost proteinov, merjena z absorbanco pri 280 nm je nizka.

Najvišje aktivnosti na omenjena substrata so bile v frakciji 25 (po kromatografiji vzorca D₄), ki se je eluirala z 0,31 M NaCl. Vendar pa je aktivnost na substrat APNA v primerjavi z aktivnostjo na substrat LPNA zanemarljiva.

Če primerjamo obe kromatografiji skupaj vidimo, da dobimo podobne rezultate, le da ima LAP še večjo aktivnost v vzorcu D₃.

Združili smo frakcije in jih označili: 23, 24 - slika 18A (D₃I_S); 25, 26 - slika 18B (D₄I_S); jih skoncentrirali in shranili pri -70 °C za nadaljnjo karakterizacijo.

4.2.4 Karakterizacija izoliranih aminopeptidaz

Kot je že omenjeno, smo izbrane frakcije, ki smo jih dobili z ionsko izmenjevalno kromatografijo s sistemom FPLC, skoncentrirali in jih še nadalje okarakterizirali. Z NaDS-poliakrilamidno elektroforezo smo ugotavljali stopnjo očiščenja izoliranih aminopeptidaz. Ugotovili smo kakšno aktivnost kažejo na različne aminopeptidazne substrate in preučili vpliv specifičnih peptidaznih inhibitorjev na aktivnosti na APNA in LPNA. Vzorcem smo tudi določili N-terminalno sekvenco.

4.2.4.1 NaDS-poliakrilamidna elektroforeza

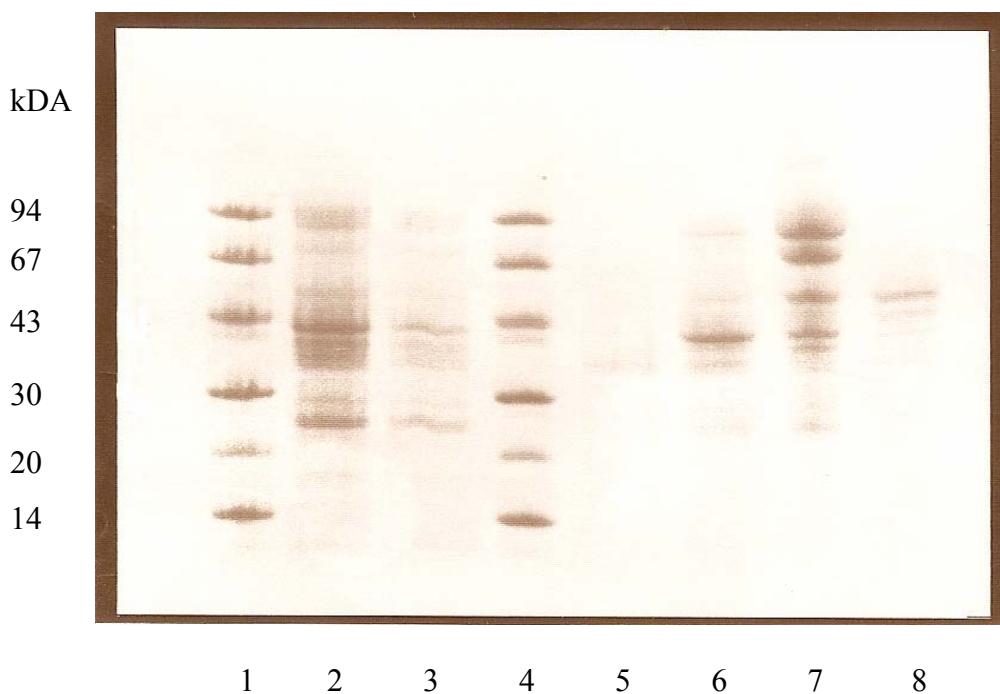
Iz slike 19A, nanos 5 vidimo, da je najbolj čista aminopeptidaza, aktivna na LPNA, ki se je v ionsko izmenjevalni kromatografiji vzorca D₄ (slika 18B) eluirala v frakcijah 25 in 26, poimenovanim D₄I_s. Rezultati kažejo, da je to LAP s molekulsko maso 36 kDa. Temu enak vzorec, vendar dobljen s ionsko izmenjevalno kromatografijo frakcij D₃ (slika 18A, D₃I_s), je bil manj čist, saj je na elektroforegramu vidno več lis (slika 19B, nanos 2). Je pa najmočnejša tista, ki ustreza LAP s molekulsko maso 36 kDa.

Po čistosti vzorcev prikazanih na sliki 19A nato sledi vzorec L₄I_L (slika 19A, nanos 8). Najmočnejša lisa ustrezta molekulski masi približno 60 kDa. Temu ustrezta vzorec L₂I_L (slika 19B, nanos 4), kjer je najmočnejša lisa z enako molekulsko maso, je pa spet manj čist kot L₄I_L.

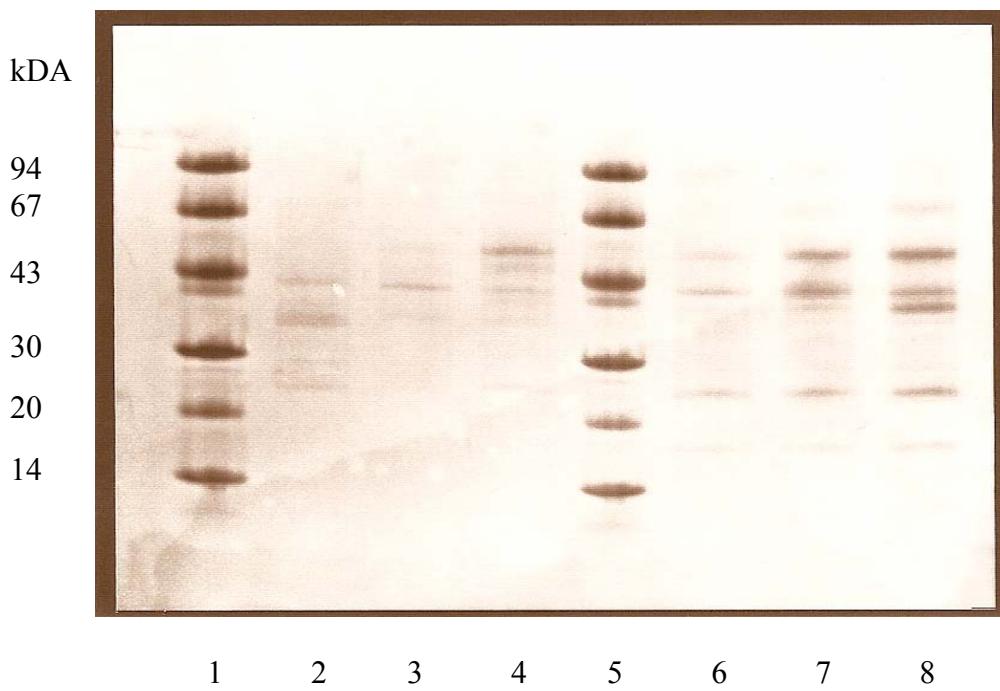
Na elektroforegramu vzorca S₄I_L (slika 19A, nanos 6) in S₂I_L (slika 19B, nanos 3) je najbolj izražena lisa s molekulsko maso 42 kDa. Gre za enega od vrhov aktivnosti na APNA, ki smo ga dobili z ionsko izmenjevalno kromatografijo tistih frakcij z gelske filtracije, ki so kazale največjo aktivnost na APNA, zato smo sodili, da je to verjetno AAP.

Vzorec S₄I_s (slika 19A, nanos 3) je manj čist, saj je prisotno večje število lis. Vidni sta dve močnejše izraženi lisi približno enake jakosti, od katerih ena ustrezta molekulski masi 42 kDa, ki se ujema z liso S₄I_L (slika 19A, nanos 6). Ostale frakcije so bile mnogo manj čiste, kot je to razvidno s slik 19A (nanos 2 in nanos 7) in 19B (nanosi 6, 7 in 8).

A



B

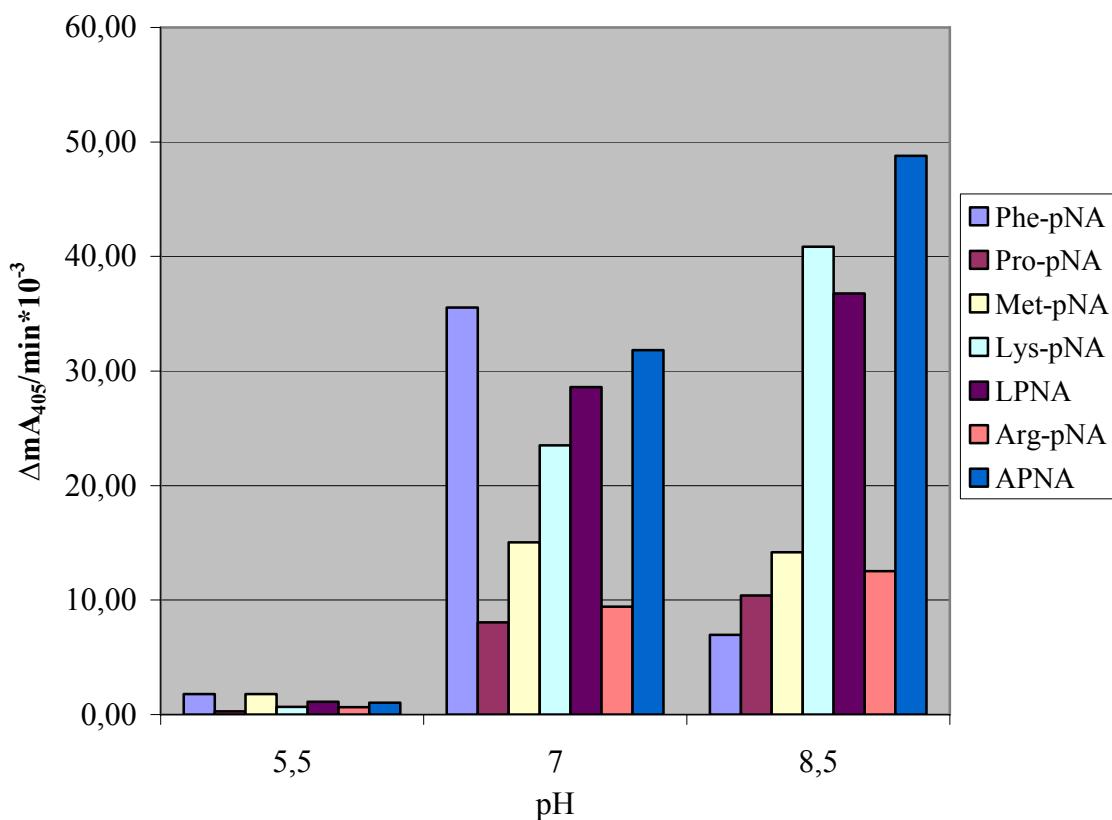


Slika 19: NaDS - poliakrilamidna elektroforeza frakcij iz ionskoizmenjevalne kromatografije. Oznake pod geloma pomenijo **A:** 1- standardni proteini, 2- frakcije označene s S₄I_{LD}, 3- frakcije označene s S₄I_S , 4- standard, 5- frakcije označene z D₄I_S , 6 frakcije označene s S₄I_L , 7- frakcije označene z L₄I_S in 8- frakcije označene z L₄I_L; **B:** 1- standard, 2- frakciji 23 in 24 iz D₃I_S, 3- frakciji 20 in 21 iz S₂I_L, 4- frakciji 23 in 24 iz L₂I_L, 5- standard, 6- frakcije 22, 23 in 24 iz S₂I_S, 7- frakcije 31, 32 in 33 iz L₃I_S in 8- frakcij 25, 26 in 27 iz L₂I_S.

4.2.4.2 Ugotavljanje aktivnosti na različne sintetične substrate

4.2.4.2.1 Ugotavljanje aktivnosti na različne sintetične substrate v ekstraktih listov fižola, ki je rasel na polju

V listnem ekstraktu smo določali aktivnosti na 7 različnih substratov pri treh vrednostih pH (po postopku 3.2.4.1). Reakcijsko zmes pufra in substrata smo z neredčenim ekstraktom inkubirali do trenutka, ko je postala vidno obarvana. Potem smo reakcijo prekinili z 1M HClO₄. Po prekinitvi reakcije smo vzorec centrifugirali in v supernatantu izmerili povečanje absorbance pri 405 nm glede na slepi vzorec. Aktivnost smo izrazili kot $\Delta A_{405} / \text{min} * 10^{-3}$ (slika 20).



Slika 20: Primerjava aktivnosti pri treh vrednostih pH na 7 različnih substratov (PhePNA, ProPNA, MetPNA, LysPNA, LPNA, ArgPNA in APNA).

Aktivnosti dobljene pri pH 5,5 so zelo majhne. Pri pH 8,5 so vse aktivnosti večje kot pri pH 7 razen aktivnost na substrat PhePNA, ki je veliko večja pri pH 7 in aktivnost na substrat MetPNA, ki je za spoznanje večja pri pH 7.

4.2.4.2.2 Ugotavljanje aktivnosti na različne sintetične substrate v frakcijah, ki smo jih dobili po FPLC

V tem poskusu smo želeli ugotoviti, ali delno očiščena encima AAP in LAP v vzorcih S₂I_S in D₄I_S kažeta aktivnost na več substratov. Glede na dobljene rezultate v predhodnem testu (4.2.4.2.1) smo se odločili, da bomo kot substrate uporabili APNA, LPNA, LysPNA in PhePNA. Vsi imajo v molekuli para-nitroanilid (pNA) in jih zato lahko zasledujemo spektrofotometrično (3.2.4.2). Aktivnost encimov na te substrate smo spremljali kontinuirno v odvisnosti od časa. Rezultati so predstavljeni v preglednici 8.

Preglednica 8: Aktivnost encimov v vzorcih S₂I_S in D₄I_S po FPLC na substrate APNA, LPNA, LysPNA in PhePNA. Encimska aktivnost je izražena kot naklon premice (odvisnost absorbance od časa) s standardnim odklonom

	Vzorec S ₂ I _S	Vzorec D ₄ I _S
Substrat	Enc. aktivnost $\Delta mA/dt$ (min ⁻¹)	Enc. aktivnost $\Delta mA/dt$ (min ⁻¹)
APNA	7,91 ± 0,22	3,86 ± 0,12
LPNA	2,54 ± 0,11	10,06 ± 0,13
Lys-PNA	3,52 ± 0,12	1,77 ± 1,0
Phe-PNA	2,32 ± 0,22	26,91 ± 1,52

Vzorec S₂I_S, ki naj bi vseboval AAP, je dal največjo aktivnost na APNA, najmanjšo pa na Phe-PNA, medtem ko je vzorec D₄I_S, ki naj bi vseboval LAP, kazal največjo aktivnost na Phe-PNA in najmanjšo na Lys-PNA. Obe delno izolirani aminopeptidazi se očitno razlikujeta v substratni specifičnosti.

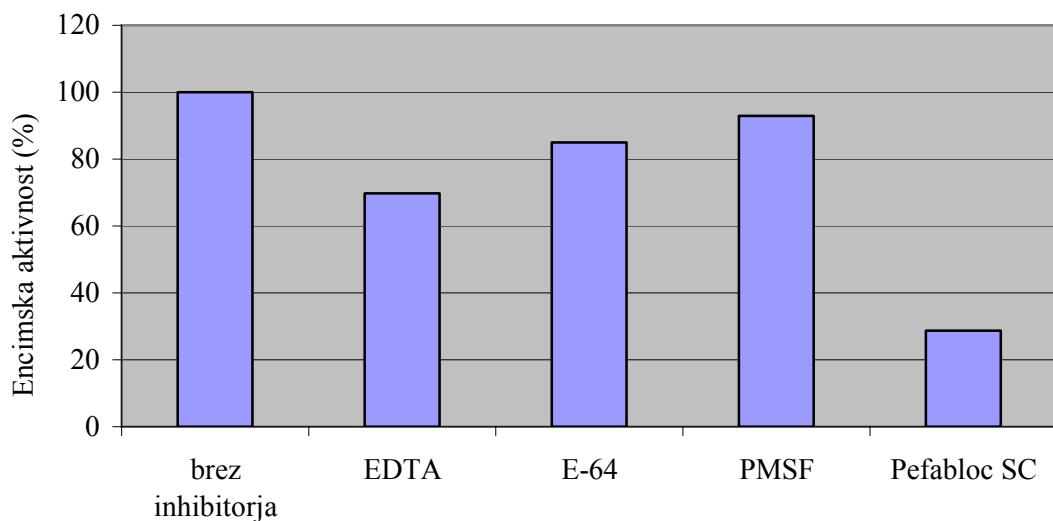
4.2.4.3 Vpliv specifičnih peptidaznih inhibitorjev na aktivnost

Katalitični tip aminopeptidaz v vzorcih S₂I_S in D₄I_S smo ugotavljali z različnimi specifičnimi inhibitorji proteaz. Pefabloc SC je učinkovit inhibitor SP, zlasti tistih, podobnih tripsinu. PMSF je prav tako inhibitor SP, vendar z drugačnim mehanizmom delovanja; EDTA, inhibira metaloproteaze, E-64, pa cisteinske proteaze. Vpliv inhibitorjev na aktivnosti APNA in LPNA smo spremljali kontinuirno v odvisnosti od časa.

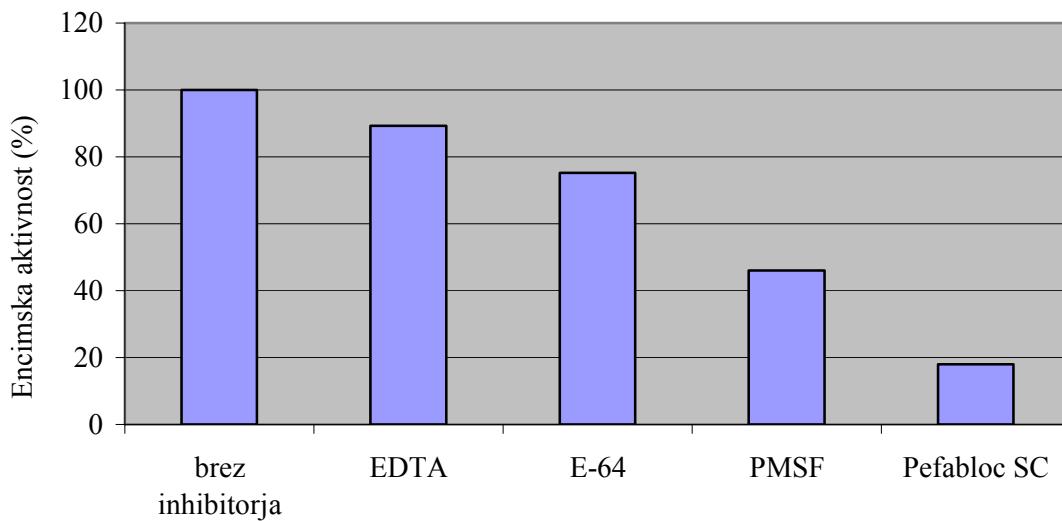
Kot je vidno iz rezultatov prikazanih na sliki 21A, je aktivnost vzorca S₂I_S na APNA najbolj inhibiral Pefabloc SC, do določene mere pa tudi EDTA.

Pefabloc SC je bil tudi najboljši inhibitor aktivnosti vzorca D₄I_S na LPNA (slika 21B). Pomembna razlika med aminopeptidazama iz teh dveh vzorcev pa je v tem, da slednjega PMSF inhibira veliko bolj učinkovito, EDTA pa zelo malo.

A



B



Slika 21: Aktivnosti na substrat APNA v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev (EDTA, E-64, PMSF in Pefabloc SC) v vzorcih S₂I_S(A) in D₄I_S(B).

4.2.4.4 N-terminalno zaporedje vzorcev S₄I_L in D₃I_S

Vzorec S₄I_L, katerega elektroforegram je prikazan na sliki 19A, nanos 6, je bil glede na vidno število lis dokaj čist, zato smo proteine iz najmočnejše lise uporabili za določanje N-terminalnega aminokislinskega zaporedja. Kot sem že omenila, smo predpostavili, da je to AAP. Analiza je pokazala, da je v vzorcu bilo prisotno več različnih proteinov. Zaradi

različnih intenzitet signalov je bilo možno razbrati tri N-terminalna aminokislinska zaporedja:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
V A V N R S E F E (L) M P M A
V N R S E F E L M (P) M A . .
A K D L . I R G I . P N D K

Aminokislinsko zaporedje smo primerjali z že znanimi aminokislinskimi zaporedji proteinov s programom BLAST (Altschul in sod., 1990). Nismo ugotovili homologije z nobenim znanim proteinom.

V vzorcu D₃I_S je protein, katerega smo žeeli sekvenirati, bil prisoten v zelo majhni koncentraciji, tako da smo aminokislinsko zaporedje razbrali le do osme aminokisline:

1 2 3 4 5 6 7 8
A T Q P L A . L

Tudi tega zaporedja nima noben znan protein. Za zanesljivost primerjalnih analiz bi morali določiti precej daljše aminokislinsko zaporedje.

4.3 VPLIV VODNEGA STRESA NA AKTIVNOST AP

Namen tega dela moje diplomske naloge je bil ugotoviti, če vodni stres vpliva na aktivnosti aminopeptidaz, merjenih z različnimi substrati, v ekstraktih listov fižolovih rastlin. V našem laboratoriju so že ugotovili, da pomanjkanje vode povzroči spremembe aktivnosti aminopeptidaz na substrata APNA in LPNA, ki so odvisne od stopnje suše (Hieng in sod., 2004). Mi smo uporabili še druge sintetične aminopeptidazne substrate in poleg suše merili tudi vpliv poplavljanja. Te eksperimente smo, tako kot izolacijo dveh aminopeptidaz, delali s sorte Zorin. Ekstrakte smo pripravili iz listov rastlin, ki so rasle pod kontroliranimi pogoji v rastni komori (3.1.1.2).

4.3.1 Vsebnost vlage in topnih proteinov v listih stresiranih rastlin

Vsebnosti vlage v listih (VV) in vsebnosti topnih proteinov v listnih ekstraktih so razvidni iz preglednice 9.

Preglednica 9: Vsebnost vlage (VV) v odstotkih ($m_1 - m_2 / m_1$; m_1 pomeni svežo maso, m_2 pa suho maso lista) in vsebnost proteinov v listih fižola, ki je rasel pod kontroliranimi pogoji (kontrola, suša in poplavljajanje)

	Kontrola za sušo	suša	Kontrola za poplavljajanje	poplavljajanje
Vsebnost vlage (%)	92,1	76	90,7	90
Vsebnost proteinov (mg/ml)	0,42	0,52	2,24	2,12

VV je bila v listih obeh vrst kontrolnih rastlin, torej rastlin, ki so bile kontrolne v eksperimentu s pomanjkanjem vode in tistih, ki so bile kontrole pri poplavljjanju, približno enaka. V listih poplavljenih rastlin je bila približno enaka kot pri kontrolnih rastlinah, v listih rastlin izpostavljenih pomanjkanju vode pa se je pa izrazito zmanjšala, za približno 14 % v primerjavi s kontrolnimi rastlinami.

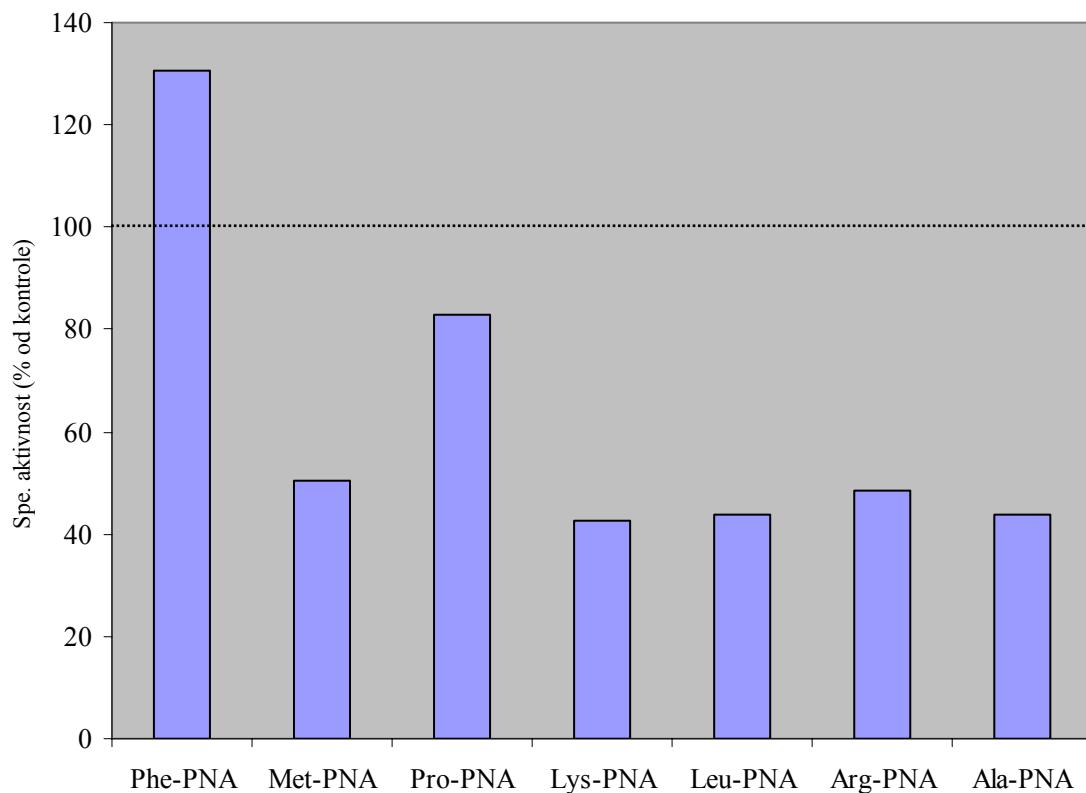
V listnih ekstraktih rastlin v eksperimentu s pomanjkanjem vode smo, v primerjavi z eksperimentom poplavljanja, izmerili zelo majhno vsebnost topnih proteinov. Ta je tudi v listnih ekstraktih rastlin, ki so rasle na polju, bila veliko večja (4.1.1) in primerljiva z eksperimentom poplavljanja. Ker je med pripravo ekstraktov in določanjem vsebnosti njihovih topnih proteinov preteklo več časa, smo sklepali, da so ekstrakti verjetno bili nehote odmrznjeni in potem ponovno zamrznjeni. To je lahko privedlo doobarjanja neke količine proteinov. Vseeno smo se odločili, da bomo v teh ekstraktih določili aminopeptidazne aktivnosti na različne substrate, saj v okviru te diplomske naloge časovno več ni bilo mogoče vzgojiti in stresirati novih rastlin.

Vsebnost topnih proteinov v listih poplavljenih rastlin in njihovih kontrol se ni bistveno razlikovala (preglednica 9).

4.3.2 Primerjava aktivnosti AP v listnih ekstraktih sušnih in kontrolnih rastlin

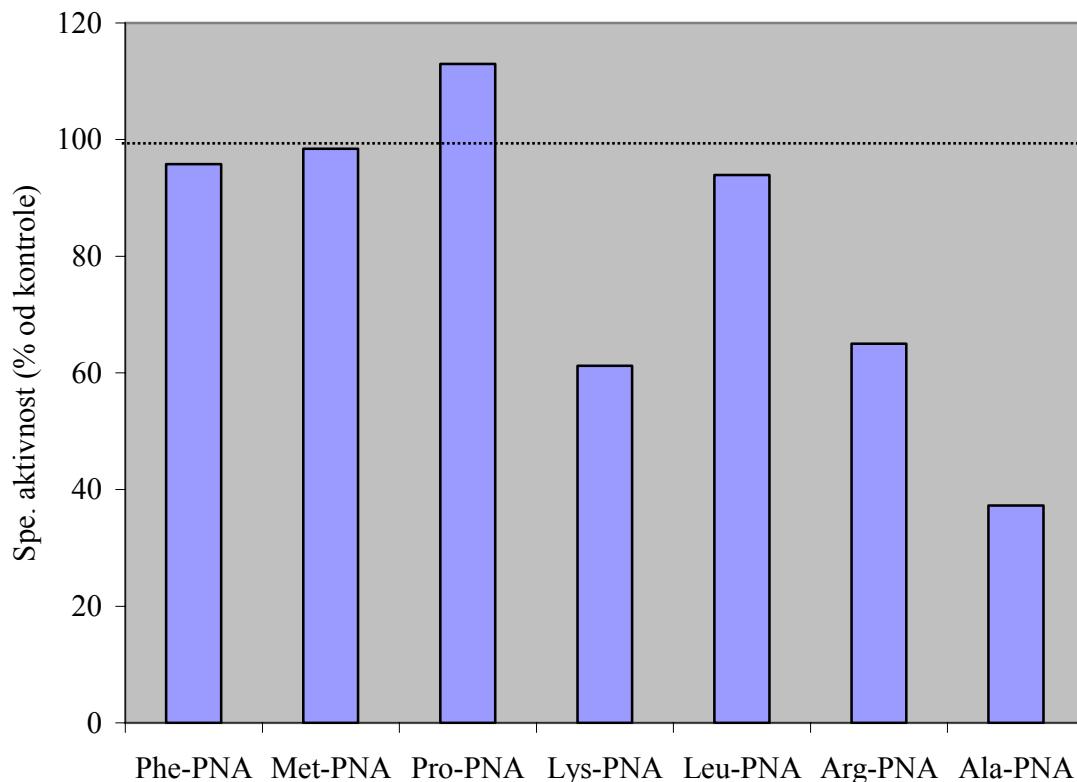
Določili smo specifične aktivnosti ($\Delta A_{405}/(mg\ protein \times min)$) na sedem različnih substratov (PhePNA, ProPNA, MetPNA, LysPNA, LPNA, ArgPNA in APNA) v ekstraktih listov, ki so bili izpostavljeni suši in jih primerjali s specifičnimi aktivnostimi v ekstraktih kontrolnih listov. Rezultate za stresirane rastline smo prikazali kot odstotke od kontrole (slika 22).

Iz slike 22 vidimo, da je specifična aktivnost v ekstraktih listov, ki so bili izpostavljeni suši, na vse substrate, razen Phe-PNA, nižja kot specifična aktivnost v kontrolah.



Slika 22: Specifična aktivnost na substrate Phe-PNA, Met-PNA, Pro-PNA, Lys-PNA, LPNA, Arg-PNA in APNA v listih fižola izpostavljenega suši, izražena v odstotkih od specifične aktivnosti v listih kontrolnih rastlin

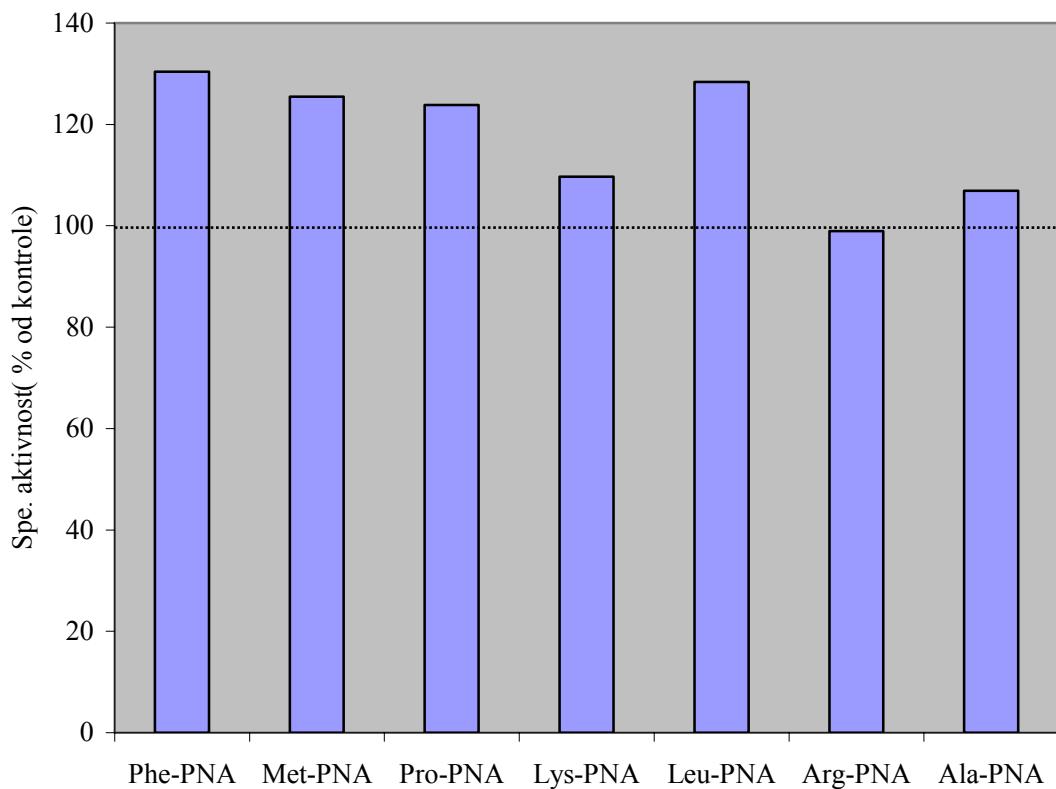
Ker smo vedeli, da fižol, ki je rasel na polju, ni bil optimalno preskrbljen z vodo, smo tudi aktivnosti prikazane na sliki 20, primerjali s kontrolnimi. Ob tem smo se zavedali, da je fižol na polju izpostavljen tudi drugim dejavnikom okolja. Najvišje aktivnosti za posamezne substrate prikazane na sliki 20 smo najprej preračunali v specifične aktivnosti in jih potem izrazili kot odstotek od kontrol iz eksperimenta pomanjkanja vode. Rezultati so podani na sliki 23.



Slika 23: Specifična aktivnost na substrate Phe-PNA, Met-PNA, Pro-PNA, Lys-PNA, LPNA, Arg-PNA in APNA v listih fižola, ki je rasel na polju, izražena v odstotkih od specifične aktivnosti v listih kontrolnih rastlin.

4.3.3 Primerjava aktivnosti AP v listnih ekstraktih poplavljenih in kontrolnih rastlin

Želeli smo ugotoviti, če tudi poplavljjanje vpliva na aktivnost aminopeptidaz na različne substrate, tako kot suša. Tako kot v predhodnem eksperimentu, smo določili aktivnost na sedem različnih substratov v ekstraktih listov, ki so bili poplavljeni in v ekstraktih kontrolnih listov. Na enak način smo naredili primerjavo in rezultate podali na sliki 24.



Slika 24: Specifična aktivnost na substrate Phe-PNA, Met-PNA, Pro-PNA, Lys-PNA, LPNA, Arg-PNA in APNA v listih poplavljenega fižola glede na specifično aktivnost na omenjene substrate v kontrolnih listih, izražena v odstotkih (od kontrole).

Iz slike 24 vidimo, da je aktivnost v ekstraktih listov z rastlin, ki so bile izpostavljene poplavljjanju, na vse substrate, razen Arg-PNA, višja kot aktivnost v kontrolah.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V svojem diplomskem delu smo največ pozornosti namenili optimizaciji postopka izolacije dveh aminopeptidaz iz listov navadnega fižola *Phaseolus vulgaris*. Aminopeptidaze sodelujejo v presnovi proteinov in regulaciji njihovega delovanja, torej v procesih, ki so pomemben del odziva rastlin na spremembe okolja v katerem živijo. Ker je fižol med najpomembnejšimi stročnicami, ki se uporabljajo za prehrano, smo z našo raziskavo žeeli pomagati k pojasnjevanju mehanizmov, s katerimi se fižol prilagodi na vodni stres.

Za izolacijo smo se odločili, ker je bilo predhodno ugotovljeno, da so v odziv na sušo vpleteni različni razredi proteaz v listih različno občutljivih sort navadnega fižola (Hieng in sod., 2004). Pokazali so tudi, da pomanjkanje vode različno vpliva na dve aminopeptidazni aktivnosti v ekstraktih fižolovih listov; aktivnost na substrat LPNA se poveča, medtem ko se aktivnost na substrat APNA z ionsko izmenjevalno kromatografijo loči na dva vrhova, ki se v različnih stopnjah pomanjkanja vode različno spreminja (Šoštarič, 2005). Poleg tega je o aminopeptidazah v fižolu in rastlinah na sploh zelo malo znanega. Nobena fižolova aminopeptidaza še ni biokemijsko okarakterizirana, za razliko od endopeptidaz.

Za izolacijo aminopeptidaz smo izbrali liste fižola sorte Zorin, ki je rasel na polju, ker je kazal večjo aminopeptidazno aktivnost na substrata APNA in LPNA ter je vseboval več proteinov kot druga sorta Češnjevec. Poleg tega se nam je zdel primeren, ker je v primerjavi z drugimi nam dostopnimi sortami srednje občutljiv na sušo in kaže relativno zmožnost ohranitve membran po osmotskem stresu (Hieng in sod., 2004). Je tudi sorta, ki je vzgojena pri nas, na Kmetijskem inštitutu Republike Slovenije.

Rastlinski material potreben za primerjavo aminopeptidaznih aktivnosti iz listov kontrolnih rastlin s tistimi iz listov sušnih in poplavljenih rastlin, smo vzgojili pod kontroliranimi pogoji.

Hieng in sodelavke (2004) so pokazale, da gre pri aminopeptidaznih aktivnostih na APNA in LPNA najverjetneje za serinske proteaze. Na osnovi pH profilov, ki so jih določile, smo aktivnosti na ta dva substrata določali pri pH 8,3 in 8,5.

Najprej smo optimizirali postopek izolacije teh dveh AP, ki smo jih poimenovali AAP (aktivna na APNA) in LAP (aktivna na LPNA). Sledili smo uveljavljenim metodam izolacije in čiščenja različnih encimov, tako tudi aminopeptidaz (Desimone in sod., 2000). Ker smo se odločili, da bo prva kromatografska stopnja v izolaciji gelska izključitvena kromatografija, smo morali v prvi fazi dobljeni ekstrakt listov fižola skoncentrirati. Načeloma so možne različne metode koncentriranja, ena od njih je tudi obarjanje proteinov na različne načine npr. z veliko ionsko jakostjo oz. soljo ali z organskimi topili kot je aceton. Pri obarjanju z acetonom je zelo pomembno, da je postopek izveden čim bolj natančno, kajti izgube so lahko kljub preciznemu delu velike. Tudi v našem primeru se je zelo veliko proteinov iz listnega ekstrakta irreverzibilno oborilo, vključno tistih z aminopeptidazno aktivnostjo na substrata APNA in LPNA. Odstranili smo edino klorofil,

ostalo pa je veliko drugih pigmentov. Klorofil se je lahko vezal na hidrofobne dele proteinov, ki so se izpostavili na površini, kot posledica denaturacije z acetonom.

Obarjanje z amonijevim sulfatom se je izkazalo za veliko bolj racionalno, izgube proteinov pa so bile precej manjše. Zanimivo je, da se večina proteinov iz ekstrakta fižolovih listov obori pri majhnih koncentracijah amonijevega sulfata (40 in 50 %). S 30 % amonijevim sulfatom smo oborili veliko barvil, predvsem zelena, malo proteinov in skoraj nič AAP in LAP. Če je prva faza obarjanje s 40 % amonijevim sulfatom, pa oborina ni bila zelena. Verjetno gre za vpliv določene ionske jakosti na vezavo barvil na nekatere proteine ali druge velike molekule in njihovo agregacijo. Opazili smo, da je določanje vsebnosti proteinov v ekstraktih oz. raztopinah oborin netočno dokler so prisotni pigmenti.

Glede na dobljene rezultate smo se odločili za frakcijsko obarjanje med 30, 40 in 50 % amonijevim sulfatom. Obarjanje z 30 % amonijevim sulfatom smo vključili, da bi odstranili prisotne pigmente, ki bi motili nadaljnje delo.

Če primerjamo raztopini proteinov $P_{30-40-50}$ in P_{30-50} med seboj ugotovimo, da je frakcionirno obarjanje s 30,40 in 50 % amonijevim sulfatom boljše, saj oborimo več AP aktivnih na substrata APNA in LPNA kot pri frakcionirnem obarjanju s 30 in 50 % amonijevim sulfatom.

Obarjanje izvedeno v postopku optimizacije, se je izkazalo za boljše, kot obarjanje pri sami izolaciji, kajti pri optimizaciji smo imeli manjše količine in smo zato lahko delali še bolj natančno in hitreje, zato je, najverjetneje prišlo do manjših izgub AP.

Ker smo vedeli, da se bo pri postopku izolacije aminopeptidaz pojavila potreba po shranjevanju vzorcev, smo žeeli ugotoviti, kako pogoji shranjevanja vplivajo na vsebnost proteinov in na aktivnosti na substrata APNA in LPNA. Ugotovili smo, da sta AAP in LAP stabilni samo, ko sta shranjeni pri -70°C .

Kot drugo stopnjo izolacije smo uporabili gelsko izključitveno kromatografijo. Pokazalo se je, da s to metodo AAP in LAP ne moremo popolnoma ločiti. Vendar so elucijski profili dobljeni z merjenjem A_{280} (slika 14) in aktivnosti frakcij na APNA in LPNA pokazali, da smo AAP in LAP ločili od precejšnjega dela ostalih proteinov in/ali obarvanih snovi, delno pa tudi med seboj. Kot v ekstraktu, smo tudi po kromatografiji ugotovili, da je LAP prisotna v manjši količini kot AAP, kar je nasprotno od rezultata, ki so ga doble Hieng in sodelavke (2004), ki so kromatografirale razopino proteinov oborjenih iz listnega ekstrakta z acetonom. Razlog je najverjetneje neustreznost obarjanja z acetonom, pri katerem so posebej velike izgube AAP.

Elucijski profili treh delov iste raztopine proteinov P_{30-50} , ki smo jo dobili z obarjanjem med 30 % in 50 % amonijevega sulfata, so bili med seboj primerljivi (slika 14A, B in C). Kromatografija raztopine oborine proteinov $P_{30-40-50}$, to pomeni oborine, ki smo jo dobili z obarjanjem proteinov pri koncentraciji amonijevega sulfata 30-40-50 %. (slika 15) je dala podobne rezultate kot prejšnje tri. Vendar lahko rečemo, da je v tem primeru očiščenost AAP in LAP večja, kar vidimo iz primerjave aktivnosti AAP in LAP (A_{405}) in A_{280} v frakcijah, v katerih smo aktivnosti zaznali.

Gelska izključitvena kromatografija je tudi omogočila določitev molekulskih mas eluiranih AP. Ker so le-te, določene ločeno na osnovi štirih kromatografij, med seboj bile zelo podobne, smo izračunali povprečne vrednosti. Molekulska masa AAP določena na ta način je 83 ± 3 kDa, molekulska masa LAP pa 72 ± 3 kDa.

Elucijski profili so nakazali, da je prisotnih več različnih aminopeptidaz aktivnih na APNA in LPNA. Ravno zaradi tega smo pri posamezni kromatografiji skrbno izbrali frakcije, katere smo združevali.

Kot zadnjo stopnjo čiščenja AAP in LAP, izoliranih iz listov fižola, smo v okviru moje diplomske naloge uporabili ionsko izmenjevalno kromatografijo, s pomočjo aparature Äkta za FPLC. Za to je najprej bila potrebna dializa frakcij, ki smo jih dobili z gelsko kromatografijo. Pri tem smo izgubili nekaj proteinov, ki so se verjetno vezali na stene vrečke za dializo, ali pa oborili, vendar pa ne encimov, katere smo žeeli očistiti, saj sta se specifična aktivnosti na substrata APNA in LPNA povečali.

Ker so že prej ugotovili, da se AP aktivne na APNA in LPNA vežejo na anionski izmenjevalec s katerega se potem lahko eluirajo z gradientom koncentracije NaCl (Bidovec, 1999), smo se odločili, da bomo uporabili močan anionski izmenjevalec Q Sepharose FF.

Ugotovili smo, da se večina vezanih aminopeptidaz z gela eluira z $0,4$ M NaCl v PP pufru s pH 7,0. Da bi elucija AAP in LAP bila popolna, smo se odločili, da uporabimo gradient od $0,0$ do $0,5$ M NaCl v pufru.

Z ionsko izmenjevalno kromatografijo smo uspeli dodatno očistiti in medsebojno ločiti AAP in LAP. Vendar je tudi v frakcijah, v katerih so bile njihove aktivnosti največje, še vedno prisotno več drugih proteinov, kar se vidi tudi na elektroforegramih na slikah 19A in B.

Najboljšo ločbo smo dobili s kromatografijo vzorcev L in D. Rezultati kažejo, da se v aktivnih frakcijah, dobljenih po ionsko izmenjevalni kromatografiji vzorca L, nahaja predvsem AAP, ki pa je, čeprav manj, aktivna tudi na LPNA. Na to kaže tudi določitev aktivnosti izolirane AAP na različne substrate (preglednica 8).

S kromatografijo vzorcev D pa smo ločili in delno očistili encim, ki smo ga na začetku našega dela poimenovali LAP, saj so frakcije, v katerih je bil vrh aktivnosti, bile izrazito aktivne na LPNA in veliko manj na APNA. Tudi aktivnosti na različne substrate so potrdili, da gre za drugačen encim od tistega, ki smo ga poimenovali AAP (preglednica 8). So pa ti rezultati izpostavili še eno pomebno dejstvo. LAP namreč ni bila najbolj aktivna na LPNA, temveč na Phe-pNA. To lahko seveda pomeni, da gre za encim, ki kaže največjo aktivnost na Phe-pNA in manjšo na LPNA, ali pa, da gre za dva encima v istem vzorcu. Rešitev te dileme zahteva dodatne eksperimente.

Za elucijske diagrame, ki smo jih dobili po ionsko izmenjevalni kromatografiji frakcij S, je bilo značilno, zlasti v primeru aktivnosti na APNA, več vrhov. Največji vrh kaže visoko aktivnost tako na APNA kot na LPNA. Iz tega lahko sklepamo, da AAP razgraja tudi LPNA, ali pa gre za dva, slabo ločena, encima.

Iz teh rezultatov sklepamo tudi, da je v fižolovih listih prisotno več oblik AAP. Šoštarič (2005) je z ionsko kromatografijo neočiščenega ekstrakta fižolovih listov ločila dva izrazita vrhova aktivnosti na substrat APNA, in en izrazit vrh aktivnosti na substrat LPNA, vendar pa so bile aktivnosti na substrat APNA, tako kot v naših eksperimentih, višje kot na substrat LPNA. V primeru AAP lahko gre za dva ali več encimov ali pa izoencimov.

Na osnovi NaDS-PAGE elektroforeze bi lahko sklepali, da je molekulska masa encima, ki smo ga poimenovali LAP, 36 kDa. Ker je molekulska masa te LAP, sodeč po gelski izključitveni kromatografiji 72 kDa, kar je točno dvakrat več, sklepamo da gre za dimerni encim. Enako lahko rečemo tudi za AAP iz vzorcev S_4I_L (slika 19A, nanos 6) in S_2I_L (slika 19B, nanos 3), kajti na elektroforegramih je najbolj izražena lisa s molekulsko maso 42 kDa. Gre za enega od vrhov aktivnosti na APNA, ki smo ga dobili z ionsko izmenjevalno kromatografijo tistih frakcij z gelske filtracije, ki so kazale največjo aktivnost na APNA, molekulska masa izračunana na osnovi gelske izključitvene kromatografije pa je 83 kDa. V literaturi smo zasledili nekaj opisanih rastlinskih aminopeptidaz, ki so dimerne, kot npr. tista iz etioplastov kalčkov sladkorne pese (El. Amrani in sod., 1995).

Najmočnejša lisa na elektroforegramih vzorcev L_4I_L (slika 19A, nanos 8) in L_2I_L (slika 19B, nanos 4), ustreza molekulski masi približno 60 kDa. Gre zopet za encim, ki kaže aktivnost na APNA, vendar ga v okviru moje diplomske naloge nismo dalje karakterizirali, zato o njem ne vemo več podrobnosti.

Kot smo že omenili, AAP in LAP kažeja aktivnost na več substratov. Podatek o vrednostih pH, pri katerih smo ugotovili največje aktivnosti na te substrate v listnih ekstraktih (4.2.4.2.1), kaže na to, da gre za aminopeptidaze, ki so locirane bodisi v organelih, bodisi v citosolu, saj le-te delujejo, za razliko od tistih v vakuolah, v alkalnem okolju. Znane so npr. AP, ki se nahajajo v kloroplastih (Desimone in sod., 2000) ali v peroksisomih (Palma in sod. 2002).

AAP in LAP smo še nadalje karakterizirali s specifičnimi peptidznimi inhibitorji, da bi ugotovili njihov katalitični tip. Pefabloc SC in PMSF inhibirata serinske peptidze, EDTA metalopeptidaze in E-64 cisteinske peptidaze. Aktivnost AAP je najbolj inhibiral Pefabloc SC, do določene mere pa tudi EDTA. Pefabloc SC je bil tudi najboljši inhibitor aktivnosti vzorca LAP. Pomembna razlika med aminopeptidazama iz teh dveh vzorcev pa je v tem, da slednjega PMSF inhibira veliko bolj učinkovito, EDTA pa zelo malo. Torej ta LAP ni eden od tipov heksamernih metalopeptidaz, o katerih je največ znanega (Walling, 2004).

Z opisano karakterizacijo smo torej potrdili indikacije, da gre vsaj za dve AP v fižolovih listih, za katere kaže, da se njihovi aktivnosti spremnjava pod vplivom vodnega stresa (Šoštarič, 2005). Primerjava z drugimi rastlinskimi AP je zelo otežena, ker je v literaturi relativno malo podatkov o izolaciji in karakterizaciji očiščenih rastlinskih aminopeptidaz in nobenih o aminopeptidazah iz fižola, kot je razvidno iz Pregleda objav.

V banki podatkov o proteolitičnih encimih MEROPS smo zasledili samo eno aminopeptidazo serinskega katalitičnega tipa, ki pa je bakterijskega izvora (Rawlings in sod., 2006).

Palma in sodelavci (2002) so poročali, da v peroksisomih iz listov graha deluje LAP s molekulsko maso 56,8 kDa, za katero so navedli, da je serinska proteaza. Vsekakor AAP in LAP, ki smo ju izolirali iz fižolovih listov, spadata med redke do sedaj opisane serinske aminopeptidaze. Podatek, da je aktivnost LAP pravzaprav večja na substrat Phe-pNA kot pa na LPNA, kaže da bi to pravzaprav lahko bila fenilalanin aminopeptidaza. Pri pregledu literature smo našli samo tri zaznamke o aminopeptidazah s tem imenom in vse tri so mikrobnega izvora, kot je tista iz *Aspergillus niger* (Basten in sod., 2002). So pa večkrat omenjene aminopeptidaze, ki so aktivne na nitroanilide ali naftilamide aromatskih aminokislin, kot je fenilalanin. Primer je aminopeptidaza cisteinskega katalitičnega tipa v kličnih listih soje (Couton in sod. 1991).

V zadnjem delu svojega diplomskega dela sem proučevala vpliv vodnega stresa na aktivnost aminopeptidaz, merjenih z različnimi substrati (PhePNA, ProPNA, MetPNA, LysPNA, ArgPNA, LPNA in APNA), v ekstraktih listov fižolovih rastlin sorte Zorin. To pomeni, da so med njimi bile tudi dve aminopeptidazi, ki sem jih izolirala in delno očistila. To dejstvo podpirajo tudi ugotovitve prejšnjih študij (Hieng in sod., 2004).

Kot smo že omenili, smo rastline namenjene proučevanju vpliva suše in poplavljanja, gojili v kontroliranih pogojih. S tem smo eliminirali vplive drugih dejavnikov (temperatura, slanost, patogeni, ...), katerim so rastline izpostavljene v naravnem okolju in se osredotočili na pomanjkanje ali prebitek vode ter odziv rastlin na ta dva stresna dejavnika. Najprej smo ugotovili, da je bila VV v listih obeh vrst kontrolnih rastlin, torej rastlin, ki so bile kontrolne v eksperimentu s pomanjkanjem vode in tistih, ki so bile kontrole pri poplavljaju, približno enaka. V listih poplavljenih rastlin je bila približno enaka kot v kontrolah, v listih rastlin izpostavljenih pomanjkanju vode, pa se je pa izrazito zmanjšala, za približno 14 %. To je v skladu z našimi pričakovanji, saj v obdobju suše ni dotoka vode v rastlino, a rastlina jo kljub temu potrebuje za svoje delovanje in se zato njena vsebnost znižuje.

V listnih ekstraktih poplavljenih rastlin se je specifična aktivnost, na vse substrate, razen Arg-PNA, povišala, glede na kontrolno specifično aktivnost, medtem ko se je pri listnih ekstraktih sušnih rastlin specifična aktivnost zmanjšala, glede na kontrolno specifično aktivnost. Razlike odražajo spremembe v vseh AP, ki razgrajujejo posamezen substrat in ne nujno točno določene AP. V literaturi nismo zasledili podatkov o poplavi. Podatki v suši, pa se razlikujejo od podatkov v literaturi (Hieng in sod., 2004; Chao in sod., 1999), čeprav gre za druge AP.

Možno je, da je v primeru proučevanja vpliva suše na aktivnost aminopeptidaz, prišlo do napake (ekstrakti so bili verjetno nehote odmrznjeni in potem ponovno zamrznjeni), kajti vsebnost proteinov v kontrolah sušnih rastlin je bila štirikrat manjša kot pri kontroli poplave. Vendar v okviru te diplomske naloge časovno več ni bilo mogoče vzgojiti in stresirati novih rastlin, da bi preverili napako.

Kot smo že omenili v pregledu objav, so do sedaj objavljene raziskave o funkciji rastlinskih aminopeptidaz v glavnem osredotočene na proces kalitve in senescence oz. mobilizacije proteinov. Poznana je tudi vloga LAP, ki pripadajo metalopeptidazam, pri mehanskem stresu in s tem povezanem napadom insektov (Walling, 2004). Veliko manj se ve o vpletenuosti teh encimov v odziv rastlin na abiotiske strese, torej tudi na pomanjkanje vode (Chao in sod., 1999; Hieng in sod. 2004).

5.2 SKLEPI

Optimizirali smo metodo izolacije dveh aminopeptidaz iz listov fižola (*Phaseolus vulgaris*) sorte Zorin, ki smo jih poimenovali AAP in LAP.

Primerna prva stopnja izolacije je frakcijskoobarjanje z amonijevim sulfatom; s 30 % amonijevim sulfatom odstranimo predvsem pigmente, medtem ko sta se AAP in LAP oborili med 40 in 50 % amonijevim sulfatom.

Z gelsko izključitveno kromatografijo, kot naslednjo stopnjo čiščenja, smo AAP in LAP ločili od večjega dela barvil in proteinov, nismo pa jih popolnoma ločili med seboj. S to metodo smo tudi določili njuni navidezni molekulski masi; le-ta je za AAP 83 kDa in za LAP 72 kDa.

Ionsko izmenjevalna kromatografija z uporabo močnega anionskega izmenjevalca in z elucijo med 0,0 in 0,5 M NaCl v PP pufru s pH 7,0 je, kot tretja stopnja čiščenja, omogočila ločbo AAP in LAP, vendar ne tudi njunega popolnega očiščenja.

Ugotovili smo, da AAP kaže največjo aktivnost na substrat APNA, manjšo na substrata Lys-PNA in Leu-PNA ter najmanjšo na substrat Phe-PNA. LAP pa kaže največjo aktivnost na substrat Phe-PNA, manjšo na substrata LPNA in APNA ter najmanjšo na Lys-PNA.

Z uporabo različnih inhibitorjev smo ugotovili, da AAP in LAP najverjetneje spadata med aminopeptidaze serinskega katalitičnega tipa.

Z NaDS-poliakrilamidno elektroforezo smo določili približno molekulsko maso AAP, ki je znašala 42 kDa in LAP, ki je znašala 36 kDa. Primerjava z približnimi molekulskimi masami ocenjenimi na osnovi gelske izključitvene kromatografije kaže na dimerno naravo teh encimov.

Pri primerjavi aktivnosti AP na sedem različnih sintetičnih substratov (PhePNA, ProPNA, MetPNA, LysPNA, LPNA, ArgPNA in APNA) v ekstraktih listov stresiranih in kontrolnih rastlin smo ugotovili, da je aktivnost v ekstraktih listov, ki so bili izpostavljeni suši, na vse substrate, razen Phe-PNA, nižja kot aktivnost v kontrolah, medtem ko je v ekstraktih listov poplavljenih rastlin na vse substrate, razen Arg-PNA, višja kot aktivnost v kontrolnih rastlinah. To je indikacija, da sta tudi AAP in LAP vpleteni v odziv navadnega fižola na vodni stres.

Rezultati diplomskega dela so osnova za nadaljnja raziskovanja strukture in funkcije AAP in LAP v rastlinah, zlasti tistih izpostavljenih različnim spremembam v okolju.

6 POVZETEK

Aminopeptidaze so encimi, ki katalizirajo cepitev peptidnih vezi z N-terminalnega konca proteinov. Razgradnja proteinov, ki je odvisna od nivoja aktivnosti proteolitičnih encimov, je eden od mehanizmov, s katerim se rastlina odzove na strese iz okolja. Raziskave molekulskega osnova odziva fižola na vodni stres so zlasti pomembne, ker stročnice zavzemajo osrednji položaj v kmetijstvu in človeški prehrani povsod po svetu. Za navadni fižol (*Phaseolus vulgaris*) je značilna sorazmerno velika vsebnost proteinov, ki vsebujejo esencialne aminokisline, in je tako zdrav nadomestek za meso, poleg tega pa je tudi dober vir vlaknin, mineralov in vitaminov. Že sedaj pa kar 60 % svetovne pridelave fižola poteka v razmerah pomanjkanja vode in verjetno se bo ta delež še povečal. Za hitro spreminjače se podnebje postaja karakteristično, da se obdobja suše menjavajo s poplavami. Zato je pomembno pojasniti mehanizme, s katerimi se fižol prilagodi na vodni stres, da bomo lahko izboljšali njegove agronomiske lastnosti in dobili odpornejše sorte.

O značilnostih in vlogi aminopeptidaz v odzivu rastlin na vodni stres je na voljo zelo malo literarnih podatkov. Vendar lahko predpostavimo, glede na vlogo presnove proteinov v obrambi oz. adaptaciji na sušo in poplavljajanje, da so aminopeptidaze vpletene v te procese. Z diplomskim delom smo želeli pomagati k pojasnjevanju mehanizmov, s katerimi se fižol prilagodi na vodni stres. Zato smo se odločili, da bomo izolirali dve aminopeptidazi, ki smo jih poimenovali AAP (aktivna na substrat APNA) in LAP (aktivna na substrat LPNA) in jih preliminarno okarakterizirali. Predhodno bilo ugotovljeno, da se aktivnosti na ta dva substrata v ekstraktih listov fižola (*Phaseolus vulgaris* L. cv Zorin) spremunjata v suši.

Za izolacijo aminopeptidaz smo izbrali liste fižola sorte Zorin, ki je rasel na polju. Rastlinski material potreben za primerjavo aminopeptidaznih aktivnosti iz listov kontrolnih rastlin s tistimi iz listov sušnih in poplavljenih rastlin, smo vzgojili pod kontroliranimi pogoji. Kontrolne rastline smo zalivali vseh 25 dni poskusa, medtem ko smo suši izpostavljene rastline prenehali zalivati po 19 dneh vzgoje, poplavljenim rastlinam pa dolivali toliko vode, da je popolnoma prekrivala zemljo. VV je bila v listih obeh vrst kontrolnih rastlin, torej rastlin, ki so bile kontrolne v eksperimentu s pomanjkanjem vode in tistih, ki so bile kontrole pri poplavljaju, približno enaka. V listih poplavljenih rastlin je bila približno enaka kontroli, v listih rastlin izpostavljenih pomanjkanju vode pa se je pa izrazito zmanjšala, za približno 14 %.

Najprej smo optimizirali postopek izolacije AAP in LAP. V prvi fazi smo ekstrakt listov fižola skoncentrirali in sicer na dva načina, da bi ugotovili kateri da boljše rezultate. Najprej smo obarjali z acetonom, ki pa je ireverzibilno oboril veliko proteinov iz listnega ekstrakta, vključno tistih z aminopeptidazno aktivnostjo na substrata APNA in LPNA. Odstranili smo edino klorofil, ostalo pa je veliko drugih pigmentov. Obarjali smo tudi z različnimi koncentracijami amonijevega sulfata, kar se je izkazalo za veliko bolj racionalno, ker so izgube proteinov bile precej manjše. Večina proteinov iz ekstrakta fižolovih listov se obori pri nizkih koncentracijah amonijevega sulfata (40 in 50 %). S 30 % amonijevim sulfatom smo oborili veliko barvil, predvsem zelena, malo proteinov in skoraj nič AAP in LAP. Odločili smo se, da bomo pri izolaciji uporabili frakcijsko obarjanje med 30, 40 in 50 % amonijevim sulfatom.

Ker smo vedeli, da se bo pri postopku izolacije aminopeptidaz pojavila potreba po shranjevanju vzorcev, smo žeeli ugotoviti, kako pogoji shranjevanja vplivajo na vsebnost proteinov in na aktivnosti na substrata APNA in LPNA. Ugotovili smo, da sta AAP in LAP stabilni pri temperaturi -70 °C.

Kot drugo stopnjo izolacije smo uporabili gelsko izključitveno kromatografijo. Pokazalo se je, da s to metodo AAP in LAP ne moremo popolnoma ločiti. Vendar so elucijski profili dobljeni z merjenjem A₂₈₀ in aktivnosti frakcij na APNA in LPNA pokazali, da smo AAP in LAP ločili od precejšnjega dela ostalih proteinov in/ali obarvanih snovi, delno pa tudi med seboj. Kot v ekstraktu, smo tudi po kromatografiji ugotovili, da je LAP prisotna v manjši količini kot AAP.

Z gelsko izključitveno kromatografijo smo tudi določili navidezni molekulski masi eluiranih AP. Molekulska masa AAP je 83 kDa, molekulska masa LAP pa 72 kDa.

Kot zadnjo stopnjo čiščenja AAP in LAP, izoliranih iz listov fižola, smo uporabili ionsko izmenjevalno kromatografijo, s pomočjo aparature Äkta za FPLC. Za elucijo AAP in LAP z anionskega izmenjevalca Q Sepharose FF smo uporabili gradient od 0,0 do 0,5 M NaCl v pufru s pH 7,0. S to metodo smo uspeli dodatno očistiti in medsebojno ločiti AAP in LAP. Vendar je tudi v frakcijah, v katerih so bile njihove aktivnosti največje, še vedno bilo prisotno več drugih proteinov, kar smo ugotovili tudi z NaDS-poliakrilamidno elektroforezo.

Najbolj čista je bila LAP s približno molekulsko maso 36 kDa. Ker je le-ta, ocenjena na osnovi gelske izključitvene kromatografije na 72 kDa, gre lahko za dimerni encim. Primerjava aktivnosti na 4 različne substrate je pokazala, da LAP kaže največjo aktivnost na Phe-PNA, manjšo na substrata LPNA in APNA ter najmanjšo na Lys-PNA, tako da lahko pravzaprav gre za fenilalanin-aminopeptidazo. Vpliv specifičnih inhibitorjev na njenou aktivnost kaže, da je to peptidaza s serinskim katalitičnim mehanizmom.

V primeru proteinov aktivnih na APNA, je ionsko izmenjevalna kromatografija pokazala, da gre lahko za dva ali več encimov ali pa izoencimov. Izračunana na osnovi NaDS-poliakrilamidne elektroforeze je približna molekulska masa AAP, ki smo jo mi izolirali in delno prečistili, 42 kDa. To je dvakrat manj od tiste dobljene z gelsko izključitveno kromatografijo, kar zopet kaže na dimerno AP. Ugotovili smo tudi, da AAP kaže največjo aktivnost na substrat APNA, manjšo na substrata Lys-PNA in Leu-PNA ter najmanjšo na substrat Phe-PNA. Njeno aktivnost na APNA je najbolj inhibiral Pefabloc SC specifičen inhibitor serinskih proteaz, kar jo uvršča v isti katalitični tip kot LAP.

Pomembni razlici med AAP in LAP sta različni stopnji aktivnosti na uporabljeni sintetične substrate in različna profila inhibicije s tem, da slednjega PMSF inhibira veliko bolj učinkovito, EDTA pa zelo malo, za razliko od AAP.

Na razpolago smo imeli premalo čistega vzorca za uspešno določanje N-terminalnega aminokislinskega zaporedja AAP in LAP. Sekvence, ki smo jih dobili, niso pokazale homologije z doslej znanimi proteini.

Naši podatki, kažejo, da gre za doslej neopisana encima. Zanimivo je, da nobeden od njiju ni metalopeptidaza, kar je večina tistih rastlinskih AP, ki so biokemično karakterizirane. Omembe serinskih aminopeptidaz so v literaturi redke.

Pri primerjavi aktivnosti AP na sedem različnih substratov (PhePNA, ProPNA, MetPNA, LysPNA, LPNA, ArgPNA in APNA) v listnih ekstraktih poplavljениh in kontrolnih rastlin smo ugotovili, da je aktivnost v ekstraktih listov rastlin, ki so bile izpostavljene poplavljjanju, na vse substrate, razen Arg-PNA, višja kot aktivnost v kontrolah. Pri primerjavi aktivnosti AP na omenjenih sedem različnih substratov v listnih ekstraktih sušnih in kontrolnih rastlin pa smo ugotovili, da je aktivnost v ekstraktih listov, ki so bili izpostavljeni suši, na vse substrate, razen Phe-PNA, nižja kot aktivnost v kontrolah. To tudi pomeni, da sta AAP in LAP vpleteni v odziv navadnega fižola na vodni stres.

7 VIRI

Abram V., Cigič B., Poklar U.N., Skrt M. 2006. Eksperimentalna biokemija za študente biotehnologije in živilske tehnologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 71-72

Barrett A.J. 1986. The classes of proteolytic enzymes. V: Plant proteolytic enzymes. Dalling M.J. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 2-16

Bartling D., Nosek J. 1994. Molecular and immunological characterization of leucine aminopeptidase in *Arabidopsis thaliana*: a new antibody suggests a semi-constitutive regulation of phylogenetically old enzyme. Plant Science, 99: 199-209

Basten D.E.J.W., Dekker P.J.T., Schaap P.J. 2003. Aminopeptidase C of *Aspergillus niger* is a novel phenylalanine aminopeptidase. Applied and Environmental Microbiology, 69: 1246-1250

Bohnert H.J., Nelson D.E., Jensen R.G. 1995. Adaptations to environmental stresses. Plant Cell, 7: 1099-1111

Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 137-137.

Božič N., Vujčič Z. 2005.. Detection and quantification of leucyl aminopeptidase after native electrophoresis using leucine-p-nitroanilide. Electrophoresis, 26: 2476-2480

Bratford M. M. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254

Broughton W.J., Hernandez G., Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J. 2003. Beans (*Phaseolus spp.*) – model food legumes. Plant and Soil, 252: 55-128

Brzin J., Kidrič M. 1995. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 13: 422-467

Callis J. 1995. Regulation of protein degradation. Plant Cell, 7: 845-857

Chao W.S., Gu Y.Q., Pautot V., Bray E.A., Walling L.L. 1999. Leucine aminopeptidase RNAs, proteins and activities increase in response to water deficit, salinity and the wound signals systemin, methyl jasmonate and abscisic acid. Plant Physiology, 120: 979-992

Chao W.S., Pautot V., Holzer F.M., Walling L.L. 2000. Leucine aminopeptidases: The ubiquity of LAP-N and the specificity of LAP-A. Planta, 210: 563-573

Costa Franca M.G., Pham Thi A.T., Pimentel C., Pereyra Rossiello R.O., Zuly-Fodil Y., Laffray D. 2000. Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris*

cultivars in response to induced drought stress. Environmental and Experimental Botany, 43: 227-237

Couton J.M., Sarath G., Wagner F.W. 1991. Purification and characterization of a soybean cotyledon aminopeptidase. Plant Science, 75: 9-17

Coux O., Tanaka K., Goldberg A. L. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. Annual Review of Biochemistry, 65: 801-847

Cowan A. K. 1994. Plant stress. V: Encyclopedia of agricultural science. Vol. 3. Arntzen C.J., Ritter E.M. (eds.). San Diego, Rhodes University by Academic Press, Inc: 359-368

Cruz de Carvalho M. H., Lufray D., Louguet P. 1998. Comparison of the physiological responses of *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* cultivars when submitted to drought conditions. Environmental and Experimental Botany, 40: 197-207

Černe M., Vrhovnik I. 1992. Vrtnine vir zdravja in naša hrana. Ljubljana, ČZD Kmečki Glas: 22-22

Černe M. 1997. Stročnice. Ljubljana, ČZD Kmečki Glas: 25-32

Desimone M., Krueger M., Wessel T., Wehofsky M., Hoffmann R., Wagner E. 2000. Purification and characterization of an aminopeptidase from the chloroplast stroma of barley leaves by chromatographic and electrophoretic methods. Journal of Chromatography B, 737: 285-293

Duarte I.C., Ricardo C.P.P., Duquemagalhaes M.C. 1993. Peptide-hydrolases in cotyledons of germinating lupin. Phytochemistry, 33: 35-40

El Amrani A., Suire C., Camara B., Gaudillere J.P., Couee I. 1995. Purification and characterization of a novel aminopeptidase, plastidial alanine-aminopeptidase, from the cotyledons of etiolated sugar beet seedlings. Plant Physiology, 109: 87-94

Fitter A.H., Hay R.K.M. 1983. Water V: Environmental physiology of plants. Sutcliffe J.F., Cronshaw J. (eds.). London, New York, Toronto, Academic Press: 118-168

Frere J.M., Van Beeumen J. 2004. DmpA L-aminopeptidase D-Ala esteraze/amidase of *Ochrobactrum anthropi*. V: Handbook of proteolytic enzymes. 2nd ed. Vol. 2. Cysteine peptidases, serine and threonine peptidases. Barret A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. (eds.). London, Elsevier: 2055-2057

Fujinaga M., Cherney M.M., Oyama H., Oda K., James M.N.G. 2004. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101: 3364-3369

- Gu Y.Q., Walling L.L. 2000. Specificity of the wound-induced leucine aminopeptidase (LAP-a) of tomato: activity on dipeptide and tripeptide substrates. European Journal of Biochemistry, 267: 1178-1187
- Gu Y.Q., Chao W.S., Walling L.L. 1996. Localization and post-translational processing of the wound-induced leucine aminopeptidase proteins of tomato. Journal of Biological Chemistry, 271: 25880-25887
- Halls C.E., Rogers S.W., Rogers J.C. 2005. Purification of a proaleurain maturation protease. Plant Science, 168: 1267-1279
- Heldt H.W. 1997. Plant biochemistry and molecular biology. Oxford, New York, Tokio, Oxford University Press: 301-308
- Hieng B. 2002. Vpliv suše na tolerantne in občutljive rastline iz družin *Fabaceae* in *Gesneriaceae*. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 1-19
- Hieng B., Ugrinović K., Šuštar-Vozlič J., Kidrič M. 2004. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. Journal of Plant Physiology, 161: 519-530
- Hildman T., Ebneth M., Pena-Cortes H., Sanchez-Serrano J., Willmitzer L., Prat S. 1992. General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. Plant Cell, 4: 1157-1170
- Huffaker R.C. 1990. Proteolitic activity during senescence of plants. New Phytologist, 116: 199-231
- Kim H., Lipscomb W.N., 1993. Differentiation and identification of two catalytic metal binding sites in bovine lens leucine aminopeptidase by x-ray crystallography. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90: 5006-5010
- Kirmizi S., Guleryuz 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
- Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 609-632
- Lakitan B., Wolfe D.W., Zobel R.W. 1992. Flooding affects snap bean yield and genotypic variation in leaf gas-exchange and root-growth response. Journal of the American Society for Horticultural Science, 117: 711-716
- Larcher W. 1987. Stress bei Pflanzen (Stress in plants). Naturwissenschaften, 74: 158-167

- Liu X.Q., Jagendorf A.T. 1986. Neutral peptidase in the stroma of pea chloroplasts. *Plant Physiology*, 81: 603-608
- McKersie B.D., Leshem Y.L. 1994. Stress and stress coping in cultivated plants. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 148-180
- Medrano F.J., Alonso J., Garcia J.L., Romero A., Bode W., Gomis-Ruth F.X. 1998. Structure of proline aminopeptidase from *Xanthomonas campestris* pv. citri: a prototype for the prolyl oligopeptidase family. *EMBO Journal*, 17: 1-9
- Mikkonen A. 1992. Purification and characterization of leucine aminopeptidase from kidney bean cotyledons. *Physiologia Plantarum*, 84: 393-398
- Morgan J.M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35: 299-319
- Ogiwara N., Amano T., Satoh M., Shioi Y. 2005. Leucine aminopeptidase from etiolated barley seedlings: characterization and partial purification of isoforms. *Plant Science*, 168: 575-581
- Palma J.M., Sandalio L.M., Javier Corpas F., Romero-Puertas M.C., McCarthy I., delRío L., A. 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 521-530
- Parrot D., Yang L., Shama L., Fischer A.M. 2005. Senescence is accelerated, and several proteases are induced by carbon "feast" conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Planta*, 222: 989-1000
- Polgár L. 2004. Catalytic mechanisms of cysteine peptidases. V: *Handbook of proteolytic enzymes*. 2nd ed. Vol. 2. Cysteine peptidases, serine and threonine peptidases. Barret A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F.(eds.). London, Elsevier: 1072-1079
- Popovič T., Kidrič M., Puizdar V., Brzin J. 1998. Purification and characterization of two cysteine proteinases from *Phaseolus vulgaris* leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 9: 637-645
- Popovič T., Puizdar V., Brzin J. 2002. A novel subtilase from common bean leaves. *FEBS Letters*, 530: 163-168
- Ramakrishna V., Rao P.R. 2006. Storage protein degradation in germinating Indian bean (*Dolichos lablab* L. var. *lignosus*) seeds. *Seed Science and Technology*, 34: 161-168
- Rawlings N.D., Barrett A.J. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290: 205-218

Rawlings N.D., Barrett A.J. 2004. Introduction: metallopeptidases and their clans. V: Handbook of proteolytic enzymes. 2nd ed. Vol.1. Aspartic and metallo peptidases. Barret A.J., Rawllings N.D., Woessner J.F. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 231-268

Rawlings N.D., Morton F.R., Barrett A.J. 2006. MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Research, 34, D270-D272

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: 6512-6516

Rogers J.C. 2004. Aleurain. V: Handbook of proteolytic enzymes. 2nd ed. Vol. 2. Cysteine peptidases, serine and threonine peptidases. Barret A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. (eds.). London, Elsevier: 1150-1151

Roos S., Giglione C., Pierre M., Espagne C., Meinnel T. 2005. Functional and developmental impact of cytosolic protein N-terminal methionine excision in arabidopsis. Plant Physiology, 137, 2: 623-637

Roy-Macaulay H., Zuliy-Fodil Y., Kidrič M., Pham Thai A.T., Viera da Silva J. 1992. Effect of drought stress on proteolytic activities in *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. Physiologia Plantarum, 85: 90-96

Sanchez-Moran E., Jones G.H., Franklin F.C.H., Santos J.L. 2004. A puromycin-sensitive aminopeptidase is essential for meiosis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, 16,11: 2895-2909

Schaller A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. Planta, 220: 183-197

Schneider K.A., Rosales-Serna R., Ibarra-Perez F., Cazares-Enriquez B., Acosta-Gallegos J.A., Ramirez-Vallejo P., Wassimi N., Kelly J.D. 1997. Improving common bean performance under drought stress. Crop Science, 37: 43-50

Sequí-Real B., Martinez M., Sandoval I.V. 1995. Yeast aminopeptidases I is post-translationally sorted from the cytosol to the vacuole by a mechanism mediated by its bipartite N-terminal extension. EMBO Journal, 14: 5476-5484

Singh B.P., Tucker K.A., Sutton J.D., Bhardwaj H.L. 1991. Flooding reduces gas-exchange and growth in snap bean. Hortscience, 26: 372-373

Singh S.P. 1999. Production and utilization. V: Common bean improvement in the twenty-first century. Singh S.P. (ed.). Dordrecht, Kluver Academic Publishers: 1-24

Sopanen T., Mikola J. 1975. Purification and partial characterization of barley leucine aminopeptidase. Plant Physiology, 55: 809-814

Stevanović B., Janković M.M. 2001. Ekologija biljaka sa osnovama fiziološke ekologije biljaka. Beograd, NNK International: 7-68

Syros T., Yupsanis T., Petkou D., Economou A.S. 2005. Protein, leucine aminopeptidase, esterase, acid phosphatase and photosynthetic responses of oleander (*Nerium oleander* L.) during cold acclimation and freezing treatments. *Journal of Plant Physiology*, 162: 886-894

Šoštarič M. 2005. Vpliv suše na serinske proteaze v homioohidričnih in poikilohidričnih rastlinah. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 91 str.

Takaoka S. 2005. Impact of the 1997-1998 El Nino rains on farms in the Mount Kenya region. *Mountain Research and Development*, 25: 326-331

Taylor A. 1993. Aminopeptidases: structure and function. *FASEB Journal*, 7: 290-298

Torress G.A.M., Pflieger S., Corre-Menguy F., Mazubert C., Hartmann C., Lelandais-Brière C. 2006. Identification of novel drought-related mRNAs in common bean roots by differential display RT-PCR. *Plant Science*, 171: 300-307

Vasquez-Tello A., Zuly-Fodil Y., Pham Thi A.T., Vieria da Silva J.B. 1990. Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *Journal of Experimental Botany*, 41, 228: 827-832

van der Valk H.C.P.M., van Bentum M.I.A., van Loon L.C. 1989. Proteolytic enzymes in developing leaves of oats (*Avena sativa* L.) II. Aminoacyl-2-naphthylamidases. *Journal of Plant Physiology*, 135: 489-494

Vierstra R.D. 1996. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology*, 32: 275-302

Walling L.L., Gu Y.Q. 1996. Plant aminopeptidases: occurrence, function and characterization. V: Aminopeptidases. Taylor A. (ed.). Georgetown, TX:R.G. Landes: 174-219

Walling L.L., 2004. Leucil aminopeptidase (plant). V: Handbook of proteolytic enzymes. 2nd ed. Vol.1. Aspartic and metallo peptidases. Barret A.J., Rowllings N.D., Woessner J.F. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 901-905

White J.W., Molano C.H. 1994. Production of common bean under saturated soil culture. *Field Crops Research*, 36: 53-58

Wolfe D.W., Topoleski D.T., Gundersheim N.A., Ingall B.A. 1995. Growth and yield sensitivity of 4 vegetable crops to soil compaction. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120: 956-963

Živković T., Quartacci M.F., Stevanović B., Marinone F., Navari-Izzo F. 2005. Low molecular weight substances in the poikilohydric plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. Plant Science, 168: 105-111

Yamaoka Y., Takeuchi M., Morohashi Y. 1994. Purification and partial characterization of an aminopeptidase from mung bean cotyledons. Physiologia Plantarum, 90: 729-733

ZAHVALA

Za vso strokovno pomoč, vodenje, usmerjanje, koristne nasvete pri izdelavi diplomskega dela in potrpežljivosti z mano, se v največji meri zahvaljujem somentorici dr. Marjetki Kidrič. Marjetka, hvala ti za vse proste dneve, ki si jih žrtvovala.

Iskreno se zahvaljujem tudi svojemu mentorju doc. dr. Balžu Cigiću za vodenje, koristne nasvete in razumevanje.

Prav tako se zahvaljujem recezantu doc. dr. Rajku Vidrihu za nasvete in popravke pri zaključnem oblikovanju diplomskega dela.

Zahvalila bi se tudi svoji družini za razumevanje in potrpežljivost v mojih letih študija.
Hvala!

Na koncu naj se zahvalim še svojima najdražjima, sinčku Tadeju in možu Robertu. Hvala,
ker me podpirata in razumeta.