

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Anja Gotar

**VPLIV SUŠE NA FENILALANIN-AMINOPEPTIDAZNO
AKTIVNOST V EKSTRAKTIH FIŽOLOVIH LISTOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF DROUGHT ON PHENYLALANINE AMINOPEPTIDASE
ACTIVITY IN EXTRACTS OF BEAN LEAVES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Odseku za biotehnologijo 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 recenzentko doc. dr. Polono Jamnik.

Mentor: doc. dr. Blaž Cigić

Somentorica: dr. Marjetka Kidrič

Recenzentka: doc. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Anja Gotar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.151.6: 581.151: 635.652(043)=163.6
KG encimi/fiziologija rastlin/stres/suša/fižol/*Phaseolus vulgaris*/proteolitični encimi/
aminopeptidaze/fenilalanin-aminopeptidaze/nativna elektroforeza/cimografija
AV GOTAR, Anja
SA CIGIĆ, Blaž (mentor)/ KIDRIČ, Marjetka (somentorica)/ JAMNIK, Polona
(recezентka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2009
IN VPLIV SUŠE NA FENILALANIN-AMINOPEPTIDAZNO AKTIVNOST V
EKSTRAKTIH FIŽOLOVIH LISTOV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 65 str., 10 pregl., 23 sl., 9 pril., 109 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Aminopeptidaze so encimi, ki katalizirajo cepitev peptidnih vezi z N-terminalnega
konca proteinov. Proteoliza, ki je odvisna od nivoja aktivnosti mnogih
proteolitičnih encimov, je eden od mehanizmov odziva rastlin na strese iz okolja,
vključno s sušo, katere vpliv smo preučevali. S pomočjo cimografije, ki temelji na
določanju encimske aktivnosti s 7-amino-4-metilkumarinom označenimi
aminokislinami po nativni elektroforezi, smo v surovih listnih ekstraktih navadnega
fižola (*Phaseolus vulgaris* cv. Zorin) zaznali pet različnih fenilalanin-
aminopeptidaznih aktivnosti. Encimska aktivnost aminopeptidaz, normirana na
suho snov, se je v suši povečala. Analizirali smo različno stare liste in ugotovili, da
se aktivnost nekaterih aminopeptidaz s staranjem povečuje, nekaterih pa zmanjšuje.
Aktivnost aminopeptidaze, ki se je v suši najbolj povečala, je bila povečana tudi v
starejših listih. Različne vrste fižola so imele podoben aminopeptidazni profil, večje
razlike smo opazili pri vrsti *Vigna unguiculata*, ki spada v drugi rod skupne družine
Fabaceae.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.151.6: 581.151: 635.652(043)=163.6
CX enzymes/plant physiology/stress/drought/bean/*Phaseolus vulgaris*/proteolytic enzymes/aminopeptidases/phenylalanine aminopeptidase/native electrophoresis/zymography
AU GOTAR, Anja
AA CIGIĆ, Blaž (supervisor)/ KIDRIČ, Marjetka (co-advisor)/ JAMNIK, Polona (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2009
TI EFFECT OF DROUGHT ON PHENYLALANINE AMINOPEPTIDASE ACTIVITY IN EXTRACTS OF BEAN LEAVES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 65 p., 10 tab., 23 fig., 9 ann., 109 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Aminopeptidases catalyze the cleavage of amino acid residues from the N-terminal end of proteins. Degradation of proteins, which depends on the levels of activities of a number of proteolytic enzymes, is a mechanism of plant response to environmental stress, including drought, that we have investigated. We have detected five phenylalanine-aminopeptidases in leaf extracts of common bean *P. vulgaris* cv. Zorin by zymography, based on the assay of aminopeptidase activities with 7-amino-4-methylcoumarin labeled amino acids after native electrophoresis. We have shown that under water deficit, aminopeptidase activities normalized to dry weight are increased. Contents of certain aminopeptidases are increased and others decreased as a result of ageing of leaves. The content of an aminopeptidase, which was the most significantly increased in response to drought, was also higher in older leaves. We have found a very similar aminopeptidase profile in other species of *Phaseolus*. Larger differences were observed in *Vigna unguiculata*, belonging to another genus of family *Fabaceae*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 NAVADNI FIŽOL (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	2
2.1.1 Fiziološke in morfološke karakteristike	2
2.1.2 Kalitev fižolovega semena	3
2.1.3 Rastne razmere	4
2.1.3.1 Toplota.....	4
2.1.3.2 Vлага.....	5
2.1.3.3 Svetloba	5
2.1.3.4 Kakovost zemljišča.....	5
2.1.4 Pomen za prehrano.....	5
2.2 SUŠA	6
2.2.1 Odziv rastlin na pomanjkanje vode	7
2.2.2 Fiziološke in biokemijske spremembe v rastlinah, ki jih povzroči pomanjkanje vode	9
2.2.3 Fižol (<i>Phaseolus sp.</i>) in vodni stres	10
2.3 RASTLINSKE PROTEAZE	11
2.3.1 Vloga rastlinskih proteaz	12
2.3.2 Strukturalna razdelitev proteaz	12
2.3.2.1 Serinske proteaze	15
2.3.2.2 Cisteinske proteaze	15
2.3.2.3 Metaloproteaze	16
2.3.3 Proteaze in vodni stres	17
2.4 CIMOGRAFIJA	17
2.4.1 Cimografija s proteinskimi substrati.....	18
2.4.2 Cimografija s sintetičnimi substrati.....	18
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 MATERIALI	21
3.1.1 Rastlinski material.....	21
3.1.2 Bakterijske kulture.....	21
3.1.3 Kemikalije	21

3.1.4 Raztopine.....	22
3.1.5 Aparature	22
3.1.5.1 Spektrofotometer	22
3.1.5.2 Aparatura za slikanje (dokumentiranje) gelov.....	23
3.1.5.3 Elektroforezni sistem.....	23
3.2. METODE.....	23
3.2.1 Vzgoja fižola.....	23
3.2.1.1 Priprava semen za kalitev	23
3.2.1.2 Priprava petrijevke za kalitev semen.....	24
3.2.1.3 Kalitev semen	24
3.2.1.4 Sajenje rastlin	24
3.1.1.5 Rastni pogoji.....	24
3.1.1.6 Vzorčenje.....	25
3.1.1.7 Določanje vsebnosti vode.....	25
3.1.1.8 Določanje relativne vsebnosti vode.....	25
3.2.2 Homogenizacija rastlinskega materiala in priprava ekstraktov.....	26
3.2.3 Optimizacija stabilnosti ekstraktov	26
3.2.4 Določanje vsebnosti proteinov.....	26
3.2.5 Cimografija	27
3.2.5.1 Priprava gela za elektroforezo	27
3.2.5.2 Nativna elektroforeza	28
3.2.5.3 Analiza nativnih poliakrilamidnih gelov s fluorescentnim substratom za aminopeptidaze	28
3.2.5.4 Analiza nativnih poliakrilamidnih gelov s fluorescentnim substratom za aminopeptidaze in z reducentom	29
3.2.5.5 Analiza dokumentiranih cimogramov	29
4 REZULTATI.....	30
4.1 OPTIMIZACIJA VZORČENJA IN SHRANJEVANJA	30
4.1.1 Vpliv vzorčenja na določanje mase svežih listov fižola	30
4.1.2 Izbira lista za določanje suhe snovi in za ekstrakcijo aminopeptidaz	31
4.1.3 Izbira substrata.....	32
4.1.4 Vpliv shranjevanja na aminopeptidazno aktivnost.....	32
4.1.5 Vpliv reducenta DTT na fenilalanin-aminopeptidazno aktivnost	33
4.2 VPLIVI POMANJKANJA VODE.....	34
4.2.1 Vsebnost vode (VV) v posameznih listih kontrolnih in sušnih rastlin.....	34
4.2.2 Relativna vsebnost vode (RVV) v posameznih listih kontrolnih in sušnih rastlin	34
4.2.3 Razmerje med koncentracijo topnih proteinov in suho snovjo.....	35
4.2.4 Vpliv suše na aminopeptidazno aktivnost na substrat Phe-AMC s cimografijo v listnih ekstraktih navadnega fižola	36

4.2.4.1 Aminopeptidazna aktivnost na substrat Phe-AMC v listnih ekstraktih navadnega fižola pri suši prve stopnje (S1) in pri ustreznih kontroli (K1)	36
4.2.4.2 Aminopeptidazna aktivnost na substrat Phe-AMC v listnih ekstraktih navadnega fižola pri suši druge stopnje (S2) in pri ustreznih kontroli (K2)	40
4.2.4.3 Primerjava ekstraktov iz različnih listov glede na aktivnost aminopeptidaz določenih s cimografijo	44
4.2.5 Aminopeptidazna aktivnost v posameznih delih kalčka.....	46
4.2.6 Aminopeptidazna aktivnost na substrat Phe-AMC v različnih sortah navadnega fižola ter drugih vrstah iz družine <i>Fabaceae</i>	46
4.2.7 Preverjanje uporabnosti cimografije za določanje aminopeptidazne aktivnosti v ekstraktih mikrobiološkega izvora.....	48
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	49
5.1 RAZPRAVA.....	49
5.2 SKLEPI.....	53
6 POVZETEK.....	53
7 VIRI	56

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev in oznake proteaz (NC-IUBMB, 2007)	14
Preglednica 2: Razvrstitev proteaz glede na mehanizem katalize (Barrett in sod., 2004) .	14
Preglednica 3: Klani in družine metalopeptidaz, ki vsebujejo aminopeptidaze (Rawlings in sod., 2008)	17
Preglednica 4: Proizvajalci največkrat uporabljenih kemikalij.....	22
Preglednica 5: Uporabljeni pufri	22
Preglednica 6: Uporabljene kemikalije za pripravo koncentrirnega in ločevalnega gela ..	28
Preglednica 7a: Masa svežih fižolovih listov in spremembe le-te pri različnih postopkih vzorčenja (led – led + N ₂).....	30
Preglednica 7b: Masa svežih fižolovih listov in sprememba le-te pri različnih postopkih vzorčenja (N ₂ - N ₂ + zmrzovalnik).....	31
Preglednica 8: Masa svežih fižolovih listov (s.m.) in suhe snovi (s.s.) ter izračun vsebnosti vode (VV) v posameznih listih sestavljenega lista ene rastline.....	31
Preglednica 9: Aktivnost aminopeptidaz na substrat Phe-AMC v posameznih listih pri suši 1 (S1) in kontroli 1 (K1), izražena kot kvocient intenzitete lise in suhe snovi (integral/µg). Prikazane so povprečne vrednosti (povprečje petih rastlin) in ustrezne standardne deviacije za posamezne, na suho snov normirane, aminopeptidazne aktivnosti v ekstraktih iz sušnih in kontrolnih listov za stanje 1 (K1 in S1).....	38
Preglednica 10: Aktivnost aminopeptidaz na substrat Phe-AMC v posameznih listih pri suši 2 (S2) in in kontroli 2 (K2), izražena kot kvocient intenzitete lise in suhe snovi (integral/µg). Prikazane so povprečne vrednosti (povprečje petih rastlin) in ustrezne standardne deviacije za posamezne, na suho snov normirane, aminopeptidazne aktivnosti v ekstraktih iz sušnih in kontrolnih listov za stanje 2 (K2 in S2).....	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Različne faze kaljenja fižola, A-seme in B-poganjek (Fink, 1993).....	3
Slika 2: Poimenovanje posameznih listov rastline.....	4
Slika 3: Shema eksperimenta	23
Slika 4: 5 rastlin kontrole 1 (K1), katerih liste smo uporabili za ekstrakcijo encimov.....	24
Slika 5: 5 rastlin suše 1 (S1), katerih liste smo uporabili za ekstrakcijo encimov	25
Slika 6: Način vpenjanja dveh stekelc za vlivanje gelčkov na nosilec in vstavitev glavnička po dodatku koncentrirnega gela.....	28
Slika 7: Sestavljen list fižola	32
Slika 8: Tipični profil aktivnosti aminopeptidaz po analizi z različnimi substrati. Od leve proti desni si sledijo: Leu-AMC, Phe-AMC, Met-AMC in Ala-AMC. Nanašali smo 8 µL ekstrakta.....	32
Slika 9: Vpliv pogojev shranjevanja na aktivnost na substrat Phe-AMC. 1) ekstrakt + voda (-20 °C); 2) ekstrakt + voda (-70 °C); 3) ekstrakt + glicerol (-20 °C); 4) ekstrakt + glicerol (-70 °C). Cimogram: A: aktivnost po petih dneh; B: aktivnost po devetih dneh; C: aktivnost po štirinajstih dneh; D: aktivnost po enem mesecu	33
Slika 10: Aminopeptidazna aktivnost v ekstraktih listov fižola sorte Zorin analiziranih s substratom Phe-AMC brez dodatka reducenta (-) in z dodatkom reducenta DTT (+).....	33
Slika 11: Vsebnost vode (VV) v prvih, drugih in tretjih listih kontrolnih in sušnih rastlin za stanje 1 (K1 in S1) ter za stanje 2 (K2 in S2)	34
Slika 12: Relativna vsebnost vode (RVV) v prvih, drugih in tretjih listih kontrolnih in sušnih rastlin za stanje 1 (K1 in S1) ter za stanje 2 (K2 in S2)	35
Slika 13: Umeritvena krivulja, ki smo jo naredili z raztopinami govejega serumskega albumina različnih koncentracij v območju od 1 do 16 µg / mL. Koncentracijo proteinov v vzorcu (mg / mL) smo izračunali s pomočjo enačbe umeritvene krivulje	36
Slika 14: Razmerje med topnimi proteini in suho snovjo za posamezne liste [mg / µg] v kontrolnih in sušnih ekstraktih listov fižola za stanje 1 (K1 in S1) ter za stanje 2 (K2 in S2).....	36

Slika 15: Aminopeptidazna aktivnost listnih ekstraktov 5 kontrolnih rastlin (1-5) in 5 rastlin izpostavljenih suši 1 (6-10) analizirana s substratom Phe-AMC. Desno so oznake posameznih aminopeptidaz (AP_1 - AP_5). Predstavljeni so cimogrami ekstraktov prvih listov (A), drugih listov (B) in tretjih listov (C) 37

Slika 16: Primerjava aktivnosti različnih aminopeptidaz na substrat Phe-AMC, določenih s cimografijo, med kontrolo 1 (K1) in sušo 1 (S1) za prve liste (A), druge liste (B) in tretje liste (C). Relativne aktivnosti za posamezne aminopeptidazne aktivnosti v S1 v primerjavi z ustreznimi K1 so navedene v %..... 39

Slika 17: Aminopeptidazna aktivnost listnih ekstraktov 5 kontrolnih rastlin (1-5) in 5 rastlin, izpostavljenih suši 2 (6-10) analizirana s substratom Phe-AMC. Desno so oznake posameznih aminopeptidaz (AP_1 - AP_5). Predstavljeni so cimogrami ekstraktov prvih listov (A), drugih listov (B) in tretjih listov (C) 41

Slika 18: Primerjava aktivnosti različnih aminopeptidaz na substrat Phe-AMC, določenih s cimografijo, med kontrolo 2 (K2) in sušo 2 (S2) za prve liste (A), druge liste (B) in tretje liste (C). Relativne aktivnosti za posamezne aminopeptidazne aktivnosti v S2 v primerjavi z ustreznimi K2 so navedene v %..... 43

Slika 19: Primerjava aminopeptidaznih aktivnosti AP_1 (A), AP_2 (B), AP_3 (C), AP_4 (D) in AP_5 (E) v različno starih listih kontrolnih rastlin in rastlin izpostavljenih suši v obeh stanjih (kontrola 1 in 2 ter suša 1 in 2) 45

Slika 20: Aminopeptidaze v treh različnih delih kalčka fižola sorte Zorin. Nanos 1: listki, nanos 2: korenine in nanos 3: kotiledon. Nanašali smo $8\mu\text{L}$ ekstrakta 46

Slika 21: Sorodnost med fižoli, ki smo jih analizirali na substrat Phe-AMC s cimografijo 47

Slika 22: Cimogram A: ekstrakti listov treh sort navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*) - Zorin (1), Češnjevec (2) in Tiber (3). Cimogram B: aminopeptidaze aktivne na substrat Phe-AMC v ekstraktih kalčkov drugih vrst fižola – *Phaseolus lunatus* (5) in *Phaseolus coccineus* (6) ter v *Vigna unguiculata* (4) 47

Slika 23: Frakcije bakterijskih kultur *Lactobacillus gasseri* K7, *Streptococcus thermophilus* S4, *Lactobacillus helveticus*, *E. coli faecium* BM 3/2 in *E. coli faecalis* 25 po obrnjeni elektroforezi in barvanju z Leu-AMC (levih 5 nanosov) in Phe-AMC (desnih 5 nanosov) 48

PRILOGE

Priloga A: Podatki o sveži masi posameznih fižolovih listov, masi nasičenih listov, suhi snovi in o vsebnosti vode (VV) ter relativni vsebnosti vode (RVV) za posamezne rastline za kontrolo 1 (K1) in sušo 1 (S1)

Priloga B: Podatki o sveži masi posameznih fižolovih listov, masi nasičenih listov, suhi snovi in o vsebnosti vode (VV) ter relativni vsebnosti vode (RVV) za posamezne rastline za kontrolo 2 (K2) in sušo 2 (S2)

Priloga C: Vsebnost vode (VV) v prvih, drugih in tretjih listih za kontrolo 1 (K1) in sušo 1 (S1) ter za kontrolo 2 (K2) in sušo 2 (S2). Rezultati meritev so podani v %

Priloga D: Relativna vsebnost vode (RVV) za prve, druge in tretje liste za kontrolo 1 (K1) in sušo 1 (S1) ter za kontrolo 2 (K2) in sušo 2 (S2). Rezultati meritev so podani v %

Priloga E: Koncentracija proteinov [mg / ml] v posameznih ekstraktih zamrznjenih listov fižola *Phaseolus vulgaris* cv. Zorin

Priloga F: Razmerje med topnimi proteini in suho snovjo za posamezne fižolove liste (prvi, drugi in tretji list) v kontroli in suši za stanje 1 (K1 in S) ter v kontroli in suši za stanje 2 (K2 in S2). Rezultati so podani v mg/g

Priloga G: Aktivnost aminopeptidaz na substrat Phe-AMC v posameznih listih pri suši 1 (S1) in kontroli 1 (K1), izražena kot kvocient intenzitete lise in proteinov (integral/ μ g). Prikazane so povprečne vrednosti (povprečje petih rastlin) in ustrezne standardne deviacije za posamezne, na proteine normirane, aminopeptidazne aktivnosti pri ekstraktih iz sušnih (S1) in kontrolnih (K1) listov

Priloga H: Aktivnost aminopeptidaz na substrat Phe-AMC v posameznih listih pri suši (S2) in kontroli 2 (K2), izražena kot kvocient intenzitete lise in proteinov (integral/ μ g). Prikazane so povprečne vrednosti (povprečje petih rastlin) in ustrezne standardne deviacije za posamezne, na proteine normirane, aminopeptidazne aktivnosti pri ekstraktih iz sušnih (S2) in kontrolnih (K2) listov

Priloga I: Primerjava aktivnosti posameznih aminopeptidaz v ekstraktih prvega, drugega in tretjega lista med kontrolo 1 (K1) in sušo 1 (S1) ter med kontrolo 2 (K2) in sušo 2 (S2), normirani na μ g proteinov. A=AP₁, B=AP₂, C=AP₃, D=AP₄, E=AP₅

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A ₄₆₅	absorbanca pri valovni dolžini 465 nm (absorbance at 465 nm)
A ₅₉₅	absorbanca pri valovni dolžini 595 nm (absorbance at 595 nm)
ABA	abscizinska kislina (abscisic acid)
Ala-AMC	alanin-7-amino-4-metilkumarin (alanine-7-amino-4-methylcoumarin)
AMC	7-amino-4-metilkumarin
AP _x	aminopeptidaza (x = 1, 2, 3, 4, 5)
BSA	goveji serumski albumin (bovine serum albumin)
DTT	ditiotreitol (dithiothreitol)
s.s.	suha snov (dry weight)
s.m.	masa svežih fižolovih listov (fresh weight)
K1	kontrola 1 – fižol, zalivan 23 dni
K2	kontrola 2 – fižol, zalivan 25 dni
K _{x,y}	kontrolna rastlina, ekstrakt določenega lista (y) ustrezne rastline (x)
LEA-proteini	proteini, ki se v večjih količinah pojavljajo v pozni embriogenezi (Late Embryogenesis Abundant Proteins)
Lys-AMC	lisin-7-amino-4-metilkumarin (lysine-7-amino-4-methylcoumarin)
Met-AMC	metionin-7-amino-4-metilkumarin (methionine-7-amino-4-methylcoumarin)
NaDS	natrijev dodecil sulfat (sodium dodecyl sulphate)
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PCD	programirana celična smrt (programmed cell death)
Phe-AMC	fenilalanin-7-amino-4-metilkumarin (phenylalanine-7-amino-4-methylcoumarin)
PVP	polivinilpirolidon (polyvinyl pyrrolidone)
RVV	relativna vsebnost vode (relative water content)
S1	suša 1 – fižol, zalivan 20 dni + 3 dni brez zalivanja
S2	suša 2 – fižol, zalivan 20 dni + 5 dni brez zalivanja
S _{x,y}	rastlina izpostavljena suši, ekstrakt določenega lista (y) ustrezne rastline (x)
n.m.	masa nasičenih fižolovih listov (saturated weight)
VV	vsebnost vode (water content)

1 UVOD

Aminopeptidaze so encimi, ki v vseh živih organizmih sodelujejo v razgradnji proteinov, torej spadajo v veliko skupino proteolitičnih encimov oz. proteaz. Katalizirajo cepitev peptidnih vezi z N-terminalnega konca proteinov. Skupaj z ostalimi proteazami sodelujejo v procesiranju proteinov, ki je pomembna stopnja v kontroli delovanja in presnove vsakega živega bitja.

Rastlinske proteaze so danes predmet številnih raziskav, saj je proteoliza vpletena v fiziologijo in razvoj rastline. Proteaze so vključene v ves življenski cikel rastlin, od mobilizacije rezervnih proteinov med kativijo semen do iniciacije celične smrti in staranja rastlin, vpletene pa so tudi v odziv rastlin na abiotski in biotski stres. Razgradnja proteinov je namreč bistvena za adaptacijo na spremembe okolja (Callis, 1995; Schaller, 2004).

O značilnostih in vlogi aminopeptidaz v odzivu rastlin na različne abiotiske stresorje je na voljo zelo malo literaturnih podatkov. Objavljeno je, da pomanjkanje vode povzroči zvišanje genske ekspresije in aktivnosti levcin-aminopeptidaze, ki spada med metalopeptidaze, v paradižniku *Lycopersicon esculentum*. Za ta encim je sicer znano, da sodeluje v obrambi rastline pred napadom patogenov in mehanskimi poškodbami (Chao in sod., 1999). Pomanjkanje vode vpliva tudi na aktivnosti levcin-aminopeptidaze in alanin-aminopeptidaze v listih fižola *Phaseolus vulgaris*. Za ta dva encima so dosedanje raziskave pokazale, da nista metalopeptidazi, vendar bolj podrobno nista bili karakterizirani (Hieng in sod., 2004).

Rezultati predhodnih raziskav (Budić in sod., 2009) so pokazali, da se v fižolovih listih izraža več različnih encimov s fenilalanin-aminopeptidazno aktivnostjo, ki do sedaj še niso bili opisani v literaturi.

1.1 NAMEN DELA

- optimizacija vzorčenja fižolovih listov, shranjevanja listnih ekstraktov in analize aminopeptidazne aktivnosti s cimografijo
- vrednotenje vpliva suše na fenilalanin-aminopeptidazno aktivnost v listih fižola z uporabo cimografije
- preverjanje uporabnosti cimografije za določevanje aminopeptidazne aktivnosti v ekstraktih mikrobiološkega izvora

2 PREGLED OBJAV

2.1 NAVADNI FIŽOL (*Phaseolus vulgaris* L.)

Navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.) spada v družino metuljnic (*Fabaceae*), ki razvijejo pokončno razvejana, posamezne vrste pa tudi plezajoča stebla. Razdelimo ga v tri podvrste, te pa naprej na sorte:

- *Phaseolus vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *nanus* (L.) Aschers f. *sine fibris* – nizki stročji fižol, *Aschers f. fibriferis* – nizki fižol za zrnje (sem spada Zorin*, ki sem ga preučevala v svoji nalogi)
- *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).

*Sorta Zorin je nizek, ima temno rdeče pisano podolgovato zrnje in je zelo rodoviten. Vzgojila ga je Silva Avšič, dipl. inž. agr., v sortno listo je bil vpisan leta 1986 (Černe, 1997).

2.1.1 Fiziološke in morfološke karakteristike

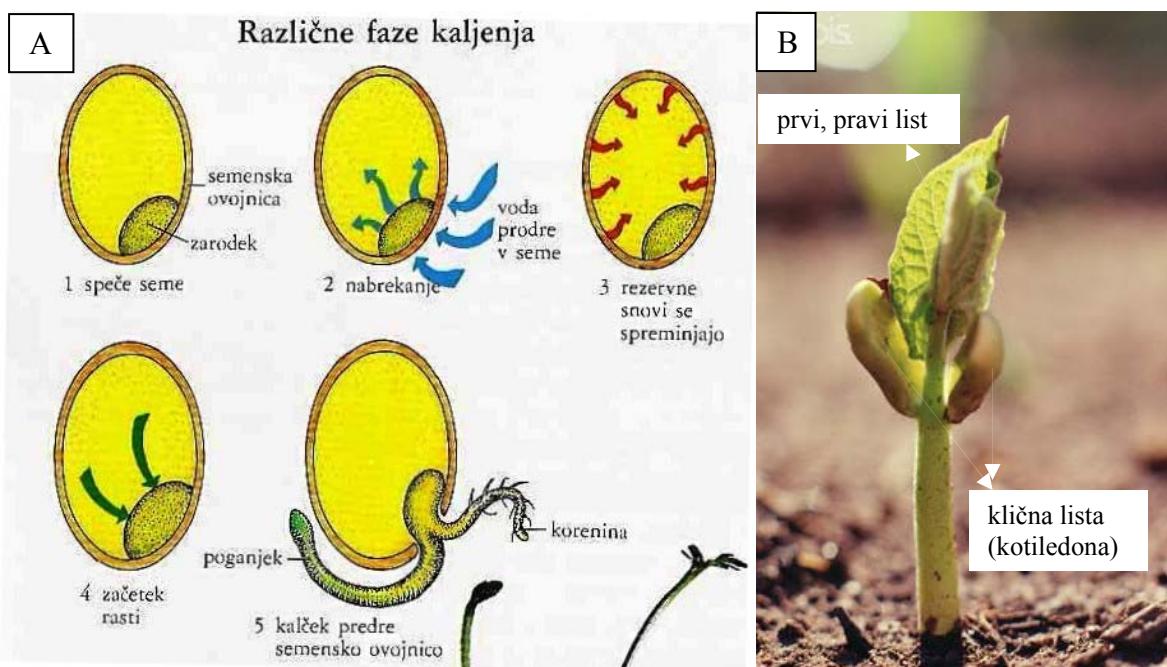
V rodu *Phaseolus* je približno 180 vrst, večinoma razširjenih v tropskih območjih. Vrsta *Phaseolus vulgaris* L. je najbolj razširjena vrsta enoletnih zelnatih fižolov. Glavno korenino ima bolj slabo razvito v primerjavi s stranskimi koreninami, kjer so gomolji večinoma videti kot izrastki na korenini. Korenine prodrejo zelo globoko v zemljo. Steblo fižola je tanko, okroglo, šesterorobo. Posamezno steblo imenujemo vit, vse viti enega grma pa vitje. Vitje z listi in stroki ali brez njih da fižolovino ali fižolinko, tako imenujemo predvsem fižolovo slamo.

Po višini stebla razdelimo sorte v 3 skupine:

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

Na steblu so izmenično razporejeni listki s prilstiki. Po vzniku se najprej razvijeta dva srčasta in celoroba lista, vsi naslednji listi pa so trojni ali tridelni (sestavljeni), z dolgimi listnimi peclji. Srednji listič v posameznem listu, kateri je na vrhu nekoliko zašiljen, je vedno močneje razvit kot stranska lističa, listi in lističi pa so gibljivi. Listi so rumenozeleni, svetlo ali temno zeleni, dlakavi, na listnih žilah so sledovi antocianov. Posamezni listi so oblikovani trikotno, rombasto ali okroglasto. Listi so majhni ali veliki, gladki do mehurasti, z ravno ali nekoliko izbočeno listno ploskvijo. Listne žile so bolj ali manj debele. Cvetovi so dvospolni, 1 do 1,5 cm dolgi, izraščajo iz nodijev in so posamični ali dvojni pri tleh, višje na viti so združeni v socvetje s po 3 do 8 cvetovi. Ti so beli, rumeni, bledorožnati, rdeči ali vijolični. Sorte zobarvanim cvetom imajo 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. Plod je nitast ali breznitni strok, dolg 10 do 30 cm, širok 2 do 3 cm, zeleno, rumeno ali pisano obarvan, raven do ukrivljen, na prerezu okrogel, ploščat ali ploščato okrogel. Seme je 1 do 2 cm dolgo, 0,7 do 1,1 cm široko, bele, rumene, rožnate, rjave, temno rdeče, vijolične, modrikaste, sive, črne ali pisane barve, lahko je ob popku obrobljeno z drugo barvo ali ima obarvan popek. Po obliku je ledvičasto, ovalno, jajčasto, okroglo ali eliptično. Sorte, ki imajo daljše seme, razvijejo tudi daljše stroke. Po debelini in teži je seme zelo različno, od velikosti riževega semena do kostanja, zato se masa 1000 semen razlikuje – razpon je od 300 do 700 ali celo do 1000 g. Seme fižola obdrži kaljivost tri do štiri leta, odvisno od vlage v semenu in načinu shranjevanja (Černe, 1997).

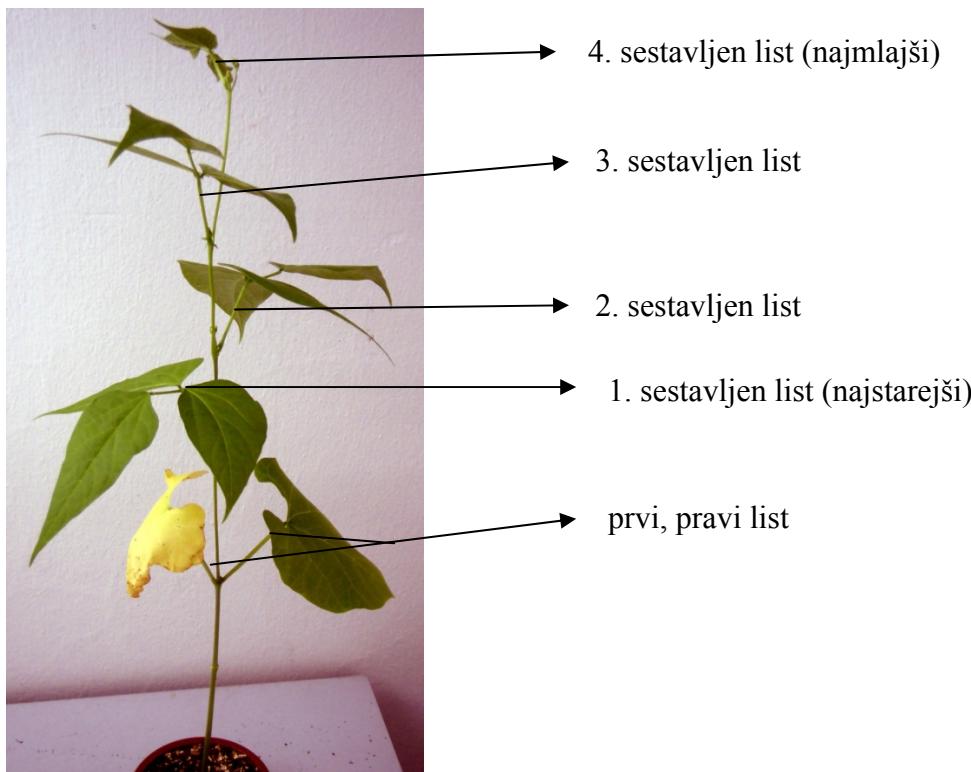


Slika 1: Različne faze kaljenja fižola, A-seme in B-poganjek (Fink, 1993)

2.1.2 Kalitev fižolovega semena

Da seme začne kaliti potrebuje določene pogoje. Seme miruje, dokler nima ustrezne vlage, zraka in topote. Šele potem se mirovanje pretrga in zarodek začne rasti. Nabrekanje semena je prva stopnja v razvoju kalčka (slika 1A). Najprej nabrekneta pri kalitvi klična lista in se razmakneta tako močno, da pretrgata semensko lupino, ta postane prepustna za zrak in vodo, seme pospeši dihanje in tako semenska ovojnica kmalu odpade in presnova se začne. Kaljenje je končano, ko se razvijejo prvi zeleni listi. Nato si poganjek s pomočjo klorofila v listih s fotosintezo sam ustvarja hranilne snovi in tako postane neodvisen od rezerve v kličnih listih.

Prva se pokaže iz semena podaljšana korenčica. Ta sili v podlago in se začne razvijati v glavno korenino, iz nje poganjajo vstran stranske korenine. Tudi stebelce in prva dva lista brstiča hitro rasteta in prodreta z ukrivljenim stebelcem vred na svetlo ter ozelenita. Nato se stebelce kmalu zravnata (slika 1B) in razvije nadzemeljsko steblo, prvima listoma brstiča pa sledijo kmalu še drugi zeleni listi (slika 2). Najnižje na steblu sta priraska klična lista. Klični listi so sploh prvi listi, ki se razvijajo na steblu. Ker imajo drugačno nalogo kot zeleni listi, se razlikujejo od njih tudi po obliki (slika 1B) (Fink, 1993).



Slika 2: Poimenovanje posameznih listov rastline (Gotar, 2009)

2.1.3 Rastne razmere

Fižol zahteva toplo in vlažno podnebje. Slabo prenaša vročino in sušo, saj ta skrajšuje čas rasti, s tem pa količino pridelka in seveda njegovo kakovost.

2.1.3.1 Toplota

Fižol že med kalitvijo zahteva veliko topote, zato ga sejemo na prosto šele maja, ko se temperatura tal dvigne na 10 do 15 °C. Minimalna temperatura za vznik je 9 do 12 °C, optimalna 18 do 22 °C, maksimalna 30 do 37 °C. Fižol pozebe že pri temperaturi – 0,1 °C. Jeseni prenesejo odrasle rastline temperature do 0 °C. Optimalna temperatura za razvoj fižola je 18 do 25 °C, pri temperaturah pod 15 °C se občutno zmanjšuje pridelek, neugodno pa delujejo tudi temperature nad 35 °C.

2.1.3.2 Vlaga

Poleg visoke zračne vlage potrebuje fižol tudi veliko vlage v tleh. Že ob kalitvi je zrno vsrka enkrat več od svoje suhe mase, zato hitro in enakomerno vznikne samo v vlažni zemlji. Optimalna talna vlaga je 60 do 75 % poljske kapacitete tal za vlago, optimalna zračna vlažnost pa 65 do 80 % relativne vlage zraka.

2.1.3.3 Svetloba

Predvsem v začetku rasti zahteva fižol veliko svetlobe, sicer so rastline pretegnjene. Ob cvetenju in razvoju strokov zadovoljiva osvetlitev ugodno deluje na kakovost stročja. V vseh urah dneva obrača fižol liste proti soncu, k njemu so popolnoma obrnjeni predvsem zjutraj in zvečer, opoldne pa svetloba pada samo na robove listov, kar preprečuje preveliko izsušitev.

2.1.3.4 Kakovost zemljišča

Fižol zahteva bolj kakovostno zemljo kot druge stročnice. Zelo dobro uspeva na peščeno – ilovnatih tleh. Na zelo peščenih ali izredno težkih glinastih tleh, kjer se zadržuje voda, slabše raste. Največji pridelek dobimo na srednje težkih tleh, ki dobro zadržujejo vodo, imajo srednje visok nivo podtalnice, v zemlji pa dovolj kalcija. Optimalen pH tal je 6,5 do 7,8. Fižol zelo slabo uspeva v kislih tleh s pH pod 5,5, ker se tam ne morejo razkrojiti nitrifikacijske bakterije, ki živijo na fižolovih koreninah. Te bakterije vežejo dušik iz zraka, od njega pa iz korenin črpajo organske spojine. Pri predelovanju fižola je izredno pomembno, da so tla bazična ali nevtralna, da v takih tleh ne primanjuje mangana, ker to povzroča pojav nekrotičnega tkiva v notranjosti kotiledonov – kličnih listov (Osvald in Kogoj-Osvald, 1994; Černe, 1997).

2.1.4 Pomen za prehrano

Navadni fižol je daleč najpomembnejša kulturna rastlina med stročnicami za zrnje in zavzema pomembno mesto med stročnicami, ki se uporablja za prehrano (Singh, 1999). V nekaterih državah je fižol glavni vir beljakovin v prehrani ljudi, saj vsebujejo približno 2 do 3 krat več beljakovin kot žita. Najbolj pogosto se, izmed ogromno vrst stročnic, uživa ravno fižol (*Phaseolus vulgaris*) (Broughton in sod., 2003; Fiqueiredo, 2008).

Fižol je danes nenasadljiva skupina zelenjave. Med povrtninami ima suho fižolovo zrnje visoko energijsko vrednost, saj 100 g vsebuje 335 kalorij. K tej vrednosti največ prispevajo ogljikovi hidrati, ki zavzemajo do 55 odstotkov od mase zrna. Zaradi visoke vsebnosti beljakovin (1 % do 3 % v svežem stroku in 20 % do 24 % v suhem zrnu) v vegetarijanski prehrani vsaj deloma nadomešča meso, sicer pa se beljakovine fižola dopolnjujejo z beljakovinami mesa, jajc, mleka in žitaric. Razlog, da so stročnice bolj bogat vir proteinov kot ostale rastline je v tem, da s pomočjo bakterij fiksirajo dušik iz zraka. Fižol vsebuje tudi veliko prehranskih vlaknin, ki vplivajo na delovanje prebavnega trakta in na proces metabolizma, s katerim je ta povezan. V črevesju nabreknejo in s tem spodbujajo 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 (Kutoš, 1997). Z rednim uživanjem fižolovih jedi telo bogatimo s fosforjem, magnezijem, kalcijem, železom, kobaltom, nikljem in kalijem. Ker vsebuje fižol malo natrija in veliko kalija, učinkuje diuretično. Vsebuje tudi vitamine iz B skupine (riboflavin, tiamin in folno kislino) in vitamin E (Broughton in sod., 2003; Perazzini in sod., 2008).

Pomembni so tudi pigmenti v fižolu, ki so jim v zadnjih letih namenili veliko pozornosti, saj imajo funkcionalno vlogo pri preprečevanju kroničnih bolezni, tudi raka, bolezni srca in ožilja, debelosti in diabetesa (Perazzini in sod., 2008). Znanstveniki na področju prehrane na Ministrstvu Združenih držav Amerike za kmetijstvo (USDA) so merili antioksidacijski potencial več kot 100 antioksidacijsko bogatim živilom. Zanimivo je, da so tri vrste navadnega fižola zasedle prva mesta na lestvici živil, ki na posamezen obrok vsebujejo največ antioksidantov (Xu in Chang, 2009).

Velik pomen fižola za prehrano je privedlo do ustanovitve mednarodnega konzorcija (»Phaseomics«) za izboljšanje njegove kakovosti, količine pridelka in odpornosti na stres in bolezni. Konzorcij bo ključnega pomena za izboljšanje življenskih pogojev v ogroženih regijah Afrike in Amerike (Broughton in sod., 2003).

Poleg pojma pridelave velja omeniti tudi pomembnost obdelave oz. predelave fižola. Nedavna raziskava (Xu in Chang, 2008) je pokazala, da se je drastično povečala prehranska vrednost semen, ki so jih prej obdelali z vlažnim segrevanjem (vrenje, mikrovalovno kuhanje in avtoklaviranje), torej je takšen način obdelave najbolj učinkovit. Ker se stročnice uporabljajo kot sestavine v človeški prehrani, se pred njihovo uporabo priporoča obdelava, da se zagotovi varnost in kakovost hrane in krme. Fižola ne uživamo v surovi obliki, temveč ga moramo prej ustrezno obdelati. Običajno uživamo kuhan, predhodno namočen fižol, saj surovi stroki vsebujejo težko prebavljen protein fazeolin, ki se med kuhanjem ali pečenjem razgradi. Različni načini priprave pod različnimi pogoji lahko spremenijo ne le senzorične lastnosti, temveč tudi prehransko sestavo, zaradi česar ima fižol različne fiziološke učinke (Kutoš, 1997). Zdravilni deli so cvetje, stročje, suh fižol v zrnju in tudi fižolove luščine. V njih je gvanidin-alfa-aminovalerianska kislina, ki spada v skupino glukokininov, ki delujejo podobno kot inzulin. Med kuhanjem se glukokinin ne uniči, ampak se izluži v vodo, v kateri kuhamo stročji fižol. Poleg stročja je ta voda zelo priporočljiva za sladkorne bolnike, saj glukokinin zmanjšuje količino sladkorja v krvi in seču celo za 30 do 40 % (Černe in Vrhovnik, 1992; Azevedo in sod., 2006).

2.2 SUŠA

Ocenjeno je, da kar 60 % svetovne pridelave fižola raste v razmerah pomanjkanja vode (Beebe, 2008). 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 *Phaseolus vulgaris* razmeroma občutljiva na sušo v primerjavi z ostalimi zrnatimi stročnicami. Izvajajo se intenzivne študije z namenom opredeliti fiziološke lastnosti, ki jih bo mogoče uporabiti kot merila za izbor sort z visoko toleranco na sušo (Schneider in sod., 1997; Cruz de Carvalho in sod., 1998; Singh, 1999; Costa Franca in sod., 2000; Martinez in sod., 2007).

2.2.1 Odziv rastlin na pomanjkanje vode

Voda omogoča povezavo rastline z okoljem in medij, v katerem poteka večina življenjsko pomembnih biokemijskih reakcij. Rastlinska celica je aktivna samo takrat, ko je protoplazma nasičena z vodo in je vsebuje približno 85 – 90 %.

Suša je pomemben dejavnik, ki vpliva na rast, razvoj in življenje rastlin ter tako omejuje donos posevkov. Prve vidne znake suše opazimo na listih, ki se prezgodaj starajo, čeprav se prve spremembe, tako morfološke kot tudi presnovne, pojavijo pri koreninskem tkivu, ki najprej izkusi pomanjkanje vode. Te spremembe se ne odražajo le v postopnem zmanjševanju vsebnosti vode v rastlinah, ampak tudi v kvalitativnih in kvantitativnih spremembah v njihovi presnovi, kar kažejo številni mehanizmi, ki jih rastline uporabijo kot odziv na prilagajanje suši in s katerimi si opomorejo od njenih učinkov (Martinez in sod., 2007; Kavar in sod., 2008).

Voda je v rastlinskih celicah in tkivih neposredno vključena v osnovne fiziološke procese. Že samo majhno zmanjšanje vode privede do velikih sprememb v strukturi protoplazme in s tem tudi v splošnem delovanju celic in tkiv (Fitter in Haj, 1983; Stevanović in Janković, 2001).

Suša ali pomanjkanje vode za rastlino nastopi, ko je količina oddane vode večja od količine sprejete vode oziroma, ko stopnja transpiracije preseže količino dostopne vode (Bray, 1997).

Pri rastlinah lahko do pomanjkanja vode privedejo številni stresni dejavniki v okolju, četudi je vode dovolj, in sicer:

- velike koncentracije soli v slanih habitatih, ki otežujejo koreninam izvleči vodo iz tal,
- nizke temperature; izpostavitev zmrzovanju lahko vodi do dehidracije celic, saj voda zapusti celico in tvori ledene kristale v medceličnih prostorih
- včasih se lahko tudi pri dobro zalitih rastlinah pokažejo znaki pomanjkanja vode, kot je prehodna opoldanska izguba turgorja (v takih primerih izguba vode povzroča venenje, ker transpiracija preseže hitrost absorpcije) (Bray v Buchanan in sod., 2000).

Rastline lahko preživijo na nekem področju v spremenjenih in včasih zelo neugodnih razmerah okolja, le če imajo ugoden vodni režim in pozitivno vodno bilanco pomanjkanja (Moore in sod., 1998).

Vodni stres je pogost v večini habitatov, zato so rastline razvile številne strategije, s katerimi se branijo pred njim: mehanizmi adaptacije jim omogočajo preživetje v neugodnih pogojih, z rastjo v specifičnih habitatih pa se izognejo stresnim pogojem (Bartels in Sunkar, 2005).

Pomanjanje vode rastline uravnavajo z različnimi mehanizmi, vendar se v glavnem odzovejo na dva načina. Pri prvem načinu razvijejo mehanizme, s katerimi se skušajo izogniti pomanjanju vode v okolju. To lahko naredijo s hitrim fenološkim razvojem, z razvojno plastičnostjo, s podaljšanjem dormance semen. Pri drugem načinu pa rastline pomanjanje vode tolerirajo. Te rastline imajo različne mehanizme, ki jim omogočajo, da se na sušni stres odzovejo in ga tudi preživijo. Razdelimo jih na tiste, ki vzdržujejo visok vodni potencial in tiste, ki služijo kot zaščita ob majhnem vodnem potencialu v rastlinskih tkivih (Nilsen in Orcutt, 1996).

Najpomembnejši fiziološki mehanizem odpornosti na sušni stres je osmoregulacija ali osmotsko prilagajanje. Takrat pride do kopiranja topljencev, ki močno zmanjšajo osmotski in vodni potencial rastlinske celice. Tem topljencem pravimo osmotsko aktivne substance ali osmoliti. Zaradi zmanjšanja osmotskega potenciala se poveča razlika v vodnem potencialu med celico in zunanjim okoljem, posledica tega pa je povečano osmotsko prehajanje vode iz okolja v celico. Rastlina izkoristi vso, tudi težje dostopno vodo. Z osmoregulacijo se, ob pomanjanju vode v okolju, ohranja celični turgor, tako da je omogočen nadaljnji potek metabolnih procesov. Med anorganskimi osmoliti so pomembni predvsem K^+ , Na^+ , Cl^- ioni. Med organskimi osmotsko aktivnimi substancami pa so pomembni polioli, ogljikovi hidrati, metilirane kvarterne amonijeve soli, proste aminokisline in organske kisline. Za organske osmotike velja, da ne povzročajo denaturacije metabolno pomembnih encimov in poškodb ter jih zato imenujemo kompatibilni osmoliti (Morgan, 1998; Živković in sod., 2005).

Suša povzroča veliko sprememb, ki so lahko za rastlino škodljive. Tako je npr. že omenjeno prezgodnje staranje listov. Ena od posledica pomanjanja vode je tudi tvorba prostih radikalov, ki negativno vpliva na celično presnovo in strukturo (Bartels in Sunkar, 2005).

Načini osmotskega prilagajanja, kakor tudi drugi odzivi na sušo se lahko precej razlikujejo ne samo med vrstami, ampak tudi med sortami iste vrste. Pridobivanje znanja o razlogih za različno odzivnost rastlin lahko pomembno pripomore k povečani odpornosti rastlin na pomanjanje vode (Sassi in sod., 2008).

2.2.2 Fiziološke in biokemijske spremembe v rastlinah, ki jih povzroči pomanjkanje vode

V rastlinah, ki so izpostavljene suši, se običajno zmanjša vodni potencial. V celicah se zmanjša tudi turgorski pritisk, zato se upočasni rast celic in tako vseh rastlinskih organov. Celični volumen se zaradi pomanjkanja vode zmanjša, majhne molekule in makromolekule pa postanejo bolj koncentrirane. Zaradi spremembe celičnega volumna se spremenijo prostorska razmerja med plazmalemo, tonoplastom in membranami celičnih organelov. Posledica tega je venenje neolesenelih, nadzemnih delov rastlin. Če poškodbe plazmaleme niso prevelike in če celice ne odmrejo, se ob ponovnem sprejemu vode turgor spet vzpostavi. Ob izpostavljenosti rastlin sušnemu stresu se zaprejo listne reže, s čimer se zmanjšata transpiracija in stopnja fotosinteze. Ob močnejšem stresu je ovirano tudi dihanje (Hsiao, 1973; Bray, 1997; Xiong in sod., 2002).

Poleg sprememb v celični rasti, sodijo med primarne procese, ki jih povzroča suša tudi spremembe v fotosintezi. Učinek sušnega stresa na fotosintezo je bodisi direkten (spremembe v metabolizmu) ali indirekten, kot je oksidativni stres, ki je posledica več stresnih dejavnikov skupaj (Lawlor in Tezara, 2009). Znanja o fizioloških omejitvah poteka fotosinteze v pogojih pomanjkanja vode še vedno primanjkuje.

Od velike količine podatkov, ki so na voljo iz različnih študij, ki preučujejo rastline izpostavljene suši, postaja očitno, da rastline zaznavajo in se odzivajo na primanjkljaj vode s hitrim spremenjanjem izražanja genov (Seki in sod., 2002) vzporedno s fiziološkimi in biokemijskimi spremembami, kar se zgodi tudi v blagih do zmernih stresnih pogojih (Pinheiro in sod., 2008).

Ob suši pride tudi do sprememb v metabolizmu proteinov. Sintetizirajo se različni LEA proteini (Late-Embryogenesis-Abundant Proteins) in dehidrini (Bartels in Sunkar, 2008; Pinheiro in sod., 2008). Nivo encimov, ki sodelujejo pri odstranjevanju toksičnih intermediatov kisikovega metabolizma, v suši naraste, kar ima pomembno vlogo pri toleranci rastlin na sušo. Zaradi zmanjšanja vsebnosti vode v listih in posledičnega zapiranja listnih rež se namreč zmanjša količina razpoložljivega CO₂, nastajajo pa aktivne oblike kisika, kot so superoksidni radikali. Ti so za celice zelo škodljivi in v prednosti so tiste, ki jih lahko učinkovito odstranijo (Ingram in Bartels, 1996; Battaglia in sod., 2008).

Zasledili so tudi indukcijo izražanja genov, katerih nukleotidna zaporedja so zelo podobna zaporedjem proteaz (Ingram in Bartels, 1996; Bartels in Sunkar, 2005). Možna funkcija nekaterih od teh encimov je razgradnja proteinov, ki so utrpeli nepopravljive poškodbe med sušo in so zato nepotrebni ali škodljivi. Proteaze, ki jih razgrajujejo, na ta način tudi zagotavljajo aminokisline, ki so potrebne za sintezo novih proteinov. Preživetje rastlin je, ko so pogoji za prevzem hranil omejeni, odvisno od njihove sposobnosti recikliranja znotrajceličnih komponent, kot so proteini, za oskrbo celic z aminokislinami, potrebnimi

za sintezo novih proteinov (Vierstra, 1996). Ugotovili so tudi, da pride do sprememb v delovanju ubikvitina (O'Mahony in Oliver, 1999; Perales in sod., 2008). O spremembah deleža na proteinskem nivoju oz. aktivnosti proteaz bo govora na str. 17.

Naj povzamem: rastline morajo biti sposobne odzvati se in prilagoditi na ponavljajoča se obdobja biotskih in abiotiskih stresov. Da se odzovejo na okolske spremembe jim omogočajo zapleteni mehanizmi, ki so na molekularnem nivoju v veliki meri pod nadzorom sprememb v genski ekspresiji. Do prilagoditve rastlin na sušo pride z modulacijo genskega izražanja in kopiranjem posebnih zaščitnih proteinov in metabolitov (Reddy in sod., 2004; Zang and Komatsu, 2007; Bruce in sod., 2007; Demirevska in sod., 2008).

Prilagoditev na pomanjkanje vode torej vključuje številne spremembe. Kateri je ključni proces, ki je odgovoren za toleranco, in kateri so sekundarni procesi, ki mu sledijo, še ni znano, vseeno pa med prilagoditvene spremembe v rastlini štejemo oslabljeno rast, aktivacijo/povečano ekspresijo ali indukcijo genov, začasno povišanje nivojev rastlinskega hormona abscizinske kisline (ABA), akumulacijo kompatibilnih topljencev in zaščitnih proteinov, povečan nivo antioksidantov in supresijo energetsko potratnih poti. Kljub temu, da so z razvojem visoko zmogljivih tehnologij DNA identificirali nekaj sto genov pri katerih se pod vplivom stresa nivo ekspresije zviša, so potrebne natančnejše študije, da bi lahko uporabili te gene za izboljšanje tolerance za stres (Bartels in Sunkar, 2005).

2.2.3 Fižol (*Phaseolus* sp.) in vodni stres

Kot je že rečeno, je navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.) pomembna vrsta iz družine *Fabaceae*, ki ga gojijo za prehrano ljudi po vsem svetu. Prav tako navadni fižol zelo pogosto raste v okolju, ki je večino časa izpostavljenem pomanjkanju vode (Kavar in sod., 2008).

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 zgodi že pred zaznavo kakršnegakoli pomanjkanja vode v listih. Mehanizmi, s katerimi fižol tolerira pomanjkanje vode, še posebej pri majhnem vodnem potencialu rastlin, vključujejo različne procese na celični ravni. 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 pa je pomembna za preživetje daljših in kratkotrajnih sušnih obdobij (França in sod., 1999; Singh, 1999; Martinez in sod., 2007; Capitani in sod., 2009).

Raziskovali so tudi vpliv suše in slanosti na velikost sejancev fižola *P. vulgaris*. Rezultati so pokazali, da pomanjkanje vode oz. povečana slanost povzročita upočasnitev hitrosti kaljenja in zmanjšano rast korena (Gholami in sod., 2009).

Kot odziv na sušni stres so Torres in sod. (2006) preučevali spremembe v izražanju genov v koreninah, Kavar in sod., (2008) pa so opravili dopolnilno študijo na listih navadnega fižola. V koreninah so identificirali 24, v listih pa 15 transkriptov, katerih izražanje se spremeni v pogojih pomanjkanja vode. Ugotovljeno je bilo, da se geni pod vplivom suše v listih razlikujejo od tistih v koreninah *P. vulgaris*. Te razlike niso nepričakovane, saj korenine prej občutijo zmanjšano razpoložljivost vode v okolju kot listi.

V fižolu *P. vulgaris* so identificirali majhne molekule mRNA (miRNA), ki so odgovorne za prilagoditev stročnic na spopadanje z neugodnimi razmerami. Predvidevajo, da so miRNA molekule, prisotne v navadnem fižolu in drugih stročnicah, vključene v specifične procese, ki omogočajo prilagoditev stročnic na različne zunanje stresne dejavnike. Študija o miRNA molekulah, ki so jih opredelili v navadnem fižolu pomembno prispeva k razširitvi znanja o odzivih rastlin na različne dražljaje okolja, vključujuč sušni stres (Arenas-Huertero in sod., 2009).

2.3 RASTLINSKE PROTEAZE

Proteaze ali peptidaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi v proteinskih in peptidnih substratih. Lahko jih delimo glede na to, kje cepijo peptidne verige. Endopeptidaze cepijo proteine znotraj peptidnih verig, eksopeptidaze pa na njihovih koncih. Eksopeptidaze so razdelili glede na njihovo specifičnost za substrat na aminopeptidaze, ki cepijo peptide na N-koncu, in karboksipeptidaze, ki cepijo peptide na C-koncu. Več o različnih klasifikacijah proteaz bo govora na str. 13.

Aktivnost proteaz je odvisna od stopnje razvoja in fiziološkega stanja rastlin. Nekatere so aktivne le določen čas razvoja, nekatere pa skozi celotno življenjsko dobo rastline. Značilna je tudi njihova lokalna specifičnost, saj so določene proteaze omejene le na posamezne rastlinske organe, tkiva in celične organe (Brzin in Kidrič, 1995; Vierstra, 1996; Palma in sod., 2002; Schaller, 2004).

Rastlinske proteaze so danes predmet številnih raziskav, saj proteoliza omogoča rastlinam spremembo vsebnosti proteinov med razvojem in prilagoditvi na nove pogoje v okolju (Vierstra, 1993). Proteoliza je tako vključena v fiziologijo in razvoj rastline, povezana je z različnimi stopnjami življenjskega cikla, kot so kalitev, diferenciacija, morfogeneza, staranje in programirana celična smrt (Callis, 1995; Vierstra, 1996; Beers in sod., 2000; Palma in sod., 2002).

Proteaze so torej encimi, ki opravljajo zelo pomembne funkcije v organizmih in encimi, katerim se danes posveča ogromno pozornosti. V zadnjih letih se povečuje vloga proteaz v kliničnih, farmacevtskih in industrijskih aplikacijah (proizvodnja sira, mehčanje mesa, strojenje usnja itd.) (Demir in sod., 2008).

2.3.1 Vloga rastlinskih proteaz

Proteaze urejajo biološke procese v različnih stopnjah rasti in razvoja rastlin, kot so kalitev semen, senescenca listov, zorenje plodov in semen, prav tako pa igrajo ključno vlogo v obrambnih mehanizmih rastlin na stresne dejavnike, kot so interakcije s patogeni in določene abiotiske spremembe okolja (Walling in Gu, 1996; Van der Hoorn in Jones, 2004). Proteaze, kamor uvrščamo tudi aminopeptidaze, so tako vpletene v mnoge procese rastlinskega življenskega cikla, od mobilizacije in shranjevanja proteinov med klitjem semen, do vstopanja v celično smrt in senescenco (Schaller, 2004).

Vierstra (1996) je v svojem preglednem članku podrobno opisal različne vloge rastlinskih proteaz, in sicer:

- Oskrba z aminokislinsami:

Čeprav lahko rastline sintetizirajo vse aminokisline, je velik del proteinov sestavljen iz recikliranih aminokislin. Te aminokisline lahko nastanejo pri razgradnji nefunkcionalnih ali poškodovanih proteinov ali proteinov, katerih edini namen je zaloga aminokislin. Med slednje sodijo rezervni proteini v semenu, katerih aminokisline se vgradijo v razvijajoče se organe in založni proteini vegetativnih tkiv, ki jih proteaze razgradijo med pomanjkanjem dušika. Pomemben vir aminokislin pri rastlinah je tudi ekstracelularna ali zunajcelična proteoliza, kot je zunajcelična razgradnja založnih proteinov endosperma v semenih žit, ki zagotavlja večino aminokislin za razvijajoči embrio. Poseben primer zunajcelične proteolize najdemo pri mesojedih rastlinah, ki so razvile prefinjeno morfologijo, da lahko ujamejo, prebavijo in absorbirajo insekte kot dodatni vir aminokislin in dušika.

- Odstranjevanje napačno zvitih in poškodovanih proteinov:

Neobičajni proteini nenehno nastajajo s številnimi mehanizmi, kot so mutacije, napake pri biosintezi, spontana denaturacija ter poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali, katerih koncentracija se poveča v stresnih obdobjih, ki ga povzročajo dejavniki iz okolja, kot so vročinski šok, suša, bolezni, pomanjkanje hrani in izpostavitev težkim kovinam ali analogom aminokislin. Odstranitev neobičajnih proteinov je pri rastlinah zelo pomembna, saj je sama hitrost celičnih delitev prepočasna. Pogosto se lahko napačno zviti in poškodovani proteini popravijo s pomočjo šaperonov, ki pomagajo vzpostaviti nativno konformacijo. Proteoliza je pomembna, kadar proteinov ni mogoče popraviti ali kadar nastane preveč poškodovanih proteinov (npr. pri vročinskem šoku).

- Kontrola encimskih poti:

Ena izmed glavnih funkcij proteolize je regulacija metabolizma preko kontrole nivoja ključnih metabolnih encimov. Tako pri encimu nitrat reduktazi, ki katalizira prvo stopnjo

konverzije nitrata v amonijak, pride do inaktivacije s fosforilacijo, ki ji sledi hitra razgradnja polipeptidnega dela nitrat reduktaze.

- Kontrola različnih celičnih regulatorjev:

Poleg kontrole številnih metabolnih poti igrajo proteini odločilne vloge pri mnogih regulatornih procesih, vključno s sprejemom in prenosom signalov, homeostazo, transkripcijo, celično rastjo in delitvijo.

- Kontrola celičnega cikla:

Številni prelomni dogodki v celičnem ciklu so regulirani s proteolizo: vstop iz faze G1 v fazo S (replikacija DNA), napredovanje skozi fazo S, vstop v fazo M (mitoza), zaključek anafaze in izstop iz faze M.

- Programirana celična smrt (PCD):

Procese, ki vodijo do PCD razdelimo v tri skupine: induciranje signalov, prevajanje signalov in izvršitev PCD. Proteaze proizvajajo signale, specifične za PCD, s procesiranjem ali sprostitev bioaktivnih molekul ali z aktiviranjem receptorjev na površini celice. Prav tako igrajo tudi pomembno vlogo pri prevajanju signalov. Pri izvrševanju imajo proteaze, odgovorne za PCD, dve ciljni skupini funkcionalno različnih proteinov, in sicer tiste, ki sodelujejo pri organizaciji in vzdrževanju celične strukture ter encime homeostaze. V različnih modelih PCD, npr. zaradi oksidativnega stresa, preobčutljivega odziva rastlin, staranja listov in cvetov, zorenja sadežev itd., predlagajo vpletjenost predvsem cisteinskih in serinskih endopeptidaz ter aminopeptidaz (Vierstra, 1996; Solomon in sod., 1999; Beers in sod., 2000; Lombardi in sod., 2007).

2.3.2 Struktturna razdelitev proteaz

Zaradi velike raznolikosti proteolitičnih encimov, tako glede strukture, katalitičnega mehanizma in njihove vloge, obstaja več kriterijev za razvrščanje proteaz. Najbolj uveljavljena načina razdelitve sta tista, ki ju predлага komisija za encime EC (angl. Enzyme commission, kasneje preimenovana v Nomenclature committee od the International Union of Biochemistry and Molecular Biology oz. NC-IUBMB) (NC-IUBMB, 2007) in razdelitev po spletni podatkovni bazi MEROPS (Rawlings in sod., 2006; MEROPS, 2008). Preprosto rečeno, podatkovna baza MEROPS upošteva encimski mehanizem kot glavni kriterij za klasifikacijo vseh proteolitičnih encimov, medtem ko EC uporablja ta kriterij zgolj kot enega izmed kriterijev (pri endopeptidazah).

Po pravilih Encimske nomenklature (IUB Nomenclature committee, 1984) so proteaze razdeljene med:

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

Preglednica 1: Razvrstitev in oznake proteaz (NC-IUBMB , 2007)

endopeptidaze	eksopeptidaze
EC 3.4.21 (serinske proteaze)	EC 3.4.11 (aminopeptidaze)
EC 3.4.22 (cisteinske proteaze)	EC 3.4.13 (dipeptidaze)
EC 3.4.23 (aspartatne proteaze)	EC 3.4.14 (dipeptidil peptidaze in tripeptidil peptidaze)
EC 3.4.24 (metaloproteaze)	EC 3.4.15 (peptidil peptidaze)
EC 3.4.25 (treoninske proteaze)	EC 3.4.16-18 (karboksipeptidaze)
EC 3.4.99 (neznan mehanizem delovanja)	EC 3.4.19 (omega peptidaze)

Ta klasifikacija ima nekatere pomanjkljivosti, saj ne upošteva da imajo nekateri encimi tako endo- kot eksopeptidazno aktivnost, zato je boljša klasifikacija po Rawlingsu in Barrettu (1993) ki, poleg že obstoječe razdelitve skupin po mehanizmu katalitskega delovanja, upošteva še evolucijsko povezanost encimov oziroma strukturno podobnost. Vsaka peptidaza je glede na tip katalize uvrščena v določeno skupino. Posamezni tipi so nadalje razdeljeni v družine, ki jih sestavljajo evolucijsko sorodni encimi glede na celotno aminokislinsko zaporedje ali vsaj del v okolini aktivnega mesta. Družine, pri katerih je opazna evolucijska povezanost (sorodnost primarne strukture okoli aktivnega mesta in terciarne strukture), so združene v klane. Ker imajo pri tej razvrstitvi evolucijska in strukturna podobnost ter katalitski mehanizem delovanja prednost pred substratno specifičnostjo, lahko najdemo v isti družini tako encime z endo- kot z eksopeptidazno aktivnostjo ter celo proteine, ki ne kažejo peptidazne aktivnosti (Barrett in sod., 2004).

Preglednica 2: Razvrstitev proteaz glede na mehanizem katalize (Barrett in sod., 2004)

Skupina proteaz	Število družin v skupini
Serinske proteaze	45
Cisteinske proteaze	72
Metaloproteaze	56
Aspartatne proteaze	14
Treoninske	5
Glutaminske	1
Proteaze z neznanim katalitičnim delovanjem	10

2.3.2.1 Serinske proteaze

Serinske proteaze (encimi, ki imajo v aktivnem mestu serinski ostanek) so v rastlinah med vsemi proteolitičnimi encimi najštevilčnejše oz. tvorijo največjo družino proteaz pri rastlinah (Schaller, 2004). Med serinske proteaze sodijo tako eksoso- kot endopeptidaze (Barrett in Rawlings, 1995). Trenutno je znanih 13 klanov in več kot 70 družin serinskih proteaz, ki so vpisane v bazi podatkov MEROPS (Rawlings in sod., 2008). 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 sekvence so odkrili v več rastlinskih genomih, med drugim pri navadnem repnjakovcu *Arabidopsis thaliana* in rižu *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-terminalala cepi alanin (Frere in Van Beeumen, 2004). Osnovni mehanizem delovanja serinskih proteaz vključuje prenos acilnega dela substrata k funkcionalni skupini encima (lastnost, ki jo imajo tudi druge transferaze). Dva osnovna koraka katalize vključujeta tvorbo estra med kisikovim atomom serina in acilnim delom substrata. Nastane tetraedrični intermediat in se sprosti amino del substrata. V drugem koraku voda napade acilno-encimski intermediat, ki razpade. Pri tem sprosti kisel produkt in regenerira osnovno encimsko obliko (Antão in Malcata, 2005).

Serinske proteaze so vpletene so v številne procese regulacije razvoja rastline in obrambnih odgovorov (Adam in Clarke, 2002; Palma in sod., 2002; Schaller, 2004), vendar funkcija in regulacija rastlinskih proteaz še nista dobro raziskani zaradi nepoznavanja njihovih fizioloških substratov.

2.3.2.2 Cisteinske proteaze

Cisteinske proteaze prihajajo iz različnih evolucijskih poti, razdeljene pa so v šest klanov z dvema podklanoma (Rawlings in sod., 2008). 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 (Rogers in sod., 1985).

Prva peptidaza, ki so jo dejansko določili kot cisteinsko, je papain, široko specifična cisteinska proteaza, ki je ena najbolj pogosto uporabljenih encimov v različnih industrijah (Sathish in sod., 2009). Papain spada v poddružino CA1, ki sicer vsebuje večinoma

endopeptidaze, sem pa uvrščamo tudi najbolj poznano rastlinsko aminopeptidazo aleurain iz klana CA, ki vsebuje več kot 20 družin (Polgar, 2004). V poddružino CA1 uvrščajo tudi cisteinsko proteazo (HvCP3), ki je bila raziskana v zelenih listih ječmena (*Hordeum vulgare* L.) (Watanabe in sod., 2009), OsCP iz riže (*Oryza sativa*) (Tian in sod., 2009), SPCP1 iz starih listov sladkega krompirja (*Ipomoea batatas*) (Chen in sod., 2009), AtGC1 iz navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) (Ludidi in sod., 2006), BCP15 iz oljne ogrščice (*Brassica napus*) (Stroher in sod. 1997), NtCP56 iz navadnega tobaka (*Nicotiana tabacum*) (Zhang in sod., 2009), cisteinsko proteazo iz dlakavega bombaževca (*Gossypium hirsutum*) (Shen in sod., 2004), iz trnate meteljke (*Medicago truncatula*) (Sheokand in sod., 2005), iz bele detelje (*Trifolium repens*) (Asp in sod., 2004), iz črne jelše (*Alnus glutinosa*), iz grahovca (*Astragalus sinicus*), iz korenja (*Daucus carota*), iz holandske perunike (*Iris hollandica*) in iz ricinusa (*Ricinus communis*) (Chen in sod., 2009).

2.3.2.3 Metaloproteaze

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

Metalopeptidaze so razdeljene v več klanov in mnogo družin, vendar so aminopeptidaze našli samo v nekaterih (preglednica 3).

Preglednica 3: Klani in družine metalopeptidaz, ki vsebujejo aminopeptidaze (Rawlings in sod., 2008)

Klan	Družina	Karakteristični primeri	Primeri rastlin v katerih se nahajajo
MA(E)	M1	Aminopeptidaza N (<i>Homo sapiens</i>)	<i>Oryza sativa, Medicago trunculata, Arabidopsis thaliana</i>
	M61	Glicin-aminopeptidaza (<i>Spingomonas capsulata</i>)	/
MF	M17	Levcin-aminopeptidaza (<i>Bos taurus</i>)	<i>Hordeum vulgare, Solanum Tuberosum Arabidopsis thaliana</i>
MG	M24	Metionin-aminopeptidaza tip 1 (<i>Escherichia coli</i>)	<i>Oryza sativa, Lycopersicon esculentum, Arabidopsis thaliana</i>
MH	M18	Aminopeptidaza É (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<i>Oryza sativa, Medicago trunculata, Arabidopsis thaliana</i>
	M28	Aminopeptidaza (<i>Streptomyces griseus</i>)	<i>Oryza sativa, Arabidopsis thaliana</i>
	M42	Glutamin-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>

2.3.3 Proteaze in sušni stres

Pri odzivu na vodni stres so poročali o povišanju nekaterih proteolitičnih aktivnosti in izražanju genov za domnevne proteaze (Ingram in Bartels, 1996). Najpogosteje poročajo o cisteinskih proteazah, za katere se je pokazalo, da jih inducirata suša in povišana slanost (Stroher in sod., 1997; Harrak in sod., 2001; Seki in sod.; 2002, Martinez in sod., 2007). Pri fižolu (*Phaseolus vulgaris*) in pri stročnici *Vigna unguiculata* so pri odzivu na sušo ugotovili povečano izražanje gena in povečano aktivnost aspartatne proteaze (Cruz de Carvalho in sod., 2001). Pri paradižniku (*Lycopersicon esculentum*) so ugotovili povisano aktivnost levcinske aminopeptidaze pri odzivu na pomankanje vode, slanost in pri poškodbah rastline (Chao in sod., 1999). Pri pšenici (*Triticum aestivum*) prav tako poročajo o povečanju proteazne aktivnosti (Srivalli, 1998; Miazek in Zagdanska, 2008; Simova-Stoilova in sod., 2009). V listih brazilske sorte *Phaseolus vulgaris* se aktivnost na azokazein v kislem območju pH, ki so jo pripisali serinskim proteazam, zmanjša pod vplivom pomankanja vode (Cruz de Carvalho, 2001). Hieng in sod. (2004) so v listih fižola (*Phaseolus vulgaris*) sort Starozagorski čern, Zorin in Tiber, izpostavljenim suši, s testi encimske aktivnosti in inhibicije odkrili tri serinske proteaze (SP) z relativnimi molekulskimi masami 65, 95 in 25 kDa. Aktivnosti dveh se je v pogojih pomankanja vode povečala, aktivnost SP z molekulsko maso 65 kDa pa se je povečala v občutljivih sortah, ne pa v odporni sorti (Tiber). V steblu zrnate stročnice *Lupinus albus* L. so z uporabo

dvodimenzionalne elektroforeze odkrili serinsko proteazo subtilizinskega tipa, katere izražanje se je že po treh dneh pomanjkanja vode povečala, medtem ko do sprememb v vodnem statusu rastline ni prišlo (Pinheiro in sod., 2005).

2.4 CIMOGRAFIJA

Cimografija je preprosta in občutljiva dvostopenjska tehnika za ločevanje in identifikacijo encimov v encimsko aktivnih bioloških vzorcih, ki je bila uvedena pred več kot 20 leti (Heussen in Dowdle, 1980). Vključuje ločevanje proteinov z elektroforezo, ki ji sledi analiza encimskih aktivnosti v gelu. Določene prednosti cimografije pred običajnimi analizami, kot so ocena števila encimov z določeno aktivnostjo v neočiščenih ekstraktih in ocena molekulske mase ter izoelektrične točke ustreznih encimov in njihovih izoform, so pomembne pri identifikaciji in spremeljanju specifičnih in nespecifičnih aktivnosti v kompleksnih bioloških in kliničnih vzorcih ter načrtovanju čiščenja oz. izolacije encimov (Kaberdin in McDowall, 2003).

2.4.1 Cimografija s proteinskimi substrati

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

Poceni in komercialno dostopni proteini kot so želatina, kazein, goveji serumski albumin ali hemoglobin so najpogosteji substrati za zaznavo elektroforetsko ločenih proteaz. Ločene proteaze lahko detektiramo tudi tako, da po prenosu hidrolizirajo substrat v novem matriku (če je protein vključen v indikatorski gel ali fiksiran na trdno membrano). Čeprav proteina, kot sta želatina in kazein nista naravna substrata za večino proteaz, sta uporabna

za elektroforetsko karakterizacijo proteolitičnih encimov v velikem številu bioloških vzorcev (Michaud, 1998; Frederiks in Mook, 2004).

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

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

2.4.2 Cimografija s sintetičnimi substrati

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

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

Na karboksi- konec so dodane skupine, ki dajo substratu večinoma kromogeno ali fluorogeno lastnost. Najpogostejsi med kromogenimi substituenti je 4-nitroanilid (pNA), med fluorogenimi substituenti pa 7-amino-4-metilkumarin (AMC). Substituent, ki je lahko kromogen ali fluorogen, odvisno od postopka, ki ga uporabimo za zaznavo aktivnosti je 2-naftilamid (β NA) (Sarah in sod., 1989).

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

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

Pri preučevanju aminopeptidaz so večino raziskav naredili na levcinskih aminopeptidazah iz živalskih in rastlinskih tkiv (Matsui in sod., 2006). Sprva so za substrat uporabljali aminokisline, označene z β -naftilaminom, vendar so jih kasneje zaradi toksičnosti zamenjali z aminokislinami, označenimi s 4-nitroanilidi (Hou in sod., 1999; Božić in Vujčić, 2005). Pri obeh tehnikah je potrebno nadaljnje procesiranje za zaznavo aminopeptidaz, zaradi česar pride do ireverzibilne izgube encimske aktivnosti. Redko so uporabili tudi aminokisline, označene z AMC, pri katerih se po hidrolizi amidne vezi sprosti fluorescentni AMC (Konopka in Zakharova, 2002). Takšni substrati so občutljivejši in omogočajo neposredno analizo brez fiksacije produkta. Budič in sod. (2009) so metodo podrobno razdelali za določanje aminopeptidaz in optimizirali pogoje pod katerimi se cimografija lahko uporabi za kvantitativno določanje AP v ekstraktih. Ker substrat dodamo po elektroforezi, lahko isti gel analiziramo z različnimi substrati. S sintetičnimi substrati lahko po elektroforezi zaznamo specifične skupine proteaz v surovih in slabo karakteriziranih ekstraktih, hitro določimo njihovo specifičnost za substrat, učinkovito zaznamo eksopeptidaze in se izognemo motnjam, ki jih substrat povzroča med samo elektroforezo (Budič in sod., 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Rastlinski material

Aminopeptidazno aktivnost smo določali v listih fižola *Phaseolus vulgaris* L. ssp *vulgaris* var *Nanus Aschers*, ki spada v družino *Fabaceae*. Uporabili smo sorto Zorin, ki se goji za zrnje in spada med nizki fižol. Opazovali smo vpliv pomanjkanja vode na fižol, gojen pod kontroliranimi pogoji. Za primerjavo aminopeptidazne aktivnosti v drugih vrstah fižola smo uporabili tudi liste sorte Tiber in Češnjevec ter razvijajoče se kalčke limskega fižola (*Phaseolus lunatus*), turškega fižola (*Phaseolus coccineus*) in indijskega fižola (*Vigna unguiculata*), ki ravno tako spadajo v družino *Fabaceae*. Semena vseh fižolov, razen indijskega, smo dobili na Kmetijskem inštitutu v Ljubljani. Kalčke fižole *Vigna unguiculata* pa smo dobili iz Laboratorija za molekularno ekofiziologijo, Univerza Pariz Vzhod-Pariz 12 (Laboratoire d'Ecophysiologie Moléculaire, Univ Paris Est-Paris 12).

3.1.2 Bakterijske kulture

Frakcije bakterijskih kultur za preverjanje uporabnosti cimografije v ekstraktih mikrobiološkega izvora so nam pripravili na Biotehniški fakulteti, na oddelku za Zootehniko na Rodici. Uporabili smo frakcije bakterijskih kultur *Lactobacillus gasseri* K7, *Streptococcus thermophilus* S4, *Lactobacillus helveticus*, *Escherichia coli faecium* BM 3/2 in *Escherichia coli faecalis* 25, ki so jih izolirali iz jogurta, sira in mesa.

3.1.3 Kemikalije

Proizvajalci substratov in največkrat uporabljenih kemikalij so zbrani v razpredelnici, ostale uporabljeni kemikaliji pa so večinoma proizvajalcev Merck (Nemčija), Carlo Erba (Italija) in Serva (Nemčija).

Preglednica 4: Proizvajalci največkrat uporabljenih kemikalij

β - merkaptoetanol (reducent)	Serva, Nemčija
APS	Serva, Nemčija
DTT (reducent)	Fermentas, Nemčija
Glicerol	Carlo Erba, Italija
Goveji serumski albumin (BSA)	Sigma, ZDA
Izopropanol	Carlo Erba, Italija
PVP	Sigma, ZDA
Reagent Bio-Rad	Bio-Rad, ZDA
Substrat Ala-AMC	Bachem, Nemčija
Substrat Leu-AMC	Bachem, Nemčija
Substrat Met-AMC	Bachem, Nemčija
Substrat Phe-AMC	Bachem, Nemčija
Substrat Z-Arg-AMC	Bachem, Nemčija
TEMED	Merck, Nemčija
Tris	Serva, Nemčija

3.1.4 Raztopine

Preglednica 5: Uporabljeni pufri

<p><u>Pufer za ekstrakcijo</u> 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 mM β-merkaptoetanol</p>	<p><u>Pufer za ločevalni gel</u> 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8</p>	<p><u>Pufer za koncentrirni gel</u> 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8</p>
<p><u>Pufer za nativno elektroforezo (1L)</u> 29 g Tris base, pH 8,3 144 g glicin dH₂O do 1L</p>	<p><u>Nanašalni pufer za nativno elektroforezo</u> 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (2,5 mL) glicerol (2 ml) bromfenol modro (malo) dH₂O (5,5 mL)</p>	

3.1.5 Aparature

3.1.5.1 Spektrofotometer

Za določanje proteinov smo uporabljali spektrofotometer znamke PerkinElmer Lambda Bio in kvarčne kivete širine 1 cm.

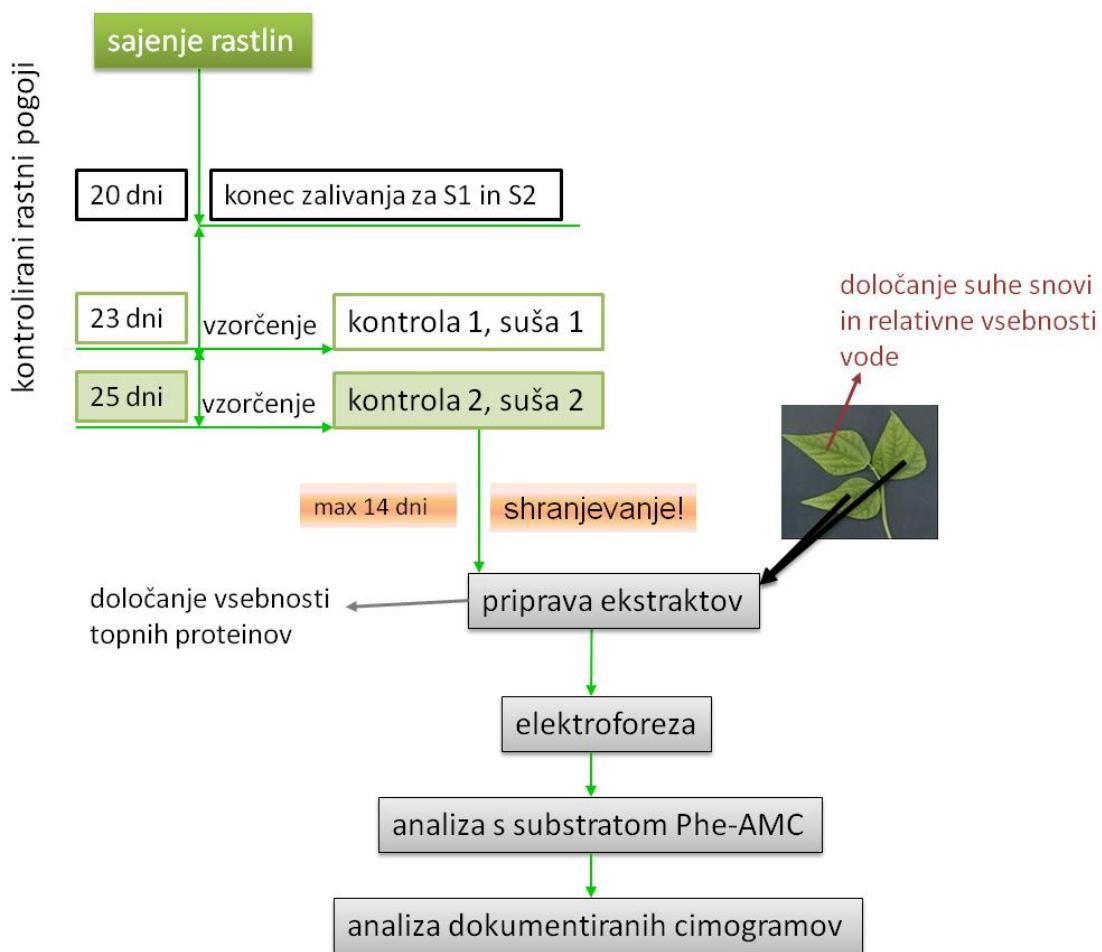
3.1.5.2 Aparatura za slikanje (dokumentiranje) gelov

Gel smo analizirali na UV transluminatorju pri valovni dolžini 365 nm in ga dokumentirali s sistemom UVItec (UVItec Limited, Velika Britanija).

3.1.5.3 Elektroforezni sistem

Elektroforezo smo izvajali z aparaturom proizvajalca Bio-Rad (Mini-protean II, Bio-Rad, Hercules, CA, ZDA).

3.2 METODE



Slika 3: Shema eksperimenta

3.2.1 Vzgoja fižola

3.2.1.1 Priprava semen za kalitev

Izbrali smo morfološko podobna semena in jih sterilizirali v razredčeni (destilirana voda: NaOCl = 1:1) raztopini NaOCl (Šampionka Renče, Slovenija). Po petih minutah smo semena dobro sprali s sterilno destilirano vodo, nato pa smo jih dve uri pustili v čaši sterilne destilirane vode, da so semena nabreknila.

3.2.1.2 Priprava petrijevke za kalitev semen

Dno petrijevke smo prekrili z debelo plastjo bombažne vate, nanjo pa položili filter papir. Nato smo vse skupaj navlažili s sterilizirano destilirano vodo, pokrili s pokrovom petrijevke, ovili z alu folijo in avtoklavirali.

3.2.1.3 Kalitev semen

S predhodno ožgano pinceto smo nabreknjena semena iz čaše prestavili na filtrirni papir v sterilne petrijevke, dolili sterilizirano destilirano vodo in jih 4 dni pustili kaliti v temi pri temperaturi 25 °C.

3.2.1.4 Sajenje rastlin

Približno enako razvite kalčke smo posadili v plastične lončke, napolnjene z mešanico vermiculita in šote (črna šota, bela šota, mivka - Asef zemlja za sejanje in pikiranje, ki je vsebovala hranila, ki oskrbujejo rastline od 4 do 6 tednov po sajenju) v razmerju 1:1 ter zalili do enake teže lončkov.

3.1.1.5 Rastni pogoji

V rastni komori na Odseku za biotehnologijo Inštituta Jožef Stefan – v Ljubljani smo ustvarili naslednje pogoje: rastline so bile dnevno 16 ur osvetljene s tokom fotonov $500 \mu\text{mol/m}^2$, pri dnevni temperaturi 24 - 25 °C, nočni temperaturi 19 - 21 °C in relativni vlažnosti zraka (RV) 80-90 % na začetku eksperimenta. Vsak dan zjutraj smo rastline zalivali z enakim volumnom vode. Po 20 dneh smo polovico rastlin prenehali zalivati, RV zraka v komori uravnali na 30 - 40 % in dnevno temperaturo na 27 - 29 °C.



Slika 4: 5 rastlin kontrole 1 (K1), katerih liste smo uporabili za ekstrakcijo encimov



Slika 5: 5 rastlin suše 1 (S1), katerih liste smo uporabili za ekstrakcijo encimov

3.1.1.6 Vzorčenje

Tri dni potem, ko smo polovico rastlin prenehali zalivati, smo pobrali liste 5 zalivanih (kontrola 1 – K1) in 5 rastlin, ki so bile izpostavljene pomanjkanju vode (suša 1 – S1). Pet dni po prenehanju zalivanja smo pobrali liste 5 zalivanih (kontrola 2 – K2) in 5 rastlin, ki so bile izpostavljene pomanjkanju vode (suša 2 – S2). Vsaki rastlini smo odrezali prvi, drugi in tretji sestavljen list (slika 2), srednji listič smo zaprli v plastično epruveto in ga uporabili za določanje suhe snovi in relativne vsebnosti vode, stranska lističa, ki smo ju kasneje uporabili za pripravo ekstraktov, pa smo zapakirali v folijo, na ledu prenesli v merilnico in najkasneje po 10 minutah stehtali, jih takoj zamrznili v tekočem dušiku ter shranili v zmrzovalniku na -70 °C.

3.1.1.7 Določanje vsebnosti vode

Vsebnost vode smo določali v srednjem lističu sestavljenega lista. Listič smo odrezali pri korenju, ga takoj zaprli v predhodno stehtano plastično epruveto z zamaškom in stehtali ter tako določili maso svežih fižolovih listov (s.m.). Epruvete z lističem smo nato odprli in jih sušili pri 80 °C 24 ur do konstantne mase ter mu tako določili suho snov (s.s.). Vsebnost vode smo izračunali s pomočjo enačbe 1.

$$VV = (s.m. - s.s.) / s.m. \times 100 [\%] \quad \dots (1)$$

3.1.1.8 Določanje relativne vsebnosti vode

Relativno vsebnost vode smo določili tako, da smo stehtan (s.m.) srednji listič sestavljenega lista razgrnili v petrijevki s filtrirnim papirjem namočenim z destilirano vodo in ga tako pustili 24h. Po tem času smo listič stehtali in tako določili maso nasičenih listov (n.m.). Nato smo listič zopet zaprli v epruveto in ga sušili v sušilniku na 80 °C 24h, ga

stehtali in s tem določili suho snov (s.s.). Relativno vsebnost vode smo izračunali z enačbo 2.

$$RVV = (s.m. - s.s.) / (n.m - s.s.) \times 100 [\%] \quad \dots (2)$$

3.2.2 Homogenizacija rastlinskega materiala in priprava ekstraktov

Proteine, ki jih želimo izolirati, moramo najprej izločiti iz celic ali celičnih komponent v topni obliki.

Postopek priprave ekstrakta iz fižolovih listov:

V ohlajeno (na -20°C) terilnico smo nalili tekoči dušik, počakali približno 20 sekund in vanjo stresli stehtane in zmrzljene zunanje lističe sestavljenega lista fižola (slika), prelili s tekočim dušikom in trli 4 minute, da smo dobili zelo fin prašek. Prašek smo prenesli v drugo ohlajeno (na 4°C) terilnico, mu dodali polivinilpirolidon (PVP) (2 g PVP / 1g s.s. listov) in vse skupaj dobro premešali. Nato smo dodali ohlajen ekstrakcijski pufer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, v katerega smo predhodno odpipetirali 7 μL reducenta β -merkaptoetanola/10 ml pufra) in vse skupaj pretlačili s pestičem. Homogenat smo filtrirali skozi lij, na katerem sta bili dve plasti pleničnih predlog (Tosama). Za ekstrakcijo smo uporabili 40 mL pufra/g s.s. listov. Dobljeni ekstrakt smo iz graduiranih epruvet prelili v mikrocentrifugirke in centrifugirali 15 minut pri 13200 g v centrifugi, ohlajeni na 4°C . Po centrifugiranju smo supernatant ločili od oborine, alikvotirali v več mikrocentrifugirk za nadaljnjo uporabo, zamrznili v tekočem dušiku ter ga shranili na -70°C .

3.2.3 Optimizacija stabilnosti ekstraktov

Da bi preverili, kako dolgo bo ekstrakt obstojen za nadaljnje delo oz. kako dolgo aminopeptidaze obdržijo svojo aktivnost, smo ekstrahirali liste fižola (suša in kontrola skupaj) in dobljeni ekstrakt razdelili na dva dela. Enemu delu smo dodali vodo in drugemu glicerol v razmerju 1:1 in ju uporabili za določitev aktivnosti aminopeptidaz v ekstraktu z vodo in z glicerolom v okviru enega meseca na temperaturi -20°C in -70°C . Po petih, devetih in po štirinajstih dneh ter po enem mesecu smo jemali vzorce iz ekstrakta z vodo in iz ekstrakta z glicerolom, ki smo ju hranili na -20°C in -70°C , ter ju takoj analizirali na fenilalanin-aminopeptidazno aktivnost s cimografijo.

3.2.4 Določanje vsebnosti proteinov

Uporabljali smo enostavno in natančno metodo za kvantitativno določanje proteinov (Bradford, 1976) z reagentom proizvajalca Bio-Rad. Metoda temelji na vezavi barvila Coomasie Brilliant Blue G-250 pri nizkem pH na bazične in aromatske aminokislinske ostanke proteinov v vzorcu, predvsem na arginin, manj na lizin ali histidin (Drobnič-Košorok, 1997). Pri tem pride do premika valovne dolžine absorpcijskega maksimuma barvila od 465 nm na 595 nm. Kompleks barvilo-protein, ki nastane med reakcijo, je obstojen le v določenem časovnem intervalu (30 minut), mi pa smo meritve naredili 10 minut po dodatku reagenta.

Postopek:

V vsakem ekstraktu smo določali vsebnost proteinov v treh paralelkah. Vzorec smo pred določanjem odtalili in ga centrifugirali 15 minut pri 13200g na 4 °C. Za vsak vzorec smo potrebovali tri epruvete, katere smo napolnili s 750 µL destilirane vode in 50 µL ustrezeno razredčenega vzorca (redčili smo z ekstrakcijskim pufrom). Nato smo dodali 200 µL Bio-Rad koncentriranega barvila (barvilo Coomasie Brilliant Blue, 55 % fosforna kislina in 15 % etanol) proizvajalca Bio-Rad in dobro premešali na vrtičniku. Po 10 minutah inkubacije na sobni temperaturi smo izmerili absorbanco pri 595 nm proti slepemu vzorcu, kjer je bila namesto ekstrakta destilirana voda.

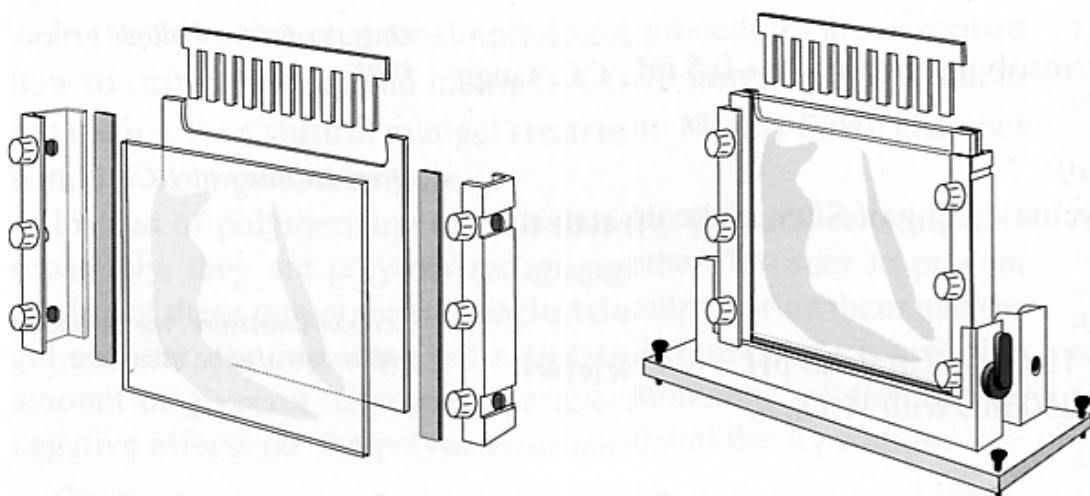
Koncentracijo proteinov v vzorcu (mg/mL) smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo naredili z raztopinami govejega serumskega albumina (BSA) s koncentracijami v območju od 1 do 16 µg/mL. Pri izračunu vsebnosti proteinov v listih, ki smo jih izrazili kot maso proteinov na suho snov listov, smo upoštevali način priprave ekstrakta (redčitev) in vsebnost vode v listih pred izolacijo.

3.2.5 Cimografija

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

3.2.5.1 Priprava gela za elektroforezo

Na nosilec za vlivanje smo vpeli dve dobro očiščeni stekelci. Najprej smo pripravili ločevalni gel: v epruveti smo zmešali destilirano vodo, pufer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8) in akrilamid/bis, nato smo dodali APS in TEMED ter dobro premešali in mešanico odpipetirali po robu malega stekelca med obe stekleni plošči do tri četrtine višine plošč. Pri tem smo morali biti pazljivi, da med pipetiranjem v tekočino niso prišli mehurčki. Na vrh ulitega ločevalnega gela smo nalili izopropanol, da se je izravnala linija gela. Gel smo pustili od 20 do 45 minut, da se je strdil. Nato smo izopropanol odlili, sprali z destilirano vodo in s filter papirjem popivnali višek vode ob robovih stekelc. Pripravili smo mešanico za koncentrirni gel: v epruveti smo zmešali destilirano vodo, pufer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8) in akrilamid/bis, dobro premešali ter dodali APS in TEMED, zopet dobro premešali in vlili nad ločevalni gel. V koncentrirni gel smo takoj namestili glavniček in pazili, da se pod zobce glavnička niso ujeli mehurčki zraka. Počakali smo, da je gel polimeriziral in bil tako pripravljen za elektroforezo.



Slika 6: Način vpenjanja dveh stekelc za vlivanje gelčkov na nosilec in vstavitev glavnička po dodatu koncentrirnega gela.

Preglednica 6: Uporabljeni kemikaliji za pripravo koncentrirnega in ločevalnega gela

	Koncentrirni gel	Ločevalni gel
	Pufer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 4 %	Pufer: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 10 %
Destilirana voda	3,218 mL	4,985 mL
Pufer	1,250 mL	2,500 mL
Akrilamid / bis	0,500 mL	2,500 mL
APS	0,025 mL	0,050 mL
TEMED	0,008 mL	0,015 mL
Končni volumen	5,000 mL	10,000 mL

10 mL mešanice za ločevalni gel in 5 mL mešanice za koncentrirni gel zadošča za 2 gela debeline 0,75 mm.

3.2.5.2 Nativna elektroforeza

Vzorce smo predhodno centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 13200g, nato smo jih obarvali z enakim volumnom nanašalnega pufra in dobro premešali. Vzorce smo nato nanašali v žepke za nanos vzorca na vrhu gela. V elektroforetsko posodo smo nalili pufer s pH 8,3, pri katerem je večina proteinov negativno nabita in potujejo proti anodi. Elektrodi smo priklopili na vir napetosti 100V in tok 30mA/gel. V električnem polju vsak protein potuje z njemu lastno elektroforetsko mobilnostjo, vendar počasneje od bromfenolmodrega. Barvilo nam tako kaže fronto. Po približno 45 minutah je barvilo zapustilo gel, elektroforezo pa

smo prekinili po 60 minutah, da so se posamezne proteaze med seboj dovolj dobro ločile za lažjo analizo gela z računalniškim programom.

3.2.5.3 Analiza nativnih poliakrilamidnih gelov s fluorescentnim substratom za aminopeptidaze

Po izteku elektroforeze smo gel sprali z destilirano vodo in ga dali v kadičko s 50 – 100 mL destilirane vode in stresali pri 50 obratih na minuto pri sobni temperaturi. Po 5 minutah smo gel prestavili v 30 mL reakcijskega pufra (0,25 M Tris-HCl, pH 7) ter dodali 30 µL 100 mM izbranega substrata (28,53 mg substrata v 1 mL DMSO). V posameznih eksperimentih smo uporabili substrate Phe-AMC, Ala-AMC, Leu-AMC in Met-AMC. Gel smo nato 10 minut stresali v inkubatorju pri temperaturi 23 °C. Po končani inkubaciji smo gel prenesli v UV transiluminator in presvetlili s svetlobo valovne dolžine 365, pri kateri absorbira produkt hidrolize AMC, ki nato fluorescira svetlobo večjih valovnih dolžin ($\text{fl.}_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$). Podatke smo zajemali z UVItec dokumentacijskim sistemom pri različnih časih osvetlitve (240, 520, 1000, 1520 in 2000 ms). Ostalih nastavitev fotoaparata med meritvami nismo spremajali.

3.2.5.4 Analiza nativnih poliakrilamidnih gelov s fluorescentnim substratom za aminopeptidaze in z reducentom

Pri ugotavljanju vpliva reducenta DTT na fenilalanin-aminopeptidazno aktivnost smo postopali enako kot pri analizi gelov brez reducenta (3.2.5.3), le da smo tu v reakcijski pufer, poleg substrata, dodali tudi 5mM reducent DTT (77,1 mg v 100 mL pufra).

3.2.5.5 Analiza dokumentiranih cimogramov

Slikovna analiza gela po elektroforezi je bila opravljena z uporabo javno dostopnega programa ImageJ. Na dokumentiranih cimogramih so svetle lise predstavljale področja encimske aktivnosti. Slike smo analizirali na osebnem računalniku s programom ImageJ. To je program, ki ga je razvil Wayne Rasband, National Institutes of Health in je na voljo na spletni strani <http://rsb.info.nih.gov/ij>.

Postopek:

Površino vsake lise smo zajeli z ustreznim pravokotnikom in izvedli integracijo. Posamezen integral je predstavljal produkt površine pravokotnika in povprečne intenzitete osvetlitve na območju pravokotnika. Intenziteto posamezne lise smo dobili tako, da smo od izmerjenega integrala za določeno liso odšteli integral ozadja, določen s pravokotnikom enake površine. Integral ozadja smo izračunali kot povprečje petih meritev na določenem cimogramu.

4 REZULTATI

Večji del diplomske naloge smo posvetili študiju aminopeptidazne aktivnosti v ekstraktih listov fižola, saj je bil namen naloge ovrednotiti vpliv pomanjkanja vode na fenilalanin-aminopeptidazno aktivnost v listih te rastline z uporabo cimografije. Le-to smo izvedli s fluorescenčno označenim fenilalaninom po nativni elektroforezi. Da bi dobili čim bolj točne in ponovljive rezultate smo najprej optimizirali metode vzorčenja listov in shranjevanja ekstraktov aminopeptidaz.

4.1 OPTIMIZACIJA VZORČENJA IN SHRANJEVANJA

4.1.1 Vpliv vzorčenja na določanje mase svežih listov fižola

Pri študiju vpliva suše na aminopeptidazno aktivnost je bilo potrebno zbrati veliko število vzorcev (listov). Ker natančna tehnica ni bila v bližini rastne komore in rastlin zaradi možnosti poškodb nismo že zeleli prenašati, smo morali ugotoviti, kateri je najboljši način vzorčenja pri naših pogojih. Pri vzorčenju se težko izognemo izgubam vode iz listov, saj do izgub prihaja že takoj, ko rastlino poškodujemo oziroma ji odrežemo liste. To lahko privede do napak v določitvi vsebnosti vode in posledično napačnim izračunom proteinov v vzorcu. Poleg tega predolg časovni zamik med odvzemom lista z rastline in njegovo zamrznitvijo v tekočem dušiku lahko sproži nezaželene spremembe v metabolizmu lista. S poskusom smo preverili, kateri način vzorčenja je najbolj primeren in ali je takojšnje zmrzovanje listov v tekočem dušiku, ki bi oteževalo kasnejše določanje mase vzorca, nujno za ohranjanje vlage.

Vzorčili smo na dva načina in primerjali spremembo mase svežih listov (s.m.). V prvem poskusu smo najprej stehtali štiri liste, jih dali na led za približno 10 minut (čas, ki smo ga potrebovali, da smo liste rastlin prenesli iz rastne komore do natančne tehnice), zopet stehtali, dali v tekoči dušik in še enkrat stehtali. V drugem poskusu pa smo liste najprej stehtali, takoj dali v tekoči dušik, stehtali in počakali, da se je masa ustalila, ponovno dali v tekoči dušik, odnesli v zmrzovalnik na -70°C in po 15 minutah ponovno stehtali. Določili smo spremembo mase pri obeh poskusih in se na podlagi le-te odločili, kako bomo vzorčili. Podatki merjenj so v preglednici 7a za prvi poskus in 7b za drugi poskus.

Preglednica 7a: Masa svežih fižolovih listov in sprememba le-te pri različnih postopkih vzorčenja (led – led + N_2)

LIST	s.m. [g]	s.m.+led [g]	Δ mase [%]	s.m.+led+ N_2 [g]	Δ mase [%]
List 1	0,691	0,685	-0,9	0,688	-0,4
List 2	0,505	0,497	-1,6	0,500	-1,0
List 3	1,133	1,128	-0,4	1,134	+0,1
List 4	0,999	0,992	-0,7	1,001	+0,2

Preglednica 7b: Masa svežih fižolovih listov in spremembe le-te pri različnih postopkih vzorčenja ($N_2 - N_2 +$ zmrzovalnik)

LIST	s.m. [g]	s.m. + N_2 [g]	Δ mase [%]	s.m.+ $N_2+zmrzovalnik$ [g]	Δ mase [%]
List 1	0,709	0,725	+2,3	0,729	+2,8
List 2	0,814	0,818	+0,5	0,820	+0,7
List 3	0,423	0,426	+0,7	0,429	+1,4

Iz rezultatov je razvidno, da so razlike pri vzorčenju minimalne, in sicer znašajo od - 1,6 % do + 2,8 %.

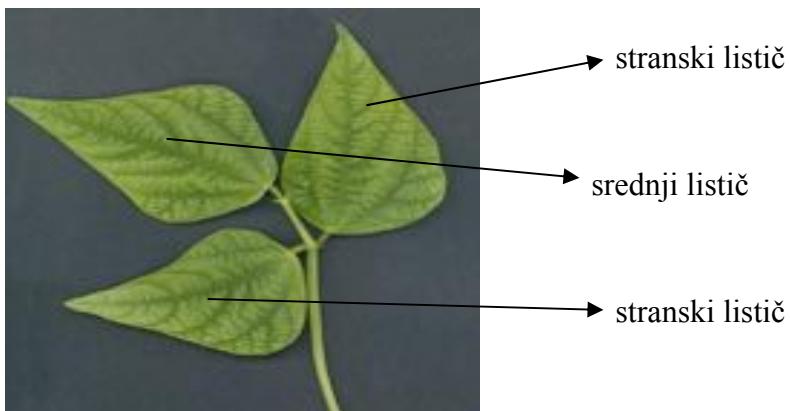
Manjše spremembe mase smo določili pri prvem poskusu, kjer smo list fižola najprej dali za 10 minut na led in šele nato zmrznili v tekočem dušiku, zato smo se pri vzorčenju in shranjevanju rastlin za nadaljnjo uporabo odločili za prvi postopek, ki je tudi bolj enostaven.

4.1.2 Izbira lista za določanje suhe snovi in za ekstrakcijo aminopeptidaz

Listi fižola so sestavljeni iz srednjega lističa in dveh stranskih lističev (slika 7). Posamezne lističe sestavljenih listov smo stehiali in v njih določili vsebnost vode. Ugotovili smo, da med stranskimi in srednjim lističem ni večjih razlik v VV. V vseh primerih je imel srednji listič za približno 0,5 % manjšo VV. Odločili smo se, da bomo za določanje vsebnosti vode vzeli srednji listič, za ekstrakcijo pa oba stranska lističa.

Preglednica 8: Masa svežih fižolovih listov (s.m.) in suhe snovi (s.s.) ter izračun vsebnosti vode (VV) v posameznih listih sestavljenega lista ene rastline

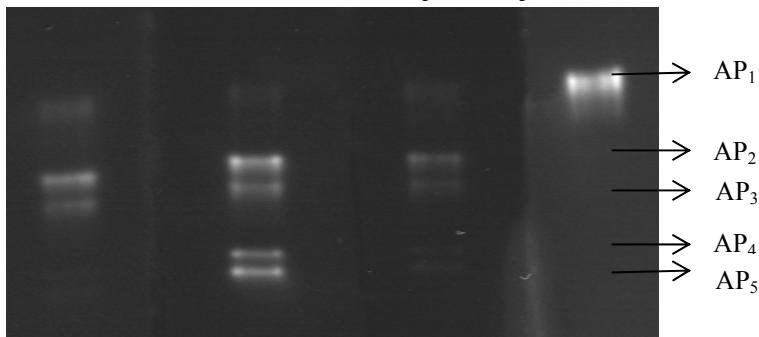
List	s.m. [g]	s.s. [g]	VV [%]
Srednji 1.	0,3163	0,0201	93,65
Stranski 1.	0,2898	0,0165	94,31
Stranski 1.	0,2639	0,0158	94,01
Srednji 2.	0,4238	0,0407	90,40
Stranski 2.	0,3673	0,0341	90,72
Stranski 2.	0,3972	0,0373	90,61
Srednji 3.	0,3275	0,0365	87,63
Stranski 3.	0,2805	0,0347	88,85
Stranski 3.	0,2667	0,0301	88,71



Slika 7: Sestavljen list fižola

4.1.3 Izbira substrata

Namen barvanja z različnimi substrati je bil ugotoviti, s katerim substratom zajamemo čim širši spekter aminopeptidazne aktivnosti, kar lahko na cimogramu opazimo kot večje število svetlih lis. Iz rezultatov, prikazanih na sliki 8, je razvidno, da s substratom Phe - AMC zaznamo pet različnih aminopeptidaznih aktivnosti. Posamezne lise smo označili kot AP₁, AP₂, AP₃, AP₄ in AP₅. Od ostalih uporabljenih substratov smo pet lis opazili še pri Met-AMC in Leu-AMC, vendar imajo vse manjšo intenziteto. Z Ala-AMC smo zaznali le zgornjo liso (AP₁), vendar je imela ta večjo intenziteto kot s preostalimi substratimi. Na osnovi barvanja z različnimi substrati smo se odločili za Phe-AMC, saj s tem substratom zaznamo največ aminopeptidaz oz. izoencimov, z ostalimi substrati pa le nekatere od njih, oziroma so izbrani substrati manj občutljivi.



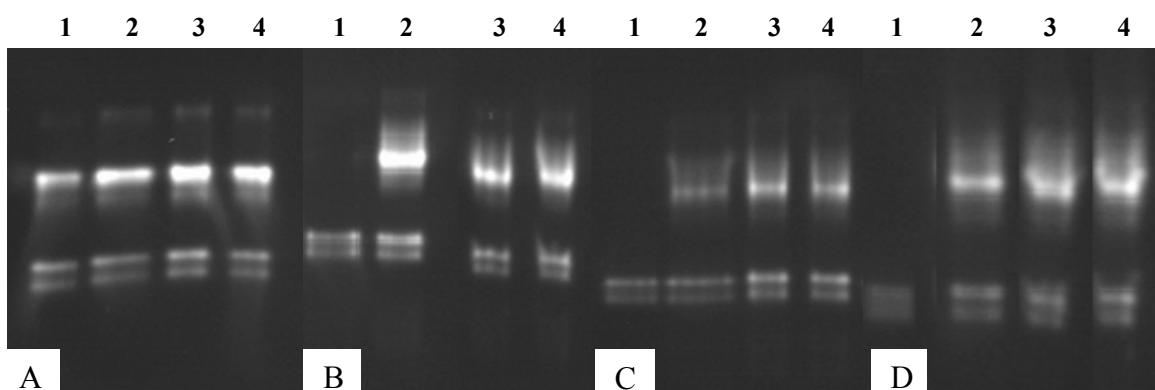
Slika 8: Tipični profil aktivnosti aminopeptidaz po analizi z različnimi substrati. Od leve proti desni si sledijo: Leu-AMC, Phe-AMC, Met-AMC in Ala-AMC. Nanašali smo 8 µL ekstrakta

4.1.4 Vpliv shranjevanja na aminopeptidazno aktivnost

Vedeli smo, da se bo pri postopku izolacije aminopeptidaz pojavila potreba shranjevanja ekstraktov, zato smo s tem eksperimentom žeeli ugotoviti, kako pogoji shranjevanja vplivajo na fenilalanin-aminopeptidazno aktivnost.

Ugotavljali smo, kako dodatek glicerola vpliva shranjevanje ekstraktov pri -20 °C in -70 °C. Vzorce smo shranjevali 5 dni, 9 dni, 14 dni in en mesec, preden smo jih odtalili in analizirali s cimografijo s substratom Phe-AMC.

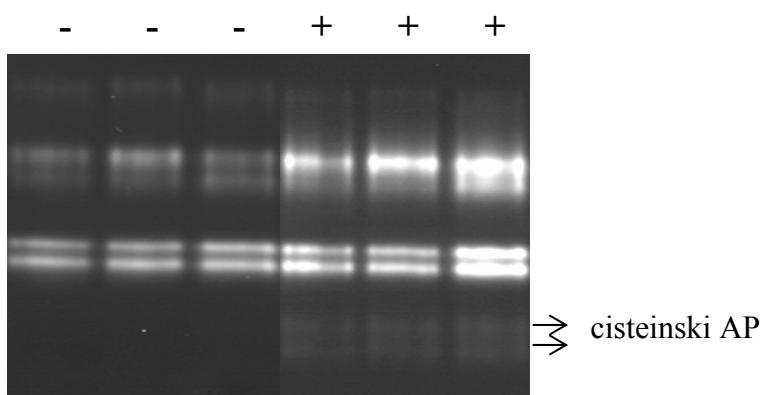
Predvidevali smo, da bo glicerol stabiliziral aminopeptidaze, shranjevanje pa bo boljše pri temperaturi -70°C . Iz rezultatov prikazanih na sliki 10 je razvidno, da v negativnem smislu odstopa predvsem shranjevanje na -20°C , kjer smo že po 5 dneh opazili manjo aktivnost AP₁, AP₂ in AP₃. Po 14 dneh omenjenih aminopeptidaz nismo več določili. Shranjevanje pri -70°C je preprečilo inaktivacijo proteaz, saj po 1 mesecu nismo ugotovili večjih razlik med shranjevanjem v glicerolu, oziroma v primerjavi z začetnim stanjem. Vse vzorce za nadaljnje analize smo shranjevali na -70°C , brez dodanega glicerola.



Slika 9: Vpliv pogojev shranjevanja na aktivnost na substrat Phe-AMC. 1) ekstrakt + voda (-20°C); 2) ekstrakt + voda (-70°C); 3) ekstrakt + glicerol (-20°C); 4) ekstrakt + glicerol (-70°C). Cimogram: A: aktivnost po petih dneh; B: aktivnost po devetih dneh; C: aktivnost po štirinajstih dneh; D: aktivnost po enem mesecu

4.1.5 Vpliv reducenta DTT na fenilalanin-aminopeptidazno aktivnost

Po dodatku reducenta 5 mM DTT v pufer, v katerem smo inkubirali vzorec ekstrakta, smo v kontrolnih in v sušnih rastlinah, poleg 5 aminopeptidaz ugotovili še dve, verjetno cisteinski aminopeptidazi, ki sta potovali pod AP₅ (slika 10), vendar se nismo odločili za uporabo reducenta, saj sta aminopeptidazi na meji detekcije.



Slika 10: Aminopeptidazna aktivnost v ekstraktih listov fižola sorte Zorin, analiziranih s substratom Phe-AMC brez dodatka reducenta (-) in z dodatkom reducenta DTT (+)

4.2 VPLIVI POMANJKANJA VODE

4.2.1 Vsebnost vode (VV) v posameznih listih kontrolnih in sušnih rastlin

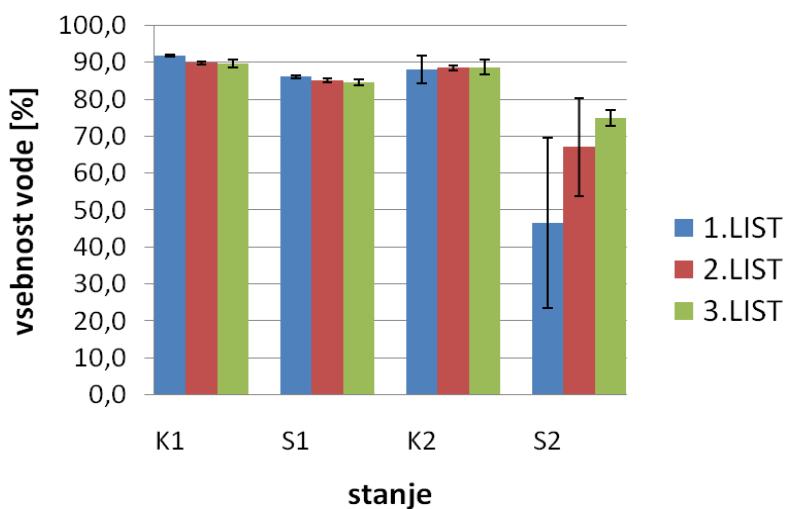
Vsebnost vode smo določali v srednjem lističu sestavljenega lista po postopku, opisanem v točki 3.2.6.

Vsebnost vode se v posameznih listih istega tretmana zelo malo razlikujejo tako v K1 kot tudi v S1, prav tako ni velikih razlik v K2, večje razlike pa smo opazili v S2, kjer je prihajalo tudi do največjih razlik med listi in posameznimi rastlinami (priloga C). Vsebnost vode (VV) v prvih listih S1 rastlin, ki so bile manj časa izpostavljene suši se je zmanjšala za malo več kot 5 % v primerjavi s prvimi K1 listi. VV v drugih listih S1 rastlin je za približno 4,7 % manjša kot v ustreznih kontrolnih listih, v tretjih listih pa se je vsebnost vode zmanjšala za približno 5,2 % v S1 v primerjavi s K1.

Pri rastlinah, ki so bile dalj časa izpostavljene suši (S2) se je VV v prvih sušnih listih zmanjšala za približno 40 % v primerjavi s prvimi listi K2, kar je največje zmanjšanje VV v sušnih rastlinah, ki smo ga določili. VV v drugih listih S2 rastlin je manjša za približno 20 %, VV tretjih listov S2 v primerjavi s tretjimi listi K2 pa je manjša za približno 13 %.

Večje razlike med posameznimi rastlinami in listi v S2 v primerjavi s S1 lahko pripisemo različni sposobnosti posameznih rastlin, da se uprejo relativno močni suši, saj so bili zlasti prvi sestavljeni listi določenih rastlin že zelo posušeni.

Podatki in grafični prikaz vsebnosti vode (VV) v posameznih listih za vsa stanja (K1, S1 in K2 in S2) so, poleg priloge C, podani tudi na sliki 11.



Slika 11: Vsebnost vode (VV) v prvih., drugih in tretjih listih kontrolnih in sušnih rastlin za stanje 1 (K1 in S1) ter za stanje 2 (K2 in S2)

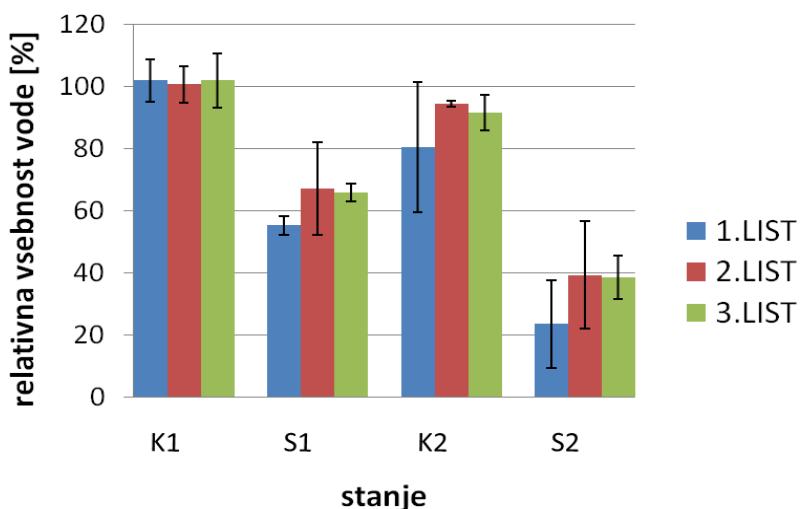
4.2.2 Relativna vsebnost vode (RVV) v posameznih listih kontrolnih in sušnih rastlin

Relativno vsebnost vode (RVV) smo določali v srednjem lističu sestavljenega lista po postopku, opisanem v točki 3.2.7. Podatki in grafični prikaz relativne vsebnosti vode

(RVV) v posameznih listih za vsa stanja (K1, S1 in K2 in S2) so predstavljeni na sliki 12 in v prilogi D.

RVV v prvih lističih sušnih rastlin, ki so bile manj časa izpostavljene suši (S1) se je zmanjšala za približno 46 % v primerjavi s prvimi kontrolnimi listi. RVV v drugih listih S1 rastlin je za približno 33 % manjša kot v ustreznih kontrolnih listih, v tretjih listih pa se je RVV zmanjšala za približno 36 % v S1 v primerjavi s K1 (priloga D).

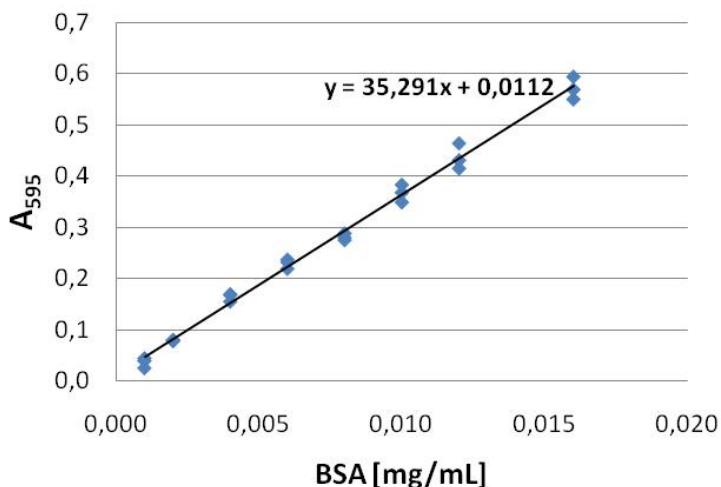
Pri rastlinah, ki so bile dalj časa izpostavljene suši (S2) se je RVV v prvih sušnih listih zmanjšala za približno 57 % v primerjavi s prvimi listi K2, kar je največje zmanjšanje RVV v sušnih rastlinah, ki smo jo določili. RVV v drugih listih S2 rastlin je manjša za približno 55 %, RVV tretjih listov S2 v primerjavi s tretjimi listi K2 pa je manjša za približno 53 %.



Slika 12: Relativna vsebnost vode (RVV) v prvih., drugih in tretjih listih kontrolnih in sušnih rastlin za stanje 1 (K1 in S1) ter za stanje 2 (K2 in S2)

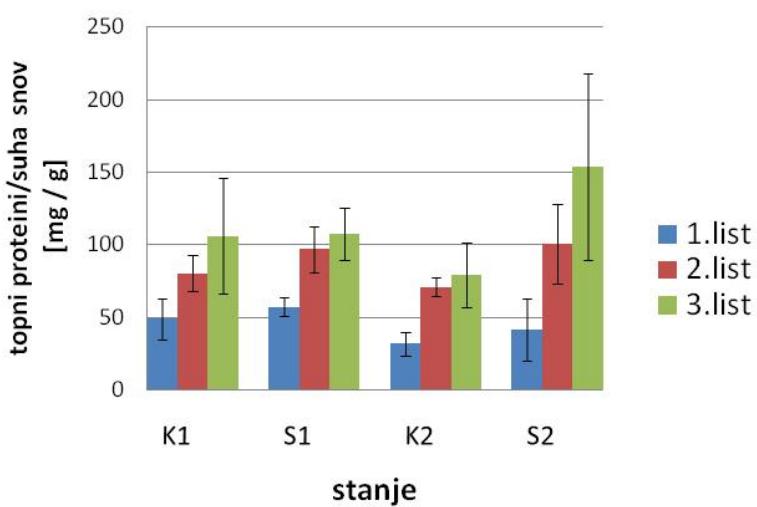
4.2.3 Razmerje med koncentracijo topnih proteinov in suho snovjo

V vsakem ekstraktu smo določili koncentracijo topnih proteinov. Proteine smo določali po metodi Bradford (1976) in njihovo koncentracijo izračunali iz umeritvene krivulje (slika 13). Rezultati meritev koncentracije proteinov so prikazani v prilogi E, izračuni razmerja med vsebnostjo topnih proteinov in suho snovjo pa so grafično prikazani na sliki 14 ter v prilogi F.



Slika 13: Umeritvena krivulja, ki smo jo naredili z raztopinami govejega serumskega albumina različnih koncentracij v območju od 1 do 16 µg / mL. Koncentracijo proteinov v vzorcu (mg / mL) smo izračunali s pomočjo enačbe umeritvene krivulje

Iz rezultatov (slika 14) je razvidno, da je razmerje med topnimi proteini in suho snovjo največje v mladih listih (tretji listi). Tako pri S1 kot pri S2 smo ugotovili povečanje vsebnosti topnih proteinov v primerjavi z ustreznimi kontrolami. Največje povečanje smo ugotovili za tretje liste pri primerjavi S2/K2. Iz primerjave kontrol je razvidno, da smo pri K1 določili večje vsebnosti topnih proteinov kot pri K2, kar pa ni statistično značilno.



Slika 14: Razmerje med topnimi proteini in suho snovjo za posamezne liste [mg/µg] v kontrolnih in sušnih ekstraktih listov fižola za stanje 1 (K1 in S1) ter za stanje 2 (K2 in S2)

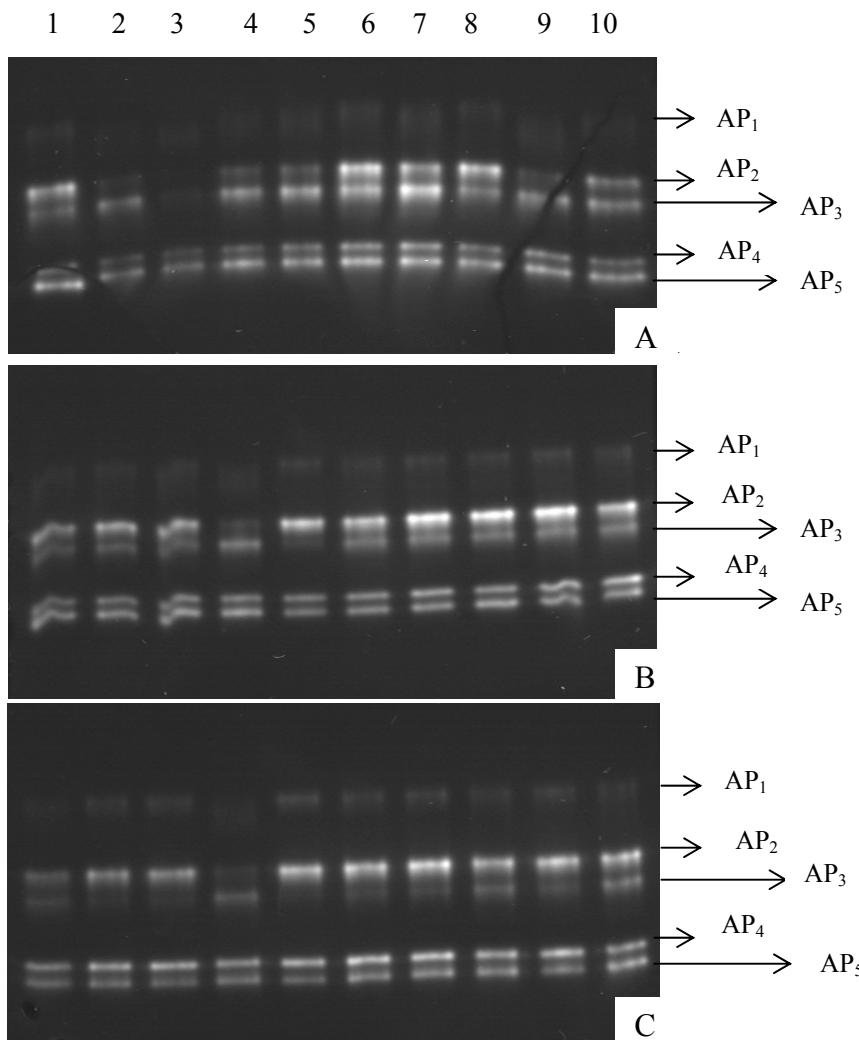
4.2.4 Vpliv suše na aminopeptidazno aktivnost na substrat Phe-AMC s cimografijo v listnih ekstraktih navadnega fižola

Analize ekstraktov na aminopeptidazno aktivnost, ki so jih z ionsko izmenjevalno kromatografijo opravili v našem laboratoriju, so pokazale, da je profil aminopeptidaznih

aktivnosti odvisen od položaja listov na steblu oz. najverjetneje od njihove starosti. Zato smo se tudi mi odločili, da bomo analizirali posamezne liste, torej prvi, drugi in tretji sestavljen list posebej.

4.2.4.1 Aminopeptidazna aktivnost na substrat Phe-AMC v listnih ekstraktih navadnega fižola pri prvi stopnji suše (S1) in pri ustrezni kontroli (K1)

S cimografijo smo po nativni elektroforezi ugotavljali aktivnost aminopeptidaz pri desetih različnih rastlinah (5 kontrol in 5 suš) v prvih, drugih in v tretjih listih fižola. Cimogrami za S1 in K1 so prikazani na sliki 15. Nanosi vzorcev na gel so bili normirani na suho snov.



Slika 15: Aminopeptidazna aktivnost listnih ekstraktov 5 kontrolnih rastlin (1-5) in 5 rastlin izpostavljenih S1 (6-10) analizirana s substratom Phe-AMC. Desno so oznake posameznih aminopeptidaz (AP₁-AP₅). Predstavljeni so cimogrami ekstraktov prvih listov (A), drugih listov (B) in tretjih listov (C).

Slike 15 je razvidna realtivno velika heterogenost biološkega materiala predvsem pri ustreznih kontrolah za posamezne skupine listov. Kljub omenjeni heterogenosti lahko že iz

cimogramov sklepamo, da je v splošnem aktivnost aminopeptidaz, ki hidrolizirajo Phe-AMC, večja v ekstraktih sušnih listov.

Preglednica 9: Aktivnost aminopeptidaz na substrat Phe-AMC v posameznih listih pri suši 1 (S1) in kontroli 1 (K1), izražena kot kvocient intenzitete lise in suhe snovi (integral/ μg). Prikazane so povprečne vrednosti (povprečje petih rastlin) in ustrezne standardne deviacije za posamezne, na suho snov normirane, aminopeptidazne aktivnosti pri ekstraktih iz sušnih in kontrolnih rastlin za stanje 1 (S1 in K1)

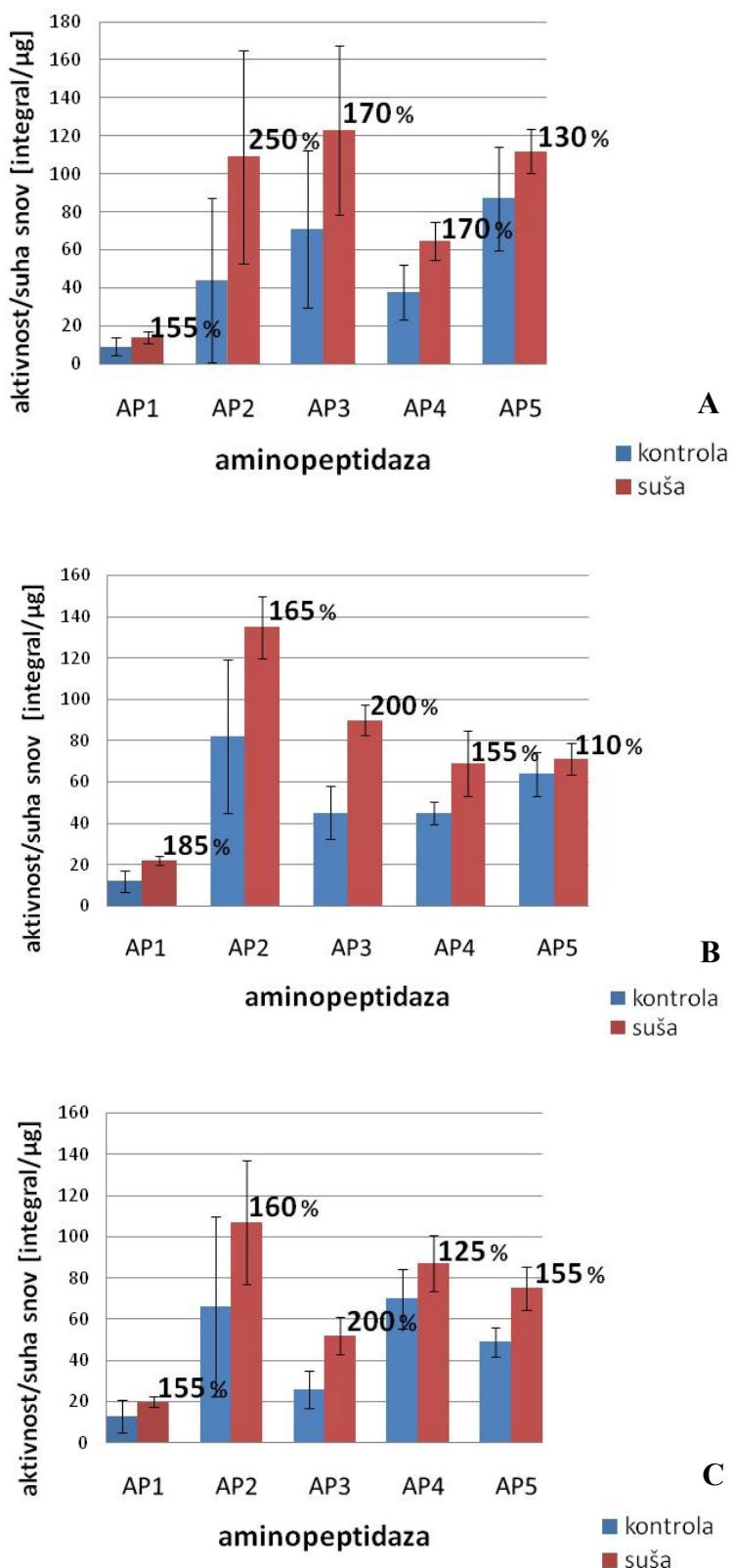
	K _{1,1}	S _{1,1}	K _{1,2}	S _{1,2}	K _{1,3}	S _{1,3}
AP₁	9,3 ± 4,7	14,1 ± 3,3 ^c	11,9 ± 5,3	21,9 ± 2,1 ^a	12,9 ± 7,8	19,7 ± 2,4
AP₂	44,2 ± 45,7	109,2 ± 55,9 ^c	81,6 ± 37,1	134,5 ± 15,1 ^b	66,4 ± 43,6	107,3 ± 30,2
AP₃	71,5 ± 41,6	122,8 ± 44,7 ^c	45,1 ± 12,8	89,5 ± 7,6 ^a	25,5 ± 8,9	52,4 ± 9,2 ^a
AP₄	38,1 ± 14,5	64,9 ± 10,0 ^a	45,2 ± 5,4	68,8 ± 15,8 ^b	69,9 ± 14,6	86,8 ± 13,6 ^c
AP₅	87,1 ± 26,9	112,3 ± 11,5 ^c	64,3 ± 10,6	70,9 ± 7,7	49,4 ± 7,0	74,9 ± 10,5 ^a
vsota	250,3 ± 133,5	423,4 ± 125,4 ^b	248,1 ± 71,3	385,8 ± 48,3 ^a	224,2 ± 81,9	341,0 ± 65,9 ^a

^a povprečne vrednosti med sušo in kontrolo za ustrezen list se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,01$)

^b povprečne vrednosti med sušo in kontrolo za ustrezen list se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

^c povprečne vrednosti med sušo in kontrolo za ustrezen list se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,1$)

Primerjava vrednosti integralov (preglednica 9) razkrije, da je za vse aminopeptidaze in liste aktivnost v ekstraktih rastlin izpostavljenih suši večja od ustrezne kontrole, vendar se vrednosti statistično značilno razlikujejo le v nekaterih primerih. Skupna aminopeptidazna aktivnost se za vse tri liste v S1 statistično značilno poveča. Iz preglednice je razvidna tudi relativno velika standardna deviacija za večino izmerjenih aktivnosti. Aminopeptidazna aktivnost na substrat Phe-AMC v ekstraktih različno starih listov je grafično predstavljena na sliki 16.

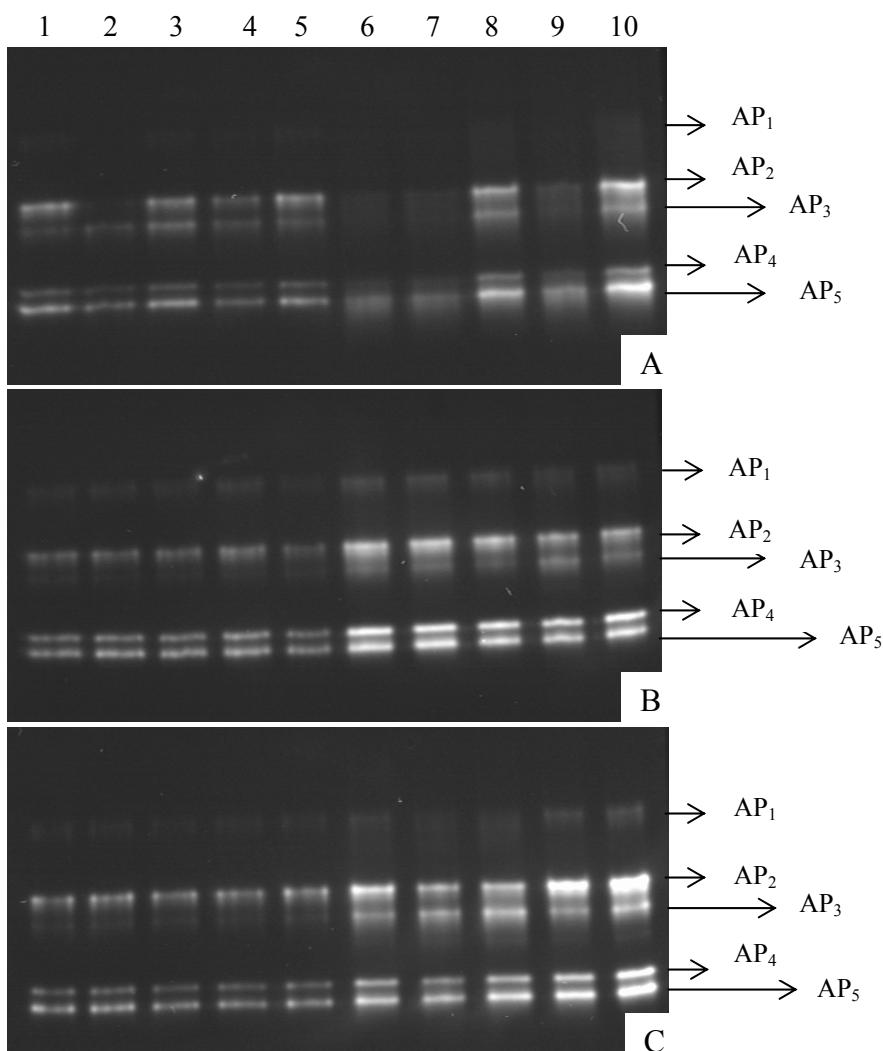


Slika 16: Primerjava aktivnosti različnih aminopeptidaz na substrat Phe-AMC, določenih s cimografijo, med kontrolo 1 (K1) in sušo 1 (S1) za prve liste (A), druge liste (B) in tretje liste (C). Relativne aktivnosti za posamezne aminopeptidazne aktivnosti v S1 v primerjavi z ustreznimi K1 so navedene v %

S slike 16 je razvidno, da se aktivnost posameznih encimov (AP_1 , AP_2 , AP_3 , AP_4 , AP_5) v suši poveča tako v prvih, drugih kot tudi v tretjih listih. V drugem in tretjem listu se v suši najbolj poveča aktivnost AP_3 , medtem ko se v prvem listu v suši najbolj poveča AP_2 . V prvem in v drugem listu se je v suši najmanj povečala aktivnost AP_5 , v tretjem listu pa AP_4 . Kljub za nekaj 10 % do več kot 100 % povečani aktivnosti v ekstraktih listov fižola, ki je bil izpostavljen suši, se meje standardnih deviacij za primerjalne pare suša-kontrola za večino izmerjenih aminopeptidaznih aktivnosti prekrivajo. Pri prvih listih tako značilne razlike opazimo le pri AP_4 . Pri drugih listih so zaradi manjše standardne deviacije razlike bolj značilne, saj do prekrivanja pride le pri AP_5 , kjer smo v S1 tudi določili najmanjši porast aminopeptidazne aktivnosti. Pri tretjih listih smo značilno povečanje aktivnosti v suši ugotovili za AP_3 in AP_5 .

4.2.4.2 Aminopeptidazna aktivnost na substrat Phe-AMC v listnih ekstraktih navadnega fižola pri suši druge stopnje (S2) in pri ustreznih kontrolah (K2)

S cimografijo smo po nativni elektroforezni ugotavljali aktivnost aminopeptidaz pri 10 različnih rastlinah (5 kontrol in 5 suš) v prvih, drugih in v tretjih listih fižola. Cimogrami za S2 in K2 so prikazani na sliki 16. Za razliko od analize aminopeptidazne aktivnosti pri S1, pri S2 nanosi vzorcev na gel niso bili normirani na suho snov. Na gel smo za S2 nanesli večje količine vzorca kot pri pripadajočih kontrolah, tako da »vizualno« večje aminopeptidazne aktivnosti za drugi (17A) in tretji list (17B) pri S2 ne pomenijo, da se je v tolikšni meri tudi povečala normirana aminopeptidazna aktivnost na substrat Phe-AMC.



Slika 17: Aminopeptidazna aktivnost listnih ekstraktov 5 kontrolnih rastlin (1-5) in 5 rastlin, izpostavljenih suši 2 (S2) (6-10), analizirana s substratom Phe-AMC. Desno so oznake posameznih aminopeptidaz (AP_1 - AP_5). Predstavljeni so cimogrami ekstraktov prvih listov (A), drugih listov (B) in tretjih listov (C).

V preglednici 10 so prikazane povprečne vrednosti in ustrezenje standardne deviacije ter statistična značilnost za posamezne, na suho snov normirane, aminopeptidazne aktivnosti na substrat Phe-AMC pri ekstraktih iz sušnih in kontrolnih listov (S2). V izračunu povprečnih vrednosti nismo upoštevali določenih aminopeptidaznih aktivnosti za ekstrakte prvih listov prve, druge in četrte rastline, saj so bili ti listi popolnoma uveneli in jih je suša irreverzibilno poškodovala, kar je razvidno tudi iz določene encimske aktivnosti prikazane na sliki 17A.

Preglednica 10: Aktivnost aminopeptidaz na substrat Phe-AMC v posameznih listih pri suši 2 (S2) in kontroli 2 (K2), izražena kot kvocient intenzitete lise in suhe snovi (integral/ μ g). Prikazane so povprečne vrednosti (povprečje petih rastlin) in ustrezne standardne deviacije za posamezne, na suho snov normirane, aminopeptidazne aktivnosti pri ekstraktih iz sušnih in kontrolnih rastlin za stanje 2 (K2 in S2)

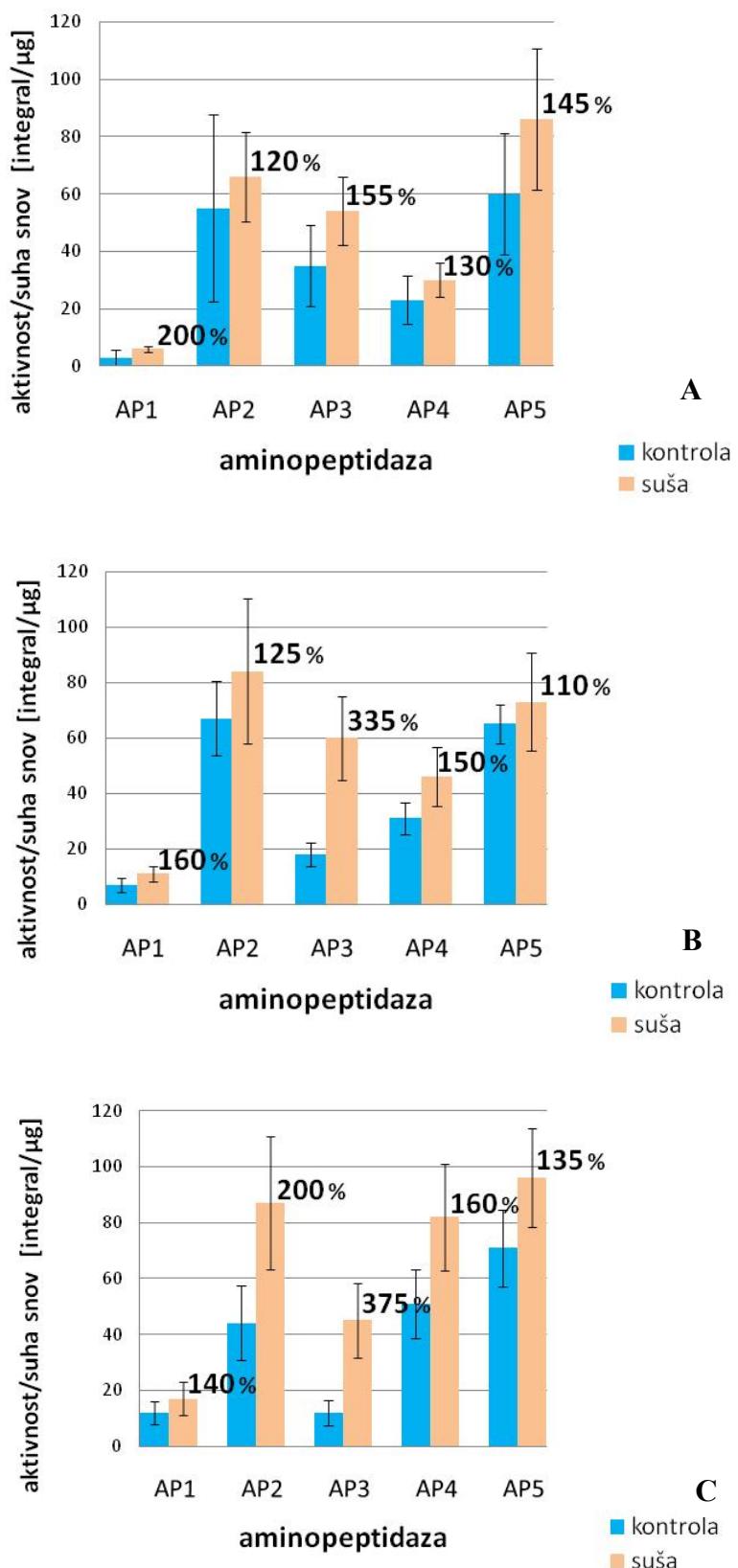
	K _{2,1}	S _{2,1}	K _{2,2}	S _{2,2}	K _{2,3}	S _{2,3}
AP₁	2,8 ± 2,9	5,8 ± 1,1	6,9 ± 2,6	11,5 ± 2,8 ^b	12,4 ± 4,2	16,6 ± 5,9
AP₂	55,1 ± 32,7	66,5 ± 15,4	67,4 ± 13,4	83,6 ± 26,2	44,0 ± 13,3	87,2 ± 23,9 ^a
AP₃	35,3 ± 14,1	54,2 ± 11,8	17,6 ± 4,1	59,9 ± 15,0 ^a	12,1 ± 4,6	45,1 ± 13,3 ^a
AP₄	23,3 ± 8,5	29,9 ± 5,9	31,4 ± 5,6	46,3 ± 10,6 ^b	51,3 ± 12,4	81,8 ± 19,2 ^b
AP₅	59,8 ± 21,2	86,1 ± 24,6	64,6 ± 7,1	73,2 ± 17,8	71,1 ± 13,7	96,1 ± 17,6 ^b
vsota	176,3 ± 79,4	242,5 ± 98,8	187,8 ± 32,6	274,5 ± 72,5 ^b	190,9 ± 48,2	326,7 ± 79,9 ^a

^a povprečne vrednosti med sušo in kontrolo za ustrezen list se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,01$)

^b povprečne vrednosti med sušo in kontrolo za ustrezen list se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

^c povprečne vrednosti med sušo in kontrolo za ustrezen list se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,1$)

Za skupno aminopeptidazno aktivnost v drugem in tretjem listu velja enako kot pri S1, saj se je tudi pri S2 le-ta statistično značilno povečala v primerjavi z ustrezeno kontrolo. Podobno kot za S1 lahko tudi za S2 ugotovimo, da so vse izmerjene aminopeptidazne aktivnosti večje kot pri kontrolah.

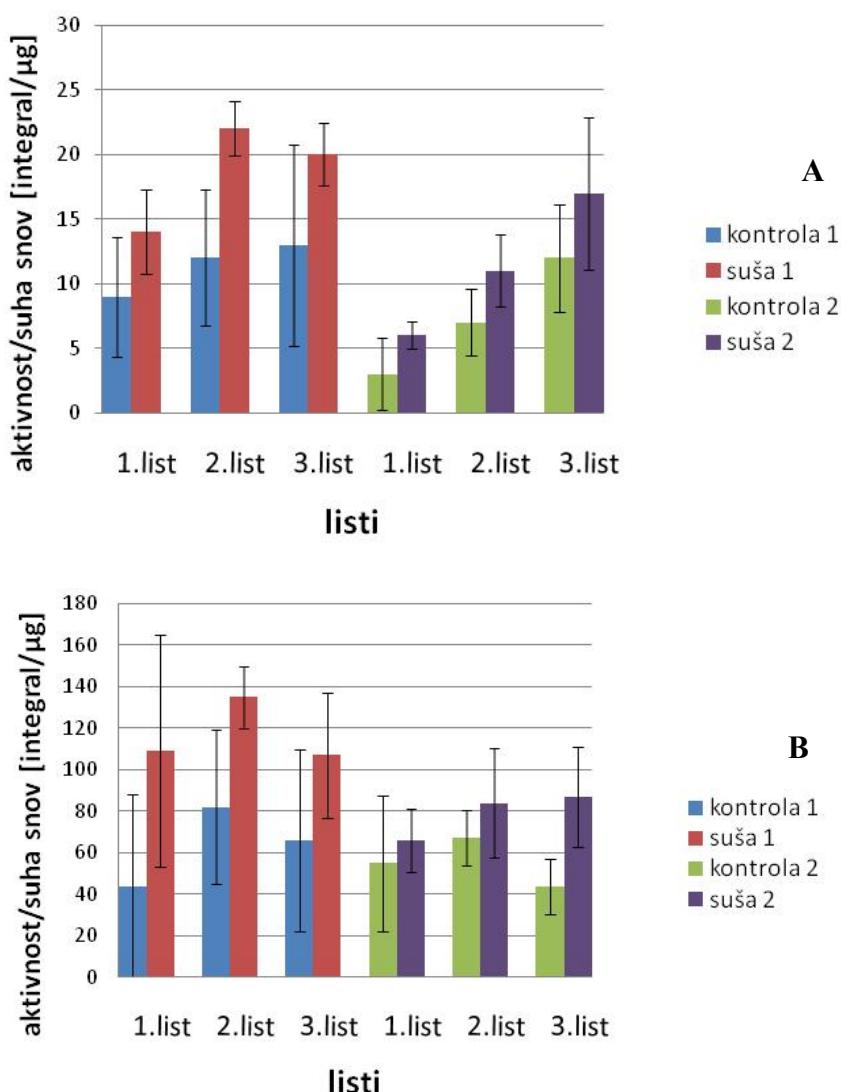


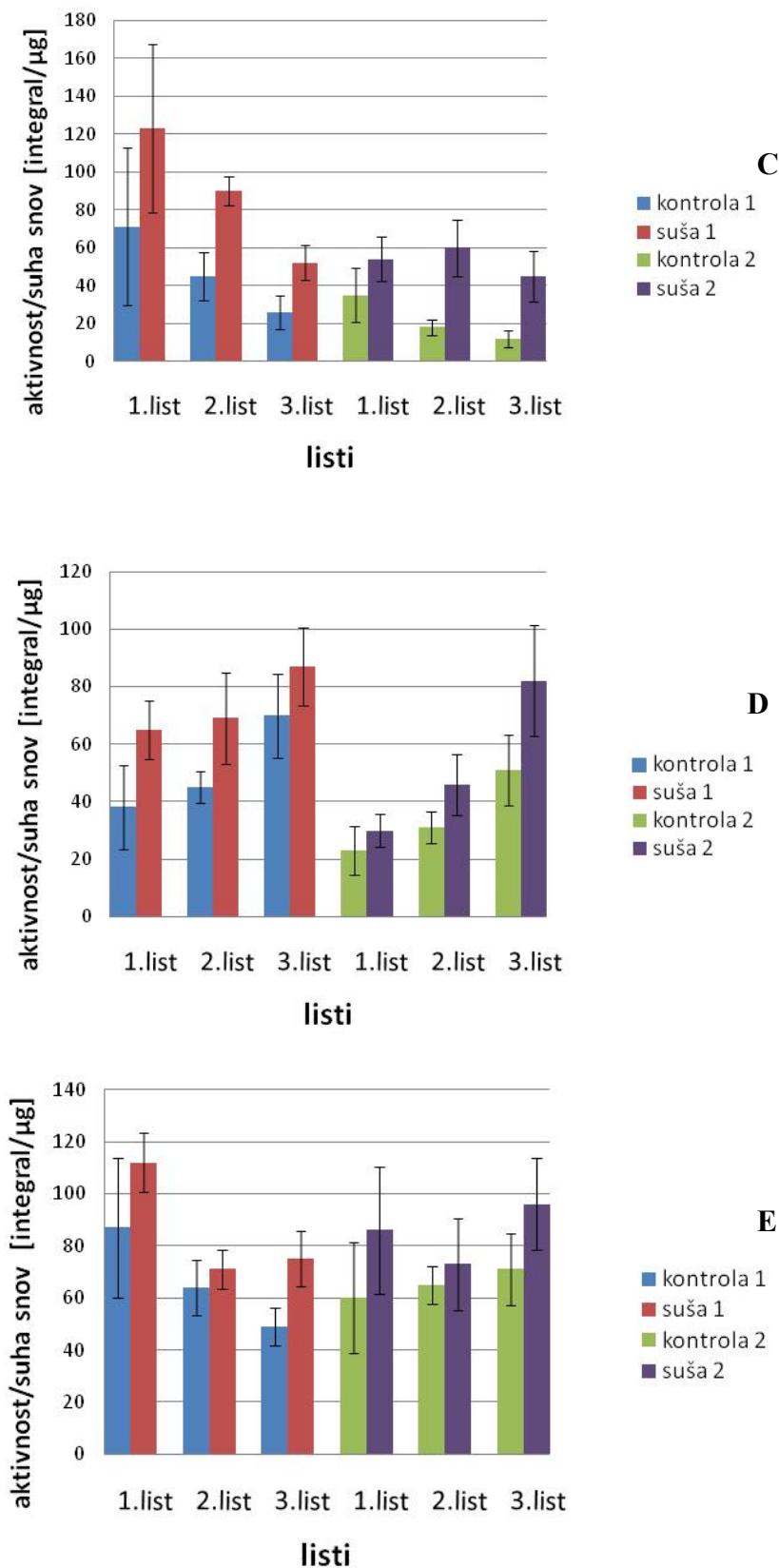
Slika 18: Primerjava aktivnosti različnih aminopeptidaz na substrat Phe-AMC, določenih s cimografijo, med kontrolo 2 (K2) in sušo 2 (S2) za prve liste (A), druge liste (B) in tretje liste (C). Relativne aktivnosti za posamezne aminopeptidazne aktivnosti v S2 v primerjavi z ustreznimi K2 so navedene v %

Grafičen prikaz primerjave aminopeptidazne aktivnosti med S2 in K2, ki temelji na podatkih iz preglednice 10 je prikazan na sliki 18. Največje povečanje je opazno za AP₃ pri drugem in tretjem listu, kjer smo določili za več kot 3x povečano aktivnost ustreznih aminopeptidaze v primerjavi s kontrolo, ki je tudi statistično značilna ($p < 0,01$).

4.2.4.3 Primerjava ekstraktov iz različnih listov glede na aktivnost aminopeptidaz določenih s cimografijo

Prvi, drugi in tretji sestavljeni listi pri fižolu so na različni razvojni stopnji, saj se je prvi list od omenjenih najprej razvil in je najstarejši, medtem ko je tretji list najmlajši od analiziranih listov. V času vzorčenja se je na fižolu razvijal že četrti sestavljen list (sliki 4 in 5), ki pa ga nismo vzorčili, ker je bil premajhen za ekstrakcijo, poleg tega pa naš osnovni namen ni bila analiza aminopeptidaz v različnih razvojnih stopnjah listov.



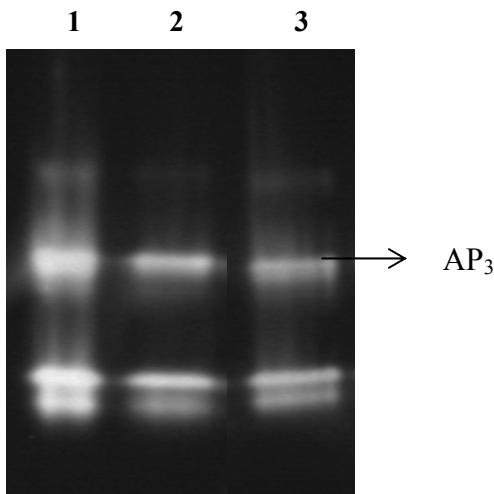


Slika 19: Primerjava aminopeptidaznih aktivnosti AP₁(A), AP₂(B), AP₃(C), AP₄(D) in AP₅(E) v različno starih listih kontrolnih rastlin in rastlin izpostavljenih suši v obeh stanjih (kontrola 1 in 2 ter suša 1 in 2)

Vsi trije analizirani listi, ki so bili že popolnoma razviti, imajo enak aminopeptidazni profil oz. v vseh se vidi pet lis (AP_1 - AP_5) (sliki 15 in 17), se na sušo odzovejo s povečanjem aminopeptidazne aktivnosti. Kljub omenjenim podobnostim pa lahko opazimo tudi velike razlike med listi. Na sliki 19 je prikazana primerjava med različnimi listi za posamezno aminopeptidazno aktivnost. Slike je razvidno, da se aktivnost nekaterih aminopeptidaz s staranjem listov povečuje, drugih pa zmanjuje. Opazno je zmanjševanje aktivnosti AP_1 in AP_4 s staranjem listov, tako pri obeh kontrolah kot sušah (malenkost odstopa le AP_1 pri S1). Pri AP_3 pa je razvidno, da se aktivnost aminopeptidaze v starejših listih povečuje. Relativno velike razlike v aktivnosti aminopeptidaz v različno strarih listih, so potrdile pravilnost odločitve, da primerjamo med seboj le posamezne liste in ne vzorčimo vseh listov hkrati.

4.2.5 Aminopeptidazna aktivnost v posameznih delih kalčka

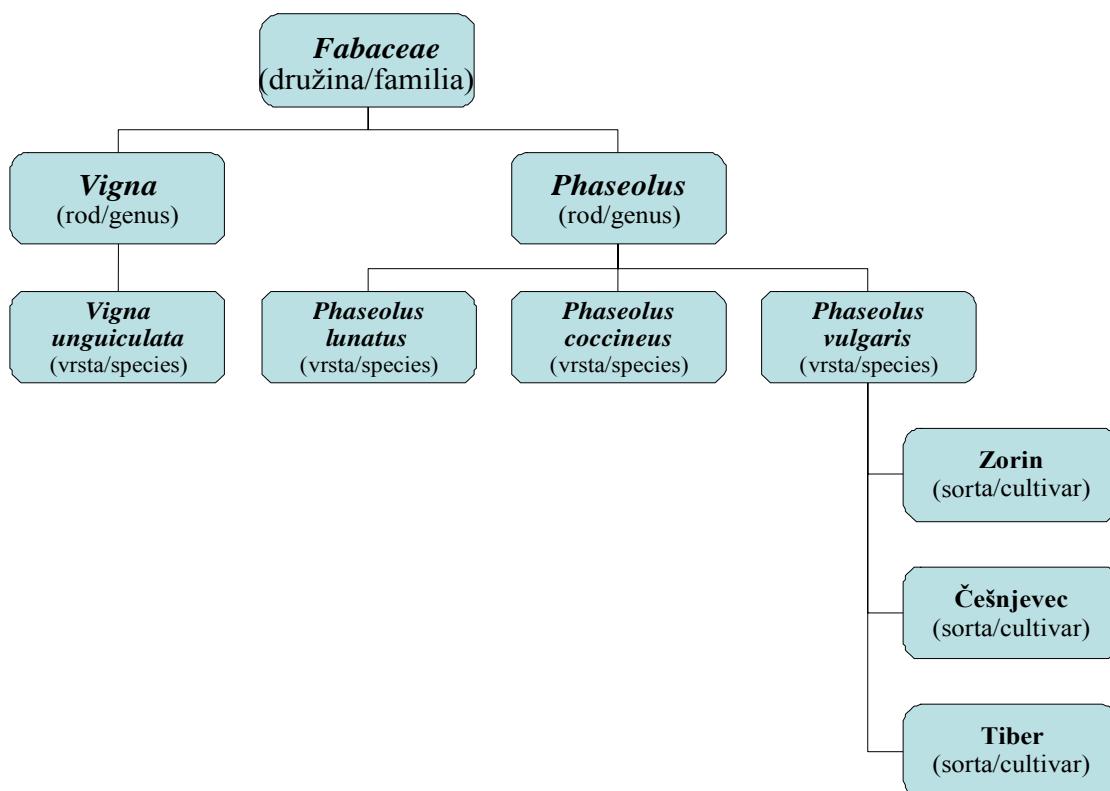
S tem poskusom smo želeli ugotoviti, kakšen je profil aminopeptidaz v različnih delih kalčka fižola sorte Zorin. Posebej smo ekstrahirali mlade listke, korenine in kotiledone in ugotovili, da je profil aminopeptidaz v vseh delih kalčka enak tistim, ki smo jih preučevali v nalogi (listom že razvite rastline), relativne zastopanosti posameznih aktivnosti na substrat Phe-AMC pa se razlikujejo. Aminopeptidazna aktivnost je največja v mladih listkih, manjša v koreninah in najmanjša v kotiledonu. Opazimo lahko, da je relativna aktivnost AP_3 v kalčku manjša kot v listih, ki smo jih preučevali v glavnem eksperimentu.



Slika 20: Aminopeptidaze v treh različnih delih kalčka fižola sorte Zorin. Nanos 1: listki, nanos 2: korenine in nanos 3: kotiledon. Nanašali smo $8\mu\text{L}$ ekstrakta

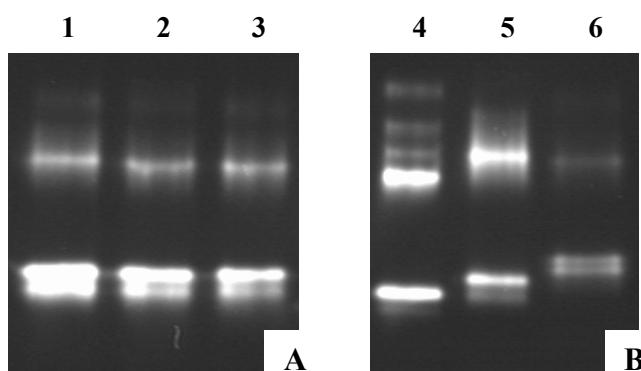
4.2.6 Aminopeptidazna aktivnost na substrat Phe-AMC v različnih sortah navadnega fižola ter drugih vrstah iz družine Fabaceae

Primerjali smo tudi profile fenilalanin-aminopeptidaznih aktivnosti proteolitičnih encimov v kalčkih treh sort navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*), in sicer Zorina, Tibra in Češnjevca, drugih vrst fižola – *Phaseolus lunatus* in *Phaseolus coccineus*, ter stročnice *Vigna unguiculata* iz drugega rodu iste družine Fabaceae. Sorodnost med temi metuljnicami je prikazana na sliki 21.



Slika 21: Sorodnost med fižoli, ki smo jih analizirali na substrat Phe-AMC s cimografijo

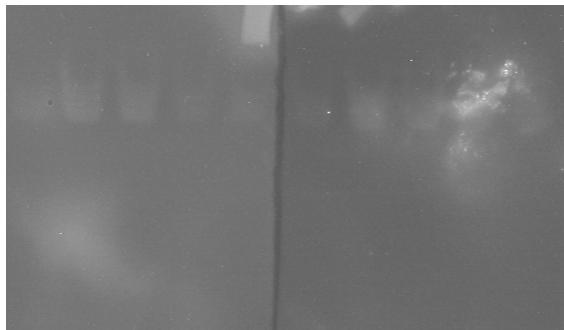
Po separaciji proteinov z elektroforezo, barvanju gela s substratom Phe-AMC in inkubaciji smo dobili rezultat prikazan na sliki 22. Sorte navadnega fižola Zorin, Tiber in Češnjevec so vsebovale iste fenilalanin-aminopeptidaze z rahlo različno relativno aktivnostjo in večjo podobnostjo med Tibrom in Češnjevcem, v fižolih, ki pripadajo drugi vrsti (*Phaseolus lunatus* in *Phaseolus coccineus*), pa se te proteaze razlikujejo, kar lahko opazimo na sliki kot razliko v mobilnosti. Največ aminopeptidaz vsebuje *Vigna unguiculata* (6), v sorti *Phaseolus lunatus* smo zasledili 4 aminopeptidaze, v sorti *Phaseolus coccineus* pa je aminopeptidazna aktivnost najmanjša.



Slika 22: Cimogram A: ekstrakti listov treh sort navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*): Zorin (1), Češnjevec (2) in Tiber (3). Cimogram B: aminopeptidaze aktivne na substrat Phe-AMC v ekstraktih kalčkov drugih vrst fižola – *Phaseolus lunatus* (5) in *Phaseolus coccineus* (6) ter v *Vigna unguiculata* (4)

4.2.7 Preverjanje uporabnosti cimografije za določanje aminopeptidazne aktivnosti v ekstraktih mikrobiološkega izvora

Aminopeptidazno aktivnost smo poskušali določiti tudi v celičnih lizatih bakterijskih kultur, ki so jih izolirali iz sira, jogurta in mesa. Lizate celic so nam pripravili na Biotehniški fakulteti, na oddelku za Zootehniko na Rodici.



Slika 23: Frakcije bakterijskih kultur *Lactobacillus gasseri* K7, *Streptococcus thermophilus* S4, *Lactobacillus helveticus*, *E. coli faecium* BM 3/2 in *E. coli faecalis* 25 po obrnjeni elektroforezi in barvanju z Leu-AMC (levih 5 nanosov) in Phe-AMC (desnih 5 nanosov)

Po separaciji proteinov z elektroforezo in barvanju gela po opisanem postopku s substrati Met-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC, Z-Arg- AMC in Phe-AMC, osvetlitvi gela in slikanju z UV transluminatorjem nismo zasledili aminopeptidazne aktivnosti.

Poskusili smo še postopek elektroforeze, kjer smo zamenjali elektrodi in pri barvanju z Leu-AMC in Phe-AMC zasledili eno aminopeptidazo, vendar so potrebne še nadaljnje analize in optimizacija, da bi potrdili uporabnost cimografije, ki smo jo uporabili v našem delu, tudi za ekstrakte mikrobiološkega izvora.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Ker je fižol med najpomembnejšimi stročnicami, ki se uporablja za prehrano, smo z našo raziskavo žeeli pomagati k pojasnjevanju mehanizmov, s katerimi se fižol prilagodi na sušni stres. Največ pozornosti smo namenili optimizaciji postopka izolacije 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.

Izolacija aminopeptidaz iz listov fižola zaradi narave rastlinskega materiala predstavlja svojevrsten problem (Brzin, Kidrič, 1995), zato smo najprej optimizirali postopek vzorčenja, kjer smo preučevali, kako različni načini vzorčenja vplivajo na določanje mase svežih listov fižola. Ugotovili smo, da ni nujno potrebno takojšnje zamrzovanje v tekočem dušiku, torej odtrgane liste lahko za krajši čas damo na led in šele potem zamrznemo s tekočim dušikom, to pa nam v veliki meri poenostavi postopek vzročenja.

Odločiti smo se morali, kateri del sestavljenega lista bomo uporabili za določanje suhe snovi in, kateri listič za izolacijo aminopeptidaz. Naš sklep je bil, da za določanje suhe snovi lahko vzamemo katerikoli listič, saj večjih razlik v vsebnosti vode med lističi nismo določili. Opazno je le manjše odstopanje za srednji listič, ki ima za približno 0,5 % manjšo VV (pregl. 8). Ker smo večje količine materiala potrebovali za ekstrakcijo aminopeptidaz, smo za ta namen vzorčili dva stranska lističa, za določitev suhe snovi pa srednji listič.

Za izolacijo aminopeptidaz smo izbrali liste fižola sorte Zorin, ki smo ga vzgojili pod kontroliranimi pogoji. Zorin 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.

Predhodno je bilo ugotovljeno, da so v odziv na sušo vpletene različni razredi proteaz v listih različno občutljivih sort navadnega fižola (Hieng in sod., 2004). Iz listov fižola sorte Zorin so izolirali tri aminopeptidaze, ki najverjetneje spadajo med aminopeptidaze serinskega katalitičnega tipa. Ugotovili so, da se aminopeptidazna aktivnost spreminja v ekstraktih listov, ki so bili izpostavljeni suši, kar kaže na to, da so izolirane aminopeptidaze vpletene v odziv navadnega fižola na vodni stres (Vrhovnik, 2007). Na splošno pa je o aminopeptidazah v fižolu in rastlinah nasprotno zelo malo znanega, saj vpliv pomanjanja vode na aktivnost teh encimov še ni dobro raziskan. Za razliko od endopeptidaz, nobena fižolova aminopeptidaza še ni biokemijsko okarakterizirana.

Rezultati predhodnih raziskav (Budić in sod., 2009) so pokazali, da se v fižolovih listih izraža več različnih encimov s fenilalanin-aminopeptidazno aktivnostjo, ki do sedaj še niso

bili opisani v literaturi. Z analizo ekstraktov na substrat Phe-AMC nam je uspelo določiti pet različnih aminopeptidaz s tipičnim profilom tako v kontrolnih kot tudi v sušnih rastlinah, kar je več kot v Budič (2009), kjer so ugotovili le štiri AP. Da nam je uspelo določiti eno AP več, je verjetno posledica tega, da smo fižol vzgojili pod kontroliranimi pogoji, v omenjeni študiji pa so rastline rasle na polju. Poleg petih AP smo po dodatku reducenta DTT zaznali še dve, verjetno cisteinski aminopeptidazi, ki pa jih nismo analizirali na vpliv suše, saj so bile na meji detekcije.

Ker smo vedeli, da se bo pojavila potreba po shranjevanju vzorcev in da lahko nepravilno shranjevanje privede do neželenih napak, smo že zeleli ugotoviti, kako pogoji shranjevanja vplivajo na aktivnost na substrat Phe-AMC. Preučevali smo vpliv temperature in glicerola na ohranjanje aminopeptidazne aktivnosti. Ugotovili smo, da se aminopeptidazna aktivnost najbolj ohrani v ekstraktu, kateremu je dodan glicerol, zamrznjenem v tekočem dušiku in shranjenem na temperaturi -70 °C. Hranjenje na temperaturi -20 °C brez dodanega glicerola pa je neprimerno, saj nekatere aminopeptidaze postanejo neaktivne. Da je za ohranitev aktivnosti aminopeptidaz ustrezno le shranjevanje na temperaturi -70 °C so ugotovili že pri shranjevanju ekstraktov za določanje levcin- in alanin-aminopeptidaz (Vrhovnik, 2007). Za dodatek glicerola se, kljub pozitivnemu učinku na ohranjanje encimske aktivnosti (Pierce, 2005), nismo odločili, saj je glicerol zaradi svoje viskoznosti rahlo motil elektroforezo, smo pa iz previdnosti vse vzorce hranili na -70 °C in jih porabili v štirinajstih dneh od ekstrakcije.

V okviru glavnega eksperimenta smo proučevali odziv posameznih listov na sušo na nivoju vsebnosti vode (VV), relativne vsebnosti vode (RVV), vsebnosti proteinov in aminopeptidazne aktivnosti. Vsi merjeni parametri so se razlikovali tako med posameznimi stanji kot tudi na nivoju listov. Kot je že omenjeno, smo rastline, namenjene preučevanju vpliva suše, 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 vode ter odziv rastlin na ta stresni dejavnik. Na nivoju VV smo opazili najmanjše razlike, saj smo za S1 (listi niso bili zalivani 3 dni) opazili zmanjšanje VV v vseh treh listih sušnih rastlin za približno 5 % v primerjavi z ustrezno kontrolo. Razlike v RVV so bile precej večje, saj smo za S1 določili le okoli 60 %. Pri S2 so bile opazne že razlike v VV, kjer so se vrednosti v vseh listih zmanjšale pod 75 %, kar ustreza že relativno hudi suši, saj večino kmetijsko pomembnih rastlin, torej tudi fižol, uvrščamo med mezofite. To so rastline, ki rastejo v okolju s srednjo, povprečno preskrbljenostjo z vodo (Salisbury in Ross, 1992) in že 10 - 15 % izguba vode, negativno vpliva na potek metabolnih procesov oz. že 10 % vodni primankljaj pri mezofitih predstavlja mejo odpornosti (Virant-Klun, 1993).

Vidne so tudi velike razlike med posameznimi listi, predvsem pri prvih listih. Korenine rastejo proti predelom, kjer je voda dostopna in se razširjajo, medtem ko nadzemni deli

zaostajajo v rasti in dosežejo omejeno razrast. Vsi deli iste rastline niso enako močno izpostavljeni suši. Vrhni listi rastline in poganjki črpajo vodo iz spodnjih listov in tako lažje preživijo sušo (McKersie in Leshem, 1994). Nekateri prvi, najstarejši listi, so bili že tako suhi, da jih nismo upoštevali v kasnejšem določanju encimske aktivnosti. Tudi RVV je bila pri teh listih že zelo nizka, okoli 20 %. Rezultati so v skladu z našimi pričakovanji, saj v obdobju suše ni dotoka vode v rastlino, vendar jo rastlina, kljub temu, potrebuje za svoje delovanje. Zato se v obdobju pomanjkanja vode njena vsebnost znižuje (Vrhovnik, 2007).

V posameznih, prvih, drugih in tretjih listih petih kontrolnih in ustreznih sušnih rastlin smo po času 1 (K1 in S1) in po času 2 (K2 in S2) določili vsebnost topnih proteinov, ki se je razlikovala v različno starih listih K1 in K2 in S1 in S2, razlike v vsebnosti topnih proteinov pa smo določili tudi med kontrolo in ustrezeno sušo. Tako pri S1 kot pri S2 smo ugotovili povečanje vsebnosti topnih proteinov v primerjavi z ustreznimi kontrolami. Pri primerjavi kontrol pa smo ugotovili povečanje v K1, ki pa ni statistično značilno. Vsebnost topnih proteinov je manjša v starejših listih tako pri kontroli kot tudi v suši in se je povečala v suši v primerjavi z ustrezeno kontrolo. V S1 smo opazili manjše povečanje topnih proteinov, v S2 pa pri drugem in tretjem listu večje povečanje. Manjša vsebnost topnih proteinov v starejših listih kaže na pojav senescence v teh listih, saj je velik padec vsebnosti proteinov ena od značilnosti senescence (Huffaker, 1990, Khanna-Chopra in sod., 1999).

Pri vseh listih in v vseh stanjih smo v suši opazili povečanje aminopeptidazne aktivnosti za posamezne AP, ko smo izmerjeno aktivnost normirali na suho snov. V listih fižola *Vigna unguiculata*, ki pripada isti družini (*Fabaceae*) kot *Phaseolus vulgaris*, ki smo ga preučevali, so ugotovili povečane aktivnosti nekaterih cisteinskih proteaz (Khanna-Chopra in sod., 1999) in aspartatne proteaze (Cruz de Carvallho in sod., 2001). Od aminopeptidaz so kot odziv na sušo opazili povečano aktivnost levcin-aminopeptidaze pri fižolu (Hieng in sod., 2004), pšenici (Miazek in Zagdanska, 2008) ter paradižniku (Chao in sod., 1999). Povečana aktivnost proteolitičnih encimov bi bila lahko povezana s tem, da zaradi omejene fotosinteze rastlini prične primanjkovati gradnikov in je zato zelo pomembno recikliranje znotrajceličnih komponent, torej tudi proteinov. Z njihovim recikliranjem pa rastlina dobi aminokisline potrebne za sintezo novih proteinov (Vierstra, 1996).

Kljub relativno uniformnemu odzivu posameznih listov na sušo, smo opazili velike razlike med posameznimi listi, ki najverjetneje ne odražajo vpliva suše kot take, ampak nakazujejo na različno fiziologijo posameznih listov. Pri S1 in K1 smo opazili največjo proteolitično aktivnost pri najstarejših, prvih listih, še posebej, če upoštevamo normiranje na topne proteine (priloga G), kar se sklada s predhodnimi rezulati, da se povečanje proteolitične aktivnosti pogosto pojavi med senescenco (Huffaker, 1990; Brzin in Kidrič, 1995).

Pri primerjavi posameznih aminopeptidaz smo opazili, da se aktivnost nekaterih AP, normiranih na suho snov, s staranjem povečuje (AP_3), aktivnost najmanj dveh (AP_1 in AP_4) pa se s staranjem značilno zmanjšuje. Primerjali smo tudi profil aminopeptidaz v različnih delih kalčka fižola Zorin. Posebej smo ekstrahirali mlade listke, korenino in kotiledone. Profil aminopeptidaz je v vseh delih kalčka enak, aktivnosti pa se razlikujejo. Aktivnost je največja v mladih listkih in najmanjša v kotiledonu. Zanimiva je ugotovitev, da je v kalčku AP_3 manj aktivna kot v prvem, najstarejšem listu, kjer smo zaznali največje povečanje AP_3 . Torej lahko sklepamo, da je AP_3 veliko bolj aktivna v starih, senescenčnih listih kot v mladih delih rastline.

Pri analizi ostalih fižolov vrste *Phaseolus vulgaris* (sorti Tiber in Češnjevec) smo ugotovili enak profil aminopeptidaz z manjšimi razlikami v aktivnosti. Pri fižolih vrste *Phaseolus Coccineus* in *Phaseolus Lunatus* smo določili manjše razlike tudi v tipu AP, najbolj pa odstopa aminopeptidazni profil pri evolucijsko najbolj oddaljeni *Vigna unguiculata*.

Preverili smo tudi uporabnost cimografije, ki temelji na določevanju encimske aktivnosti z AMC označenimi aminokislinsami, za določevanje aminopeptidazne aktivnosti v nekaterih živilih, kjer je njihova aktivnost pomemben dejavnik kakovosti. Uporabili smo ekstracelularne frakcije in celične lizate bakterijskih kultur (*Lactobacillus gasseri* K7, *Streptococcus termophilus* S4, *Lactobacillus helveticus*, *E. coli faecium* BM 3/2 in *E. coli faecalis* 25) iz sira, jogurta in mesa. Aminopeptidazne aktivnosti s standardnim postopkom nismo določili, s postopkom obrnjene elektroforeze pa smo po analizi s substratoma Leu-AMC in Phe-AMC zasledili aminopeptidazne aktivnosti, kar se sklada s predhodnimi ugotovitvami o aminopeptidazni aktivnosti, ki so jo zasledili v nekaterih testiranih bakterijskih kulturah in kompleksnih matriksih kot je sir (Gatti in sod., 2004 in 2008). Da bi potrdili uporabnost cimografije aminopeptidaz tudi za ostala živila je potrebno še veliko optimizacije tako na nivoju priprave vzorcev kot elektroforeze..

5.2 SKLEPI

- Metodo cimografije smo uspešno uporabili za ločevanje in identifikacijo aminopeptidaz s fluorescenčno označenim fenilalaninom po nativni elektroforezi iz ekstraktov listov fižola *Phaseolus vulgaris* cv. Zorin.
- Identificirali smo 5 fenilalanin-aminopeptidaz in ugotovili povečanje aminopeptidazne aktivnosti na substrat Phe-AMC v vseh listih sušnih rastlin (v prvem – najstarejšem, drugem in v tretjem - najmlajšem listu). Z uporabo reducenta DTT pa smo zaznali še dve, verjetno cisteinski, aminopeptidazi.
- Pri primerjavi listov smo ugotovili, da se tako koncentracija proteinov kot tudi aktivnost aminopeptidaz razlikuje v različno starih listih. Skupna aminopeptidazna aktivnost, normirana na suho snov je v kontrolnih rastlinah enaka v vseh listih. Aktivnost na substrat Phe-AMC pa se je v sušnih rastlinah v stanju 1 najbolj povečala v prvem listu, v stanju 2 (daljša suša) pa v tretjem listu.
- Aktivnost nekaterih AP, normiranih na suho snov, se s staranjem povečuje (AP_3), najmanj dveh (AP_1 in AP_4) pa se s staranjem značilno zmanjšuje.
- V različnih delih kalčka fižola Zorin smo zaznali soroden profil AP kot pri listih in manjšo aktivnost AP_3 , kar kaže na to, da je AP_3 veliko bolj aktivna v starejših kot v mladih delih rastline.
- V sortah Tiber in Češnjevec (*Phaseolus vulgaris*) smo ugotovili enak profil AP z manjšimi razlikami v aktivnosti, večje razlike tako v aktivnosti kot tudi v elektroforetski mobilnosti AP pa smo zaznali pri sorodnikih (*Phaseolus Coccineus* in *Phaseolus Lunatus*), kjer najbolj odstopa evolucijsko najbolj oddaljena *Vigna unguiculata*.
- Metoda cimografije, ki temelji na določevanju encimske aktivnosti z AMC označenimi aminokislinami, bi bila lahko uporabna tudi za določanje aktivnosti aminopeptidaz v ostalih živilih, saj je njihova aktivnost pomemben dejavnik kakovosti. Cimografijo smo uporabili na mikrobioloških sistemih, vendar smo dobili slabe odzive. Potrebne so še nadaljnje raziskave, ki bi potrdile uporabnost metode za ločevanje in identifikacijo aminopeptidaz v nekaterih živilih.

6 POVZETEK

Aminopeptidaze so encimi, ki katalizirajo cepitev peptidnih vezi z N-terminalnega konca proteinov. Razgradnja proteinov ali proteoliza, je eden od mehanizmov, s katerim se rastlina odzove na strese iz okolja. Za navadni fižol (*Phaseolus vulgaris*), katerega aminopeptidazno aktivnost smo preučevali, 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, 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 literaturnih podatkov. Glede na vlogo presnove proteinov v obrambi oz. adaptaciji na sušo pa lahko predpostavimo, da so aminopeptidaze vpletene v te procese.

Rastlinski material smo vzgojili pod kontroliranimi pogoji. Regulirali smo jakost in čas osvetlitve, temperaturo in relativno vlažnost. Preučevali smo liste fižola sorte Zorin. Poskrbeli smo za ustrezne kontrole, kjer so rastline določen čas rasle pod enakimi pogoji, nakar smo nekatere rastline prenehali zalivati po 20 dneh (stanje 1 - K1 in S1) in druge rastline po 23 dneh (stanje 2 - K2 in S2). Prve rastline smo vzorčili po tri dnevnom pomanjkanju vode, druge rastline pa po pet dnevnom pomanjkanju vode. Posamezne fižolove liste kontrolnih in ustreznih sušnih rastlin za posamezno stanje smo vzorčili istočasno. Liste smo homogenizirali, zamrznili v tekočem dušiku in ekstrakte shranili na temperaturi -70 °C, saj smo ugotovili, da AP najbolj ohranijo svojo aktivnost le na zelo nizkih temperaturah.

Preučevali smo odziv posameznih listov na sušo na nivoju vsebnosti vode (VV), relativne vsebnosti vode (RVV), vsebnosti proteinov in aminopeptidazne aktivnosti. V S1 se je VV zmanjšala v vseh treh listih sušnih rastlin za približno 5 % v primerjavi z ustrezno kontrolo. Razlike v RVV so bile precej večje, saj smo za S1 določili le okoli 60 %. Pri S2 so se že vrednosti VV v vseh listih zmanjšale za kar 25 %. Vidna so bila tudi velika odstopanja med posameznimi listi. Nekateri najstarejši listi so bili že tako suhi, da jih nismo upoštevali v kasnejšem določanju aminopeptidazne aktivnosti. RVV je bila pri teh listih samo še okoli 20 %.

V ekstraktih posameznih listov smo določili vsebnost topnih proteinov, ki se je razlikovala v različno starih listih K1 in S1 in S1 in S2, velike razlike v vsebnosti proteinov pa smo določili tudi med kontrolo in ustrezno sušo. Vsebnost topnih proteinov je manjša v starejših listih pri kontroli in v suši in se je povečala v suši v primerjavi z ustrezno

kontrolo. V S1 smo opazili manjše povečanje topnih proteinov, v S2 pa pri drugem in tretjem listu večje povečanje.

Za identifikacijo aminopeptidaz smo uporabili metodo cimografije, ki vključuje ločevanje proteinov s poliakrilamidno nativno gelsko elektroforezo (PAGE) z želatino. Po elektroforezi je sledila analiza s substratom Phe-AMC. Za ta substrat smo se odločili, ker smo z njim zaznali največ aminopeptidaz. Predhodno je bilo ugotovljeno, da se v fižolovih listih izraža več različnih encimov s fenilalanin-aminopeptidazno aktivnostjo, ki do sedaj še niso bili opisani v literaturi. V naših vzorcih smo določili pet različnih aminopeptidaz, po dodatku reducenta pa smo zaznali še dve, najverjetneje cisteinski aminopeptidazi tako v kontrolnih kot tudi v sušnih rastlinah.

Pri preučevanju vpliva pomanjkanja vode se je aktivnost na substrat Phe-AMC se v suši spreminja, zato lahko sklepamo, da imajo, poleg ostalih proteolitičnih encimov, tudi aminopeptidaze osrednjo vlogo v vseh procesih, kjer prihaja do sprememb v profilu in koncentraciji različnih proteinov. Aminopeptidazna aktivnost, normirana na suho snov, se je povečala v obeh sušah v primerjavi z ustrezima kontrolama. Razlike smo opazili tudi pri primerjavi različno starih listov in ugotovili, da je skupna aktivnost aminopeptidaz v K1 in S1 največja v prvem, najstarejšem listu, v K2 in S2 pa v tretjem, najmlajšem listu.

Primerjali smo aktivnosti posameznih AP in ugotovili, da se aktivnost AP₃ v listih s staranjem povečuje, aktivnost najmanj dveh (AP₁ in AP₄) pa se s staranjem zmanjšuje. V različnih delih kalčka fižola Zorin smo pri primerjavi posameznih AP ugotovili, da je v kalčku (mlad del rastline) AP₃ manj aktivna kot v prvem, najstarejšem listu, kjer smo zaznali največje povečanje AP₃.

Zelo podoben aminopeptidazni profil smo zaznali v dveh sortah fižola vrste *Phaseolus vulgaris*, pri vrstah *Phaseolus Coccineus* in *Phaseolus Lunatus* smo v tipu AP določili manjše razlike, pri evolucijsko najbolj oddaljeni *Vigna unguiculata* pa aminopeptidazni profil najbolj odstopa.

Cimografijo smo uporabili tudi za določanje aminopeptidazne aktivnosti v nekaterih živilih, vendar aktivnosti s standardnim postopkom nismo določili, s postopkom obrnjene elektroforeze pa smo po barvanju z Leu-AMC in Phe-AMC zasledili eno AP. Potrebne so nadaljnje analize in optimizacija, da bi potrdili uporabnost cimografije tudi za ostala živila.

7 VIRI

Adam Z., Clarke A.K. 2002. Cutting edge of chloroplast proteolysis. Trends in Plant Science, 7: 451-456

Antão C.M., Malcata F.X. 2005. Plant serine proteases: Biochemical, physiological and molecular features. Plant Physiology and Biochemistry, 43: 637-650

Arenas-Huertero C., Perez B., Rabanal F. 2009. Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. Plant Molecular Biology, 70: 385-401

Asp T., Bowra S., Borg S. 2004. Cloning and characterisation of three groups of cysteine protease genes expressed in the senescing zone of white clover (*Trifolium repens*) nodules. Plant Science, 167: 825-837

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

Barrett A.J., Rawlings N.D. 1995. Families and clans of serine peptidases. Archives of Biochemistry and Biophysics, 318: 247-250

Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. (eds.). 2004. Handbook of proteolytic enzymes. Two volume set. 2nd ed. Amsterdam, Elsevier: loc. pag.

Bartels D., Sunkar R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences, 24: 23-58

Battaglia M., Olvera-Carrillo Y., Garciarrubio A., Campos F., Covarrubias A.A. 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. Plant Physiology, 148: 6–24

Beebe S.E., Rao I.M., Cajiao C., Grajales M. 2008. Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. Crop Science, 48: 582-592

Beers E.P., Woffenden B.J., Zhao C. 2000. Plant proteolytic enzymes: Possible roles during programmed cell death. Plant Molecular Biology, 44: 399-415

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

- Bradford 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
- Bray E.A. 1997. Plant responses to water deficit. Trends in Plant Science, 2: 48-54
- Bray E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. 2000. Responses to abiotic stresses. V: Biochemistry & molecular biology of plants. Buchanan B., Gruissem W., Jones R. L. (eds.). Rockville, American Society of Plant Physiologists: 1158-1203
- 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
- Bruce T.J. A., Matthes M. C., Napier J. A. 2007. Stressful "memories" of plants: Evidence and possible mechanisms. Plant Science, 173: 603-608
- 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
- Budič M., Kidrič M., Meglič V., Cigić B. 2009. A quantitative technique for determining proteases and their substrate specificities and pH optima in crude enzyme extracts. Analytical Biochemistry, 388: 56-62
- Callis J. 1995. Regulation of protein degradation. Plant Cell, 7: 845-857
- Capitani D., Brilli F., Mannina L. 2009. *In situ* investigation of leaf water status by portable unilateral nuclear magnetic resonance. Plant Physiology, 149: 1638-1647
- 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
- Chen H. J., Huang G. J., Chen W. S. 2009. Molecular cloning and expression of a sweet potato cysteine protease SPCP1 from senescent leaves. Botanical Studies, 50: 159-170
- 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

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

Cruz de Carvalho M.H., d'Arcy-Lameta A., Roy-Macauley H., Gareil M., El Maarouf H., Pham-Thi A.T., Zuily-Fodil Y. 2001. Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp): Enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. FEBS Letters, 492: 242-246

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

Demir Y., Gungor A. A., Duran E. D. 2008. Cysteine protease (capparin) from capsules of caper (*Capparis spinosa*). Food Technology and Biotechnology, 46: 286-291

Demirevska K., Simova-Stoilova L., Vassileva V. 2008. Rubisco and some chaperone protein responses to water stress and rewetting at early seedling growth of drought sensitive and tolerant wheat varieties. Plant Growth Regulation, 56: 97-106

Drobnič-Košorok M. 1997. Eksperimentalne metode v biokemiji: učbenik s praktičnimi primeri. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta: 132 str.

Fink A. 1993. Poganjki in kalčki, vse leto sveža zelenjava. Ljubljana, ČZD Kmečki Glas: 12-13

França M.G., Pham Thi A. T., Pimentel C., Pereyra Rossiello R.O., Zuily-Fodil Y., Laffray D. 1999. Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. Environmental and Experimental Botany, 43: 227-237

Frederiks M. W., Mook R.F.O. 2004. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on *In Situ* zymography of gelatinases: Review and protocols. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 52: 711–722

Garciacarreno F.L., Dimes L.E., Haard N.F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Analytical Biochemistry, 214: 65-69

- Gatti M., Fornasari M.E, Lazzi C. 2004. Peptidase activity in various species of dairy thermophilic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 223-229
- Gatti M., Lindner J.D.D., Gardini F. 2008. A model to assess lactic acid bacteria aminopeptidase activities in parmigiano Reggiano cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 91: 4129-4137
- Gholami A., Sharafi S., Sharafi A. 2009. Germination of different seed size of pinto bean cultivars as affected by salinity and drought stress. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7: 555-558
- Gomis-Ruth F.X. 2003. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Molecular Biotechnology*, 24: 157–202
- Harrak H., Azelmat S., Baker E.N., Tabaeizadeh Z. 2001. Isolation and characterization of a gene encoding a drought-induced cysteine protease in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genome*, 44: 368-374
- Heussen C., Dowdle E.B. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry*, 102: 196-202
- 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 insensitivity. *Journal of Plant Physiology*, 161: 519-530
- Hou W.C., Chen H.J., Chen T.-E., Lin Y.H. 1999. Detection of protease activities using specific aminoacyl or peptidyl *p*-nitroanilides after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and its applications. *Electrophoresis*, 20: 486-490
- Huffaker R.C. 1990. Proteolitic activity during senescence of plants. *New Phytologist*, 116: 199-231
- Hummel K.M., Penheiter A.R., Gathman A.C., Lilly W.W. 1996. Anomalous estimation of protease molecular weights using gelatin-containing SDS-PAGE. *Analytical Biochemistry*, 233: 140-142

- Hsiao T.C. 1973. Plant responses to water stress. Annual Reviews of Plant Physiology, 24: 519-570
- Ingram J., Bartles D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47: 377-403
- Kaberdin V.R., McDowall K.J. 2003. Expanding the use of zymography by the chemical linkage of small, defined substrates to the gel matrix. Genome Research, 13: 1961-1965
- Kavar T., Maras M., Kidrič M., Sustar Vozlič J., Meglič V. 2008. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. Molecular Breeding, 21: 159-172
- Khanna-Chopra R., Srivalli B., Ahlawat Y.S. 1999. Drought induces many forms of cysteine proteases not observed during natural senescence. Biochemical and Biophysical Research Communications, 255: 324-329
- Kleiner D. E., Stetlerstevenson W.G. 1994. Quantitative zymography: Detection of picogram quantities of gelatinases. Analytical Biochemistry, 218: 325-329
- Konopka A., Zakhарова Т. 2002. Evaluation of methods to solubilize and analyze cell-associated ectoenzymes. Journal of Microbiological Methods, 51: 273-282
- Kutoš T. 1997. Vlaknina v suhem in obdelanem fižolu. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97 str.
- Lawlor D. W., Tezara W. 2009. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: A critical evaluation of mechanisms and integration of processes. Annals of Botany, 103: 561-579
- Leber T.M., Balkwill F.R. 1997. Zymography: A single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. Analytical Biochemistry, 249: 24-28
- Lombardi L., Ceccarelli N., Picciarelli P. 2007. Caspase-like proteases involvement in programmed cell death of *Phaseolus coccineus* suspensor. Plant Science, 172: 573-578
- Ludidi N., Abrahams G., Gehring C. 2006. AtGC1, a dual function *Arabidopsis thaliana* protein with guanylyl and cysteine protease activity. Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology, 143, Suppl.1: S179-S179

- Makowski G.S., Ramsby M.L. 1996. Calibrating gelatin zymograms with human gelatinase standards. *Analytical Biochemistry*, 236: 353-356
- McKersie B.D., Leshem Y. 1994. Stress and stress coping in cultivated plants. Dordrecht, Kluwer Academic Press: 256 str.
- Michaud D., Asselin A. 1995. Application to plant-proteins of gel-electrophoretic methods. *Journal of Chromatography A*, 698: 263-279
- Martinez J.P., Silva H., Ledent J.F. 2007. Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy*, 26: 30-38
- Matsui M., Fowler J.H., Walling L.L. 2006. Leucine aminopeptidases: Diversity in structure and function. *Biological Chemistry*, 387: 1535-1544
- Miazek A., Zagdanska B. 2008. Involvement of exopeptidases in dehydration tolerance of spring wheat seedlings. *Biologia Plantarum*, 52: 687-694
- Michaud D. 1998. Gel electrophoresis of proteolytic enzymes. *Analytica Chimica Acta*, 372: 173-185
- NC-IUBMB. 2007. Enzyme nomenclature. London, NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (julij 2009): 2 str.
- O' Mahony P. J., Oliver M.J. 1999. The involvement of ubiquitin in vegetative desiccation tolerance. *Plant Molecular Biology*, 41: 657-667
- Palma J.M., Sandalio L.M., Javier Corpas F., Romero-Puertas M.C., McCarthy I., del Rio L.A. 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: Role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 521-530
- Perales L., Penarrubia L., Cornejo M.J. 2008. Induction of a polyubiquitin gene promoter by dehydration stresses in transformed rice cells. *Journal of Plant Physiology*, 165: 159-171
- Perazzini R., Leonardi D., Ruggeri S. 2008. Characterization of *Phaseolus vulgaris* L. landraces cultivated in central Italy. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63: 211-218
- Protein stability and storage. 2005. Rockford, Pierce Biotechnology Inc. (september 2005)

http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_6581.pdf (avgust 2009):3 str.

Pinheiro C., Kehr J., Ricardo C.P. 2005. Effect of water stress on lupin stem protein analysed by two-dimensional gel electrophoresis. *Planta*, 221: 716-728

Pinheiro C., de Carvalho M.H.C., Bartels D. 2008. Dehydrins in *Lupinus albus*: Pattern of protein accumulation in response to drought. *Functional Plant Biology*, 35: 85-91

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

Rasband W.S. 2009. ImageJ. Bethesda, United States National Institutes of Health
<http://rsb.info.nih.gov/ij/> (julij 2009): 1 str.

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

Rawlings N.D., Morton F.R., Barrett A.J. 2006. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 34: 270-272
<http://merops.sanger.ac.uk/> (julij 2009)

Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., Kong, J., Barrett, A.J. 2008. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 36: 320-325
<http://merops.sanger.ac.uk/> (julij 2009)

Reddy A.R., Chaitanya K.V., Vivekanandan M. 2004. Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161: 1189-1202

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

Salisbury F.B., Ross C.W. 1992. *Plant physiology*. Belmont, Wadsworth Publishing: 682 str.

Sathish H.A., Kumar P.R., Prakash V. 2009 The differential stability of the left and right domains of papain. *Process Biochemistry*, 44: 710-716

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

Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal*, 31: 279-292

Shen F.F., Yu S.X., Han X.L. 2004. Cloning and characterization of a gene encoding cysteine proteases from senescent leaves of *Gossypium hirsutum*. *Chinese Science Bulletin*, 49: 2601-2607

Sheokand S., Dahiya P., Vincent J. L. 2005. Modified expression of cysteine protease affects seed germination, vegetative growth and nodule development in transgenic lines of *Medicago truncatula*. *Plant Science*, 169: 966-975

Simova-Stoilova L., Demirevska K., Petrova T. 2009. Antioxidative protection and proteolytic activity in tolerant and sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties subjected to long-term field drought. *Plant Growth Regulation*, 58: 107-117

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

Solomon M., Belenghi, B., Delledonne M., Menachem E., Levine A. 1999. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 11: 431-444

Srivalli B., Khanna Chopra R. 1998. Drought-induced enhancement of protease activity during monocarpic senescence in wheat. *Current Science*, 75: 1174-1176

Stroher V.L., MacLagan J.L., Good A.G. 1997. Molecular cloning of a *Brassica napus* cysteine protease gene inducible by drought and low temperature stress. *Physiologia Plantarum*, 101: 389-397

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

Šval B. 2008. Vpliv oskrbe z vodo na proteolitično aktivnost v listih fižola in afriške vijolice. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 48 str.

- Tian L.H., Zhang L., Zhang J. 2009. Differential proteomic analysis of soluble extracellular proteins reveals the cysteine protease and cystatin involved in suspension-cultured cell proliferation in rice. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1794: 459-467
- Torres G.A.M., Pflieger S., Corre-Menguy F. 2006. Identification of novel drought-related mRNAs in common bean roots by differential display RT-PCR. *Plant Science*, 171: 300-307
- van der Hoorn R.A.L., Jones J.D. 2004. The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 400-407
- Vierstra R.D. 1993. Protein degradation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44: 385-410
- Vierstra R.D. 1996. Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology*, 32: 275-302
- Virant-Klun I. 1993. Odpornost koruze (*Zea mays* L.) kultivarjev "Dea" in "Carla" na pomanjkanje vode. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: str. 16 - 16
- Vrhovnik M. 2007. Karakterizacija alanin-aminopeptidaze in levcin-aminopeptidaze iz fižolovih listov glede na oskrbo z vodo. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 84 str.
- Walling L.L., Gu Y.Q. 1996. Plant aminopeptidases: Occurrence, function and characterization. V: *Aminopeptidases*. Taylor A. (ed.). Georgetown, Landes Bioscience: 174- 219
- Watanabe Y., Matsushima S., Yamaguchi A. 2009. Characterization and cloning of cysteine protease that is induced in green leaves of barley. *Plant Science*, 176: 264-271
- Weder J.K.P., Kaiser K.P. 1995. Fluorogenic substrates for hydrolase detection following electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 698: 181-201
- Xu B.J., Chang S.K.C. 2008. Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 7165-7175

- Xu B.J., Chang S.K.C. 2009. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal proccessing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 4754-4764
- Xiong L.M., Schumaker K.S., Zhu J.K. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 14: 165-183
- Zang X., Komatsu S. 2007. A proteomic approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochemistry*, 68: 426–437
- Zhang X.M., Wang Y., Lv X.M. 2009. NtCP56, a new cysteine protease in *Nicotiana tabacum* L., involved in pollen grain development. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1569-1577
- 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

ZAHVALA

doc. dr. Blažu Cigiču se zahvaljujem za vso strokovno pomoč in potrpežljivost pri nastajanju te diplome. Hvala za odlično mentorstvo!

Posebna zahvala moji somentorici prof. dr. Marjetki Kidrič. Iskrena hvala za strokovno, predvsem pa HVALA za vso moralno pomoč.

Hvala doc. dr Poloni Jamnik za recenzijo diplomske naloge in hvala za izredno prijaznost.

Za uvajanje v laboratorijsko delo se zahvaljujem Maruški Budič, uni. dipl. mikrobiol. in vsem ostalim na Institutu Jožef Stefan, ki ste mi kakorkoli olajšali delo.

Zahvaljujem se tudi oddelku za Zootehniko, Aljoši Trmčiču, univ. dipl. inž. živ. tehnol. in prof. Dr. Ireni Rogelj za pripravo mikrobiološkega materiala.

Mojima staršema bi se rada zahvalila za finančno pomoč. Hvala, ker sta mi omogočila študij in hvala, ker sta mi v drugem letniku dovolila, da se je pot v šolo skrajšala.

Največja zahvala pa gre mojemu fantu Mihi, ki mi je v vseh letih študija stal ob strani ob lepih in manj lepih trenutkih ter me vedno in povsod podpiral. Miha, hvala, ker verjameš vame, tudi kadar sama ne...

PRILOGE

Priloga A: Podatki o sveži masi posameznih fižolovih listov, masi nasičenih listov, suhi snovi in o vsebnosti vode (VV) ter relativni vsebnosti vode (RVV) za posamezne rastline za kontrolo 1 (K1) in sušo 1 (S1)

RASTLINA / LIST	sveža masa listov [g]	masa nasičenih listov [g]	suha snov [g]	VV [%]	RVV [%]
K 1/1	0,3573	0,3748	0,0292	91,83	94,94
K 1/2	0,4016	0,4152	0,0431	89,27	96,35
K 1/3	0,3881	0,4108	0,0427	88,99	93,83
K 2/1	0,6278	0,5889	0,0549	91,25	107,28
K 2/2	0,9277	0,8886	0,0927	90,01	104,91
K 2/3	0,6492	0,6043	0,0571	91,20	108,21
K 3/1	0,3517	0,3731	0,0290	91,75	93,78
K 3/2	0,4130	0,4450	0,0416	89,93	92,07
K 3/3	0,3162	0,3445	0,0356	88,74	90,84
K 4/1	0,6997	0,6584	0,0593	91,53	106,89
K 4/2	0,8883	0,8523	0,0945	89,34	104,75
K 4/3	0,6562	0,6114	0,0738	88,76	108,33
K 5/1	0,6905	0,6523	0,0560	91,89	106,41
K 5/2	0,8591	0,8262	0,0841	90,20	104,43
K 5/3	0,5926	0,5526	0,0558	88,89	108,05
S 1/1	0,2163	0,3454	0,0297	86,27	59,11
S 1/2	0,3403	0,3613	0,0486	85,72	93,28
S 1/3	0,2356	0,3267	0,0357	84,85	68,69
S 2/1	0,2227	0,3987	0,0337	84,87	51,78
S 2/2	0,2817	0,4503	0,0438	84,45	58,52
S 2/3	0,1974	0,2841	0,0319	83,84	65,62
S 3/1	0,2351	0,3995	0,0339	85,58	55,03
S 3/2	0,3141	0,5049	0,0468	85,10	58,35
S 3/3	0,2319	0,3313	0,0371	84,00	66,21
S 4/1	0,2317	0,3940	0,0323	86,06	55,13
S 4/2	0,3477	0,5512	0,0510	85,33	59,32
S 4/3	0,1974	0,2797	0,0315	84,04	66,84
S 5/1	0,1725	0,3121	0,0235	86,38	51,63
S 5/2	0,2731	0,3914	0,0411	84,95	66,23
S 5/3	0,3241	0,5024	0,0455	85,96	60,98

Priloga B: Podatki o sveži masi posameznih fižolovih listov, masi nasičenih listov, suhi snovi in o vsebnosti vode (VV) ter relativni vsebnosti vode (RVV) za posamezne rastline za kontrolo 2 (K2) in sušo 2 (S2)

RASTLINA /LIST	sveža masa listov [g]	masa nasičenih listov [g]	suha snov [g]	VV [%]	RVV [%]
K 1/1	0,3573	0,3616	0,0322	90,99	98,69
K 1/2	0,4789	0,5012	0,0542	88,68	95,01
K 1/3	0,3746	0,3992	0,0462	87,67	93,03
K 2/1	0,3255	0,5007	0,0546	83,23	60,73
K 2/2	0,4591	0,4784	0,0522	88,63	95,47
K 2/3	0,3878	0,3994	0,0418	89,22	96,76
K 3/1	0,3613	0,3832	0,0328	92,17	93,75
K 3/2	0,5392	0,5725	0,0695	87,11	93,38
K 3/3	0,4299	0,4613	0,0500	88,37	92,37
K 4/1	0,2518	0,4311	0,0380	84,91	54,39
K 4/2	0,5179	0,5432	0,0572	88,96	94,79
K 4/3	0,3616	0,3845	0,0306	91,54	93,53
K 5/1	0,3366	0,3555	0,0342	89,84	94,12
K 5/2	0,4868	0,5189	0,0543	88,85	93,09
K 5/3	0,4395	0,5224	0,0613	86,05	82,02
S 1/1	0,0255	0,0848	0,0210	17,65	7,05
S 1/2	0,1041	0,2949	0,0393	62,25	25,35
S 1/3	0,1028	0,2654	0,0272	73,54	31,74
S 2/1	0,302	0,0682	0,0208	31,13	13,83
S 2/2	0,1228	0,3570	0,0638	48,05	20,12
S 2/3	0,1175	0,2896	0,0320	72,77	33,19
S 3/1	0,0614	0,1666	0,0235	61,73	26,48
S 3/2	0,1429	0,3176	0,0432	69,77	36,33
S 3/3	0,1476	0,3300	0,0374	74,66	37,66
S 4/1	0,0382	0,1173	0,0204	46,60	18,37
S 4/2	0,1898	0,3046	0,0337	82,24	57,62
S 4/3	0,1873	0,3930	0,0460	75,44	40,72
S 5/1	0,0835	0,1586	0,0207	75,21	45,54
S 5/2	0,1971	0,3129	0,0472	76,05	56,42
S 5/3	0,1512	0,2740	0,0330	78,17	49,05

Priloga C: Vsebnost vode (VV) v prvih, drugih in tretjih listih za kontrolo 1 (K1) in sušo 1 (S1) ter za kontrolo 2 (K2) in sušo 2 (S2). Rezultati meritev so podani v %

	K1	S1	K2	S2
1. list	$91,7 \pm 0,3$	$86,1 \pm 0,4$	$88,0 \pm 3,6$	$46,5 \pm 23,5$
2. list	$89,8 \pm 0,4$	$85,1 \pm 0,5$	$88,4 \pm 0,8$	$67,7 \pm 13,2$
3. list	$89,7 \pm 1,2$	$84,5 \pm 0,9$	$88,6 \pm 2,0$	$74,9 \pm 2,1$

Priloga D: Relativna vsebnost vode (RVV) za prve, druge in tretje liste za kontrolo 1 (K1) in sušo 1 (S1) ter za kontrolo 2 (K2) in sušo 2 (S2). Rezultati meritev so podani v %

	K1	S1	K2	S2
1. list	$101,9 \pm 6,9$	$55,2 \pm 0,4$	$80,3 \pm 21,0$	$23,5 \pm 14,2$
2. list	$100,5 \pm 5,9$	$67,1 \pm 0,5$	$94,3 \pm 1,1$	$39,2 \pm 17,3$
3. list	$101,9 \pm 8,8$	$65,7 \pm 0,9$	$91,5 \pm 5,6$	$38,5 \pm 6,9$

Priloga E: Koncentracija proteinov [mg / ml] v posameznih ekstraktih zamrznjenih listov fižola *Phaseolus vulgaris* cv. Zorin

	Suša 1 proteini [mg/mL]	Suša 2 proteini [mg/mL]
K _{1,1}	1,31 ± 0,03	0,81 ± 0,08
K _{2,1}	0,65 ± 0,09	0,52 ± 0,21
K _{3,1}	0,83 ± 0,02	0,77 ± 0,07
K _{4,1}	0,85 ± 0,13	0,57 ± 0,10
K _{5,1}	1,16 ± 0,03	0,59 ± 0,06
K _{1,2}	1,43 ± 0,21	1,42 ± 0,06
K _{2,1}	1,53 ± 0,11	1,52 ± 0,07
K _{3,2}	1,88 ± 0,15	1,31 ± 0,12
K _{4,2}	1,46 ± 0,09	1,63 ± 0,06
K _{5,2}	1,94 ± 0,07	1,54 ± 0,14
K _{1,3}	1,79 ± 0,12	1,66 ± 0,28
K _{2,3}	1,56 ± 0,05	1,61 ± 0,16
K _{3,3}	2,10 ± 0,04	1,48 ± 0,09
K _{4,3}	1,85 ± 0,11	2,28 ± 0,10
K _{5,3}	3,67 ± 0,05	1,20 ± 0,06
S _{1,1}	1,33 ± 0,13	1,14 ± 0,02
S _{2,1}	1,33 ± 0,07	1,37 ± 0,02
S _{3,1}	1,24 ± 0,12	2,17 ± 0,03
S _{4,1}	1,32 ± 0,07	1,13 ± 0,04
S _{5,1}	1,01 ± 0,03	2,77 ± 0,05
S _{1,2}	1,74 ± 0,15	4,19 ± 0,04
S _{2,2}	2,26 ± 0,19	3,12 ± 0,11
S _{3,2}	1,79 ± 0,14	5,03 ± 0,04
S _{4,2}	2,27 ± 0,08	5,38 ± 0,09
S _{5,2}	2,57 ± 0,06	5,57 ± 0,08
S _{1,3}	2,55 ± 0,11	7,36 ± 0,11
S _{2,3}	2,74 ± 0,07	5,65 ± 0,06
S _{3,3}	2,10 ± 0,20	4,90 ± 0,04
S _{4,3}	2,67 ± 0,04	2,96 ± 0,02
S _{5,3}	1,78 ± 0,05	4,24 ± 0,16

Priloga F: Razmerje med topnimi proteini in suho snovjo za posamezne fižolove liste (prvi, drugi in tretji list) v kontroli in suši za stanje 1 (K1 in S) ter v kontroli in suši za stanje 2 (K2 in S2). Rezultati so podani v mg/g

	K1 [mg/g]	S1 [mg/g]	K2 [mg/g]	S2 [mg/g]
1. list	4,9 ± 1,4	5,7 ± 0,6	3,2 ± 0,8	4,1 ± 2,2
2. list	8,0 ± 1,2	9,7 ± 1,6	7,1 ± 0,7	10,1 ± 2,8
3. list	10,6 ± 4,0	10,8 ± 1,8	8,0 ± 2,2	15,4 ± 6,4

Priloga G: Aktivnost aminopeptidaz na substrat Phe-AMC v posameznih listih pri suši 1 (S1) in kontroli 1 (K1), izražena kot kvocient intenzitete lise in proteinov (integral/µg). Prikazane so povprečne vrednosti (povprečje petih rastlin) in ustrezne standardne deviacije za posamezne, na proteine normirane, aminopeptidazne aktivnosti pri ekstraktih iz sušnih (S1) in kontrolnih (K1) listov

	K _{1,1}	S _{1,1}	K _{1,2}	S _{1,2}	K _{1,3}	S _{1,3}
AP₁	184 ± 65	244 ± 37	143 ± 42	230 ± 30	118 ± 42	184 ± 16
AP₂	964 ± 571	1894 ± 893	991 ± 376	1423 ± 310	603 ± 281	1032 ± 353
AP₃	1466 ± 789	2127 ± 664	581 ± 218	935 ± 123	260 ± 118	512 ± 190
AP₄	780 ± 212	1133 ± 125	569 ± 87	704 ± 63	698 ± 189	810 ± 61
AP₅	1786 ± 355	1967 ± 198	819 ± 195	743 ± 130	516 ± 182	724 ± 224
vsota	5181 ± 1992	7365 ± 1917	3104 ± 918	4035 ± 656	2194 ± 812	3263 ± 843

Priloga H: Aktivnost aminopeptidaz na substrat Phe-AMC v posameznih listih pri suši (S2) in kontroli 2 (K2), izražena kot kvocient intenzitete lise in proteinov (integral/µg). Prikazane so povprečne vrednosti (povprečje petih rastlin) in ustrezne standardne deviacije za posamezne, na proteine normirane, aminopeptidazne aktivnosti pri ekstraktih iz sušnih (S2) in kontrolnih (K2) listov

	K _{2,1}	S _{2,1}	K _{2,2}	S _{2,2}	K _{2,3}	S _{2,3}
AP₁	5434 ± 106	94 ± 29	96 ± 29	115 ± 12	158 ± 36	110 ± 15
AP₂	1658 ± 940	720 ± 467	951 ± 154	831 ± 106	556 ± 63	591 ± 104
AP₃	1113 ± 329	922 ± 370	248 ± 50	607 ± 122	160 ± 76	320 ± 146
AP₄	723 ± 175	453 ± 123	441 ± 56	466 ± 39	655 ± 78	568 ± 161
AP₅	1853 ± 348	1443 ± 347	914 ± 87	732 ± 57	915 ± 137	671 ± 174
vsota	5434 ± 1898	3312 ± 1336	2651 ± 376	2751 ± 335	2443 ± 390	2260 ± 601

Priloga I: Primerjava aktivnosti posameznih aminopeptidaz v ekstraktih prvega, drugega in tretjega lista med kontrolo 1 (K1) in sušo 1 (S1) ter med kontrolo 2 (K2) in sušo 2 (S2), normirani na μg proteinov. A=AP₁, B=AP₂, C=AP₃, D=AP₄, E=AP₅

