

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

**Molekularno kloniranje i analiza gena
za aspartičnu proteinazu heljde
(*Fagopyrum esculentum* Moench)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Timotijević Gordana

Beograd, 2009.

Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

**Molekularno kloniranje i
analiza gena za aspartičnu
proteinazu heljde
(*Fagopyrum esculentum*
Moench)**

Doktorska disertacija

Gordana Timotijević



2009

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
СВЕТОЗАР
СОФИЈА
и. Бр. 160022



Mentori i članovi komisije:

dr Vesna Maksimović, naučni savetnik,

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu

dr Svetlana Radović, vanredni profesor,

Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Đorđe Fira, vanredni profesor,

Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Zahvaljujem se mentorima i članovima komisije na pomoći u izradi ove doktorske disertacije.

Takođe, zahvalnost dugujem i saradnicima koji su svojim ličnim i profesionalnim savetima doprineli nastanku ovog rada.



SADRŽAJ

1. UVOD

1.1 Proteaze	1
1.1.1 Opšte karakteristike.....	1
1.1.2 Nomenklatura: proteaze, proteinaze i peptidase.....	1
1.1.3 Standardna klasifikacija proteaza.....	3
1.1.4 Serinske proteaze.....	4
1.1.5 Cisteinske proteaze.....	5
1.1.6 Metalo-proteaze.....	7
1.1.7 Aspartične proteaze.....	8
1.2 Biljne aspartične proteinaze	11
1.2.1 Ime i istorija istraživanja.....	11
1.2.2 Aktivnost.....	13
1.2.3 Primarna struktura.....	14
1.2.4 Tercijerna struktura.....	17
1.2.5 Prečišćavanje i ekspresija AP proteina.....	19
1.2.6 Geni za aspartične proteinaze i klasifikacija na osnovu domenske strukture.....	20
1.3 Biološki aspekti	22
1.3.1 Aktivacija proenzima i transport.....	22
1.3.2 Distribucija i lokalizacija u tkivima i organima.....	24
1.3.3 Funkcija.....	25
1.4 Biotehnološka primena aspartičnih proteinaza	26
1.4.1 Upotreba aspartičnih proteinaza u industrijske svrhe.....	26
1.4.2 Upotreba aspartičnih proteinaza u koagulaciji mleka.....	26
1.5 Heljda	28

2. CILJ	32
3. MATERIJAL I METODE	33
3.1. Biljni materijal i tretmani	33
3.1.1. Biljni materijal.....	33
3.1.2. Klijanje semena.....	33
3.1.3. Tretmani biljaka.....	34
3.1.4. Inkubacija listova heljde u medijumu koji sadrži SA.....	35
3.2. Bakterijske procedure	35
3.2.1. Medijumi za uzgajanje bakterija.....	35
3.2.2. Bakterije i plazmidi.....	35
3.2.3. Uzgajanje i održavanje bakterija.....	35
3.2.4. Priprema elektrokompetentnih ćelija <i>E.coli</i> za elektroporaciju...37	
3.2.5. Transformacija <i>E.coli</i> elektroporacijom.....	37
3.3. Osnovne procedure rada sa DNK	38
3.3.1. Izolovanje biljne genomske DNK.....	38
3.3.2. Izolovanje plazmida iz bakterija.....	38
3.3.3. Elektroforeza DNK na gelu od agaroze.....	40
3.3.4. Prečišćavanje fragmenata DNK sa gela od agaroze.....	40
3.3.5. Digestija DNK restrikcionim enzimima.....	41
3.3.6. Ligacija DNK sa Marathon adapterima.....	41
3.3.7. Ligacija DNK sa plazmidnim vektorima.....	42
3.3.8. Taloženje DNK etanolom.....	42
3.3.9. Metoda po Southern-u (Neradioaktivno obeležavanje probe metodom dopunjavanja DNK (oligo labelling).....	42
3.3.10. Prenos DNK sa gela na membranu.....	43
3.3.11. Hibridizacija i detekcija signala.....	44
3.3.12. Sekvenciranje DNK.....	45
3.3.13. Kompjuterska analiza sekvenci.....	45
3.4. Reakcija lančanog umnožavanja segmenata DNK (PCR)	46
3.4.1. Umnožavanje fragmenata DNK.....	46

3.4.2.	<i>Umnožavanje fragmenata DNK korišćenjem degenerativnih prajmera.....</i>	49
3.4.3.	<i>5' i 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....</i>	49
3.4.4.	<i>Real-time PCR.....</i>	51
3.5.	Osnovne procedure rada sa RNK	52
3.5.1.	<i>Izolovanje ukupne RNK (Taylor & Powell, 1982).....</i>	52
3.5.2.	<i>Izolovanje ukupne RNK modifikovanom CTAB mini prep metodom (Doyle & Doyle, 1987).....</i>	53
3.5.3.	<i>Elektroforeza RNK na gelu od agaroze.....</i>	54
3.5.4.	<i>Izolovanje poli(A) RNK.....</i>	55
3.5.5.	<i>Sinteza cDNK.....</i>	55
3.5.6.	<i>Metoda „Northern blot“ (Neradioaktivno obeležavanje probe metodom dopunjavanja DNK (oligo labelling).....</i>	56
3.5.7.	<i>Prenos RNK sa gela na najlonsku membranu.....</i>	57
3.5.8.	<i>Hibridizacija i detekcija radioaktivnih hibridizacionih signala...57</i>	
3.6.	Osnovne procedure rada sa proteinima	58
3.6.1.	<i>Priprema proteinskih ekstrakata.....</i>	58
3.6.2.	<i>Precipitacija proteina acetonom.....</i>	58
3.6.3.	<i>SDS-PAGE.....</i>	59
3.6.4.	<i>Priprema anti-FeAP9 antitela.....</i>	60
3.6.5.	<i>„Western blot“ analiza.....</i>	60
3.6.6.	<i>Prenos proteina sa gela na PVDF membranu.....</i>	60
3.6.7.	<i>Hibridizacija i detekcija signala.....</i>	61
3.6.8.	<i>Ekspresija rekombinantnog proteina.....</i>	62
3.7.	<i>In situ</i> RNK-RNK hibridizacija	63
3.7.1.	<i>Fiksiranje i dehidratacija tkiva.....</i>	63
3.7.2.	<i>Kalupljenje tkiva.....</i>	64
3.7.3.	<i>Sečenje mikrotomom i priprema mikroskopskih pločica.....</i>	64

3.7.4.	<i>Priprema RNK probe – in vitro transkripcija</i>	64
3.7.5.	<i>In situ pretretman preseka tkiva</i>	65
3.7.6.	<i>In situ hibridizacija</i>	66
3.7.7.	<i>Detekcija signala</i>	66
4.	REZULTATI	68
4.1.	Izolovanje gena za aspartične proteinaze heljde	68
4.1.1.	<i>Kloniranje i analiza parcijalnih cDNK sekvenci koje kodiraju dve tipične aspartične proteinaze heljde</i>	68
4.1.2.	<i>Izolovanje kodirajućeg regiona FeAP9 pune dužine modifikovanom 5' i 3' RACE metodom</i>	71
4.2.	Analiza kompletne kodirajuće FeAP9 sekvence	75
4.2.1	<i>Analiza sekundarne i trcijarne strukture</i>	80
4.3.	Izolovanje i analiza gena za FeAP9	83
4.3.1.	<i>Izolovanje i analiza 5' regulatornog regiona za FeAP9</i>	87
4.4.	Profil ekspresije gena za FeAP9	90
4.4.1.	<i>Analiza ekspresije FeAP9 u različitim organima heljde metodom „Northern“ blot</i>	90
4.4.2.	<i>Analiza ekspresije FeAP9 u različitim organima heljde metodom RT PCR</i>	92
4.4.3.	<i>Analiza ekspresije FeAP9 u uslovima abiotičkog stresa metodom Real-time PCR</i>	95
4.4.3.1.	<i>Standardizacija Real-time PCR za praćenje ekspresije gena za FeAP9</i>	95
4.4.3.2.	<i>Ekspresija FeAP9 gena u uslovima abiotičkog stresa</i>	98
4.4.4.	<i>In situ RNK-RNK hibridizacija</i>	101
4.5.	Analiza ekspresije FeAP9 proteina	102
4.5.1.	<i>Ekspresija rekombinantnog FeAP9 proteina</i>	102

APSTRAKT	
4.5.2. Imunodetekcija FeAP9 proteina.....	104
5. DISKUSIJA	108
6. ZAKLJUČCI	130
7. LITERATURA	133

APSTRAKT

Dve parcijalne cDNK (*FeAP9* i *FeAP12*) koje kodiraju aspartične proteinaze heljde su dobijene primenom metode PCR sa degenerativnim prajmerima dizajniranim na osnovu konzervisanih sekvenci biljnih aspartičnih proteinaza (AP). Korišćenjem 5' i 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends) pristupa, odgovarajući 5' i 3' krajevi sekvence *FeAP9* su amplifikovani i rekonstruisana je kompletna sekvenca. Utvrđeno je da *FeAP9* sadrži otvoreni okvir čitanja od 1521 bp koji kodira prekursori protein od 507 ak. Poređenje aminokiselinskih sekvenci sa ostalim biljnim AP pokazalo je da *FeAP9* i *FeAP12* imaju veliku homologiju sa tipičnim aspartičnim proteinazama i da sadrže PSI (plant specific insert) sekvencu karakterističnu samo za biljne AP. Uočena je i karakteristična struktura: signalna sekvenca, prosegment i nizvodna polipeptidna sekvenca sastavljena od dva lanca zrelog enzima koja su razdvojena PSI regionom. Dodatno je iz gDNK heljde izolovan i genomski klon *FeAP9* dužine 5374 bp koji sadrži 12 introna i ova strukturalna organizacija pokazuje sličnost sa većinom biljnih AP. Dodatno je otkriveno prisustvo lider introna koji je lociran samo 1 bp uzvodno od ATG u 5'UTR regionu AP gena. Kompjuterska analiza ovog introna ukazuje na prisustvo potencijalnih regulatornih sekvenci koje mogu biti uključene u odgovor na različite stimulse.

U cilju ispitivanja ekspresije gena za *FeAP* vršena su analize iRNK različitih organa heljde u normalnim fiziološkim stanjima ili u uslovima različitih faktora abiotičkog stresa. Primenjene su metode Northern blot, RT PCR i Real-time PCR uz upotrebu proba ili prajmera specifičnih za *FeAP9/FeAP12*. Pokazano je da se *FeAP9* eksprimira u semenu, listu, cvetu i korenu heljde, a maksimum ekspresije u semenu dostiže se u fazi 19-23 dana nakon cvetanja. Osim toga, uočeno je da nivo ekspresije *FeAP9* dramatično raste u senescentnom listu. Ekspresija *FeAP12* vezana je samo za seme, a profil ove ekspresije se razlikuje u odnosu na profil ekspresije *FeAP9*. Utvrđeno je takođe da se nivo *FeAP9* transkripta povećava u listovima biljaka koje su izlagane suši, mraku, mehaničkim povredama i salicilnoj kiselini, što ukazuje na moguću ulogu ovog gena u odgovoru na stres.

Takođe je proizveden rekombinanti *FeAP9* protein korišćenjem pMAL ekspresionog vektora, međutim protein je pretežno bio lokalizovan u inkluzionim telima, a različite metode

renaturacije nisu dovele do proteinazne aktivacije. Napravljena su primarna poliklonska antitela koja prepoznaju 14 ak dug oligopeptid koji odgovara N terminusu *FeAP9* proteina i korišćena su za imunodetekciju u analizi Western blot. Pri redukujućim uslovima antitelima smo detektovali protein od 47 kDa u svima analiziranim tkivima, osim u cvetu gde je bio prisutan protein od oko 52 kDa. U prisustvu β -merkaptioetanol detektovan je polipeptid of 32 kDa u stablu, listu, korenu i semenu, dok je polipeptid od 26 kDa uočen u cvetovima, što je verovatno posledica post-translacione obrade. Imunodetekcijom je pokazano da se *FeAP9* akumulira u semenu tokom sazrevanja i da je prisutan u početnim fazama germinacije. Osim toga, *FeAP9* je bio zastupljen u svim fazama razvića listova, kao i u tučkovima razvijenih cvetova heljde.

ABSTRACT

Two partial cDNAs (*FeAP9* and *FeAP12*) encoding for buckwheat aspartic proteinase were obtained by PCR with degenerate primers designed for conserved sequences of plant aspartic proteinases (APs). Using rapid amplification of cDNA ends approach, 5' and 3' ends appropriate to *FeAP9* has been amplified and full length sequence was reconstructed. It was found that *FeAP9* cDNA contained open reading frame of 1521 bp encoding precursor polypeptide of 507 aa. Alignment of deduced amino acid sequences with other plant APs demonstrated that *FeAP9* and *FeAP12* contained a plant specific insert of 104 amino acids (aa), a unique sequence of plant APs. Derived amino acid sequence comprised: signal sequence, prosegment and downstream polypeptide sequence that includes two chains of the mature enzyme separated by PSI. In addition, we have isolated genomic clone *FeAP9* of 5374 bp from buckwheat gDNA. Structural organization of aspartic proteinase AP9 gene was similar to majority of plant APs containing 12 introns. Also, we have revealed presence of the leader intron located 1 bp upstream of the ATG in 5'UTR region of AP gene. Computer analysis of the leader intron predicted the existence of regulatory sequences that could be involved in responses to different stimuli.

In order to investigate expression of the buckwheat FeAP, Northern blot analysis was performed with gene specific probe and total RNA isolated from different buckwheat organs, as well as from the seeds throughout development. It was shown that AP is expressed in buckwheat seeds, leaves, flowers and roots. Expression reached maximum at stage of 19-23 days after flowering. Also, it was detected that the level of AP expression dramatically increases during leaf senescence. In order to distinguish precise difference in expression of *FeAP9* and *FeAP12* genes we have designed primers from 3' UTR of *FeAP9* gene and gene specific primers from coding *FeAP12* sequence. RT PCR experiments indicate that *FeAP9* is ubiquitously expressed in all analyzed tissues, while *FeAP12* expression is seed specific and its profile of expression differs in relation to *FeAP9* profile. Furthermore we monitored *FeAP9* expression changes in response to a variety of abiotic stresses using Real-time PCR. We found that the

expression is upregulated by exposure to drought, darkness, wounding and SA, indicating a likely role for the gene in stress responses.

Finally, we have produced recombinant *FeAP9* protein using pMAL expression vector, but protein was located mostly in inclusion bodies and different refolding methods did not result in activation of the proteinase. Therefore, primary polyclonal antibodies against oligopeptide corresponding to the N-terminal 14 residues of *FeAP9* was produced and used in Western blot analysis. Under nonreducing condition protein of 47 kDa corresponding to *FeAP9* was detected in all analyzed tissues except in the flowers, where the protein of 52 kDa was present. In the presence of β -mercaptoethanol we detected polypeptide of 32 kDa in stems, leaves, roots and seeds, while 26 kDa polypeptide was noticed in flowers. Immunodetection showed that *FeAP9* was accumulated during seed development and it was present in early stages of germination. Moreover, *FeAP9* was detected in all stages of leaf development, as well as in pistils of fully opened buckwheat flowers.

SKRAĆENICE

- ak – amino kiselina
- AP – aspartične proteinaze
- APS – amonijum persulfat
- BCIP – 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat
- bp – bazni par
- BPB – bromophenol blue (bromfenol plavo)
- BSA – bovine serum albumin (albumin govedeg seruma)
- CCP – colloidal calcium phosphate (koloidni kalcijum fosfat)
- cDNK – komplementarna cDNK
- CDR1 – constitutive disease resistance
- CND41 – chloroplast nucleoid DNA binding protein
- cpm – counts per minute (otkucaji u minutu)
- CTAB – cetil trimetilamonijum bromid
- DAF – days after flowering (dani nakon cvetanja)
- DAI – days after imbibition (dani nakon imbibicije)
- DMSO – dimetilsulfoksid
- DTT – ditioneitol
- EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid (etilendiamintetrasirćetna kiselina)
- HRP – horseradish peroxidase
- HRP – horseradish peroxidase
- HvAP – aspartična proteinaza ječma (*Hordeum vulgare*)
- IPTG – izopropiltio- β -D-galaktozid
- iRNK – informaciona RNK
- kDa – kilodalton
- MBP – maltose binding protein
- NBT – nitroblue tetrazolium
- OsAsp1 – aspartična proteinaza pirinča (*Oryza sativa*)
- PBS – phosphate-buffered saline
- PCR – polymerase chain reaction (reakcija lančanog umnožavanja segmenta DNK)

PRE – presegment (signalni peptid)
PRO – propeptid
PRP – pathogenesis-related protein (protein vezan za patogenezu)
PSI – plant specific insert (insert specifičan za biljke)
PVDF – polivinil diflorid
PVP – polivinilpirolidon
RACE – rapid amplification of cDNA ends
RP – rezervni protein
rRNK – ribozomalna RNK
RT – reverzna transkripcija
SA – salicylic acid (salicilna kiselina)
SDS – sodium dodecyl sulfate (natrijum dodecil sulfat)
SDS-PAGE – sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS – Tris-buffered saline
TEMED – N,N,N',N'-tetrametilendiamin phenol blue
TGB – Tris-glycine buffer
Tris – tris (hidroksimetil) aminometan
tRNK – transportna RNK
UTR – untranslated region (netranslirajući region)

1. UVOD

1.1. Proteaze

1.1.1. Opšte karakteristike

Proteini predstavljaju najraznovrsnije organske molekule živih sistema neophodne za sve aspekte njihovog funkcionisanja i izgrađeni su od aminokiselina kao osnovnih gradivnih jedinica. Živi organizmi obezbeđuju aminokiseline iz životne sredine putem ishrane ili ih sami sintetisu i povezuju, formirajući biološke polimere t.j. polipeptide. Nakon sinteze polipeptida u živim sistemima se konstantno kontroliše njihova veličina i oblik posredstvom brojnih mehanizama kojima se oni pakuju u globularne oblike, čime nastaju proteini. Osim što predstavljaju strukturne komponente svih živih ćelija, proteini mogu vršiti i određene funkcije. Takvi proteini nazivaju se enzimima i oni predstavljaju katalizatore biohemijskih reakcija. Enzimi označeni kao proteaze katalizuju razgradnju proteina uvođenjem molekula vode u peptidnu vezu usled čega se raskidaju veze između amino kiselina. Ujedno, proteaze su esencijalne i za sintezu samih proteina kontrolišući njihovu kompoziciju, oblik, veličinu, obradu i finalnu razgradnju. Proteolitička obrada peptidnih veza je jedna od najzastupljenijih i najvažnijih enzimskih modifikacija proteina u kojoj proteaze igraju fudamentalnu ulogu. Proteini sintetisani kao prekursori podležu selektivnom enzimskom sečenju peptidnih veza, čime se prekursori prevode u zrele proteine. U većini slučajeva ovo je od ključne važnosti za formiranje finalne trodimenzionalne strukture proteina, čime je omogućeno njihovo pravilno lokalizovanje i obavljanje specifične funkcije. Aktivnost proteaza je selektivna i svaka od njih je odgovorna za sečenje između specifičnih aminokiselinskih sekvenci pri određenim uslovima. Osim toga, proteaze su uključene u proces degradacije nepravilno obrađenih proteina, u razgradnju proteina u toku normalnog ćelijskog ciklusa, kao i u rekonstrukciji tkiva (Puente *et al.*, 2003; Seife, 1997).



Obzirom da su proteolitički enzimi uključeni u mnogobrojne fiziološke funkcije: od jednostavne degradacije proteina tokom varenja hrane do signalne transdukcije u visoko regulisanim kaskadnim procesima, nije začuđujuća činjenica da su one mnogobrojne i raznovrsne. Postoji više od 500 humanih proteaza, a poznato je da oko 2% humanog genoma čine sekvence koje kodiraju ove enzime. One imaju suštinsku ulogu u nastajanju, rastu, sazrevanju, starenju kao i smrti svih živih organizama kontrolišući aktivaciju, sintezu i modifikaciju proteina u većini fizioloških procesa. Većina znanja o strukturi, funkcijama koje obavljaju i biološkoj ulozi proteaza proistekla je iz studija na humanim i mikrobijalnim enzimima (Barrett *et al.*, 1998).

U medicini proteaze predstavljaju veoma važne potencijalne ciljane molekule za različite medicinske intervencije, obzirom da je poznato da mutacije u preko 50 humanih proteaza dovode do nastanka naslednih t.j. genetskih bolesti. Takođe, usled faktora spoljašnje sredine može doći do prekomerne ili preterano smanjene produkcije samih proteaza ili njihovih inhibitora i aktivatora što dovodi do patoloških stanja i bolesti, a poznato je da virusi, bakterije i paraziti koriste proteaze za širenje infekcije u domaćinima. Zbog svega navedenog naučnici nastoje da razviju i sintetišu nove generacije specifičnih proteaznih inhibitora, potencijalno moćnih terapeutika. Neke od humanih proteaza, kao što su kalikreini i katepsini, su identifikovani kao važni prognostički indikatori raznih bolesti, a neke proteaze su sastavni deo eksperimentalnih vakcina, koje bi se koristile za odbranu od infektivnih bolesti kao što je malarija.

Očigledno, karakterizacija specifičnih proteolitičkih enzima, kao i bolje razumevanje njihove funkcije u biološkim procesima ima veliki značaj.

1.1.2. Nomenklatura: proteaze, proteinaze i peptidaze

Izraz “proteaze” se već dugo koristio kao naziv za enzime koji degraduju proteine hidrolizujući peptidne veze kada su Grassmann & Dyckerhoff (1928) uočili da postoje dva veoma različita tipa ovih enzima. Oni su primetili da neki od proteolitičkih enzima deluju najbolje na intaktne proteine, dok drugi pokazuju preferenciju prema malim peptidima kao supstratima. Na osnovu ove pojave autori su predložili novi termin “proteinaze” za proteaze koje pokazuju specifičnost za intaktne proteine kao supstrate. Priroda ovih razlika postala je još uočljivija kao rezultat rada na sintetičkim peptidnim supstratima sa ili bez blokiranih terminalnih ostataka, kada su Bergmann & Ross (1936) uveli dodatne termine: “endopeptidaze” i “egzopeptidaze”. Danas je prihvaćena takva terminologija na osnovu koje se sve hidrolaze peptidnih veza nazivaju proteaze ili peptidaze (Barrett & McDonald, 1936). Ovo je veoma opšti termin koji se odnosi na sve proteolitičke enzime bez obzira na mehanizam njihove aktivnosti. U okviru proteaza definišu se dve grupe enzima: proteaze koje deluju na unutrašnje peptidne veze označene kao “proteinaze” ili “endopeptidaze” i proteaze koje seku terminalne peptidne veze t.j. “egzopeptidaze”.

1.1.3. Standardna klasifikacija proteaza

Aminokiseline specifične za aktivno mesto, trodimenzionalna struktura i hemijski mehanizmi katalitičke aktivnosti su osnovni parametri za klasifikaciju proteinaza. Klasifikacija je takođe bazirana i prema njihovoj molekularnoj masi, naelektrisanju, međusobnoj homologiji, supstratnoj specifičnosti i osetljivosti prema različitim specifičnim inhibitorima. Prvobitno su ovi enzimi bili klasifikovani u četiri osnovne grupe: serinske, cisteinske, aspartične i metalo –

proteaze (Barret *et al.*, 1998). Nedavno su još dva tipa proteaza dodata u opštu klasifikaciju: treoninske proteinaze koje su konstitutivni elementi 26S proteazoma (Seemüller *et al.*, 1995; Wlodawer *et al.*, 1995) i glutaminske proteinaze koje su pronađene isključivo u filamentoznim gljivama (Sims *et al.*, 2004). Alternativni način klasifikacije proteaza može biti i na osnovu optimalnog pH na kome su aktivne, tako da se prema ovom parametru proteaze se dele na: kisele, neutralne i bazne.

1.1.4. Serinske proteaze

Serinske proteaze (serinske endopeptidaze ili proteinaze) predstavljaju jednu od najvećih grupa proteolitičkih enzima i trenutno prema MEROPS bazi podataka postoji preko 50 familija serinskih proteaza (Barrett & Rawlings, 1995). Karakteristične su po tome što im je jedna od amino kiselina u aktivnom mestu serin, a pronađene su i u jednoćelijskim i u složenim organizmima (Polgár, 2005). Serinske proteinaze su grupisane u klanove u okviru kojih dele strukturnu sličnost, a dodatno su podeljene u podgrupe – familije u koje su svrstani enzimi sa sličnim sekvencama. Glavnim klanovima pripadaju: himotripsinu i subtilizinu slične proteinaze, alfa/beta hidrolaze i signalne peptidaze. U evolutivnom smislu serinske proteinaze su prevashodno služile kao digestivni enzimi. U sisarskim sistemima, one su evoluirale genskim duplikacijama kako bi obavljale raznovrsne funkcije u imunskom sistemu, inflamaciji i zgrušavanju krvi. Himotripsin, tripsin i elastaze su najpoznatiji predstavnici klana himotripsinu sličnih proteinaza (Blow, 1976; Huber & Bode, 1978). Sva tri enzima se sintetišu u ćelijama pankreasa u obliku zimogena, sekretuju se u tanko crevo i svaki od njih katalizuje vrlo specifične reakcije delujući na različite regione polipeptida u zavisnosti od bočnih lanaca amino kiselina

koje okružuju mesto sečenja. Himotripsin je odgovoran za sečenje između hidrofobnih, tripsin između pozitivno naelektrisanih, a elastaza između neutralnih amino kiselina. Kombinacija ova tri enzima omogućava efikasno varenje proteina. Subtilizin je prokariotska serinska proteaza koja je slična himotripsinskom klanu po katalitičkom mehanizmu i katalitičkoj trijadi (His-Ser-Asp), ali su evolutivno nesrodne sa himotripsinom i njemu sličnim proteazama. Ovo je primer konvergentne evolucije obzirom da je isti mehanizam evoluirao dva puta nezavisno tokom evolucije. Inhibitori serinskih proteinaza su označeni kao serpini od kojih su najpoznatiji alfa 1-antitripsin, alfa 1-antihimotripsin, antitrombin, neuroserpini i plazminogen inhibitor 1. Promene u sintezi i ekspresiji serinskih proteaza mogu dovesti do pojave raznih bolesti, kao što su tromboze, kancer i nerodegenerativne bolesti.

Većina saznanja o serinskim proteazama proističe iz analiza humanih serinskih proteaza, dok se o biljnim proteazama malo zna i pretpostavlja se da su uključene u regulaciju procesa razvića i diferencijacije, kao i u odbrambene mehanizme biljaka (Tripathi & Sowdhamini., 2006). Biljne serinske proteinaze učestvuju u mikrosporogenezi, simbiozi i deo su signalnih puteva koji vode Rubisco proteolizi izazvanoj fungalnim toksinom. Osim toga, kod nekih od biljnih serinskih proteinaza došlo je do diverzifikacije funkcije, obzirom da se ponašaju pre kao aciltransferaze nego kao hidrolaze, i kao takve uključene su u regulaciju sekundarnog metabolizma kod biljaka (Schaller, 2004).

1.1.5. Cisteinske proteaze

Cisteinske proteaze su široko rasprostranjene među svim živim organizmima i gotovo sve proteaze ove familije su lokalizovane u lizozomima gde učestvuju u finalnoj neselektivnoj

proteinskoj degradaciji. Ipak u skorije vreme su otkriveni i novi članovi koji imaju ograničenu tkivnu ekspresiju što ukazuje da ove proteaze mogu uzeti učešće i u specifičnim biološkim funkcijama. U određenim uslovima cisteinske proteaze se mogu naći van lizozoma što najčešće rezultuje patološkim stanjima. Katalitički mehanizam cisteinskih proteaza uključuje sulfhidrilnu grupu cisteina koji zajedno sa histidinom čini katalitičku dijadu. Najzastupljenija među njima je klasa papainskih cisteinskih proteaza koja pored papaina, sadrži, karikain, bromelain, aktinidin, ficin, aleurain, kruzipain kao i kaspaze i katepsine (Turk *et al.*, 2000). Pored ove klase poznata je i klasa nelizozomalnih enzima označenih kao kalpaini kojima je za aktivnost neophodan Ca^{++} . Cisteinske proteinaze su relativno male molekulske mase i sintetišu se kao preproenzimi koji se aktiviraju u lizozomima u uslovima pH koji je niži od neutralnog. Međutim, njihova aktivnost takođe može biti regulisana specifičnim endogenim inhibitorima kao što su cistatini i stefini. Uloga ovih proteaza se povezuje sa apoptozom, adaptivnim imunskim odgovorom, prohormonskim procesovanjem i remodelovanjem ekstraćelijskog matriksa tokom razvića kostiju. Uočeno je da su cisteinske proteaze uključene i u nastanak brojnih bolesti kao što su reumatoidni artritis, osteoporoza, Alchajmerova bolest, mišićna distrofija i kancer. U najvećem broju ovih bolesti otkriveno je da su cisteinske proteinaze prisutne u ekstraćelijskoj t.j. ekstralizozmalnoj formi (Chapman *et al.*, 1997).

Za biljne cisteinske proteaze se predpostavlja da zbog velike zastupljenosti učestvuju u važnim ćelijskim procesima. Poznata je njihova uloga u odbrani od insekata, u procesima razvića, kao i u programiranoj ćelijskoj smrti (Rowan, 1990). Najpoznatije biljne cisteinske proteaze su poreklom iz nezrelih plodova papaje, ananasa i kivija u kojima su zastupljene u veoma velikoj količini (npr, do 1g po plodu ananasa). Proteaze izolovane iz ovog voća našle su

primenu u eliminisanju intestinalnih Nematoda obzirom da mogu degradovati kolagenu slične proteine koji izgrađuju kutikulu ovih crevnih parazita (Stepek *et al.*, 2004).

1.1.6. Metaloproteaze

Metaloproteaze predstavljaju proteolitičke enzime u čije je katalitičke mehanizme uključen metal. Aktivnost najvećeg broja metaloproteaza zavisi od cinka, dok je za aktivnost nekih od njih neophodno prisustvo kobalta ili mangana. Tretman helatirajućim agensima kao što je EDTA koji uklanja cink iz aktivnog mesta dovodi do kompletne inaktivacije metaloproteaza. Jon metala je za većinu metaloproteaza povezan posredstvom konsenzus sekvenci HEXXH, dok neke matriksne metaloproteaze imaju produžen cink vezujući motiv (HEXXHXXGXXH) u kome dominiraju tri histidina (Hooper, 1994). U skorije vreme opisana je nova familija ATP zavisnih metaloproteaza koja se odlikuje po prisustvu visoko konzervisanog ATP vezujućeg domena – AAA motiv (Patel & Latterich, 1998).

Neke od metaloproteaza uključene su u remodelovanje tkiva učestvujući u degradaciji eksracelijskog matriksa što se dešava prilikom fizioloških procesa kao što su morfogeneza, angiogeneza ili povređivanje. Neke imaju ulogu u ćelijskom prenosu signala zahvaljujući sposobnosti da otpuštaju citokine ili faktore rasta sa ćelijske površine isecanjem preproteina vezanih za membrane (Matrisan, 1992). Poremećeno funkcionisanje metaloproteaza najčešće dovodi do različitih inflamatornih, degenerativnih i malignih bolesti kao što su na primer osteoartritis, gingivitis, kornealni epidermalni ili gastrični ulceritis i sl.

Biljne metalo-proteaze su, kao i ostale familije proteaza, u odnosu na bakterijske i sisarske veoma slabo izučene. Poznato je da je njihova ekspresija u biljkama strogo programirana tokom razvića i vezana



isključivo za tkivo lista (Ramos & Selistre de Araujo, 2001). U genomu Arabidopsisa identifikovan je 81 gen koji kodira metalo-proteaze i ovi geni su svrstani u 12 klanova. Najpoznatija iz ove familije je stromalna procesujuća endopeptidaza (SPP) koja je uključena u modifikaciju hloroplastnih proteina kodiranih nukleusnim genima i sintetisanih u citosolu. Njihovo uvođenje u plastid zavisi od amino-terminalnog targetujućeg signala, t.j. tranzitnog peptida čije je uklanjanje omogućeno dejstvom SPP metalo-proteaze (Schaller, 2004).

1.1.7. Aspartične proteaze

Aspartične proteinaze (AP) (EC 3.4.23) su široko rasprostranjene među kičmenjacima, biljkama, nematodama, kvascima, bakterijama i virusima (Davies, 1990; Dunn, 2002). Na osnovu MEROPS (<http://www.merops.ac.uk>) baze podataka aspartične proteinaze su svrstane u 15 familija na osnovu homologije aminokiselinskih sekvenci i 6 klanova na osnovu evolutivnih odnosa i tercijarne strukture. Većina AP pripada A1 familiji u okviru koje su dve subfamilije: A1A - pepsinu slične proteaze (gastricin, rennin, himozin, napsini, katepsini D i E, itd.) i A1B – nepentensinu slične proteaze (CND41, nucelin, plazmepsini, itd.). Do sada okarakterisane aspartične proteaze iz familije A1 sadrže dve asparaginske kiseline esencijalne za njihovu aktivnost, koje su smeštene u okviru dve katalitičke trijade (DT/SG i DSG) aktivnog mesta. Aspartične proteaze su aktivne na kiselom pH, hidrolizuju peptidne veze između hidrofobnih aminokiselina i specifično su inhibirane pepstatiom A, heksapeptidom poreklom iz *Streptomyces*-a (Rawlings & Barret, 1995). Većina aspartičnih proteinaza familije A1 se sintetiše kao prepropeptid, koji se zatim prevodi u aktivni protein, isecanjem signalnog peptida, a zatim propeptida. Propeptid ima ulogu održavanja stabilnosti proenzima i njegovim isecanjem zimogen se prevodi u aktivnu formu. Obzirom da za razliku od serinskih, cisteinskih i metalo-

proteaza imaju isključivo endopeptidaznu aktivnost, u literaturi se za AP ravnopravno koriste nazivi aspartične proteaze, proteinaze ili endopeptidaze.

Smatra se da sve AP imaju zajedničko evolutivnog poreklo. Zanimljivo je da, iako su funkcije aspartičnih proteinaza veoma raznovrsne, asparaginske kiseline koje čine njihovo aktivno mesto, kao i okolne sekvence su visoko konzervisane. Predpostavlja se da veliki rasep u okviru aktivnog mesta u koji se smešta supstrat omogućava brojne alternacije, a bez nastanka dodatnih proteinskih domena. Inače, ovi enzimi najčešće poseduju dvodomensku strukturu, što ukazuje da su aspartične proteinaze verovatno nastale genskim duplikacijama i fuzijama (Tang & Wong, 1987). S obzirom da retrovirusne aspartične proteinaze imaju samo jedno aktivno mesto i formiraju aktivne dimere, pretpostavlja se da su oni ili fosilni ostaci predačke AP (Pearl *et al.*, 1987), ili da su nastali od gena domaćina u kome je došlo do delecije (Rao *et al.*, 1991).

Aspartične proteinaze imaju veoma dugu istoriju što se tiče upotrebe i izučavanja. Hiljadama godina unazad himozin, AP iz želuca preživara se koristi kao sirilo u proizvodnji sira, a takodje su AP korišćene za pripremu soja sosa u drevnoj Kini. Prva izučavanja na polju enzima vršena su upravo na pepsinu početkom 19 veka (Fruton, 2002). Većina dosadašnjih saznanja o ulozi aspartičnih proteinaza proističe iz studija na enzimima mikroorganizama i životinja. Među njima najbolje su okarakterisani predstavnici AP iz familije A1 pepsin, himozin, renin, katepsin D i napsini, a koje imaju vrlo raznovrsne funkcije.

Pepsin i himozin predstavljaju želudačne digestivne enzime koji se proizvode u zimogenoj formi, i nakon sekretovanja u lumen želuca usled niskog pH (2-3) bivaju autokatalitički aktivirani. Aktivne forme su uključene u digestiju proteina koji se prethodno delimično u kiseloj sredini želudca denaturišu. Pepsin usitnjava proteine do peptona, dok

himozin prevodi kazeinogen, protein mleka u parakazein, a oni dalje bivaju podvrgnuti potpunoj degradaciji od strane serinskih i cisteinskih proteaza (Lee & Ryle, 1967; Visser *et al.*, 1987).

Renin je enzim koga proizvode bubrezi i koji deluje na angiotensinogen proizveden u jetri. Renin je visoko specifična endopeptidaza koja seče peptidnu vezu isključivo između dva leucina u angiotensinogenu. Na ovaj način formira se angiotenzin I, koji se konvertuje u angiotenzin II. Angiotenzin II je jak vazokonstriktor, a takođe stimuliše sintezu aldosterona koji izaziva zadržavanje soli i vode u bubrezima što vodi povećanju arterijskog pritiska. Na ovaj način renin posredno učestvuje u regulaciji krvnog pritiska i balansa elektrolita u organizmu (Inagami, 1989).

Katepsin D je lizosomalna aspartična proteinaza uključena u proces programirane ćelijske smrti. Sintetiše se u normalnim i malignim ćelijama pod kontrolom steroidnih hormona i pretpostavlja se da učestvuje u razgradnji ekstracelularnog matriksa. Jedna od funkcija ovog enzima je sazrevanje i degradacija endometrijuma za vreme menstrualnog ciklusa. Zimogena forma enzima, prokatepsin D, identifikovana je u humanom i goveđem mleku. Smatra se da njegova funkcija može biti degradacija proteina mleka. Katepsin D je takođe sposoban da aktivira neutrofle i limfocite, te je pretpostavljena i njegova uloga u aktivaciji imunske zaštite novorođenčadi koja se doje. Katepsin D je prekomerno eksprimiran u ćelijama raka dojke i stimuliše njihovu proliferaciju. Zbog povećane ekspresije u malignim tkivima, katepsin D se koristi kao biološki marker za procenu odgovora na preoperativnu hemoterapiju različitih kancera (Vetvicka & Fusek, 1994).

Napsini A i B su detektovani u plućima i bubrezima i visoko su eksprimirani kod bolesnika obolelih od adenokarcinoma. Smatra se da napsin A ima ulogu u funkcionisanju

normalnog alveolarnog epitela, kao i da je uključen u proteolitičko procesovanje surfaktantnih prekursora (Chuman *et al.*, 1999).

Aspartična proteinaza iz familije A2, koja je najbolje okarakterisana je HIV-1 retropepsin. Za razliku od članova familije A1, ovaj enzim ima samo jednu asparaginsku kiselinu u aktivnom mestu, zbog čega je enzim aktivan jedino kao homodimer, sastavljen od dve identične subjedinice molekulske mase 11 kDa. Aktivan je na neutralnom pH i učestvuje u maturaciji humanog virusa imunodeficijencije sečenjem gag-pol poliproteina na osam mesta između hidrofobnih aminokiselina (Seelmeir *et al.*, 1988).

Presenilin je aspartična proteinaza iz familije A22, čije aktivno mesto čine dva aspartata, ali su oni u okviru drugačijih konsenzus sekvenci u odnosu na A1 familiju. Ova proteinaza učestvuje u formiranju amiloidnog β peptida, čiji agregati dovode do Alchajmerove bolesti. Presenilin je ciljna proteinaza za dizajniranje različitih inhibitora u cilju lečenja ovog oboljenja (Dunn *et al.*, 2002).

1.2. Biljne aspartične proteinaze

1.2.1. Ime i istorija istraživanja

Aspartične proteinaze su zastupljene u čitavom biljnom carstvu i njihovo prisustvo detektovano je u različitim tkivima biljaka koje su do sada analizirane. U literaturu je od 1997. god. uvedeno ime **fitepsini** koje se odnosi na sve biljne aspartične proteinaze, međutim, često se enzimima ove klase daju imena koja ukazuju na biljnu vrstu ili tkivo iz koga su prečišćeni.

Najbolje okarakterisani su fitepsini iz karduna (*Cynara cardunculus* L.) i ječma (*Hordeum vulgare* L.). Cvetovi karduna, biljke koja je slična artičoki, poseduju sposobnost da



koagulišu mleko i koriste se u tradicionalnom pravljenju sira u Španiji i Portugaliji. Ova aktivnost može se pripisati familiji AP, koja se sastoji od tri enzima: cinaraze 1-3, koje su izolovane iz cvetova ove biljke (Cordeiro *et al.*, 1992; Heimgartner *et al.*, 1990). Kasnije je ova grupa preimenovana u ciprozini 1, 2 i 3 (cyprosins *od engl. cynara protease-syn*) i određena je njihova primarna struktura (Cordeiro *et al.*, 1994). Druga dva fitepsina, izolovana iz cvetova karduna i označena kao kardozin A i B, naknadno su intenzivnije proučavani (Barros & Malcata, 2000; Egas *et al.*, 2000; Faro *et al.*, 1999; Ramalho-Santos *et al.*, 1997; Ramalho-Santos *et al.*, 1998; Verissimo *et al.*, 1996; Vieira *et al.*, 2001) i određena je njihova kristalna struktura (Frazão *et al.*, 1999). Seme ječma ima izrazitu fitepsinsku aktivnost (Morris *et al.*, 1985; Sarkkinen *et al.*, 1992) koja je, pretpostavlja se, uključena u inicijaciju hidrolize rezervnih proteina na početku germinacije. Fitepsin iz semena ječma je prvi iz ove klase biljnih enzima kome je determinisana primarna struktura (Runeberg-Ross *et al.*, 1991). Odgovarajući enzim iz dormantnog semena ječma, označen kao HvAP je prečišćen i okarakterisan (Costa *et al.*, 1997; Kervinen *et al.*, 1993; Runeberg-Ross *et al.*, 1994; Sarkkinen *et al.*, 1992; Törmäkangas *et al.* 1994). Takođe je proučavana njegova modifikacija na putu ka vakuolama u kojima je smešten kao zreo enzim (Glathe *et al.*, 1998) i određena je kristalna struktura zimogene forme enzima (Kervinen *et al.*, 1999).

Na osnovu ovih kao i mnogih drugih studija postalo je očigledno da fitepsini pokazuju visok stepen homologije u pogledu aminokiselinske sekvence, strukture i osnovnih biohemijskih karakteristika sa životinjskim i mikrobnim AP. Međutim, mnogi fitepsini sadrže dodatnu proteinsku sekvencu od oko 100 amino kiselina označenu kao PSI (**p**lant-**s**pecific **i**nsert), (Mutlu & Gal, 1999). Aminokiselinska sekvencu ovog domena nema homologiju sa sisarskim ili mikrobnim AP, tako da PSI predstavlja jedinstvenu strukturnu karakteristiku fitepsina.

1.2.2. Aktivnost

Za sve biljne aspartične proteinaze karakteristično je da im je aktivnost maksimalna na niskom pH, da su osjetljive na prisustvo pepstatina A i da je prevashodno usmerena na hidrolizu kovalentnih veza između hidrofobnih aminokiselina. Najdetaljnije analize aktivnosti biljnih AP vršene su na fitepsinima ječma poreklom iz različitih tkiva. Aktivnost je merena kao pepstatin A senzitivno "sečenje" proteina na pH 3,7 korišćenjem hemoglobina kao supstrata (Sarkkinen *et al.*, 1992; Törmäkangas *et al.*, 1994), kao i elektroforetskom metodom u kojoj je korišćen nativni gel sa imobilizovanim edestinom (Wrobel & Jones, 1992; Zhang & Jones, 1995). Prečišćeni enzim hidrolizuje i hromoforni supstrat između Phe i Nph (**p-nitro-D-phenilalanine**), optimalno na pH 3,5-4,1 (Kervinen *et al.*, 1993; Sarkkinen *et al.*, 1992). Slična specifičnost pokazana je i kod mnogih drugih fitepsina sa manjim varijacijama (Bleux *et al.*, 1998; Faro *et al.*, 1995; Polanowski *et al.*, 1985; Ramalho-Santos *et al.*, 1996). Osim hemoglobina ostali *in vitro* supstrati za fitepsine mogu biti albumin, gliadin, hromoforni peptidi, kazein (Mutlu & Gal, 1999) i luciferaza (Amidon *et al.*, 1999).

Ječamski fitepsin je inhibiran pepstatinom A, kao i drugim inhibitorima analognim supstratu, koji ostvaruju inhibitorni efekat prema sisarskoj lizosomalnoj AP - katepsinu D (Sarkkinen *et al.*, 1992). Serija sintetskih inhibitora konstruisanih za sisarske i retrovirusne AP su testirani na rekombinantnim enzimima karduna (ciprozini) i neki od inhibiranih enzima pokazali su K_i vrednosti u nanomolarnom opsegu (White *et al.*, 1999). Endogeni inhibitori su detektovani i prečišćeni iz nekoliko biljnih vrsta: paradajza (Cater *et al.*, 2002; Hansen & Hannapel, 1992), krompira (Maganja *et al.*, 1992; Mares *et al.*, 1998) i tikve (Christeller *et al.*, 1998). Ovi inhibitori pokazuju svoj inhibitorni efekat i na sisarskim AP, kao što su katepsin D i pepsin, kao i na kvaščevoj proteinazi A.

1.2.3. Primarna struktura

Većina aspartičnih proteinaza koja je do sada identifikovana se sintetiše kao jednolančani preproenzim da bi se zatim konvertovale u zreli enzim koji može biti u jednolančanoj ili dvolančanoj formi. Primarni translacioni produkt većine fitepsina sličan je odgovarajućim produktima sisarskih i mikrobijalnih gena za aspartične proteinaze. On sadrži signalnu sekvencu, koja je praćena auto-inhibitornim peptidom, dužine oko 40 aminokiselina (propeptid) i sekvencom koju poseduje zreo enzim (Cordeiro *et al.*, 1994; Domingos *et al.*, 2000, Faro *et al.*, 1999; Hiraiwa *et al.*, 1997; Runeberg-Ross *et al.*, 1991; Vieira *et al.*, 2001), (**Slika 1**). Primarna struktura fitepsina sadrži nekoliko domena koji su zastupljeni u svim AP. Oni obuhvataju dve konzervisane aminokiselinske sekvence u katalitičkom aktivnom mestu: Asp-Thr-Gly i Asp-Thr/Ser-Gly. Kod sisara i mikroorganizama sekvenca Asp-Thr-Gly se nalazi na oba mesta i još uvek nije poznato kakav je biološki značaj ove promene. Jedinstvena karakteristika mnogih fitepsina je dodatna sekvenca sastavljena od oko 100 aminokiselina, označena kao PSI (*od engl. plant-specific insert*), koja je locirana na C-terminalnom regionu proteina. Zbog prisustva PSI regiona primarni translacioni proizvod fitepsina (oko 500 AK) je znatno veći od mnogih odgovarajućih sisarskih enzima. U okviru PSI regiona nalazi se jedno konzervisano i funkcionalno N-glikozilovano mesto (Costa *et al.*, 1997; Frazão *et al.*, 1999). Takođe je utvrđeno da je PSI region sličan sapozinima iz sisarskih ćelija. Šest konzervisanih Cys, mesto za glikozilaciju, kao i konzervisani Pro i Tyr/Phe ostaci u PSI domenu su analogni onim kod sapozina (Guruprasard *et al.*, 1994; Ponting & Russell, 1995; Schuette *et al.*, 2001). Za sapozine je poznato da interaguju sa lipidima i iniciraju degradaciju sfingolipida kod životinjskih ćelija, pored ostalih funkcija (Schuette *et al.*, 2001; Vaccaro *et al.*, 1999). Slično tome, mesto za vezivanje za membranu je identifikovano u PSI regionu, što je bazirano na kristalnoj strukturi

ječamskog fitepsina (Kervinen *et al.*, 1999). Na osnovu toga, PSI domen ima pretpostavljenu funkciju ciljnog signala za vakuole, koji dovodi fitepsin u kontakt sa membranama, kao i sa receptorima vezanim za membrane u Goldžijevom kompleksu. Na ovaj način se formiraju transportne vezikule koje sadrže fitepsin i koje se otpuštaju od Goldžijevog kompleksa do vakuola. Takođe je pokazano da delecije u PSI regionu vode sekreciji oštećenog ječamskog fitepsina u duvanskim ćelijama, dok se intaktni protein transportuje u vakuole (Törmäkangas *et al.*, 2001). PSI region može imati i odbrambenu ulogu protiv napada patogena. Egas *et al.*, 2000 su demonstrirali da proforma kardozina A može da interaguje sa fosfolipidnim membranskim vezikulama *in vitro*, dok mutant kome nedostaje PSI region nema tu sposobnost. Ova interakcija PSI regiona sa vezikularnim membranama dovodi do pražnjenja vezikularnog sadržaja. Iz tog razloga autori pretpostavljaju da PSI region ima ulogu odbrambenog oružja uzrokujući oštećenje membrane patogena. Osim toga, fitepsini su visoko ekspimirani u senescentnom i apoptoskom tkivu. Neke studije ukazuju na značaj PSI regiona za pravilnu obradu i pakovanje prekursorskog proteina. Ekspresija pirinčanog fitepsina orizasina1, u *E.coli* sa ili bez PSI regiona nije imala efekta na enzimsku aktivnost procesovanog enzima, međutim način obrade je bio izmenjen (Asakura *et al.*, 2000). Kada je fitepsin Cynare, cinaraza bila ekspimirana u *Pichia pastoris* bez PSI regiona, neobrađeni i pogrešno upakovani prekursorski protein je bio akumuliran ukazujući na ulogu PSI regiona u korektnom pakovanju i obradi enzima (White *et al.*, 1999).



Slika 1. Šematski prikaz primarnog translacionog produkta

Iako mnogi do sada detaljno izučavani fitepsini poseduju veliku homologiju na nivou aminokiselinske sekvence, neki noviji rezultati ukazuju da AP predstavljaju veoma raznovrsnu klasu enzima u biljnom carstvu. Poslednjih godina otkriveno je nekoliko AP koje nemaju tipičnu strukturu aspartičnih proteinaza. Zajednička karakteristika novog tipa AP je da ne poseduju PSI domen i u literaturi ove proteinaze se najčešće označavaju kao atipične aspartične proteinaze. Jedan od takvih primera je proteinaza slična fitepsinu, molekulske mase 45 kDa (nucelin), iz ovarijuma ječma, koja se eksprimira nakon polinacije u nucelanim ćelijama, po čemu je i dobila ime. Iako primarna struktura ukazuje da se radi o aspartičnoj proteinazi na osnovu konzerviranog DTG/DSG motiva, ovom enzimu nedostaju propeptidni i PSI region (Chen & Foolad, 1997). Takođe, hloroplasni nukleoidi duvana sadrže enzim sličan fitepsinu (CND41), molekulske mase od 40,5 kDa i sa konzervisanim regionom u okviru aktivnog mesta, ali cDNK koja kodira taj protein ne poseduje ni PSI region, ni propeptidnu sekvencu (Nakano *et al.*, 1997). N-terminalni kraj čini tranzitni peptid dužine 120 aminokiselina, koji predstavlja signal za hloroplastnu lokalizaciju, hidrofoban je i bogat serinom i treoninom. Ovo je jedna od retkih aspartičnih proteinaza koja ima dvostruku funkciju: predstavlja i DNK vezujući protein i proteinazu (Murakami *et al.*, 2000). Još jedan od primera atipičnih aspartičnih proteinaza je CDR1 (CDR *od engl.* "Constitutive Disease Resistance"). CDR1 je izolovana iz listova mutantnih linija *Arabidopsis*, koje su pokazivale povećanu otpornost na patogenu bakteriju *Pseudomonas syringae*. Poseduje signalni peptid od 25 aa, ali joj nedostaju prosegment i PSI region. Kao i kod tipičnih AP, konsenzus sekvence DTG/DSG formiraju aktivno mesto proteinaze. Eksprimira se u listovima i ima ekstracelularnu lokalizaciju. Smatra se da je proteazna aktivnost CDR1 neophodna u indukciji lokalnog i sistemskog odgovora, jer oni izostaju ukoliko se inhibira proteazna aktivnost CDR1 pepstatinom A (Xia *et al.*, 2004). Slični primeri atipičnih aspartičnih

proteinaza su aspartična proteinaza pirinča *OsAsp1* - nucelinski ortolog iz pirinča i nepentesini I i II: iz karnivorne biljke *Nepenthes* (Bi *et al.*, 2005; An *et al.*, 2002).

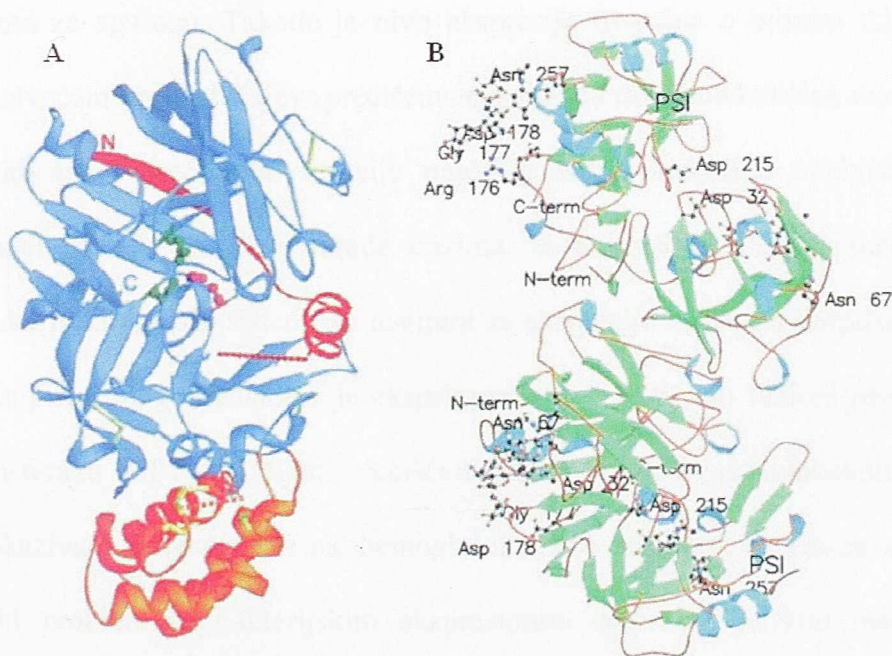
Sedmočlana familija glikozilfosfatidilinozitol (GPI) vezujućih AP je identifikovana u genomu *Arabidopsis thaliana* (Borner *et al.*, 2002). U genomu ove biljke nalazi se najmanje 66 pretpostavljenih fitepsinskih gena, od čega 60 sadrži potpunu konzervisanu sekvencu u aktivnom mestu, a 6 članova su verovatno neaktivni jer ne sadrže Asp u katalitičkom centru. Interesantno je da samo 4 člana ove familije sadrži PSI region.

1.2.4. Tercijarna struktura

Do sada je razrešena kristalna struktura fitepsina ječma (Kervinen *et al.*, 1999) i fitepsina Cinare (Frazão *et al.*, 1999) i oba pokazuju strukturu tipičnu za familiju aspartičnih proteinaza. Struktura zrelog fitepsina ječma sadrži dva slična "β-barel" domena sa dva Asp: Asp36 i Asp223, koji sačinjavaju aktivno mesto i koji su locirani u interdomenskom udubljenju. Dno udubljenja je prekriveno sa šest lanaca β-naborane ploče, koji štite unutrašnje hidrofobno jezgro (**Slika 2A**). Samoinaktivirajući mehanizam, koji je prisutan kod ječamske AP i koji se javlja kod ostalih sličnih fitepsina, razlikuje se od mehanizma inaktivacije želudačnog AP zimogena, pepsinogena (Bernstein & James, 1999; Kervinen *et al.*, 1999). Propeptid fitepsina se obavija oko zrelog proteina i njegov N-terminalni lanac je uključen u formiranje interdomenske šestolančane β-naborane ploče. Helikoidni deo propeptida je smešten u blizini aktivnog mesta i zajedno sa prvih 13 aminokiselina zrelog enzima dovodi do njegovog potpunog blokiranja.

Kristalna struktura zrelog kardozina A (**Slika 2B**) (Frazão *et al.*, 1999) je poređena sa zimogenom formom ječamskog fitepsina i ustanovljeno je da se tokom aktivacije biljnih

fitepsina dešavaju vrlo male promene (Kervinen *et al.*, 1999). Kardozin A ima dva N-glikozilovana mesta (Asn67 i Asn257) i s obzirom da su lokalizovana daleko od aktivnog mesta, izgleda da glikani imaju važnu ulogu u stabilizaciji i pravilnoj obradi prekursora, a ne u aktivnosti. Prisustvo motiva koji se vezuje za ćeliju: Arg-Gly-Asp (RGD), predstavlja jedinstvenu karakteristiku kardozina A. Kristalna struktura pokazuje da je RGD motiv smešten suprotno od aktivnog mesta i da je istaknut na površini molekula što ukazuje na njegovu ulogu u protein-protein interakcijama.



Slika 2. **Kristalna struktura fitepsina ječma i kardozina A** (preuzeto iz Kervinen *et al.*, 1999 i Frãzao *et al.*, 1999). A fitepsin ječma i kardozin A

Kristalna struktura fitepsina ječma pokazuje i orijentaciju PSI regiona u odnosu na delove zrelog enzima. On je vezan za C-terminalni domen enzima pomoću dve fleksibilne peptidne veze, dajući izvesnu slobodu u pozicioniranju PSI regiona u odnosu na ostatak enzima. PSI

domen je sagrađen od pet amfipatičnih heliksa koji formiraju helikoidni kompleks sa velikim unutrašnjim hidrofobnim jezgrom. Osim hidrofobnim interakcijama, tercijarna struktura PSI domena je stabilizovana pomoću tri disulfidne veze (Kervivnen *et al.*, 1999).

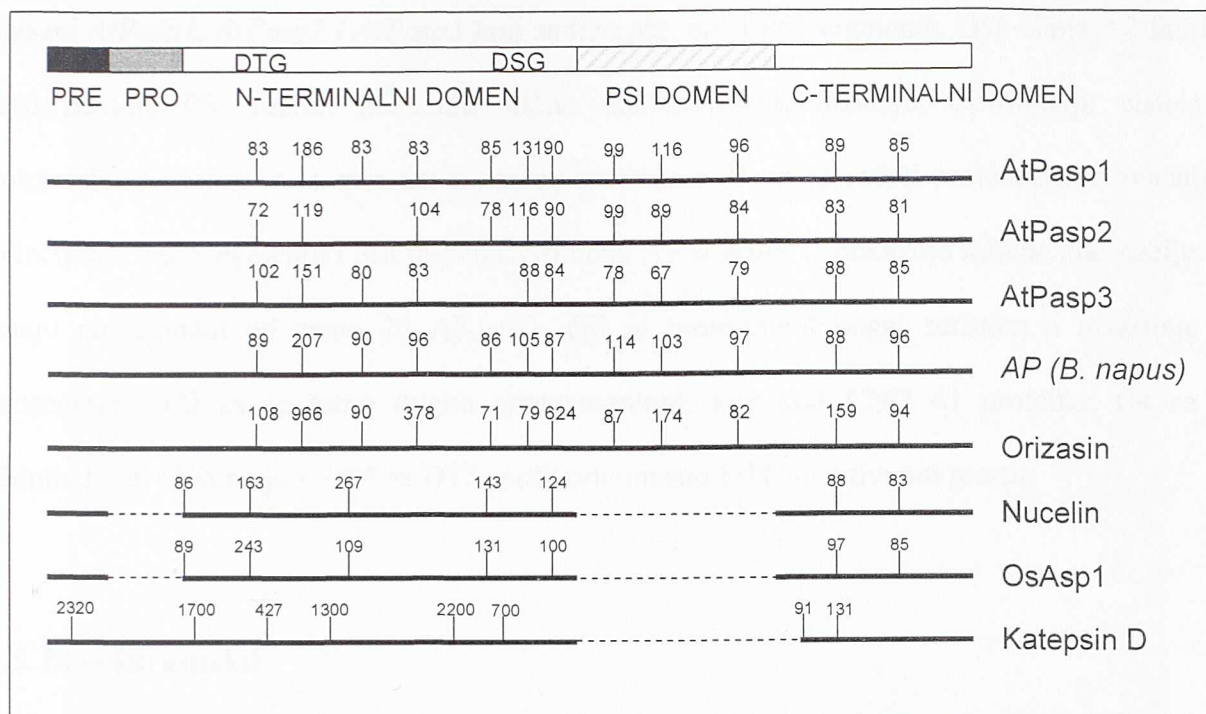
1.2.5. Prečišćavanje i ekspresija AP proteina

U najvećem broju slučajeva fitepsin je prečišćavan iz totalnog proteinskog ekstrakta pomoću afinitetne hromatografije u kojoj je kao afinitetni matriks korišćen pepstatin A kovalentno vezan za agarozu. Takođe je nivo ekspresije fitepsina u biljnim tkivima prilično nizak, te su u najvećem broju slučajeva prečišćavanja enzima dobijene količine manje od jednog miligrama. Osim toga, prečišćene frakcije najčešće sadrže nekoliko enzimskih formi ili intermedijera koji nastaju prilikom obrade enzima, te to uveliko otežava detaljnu analizu. Bakterijski i eukariotki ćelijski sistemi su testirani za ekspresiju nekih od fitepsina. Na primer, zimogena forma pirinčanog orizasina 1 je eksprimirana u *E. coli*, kao fuzioni protein vezan za glutation-S-transferazu (GST). Dobijeni prečišćeni enzim je podlegao autokatalitičkoj obradi i aktivaciji i pokazivao aktivnost prema hemoglobinu kao supstratu (Asakura *et al.*, 2000). Medjutim, opšti problem sa bakterijskim ekspresionim sistemom je vrlo mala produkcija pravilno "upakovanog" proteina (Glathe *et al.*, 1998; White *et al.*, 1999). Ekspresioni sistemi u kojima su korišćene eukariotske ćelije za produkciju fitepsina su se pokazali uspešnim. Na primer, cDNK koja kodira prekursor fitepsina (ciprozina) iz cvetova Cynare, eksprimirana je u ćelijama *Pichia pastoris* i iz njih je prečišćen aktivni enzim (White *et al.*, 1999). Metod u kome su korišćene insekatske ćelije inficirane bakulovirusom je korišćen za dobijanje fitepsina ječma koji je potom korišćen za analiziranje kristalne strukture, kao i u druge svrhe (Glathe *et al.*, 1998;

Kervinen *et al.*, 1999). Interesantno je zapaziti da je ciprozin izolovan iz ćelijske kulture bio potpuno obrađen i aktivan, dok je fitepsin ječma bio proizveden u zimogenoj formi, bez ER-signalne sekvence. Još uvek nije jasno da li pokazane razlike proističu zbog korišćenja različitih ekspresionih sistema ili su posledica različitosti u mehanizmima obrade kojima enzimi podležu prilikom aktivacije.

1.2.6. Geni za aspartične proteinaze i klasifikacija na osnovu domenske strukture

Većina AP proteina je izolovana i analizirana iz biljnih tkiva pre nego što su određene sekvence gena koji ih kodiraju. Do sada je izolovano svega pet genomskih klonova tipičnih aspartičnih proteinaza: *AtPasp1*, *AtPasp2* i *AtPasp3* iz *Arabidopsisa*, orizasin iz pirinča i geni za aspartičnu proteinazu iz *B.napus* (*BnAP*) i *Vigna unguiculata* (*VuAPI*), (Chen *et al.*, 2002; Asakura *et al.*, 1995; D'Hondt *et al.*, 1997; Cruz de Carvalho *et al.*, 2004). *AtPasp1* *Arabidopsisa* ima 12 introna kao i AP geni *BnAP*, *VuAPI* i *OsAsp*, dok u druga dva gena, *AtPasp 2* i *3*, nedostaje po jedan intron (treći i peti) (Chen *et al.*, 2002). Dužine introna su male, između 72 i 184 bp, slično kao i kao kod *B. napus*. Kod pirinčanog orizasina, pored kratkih introna, prosečne dužine oko 100 bp, uočena su i dva znatno duža: (drugi, dug 966 bp i sedmi, dug 624 bp). Iako je u okviru tipičnih proteinaza struktura gena u pogledu pozicija, broja i dužina introna prilično uniformna, ona se značajno razlikuje u odnosu na strukturu atipičnih proteinaza kao što su ječamski nucelin (Chen & Foolad, 1997) i *OsAsp1* pirinča (Bi *et al.*, 2005) i tipičnih sisarskih AP kao što je katepsin D. Nucelin i *OsAsp1* imaju po sedam, a katepsin D osam introna (**Slika 3**). Zanimljivo je da su u ovoj grupi AP okarakterisana i dva gena koja ne poseduje introne *CDR1* iz duvana (Xia *et al.*, 2004) i *APL1* iz heljde (Milisavljević *et al.*, 2008).



Slika 3. Šematski prikaz strukture gena za aspartične proteinaze (AtPasp1-3 iz *Arabidopsis thaliana*; AP iz *Brassica napus*; orizasin i OsAsp1 iz pirinča; nucelin iz ječma; humani katepsin D), (preuzeto iz Chen *et al.*, 2002)

Analiza genoma Arabidopsisa, pokazala je da postoji skoro 70 genomskih sekvenci koje kodiraju potencijalne aspartične proteinaze. Nije poznato da li svi ovi geni kodiraju aktivne enzime. Neke kodiraju AP sa samo jednom DT/SG sekvencom, pa se ne isključuje mogućnost da funkcionišu kao homo ili heterodimeri kako bi formirali dvodomensku strukturu i bili aktivni kao proteinaze (Beers *et al.*, 2004).

Različite klasifikacije AP izvedene na osnovu bioinformatičkih analize genoma Arabidopsisa su do sada bile prihvaćene. Poslednja i najdetaljnija klasifikacija (Faro & Gal, 2005) razvrstava gene za aspartične proteinaze na osnovu izvedene domenske organizacije i motiva u aktivnom mestu. Na osnovu ovoga, AP su svrstane u tri grupe: tipične (grupa A1 i A2), nucelinu slične (grupa B) i atipične proteinaze (grupe C1 do C5). U A1 grupu spadaju prethodno

opisani *AtPasp1*, *AtPasp2* i *AtPasp3* koji sadrže pre, pro i PSI segmente. Dva člana A2 familije iako nemaju PSI region pokazuju sličnu domensku organizaciju, distribuciju cisteina i konzervisani tirozin pa su svrstani u tipične proteinaze. B grupa sadrži proteinaze sa značajnim delecijama u prosegmentu i PSI regionu. Atipične AP iz grupe C pokazuju različite alternacije: C1 imaju prosegment od samo 25 AK; C2, čiji je presegment bogat serinom a nedostaje im prosegment; C3 sa izuzetno dugim prosegmentom, kao kod CND 41 proteina; C4 sa C-terminalnom ekstenzijom i C5 sa DTS motivom umesto DTG u aktivnom mestu.

1.3. Biološki aspekti

1.3.1. Aktivacija proenzima i transport

Fitepsini se eksprimiraju u zimogenoj formi i podležu obradi N-terminusa tokom aktivacije. PSI region se najčešće uklanja prilikom ovog procesa što dovodi do formiranja dvolančanog enzima (Glathe *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2001; Ramalho-Santos *et al.*, 1998; Verissimo *et al.*, 1996; White *et al.*, 1999). Razlog zbog čega su neki fitepsini monomeri, a neki dimeri, još uvek nije poznat.

Aktivacija fitepsina zahteva uključivanje i autokatalitičkih i heterokatalitičkih koraka i prevashodno zavisi od promene pH kao i obrade proteazama prisutnim u posebnim ćelijskim odeljcima. Rekombinantno proizvedeni fitepsin ječma podleže autokatalitičkoj obradi na $\text{pH} \leq 4,5$. Takođe je poređenjem *in vitro* i *in vivo* obrade pokazano da postoje neke male razlike koje ukazuju da je u ovom procesu neophodno prisustvo i nekih drugih proteinaza za kompletno sazrevanje *in vivo*. *In vitro* studije na prokardozinu A ukazuju da se propeptid najverovatnije

uklanja autokatalitičkim putem, dok obrada PSI regiona zahteva aktivnost cisteinskih ili serinskih proteinaza (Ramalho-Santos *et al.*, 1998; Verissimo *et al.*, 1996).

Unutarćelijski transport je izučavan na fitepsinu ječma (Glathe *et al.*, 1998; Törmäkangas *et al.*, 2001). Primarni translacioni produkt se nakon sinteze prenosi u hrapavi endoplazmatični retikulum gde se ER-signalna sekvenca uklanja i proenzim N-glikoziluje. Fitepsin izgleda koristi mehanizam transporta koji je posredovan COPII vezikulama kako bi napustio ER i uputio se ka Goldžijevom aparatu (Törmäkangas *et al.*, 2001). U Goldžijevom kompleksu glikani se modifikuju do složenih finalnih formi i proenzim se pakuje u transportne vezikule, koje se usmeravaju ka vakuolama kao konačnom odredištu. Nakon ulaska u vakuole, kiseli pH najverovatnije otpočinje aktivaciju fitepsina koja podrazumeva autokatalitičko sečenje propeptida i uklanjanje PSI sekvence. Protein se takodje delimično modifikuje i drugim proteazama, što dovodi do formiranja finalne zrele forme enzima.

Neki regioni u fitepsinu mogu igrati ulogu ciljnih signala koji obezbeđuju pravilno usmeravanje članova fitepsinske familije ka vakuolama ili ka izlazu iz ćelije. Na primer, za fitepsin ječma pretpostavljeno je da tu ulogu ima NPLR-peptid (Asn-Pro-Leu-Arg) u autoinhibitorom domenu, kao i neka mesta u PSI domenu (Guruprasard *et al.*, 1994; Kervinen *et al.*, 1999; Törmäkangas *et al.*, 2001). C-terminalni peptid takođe ima ulogu intracelularnog ciljnog signala (Ramalho-Santos *et al.*, 1998). Međutim, tačna interakcija fitepsinskog proenzima i drugih unutarćelijskih proteina prilikom transporta još uvek nije poznata.

1.3.2. Distribucija i lokalizacija u tkivima i organima

Do sada prečišćeni fitepsini su uglavnom poreklom iz semena. Međutim enzimi iz ove familije su široko rasprostranjeni i u drugim biljnim organima i tkivima. Većina ih se akumulira u vakuolama, dok se neki sekretuju iz ćelije. U kardunu, cinaraze kao i kardozin A i B su prisutni u tučkovima cvetova. Izgleda da su ove proteinaze isključivo specifične za cvet i njihova ekspresija je precizno regulisana tokom razvića. iRNK koje kodiraju ciprozin se javlja u ranim stadijumima razvića cveta, dok ih u oformljenom cvetu nema. Kardozin A se nagomilava u vakuolama, koje su skladišta proteina u epidermalnim papilama i vakuolama epidermalnih ćelija tučka (Ramalho-Santos *et al.*, 1994). dok se kardozin B akumulira u ćelijskom zidu i ekstracelularnom matriksu provodnog tkiva (Vieira *et al.*, 2001). To ukazuje na činjenicu da se fitepsini ove biljke, iako slični po svojoj primarnoj strukturi, nalaze u različitim delovima tučka.

Ječamski fitepsin se eksprimira u različitim tkivima semena (pretežno u embrionu, skutelumu i aleuronskom sloju), izdancima, listovima, cvetovima i korenovima (Törmäkangas *et al.*, 1994). Enzim je lokalizovan imunocitohemijskim metodama u skutelarnim i aleuronskim vakuolama sa rezervnim proteinima u semenu (Betke *et al.*, 1996; Martilla *et al.*, 1995), kao i u lisnim i cvetnim vakuolama (Paris *et al.*, 1996; Runeberg-Ross *et al.*, 1994). U korenu ječma, fitepsin je u najvećoj meri prisutan u trahealnim elementima u razviću i u sitastim ćelijama (Runeberg-Ross & Saarma, 1998). Elektroforetskim putem su detektovane četiri AP aktivne forme sa različitom mobilnošću u ekstraktima (Zhang & Jones, 1995), ali nije poznato da li su ovi enzimi derivati nastali različitom obradom od zajedničkog prekursora.

Dva sekretorna fitepsina su izolovana iz listova duvana i paradajza (Rodrigo *et al.*, 1989; Rodrigo *et al.*, 1991). AP je takođe lokalizovan u ćelijskom zidu polena kukuruza (Radlowski *et*

al., 1996). Identifikovani su i neki od proteina sličnih fitepsinu koji su lokalizovani u mebranama fotosistema II plastida tikve (Kuwabara & Suzuki, 1995) i u nukleoidima hloroplasta ćelija duvana (Murakami *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 1997). AP su prisutne i u organima za hvatanje isekata kod insektivornih biljaka (An *et al.*, 2002).

1.3.3. Funkcija

Fitepsini su pronađeni u različitim tkivima mnogih biljnih vrsta tako da izgleda da igraju važnu ulogu u mnogobrojnim proteolitičkim procesima u ćelijama i vanćelijskom prostoru. Ovi enzimi su uključeni u modifikaciju rezervnih proteina, isecanje propeptida i obradu zimogena, degradaciju tkiva prilikom rasta polenove cevi, u degradaciju ćelijskih proteina tokom apoptotskih procesa, kao i u odbranu biljke od napada patogena (Mutlu & Gal, 1999).

Fitepsini su u većoj količini pronađeni u germinativnom semenu i za nekoliko prečišćenih enzima pokazano je da su sposobni da degraduju rezervne proteine *in vitro* (Bleukx *et al.*, 1998; D'Hondt *et al.*, 1993; Hiraiwa *et al.*, 1997; *et al.*, Voigh *et al.*, 1994). Ovi enzimi mogu direktno učestvovati u modifikaciji i razgradnji rezervnih proteina ili mogu obrađivati ili aktivirati druge hidrolaze tokom razvića i klijanja. U ječmu, distribucija fitepsina u vegetativnim i reproduktivnim tkivima kao i enzimska intracelularna lokalizacija u hidrolitičkim organelama, ukazuje na to da fitepsin prevashodno ima ulogu u obradi i modifikaciji proteina u različitim fazama životnog ciklusa biljaka (Paris *et al.*, 1996; Runeberg-Ross *et al.*, 1994; Törmäkangas *et al.*, 1994). Osim toga, u skorijim istraživanjima, fitepsini su dovedeni u vezu sa programiranom ćelijskom smrću (apoptoza) u razvoju traheja u korenu ječma (Lindholm *et al.*, 2000; Runeberg-

Ross & Saarma, 1998) i u degenerisanim nucelarnim ćelijama ovarijuma ječma (Chen & Foolad, 1997).

Fitepsini u cvetnim organima Cynare izgleda da imaju nekoliko različitih uloga u toku razvića cveta i razmnožavanju. Na primer, kardozin A sadrži Arg-Gly-Asp (RGD) ćelijski vezujući motiv, tako da se pretpostavlja da ima ulogu u proteolitičkim mehanizmima koji su posredovani adhezijom i koji su uključeni u prepoznavanje polena i njegov rast (Faro *et al.*, 1999). Kardozin B se akumulira u ćelijskim zidovima i ekstracelularnom matriksu provodnog tkiva te tako ima ulogu u odbrambenim mehanizmima protiv patogena (Vieira *et al.*, 2001). Ekstracelularni fitepsin prečišćen iz lista paradajza i duvana degraduje PRP (*od engl. Pathogenesis-Related Protein*) *in vitro*. Osetljivost PRP na fitepsinsku aktivnost i kodistribucija ovog enzima sa PRP ukazuje da se biološka aktivnost ovih odbrambenih proteina može regulisati dejstvom fitepsina (Rodrigo *et al.*, 1989; Rodrigo *et al.*, 1991). Pronađeno je da fitepsinska aktivnost izrazito raste u stresnim situacijama. Na primer, ekspresija enzima paradajza sistemski je indukovana u lišću nakon njegovog povređivanja (Schaller & Ryan, 1996), kao i ekspresija enzima pasulja u uslovima suše (Cruz de Carvalho *et al.*, 2001). Geni uključeni u senescenciju kod suncokreta takođe obuhvataju i fitepsin (Panavas *et al.*, 1999).

1.4. Biotehnološka primena aspartičnih proteinaza

1.4.1. Upotreba aspartičnih proteinaza u industrijske svrhe

Broj enzima biljnog porekla koji se koriste u industrijske svrhe je još uvek mali. Među njima su proteinaze najviše eksploatisane i to u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, kao i u industriji deterdženata. Takođe se biljne proteinaze koriste u obradi vune i štavljenju kože

(Heimgartner *et al.*, 1990). Najšire korišćene biljne proteinaze su papain, bromelain i ficin ekstrahovani iz *Carica papaya*, *Ananas comosus* i *Ficus glabara*.

Zanimljivo je da su cvetovi različitih biljaka koji su sušeni na vazduhu, korišćeni u regionu Mediterana za proizvodnju sira još od doba Rimskog carstva. U ovom slučaju za proces koagulacije mleka odgovoran je visok nivo proteolitičkih enzima u cvetovima, a sirevi dobijeni grudvanjem mleka pomoću vodenih ekstrakata cvetova su vrlo cenjeni. Najpoznatija biljka korišćena u ove svrhe je *Cynara cardunculus*, koja je široko raspostranjena u oblasti južne Evrope (Roa *et al.*, 1999). Za proizvodnju vrlo poznatog i cenjenog La serena sira upotrebljavaju se cvetovi ove biljke koji se sakupljaju kada biljka postane senescentna i koji sadrže proteolitičke enzime, označene u okviru ove biljne vrste kao cinaraze. Upotreba cvetova sa različitim sadržajem proteinaza, shodno njihovoj prirodnoj varijabilnosti, kao i sezonskim klimatskim promenama, uslovljavaju varijacije u morfo-organoleptičkim karakteristikama sira. Iz tog razloga javlja se zahtev za uravnotežavanjem kvaliteta sira. Osim karduna, u industrijskoj i tradicionalnoj proizvodnji sira u upotrebi je ograničen broj biljnih vrsta, među kojima su na primer: *Solanum dohium* (Yousif *et al.*, 1996) i sedam predstavnika familije *Papilionoideae* (Lopes *et al.*, 1997).

1.4.2. Uloga aspartičnih proteinaza u koagulaciji mleka

Ukus i finalna struktura sira rezultat su serije hemijskih, biohemijskih i mikrobioloških događaja koji se odvijaju tokom procesa sirenja. Promene koje nastaju u mleku prilikom procesa koagulacije su posledica aktivnosti proteolitičkih enzima. Osnovni proteolitički agensi uključeni u ovaj događaj su: prirodne proteaze samog mleka, proteolitički enzimi iz sirila koje se najčešće

dobija iz želuca mladih preživara, kao i proteinaze i peptidaze iz mikroorganizama u starter kulturi (Irigoyen *et al.*, 2000). Kazeinske micelle predstavljaju glavne gradivne blokove koaguluma mleka. Kazeini su najzasupljeniji proteini mleka (oko 80%) i javljaju se u vidu četiri različita tipa, kao: α_{s1} -, α_{s2} -, β - i κ - kazeini. U kombinaciji sa kalcijum fosfatom kazeini formiraju agregate koji su označeni kao micelle. Postoji više pretpostavljenih modela koji objašnjavaju način na koji je organizovana struktura micela. Jedna od hipoteza koju je postavio Horne, 1998. ukazuje na mogućnost da se u micelama kazeini međusobno vezuju svojim hidrofobnim regionima, kao i vezama u koje je uključen CCP (*od engl.* Colloidal Calcium Phosphate), a stabilnost i integritet micela izgleda da su kontrolisani balansom između privlačnih i odbojnih sila u njima. Pri tome κ -kazein može da uspostavi samo hidrofobne interakcije sa drugim kazeinima s obzirom da nema sposobnost da vezuje Ca^{++} usled nedostatka fosfoerinskih ostataka, i to ga čini "lančanim terminatorom" (Lucey, 2002). Tako je κ -kazein pozicioniran na površini micela i njegova kontrolisana degradacija proteolitičkim enzimima daje mogućnost rasta kazeinskih agregata, što opet vodi promeni agregatnog stanja mleka, odnosno njegovoj koagulaciji.

1.5. Heljda

Heljda je dikotiledona stranooplodna biljka koja pripada familiji *Polygonaceae*. Pored heljde, ovoj familiji pripadaju i neke druge, uglavnom korovske biljke. Zbog načina gajenja i primene u ishrani heljda se često svrstava u žitarice. Familiji *Polygonaceae* su srodne familije *Chaenopodiaceae*, *Araceae* i *Amaranthaceae*.

Seme heljde u proseku sadrži 59 – 62 % slobodnih azotnih komponenti, 1 – 12 % proteina i 2,5 – 2,7 % lipida. Neki autori navode sadržaj proteina iznad 18 % (Alekseeva, 1981). Analiza aminokiselinskog sastava proteina pokazala je da heljda sadrži relativno visok nivo lizina (6,1 %), arginina (8,9 %) i asparaginske kiseline (9 %), a najmanje glutaminske kiseline i prolina u poređenju sa drugim vrstama. Pored toga proteini semena heljde imaju i relativno visok nivo treonina (3,7 %), triptofana (1,6 %), histidina (2,4 %), cisteina i metionina (oko 2 %), (Javornik, 1981). Pored upotrebe u ljudskoj ishrani heljda se može koristiti i u ishrani stoke. Zbog relativno kratkog perioda vegetacije (60 – 100 dana), heljda se može gajiti i kao drugi usev, posle žetve pšenice, ječma, itd. Osim toga, njeni cvetovi sadrže nektar, pa je heljda cenjena kao medonosna biljka, sa periodom cvetanja 35 – 45 dana (Alekseeva, 1981). Vegetativni delovi heljde sadrže rutin kao sekundarni metabolit koji nalazi primenu u farmaceutskoj industriji.

Nedostatak heljde je relativno visok sadržaj tanina. Ove supstance su odgovorne za težu svarljivost proteina. Tanini se uglavnom nalaze u spoljašnjim delovima semena, dok ih embrion i endosperm ne sadrže. Heljda u svojim proteinskim telima sadrži metaloproteinazu i njen inhibitor, aspartičnu proteinazu, karboksipeptidazu, kiselu fosfatazu, α -D-manozidazu, kao i inhibitore tripsina i himotripsina (Elpidina *et al.*, 1990).

U semenu heljde kao i kod drugih biljaka nalaze se proteini različitih funkcija. To su strukturni proteini, enzimi neophodni za održavanje normalnog metabolizma, kao i rezervni proteini. Rezervni proteini su tkivno specifični, nagomilavaju se u kasnoj fazi embriogeneze u proteinskim telima i služe kao izvor aminokiselina, azota i ugljenika u procesima klijanja. Prema rastvorljivosti se dele na albumine, globuline, prolamine i gluteine. Proteinska tela kod dikotiledonih biljaka su vakuolarnog porekla. Proteini čija se sinteza odigrava u granularnom endoplazmatičnom retikulumu sazrevaju u Goldžijevom aparatu, i bivaju transportovani

vezikulama ovog aparata do vakuola. Pretpostavlja se da na taj način dolazi do formiranja proteinskih tela. Aspartična proteinaza heljde i ostali tipovi proteinaza uključeni su u metaboličku obradu rezervnih proteina heljde, kao i u procese njihove razgradnje na početku klijanja semena.

Do sada je iz semena heljde izolovana jedna aspartična proteinaza i biohemijski okarakterisana (Timotijević *et al.*, 2003). Maksimum proteolitičke aktivnosti je detektovan na pH 3,1 i ova aktivnost može biti inhibirana pepstatinom A. U totalnom proteinskom ekstraktu semena heljde u razviću detektovana je dimerna forma od 47 kDa, sastavljena od dve subjedinice: 31 i 16 kDa. Rezervni proteini semena heljde, BSA, kazein i hemoglobin predstavljaju *in vitro* supstrate za AP aktivnost iz semena heljde. Ukupni vodeni ili kiseli ekstrakti semena heljde u razviću, kao i zrelog semena heljde imaju sposobnost koagulacije mleka. Poređenjem profila hidrolize κ -kazeina i BSA kao supstrata, u prisustvu AP heljde ili himozina iz komercijalnog sirila ustanovljeno je da je AP heljde po svojoj aktivnosti slična himozinu. Osim toga, iz cDNK biblioteke semena heljde u srednjoj fazi sazrevanja identifikovana je još jedna aspartična proteinaza *FeAPL1*, koja na osnovu poređenja sa sekvencama iz baze podataka spada u grupu atipičnih aspartičnih proteinaza (Milisavljević, *et al.*, 2008). Analizom aminokiselinske sekvence izvedene iz cDNK *FeAPL1* pune dužine pokazano je da ova proteinaza ne poseduje PSI domen, ima konzervisano aktivno mesto DTG/DSG, kao i signalni peptid dužine 20 ak, dok postojanje propeptida nije utvrđeno. Takođe je identifikovan *FeAPL1* gen iz gDNK heljde, za koji se pokazalo da ne sadrži introne. Analiza ekspresije ovog gena Northern blot analizom pokazala je da se *FeAPL1* ne eksprimira ni u jednom drugom organu, osim u semenu gde se maksimum ekspresije dostiže u fazi 14-17 DAF (“days after flowering” – dani nakon cvetanja).

U ovom radu predstavljena je izolacija cDNK i gena za aspartičnu proteinazu heljde (*FeAP9*), koja pripada klasi tipičnih aspartičnih proteinaza, čija je parcijalna biohemijska karakterizacija aktivnosti vršena prethodno. Takođe je analizirana struktura i ekspresija *FeAP9* gena u različitim organima tokom razvicia heljde, kao i pod uticajem različitih abiotičkih stresova.

2. CILJ

Ovaj rad je urađen kao deo projekta: "Struktura, funkcija i regulacija ekspresije odabranih biljnih gena" (143017) u okviru podprojekta koji se odnosi na aspartične proteinaze heljde.

Prisustvo endogene proteolitičke aktivnosti u semenu heljde uočeno je u toku procesa analize rezervnih proteina semena heljde, što je otvorilo novo polje istraživanja vezano za definisanje proteolitičkih enzima i njihove potencijalne uloge u metabolizmu rezervnih proteina. Tako je u prvoj fazi rada dokazano je da je makar deo ove proteolitičke aktivnosti neposredno vezan za proteinaze inhibirane pepstatinom A koje reaguju sa antitelima na fitepsine, čime je potvrđeno da se radi o klasi tipičnih aspartičnih proteinaza. U okviru magistarske teze definisana su specifična proteolitička svojstva ove enzimske klase, kao i proteinski ekspresioni profil upotrebom heterolognih antitela.

S obzirom na navedeno, cilj ovog rada je bio izolovanje cDNK i odgovarajućeg gena za tipičnu aspartičnu proteinazu heljde, odnosno za potencijalno grupu gena koji bi pripadali navedenoj klasi. Osim analize primarne, sekundarne i tercijarne strukture ovih gena i odgovarajućih 5' regulatornog regiona, cilj je bio da se okarakteriše i ekspresija gena u smislu specifičnosti za pojedini organ/tkivo ili efekta određenih fizioloških uslova, kao i faktora abiotičkog/biotičkog stresa na nivo ekspresije. Ovi podaci bi trebalo da ukazu na potencijalnu funkciju tipičnih aspartičnih proteinaza kod heljde kao još jednom od model-sistema koji upotpunjuje ukupno znanje o proteinskoj degradaciji – fenomenu koji karakterise različite procese u biljnoj ćeliji.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Biljni materijal i tretmani

3.1.1. Biljni materijal

Heljda (*Fagopyrum esculentum* Moench, cv. Darja) je uzgajana u stakleniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

Period od pojave cveta do zrelog semena kod heljde traje oko 30 dana. Semē u razviću klasifikovano je prema morfološkim karakteristikama: veličina i masa svežeg semena, boja semenjače, veličina kotiledona i konzistencija endiosperma. Faze u sazrevanju označene su kao 9, 11, 14, 17, 19, 21, 23, 25 i 28 DAF (DAF *od engl.* “**D**ays **A**fter **F**lowering”), kao što je uobičajeno u literaturi. Semena, listovi, cvetovi, stabla i korenovi heljde su sakupljeni, zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80° C za kasnije izolovanje RNK i proteina. Semena su sakupljena iz različitih faza sazrevanja: <9 DAF; 9-11 DAF; 11-14 DAF; 14-17 DAF; 17-19 DAF; 19-21 DAF; 21-23 DAF; 23-25 DAF i 25-28 DAF, a listovi u dve faze: zeleni list i žuti list u kome su znakovi senescencije bili vidljivi.

3.1.2. Klijanje semena

Semena su sterilisana u 0.4% Na-hipohloritu u trajanju od 20 minuta. Sledilo je ispiranje sterilnom destilovanom vodom, tri puta po pet minuta. Nakon toga semena su raspodeljivana na vlažni filter papir postavljan u staklenu Petri šolju. Inkubiranje je trajalo 8 dana na 25⁰ C u mraku. Početak klijanja karakteriše se intezivnim usvajanjem vode pri čemu embrioni bubre povećavajući volumen od 10 do 100 puta. U tom periodu zaštitni omotač puca i iz semena se pojavljuje klijanac u kome se sintetišu hidrolitički enzimi, amilaza i proteinaze. Ovi enzimi

razgrađuju skrob i proteine do šećera i aminokiselina. U toku procesa klijanja, za potrebe eksperimenta svakodnevno su uzimani klijanci, počev od 0 DAI do 6 DAI (**DAI** od engl. “**D**ays **A**fter **I**mbibition”). Klijanci su zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -70° C do ekstrakcije proteina.

3.1.3. Tretmani biljaka

U svrhu izazivanja senescencije mrakom biljke su neprekidno držane u mraku u provetrenom prostoru i redovno su zalivane. Potpuno razvijeni listovi su sakupljeni sa većeg broja biljaka heljde nakon 1, 2, 3, 5, 7, 9 i 11 dana. Stres sušom je indukovano izostavljanjem navodnjavanja kompletno razvijenih biljaka tokom 13 dana. Sasvim razvijeni listovi su prikupljeni nakon 3, 5, 7, 9, 11, 13 i 15 dana njihovog isušivanja. Mehaničko povređivanje listova izvođeno je bušenjem nekoliko rupa po listu (oko 10) pomoću sterilne igle (\varnothing 0.45 x 12mm, 26G x 1/2”). Povređeni listovi su sakupljeni nakon 1, 2 i 3 dana po “ranjavanju”. Za UV eksperimente biljke su tretirane tako što su izlagane UV zračenju (radijacija 290-320 nm) tokom 1, 2 i 24 sata, korišćenjem UV lampe (HPQ 100 W Philips) koja je bila instalirana na udaljenosti od 30 cm u odnosu na biljke. Nadzemni delovi četiri nedelje starih biljaka su prebacivani u MS1/2 medijum (Murashige & Skoog, 1962) sa ili bez CdCl_2 , pri čemu su korišćene dve različite koncentracije CdCl_2 : $100\mu\text{M}$ i $300\mu\text{M}$, a zatim su listovi prikupljeni nakon 3,5 h; 4 h i 1 dana.

Nakon tretmana, sa ovih biljaka sakupljeni su listovi u već naznačenim fazama, zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80°C za izolovanje RNK.

3.1.4. Inkubacija listova heljde u medijumu koji sadrži salicilnu kiselinu (SA)

Tretman biljaka salicilnom kiselinom je izveden prema Wen *et al.*, 2005 uz manje modifikacije. Listovi heljde su sečeni u male kvadratne komadiće površine oko 1 cm² koji su odmah bili potapani u medijum za ekvilibrisanje (50 mM Mes-Tris (pH 5.5), 1 mM EDTA, 5 mM askorbinska kiselina, 5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ i 200 mM manitol) tokom 30 min. Nakon ekvilibrisanja 5 g lisnih isečaka je prebačeno u Petri šolju sa 20 ml inkubacionog pufera koji je sadržavao pufer za ekvilibrisanje i 200 μM SA. Kao kontrola korišćeni su ekvilibrisani listovi iste težine inkubirani u istom puferu koji je umesto SA sadržavao destilovanu vodu. Petri šolje su blago mućkane na 25°C i odvojeno je po 1 g listova iz SA incubacionog pufera, kao i iz kontrolnog pufera nakon 1, 3 i 5 časova, zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80°C za izolovanje RNK.

3.2. Bakterijske procedure

3.2.1. Medijumi za uzgajanje bakterija

LB

1% (w/v) tripton; 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) ekstrakt kvasca, pH podešen na 7,5 sa 2 M NaOH (Sambrook *et al.*, 1989).

Bogati medijum sa glukozom

Za 1 l: 10 g triptona, 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl, 2 g glukoze

SOC

2% (w/v) tripton; 0,5% (w/v) ekstrakt kvasca; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glukoza (Hanahan 1983).

Čvrsti medijumi su pravljeni dodavanjem 1,5% w/v agara, IPTG u finalnoj koncentraciji 1 $\mu\text{g/ml}$ i X-gal u finalnoj koncentraciji 40 $\mu\text{g/ml}$ u LB medijum. Na ovakvim podlogama je moguća selekcija rekombinantnih bakterijskih sojeva plavo/belom selekcijom (α -komplementacija) (Sambrook *et al.*, 1989). U LB medijum za uzgajanje *E. coli* dodavan je antibiotik ampicilin u koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.2. Bakterije i plazmidi

Korišćen je soj XL1-Blue *E. coli* bakterija (endA1, gyrA96, hsdR17(rK-mK+), lac, recA1, relA1, supE44, thi-1, F'[proAB, lacIqZ Δ M15, Tn10]).

Plazmid korišćen u eksperimentima za kloniranje PCR produkata je bio pGEM-T Easy vektor (Promega). Ovaj vektor kao selektivni marker poseduju gen rezistenciju na ampicilin. Za ekspresiju rekombinantnog proteina korišćen je ekspresioni vektor pMAL-c2X. dizajniran tako da omogućava stvaranje fuzije proteina od interesa zajedno sa MBP tagom (MBP *od engl. Maltose-Binding Protein*). Vektor pMAL-c2X takođe poseduje kao selektivni marker rezistenciju na ampicilin.

3.2.3. Uzgajanje i održavanje bakterija

Kulture transformanta *E. coli* XL1-Blue za potrebe kloniranja su uzgajane preko noći na 37°C na čvrstom ili tečnom LB medijumu uz dodatak ampicilina. Petri šolje sa bakterijama su čuvane na +4°C i obnavljane na četiri do šest nedelja, a za dugoročnu upotrebu kulture bakterija su zamrzavane na -80°C u 15% (v/v) glicerolu. U čvrst medijum dodavan je X-Gal u koncentraciji 80 $\mu\text{g/ml}$ i 0.5 mM IPTG kako bi se obezbedila plavo-bela selekcija bakterijskih kolonija.

3.2.4. Priprema elektrokompetentnih ćelija *E. coli* za elektroporaciju

1 l LB medijuma je inokulisan 1% inokulumom sveže prekonoćne kulture bakterija. Bakterije su gajene na 37°C uz mućkanje do postizanja $OD_{600}=0,5-0,7$. Rast bakterijske kulture zaustavljan je premeštanjem na led i inkubiranjem od 15-30 minuta. Od tog momenta sve je rađeno na ledu, hladnim nastavcima i rastvorima. Bakterije su centrifugirane 15 min na 5000 obr/min u GSA rotoru. Talog ćelija je resuspendovan u 1 l hladne destilovane vode i centrifugiran 15 min na 5000 obr/min u GSA rotoru. Ovaj korak je ponavljan, ali sa 500 ml hladne vode. Zatim su ćelije resuspendovane u 20 ml hladnog 10% glicerola i centrifugirane u hladnom SS34 rotoru 10 min na 7000 obr/min. Bakterije su resuspendovane u 3 ml 10% glicerola i razdeljivane u porcije od po 50 μ l. Ovako pripremljene ćelije su čuvane najmanje 6 meseci na -70°C.

3.2.5. Transformacija *E. coli* elektroporacijom

Za elektroporaciju je korišćen BIO RAD aparat Gene pulser. Smeša za elektroporaciju pripremana je tako što je precipitat ligacione smeše pomešan sa 50 μ l elektrokompetentnih *E. coli* ćelija. Posle 10 min inkubacije na ledu ova smeša je prenošena u ohlađenu kivetu za elektroporaciju (1 mm razmak između elektroda), stavljana u komoru elektroporatora i vršena je elektroporacija pod sledećim uslovima: 25 μ F, 200 Ω i 1,25 kV. Radeći brzo elektroporirane ćelije su pomešane sa 1 ml SOC medijuma, inkubirane uz intenzivno mućkanje 1 h na 37°C i zatim razmazivane na petri šolje. Posle prekonoćnog rasta na 37°C pojedinačne kolonije su analizirane na prisustvo željenog inserta.

3.3. Osnovne procedure rada sa DNK

3.3.1. Izolovanje biljne genomske DNK

Za izolovanje biljne genomske DNK iz tkiva heljde korišćena je metoda opisana od strane Dellaporta *et al.*, 1983. 1 g biljnog materijala (pupoljci) zamrzavano je u tečnom azotu i mleveno u fini prah, tučkom u avanu. Dodavano je 15 ml ekstrakcionog pufera (100 mM Tris, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0; 500 mM NaCl; 10 mM β -merkaptetoanol) i 1 ml 20% SDS, dobro izmešano i inkubirano 10 min na 65°C. Zatim je dodavano 5 ml 5 M K-acetata (Sambrook *et al.*, 1989), smeša je promešana i inkubirana na ledu 20 min. Proteini i polisaharidi su taloženi centrifugiranjem pri 25000 g 20 min, nakon čega je supernatant filtriran kroz 4 sloja gaze. Supernatantu je dodavano 0,6 volumena izopropanola, smeša je mešana i inkubirana 30 min na -20°C. Genomska DNK je taložena centrifugiranjem pri 20000 g 15 min i dobijeni talog je sušen na vazduhu 10 min, a zatim resuspendovan u 0,7 ml 50 mM Tris; 10 mM EDTA pH 8,0. Ukoliko je rastvaranje bilo otežano, ova suspenzija je ostavljena preko noći na +4°C. Nakon rastvaranja, DNK je ponovo taložena dodavanjem 75 μ l Na-acetata i 500 μ l izopropanola i dalje kao što je opisano u Odeljku 3.3.8. Dobijeni talog DNK je rastvaran u 100 μ l 10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0 ili u vodi. Kvalitet izolovanja proveravan je digestijom DNK restrikcionim enzimima i ukoliko je bilo neophodno izolovana DNK je dodatno prečišćavana.

3.3.2. Izolovanje plazmida iz bakterija

Za izolovanje plazmidne DNK korišćeno je nekoliko metoda, u zavisnosti od toga da li je svrha bila analiza dobijenih klonova ili priprema plazmida za reakcije koje slede. Za analitičku svrhu korišćene su brze procedure za izolovanje plazmida iz tečne kulture ili direktno iz kolonija.

Plazmidi su direktno iz kolonija izolovani tako što su pojedinačne kolonije prenošene u ependorf epruvete u kojima se nalazilo 25 μ l 10 mM EDTA, pH 8,0. Dodavano je 25 μ l litičkog pufera (200 mM NaOH; 0,5% SDS; 20% saharoza). Smeša je resuspendovana snažnim mućkanjem i inkubirana 10 min na 70°C. Posle hlađenja do sobne temperature, smeši je dodavan 1,5 μ l 4 M KCl i inkubirana je 5 min na ledu. Nakon centrifugiranja (3 min na 13000 obr/min na 4°C), supernatanti koji su sadržavali izolovane plazmide, analizirani su elektroforetski.

Plazmidi su iz tečne kulture izolovani po brznoj proceduri na sledeći način: 1,5 ml prekonoćne bakterijske kulture je kratko centrifugiran u mikrocentrifugi, a talog resuspendovan u 300 μ l TENS pufera (1 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 M EDTA, pH 8,0; 10 M NaOH; 20% SDS). Potom je smeši dodavano 150 μ l 3 M Na-acetata pH 5,2, smeša je promućkana i kratko centrifugirana 2 min. Supernatantu je dodavano 1 ml hladnog 96% etanola. Talog dobijen centrifugiranjem (10 min na 13000 obr/min) je ispiran 70% etanolom, sušen i rastvaran u 20 μ l bidestilovane vode.

Za preparativne svrhe korišćen je QiaMini Prep Kit (Qiagen), po uputstvu proizvođača. 1,5 ml prekonoćne kulture je kratko centrifugiran u mikrocentrifugi i bakterijski talog je resuspendovan u 250 μ l pufera P1 koji obezbeđuje alkalne uslove za liziranje bakterija. Nakon dodavanja 250 μ l pufera P2 i 350 μ l pufera N3 koji obezbeđuju visoku koncentraciju soli za precipitaciju genomske DNK i vezivanje plazmidne DNK za silika kolorice, smeša je centrifugirana na 13000 obrt/min 10 min. Supernatant je nanošen na QIAprep Spin kolonice koje su potom centrifugirane na 13000 obrt/min 1 min. Kolonice su ispirane puferom PE koji efikasno uklanja soli i centrifugirane na 13000 obrt/min 1 min. Dodatnim centrifugiranjem pod istim uslovima, eliminišu se tragovi etanola koji bi inhibirali enzimske reakcije na prečišćenim

plazmidima. DNK je eluirana sa kolonice sa 50 μ l vode. Ovako prečišćeni plazmidi su korišćeni za sekvenciranje.

3.3.3. Elektroforeza DNK na gelu od agaroze

Fragmenti DNK razdvajani su elektroforezom na gelu od agaroze (ultrapure electrophoresis grade: Gibco BRL, Life Technologies Ltd) koncentracije između 0,8 i 2% (w/v) u TAE puferu (0,04 M Tris-acetate; 1 mM EDTA), kao što je opisano u Sambrook *et al.*, 1989. U gel je dodavan etidijum bromid u koncentraciji 0,5 μ g/ml. Raspon napona je bio od 5-10 V/cm gela. Posle završene elektroforeze, DNK je vizualizovana na UV transiluminatoru na talasnoj dužini od 266 nm. DNK marker, korišćen kao standard u svim elektroforetskim analizama je bio „1 kb+ ladder“ (Invitrogen).

3.3.4. Prečišćavanje fragmenata DNK sa gela od agaroze

Za prečišćavanje DNK sa agaroznog gela korišćen je QIAEXII Gel Extraction Kit (Qiagen). DNK je razdvajana elektroforezom na 1,5% gelu od SeaKem GTG agaroze (FMC BioProducts), koja ne inhibira enzimske reakcije. Nakon elektroforeze, fragmenti DNK od interesa su isecani i inkubirani u 3 zapremine QX1 pufera u odnosu na zapreminu gela (100 mg u 300 μ l), a zatim je smeši dodavano 10 μ l QIAEX II partikula. Nakon ovog postupka sledila je inkubacija na 50°C, 10 min i za to vreme smeša je dodatno mućkana svaka 2-3 min radi boljeg rastvaranja gela. Uzorak je centrifugiran 1 min na 13000 obrtaja/min i pažljivo je uklanjana tečna faza. Talog je mućkanjem rastvoren u 500 μ l QX1 pufera, a zatim je sledilo centrifugiranje 1 min na 13000 obrtaja/min. Tečna faza je pažljivo uklonjena čime je uzorak oslobođen ostataka agaroze. Talog je ponovo rastvoren mućkanjem u 500 μ l PE pufera koji sadrži etanol, a zatim je

uzorak centrifugiran 1 min na 13000 obrtaja/min. Poslednji korak je ponovljen, pri čemu su ovim postupkom iz uzorka uklonjeni ostaci soli. Tečna faza je pažljivo uklanjana automatskom pipetom, do poslednje kapi, kako bi se uzorak oslobodio viška etanola koji bi inhibirao enzimske reakcije. Talog je sušen na vazduhu sve dok nije postao bele boje, a zatim je rastvaran u 20 μ l 10 mM Tris, pH 8,0 ili u H₂O i inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi da bi se DNK eluirala sa QIAEXII partikula. Nakon centrifugiranja 1 min na 13000 obrtaja/min, supernatant koji je sadržavao prečišćenu DNK je prebacivan u čistu plastičnu tubu.

3.3.5. Digestija DNK restrikcionim enzimima

Digestija DNK restrikcionim enzimima je vršena komercijalnim preparatima enzima i pufera po uputstvu proizvođača. Digestija plazmida radi izbacivanja inserta trajala je 3 do 4 sata, a parcijalna digestija genomske DNK je trajala 5 sati. Koncentracija korišćenih restrikcionih enzima je varirala, uobičajeno je bila za plazmide oko 5 U/ μ g DNK, osim za genomsku DNK gde je korišćeno 10 U/ μ g DNK, ali je vođeno računa da finalna koncentracija glicerola u reakcionoj smeši ne bude preko 10%. Digestije su inkubirane na temperaturi preporučenoj od strane proizvođača (za većinu enzima 37°C) i po isteku vremena su prekidane inkubacijom na 65°C.

3.3.6. Ligacija DNK sa Marathon adapterima

Za svrhu ligacije digerirane genomske DNK sa Marathon cDNK adapterima (Clontech) 500 ng DNK je ligirano sa 20 pmola adaptera (\approx 200 puta molarni višak) u 50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 1 mM ATP i 5% (w/v) polietilen glikolu, pomoću 1 U T4 DNK ligaze (Promega), u zapremini od 10 μ l. Reakcija je ostavljena preko noći na 16°C, posle čega je

inkubirana 5 min na 70°C u cilju inaktivacije ligaze. Tako dobijena DNK je taložena etanolom, rastvarana u vodi, puštana na 1% agarozni gel, sa koga je eluirana radi oslobađanja od neligiranih adaptera. Ovako prečišćena DNK je korišćena za umnožavanje u Marathon PCR reakciji.

3.3.7. Ligacija DNK sa plazmidnim vektorima

Ligacija DNK je vršena sa 50 ng pGEM-T Easy plazmidnim vektorom i 3 puta molarnim viškom inserta u prisustvu 3 U T4 DNK ligaze u 1X Rapid Ligation puferu, preko noći na 4°C. Ligacija je inaktivirana zagrevanjem smeše na 65°C i DNK istaložena etanolom kao što je opisano u Odeljku 3.3.8. Sve komponente potrebne za ligaciju su iz pGEM-T Easy Vector Systems kita (Promega).

3.3.8. Taloženje DNK etanolom

Taloženje DNK je vršeno dodavanjem 1/10 volumena 3 M Na-acetata i 2,5 volumena hladnog 99% etanola. Nakon prekonoćne precipitacije na -20°C, rastvor je centrifugiran 30 min na 13000 obr/min u mikrocentrifugi na 4°C. Višak soli je odstranjivan ispiranjem taloga DNK hladnim 70% etanolom, a zatim je DNK sušena pod vakuumom i resuspendovana u bidestilovanoj vodi.

3.3.9. Metoda po Southern-u (Neradioaktivno obeležavanje probe metodom dopunjavanja DNK (oligo labelling))

DNK proba za hibridizaciju po Southern-u je predstavljala insert klona *pFeAP9* tj. cDNK za aspartičnu proteinazu heljde. Kao negativna kontrola korišćen je produkt PCR umnožavanja

fragmenta klona *pFeAPL1* dobijen korišćenjem gen-specifičnih prajmera F8 i R83. Sve probe su pre obeležavanja prečišćene na agaroznom gelu. Obeležavanje je vršeno uz pomoć kita BioPrime DNA Labeling System (Gibco BRL), po uputstvu proizvođača. 100 ng DNK rastvarano je u 20 µl vode i na ledu je dodavano 20 µl smeše prajmera. Nakon denaturacije na 100°C 5 min, na ledu je dodavano 5 µl smeše nukleotida (koja sadrži i biotinom obeleženi dCTP), 4 µl vode i 1 µl Klenovljevog enzima. Nakon mešanja, reakciona smeša je inkubirana 1 h na 37°C i prekidana dodavanjem 5 µl stop pufera. Reakciona smeša je zatim dva puta taložena etanolom, rastvarana i pre dodavanja u pufer za hibridizaciju proba je denaturisana kuvanjem u ključalom vodenom kupatilu 5 minuta.

3.3.10. Prenos DNK sa gela na membranu

Po završenoj elektroforezi DNK u agaroznim gelovima sa 0,5 µg/ml etidijum bromidom, DNK je analizirana metodom po Southern-u. Isecana je ivica gela koja sadrži elektroforetski razdvojen standard dužina DNK, i fotografisana sa prislonjenim fluorescentnim lenjirom. Ostatak gela je potapan u rastvor za depurinaciju (0,25 M HCl) 10 min, kratko ispiran u destilovanoj vodi, prenošen u rastvor za denaturaciju (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) i blago mućkan 30 min, pa inkubiran u rastvoru za neutralizaciju (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl, pH 7,2; 0,001 M EDTA, pH 8,0) 2 puta po 15 min na sobnoj temperaturi uz lagano mućkanje. Tokom depurinacije i denaturacije gela membrana Biodyne A (Gibco BRL) i 5 listova Whatman 3MM hromatografskog papira je isecano na dimenzije gela i potapano u rastvor za transfer DNK (10X SSC pufer – 3 M NaCl; 0,3 M Na₃-citrat). Isecana je i potapana i traka 3 MM papira tako da je širina trake odgovarala širini gela, dok je dužina bila nekoliko puta veća od dužine gela. Isecani su i papirni ubrusi dimenzije gela, naslagani na gomilu visine oko 10 cm. Nakon završene

neutralizacije, gel je takođe potapan u rastvor za transfer. Na podlogu dimenzije gela, potopljen u rastvor za transfer slagano je redom: duža traka 3 MM papira (tako da su krajevi potopljeni u rastvor za transfer), 2 trake 3 MM papira dimenzije gela, gel, membrana, 3 trake 3 MM papira dimenzije gela, papirni ubrusi. Prilikom slaganja treba voditi računa da se ne stvore mehuri vazduha koji bi sprečili transfer DNK, a ukoliko do toga dođe treba ih pažljivo odstraniti kotrljanjem staklenog štapića. Nakon slaganja, preko papirnih ubrusa stavljan je teret sa ravnomerno raspoređenom težinom preko čitavog gela i kapilarni transfer je vršen preko noći. Po završenom transferu, DNK na membrani je fiksirana pečenjem u vakuum pećnici na 80°C u trajanju od dva sata. Membrana je ili odmah korišćena za hibridizaciju ili zatvarana u plastičnu kesu i ostavljena na 4°C do upotrebe.

3.3.11. Hibridizacija i detekcija neradioaktivnih hibridizacionih signala

DNK prenet na najlonsku membranu je hibridizovana sa obeleženom DNK probom. Čitav postupak hibridizacije se sastojao od tri faze: prehibridizacije i denaturacije probe, hibridizacije i posthibridizacionih pranja. Prehibridizacija je vršena u puferu za hibridizaciju (5xSSC; 0,1% N-laurilsarkozin; 0,02% SDS; 1% kazein) 1 sat na 65°C, nakon čega je ovaj pufer odlivan i dodavan svež hibridizacioni pufer koji je sadržavao denaturisanu neradioaktivno obeleženu probu (Odeljak 3.6.1.). Hibridizacija je trajala preko noći na 65°C uz blago mućkanje, posle čega je membrana podvrgnuta seriji pranja: 2 puta po 3 min na sobnoj temperaturi u rastvoru 1 (2xSSC; 0,1% SDS); 2 puta po 3 min na sobnoj temperaturi u rastvoru 2 (0,2xSSC; 0,1% SDS); 2 puta po 15 min na 60°C u rastvoru 3 (0,16xSSC; 0,1% SDS) i konačno kratko u 2xSSC (Sambrook *et al.*, 1989). Detekcija hibridizacionog signala je vršena uz pomoć BluGene Nonradioactive Nucleic Acid Detection System (Gibco BRL) po uputstvu proizvođača.

Membrana je prvo kratko ispirana u puferu 1 (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl), a zatim inkubirana u rastvoru za blokiranje (3% BSA u puferu 1) 1 sat na 65°C i rastvoru za vezivanje (1 µg/ml konjugata streptavidin-alkalna fosfataza u puferu 1) 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon ove inkubacije, membrana je ispirana 2 puta po 15 min na sobnoj temperaturi u puferu 1 i 10 min u puferu 3 (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂). Membrana je zatim zatapana u plastičnu kesu sa dodatkom supstrata za alkalnu fosfatazu (44 µl NBT - nitroblue tetrazolium (75 mg/ml); 33 µl BCIP - 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat (50 mg/ml) u 10 ml pufera 3) i stavljana u mrak dok se ne postigne željeni intenzitet signala. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 20 mM Tris, pH 7,5; 0,5 mM EDTA, a zatim je membrana sušena, zatapana u plastičnu kesu i fotografisana.

3.3.12. Sekvenciranje DNK

Sekvenciranje DNK je rađeno na kapilarnom sekvenceru ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems) na Univerzitetu u Padovi, Italija (<http://www.bmr-genomics.it>).

3.3.13. Kompjuterska analiza sekvenci

Za poređenje sekvenci sa sekvencama iz GenBank baze podataka korišćen je BLAST search program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Konstrukcija filogenetskog stabla je obavljena upotrebom programskog paketa PHYLIP. Analiza sekvence je rađena u okviru programskog paketa ExpASy (<http://www.expasy.org>). Predikcija signalnog peptida rađena je u SignalP 3.0 programu. Za predviđanje starta transkripcije i osnovnog promotora korišćen je Promoter Prediction program (<http://www.fruitfly.org>), dok su za predviđanje regulatornih elemenata promotora korišćene tri baze podataka: MatInspector professional (<http://www.genomatix.de>),

PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp>) i PlantCARE (<http://sphinx.rug.ac.be:8080>). Predikcija trodimenzionalne strukture je urađena u programu GeneSilico (<http://www.genesilico.pl/met>).

3.4. Reakcija lančanog umnožavanja segmenata DNK (PCR)

3.4.1. Umnožavanje fragmenata DNK

Umnožavanje fragmenata DNK vršeno je u 0,5 ml epruvetama tako što su pomešani matrica DNK, 0,2 mM dNTP smeša, 0,2 μ M prajmeri i pufer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 0,1% Triton X-100; 2,5 mM MgCl₂). Reakcije PCR (*od engl.* Polymerase Chain Reaction) su rađene u 25-50 μ L reakcionim smešama sa 10-20 ng matrice i 2,5 U enzima Taq polimeraze (Promega). Profil reakcije zavisio je od konkretne aplikacije, ali se sastojao od inicijalne denaturacije, za kojom je sledio odgovarajući broj ciklusa denaturacije, vezivanja prajmera i ekstenzije, i finalne produžene ekstenzije. Nazivi i sekvence korišćenih prajmera, kao i profili PCR reakcija i svrha upotrebe prikazani su tabelarno (**Tabela 1**), dok su PCR profili i svrha korišćenja pojedinačnih parova prajmera prikazani u **Tabeli 2**.

Ime	Sekvenca (5' to 3')	Ime	Sekvenca (5' to 3')	Ime	Sekvenca (5' to 3')
P500	tggttcacaggaagataagtgtgc	P952	tgcaattctctggctcactacacc	Uap1	aaaccgccgtgcaaatfc
P498	tttgggtcacaggaagataagtgtgc	P916	gcaattgggtgctctggtgtag	Uap2	tgaagcagcaccacgacg
P255	ggagcctagtctcacattgttgc	APK1	atgaccaacatttctcggatttctgt	26Sf	attcecaaacaccgactc
P284	agtttgacgggatacttgggcttg	APK2	ctaagcagcttcagcaaacccgact	26Sr	gccgtccgaattgtagtctg
P429	caatagcaatctcaccgaagtattgg	If	attggtcttttgcatcatcc	H3f	gaaattcgcaagtaccagaagag
P269	ttctctcttttaggccactctgacc	Ir	ccaaggccatacttctgcat	H3r	ccaacaaggatgcccacgc
P408	gcgattgagccagaatgaaaatac	P221	ttgttgagaatcaggaatttattgagg	APSH1	tgaccgggaataatgatttggctcagag
		P445	ccaccaaatacaagctcaccaccttc	APSH2	tataagcttagcagcttcagcaaacccg

Tabela 1. Spisak i sekvence prajmera korišćenih u ovom radu

Korišćeni prajmeri	PCR profil	Upotreba	Matrica
APK1/P408	95°C/5'; (95°C/1', 64°C/1', 72°C/1'30'')X30; 72°C 5'	Izolovanje dela genomskog klona	gDNK
P284/P952	95°C/5'; (95°C/1', 64°C/1', 72°C/1'30'')X30; 72°C 5'	Izolovanje dela genomskog klona/ provera specifičnosti	gDNK cDNK
P916/APK1	95°C/5'; (95°C/1', 64°C/1', 72°C/1'30'')X30; 72°C 5'	Izolovanje dela genomskog klona	gDNK
If Ir	94°C/3'; (94°C/1', 66°C/1', 72°C/1') X28; 72°C 10'	Umnožavanje "leader introna"	gDNK
Uap1/Uap2	94°C/5'; (94°C/30'', 60°C/30'', 72°C/1') X25; 72°C 10'	Umnožavanje FeAP9	cDNK
P221/P445	94°C/5'; (94°C/30'', 60°C/30'', 72°C/1') X25; 72°C 10'	Umnožavanje FeAP12	cDNK
H3f H3r	95°C/5'; (94°C/30'', 60°C/30'', 72°C/1') X25; 72°C 10'	Umnožavanje referentnog histon 3 gena	cDNK
26Sf/26Sr	94°C/5'; (94°C/30'', 60°C/30'', 72°C/1') X25; 72°C 10'		cDNK
APK1/APK2	95°C/5'; (95°C/1', 64°C/2', 72°C/1'30'')X30; 72°C 5'	dobijanje integralnog cDNK klona	cDNK
APSH1/APSH2	95°C/5'; (95°C/1', 68°C/2', 72°C/1'30'')X30; 72°C 5'	uvođenje SmaI i HindIII restrikcionog mesta na krajeve integralnog cDNK klona	pFeAP9

Tabela 2. Spisak parova prajmera i PCR programa korišćenih u ovom radu

3.4.2. Umnožavanje fragmenata DNK korišćenjem degenerativnih prajmera

Aminokiselinske sekvence devet poznatih AP poreklom iz različitih biljnih vrsta (X56136, AJ237674, AP002480, AY142687, X80067, AB002695, AB045891, AB069959, AJ313385) su korišćene da bi se dizajnirali degenerativni prajmeri koji se nalaze u regionima koji kodiraju dva visoko konzervisana domena: D T G S S N L W V iz N-terminalnog i W I L G D V F M G iz C-terminalnog regiona zrelog enzima. U PCR su korišćeni sledeći degenerativni prajmeri:

D1: GAYACIGGVAGYTCHAAAYCTNTGGGT

D2: TGGATHYTKGGIGAYRTNTTTATG

(Y=C ili T, R=A ili G, V=C ili G ili A, H=A ili C ili T, K=A ili G ili T, N=C ili G ili A ili T, I = inozin).

Profil reakcije lančanog umnožavanja sa degenerativnim prajmerima bio je sledeći: 30 ciklusa 30 s na 94° C, 30 s na 42° C i 3 min na 72° C. U reakciji je korišćeno 100 ng cDNA koja je predstavljala matricu, 30 pmol degenerativnih prajmera i Advantage™ 2 Polymerase Mix (Clontech).

3.4.3. 5' i 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA ends)

Ova metoda predstavlja modifikaciju metode opisane od strane Chenčik *et al.*, 1995. i prvenstveno je korišćena za umnožavanje krajeva cDNK, ali se može upotrebiti i za amplifikaciju željenih uzvodnih ili nizvodnih sekvenci genomske DNK, koja je određena u oba slučaja orijentacijom gen-specifičnog prajmera. Drugi prajmer u reakciji PCR nije specifičan, već je komplementaran delu sekvence Marathon adaptera. Adapteri su parcijalno dvolančani oligonukleotidi, koji prelaze u dvolančane nakon što polimerizacija koja otpočne sa gen-

specifičnog prajmera popuni jednolančani region adaptera i na taj način napravi mesto za vezivanje adapterskog prajmera. Upotrebom ovakvog sistema postiže se povećanje specifičnosti PCR reakcije. Reakcija zapremine 50 μ l je sadržavala 100 ng matrice genomske DNK parcijalno digerirane sa *EcoRV* sa ligiranim adapterom, 10 pmol gen-specifičnog prajmera P500 (**Tabela 1**), 10 pmol Marathon adapter AP1 prajmera (5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'), 0,2 mM dNTP smešu, 40 mM Tricin-KOH, 15 mM KOAc, 3,5 mM Mg(OAc)₂, 3,75 μ g/ml BSA, 0,005% Tween-20, 0,005% Nonidet-P40 i 1X smešu Advantage2 polimeraze (Clontech). Ova smeša sadrži AdvanTaq polimerazu, malu količinu enzima sa editorskom funkcijom (3'-5' egzonukleaza) koja smanjuje učestalost ugradnje pogrešnog nukleotida i TaqStart antitelo koje obezbeđuje automatski hot start i time povećava efikasnost i specifičnost PCR amplifikacije. Na isti način određen je 3' nepoznati kraj cDNK sekvence koja kodira *FeAP9* gen. U svrhu izvođenja 3'-RACE procedure korišćeni su P255 i P284 prajmeri čije su sekvence prikazane u **Tabeli 1**. Profil Marathon PCR umnožavanja ("touch down" PCR) bio je: inkubacija 3 min na 94°C, 5 ciklusa inkubacije 30 s na 94°C i 4 min na 72°C, 5 ciklusa inkubacije 30 s na 94°C i 4 min na 70°C, 20 ciklusa inkubacije 30 s na 94°C i 4 min na 68°C. Po završenoj reakciji 10 μ l proizvoda razdvajano je na gelu od agaroze. Ovakav profil PCR reakcije omogućava obogaćivanje smeše specifičnom matricom u toku prvih pet ciklusa, kada se aniling odigrava na povišenoj temperaturi koja ne dozvoljava vezivanje za nespecifičnu matricu. Obzirom da primarni PCR ni u jednom slučaju nije davao jasno razdvojenu traku ili trake od interesa, pristupalo se sekundarnom PCR umnožavanju pomoću "nested" Marathon adapter AP2 prajmera (5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3') i P498 prajmera (**Tabela 1**). 1 μ l 10 puta razblažene smeše primarnog PCR predstavljalo je matricu za sekundarni PCR, a umnožavanje je vršeno po sledećem profilu: inkubacija 3 min na 94°C i 25 ciklusa inkubacije na 30 s na 94°C i 4

min na 68°C i završna ekstenzija 10 min na 72°C. Dobijeni proizvodi sekundarne PCR reakcije analizirani su na gelu od agaroze. Isti postupak korišćen je i za određivanje 5' regulatornog regiona *FeAP9* gena, s tim što je korišćena gDNK parcijalno digerirana *SmaI* enzimom kao matrica i prajmeri AP1/P429 za “touch down” i AP2/P269 za “nested” PCR (**Tabela 1**).

3.4.5. Real-time PCR

Uzorci cDNA dobijeni kao što je opisano u Odeljku 3.5.4. su rastvoreni u odnosu 1:20 u „nuclease-free” vodi. Isti alikvoti cDNK uzoraka su korišćeni za Real-time PCR sa prajmerima dizajniranim i za *FeAP9* (Uap1/Uap2) i za histon 3 (H3f/H3r) koji je predstavljao referentni gen (**Tabela 1**). Heljdina 26S rRNA (26Sf/26Sr) je takođe korišćena kao dodatni referentni gen u RT Real-time PCR eksperimentima. Reakcije su izvođene u zapremini od 25 µl i sadržavale su 500 nM svakog od prajmera i 1x SYBER Green PCR master mix (Applied Biosystems). 26S rRNA prajmeri su korišćeni u koncentraciji od of 50 nM. Real-time PCR je izvođen na aparatu ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem) i to pri parametrima preporučenim od strane proizvođača (2 minuta na 50°C, 10 minuta na 95°C i 40 ciklusa 95°C 15 sekundi i 60°C 1 min). Svaka PCR reakcija je rađena u triplikatu, a u eksperiment su kao negativne kontrole bile uključene reakcije koje nisu sadržavale matricu. Rezultati su analizirani pomoću 7500 System Software (Applied Biosystems) programa i predstavljeni su kao 2^{-dCt} , gde je dCt razlika između Ct vrednosti *FeAP9* i referentnog gena.

3.5. Osnovne procedure rada sa RNK

3.5.1. Izolovanje ukupne RNK (Taylor & Powell, 1982)

Za izolovanje ukupne RNK iz biljnih tkiva korišćena je metoda koju su opisali Taylor i Powell, 1982 i ovako dobijena RNK upotrebljavana je za "Northern blot" analizu ekspresije gena za *FeAP9*. Ukupna RNK izolovana je iz 0,5-5 g tkiva heljde. Da bi se inaktivirala RNaza, svi rastvori su pre upotrebe sterilisani 40 min, pod pritiskom od 2 bara, a stakleni i keramički sudovi pečenjem na 180°C preko noći. Plastični sudovi i epruvete od polipropilena sterilisani su potapanjem u 3% H₂O₂ 30 min.

Tkivo je zamrzavano u tečnom azotu i mleveno u fini prah. Dodavana su tri volumena ključalog ekstrakcionog pufera (2% CTAB; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 2% β-merkaptetanol) i smeša je ostavljena u vodenom kupatilu na 55°C dok temperatura ekstrakcione smeše ne dostigne datu temperaturu. Zatim je dodavan isti volumen smeše SEVAG i vršeno je blago mućkanje da bi se izmešale organska i vodena faza. Centrifugirano je 10 min na 9000 obr/min u SS34 rotoru na sobnoj temperaturi. U vodenu fazu je dodavano 1/10 volumena 10% CTAB i ponavljana je ekstrakcija smešom SEVAG. Nakon centrifugiranja ponovo je odvajana vodena faza iz koje su nukleinske kiseline taložene dodavanjem oko 1-2 volumena precipitacionog pufera (1% CTAB; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 1% β-merkaptetanol). Dodavanje precipitacionog pufera vršeno je lagano, sve dok vodena faza ne postane mutna, nakon čega je inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi. Precipitaciona smeša je centrifugirana 5 min na 9000 obr/min u SS34 rotoru. Talog je rastvaran u 3 ml 1 M CsCl, i ovaj rastvor je naslojavan na 2 ml 5,7 M CsCl u polipropilenskim epruветama za SW 50.1 rotor, nakon čega je vršeno centrifugiranje 20 sati na 35000 obr/min pri temperaturi od 20°C. Tokom centrifugiranja RNK pada kao talog na dno epruvete.

Prečišćavanje RNK od CsCl rađeno je po protokolu iz laboratorijskog priručnika Sambrook *et al.*, 1989. Talog RNK ispiran je u 70% etanolu i sušen na sobnoj temperaturi, a zatim rastvaran u 100 µl TE pufera, pH 7,6 (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA) koji sadrži 0,1% SDS. Zatim je dodavano 200 µl TE pufera, pH 7,6 i precipitirano sa 1/10 volumena CH₃COONa, pH 5,2 i tri volumena hladnog 96% etanola, 30 min na ledu. Smeša je centrifugirana 15 min pri 12000 g, talog je ispiran 70% etanolom i sušen na sobnoj temperaturi. RNK je rastvarana u vodi, a koncentracija je određivana spektrofotometrijski, merenjem apsorbancije na 260 nm, pri čemu jedna optička jedinica odgovara koncentraciji RNK od 40 µg/ml. Prinos RNK po gramu tkiva iznosio je 100-300 µg za semena različitih faza sazrevanja i oko 100 µg za list. Kvalitet izolovane RNK proveravan je elektroforezom na denaturišućem gelu od agaroze. RNK je čuvana na -70°C.

3.5.2. Izolovanje ukupne RNK modifikovanom CTAB mini prep metodom (Doyle & Doyle, 1987)

Po ovoj metodi, 0,5-1 g tkiva je zamrzavano u tečnom azotu i mleveno u fini prah. Tri volumena preinkubiranog CTAB pufera (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA, pH 8,0; 100 mM TRIS, pH 8,0; 2% PVP-40; 10 µl/ml β-merkaptotanol) na 65°C je dodavano u samleveni materijal i smeša inkubirana 5-10 min na 65°C uz povremeno mešanje. Prečišćavanje nukleinskih kiselina je vršeno dodavanjem 1 volumena smeše SEVAG-a (hloroform:izoamilakohol u odnosu 1:1). Smeša je dobro mućkana da se izmešaju vodena i organska faza i zatim centrifugirana 10 min na 9000 obr/min u SS34 rotoru u Sorval centrifugi. Vodena faza koja sadrži nukleinske kiseline je prenošena u novu epruvetu i ponovo je ekstrahovana smešom SEVAG u odnosu 1:1. DNK i RNK iz vodene faze su taložene hladnim

izopropil alkoholom na ledu 30 min i ispirane 70% etanolom. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi talog je rastvaran u odgovarajućoj zapremini vode u zavisnosti od veličine taloga (od 50 do 200 μ l). Taloženje ukupne RNK vršeno je sa 2 M LiCl na -80°C , 1 sat. Nakon centrifugiranja na 13400 obr/min. Dobijeni talog rastvaran je u RLT puferu iz QIA RNeasy kita i dalje je prečišćavanje vršeno po uputstvu proizvođača. RNK je rastvarana u vodi i koncentracija određivana spektrofotometrijski, merenjem absorbancije na 260 nm. Ova modifikovana metoda, iako nije davala veliki prinos iRNK, bila je brža te je primenjivana za dobijanje RNK koja je prevođena u cDNK u cilju praćenja ekspresije *FeAP9* gena u različitim uslovima metodom RT PCR. Pre cDNK sinteze kontaminacija gDNA je uklanjana iz RNK uzoraka upotrebom kita (Ambion DNA-free Dnase Treatment and Removal Reagents).

3.5.3. Elektroforeza RNK na denaturišućem gelu od agaroze

Zbog sekundarne strukture RNK koja utiče na njenu pokretljivost, elektroforeza se mora vršiti u denaturišućim uslovima. Sastav gela je: 1% agaroz, 1x MOPS pufer, 3,7% formaldehid. Elektroforeza je vršena u 1x MOPS puferu (20 mM MOPS; 1 mM EDTA; 5 mM NaOAc, pH 7,0). Uzorci za elektroforezu dobijani su mešanjem RNK resuspendovane u vodi sa puferom za uzorak (73% formamid; 14,5% MOPS puffer; 12,5% formaldehid) u odnosu 1:3 i denaturacijom u trajanju od 5 min na 65°C . Uzorci su zatim stavljeni na led i dodavana je boja BPB (0,25% bromfenol plava boja; 40% saharoz) i 1 μ l etidijum bromida (0,5 mg/ml). Za elektroforezu RNK upotrebljavan je napon od 5 V/cm, a po završenoj elektroforezi gelovi su fotografisani na UV transiluminatoru. Kvalitet izolovane RNK proveravan je na osnovu odnosa intenziteta traka koje odgovaraju 26S i 18S biljnih rRNK, koji bi trebalo da bude 2:1. U slučaju izolata RNK iz lista pojavljuju se i rRNK hloroplasta – 23S i 16S.

3.5.4. Izolovanje poli(A) RNK

Poli(A)RNK je izolovana iz ukupne RNK uz pomoć komercijalnog kita Straight A's mRNA Isolation System (Invitrogen), po uputstvu proizvođača. Izolovanje je vršeno iz 100 µg ukupne RNK, rastvorene u koncentraciji 1 mg/ml. Metoda se sastoji u vezivanju iRNK preko poliA kraja za Magnetight™ Oligo (dT) kuglice koje sadrže oligo(dT). Ostali tipovi RNK ostaju u rastvoru i odbacuju se. Procedura se sastoji od niza pranja u različitim puferima: Lysis, Washing buffer, koji obezbeđuju lizu i odstranjivanje svega što se ne vezuje specifično za kuglice. Sastav ovih pufera je nepoznat i zaštićen patentom od strane proizvođača. Elucija iRNK sa kuglica se vrši u bidestilovanoj vodi inkubiranjem na temperaturi od 50-70°C, 2 min. Ovako dobijena iRNK se precipitira izopropanolom u prisustvu 0,3 M natrijum acetata, ispira 70% etanolom i rastvara u vodi. Do upotrebe se čuva na -70°C.

3.5.5. Sinteza cDNK

Za sintezu prvog lanca korišćen je 1µg poli(A)RNK. Sinteza je izvršena korišćenjem reverzne transkriptaze M-MuLV (BioLabs) i odgovarajućeg pufera preporučenog od strane istog proizvođača, u reakcionoj zapremini od 10µl. 1µg poli(A)RNK inkubiran je sa 10 µM „cDNA synthesis“ prajmerom (5'-TTCTAGAATTCAGCGGCCGC(T)30-N-1N-3' gde je N-1= G, A ili C, a N= G, A, C ili T) (Clontech) ili „random hexamer“ prajmera (Applied Biosystem), 2 min na 70°C u finalnoj zapremini od 5 µl. Smeša je zatim prebacivana na led 2 min i potom kratko centrifugirana. Dodat je 10X M-MuVL pufer pH 8,3 (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ 50 mM ditiotritol) (Biolabs), 10 mM dNTP smeša i 200 U M-MuLV reverzne transkriptaze (Biolabs). Reakcija je tekla 1h na temperaturi od 37°C, a potom je zaustavljena inkubiranjem na ledu 5 min.

Drugi lanac cDNK, nakon reakcije reverzne transkripcije, sintetisan je modifikovanom metodom po Chenchik *et al.*, 1995, na sledeći način: u 10 µl ukupne reakcione smeše, koja sadrži hibridne RNK/DNK molekule, dodato je 24 U *E.coli* DNA polimeraze I; 4.8 U T4 ligaze i 1 U RNazeH; 8µl 10 X Second Strand Synthesis Buffer (Promega); 1,6 µl 10mM dNTP mix. Zapremina je podešena do finalnih 80 µl ddH₂O, i reakciona smeša je inkubirana na 16°C 90 min. Inkubacija na istoj temperaturi je nastavljena još 45 min pošto je dodato 10 U T4 DNA polimeraze. U cilju prečišćavanja cDNK od enzima, DNK je ekstrahovana dodavanjem 1 volumena smeše fenol:SEVAG u odnosu 1:1, dobro promešana i centrifugirana 10 min na 13000 obr/min u mikrocentrifiugi. Vodena faza koja sadrži DNK je prenošena u novu epruvetu i ponovo je ekstrahovana smešom SEVAG u odnosu 1:1. DNK iz vodene faze je taložena etanolom uz upotrebu 2M CH₃COONH₄. cDNK je rastvorena u 10 µl ddH₂O.

3.5.6. Metoda „Northern blot” (Radioaktivno obeležavanje probe metodom dopunjavanja DNK (oligo labelling))

DNK proba za Northern hibridizaciju je bio insert klona *pFeAP9* (cDNK koja kodira aspartičnu proteinazu). Proba je obeležavana korišćenjem kita Megaprime DNA labelling systems (Amersham Pharmacia) u kome se obeležavanje zasniva na korišćenju heksanukleotida nasumične nukleotidne sekvence koji se vezuju za matricu DNK na brojnim mestima i služe kao prajmeri za sintezu DNK. Kompleks matrice DNK i prajmera je supstrat za Klenovljev enzim, koja ugrađuje smešu neradioaktivnih nukleotida i radioaktivni dCTP (Redivue [α -32P] dCTP, Amersham Pharmacia) u novostvorenu DNK. Ovaj kit zahteva količinu matrice DNK od 25 ng i 5 µl 3000 Ci/mmol [α -32P] dCTP po reakciji obeležavanja. Obeležavanje je vršeno na sledeći način: komponente kita su otapane na sobnoj temperaturi, odgovarajućem volumenu koji sadrži

25 ng matrice DNK dodavana je voda do zapremine od 28 μ l i 5 μ l smeše prajmera, nakon čega je vršena denaturacija 5 min na 100°C i uzorak je stavljan na led. Nakon kratkog centrifugiranja uzorka, na sobnoj temperaturi dodavano je 10 μ l pufera za obeležavanje, 5 μ l [α -32P] dCTP i 2 μ l Klenovljevog enzima. Reakcija se odvijala na 37°C, 30 min do 1 sat, nakon čega je prekidana dodavanjem 5 μ l 0,2 M EDTA. Po završenoj reakciji obeležavanja proba je prečišćavana da bi se uklonio nevezani radioaktivni dCTP. Za prečišćavanje probe korišćene su Sephadex G-50 mikro kolone po uputstvu proizvođača (Amersham Pharmacia). Uspešnost obeležavanja proveravana je na scintilacionom brojaču, a uobičajeni specifični aktivitet obeleženih proba kretao se od 200000-400000 cpm/ng DNK. Prečišćena proba je pre dodavanja u pufer za hibridizaciju denaturisana kuvanjem u ključalom vodenom kupatilu 5 minuta.

3.5.7. Prenos RNK sa gela na najlonsku membranu

Prenos RNK sa gela na membranu vršen je na identičan način kao što je detaljno opisano u Odeljku 3.3.10., osim što je korišćena najlonska membrana Hybond N+ (Amersham).

3.5.8. Hibridizacija i detekcija radioaktivnih hibridizacionih signala

RNK preneti na najlonsku membranu je hibridizovana sa obeleženim DNK probama. Čitav postupak hibridizacije se sastojao od tri faze: prehibridizacije i denaturacije probe, hibridizacije i posthibridizacionih pranja. Korišćena je modifikovana metoda Church & Gilbert 1984. Prehibridizacija je vršena u puferu za hibridizaciju (0,5 M Na_2HPO_4 , pH 7,2; 1 mM EDTA; 7% w/v SDS) 1 sat na 65°C, nakon čega je ovaj pufer odlivan i dodavan svež hibridizacioni pufer koji je sadržavao denaturisanu radioaktivno obeleženu probu (5×10^6 - 10^7 cpm). Hibridizacija je trajala preko noći na 65°C uz blago mućkanje, posle čega je membrana

podvrgnuta seriji pranja u puferu za pranje (40 mM Na₂HPO₄, pH 7,2; 1% w/v SDS) 3 puta po 5 min, a zatim dodatnih 15-60 min, u zavisnosti od fona membrane, koji je povremeno proveravan GM brojačem (smatra se da je pranje završeno kada se fon spusti ispod 20 cps). Zatim je membrana stavljana u plastičnu kesu i eksponirana prislanjanjem X-ray BioMax MS filma (Kodak) u kaseti za ekspoziciju (BioMax, Kodak) sa ekranom za pojačavanje (BioMax, Kodak). Kasete sa membranom i filmom je ostavljana na -80°C preko noći (24 sata), nakon čega su autoradiogrami dobijani razvijanjem filma.

3.6. Osnovne procedure rada sa proteinima

3.6.1. Priprema proteinskih ekstrakata

Različiti organi heljde su sprášeni do finog praha u tečnom azotu korišćenjem avana i tučka. Kiseli proteinski ekstrakti su pripremani tako što je fini prah homogenizovan u tri volumena pufera za ekstrakciju (1M NaCl; 1% Triton X-100; 3 mM NaHSO₃) dodavanjem PVP, a potom je pH suspenzije podešen pomoću HCl do pH 4. Ekstrakciona smeša je homogenizovana tučkom 5-10 min na sobnoj temperaturi, i ponovo je doteran pH na 4. Suspenzija je blago mešana 20 minuta na ledu pre centrifugiranja na 9000 x g, koje je trajalo 20 min na +4° C u Sorwall centrifugi, rotor SS-34. Supernatant je profiltriran kroz sterilnu gazu i čuvan 1-2 dana na +4°C (Sarkkinen *et al.*, 1992). Supernatant je čuvan na -20°C ukoliko nije odmah korišćen. Koncentracije proteina su određivane prema metodi po Bradfordu, 1976.

3.6.2. Precipitacija proteina acetonom

Za potrebe koncentrovanja proteina vršena je precipitacija hladnim acetonom. Dve zapremine acetona dodavane su na jednu zapreminu proteinskih ekstrakata i nakon mešanja

vršena je inkubacija preko noći na -20°C . Talozni su prikupljeni centrifugiranjem u mikrofugi 15 min / $10000 \times g$, na $+4^{\circ}\text{C}$.

3.6.3. SDS-PAGE

Proteinski ekstrakti semena heljde vizuelizovani su SDS-PAGE metodom koja je vršena u diskontinuiranom sistemu gelova (modifikacija metode po Laemmli-ju). U ovim eksperimentima korišćena je Biometra aparatura za vertikalnu elektroforezu. Proteinski uzorci su pripremani tako što su rastvarani u puferu za uzorak, sledećeg sastava: 125 mM Tris, pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 0,025% boja bromfenol plavo. U slučajevima kada je elektroforeza vršena u redukujućim uslovima puferu je dodavan i β -merkaptoetanol u finalnoj koncentraciji 4%. Ovako pripremljeni uzorci su kuvani 3 min na 100°C .

Gel za koncentrovanje je sadržavao 125 mM Tris, pH 6,8; 0,1% SDS i 12-15% akrilamid. Smeša akrilamida i bisakrilamida za gelove pripremana je kao 30% rastvor (odnos akrilamida i bisakrilamida 29:1). Gel za razdvajanje sadržavao je 375 mM Tris, pH 8,8; 0,1% SDS i 5% akrilamid. Kao inicijator polimerizacije dodavan je 10% amonijum persulfat. Gelovi su nalivani između ploča tako da gel za razdvajanje predstavlja 1/4 celog gela. Dimenzije gelova su bile 8 x 5 cm, dok je njihova debljina bila 1 mm.

Elektroforeza je vršena u TGB puferu, sastava: 25 mM Tris; 250 mM glicin, pH 8,3 i 0,1% SDS, pri konstantnoj struji od 20 mA.

Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini u gelovima su fiksirani i bojani rastvorom 0,025% Coomassie brilliant blue R-250 u 45% metanolu i 10% sirćetnoj kiselini. Obezbojavanje je vršeno difuzijom u 45% metanolu i 10% sirćetnoj kiselini (Sambrook *et al*, 1989).

3.6.4. Priprema anti-FeAP9 antitela

Primarna poliklonska antitela koja prepoznaju FeAP9 protein su proizvedena posredstvom komercijalnog servisa (BioGenes, Customised polyclonal antisera / antibodies, Berlin, Germany). Sintetisan je oligopeptid (HSKYKSSKSSTYVK) koji odgovara 14 amino-kiselina dugom regionu iz N-terminusa zrelog enzima FeAP9. Antiserum je dobijen imunizacijom zečeva sintetičkim oligopeptidom. Antitela su afinitetno prečišćena na sefarozi konjugovanoj sa antigenim peptidom (BioGenes).

3.6.5. "Western blot" analiza

Imunološka identifikacija aspartične proteinaze vršena je "Western blot"-analizom. Za imunodetekciju su korišćena poliklonska antitela napravljana na oligopeptid iz N terminusa FeAP9 kao primarna, a kao sekundarna antitela u svim analizama korišćena su anti-zečja IgG antitela proizvedena u magarcu (GE Healthcare, Amersham), a koja su kovalentno vezana sa HRP (HRP *od engl.* **H**orse**R**edish **P**eroxidase), tako da je kompleks antigen-primarno antitelo-sekundarno antitelo detektovan ECL reakcijom.

3.6.6. Prenos proteina sa gela na PVDF membranu

Hibridizaciji i detekciji je prethodilo elektroforetsko razdvajanje jednakih količina proteina (30 µg) izolovanih iz različitih tkiva heljde. Razdvajanje proteina je vršeno na SDS-poliakrilamidnom gelu (5% gel za koncentrovanje i 12% gel za razdvajanje), nakon čega je sledio njihov transfer na odgovarajuće najlonske, poliviniliden difluorid (PVDF) membrane (Millipore). Za transfer je korišćen Semi-dry Fastblot B43 transfer sistem (Biometra). Gel je nakon transfera inkubiran 5 min u katodnom puferu (25 mM Tris pH9,4; 0,3% glicin; 20%

metanol). Anoda je nakvašena anodnim puferom I (300 mM Tris pH 10,4; 20% metanol) prevlačenjem nakvašene papirne vate. Dva sloja 3 MM papira su nakvašena anodnim puferom I i stavljena na anodu. Jedan sloj 3 MM papira nakvašen je anodnim puferom II (25 mM Tris, pH 10,4; 20% metanol) i dodat u "sendvič". Nitrocelulozna PVDF membrana je kratko potapana u metanol, a zatim je ispirana u vodi 5 min i inkubirana u anodnom puferu II dodatnih 5 min. Membrana je nakon inkubacije stavljena u "sendvič" i prevlačenjem pomoću staklenog štapića preko membrane istisnuti su mehurići. Gel je nakon toga stavljen na membranu i dodata su 3 sloja 3 MM papira prethodno potopljena u katodni pufer. Elektrotransfer je u ovom sistemu vršen tako što je postupak prenošenja proteina sa gela na membranu odgovarajuće površine trajao 40 min pri konstantnoj jačini struje od 5 mA po 1 cm², prema uputstvu proizvođača.

3.6.7. Hibridizacija i detekcija signala

Nakon transfera membrane su prane 2 puta po 10 min u PBST puferu (80 mM Na₂HPO₄; 20 mM NaH₂PO₄; 100 mM NaCl; 0.1% Tween-20) i inkubirane u puferu za blokiranje (5% BSA u PBST) 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon dva pranja u PBST puferu, membrane su inkubirane sa anti-AP9 antitelima (razblaženje 1:350) ili anti-MBP zečjim antiserumom (New England Biolabs) (razblaženje 1:10000) u 1% puferu za blokiranje (1% BSA in PBST) preko noći na +4° C. Membrane su ponovo prane dva puta po 10 min u PBST puferu, a zatim inkubirane sa anti zečjim-HRP antitelima (Healthcare), pri njihovom razblaženju od 1: u PBST, tokom 1 h na sobnoj temperaturi.

Hemiluminescenta detekcija je vršena korišćenjem ECL-Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) i bazirana je na reakciji oksidacije cikličnog diacilhidrazida luminola u

prisustvu HRP i peroksida. Membrane su prekrivane smešom reagensa A i B (40:1) 5 min na sobnoj temperaturi, a zatim izlagane X-ray filmovima (Kodak) u trajanju od 1 do 2 min.

3.6.8. Ekspresija rekombinantnog proteina

Kodirajuća sekvenca *FeAP9* gena je umnožena korišćenjem APShn1 i APShn2 prajmera koji sadrže *SmaI* i *HindIII* restrikciona mesta na 5' i 3' krajevima, sledstveno. Kao matrica korišćen je *FeAP9* klon (acc. no. [AAV84085](#)). Reakcija lančanog umnožavanja je izvođena po sledećem programu: početna denaturacija 94° C, 3 min, zatim 25 ciklusa po 30 s na 94° C i 2 min na 70° C i finalna ekstenzija 10 min na 72° C. Produkti amplifikacije su klonirani u pGEM-T Easy vektor (Promega), a zatim isečeni pomoću *SmaI* and *HindIII* restrikcioni enzima. Nakon ekstrakcije iz gela proizvodi su subklonirani u ekspresioni vektor pMAL-c2X (New England Biolabs). Ekspresioni vektor je prethodno otvoren tj. linearizovan dvostrukom digestijom pomoću *XmnI* i *HindIII* restrikcionih enzima (Fermentas). Rekombinantni klon koji je sadržavao *FeAP9* sekvencu u pMAL-c2X vektoru je korišćen za transformaciju kompetentog Rosetta-gami bakterijskog soja. Klon sa najvećim nivoom ekspresije rekombinantnog proteina je selektovan nakon brzog "skrininga" malih ekspresionih kultura prema pMAL Protein Fusion and Purification System Instruction Manual (BioLabs) za "large scale" produkciju. Odgovarajući LB medijum sa 0.2% glukoze (1000 ml) koji je sadržavao ampicilin 100 µg/ml, kanamicin 15 µg/ml, tetraciklin 12.5 µg/ml i hloramfenikol 34.5 µg/ml je inokulatisan sa prekonocnom kulturom (1:50) i intezivno mućkan na 37°C do postizanja OD₆₀₀ od 0,5. Ekspresija je bila indukovana dodavanjem IPTG do finalne koncentracije od 0.5 mM. Kulture su inkubirane na 25°C tokom 2 sata. Čelije su sakupljene centrifugiranjem na 4000 x g na sobnoj temperaturi 20 min i resuspendovane u puferu C (20 mM Tris-HCl, pH7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) u 5 ml po

gramu ćelija u vlažnom stanju. Nakon toga dodat je lizozim (1 mg/ml) i lizat je inkubiran na ledu 30 min. Nakon sonifikacije tri puta po 10 s na ledu, bakterijski lizat je centrifugiran na 10000 x g tokom 20 min na +4°C. Supernatant je dalje korišćen za prečišćavanje rekombinantnog proteina pod nativnim uslovima tako što je pomešan sa 1000 µl amiloza rezin i blago mućkan na 4° C, tokom noći. Rezin je kolektovan centrifugacijom 30 s na 1000 x g. i opran četiri puta u 10 zapremina pufera za pranje (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol, pH 8.0) tokom 30 min na 4°C. Protein je eluitan u 1000 µl pufera C koji je sadržavao 10 mM maltozu i analiziran je SDS-PAGEom i imunoblotom.

3.7. *In situ* RNK-RNK hibridizacija

3.7.1. *Fiksiranje i dehidratacija tkiva*

Različita tkiva heljde su sakupljana i smesta potapana u rastvor za fiksiranje (4% paraformaldehid; 4% DMSO u 1xPBS puferu) koji je predhodno preinkubiran na ledu. Fiksacija je vršena uz primenu vakuuma od 10³ Pa u eksikatoru sve do pojave mehurića, nakon čega je vakuum održavan konstantnim dodatnih 15 min. Postupak je ponavljan sve dok tkiva heljde nisu počinjala da tonu u rastvor fiksativa. Fiksativ je zamenjen i uzorci su blago mućkani preko noći na 4° C. Nakon fiksacije tkiva su ispirana dva puta po 30 min na 4° C u PBS. Dehidratacija tkiva vršena je blagim mućkanjem na ledu u 30% etanolu 60 min, a potom na sobnoj temperaturi u 50% etanolu 60 min, 70% etanolu 60 min, 85% etanolu 60 min i 95% etanolu sa 0,1% eozinom preko noći. Usledile su četiri izmene 100% etanola u kome su tkiva blago mućkana dva puta po 30 min i dva puta po 60 min. Nakon toga tkiva su blago mućkana u rastvorima "histoclear"-a u etanolu čija koncentracija je sukcesivno rasla: 25% "histoclear", 75% etanol, 90 min; 50%

“histoclear”, 50% etanol, 90 min; 75% “histoclear”, 25% etanol, 90 min; dva puta 100% “histoclear” 90 min i finalno 100% “histoclear” +1/4 volumena “histovax” ljuspica preko noći.

3.7.2. Kalupljenje tkiva

Vosak za kalupljenje “Histovax” (Histolab Products) je potpuno otopljen na 42° C i dodata mu je 1/4 rastvarača “Histoclear” (Histolab Products). Tkiva su inkubirana u ovoj smeši nekoliko sati na 55° C, a zatim je smeša zamenjena sveže otopljenim voskom i usledila je inkubacija preko noći na 55° C. Tokom naredna tri dana vršene su po dve izmene svežim voskom, a zatim su tkiva zajedno sa voskom smeštena u modle i dalje čuvana na +4° C.

3.7.3. Sečenje mikrotomom i priprema mikroskopskih pločica

Za pravljenje preseka tkiva heljde debljine 8µm korišćen je mikrotom (Leica). Mikroskopske pločice ProbeOn Plus (Fisher Biotechnology) su zagrevane na +42° C i na njih je nakapavano po nekoliko kapljica DEPC vode. Tanke tračice isečenog tkiva stavljane su na kapljice vode tako da plutaju, a potom su pločice inkubirane na +42° C. Inkubacija je trajala nekoliko minuta, sve dok voda nije isparila i preseki tkiva bili zalepljeni za površinu pločica. Pločice sa presecima čuvane su do 3 nedelje na +4° C.

3.7.4. Priprema RNK probe-in vitro transkripcija

Konstruisan je plasmid pFeAP9 tako što je kompletna FeAP9 cDNK umnožena prajmerima APK1/APK2 (**Tabela 1. i 2.**) i uklonirana u pGEM-T Easy vektor. Plazmid je linearizovan korišćenjem restrikcionog enzima *ScaI*. Kako bi se plazmidna DNK oslobodila od prisustva RNaze ili bilo kakve druge kontaminacije, vršena je fenol/hloroformska ekstrakcija

koja je praćena etanolskom precipitacijom. *In vitro* transkripcija je izvođena korišćenjem *In vitro* transcription kita (Roche). Reakcije su izvođene u 20 μ l i sadržavale su 4 μ l (1 μ g) linearizovanog plazmida; 2 μ l 10xATP/GTP/CTP/UTP-dig smeše; 2 μ l 10x pufera za transkripciju; 2 μ l RNaznog inhibitora i 2 μ l SP6 ili T7 RNK polimeraze. Orjentacija FeAP9 inserta u vektoru je bila takva da se sinteza antisens lanca, t.j. probe vodi sa SP6 promotora, dok je sinteza sens lanca, t.j. negativne kontrole, vođena sa T7 promotora. Reakcija je izvođena 2 sata na 37°C, a zatim je dodato 20 U DNaze i smeša je inkubirana 15 min na 37°C kako bi se eliminisala DNK kontaminacija. Reakcija je stopirana 10 min na 65°C. Ponovljena je etanolna precipitacija, kao što je opisano u Odeljku 3.3.8. U cilju efikasnijeg ulaska u ćelije RNK proba kao i negativna kontrola su skraćene, t.j., nespecifićno hidrolizovane do komadića od oko 400-500 bp. Hidroliza je vršena u karbonatnom puferu (40 mM NaHCO₃; 60 mM Na₂CO₃). Vreme inkubacije od 12 min, izraćunato je na osnovu formule: **Vreme=(Li-Lf) / (K x Li x Lf)**, gde je Li-inicijalna dužina probe (1.5 kb), Lf-finalna dužina probe (0.5 kb) i K-0,11 kb⁻¹min⁻¹.

3.7.5. *In situ* pretretman preseka tkiva

Preseci na mikroskopskim ploćicama su deparafinizovani u "HistoClear" rastvaraću (2X15 min), a zatim rehidratirani u rastvorima etanola razblaženja koje je postepeno povećavano: 100% (2X1-2 min), 95% (1-2 min), 90% (2 min), 80% (2 min), 60% (2 min) i 30% (2 min). Ploćice sa presecima su prebaćene 2 min u DEPC H₂O, a zatim su inkubirane u 1xPBS 20 min. Sledio je tretman proteinazom K (1 μ g/ml) u 100 mM Tris pH 8; 50mM EDTA, 30 min, na 37°C, a zatim inkubacija u 2 mg/ml glicina u PBS, 2 min. Ploćice su ispirane 2x 2 min u PBS, a potom inkubirane u 10 min u 4% paraformaldehidu/PBS i oprane 2x5min u PBS. Dodatno je vršena acetilacija, 10 min 0,1M trietanolaminom i acetanhidridom da bi se izbegao nespecifićni

signal koji može nastati vezivanjem probe za pozitivne aminokiselinske grupe. Sledilo je ispiranje u PBS 2x5 min na sobnoj temperaturi. Pločice su ponovo dehidratirane držanjem po 30 sekundi u 30%, 60%, 80%, 90% i 95% etanolu, a zatim 2x30 sekundi u 100% etanolu.

3.7.6. In situ hibridizacija

Za svaki slajd pripremljeno je po 30 μ l (100 ng) probe koja je pomešana sa formamidom iste zapremine, nakon čega je smeša inkubirana 2 min na +80° C. Smeša je potom prebačena na led i dodavano je 240 μ l hibridizacionog rastvora (10x *in situ* so; dejonizovani formamid; dekstran sulfat; Denhartov rastvor; tRNK) koji je preinkubiran na +53° C. Proba u hibridizacionom rastvoru nanošena je na preseke na pločicama, koje su prekrivane pokrovnim stakalcima za hibridizaciju (Sigma). Slajdovi su raspoređeni u vatrostalnu posudu u kojoj se nalazila papirna vata natopljena 0,2 M SSC (NaCl; Na-citrat, pH 7). Nakon hibridizacije na 60° C, preko noći vršeno je ispiranje 2x60 min u 0,2 M SSC na 60° C, a zatim su slajdovi prebacivani u PBS 1 min. Sledila je inkubacija 45 min u 1% Boeringer-ovom rastvoru za blokiranje i 30 min u 1% BSA u 100 mM Tris pH7,5; 0,3% Triton X-100.

3.7.7. Detekcija signala

Anti-dig antitela (Roche) su rastvorena u 1% BSA u 100 mM Tris pH 7,5; 0,3% Triton X-100, u odnosu 1:500. Rastvor antitela je nanošen na pločice koje su potom inkubirane 2 sata na sobnoj temperaturi. Sledila su 4 pranja u rastvoru BSA/Tris/Triton, a potom inkubacija u AP puferu (100 mM Tris pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂, 10 min). Slajdovi su prekriveni sa po 300 μ l rastvora za razvijanje signala (2 % NBT/BCIP u AP puferu) i držani u mraku preko noći. Slajdovi su ispirani u vodi kako bi se stopirala reakcija, a zatim minimalno dehidratirani

(10 sekundi 70% etanol, 10 sekundi 100% etanol), obzirom da je obojeni proizvod reakcije od koga potiče signal rastvorljiv u alkoholu. Pločice su zatim osušene i prekrivene 50% glicerolom i pokrovnom ljupticom.

4. REZULTATI

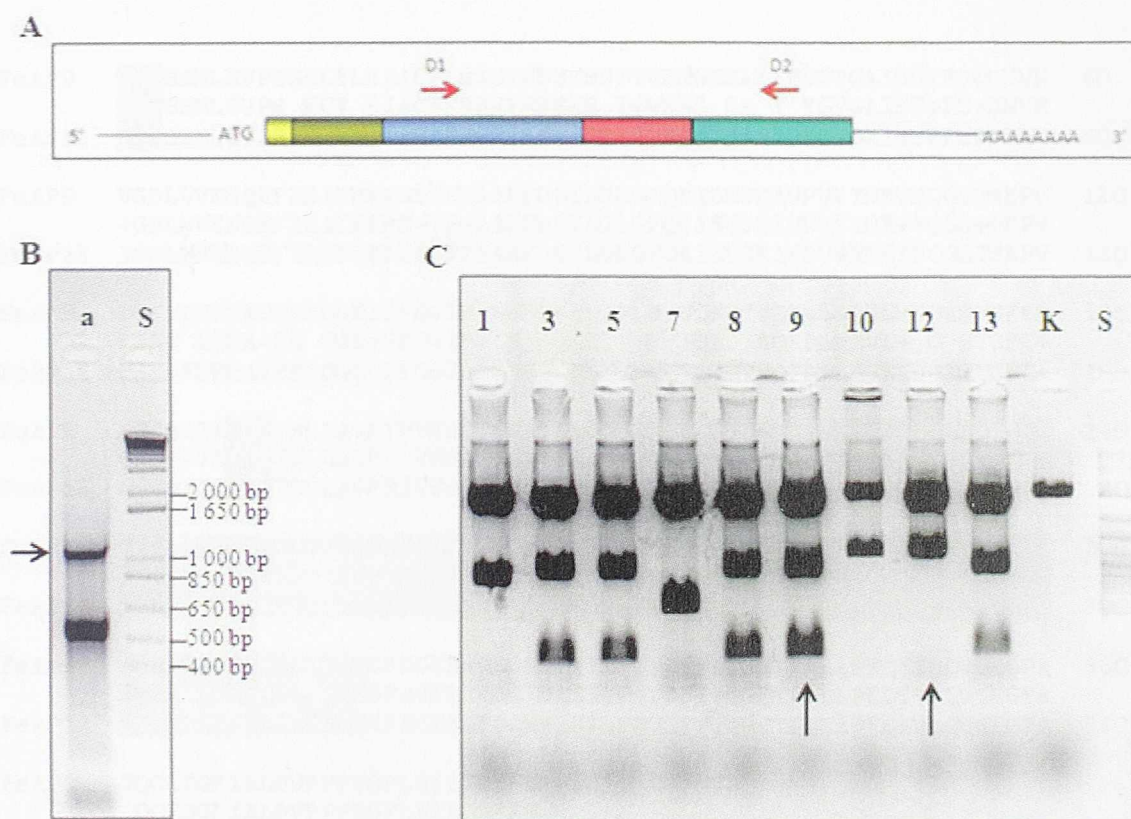
4.1. Izolovanje gena za aspartične proteinaze heljde

Imajući u vidu da o genima za biljne aspartične proteinaze postoje veoma oskudni podaci o organizaciji njihovih kodirajućih i regulatornih regiona, kao i o njihovoj ekspresiji, karakterizacija svakog novog gena predstavlja doprinos u njihovoj analizi. Obzirom da je do sada iz semena heljde izolovana jedna tipična aspartična proteinaza i da je delimično biohemijski okarakterisana njena aktivnost (Timotijević *et al.*, 2003), ukazala se potreba da se izoluje i analizira gen koji kodira ovaj enzim. U cilju izolacije gena za AP heljde opredelili smo se za cDNK koja je sintetisana iz ukupne informacione RNK izolovane iz semena u srednjoj fazi sazrevanja, obzirom da je očekivano da je u ovoj fazi zastupljena iRNK AP heljde. Ova pretpostavka proizašla je iz saznanja da dinamičnost procesa u srednjoj fazi sazrevanja, podrazumeva uključivanje i gašenje različitih grupa gena kao što su geni za rezervne proteine (RP); geni za enzime uključene u sintezu ugljenih hidrata; geni za proteinaze, koje učestvuju u sazrevanju i hidrolizi RP, kao i mnogih drugi. Do danas je iz heljde izolovano samo nekoliko gena aktivnih u srednjoj fazi sazrevanja semena i to su geni koji kodiraju subjedinice 13S globulina (Samardžić *et al.*, 2004), glavnog rezervnog proteina i gen za metalotionein (Brkljačić *et al.*, 1999).

4.1.1. Kloniranje i analiza parcijalnih cDNK sekvenci koje kodiraju dve tipične aspartične proteinaze heljde

U cilju izolovanja cDNK koja kodira aspartičnu proteinazu heljde, izvođena je reakcija lančanog umnožavanja u kojoj su korišćeni izrođeni prajmeri dizajnirani na osnovu do sada

poznatih nukleotidnih sekvenci biljnih aspartičnih proteinaza. Kao matrica u ovoj reakciji korišćena je totalna cDNK izolovana iz semena heljde u srednjoj fazi sazrevanja (17-21) DAF (DAF *od engl. Days After Flowering*). Dobijeni produkti amplifikacije dužine oko 1,2 kb (Slika 1A) su ligirani u pGEM-T Easy vektor i nakon restrikcione analize korišćenjem *EcoRI* enzima detektovana su dva tipa PCR produkata (Slika 1B). Odabrani su i sekvencirani predstavnici oba tipa PCR umnožaka.



Slika 1. Izolovanje parcijalne cDNK koja kodira aspartične proteinaze heljde primenom degenerativnih prajmera. Šematski prikaz cDNK AP sa pozicijama izrođenih prajmera (A), elektroforetska analiza PCR produkata na 2% agaroznom gelu (B) i restrikciona analiza klonova korišćenjem *EcoRI*. K - kontrola: zatvoren plazmid, S - DNK marker sa označenim dužinama fragmenata

Kompjuterskom analizom u kojoj je korišćen BLAST algoritam ustanovljeno je da obe selektovane sekvence, dužine po 1161 bp predstavljaju parcijalne cDNK koje kodiraju tipične

aspartične proteinaze heljde, označene kao *FeAP9* (acc. no. [AY826351](#)) i *FeAP12* (acc. no. [AY826352](#)), čije su nukleotidne sekvence nakon preklapanja pokazale 81% identičnosti. Analiza izvedenih *FeAP9* i *FeAP12* aminokiselinskih sekvenci pokazuje prisustvo dva aspartata u okviru konsenzus aminokiselinskih trijada DTG i DSG koje čine aktivno mesto biljnih AP. Pozicija nizvodnog prajmera D1 je takva da su dobijene parcijalne AP sekvence koje startuju od DTG motiva.

<i>FeAP9</i>	DTGSSNLWVPSGKCYLSIACFFHSHKYKSSKSSSTYVKNGKSAEIH YGTGAISGYFSQDNVK	60
<i>FeAP12</i>	DTGSSNLWVPSKCYFSIACFFHSHKYKSSKSI THVKNGTSAAIRYGTGAISGFFSRDNVK	60
<i>FeAP9</i>	VGDLWVENQEFIEATREPSLTFVAAKFDGILGLGFQEISVGKAVPVWYNNMVNQGLVNEPV	120
<i>FeAP12</i>	IGDLWVENQEFIEATREPSITFIAAKFDGILGLGFQEISVGKAVPVWYNNMIDQGLISEPV	120
<i>FeAP9</i>	FSFWLNRNADEEIGGEIVFGGIDPAHHKGEHTYLPVTQKGYWQFDLDVLVGGESTGFCS	180
<i>FeAP12</i>	FSFWNRNAEEEEGGELVFGGIDPDHFRGQHTYVPVVTQKGYWQFDMDDVLDLIDGMSTGFCA	180
<i>FeAP9</i>	GGCSAIA DS GTSLLAGPTPVVAQINHAIGASGVVSQECKTVVSYGKQILDLLVSTQPR	240
<i>FeAP12</i>	GGCA AIAD S GS TSLLAGPMAVVAQINHAIGATGIVSQECKTVVAEYGKEIIEMLLSEAQPL	240
<i>FeAP9</i>	KICSQIGLCTFDGTRGVSMGIESVVDK NV KSSGSLKEXXCVACEMAVW W QNLQ Q NT	300
<i>FeAP12</i>	KICSQ GL CTFDGTRGVSMGIESVVDK NV VKSSGSLKEXXCVACEMAVW WI QNLQ Q NT	300
<i>FeAP9</i>	EDRILDYANQLCE RL PSPMGESAVDCGSLSTLPTVSFTLGGKTFALAPEQYILQVGE G PA	360
<i>FeAP12</i>	EELILDYANQLCE RL PSPMGESAVDCSSLSLTPDVSFTIGGKTFDLAPEQYVLQVGE G PA	360
<i>FeAP9</i>	TQCISGFIALDVP PPRGPLWILGD IFM	387
<i>FeAP12</i>	AQCISGFIALDVP PPRGPLWILGD VFM	387

Slika 2. Poređenje parcijalnih *FeAP9* i *FeAP12* izvedenih aminokiselinskih sekvenci. Crveno - katalitičke trijade iz aktivnog mesta; plavo – potencijalna mesta za glikozilaciju; sivo - „plant specific insert“.

Takođe je u obe izvedene aminokiselinske sekvence uočen PSI region - „Plant Specific Insert“, dužine 104 AA. Analiza dobijenih sekvenci u programu NetNGlyc:

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> za predviđanje mesta za glikoziklaciju pokazala je potencijalno N-glikozilaciono mesto na poziciji 297 (NQTE) *FeAP9* i *FeAP12* klona, dok je u *FeAP12* pronađeno dodatno mesto na poziciji 37 (NGTS) u odnosu na DTG motiv.

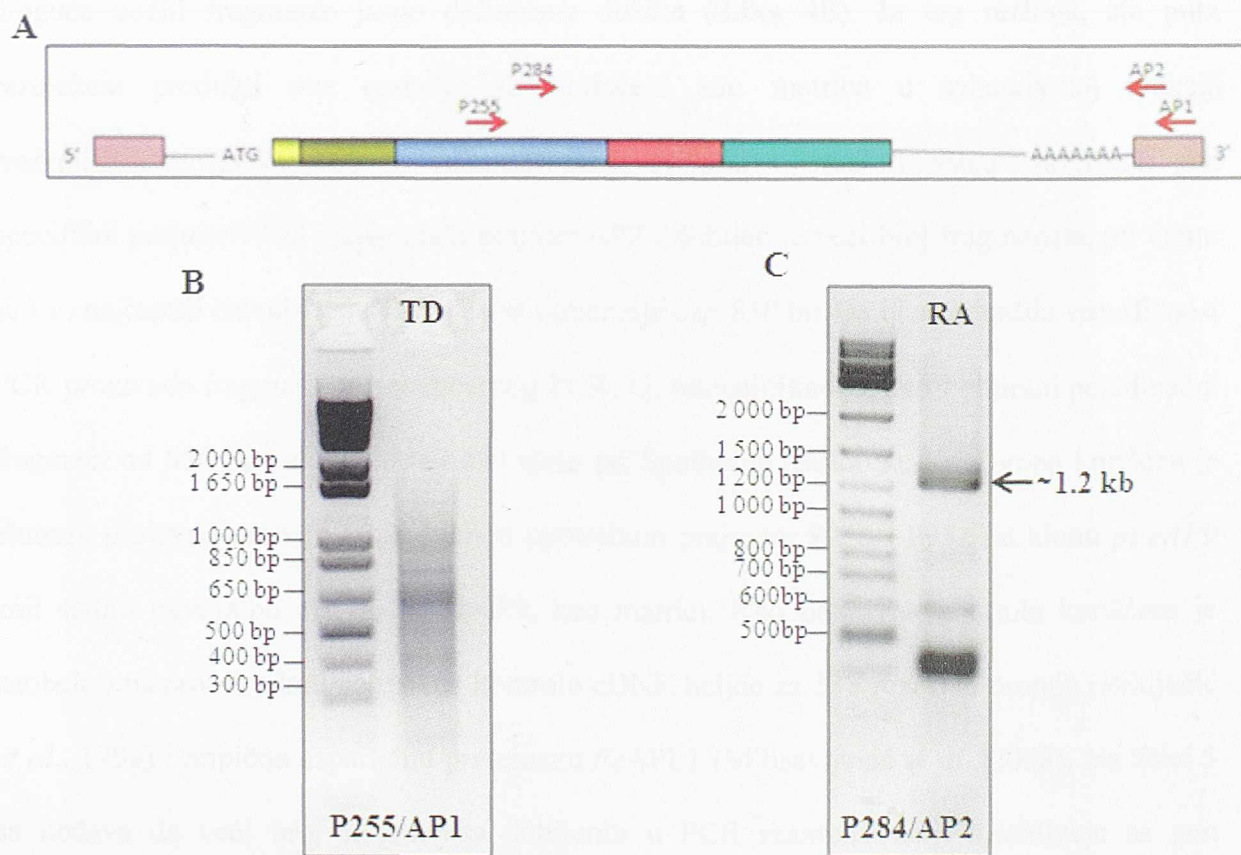
Poređenje izvedenih aminokiselinskih sekvenci *FeAP9* i *FeAP12* sa sekvencama drugih tipičnih proteinaza upotrebom BLAST algoritma pokazuje postojanje veoma visokog stepena međusobne homologije. Najveću sličnost, pokazale su *FeAP9* i *FeAP12* međusobno (93%, homologije i 87,3% identičnih aminokiselina) (**Slika 2**). Osim toga, *FeAP9* najveći procenat homologije pokazuje sa aspartičnom proteazom 1 iz *Nepenthes alata* ([dbj|BAB20969.1|](#)) - 91% , zatim aspartičnom proteinazom iz *Theobroma cacao* ([emb|CAC86003.1|](#)) - 90%, *Vigna unguiculata* ([gb|AAQ14346.1|](#)) - 89%, *Ricinus communis* ([gb|EEF32480.1|](#)) - 89% i *Arabidopsis thaliana* (GENE ID: [837740 AT1G11910](#)) - 88%. *FeAP12* pokazuje visoku sličnost aminokiselinske sekvence sa aspartičnom proteazom 2 iz *Nepenthes alata* ([dbj|BAB20970.1|](#)) - 90%, i aspartičnim proteinazama iz biljaka: *Arabidopsis thaliana* (GENE ID: [8266253 RCOM_1303660](#)) - 90 % , *Ricinus communis* ([gb|EEF32480.1|](#)) -90%, *Populus trichocarpa* ([gb|EEE83632.1|](#))- 89% i *Theobroma cacao* ([emb|CAC86003.1|](#)) -89%.

4.1.2. Izolovanje kodirajućeg regiona *FeAP9* pune dužine modifikovanom 5' i 3'

RACE metodom

U cilju određivanja kompletne sekvence cDNK koja kodira aspartičnu proteinazu heljde označenu kao *FeAP9* korišćen je 5' i 3' RACE pristup za koje su upotrebljeni gen specifični prajmeri dizajnirani na osnovu prethodno određene parcijalne sekvence cDNK za *FeAP9*. Kao matrica u ovim PCR reakcijama korišćena je cDNK iz semena heljde u srednjoj fazi razvića na čije krajeve su bili ligirani parcijalno jednolančani adapteri.

U primarnom "Touch down" PCR korišćeni su P255 kao uzvodni gen specifični prajmer i AP1 - komercijalni nizvodni prajmer specifičan za sekvencu adaptera u cilju identifikovanja nepoznatog 3' kraja gena za *FeAP9* (Slika 3A). U "Touch down" PCR reakciji dobijen je veći broj nedovoljno jasnih fragmenata (Slika 3B), te je iz tog razloga izvođena reamplifikacija, u kojoj su pedeset puta razblaženi produkti primarne reakcije korišćeni kao matrica. U reakciji reamplifikacije korišćeni su gen specifični prajmer P284 i adapterski prajmer AP2 (Slika 3A). Ovim postupkom dobijena su tri fragmenata pri čemu se kao najduži i najjasniji uočava fragment dužine od oko 1.2 kb (Slika 3C).

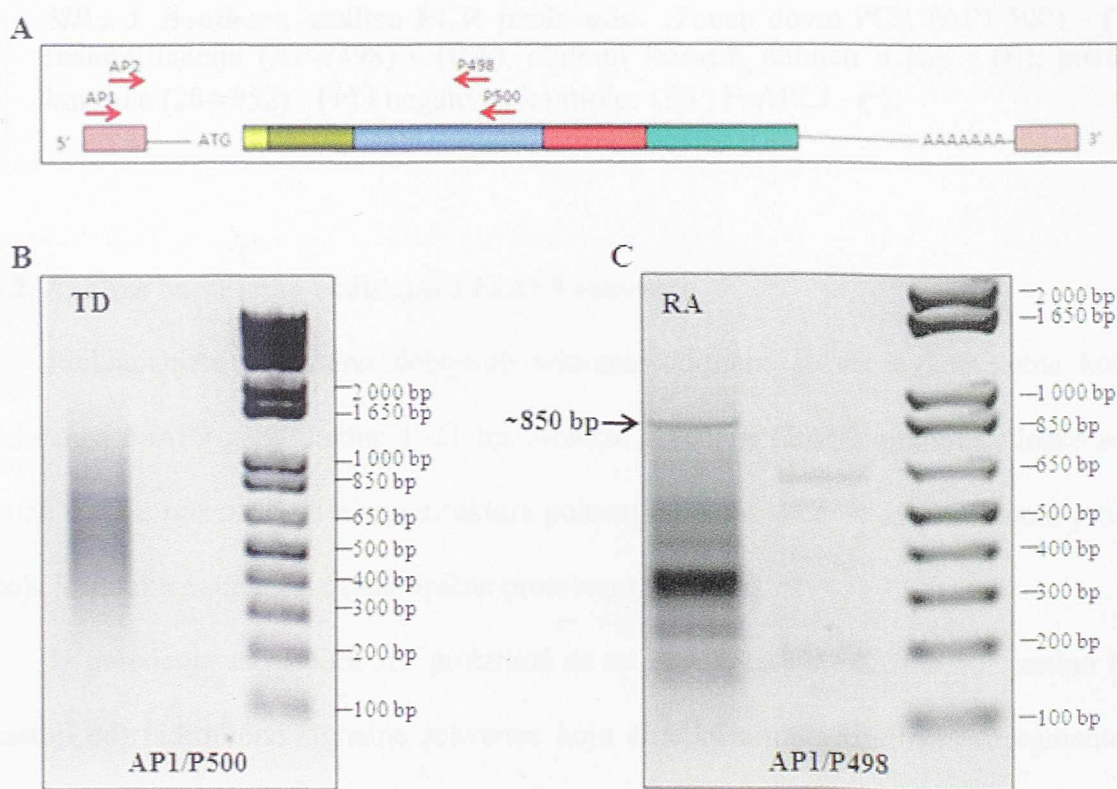


Slika 3. 3' RACE. Šematski prikaz cDNK AP sa pozicijama prajmera korišćenih za 3' RACE (A) i elektroforetska analiza produkata „Touchdown“ PCR-a (B) i njegove reamplifikacije (C) na 2% agaroznom gelu.

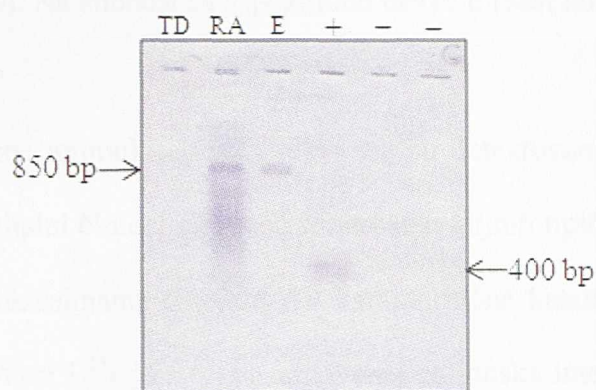
Dobijena nukleotidna sekvenca je analizirana i ustanovljeno je očekivano apsolutno preklapanje od 905 bp sa sekvencom prvobitno dobijenog parcijalnog cDNK klona *FeAP9*. Sekvenca je sadržavala i dodatnih 60 bp nepoznate 3' kodirajuće sekvence, kao i 226 bp 3' netranslirajućeg regiona.

Na sličan način urađen je i 5' RACE u cilju kompletiranja nepoznatog 5' kraja. Za "Touch down" PCR korišćen je P500 - uzvodni gen specifični prajmer i AP1 - komercijalni nizvodni prajmer specifičan za sekvencu adaptera (**Slika 4A**). U "Touch down" PCR reakciji dobijen je spektar fragmenata koji su se grupisali između 300 i 1500 bp u kojima nije bilo moguće uočiti fragmente jasno definisane dužine (**Slika 4B**). Iz tog razloga, sto puta razblaženi produkti ove reakcije su korišćeni kao matrica u sekundarnoj reakciji reamplifikacije (**Slika 4C**). U reamplifikaciji su primenjivani "neasted" prajmeri: gen specifični prajmer P498 i adapterski prajmer AP2 i dobijen je veći broj fragmenata, pri čemu se kao najjasniji izdvaja najviši fragment dimenzije oko 850 bp. Da bi se odredila specifičnost PCR proizvoda fragmenti iz sekundarnog PCR, t.j. reamplifikacije, kao i eluirani pojedinačni fragment od 850 bp su analizirani metodom po Southernu (**Slika 5**). Kao proba korišćen je eluirani proizvod umnožavanja dobijen upotrebom prajmera P255 i P952 na klonu *pFeAP9* koji sadrži parcijalnu cDNK za *FeAP9*, kao matrici. Kao pozitivna kontrola korišćena je neobeležena proba, a kao negativne kontrole cDNK heljde za 13S rezervni protein (Brkljačić *et al.*, 1998) i atipičnu aspartičnu proteinazu *FeAPL1* (Milisavljević *et al.*, 2008). Na **Slici 5** se uočava da veći broj fragmenata dobijenih u PCR reamplifikaciji hibridizuje sa gen specifičnom probom, ali se na membrani najjasnije uočava signal nastao hibridizacijom probe i fragmenta najveće molekulske mase od 850 bp. Isti signal dobijen je takođe i sa pojedinačno eluiranim fragmentom od 850 bp. Kako je u ukupnoj reakciji reamplifikacije uočen veći broj

signala, koji su verovatno posledica nekompletno umnoženog specifičnog cDNK fragmenata, odabrana je traka najveće dužine, a zatim sekvencirana. Analizom dobijene sekvence uočeno je da je taj fragment sadržavao preklap sa poznatom parcijalnom cDNK sekvencom od 475 bp, a da preostalih 380 bp predstavlja nedostajući 5' kraj, od čega je 297 bp kodirajuća sekvenca do starta translacije (ATG), dok 83 bp pripada 5' UTR, t.j. netranslirajućem regionu.



Slika 4. 5' RACE. Šematski prikaz cDNK AP sa pozicijama prajmera korišćenih za 5' RACE (A) i elektroforetska analiza produkata „Touchdown“ PCR-a (B) i njegove reamplifikacije (C) na 2% agaroznom gelu.



Slika 5. Southern analiza PCR proizvoda. „Touch down PCR (AP1/500) - (TD), reamplifikacija (AP2/498) - (RA), eluirani fragment dobijen u RA - (E), pozitivna kontrola (284/952) - (+) i negativne kontrole: 13S i FeAPL1 - (-).

4.2. Analiza kompletne kodirajuće *FeAP9* sekvence

Preklapanjem prethodno dobijenih sekvenci utvrđeno je da je kompletna kodirajuća sekvenca *FeAP9* gena dužine 1521 bp. Analiza izvedene *FeAP9* aminokiselinske sekvence pune dužine pokazuje da njena struktura pokazuje veliku sličnost sa primarnom strukturom koja je karakteristična za ostale tipične proteinaze (Slika 6).

Iz poređenja sa ostalim AP proizilazi da se *FeAP9* ukupne dužine 507 amino kiselina, sastoji od: hidrofobne signalne sekvence koju čine 24 amino kiseline, prosegmenta od 40 amino kiselina na N terminusu i nizvodne sekvence koja čini zreo enzim. Ta sekvenca sadrži dva peptidna lanca: N i C, razdvojena sa 104 amino kiseline PSI regiona (Slika 7). Procenjena molekulska masa preproteina iznosi oko 54,5 kDa, a njegova izoelektrična tačka je 5,35.

Analiza PSI regiona pomoću „NCBI conserved domain search“ programa pokazuje homologiju od 47,4% u N-terminalnom i 48,7% u C - terminalnom delu sa dva domena sapozina B prisutna u prosapozinu (smart00741) i 100% homologije sa proteinom sličnom

sapozinu (pfam03489). Na sličnost sa sapozinima ukazuje i šest konzervisanih cisteina i jedan invarijantni tirozin.

U okviru izvedene aminokiselinske sekvence su detektovana dva aspartata: ³⁶Asp and ²²³Asp, koje su esencijalni činioci aktivnog mesta svih biljnih tipičnih proteinaza, a uočeno je da sa okolnim aminokiselinama čine, za AP karakteristične katalitičke trijade: DTG i DSG. Takođe su identifikovani i ¹¹Lys i ¹³Tyr odgovorni za jonske interakcije sa Asp iz aktivnog mesta. Zanimljivo je takođe prisustvo KGE motiva na poziciji 246 do 248, po strukturi i naelektrisanju sličnom RGD domenu, koji je poznat kao ćelijski adhezivni motiv. Potencijalno N-glikozilaciono mesto na poziciji 397 (NQTE) u okviru PSI regiona je predikovano korišćenjem NetNGlyc algoritma.

Takođe su analizirani i netranslirajući 5' i 3' regioni. U ovoj analizi identifikovana su 83 bp 5' UTR regiona, uzvodno od startnog ATG, ali u okviru njega nisu pronađeni ni potencijalni regulatorni elementi, niti potencijalni start transkripcije. U okviru 226 bp 3' UTR regiona, nizvodno od stop kodona TAG, nije pronađen tipičan AATAAA konsenzus signal za poliadenilaciju. U ovom genu, je 35 nukleotida uzvodno od polyA repa pronađena potencijalna poliadenilacijska sekvenca AATTAA u kojoj je došlo do supstitucije jednog nukleotida u odnosu na konsenzus sekvencu, a koja je karakteristična za biljne gene.


```

*      20      *      40      *      60      *      80
FeAP9 : MTNISRSISL--LLVLLVSPISLSVAANDLVRVGLKKRRLLDPNRRPASRFGCK-KH----LMQKYGLGNGFGD-DDTGIIISLKNM : 78
NaAP1 : MGSTSRSVLASFLLLLSPLVNSSNDRLLRVGLKKRRLLDQINRFSSLYGCKGKESINPAIRKYGLGNGLNDDADIISLKNM : 86
TcAP : NGRIVKTTTFTVFLCLLFFIVFISISNERLVRVGLKKRRFDQNYRLAAHLDSKEREAFRASLKKYRLQGNLQESSEDIDIVALKM : 86
RcAP : NGTIKFKPALFFCLLLLPVCATASSNDGLVRLVGLKKRRFDQNNRVAQFESKGEAFRASIKKYHIRGNLGAEDIDIVSLKNM : 86
AtAP : NKIYSRTVAVSVIVSFLFCFSAFAERNDDGTFRRVGLKKRRLLDSKNRLAARVESKQEK----PLRAYR----LGDSDGADVVLKNM : 78
VuAP : MGNKNKVISLCLFVTTLDFSAVSCAPNDGLRRVGLKKRRLLDPNRLAARIGSND-DSFRASIRKFFHLQNNFAGTGETDIVALKM : 85
CcAP : MGTPIKASLLALFLFFLSPTAPSVSNGGLLRVGLKKRRVDRLDQLRAH----GVHMLGNARKDFGFRRTLSDS-GSGVALATMDR : 81
M      1      11      N      1      R      GLKK      K      D      r
*      100     *      120     *      140     *      160     *
FeAP9 : DAQYFGEIATGTFPQKFEVIEDTGSSNLWVPSRCYLSIACFFHSKYKSKSSLYVKNGKSAIHHYGTGAISEYFSQDNVKGGLD : 164
NaAP1 : NAQYFGEICIGTPEQKFEVIEDTGSSNLWVPSRCYFSIACYLHRSRYKSSRSSTYKANGKPADIQYGTGAISEYFSQDNVKGGLD : 172
TcAP : DAQYFGEICIGTPEQKFEVIEDTGSSNLWVPSRCYFSIACYLHRSRYKSSRSSTYKANGKPADIQYGTGAISEYFSQDNVKGGLD : 172
RcAP : DAQYFGEICIGTPEQKFEVIEDTGSSNLWVPSRCYFSIACYLHRSRYKSSRSSTYKANGKPADIQYGTGAISEYFSQDNVKGGLD : 172
AtAP : DAQYFGEIATGTFPQKFEVIEDTGSSNLWVPSRCYFSIACLIHPKYKSSRSSTYKANGKAAADHYGTGAIACFESYNDAVTVD : 164
VuAP : DAQYFGEISLGTSPQKFEVIEDTGSSNLWVPSRCYFSIACYLHRSRYKSSRSSTYRRNGTAAAIQYGTGAIACFESYNDVNRV : 171
CcAP : DTAYFGEICIGTPEQKFEVIEDTGSSNLWVPSRCYFSIACVHPRYDSDSSYKNGTGTASHIQYGTGAIACFESYQDSVWV : 167
daqY GEI IGTppQ FtvIEDTGSSNLWVPS KC S AC H Y S SstY NG A I YGTGAI Gffs D V vGdIV
*      180     *      200     *      220     *      240     *      2
FeAP9 : VENEAFIEATREESITELVAKFDGILGLGFQEIISVGNAPVWYNNMVGGLVNEVVFSEFNLNRNADEEBEGEIVFGGDPNHHY : 250
NaAP1 : VENEAFIEATREESITELVAKFDGILGLGFQEIISVGNAPVWYNNMVGGLVNEVVFSEFNLNRNADEEBEGEIVFGGDPNHHY : 258
TcAP : VKNQAFIEATREESITELVAKFDGILGLGFQEIISVGNAPVWYNNMVGGLVKEVVFSEFNRDEPEDDIEGSEVVEGGMDPKH : 258
RcAP : IKNEAFIEATREESITELVAKFDGILGLGFQEIISVGNAPVWYNNMVGGLVKEVVFSEFNRNADEEBEGEIVFGGDPNHHY : 258
AtAP : VKNDAFIEATREESITELVAKFDGILGLGFQEIISVGNAPVWYNNMVGGLVKEVVFSEFNLNRNADEEBEGEIVFGGDPNHHY : 250
VuAP : VKNQAFIEATREESITELVAKFDGILGLGFQEIISVGNAPVWYNNMVGGLVKEVVFSEFNLNRKTEEBEGEIVFGGDPNHHY : 257
CcAP : MEHDAFIEATREEDTVELKSEFDGILGLGFQEIISVGNAPVWYNNMVGGLVKEVVFSEFNLNRNDEEBEGEIVFGGDPNHHY : 253
v Q FIEaT Ep F akFDGILGLGFQEIISV G AvVWYNNMv QGL EpVSEFW NR e GGE VGG DP H kG H
*      60      *      280     *      300     *      320     *      340
FeAP9 : TYVPTTKGYWQFDMDDVLLVCGEISGFCSSGGCSALADSGTSLLAGPTPVVAQINHAIGASGVVQCECKRAVAAYGETI : 336
NaAP1 : TEVPTTKHGYWQFDMDDVLLVCGEISGFCSSGGCSALADSGTSLLAGPTTVAQINHAIGASGVVQCECKRAVAAYGETI : 344
TcAP : TYVPTTKRKYWQFDMDDVLLVCGEISGFCAGGCSALADSGTSLLAGPTTVAQINHAIGASGVVQCECKRVAAYGETI : 344
RcAP : TYVPTTKGYWQFDMDDVLLVCGEISGFCSSGGCSALADSGTSLLAGPTTITEVNHAIAGATGVVQCECKRAVAAYGETI : 344
AtAP : TYVPTTKRKYWQFDMDDVLLVCGEISGFCSSGGCSALADSGTSLLAGPTTITMINHAIGAGGVVQCECKRVAAYGETI : 336
VuAP : TYVPTTKRKYWQFDMDDVLLVCGEISGFCAGGCSALADSGTSLLAGPTTITMINHAIGASGVVQCECKRVAAYGETI : 343
CcAP : TYVPTTKRKYWQFDMDDVLLVCGEISGFCAGGCSALADSGTSLLAGPTTITQINHAIGAGVNLQCECKRVAAYGETI : 339
TyvPVT KGYWQFdm DVL g tG C GC AIADSGTSl agPT i NHaIGA GV sQ CK vV qYG i L
*      360     *      380     *      400     *      420     *
FeAP9 : QPKKICSIQGLCTFDGTRGWSMGIISVVDKNVDKSSGNLKDATCSACEMAVVWQNLKQNOTEDRIIDANQICERLPS : 422
NaAP1 : QPKKICSIQGLCTFDGTRGWSVGIKSVVDMNVGSSSGLQDATTACENTVWVWQNLKQNOTEERIINNVNIECERLPS : 430
TcAP : QPKKICSIQGLCTFDGTRGWSGIIISVYHENVGKATGDLHDAMSTCEMVAIVWQNLKQNOTQERIIEINIECERLPS : 430
RcAP : QPKKICSIQGLCTFDGTRGWSMGIISVVDKNAKLSNGVGDAAQCSACEMAVVWQNLKQNOTQERIINNVNIECERLPS : 430
AtAP : QPKKICSIQGLCTFDGTRGWSMGIISVVDKNAKLSNGVGDAAQCSACEMAVVWQNLKQNOTQERIINNVNIECERLPS : 422
VuAP : QPKKICSIQGLCTFDGTRGWSMGIISVVDENARKSSSGLDAAQCSACEMAVVWQNLKQNOTQDQISVNVNIECERLPS : 429
CcAP : QPKKICSHMKLCTFDGTRGWSMGIISVVDKNNKSSSG--EICTFCEMALYRMQNEIKRNETEDNTINHVNVVQDLETSS : 422
QP KICSqigLCTFDG rgv gIesVV da C CEM vvw Qnql N T Il y N lC lPspmgES
*      440     *      460     *      480     *      500     *
FeAP9 : VDCSSLSTMEVSTIGSRVEDLAPPEQYIKVGGSPVATOCISGFTALDVAEPKGLMILGDIEMGQYHTVFDENMQVGF : 506
NaAP1 : VDCSSLSTMEVSTIGSRVEDLAPPEQYIKVGGSPVATOCISGFTALDVAEPKGLMILGDIEMGQYHTVFDENMQVGF : 514
TcAP : VDCSSLSTMEVSTIGSRVEDLAPPEQYIKVGGSPVATOCISGFTALDVAEPKGLMILGDIEMGQYHTVFDENMQVGF : 514
RcAP : VDCSSLSTMEVSTIGSRVEDLAPPEQYIKVGGSPVATOCISGFTALDVAEPKGLMILGDIEMGQYHTVFDENMQVGF : 514
AtAP : VDCSSLSTMEVSTIGSRVEDLAPPEQYIKVGGSPVATOCISGFTALDVAEPKGLMILGDIEMGQYHTVFDENMQVGF : 506
VuAP : VDCSSLSTMEVSTIGSRVEDLAPPEQYIKVGGSPVATOCISGFTALDVAEPKGLMILGDIEMGQYHTVFDENMQVGF : 513
CcAP : VDCSSLSTMEVSTIGSRVEDLAPPEQYIKVGGSPVATOCISGFTALDVAEPKGLMILGDIEMGQYHTVFDENMQVGF : 506
VdC S P vsft Gg F l PE Y l VGeG qCISGF ALD pP GPlWILGD FMG HTVFD Gn VGFAEa

```

Slika 6. Poređenje aminokiselinske sekvence FeAP9 sa tipičnim aspartičnim proteinazama drugih biljnih vrsta. FeAP9 - gi|77808107; NaAP1 - gi|12231172; TcAP - gi|21616051; RcAP - gi|223530603; AtAP - gi|25055040; VuAP - gi|20800441; CcAP - gi|4582534

1 GTCTCTCTATTTTATTTTATATCTTTCCCCATTGGCTCTTTGCATCATCCCCACTACTC
61 TCTTCTTCTATAATCTCTCAGGtaaccatcctatcgattttgtggtaattttcttct
121 tattgtttgatgatgctggagtgtttgacagtttctgtatttagaataagctagtggtt
181 gattttgattttcatgattgactcaggagtagagcgaagggcattttcttttaaattggt
241 ggattaatttccctaatttgggtgttctttcaattgatcgatacacggcatgtgttttttg
301 tgtacatcagtgtttgatttgggttcttttgggaaccgatcatggctcctttttgacc
361 tgtcgaaggaaatgatttttctgatgatgtgtaagaatgtaagattatgtgttgaat
421 tagaagtgtcaacacaagaggggatgttgggtgaattaacttatggatgaggaatttgact
481 ttttcaagctagggatggactgggtgatgactgggagtgtatttccgatcctcttctgt
541 cgcttaatttgcctattttaaatacaaaaagagatgatgttctaggaccatctcgtttg
601 gacgaaattgaaatttgaactgggtacaagtatatgggaattcatgtagcgtcttttgca
661 attatgcttgacttcccttgaacatatatgacgtaaaagaacttgatgaggagaaaaat
721 tctttgcactttgatgtgtattgtacaggtggaagggaaattctttatcggatttagaat
M
781 tgtatttcttattctgctgattctgattctgattcatgggttctataactattttcagGAT
T N I S R I S L L L L V L L V S P I A L
841 GACCAACATTTCTCGGATTTCTGTGCTTCTTCTAGTGCTTCTTGTATCACCTATTGCCCT
S V A N N D L V R V G L K K R K L D P T
901 TTCAGTTGCAAATAATGATTTGGTCAGAGTGGGCTAAAGAAGAGAAAGTTGGATCCAAC
N R P A S R F G C K K H L M Q K Y G L G
961 CAACCGCCTGCCTCCGTTTTGGTTGTAAGAAACATTTGATGCAGAAGTATGGCCTTGG
N G F G D D D T G I I S L K N Y M D A Q
1021 TAATGGTTTTGGAGATGATGACACTGGTATCATCTCTCTAAAGAACTATATGGATGCCCA
Y F G E I A I G T P S Q T F T V I F D T
1081 AACTTCGGTGAGATTGCTATTGGAACCTTCACAACTTTTACGGTGATATTTGACAC
G S S N L W V P S G K C Y L S
1141 CGGGAGTTCAAATCTGTGGGTCCCATCTGGAAAATGTTACCTTTCGgtaaatatttattg
1201 ttttaaccaattgaaatattgaaatacagtgtagttgtgattggattgtgctagataagtg
I A C F F H S K Y K S S
1261 cataacaactttatgttctgctacagATCGCTTGTTTTTCCATTCAAAGTACAAGTCTA
K S S T Y V K N G
1321 GCAAGTCCAGCACTTATGTGAAAAATGgtatgactcttatcttggttccatgcttcaaca
1381 atattggctttcttttaataatagtgatataaaaactgcttttctgtggaagaact
1441 tatctggattttgacagattgctttgatcatatgtttagatcttcatgtcatatcaat
1501 cacttctgatcttctgaaggtgtctcttttagttggaagtttatcctactttctttc
1561 atttgccttctgttatttctacatcatgactaactgcgtgaagttogaacacttctg
1621 atatgatgatgttactacttttgggttgcattggaattgatcgtattacggtagactatta
1681 tgttgcacatcaatattggttcatgttaatccgaataacttatcttttaattggaacctcatc
1741 aaactattttcatttctacttctgttcatgatgatcctcgatggctaaaacctttccac
1801 cttgacaaatggtttggaatttggatgtatactttacttggaaattatattggttaatttg
1861 ttatactcccctctatgtatggaggaccttttctgtctgagtcctaaagcccaccacgggca
1921 gatatgggtaagactttaggcccgaattccggacttggcccagaaaacgggcaaatatt
1981 ttgagaagtcgggtcctagtcctggtctaccaggtaccaggtctagtcattagggatgg
2041 agtgaatacaagtgatttctaattgttggcttttaagaataaattttagcccttttttga
2101 atattaactggttctacgtcatgatacatgttggatgattatagggcaaatgtaat
2161 cattctgctgcatgccccatttgggttcatggctgctgtggaatctcatgatttttgggcat
K S A E I H Y G T G A I S G Y F S Q
2221 tgcagGTAAGTCAGCTGAGATTCAATTGGAAGTGGAGCCATTTACAGTTATTTAGCCA
D N V K V G D L V V E N Q
2281 AGACAATGTCAAAGTCGGGGACCTTGTTGTTGAAAATCAGgtagcttttagcatagtcgt
E F
2341 ataacatgtccttggattgataatttggattcttctaagctaattgctatcatcttcagGAAT
I E A T R E P S L T F V A A K F D G I L
2401 TCATTGAGGCAACAAGGGAGCCTAGTCTCACATTTGTTGACGCTAAGTTGACGGGATAC


```

4561 TATCCACATTGCCCACTGTTTCTTTCACTCTTGGTGGTAAAACATTTGCTTTGGCTCCTG
1541 Q
4621 AGCAGgtaaataactcttcaacttatctttcttggatccctcctctacttattttatgta
4681 tggtgctgctagcaagtttgggtgtaggaatgtcgttgacaattaaattatatttggat
4741 gcacaaatatcttctgacatttgggaattctttgaaatcaagtctattgttggcttggat
4801 tggtgcaagtgtttggatatacggctctgtctagattctagtttggctgctgctggcttcat
4861 gaaacagtgaatacaataatctgacaattttattccagaatcttgcacattgagataccgt
4921 tccaatatgaaatctgctgtatcataacttatgtgcatacagagattagataaattgtaat
4981 cagctatattttccaggcaaataatctgaataaaaaatcagaatgaaggcaaaatcttttt
5041 tatatggtagttccaagctagattaatctcctattcttggctgctgcttcatgaata
5101 ttacattaaagatggttggtagtaaaaccaccttgatatactgatgaagctatcgttatcta
Y I L
5161 agtgagtttgttcagaatggttggcttatggatcttatttcccgacagTATATCCTC
Q V G E G P A T Q C I S G F I A L D V P
5221 CAAGTTGGCGAAGGACCTGCGACTCAATGTATCAGTGGATTTCATTGCTCTTGACGTTCTC
P P R G P L W
5281 CCTCCACGTGGTCTCTCTGgtacgtttttactttaaactgaatgctcaaactcttactttg
5341 aacaatgaggtataggttaaggaagtaagactatgtagtcccagttatcctacatttgg
5401 aatccatgtaactataaaaaaaagtaccagcaacagaaaaggtgaocgaattgcatggg
I L G
5461 gaagcatctgatgaccaatttggctgaaaagtttcatttggggttggatgcagGATATTGGG
D I F M G Q Y H T V F D H G N M Q V G F
5521 AGACATTTTCATGGGTCAGTACCACACAGTGTTCGACCACGGGAACATGCAAGTCGGGT
A E A A *
5581 TGCTGAAGCTGCTTAGcgcgtgtttataaaccgccgtgcaaattctatattcctcctaca
5641 tgcataaaacataactatgttttagcttctaactaatgaaaggccagacaagagaggt
5701 tgtaatgtgtgttagttagtcatgctcgtctcttatgtaaataatctgtgctgctgtgtgct
5761 gctttcaatttgggaagttgaacttgaattaatacattttcataaaagctaccgtgttgg
5821 caaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

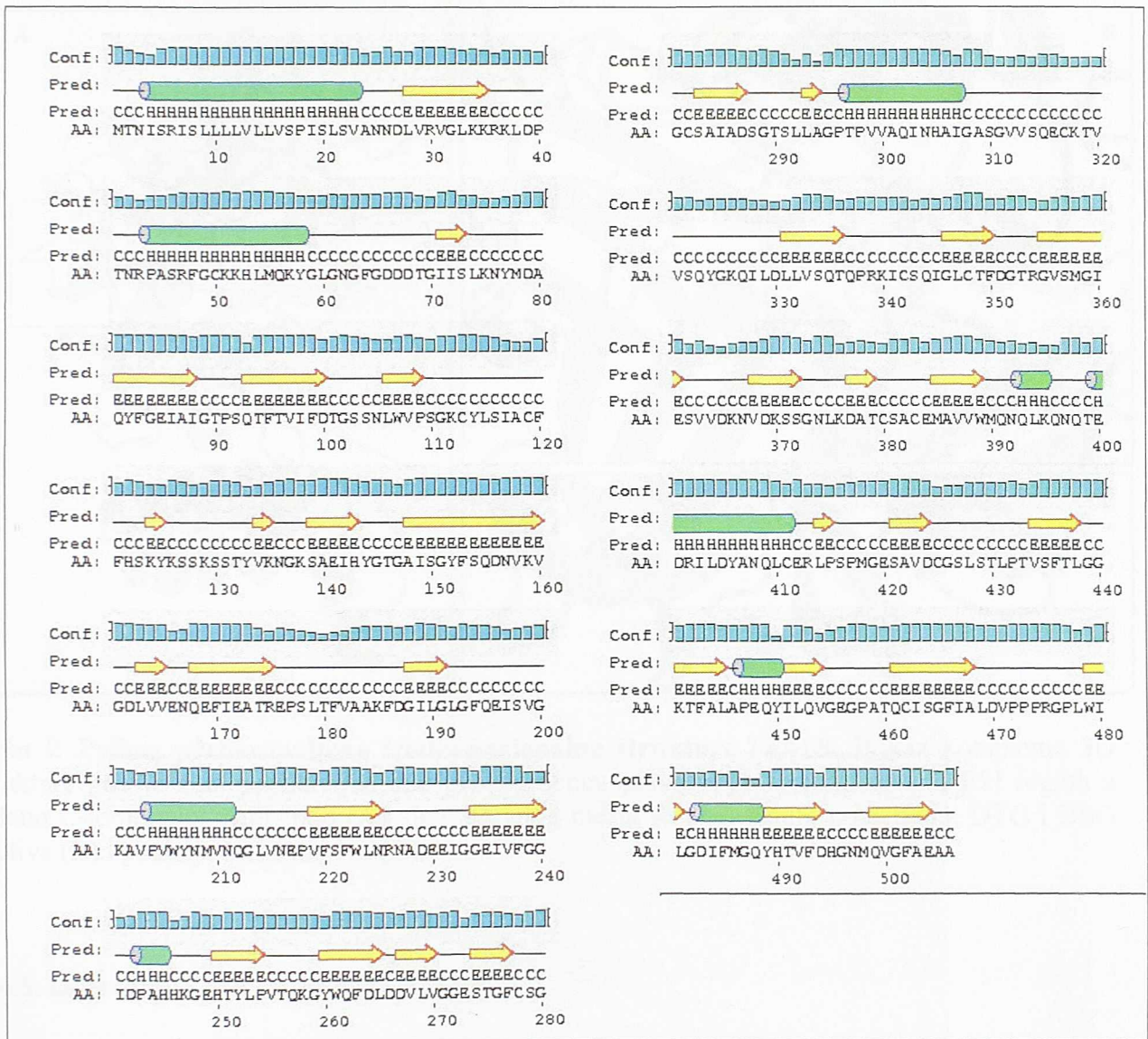
Slika 7. Nukleotidna sekvenca i izvedena aminokiselinska sekvenca *FeAP9* gena. Egzoni koji se nalaze u okviru *FeAP9* cDNK su prikazani velikim slovima, introni su prikazani malim slovima i zasenčeni sivom bojom, pre-segment je predstavljen u kurzivu, pro-segment je podvučen, DTG/DSG katalitičke trijade su prikazane tamnim slovima, a PSI region je podvučen.

4.2.1. Analiza sekundarne i tercijerne strukture *FeAP9*

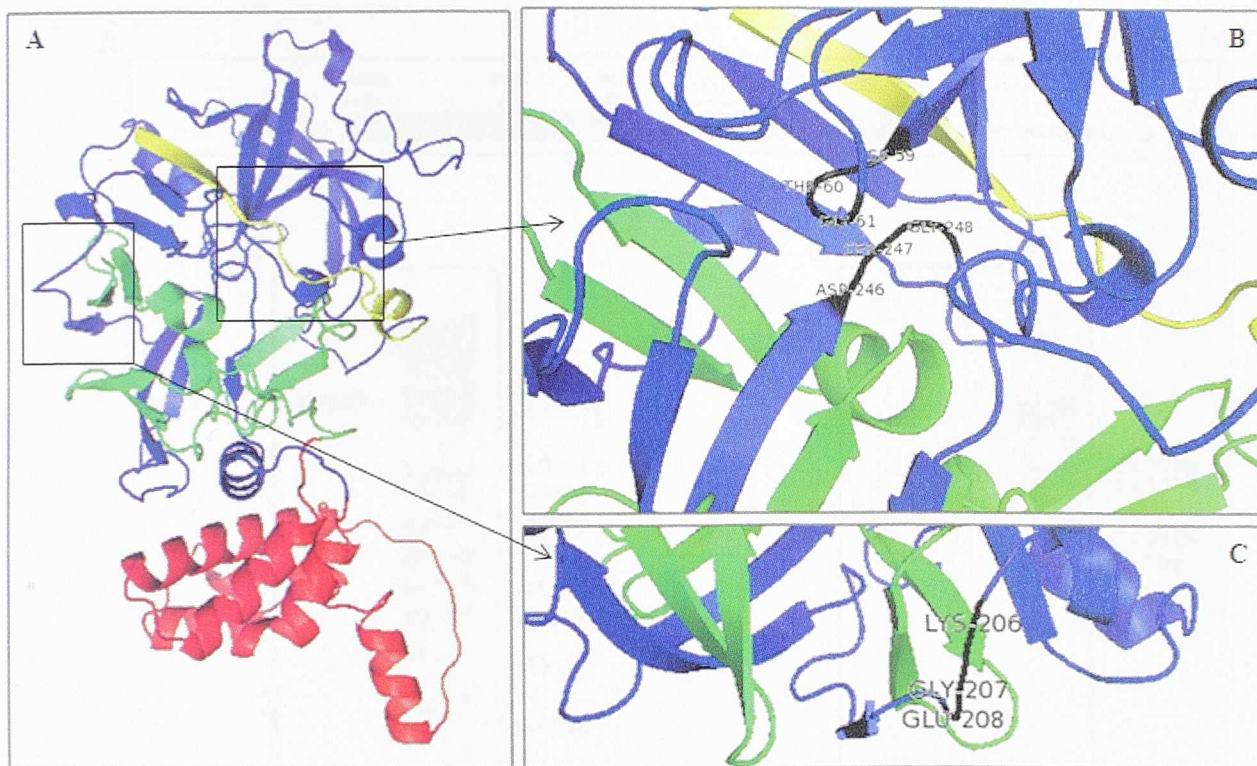
Na osnovu izvedene aminokiselinske sekvence *FeAP9* uz pomoć programskog paketa PSIPRED, određena je sekundarna struktura proteina (**Slika 8**). Predikcija trodimenzionalne (3D) strukture je rađena u programskom paketu GeneSilico (<http://genesilico.pl/meta>) (**Slika 9**). Pouzdanost predikcije predviđene strukture je zatim potvrđena u programu Verify 3D Structure, koji za svaku aminokiselinu proverava verovatnoću zauzimanja određene pozicije. Na osnovu predikcije 2D strukture utvrđeno je da se, kao i sve okarakterisane aspartične proteinaze, *FeAP9*

uglavnom sastoji od β -naboranih ploča. α -helikse formiraju aminokiseline koje čine signalni peptid (Met1-Ala20), i deo pro-segmenta Lys34-Lys54, koji nije ušao u 3D predikciju obzirom da u tom regionu AP međusobno pokazuju najmanju homologiju

Program je modelovao 3D strukturu proteina *FeAP9* na osnovu 466 aminokiseline, koje su davale homologiju sa drugim aspartičnim proteinazama te tako bile informativne za ovu analizu. Predikovana 3D struktura *FeAP9* proteina (**Slika 9A**) se podudara sa strukturama do sada okarakterisanih AP: fitepsina ječma (Kervinen *et al.*, 1999) i fitepsina Cinare (Frazão *et al.*, 1999). U predikovanoj strukturi uočen je karakterističan raspored dva Asp: Asp36 i Asp223, koji sačinjavaju aktivno mesto i koji su locirani u interdomenskom udubljenju (**Slika 9B**). Dno udubljenja je prekriveno sa šest lanaca β -naborane ploče, koji štite unutrašnje hidrofobno jezgro. Kristalna struktura pokazuje prisustvo motiva koji se vezuje za membrane ćelija: KGE motiv. Ovaj motiv je smešten suprotno od aktivnog mesta i istaknut je na površini molekula što ukazuje na njegovu ulogu u protein-protein interakcijama (**Slika 9C**). Predikcija kristalne struktura *FeAP9* heljde pokazuje i orijentaciju PSI regiona u odnosu na delove zrelog enzima. PSI domen je sagrađen od pet amfipatičnih heliksa koji formiraju helikoidni kompleks sa velikim unutrašnjim hidrofobnim jezgrom.



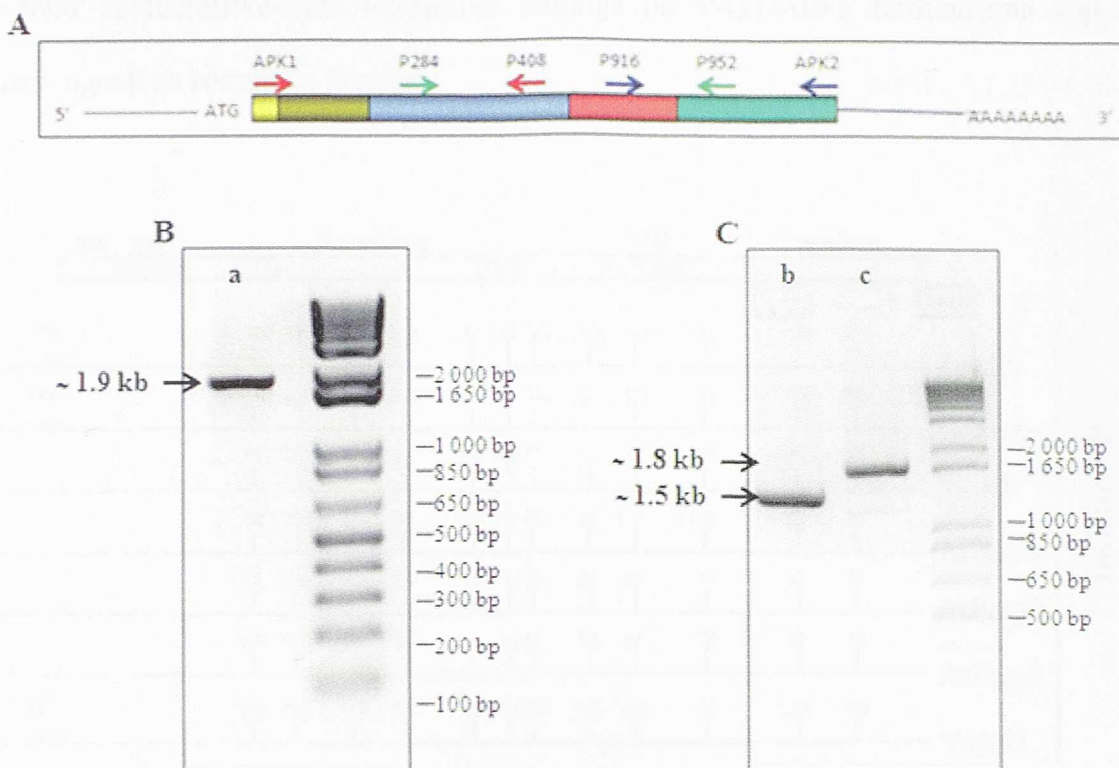
Slika 8. Sekundarna struktura FeAP9 aspartične proteinaze heljde. Zeleni cilindri predstavljaju strukture sastavljene od α -heliksa, žutim strelicama su označene β strukture, linije označavaju strukture nasumično uvijenog polipeptida, stubićima je predstavljena pouzdanost predikcije.



Slika 9. Prikaz pretpostavljene trodimenzionalne strukture *FeAP9*. Prikaz kompletne 3D strukture gde je žuto pretstavljen deo pro-segmenta, plavo N-polipeptid, crveno PSI region a zeleno C-terminalni polipeptid (A), deo aktivnog mesta sa obeleženim pozicijama DTG i DSG motiva (B) i pozicija KGE motiva (C).

4.3. Izolovanje i analiza gena za *FeAP9*

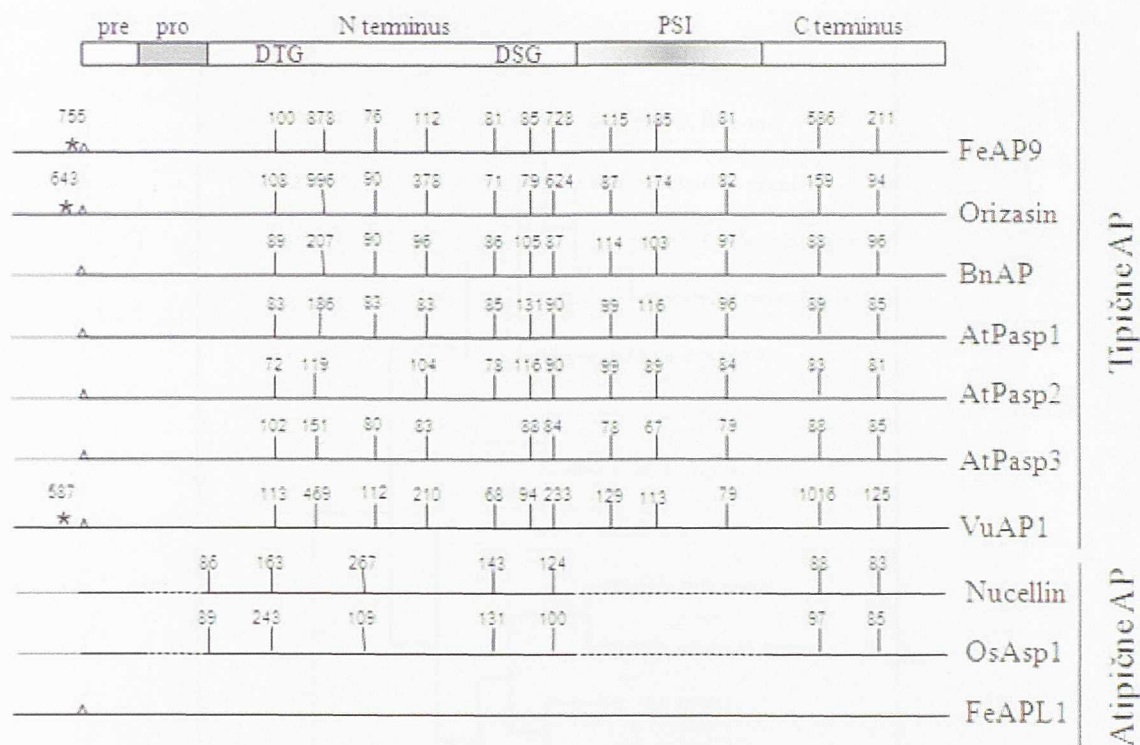
Koristeći prethodno izolovanu cDNK kompletne dužine koja kodira *FeAP9* ([AY826351](#)) dizajnirani su prajmeri za izolovanje odgovarajućeg gena za tipičnu aspartičnu proteinazu heljde iz genomske DNK. Kompletna *FeAP9* genomska sekvenca ([AM422870](#)) je dobijena u tri nezavisne reakcije lančanog umnožavanja izvedene korišćenjem sledećih pari prajmera: APK1/P408, P284/P952 i P916/APK2 (**Tabela 1**, *Materijal i metode*). Dobijeni fragmenti dužine: oko 1,9 kb; 1,5 kb i 1,8 kb (**Slika 10A i 10B**) su sekvencirani i preklapanjem njihovih sekvenci dobijen je kompletni genomski klon *FeAP9* (**Slika 7**).



Slika 10. Umnožavanje *FeAP9* gDNK. Šematski prikaz cDNK AP sa pozicijama prajmera korišćenih za dobijanje genomskog *FeAP9* klona (**A**) i elektroforetska analiza produkata PCR-a iz reakcije sa APK1/P408 (**B**) i P284/P952 i P916/APK2 (**C**) prajmerima na 2% agaroznom gelu.

Analizom u programu za predviđanje signala za iskrajanje introna („splajsovanje“), kao i preklapanjem cDNK *FeAP9* i gDNK sekvence ustanovljeno je da gen za *FeAP9* sadrži 12 introna. Većina introna je dužine oko 100 bp, sa izuzetkom drugog, sedmog i jedanaestog introna čije su dužine 878, 728 i 586 bp. Dužine i pozicije introna kao i poređenje sa drugim poznatim AP genima prikazani su na **Slici 11**. Poređenje je pokazalo da su broj, položaji i dužine introna slični među tipičnim aspartičnim proteinazama. Poređenje pokazuje da je najveća sličnost gena za *FeAP9* uočena sa orizasinom iz pirinča i vrlo malo odstupanje u odnosu na dva AP gena iz *Arabidopsis* koji nemaju duge introne i kojima nedostaje prvi

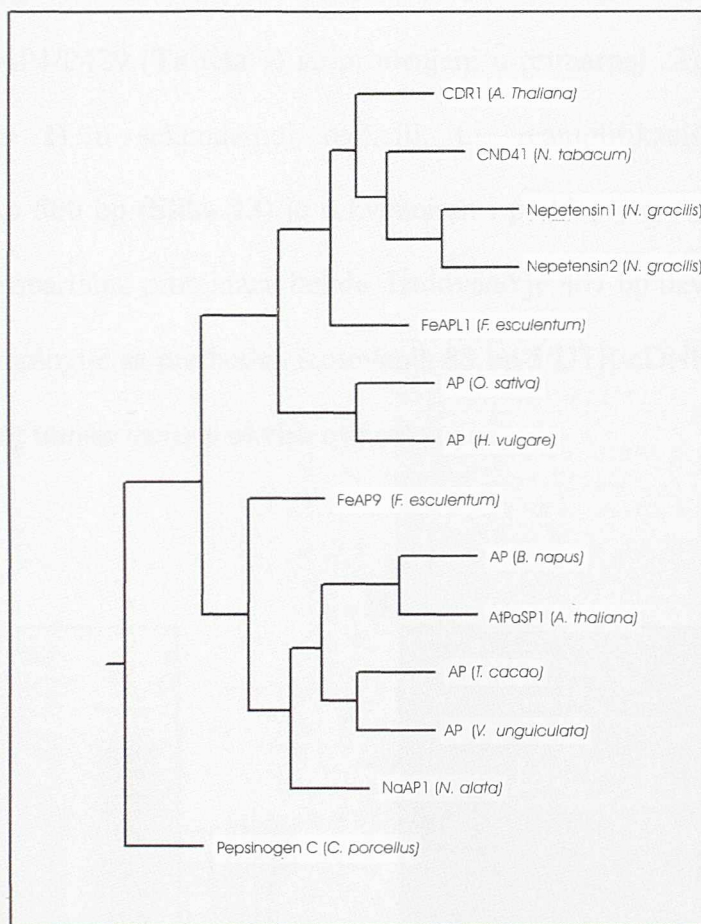
intron. Svih 12 identifikovanih introna se odlikuje po 5'-GT/AG-3' terminusima koji su konsenzus signali za iskrcanje introna.



Slika 11. Poređenje sekvence gena za *FeAP9* aspartične proteinaze heljde sa ostalim biljnim tipičnim i atipičnim aspartičnim proteinazama. U gornjem delu slike prikazan je primarni translacioni proizvod tipičnih AP gena, ispod se nalazi dijagramski prikaz pozicija (crtice) i veličine introna (brojevi iznad crtica). Lider introni su predstavljeni zvezdicom, a startni Met trouglom.

Osim navedenog izvedena je evolucionarna studija gena za *FeAP9* koja je uključivala konstruisanje filogenetskog stabla u cilju pozicioniranja *FeAP9* u odnosu na gene atipičnih, tipičnih i nebiljnih aspartičnih proteinaza. Dendrogram je konstruisan upotrebom programskog paketa PHYLIP, pri čemu su upotrebljene nukleotidne sekvence do sada poznatih AP, uz eliminisanje trećeg nukleotida kodona. Takođe, u analizi su korišćene sekvence tipičnih aspartičnih proteinaza iz kojih je izostavljen PSI region. Iz dendrograma je jasno da geni biljnih

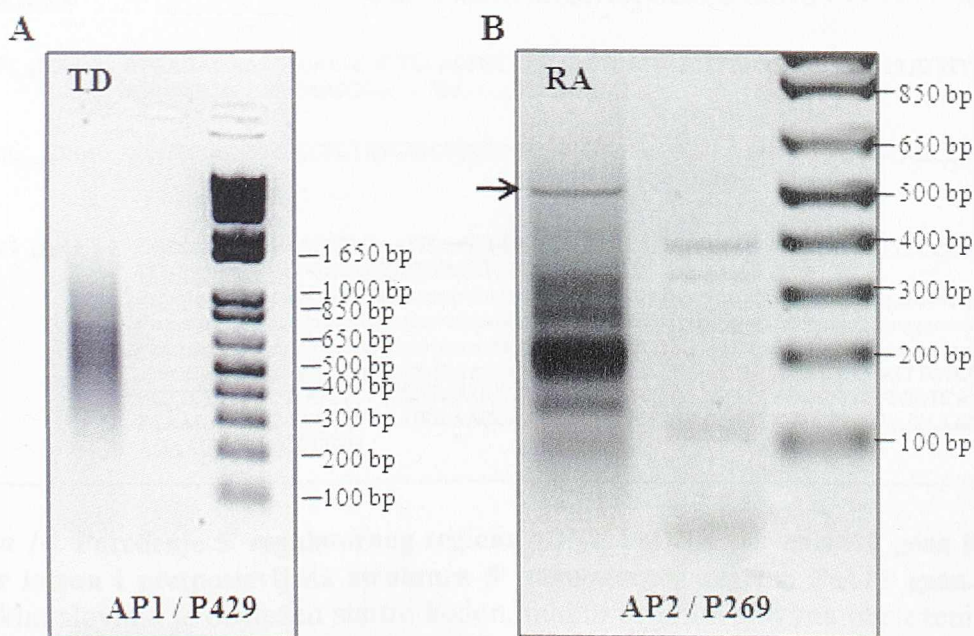
aspartičnih proteinaza pripadaju dvema granama. *FeAP9* se jasno grupiše sa ostalim genima koji kodiraju tipične AP i koji su jasno razdvojeni od grupe koju čine geni atipičnih AP (**Slika 12**). Ovim se potvrđuje analiza homologije na nivou aminokiselinske sekvence.



Slika 12. Filogenetske pozicije biljnih aspartičnih proteinaza. *FeAP9*, *Fagopyrum esculentum* (AAV84085), *TcAP1*, *Theobroma cacao* (CAC86003); *NaAP1*, *Nepenthes alata* (BAB20969); *AP Brassica napus* (AAB03108); *AtPasp1*, *Arabidopsis thaliana* (AAL08259); *AP Vigna unguiculata* (AAB03843); *Nepentesisin I i II*, *Nepenthes gracilis* ([BAD07474](#) i [BAD07475](#)); *CDR1*, *Arabidopsis thaliana* ([AAP72988](#)); *CND41*, *Nicotiana tabacum* ([BAA22813](#)); *FeAPL1*, *Fagopyrum esculentum* ([AY536047](#)); *AP-orizasin*, *Oryza sativa* (Q42456); *Hv-tipična AP*, *Hordeum vulgare* ([X56136](#)) *pepsinogen C*, *Cavis porcellus* (M88652)

4.3.1 Izolovanje i analiza 5' regulatornog regiona gena za *FeAP9*

Jedan od ciljeva ovog rada bio je i izolovanje 5' regulatornog regiona gena za *FeAP9*. Za ovu svrhu korišćen je modifikovani 5' RACE gde je kao matrica korišćena parcijalno digerirana gDNA heljde enzimom *SmaI* i na čije su krajeve bili ligirani parcijalno jednolančani adapteri. Prajmeri AP1/P429 (**Tabela 1**) su primenjeni u primarnoj „Touchdown“ reakciji, a AP2/P269 (**Tabela 1**) u sekundarnoj reakciji, t.j. reamplifikaciji. Najduži proizvod amplifikacije od oko 500 bp (**Slika 13**) je sekvenciran i preklopljen sa prethodno dobijenom cDNK koja kodira aspartičnu proteinazu heljde. Izolovano je 407 bp uzvodno od ATG, ali niti je bilo značajne homologije sa prethodno izolovanih 83 bp 5'UTR cDNK sekvence niti je bilo moguće odrediti start transkripcije u okviru ove sekvence.



Slika 13. Izolovanje 5' regulatornog regiona *FeAP9* gena primenom modifikovane 5' RACE metode. Elektroforetska analiza produkata „Touchdown“ PCR-a sa AP1/P429 prajmerima (A) i njegove reamplifikacije prajmerima AP2/P269 (B) na 2% agaroznom gelu.

Na osnovu nekih novijih saznanja iz literature pretpostavljeno je da se ova razlika može pripisati prisustvu dodatnog „vodećeg introna“ (lider intron) koji se nalazi u okviru 5'UTR (**Slika 14**). Dizajnirani su nizvodni prajmer If iz 83 bp dugog regiona koji predstavlja 5'UTR dobijen na osnovu cDNK FeAP9 sekvence (tkz. lider sekvenca) i uzvodni Ir prajmer iz kodirajuće sekvence, nizvodno od ATG. PCR proizvod dobijen korišćenjem If/Ir prajmera i gDNK iz heljde kao matrice (slika nije prikazana) je sekvenciran i na taj način dobijeno je dodatnih 349 bp 5' UTR regiona.

CardA_gDNA	ACACATTGCTCTCTTCCCACACCCTCCTTCATTGCTTCCATCAAATAACACgt - 966 - agTGAAACATG
CardA_cDNA	CCTTCATTGCTTCCATCAAATAACAC - - - - - TGAAACATG
CardD_gDNA	ACACATTGCTCTCTTCCCACACC-TCCTTCCTTGCTTCCATCAAATAACACgt - 1207 - agTGAAACATG
CardD_cDNA	CC-TCCTTCCTTGCTTCCATCAAATAACAC - - - - - TGAAACATG
CardB_gDNA	ACACATTGCTCTCTTCCCACACCCTCCTTCATTGCTTCCATCAAATAAGAGgt - 953 - agTGAAACATG
CardB_cDNA	ACACCCTCCTTCATTGCTTCCATCAAATAAGAG - - - - - TGAAACATG
VuAP1_gDNA	GTGAGAGAAATAGACACTCTCCACTGCTTATAACTCATTCTCTTCCCTCAITTTCTCTCTTTCTCTCC TGCGATCTCCATATAATCGgt - 583 - agGAGAATATG
Orizasin_gDNA	ACGTCGGTGTGCTGTGCTGCTCCTCCCGTTTTCCGgt - 649 - agATCGCAGCCATG
FeAP9_gDNA	CGCCCGGCAGGTCTAGAATTCAGCGGCCGCTCTCTATTTATTTATATCTTTCCCCCATTGGCTCT <u>TTCATCATCCCGCTACTCTCTTCTCTATAATCTC</u> cgccccggccaggtaacacagaggggatgttggtgaattaacitaggatgaggaattgacttttcaagctagggtatggactggtgagactgggagttgtattcc atectcttctgtcgcttaattgcctattaaaatacaaaaagagatgatgittctaggaccatctcgtttggacgaaattgaaattgaaactggtacaagtaratgggaatt catgragcgtctttgcaattatgcttgaactcccttgcacatatargacgraaaagaacttgatgaggagaaaattccttgacttggatgtrattgacaggtggaagg ttcttatcggatttagaattgrattcttattctgctgattctgattctgattcatgggtctataactattcagGATGACCAACATTTCCGGATTCGTT GCTTCTTAGTGCTTCTTGATCACCTATTGCCCTTTCAGTTGCAAATAATGATTTGGTCAGAGTGGGCC TAAAGAAGAGAAAGTTGGATCCAACCAACCGCCTGCCTCCGTTTTGGTTGTAAGAAACATTGATGC <u>AGAAGTATGGCCTTGG</u>

Slika 14. Poređenje 5' regulatornog regiona gDNK i cDNK sekvenci AP gena koji sadrže lider intron i pretpostavljena struktura 5' regulatornog regiona FeAP9 gena. Crvenim velikim slovima je obeležen startni kodon, malim crvenim slovima obeleženi su signali za iskrajanje introna, brojevi predstavljaju dužine lider introna, plavom bojom su obeleženi nukleotidi FeAP9 sekvence koji potencijalno pripadaju lider intronu i podvučene su sekvence prajmera If i Ir za umnožavanje FeAP9 lider introna.

Poređenje *FeAP9* genomske sekvence sklopljene kao što je prethodno objašnjeno sa odgovarajućom cDNA potvrđuje prisustvo lider introna u 5'UTR-u gena, uzvodno od startnog ATG kodona. Nukleotidne sekvence cDNK i gDNK *FeAP9* se razilaze počev od drugog nukleotida uzvodno od ATG. Na mestu gde se pojavljuje razlika između cDNK i gDNK sekvenci za *FeAP9* uočena je „splajsing“-akceptorska sekvenca: AG. Preostali nukleotidi lider sekvence pojavljuju se u uzvodnom regionu genomskog klona nakon 755 bp insertovane sekvence. Insertovana sekvenca ima konsenzus donorsko mesto za „splajsovanje“: GT na 5' kraju, što potvrđuje da se radi o lider intronu.

Kompjuterskom predikcijom u okviru lider introna pronađeno je više cis-aktivirajućih regulatornih sekvenci koje mogu biti uključene u odgovor na različite hormonske stimulse i stimulse iz spoljašnje sredine. Cis-aktivirajući elementi koji pokazuju manji ili veći stepen sličnosti („core and matrix similarity“) sa cis elementima različitih biljnih promotora su pronađeni preklapanjem podataka iz dve različite baze podataka. Elementi sa najvećim stepenom homologije su izdvojeni i ukratko opisani u sledećoj **Tabeli 1**.

CIS-ELEMENT	SEKVENCA I POZICIJA U ODNOSU NA START TRANSLACIJE <i>FeAP9</i>	NAPOMENA
5'UTR Py-rich stretch	TTTCTTCTCT / 92	Cis-element koji potvrđuje visok nivo transkripcije
AE-boks; Boks 4; GAG motiv	AGAAACAT / 607; ATTAAT / 273; AGAGAGT / 87	Prisutani u promotorima gena regulisanih <u>svetlosnim zračenjem</u>
Boks-W1	TTGACC / 644	Sekvenca za koju se vezuje WRKY transkripcioni faktor, uključena u odgovor na <u>napad patogena</u>
CGTCA- motiv	CGTCA / 721	Cis-element uključen u odgovor na <u>metil jasmonat</u>
GCN4_ motiv; Skn-1 motiv	TGAGTCA / 121; GTCAT / 537	Element uključen u ekspresiju gena u endospermu
HSE	AGAAAATTCG / 744	Cis-element uključen u odgovor na <u>toplotni stres</u>
TC-bogati ponovci	ATTTTCTTCA / 141	Cis-element uključen u <u>odbrambene mehanizme i odgovor na stres</u>
TCA element	GAGAAGAATA / 91	Sekvenca nađena u genima čija je transkripcija aktivirana <u>salicilnom kiselinom</u>
TGA boks	TGA CGTAA / 721	Cis-element u genima čija je transkripcija aktivirana <u>auksinom</u>
Cirkadian	CAANNNNATC / 404	Cis-regulatorni element uključen u kontrolu cirkadijalnog ritma

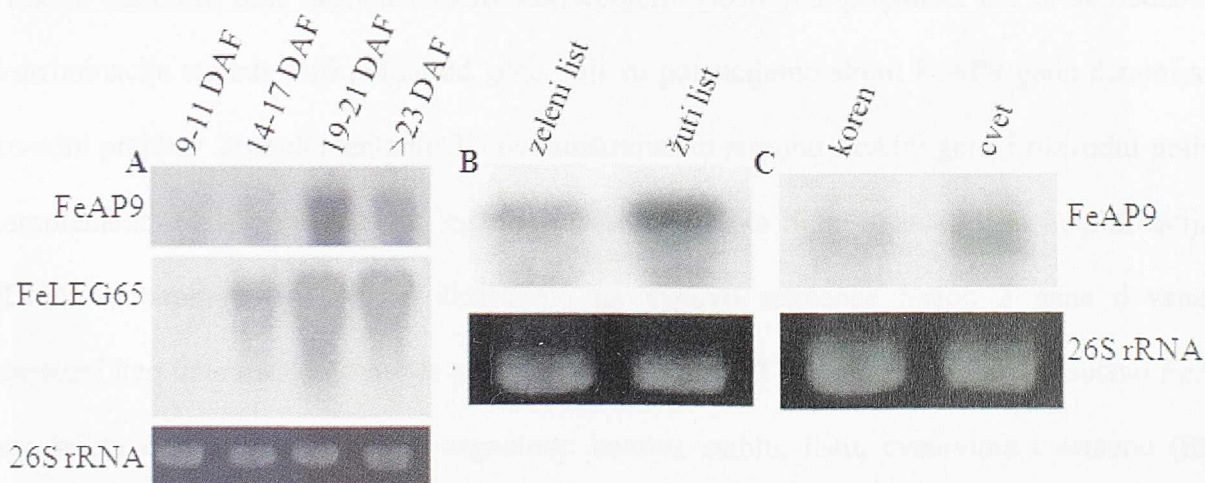
Tabela 1. Spisak cis- elemenata iz potencijalnog 5' regulatornog regiona *FeAP9*

4.4. Profil ekspresije *FeAP9* gena

4.4.1. Analiza ekspresije *FeAP9* u različitim organima heljde metodom „Northern“ blot

Utvrđivanje profila ekspresije gena za tipičnu aspartičnu proteinazu *FeAP9* u organima heljde, urađena je Northern blot analizom ukupne RNK izolovane iz različitih organa heljde kao

što su seme u različitim fazama sazrevanja (9-11; 14-17; 19-21 DAF; zrelo seme starije od 23 DAF) (**Slika 15A**), zeleni list, žuti list u prirodnoj senescenciji (**Slika 15B**) i koren i cvet (**Slika 15C**). Kao proba korišćena je radioaktivno obeležena cDNK *FeAP9*. Nakon ekspozicije od 24 sata, dobijena je radiografija prikazana na **Slici 15**. Signali su se javili ne samo u semenu, već i u ostalim analiziranim organima. Ovi rezultati pokazuju jasno definisan profil ekspresije u toku sazrevanja semena heljde, gde je slab i teško detektabilan signal uočen u početnim fazama sazrevanja (9-11 DAF i 14-17 DAF), dok je najizrazitija ekspresija uočena u toku faze 19-21 DAF. Nakon toga, intezitet signala opada u zreлом semenu. Osim toga, kroz ova četiri stupnja sazrevanja semena heljde uporedno je analiziran profil ekspresije 13S rezervnog proteina heljde (**Slika 15A**).



Slika 15. Northern analiza ukupne RNK, upotrebom inserta klonova *FeAP9* i *FeLEG65*, kao proba . Seme kroz različite faze razvicia (A), list (B), koren i cvet (C).

U svrhu detektovanja signala koji potiče od ovog rezervnog proteina heljde, u Northern analizi korišćen je *FeLEG65* cDNK klon kao proba za hibridizaciju. Uočeno je da je profil

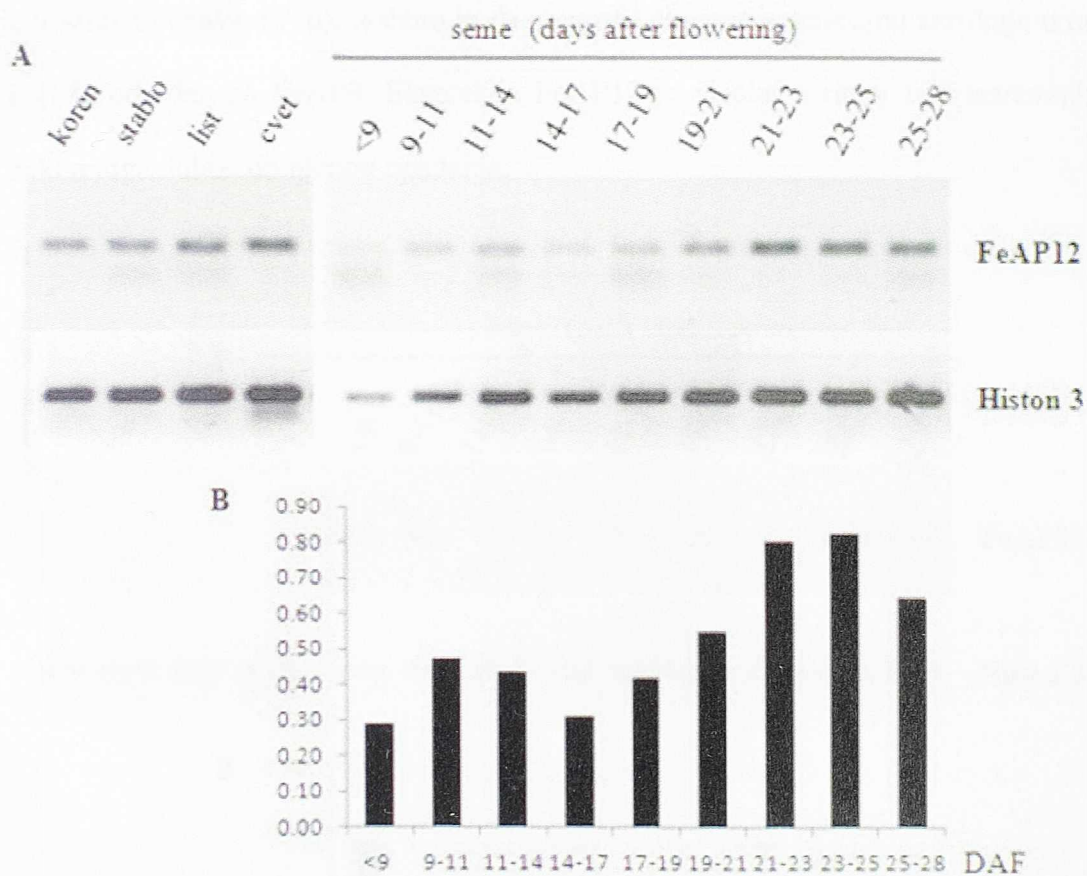
ekspresije gena za AP9 sličan profilu ekspresije 13S rezervnog proteina koji se akumulira tokom sazrevanja semena. Takođe je zanimljivo da se u prirodnom senescentnom listu detektuje upadljivo veća zastupljenost AP9 mRNK u odnosu na zeleni list (**Slika 15B**).

4.4.2. Analiza ekspresije *FeAP9* u različitim organima heljde metodom RT PCR

Imajući u vidu da je ranija analiza *FeAP9* i *FeAP12* cDNK sekvenci pokazala da međusobno dele visok nivo homologije, kao i da se može očekivati još dodatnih predstavnika AP familije u genomu heljde, bilo je neophodno reanalizirati prethodno dobijene rezultate koji su se odnosili na ekspresiju gena za *FeAP9* dobijene Northern analizom. U tu svrhu izveden je RT PCR da bi se detaljnije odredila ekspresija odgovarajuće iRNA u različitim organima heljde, kao i tokom različitih faza razvića semena korišćenjem specifičnih prajmera. Da bi se obezbedila diskriminacija signala koji potiču od gena koji su potencijalno slični *FeAP9* genu dizajniran je uzvodni prajmer komplementaran 3'-netranslirajućem regionu *FeAP9* gena i nizvodni prajmer komplementaran regionu u nivou egzon-egzon spoja kako bi se onemogućila amplifikacija sa gDNA kontaminacije. Prajmeri dizajnirani na osnovu sekvence histon 3 gena duvana su korišćeni kao unutrašnja kontrola amplifikacije. Analiza RT PCR potvrdila je prisustvo *FeAP9* transkripta u svima analiziranim organima: korenu, stablu, listu, cvetovima i semenu (**Slika 16A**).

Profil ekspresije tokom sazrevanja semena analiziran je detaljnije kroz veći broj faza sazrevanja i to određivanjem relativne ekspresije gena za *FeAP9* u odnosu na nivo referentnog gena. Analiza je vršena korišćenjem Scion Image denzitometrijskog programa ("NIH Image za Macintosh", Wane Rasband, National institutes of Health, USA, modifikovanog za Windows, Scion Corporation, 1997 (**Slika 16B**)). Dobijeni histogram ukazuje da je najveći nivo ekspresije

prisutan u fazama 21-23 i 23-25 DAF. Takođe je slaba ekspresija detektovana u semenima već u fazi 9 DAF, kao i u zrelim semenima heljde (25-28 DAF).

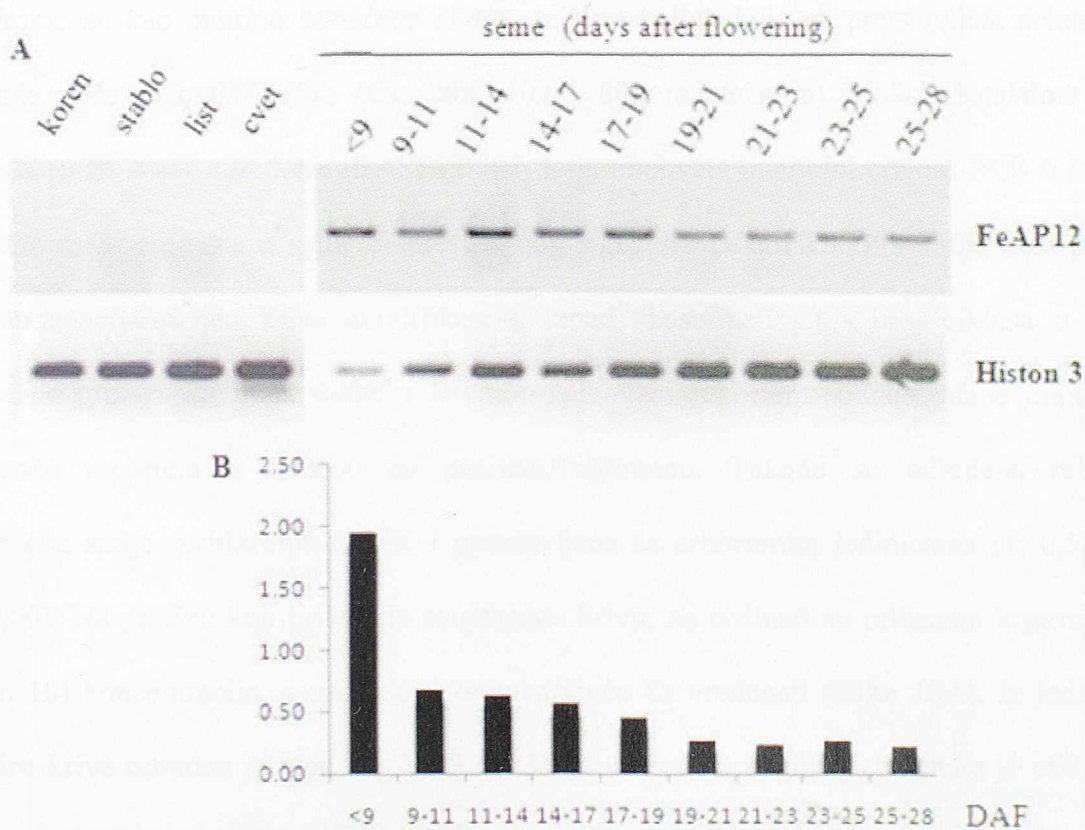


Slika 16. Analiza ekspresije gena za *FeAP9* u različitim organima i različitim fazama sazrevanja semena heljde RT PCR metodom (A). Relativna ekspresija *FeAP9* gena u semenu u različitim fazama sazrevanja određena denzitometrijskom metodom (B).

Dodatno je analiziran profil ekspresije *FeAP12* gena korišćenjem prajmera P221/P445, dizajniranih na osnovu najmanje konzervisanih sekvenci *FeAP12* i za koje je pokazano da ne

vrše umnožavanje sa *pFeAP9* (slika nije prikazana). Kao što se može videti sa **Slike 17**, ekspresiju *FeAP12* gena nije moguće uočiti u korenu, stablu, listu i cvetu.

Obzirom da je *FeAP12* mRNK moguće detektovati samo u semenu očigledno je da se radi o genu sa tkivno specifičnom ekspresijom. Takođe, nakon denzitometrijske analize nivoa ekspresije u semenu (**Slika 17 B**), uočeno je da se profil ekspresije značajno razlikuje u odnosu na onaj koji je određen za *FeAP9*. Ekspresija *FeAP12* je visoka u ranoj fazi sazrevanja (<9 DAF), a nakon toga dolazi do njenog opadanja.

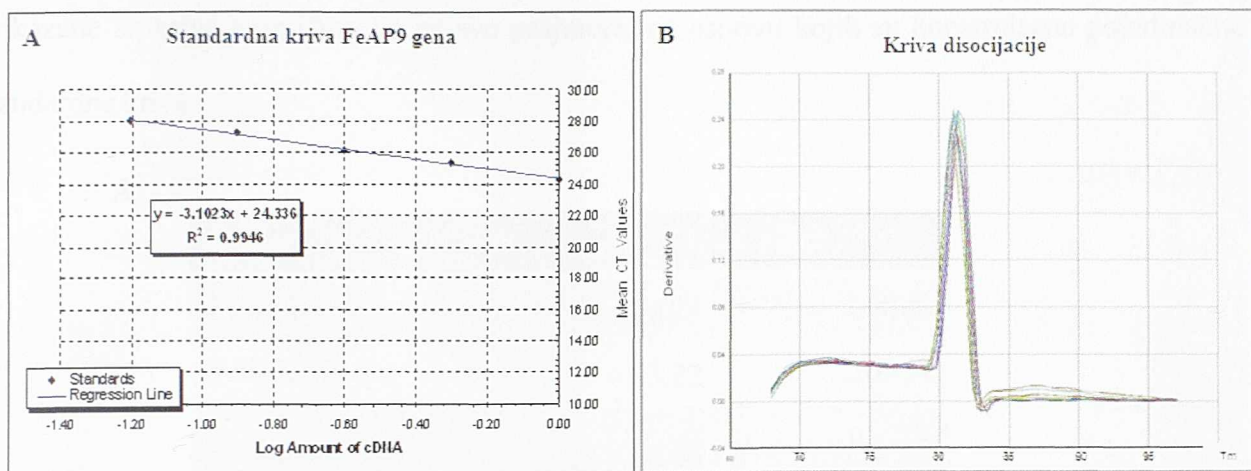


Slika 17. Analiza ekspresije gena za *FeAP12* u različitim organima i različitim fazama sazrevanja semena heljde RT PCR metodom (A). Releativna ekspresija *FeAP9* gena u semenu u različitim fazama sazrevanja određena denzitometrijskom metodom (B).

4.4.3 Analiza ekspresije FeAP9 u uslovima abiotičkog stresa metodom Real-time PCR

4.4.3.1. Standardizacija Real-time PCR za FeAP9 gen

U cilju upotrebe Real-time PCR metode za praćenje ekspresije FeAP9 gena dizajniran je veći broj prajmera koji su analizirani standardnom PCR procedurom. Proizvodi amplifikacije analizirani su na gelu (slika nije prikazana). U užu izbor su ušli prajmeri Uap1 i Uap2 (**Tabela 1**) koji su dali zadovoljavajuće umnožavanje FeAP9 gena bez prisustva nespecifičnih proizvoda. Dalje je određivana efikasnost Real-time PCR reakcija u kojima su ovi prajmeri korišćeni konstruisanjem standardne krive. Standardna kriva je dobijena na osnovu rezultata Real-time PCR u kome su kao matrice korišćene cDNK iz lista heljde koje su predstavljale sukcesivna razblaženja početne cDNK (5x, 10x, 20x, 40x i 80x razblaženja). Nakon Real-time PCR automatski su za svaki određeni: „BASELINE”, koja obuhvata inicijalni cikluse PCR u kojima postoji vrlo mala promena u jačini fluorescentnog signala; “TRESHOLD” - linija koja prolazi kroz eksponencijalni deo krive amplifikacije, iznad “baseline”; Ct - broj ciklusa u kome fluorescencija prolazi kroz “threshold” i Rn normalizovani reporter - odnos jačine emitovane fluorescence reportera u odnosu na pasivnu referencu. Takođe su određena relativna koncentracija serije razblaženja cDNK i predstavljene su arbitrarnim jedinicama (1; 0,5; 0,25; 0,13 i 0,06). Na grafiku koji prikazuje standardnu krivu, na ordinati su prikazani logaritmi (sa osnovom 10) koncentracija, a na apscisi odgovarajuće Ct vrednosti (**Slika 18A**). Iz jednačine standardne krive određen je njen nagib (-3.1023), a na osnovu nagiba, izračunata je efikasnost primenom jednačine. $E=10^{(10^{-1/\text{nagib}})}$. Efikasnost PCR reakcije za umnožavanje FeAP9 cDNK prajmerima Uap1 i Uap2 iznosila je 2,1.



Slika 18. Standardna kriva *FeAP9* gena (A) i kriva topljenja *FeAP9* produkta umnoženog upotrebom Uap1 i Uap2 prajmera (B).

Takođe je na **Slici 18B** prikazana kriva disocijacije proizvoda iz prethodne Real-time PCR amplifikacije kako bi se utvrdilo da li postoji nespecifično umnožavanje u korišćenim cDNK uzorcima. Kriva disocijacije sadrži jedan diskretan pik koji nastaje disocijacijom specifičnog proizvoda na temperaturi od 82,24° C. Drugi pikovi poreklom od nespecifičnih dvolančanih DNK nisu detektovani, kao ni potencijalni prajmer-dimeri, čije su temperature topljenja najčešće oko 76°C.

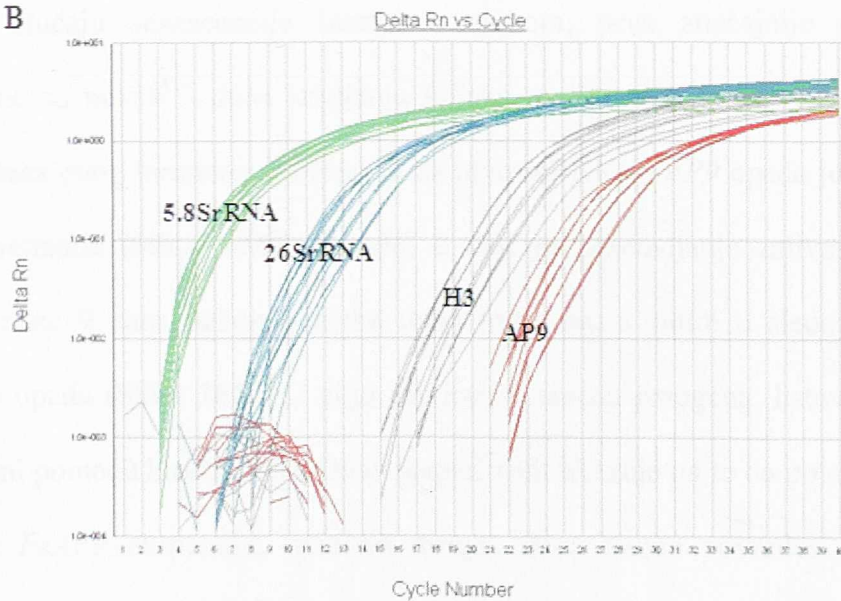
Kako bi se izvršila relativna kvantifikacija ekspresije gena za *FeAP9* bilo je neophodno pronaći odgovarajuće unutrašnje kontrole, gene koji se konstitutivno ekspimiraju u svim tkivima i to bez varijacija tokom različitih faza razvića ili delovanjem različitih spoljašnjih stimulusa na biljke. Odabrani geni su bili 26S rRNK; 5,8S rRNK i histon 3 i dizajnirani su prajmeri za njihovo umnožavanje (26Sf/26Sr; 5,8Sf/5,8Sr i H3f/H3r, **Tabela 1**, Odeljak *Materijal i metode*). Kao što je prethodno opisano, određene su efikasnosti PCR reakcija u kojim su korišćeni ovi prajmeri i cDNK iz lista heljde kao matrice koja je bila sukcesivno razblaživana, dok su krive disocijacije korišćene da bi se odredile temperature topljenja PCR proizvoda **Slika 19A**. Na **Slici 19B**

prikazane su krive amplifikacije za sve prajmere, na osnovu kojih su konstruisane pojedinačne standardne krive.

A

Gen	T _m	E = 10 ^(-1 / slope)
FeAP9	82.24	2.1006
5.8SrRNA	83.22	2.6954
Histon 3	80.96	2.0285
26S rRNA	87.49	2.05693

B



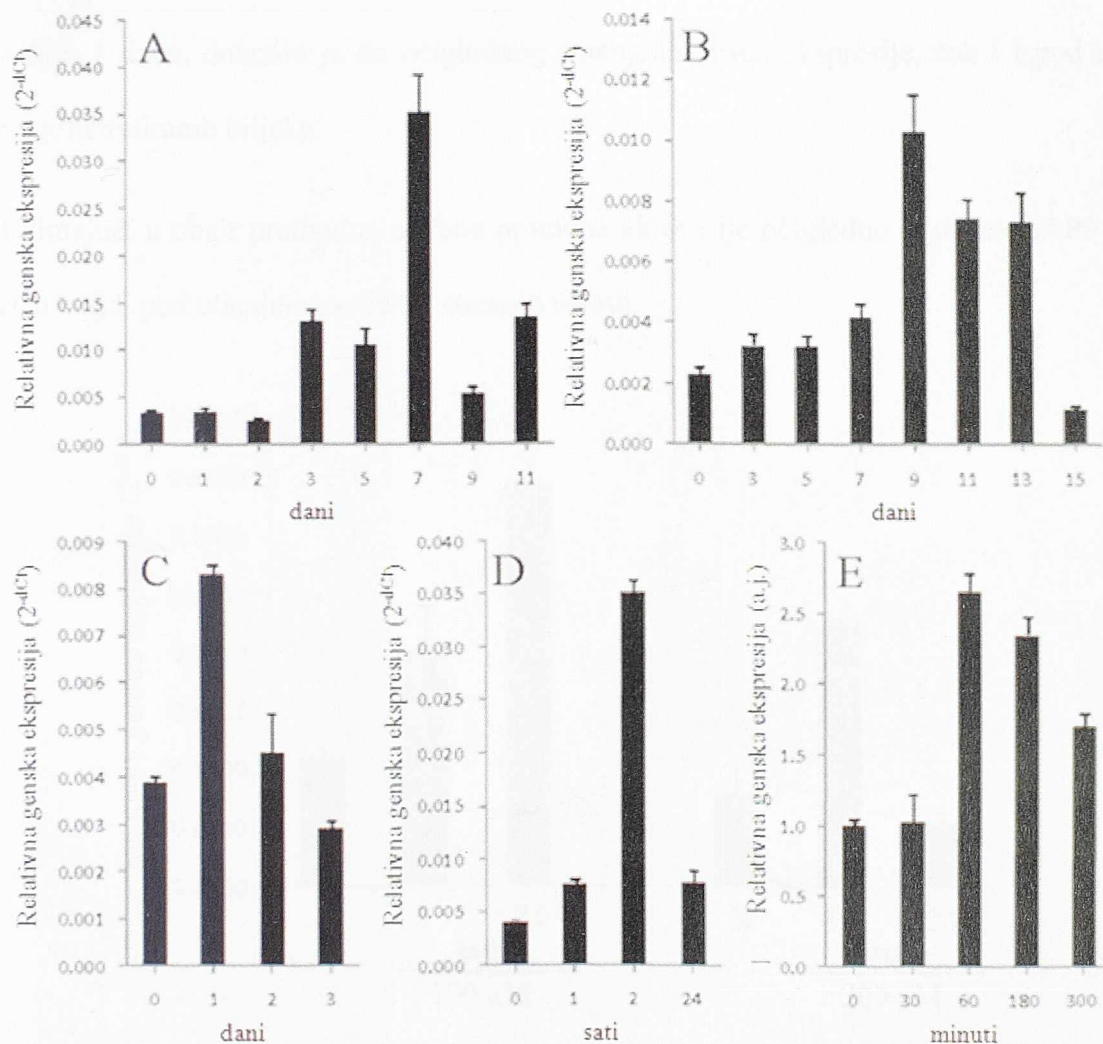
Slika 19. Tabelarni prikaz efikasnosti reakcija amplifikacija i T_m PCR proizvoda (A) i krive amplifikacija (B) referentnih gena (5.8SrRnK, 26SrRnK, H3) i FeAP9 gena.

4.4.3.2. Ekspresija *FeAP9* gena u uslovima abiotičkog stresa

U cilju ispitivanja ekspresije *FeAP9* gena u uslovima stresa, kompletno razvijene biljke heljde su bile podvrgnute različitim stimulusima iz spoljašnje sredine. Radi relativne kvantifikacije specifične mRNK primenjen je Real-time PCR pristup gde je kao unutrašnja kontrola, t.j. kao referentni gen korišćen histon 3 gen. Da bi se odredilo da li primenjeni stres može imati uticaj na ekspresiju referentnog gena, kao dodatna kontrola korišćen je gen za 26S rRNK. Pokazalo se da obe kontrole imaju sličan i nepromenjen profil ekspresije tokom stresa (slika nije prikazana).

U slučaju senescencije izazvane mrakom, prve značajnije promene u ekspresiji detektovane su nakon 3 dana izlaganja biljaka mraku, dok je najveća ekspresija zabeležena nakon 9 dana ovog tretmana. Uočeno je da nivo mRNK *FeAP9* opada jedanaestog dana nakon početka tretmana (**Slika 20A**). Takođe, u slučaju izostavljanja zalivanja biljaka, ekspresija značajno raste 9 dana nakon početka ovog tretmana, a zatim u sledećim danima ekspresija postepeno opada (**Slika 20B**). U cilju imitiranja napada patogena, listovi heljde su mehanički povređivani pomoću hiruške igle. Ovaj eksperiment ukazuje na to da povređivanje listova heljde deluje na *FeAP9* ekspresiju, naročito drugog dana nakon povrede, dok trećeg dana nivo transkripta počinje da opada (**Slika 20C**). Nakon 1 sat izlaganja biljaka UV zračenju, detektovan je slab porast ekspresije koji opada do nivoa kontrole nakon 2 sata od početka tretmana i ostaje nizak i nakon 24 sata tretmana (**Slika 20D**). Konačno, ispitivan je uticaj salicilne kiseline na profil ekspresije *FeAP9*. Otkinuti listovi heljde su iseckani na komadiće, a zatim direktno smešteni u medijum koji je sadržavao 200 μ M SA. Kontrole za svaku vremensku tačku eksperimenta su uključene u cilju eliminacije mogućeg uticaja osmotskog stresa. Za vreme prvih

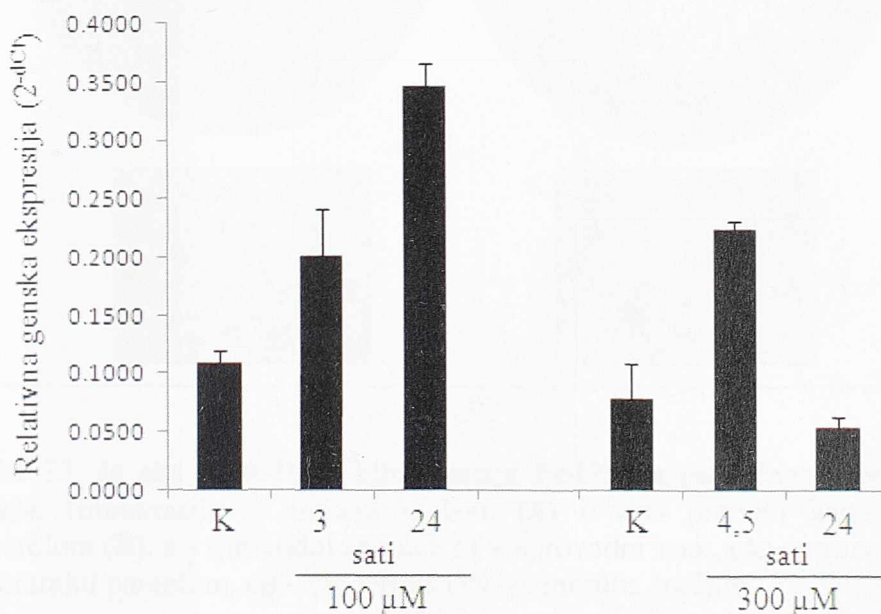
30 minuta tretmana salicilnom kiselinom, ne uočava se promena u nivou iRNK *FeAP9*, međutim, nakon 1 sata ekspresija je duplo veća (Slika 20E).



Slika 20. Real-time PCR analiza ekspresije *FeAP9* gena u listovima heljde uzorkovanim nakon različitih stresnih tretmana: mrak (A); suša (B); ranavanje (C); UV (D) i salicilna kiselina (E). Vrednosti su generisane iz tri nezavisna merenja i na stubićima su prikazane standardne greške.

Dodatno je analiziran uticaj kadmijuma na ekspresiju *FeAP9* gena i uočeno je da prilikom tretmana 100 μM CdCl_2 dolazi do upadljivog porasta nivoa *FeAP9* iRNK nakon 3 i 24 sata, u odnosu na kontrolu. Profil ekspresije se razlikovao u slučaju kada su biljke tretirane u 300 μM CdCl_2 (Slika 21). Iako je nakon 4,5 h nivo bio sličan kao i nakon 3 h tretmana 100 μM CdCl_2 , nakon 1 dana, dolazilo je do očiglednog smanjenja nivoa ekspresije, čak i ispod nivoa kontrole, t.j. netretiranih biljaka.

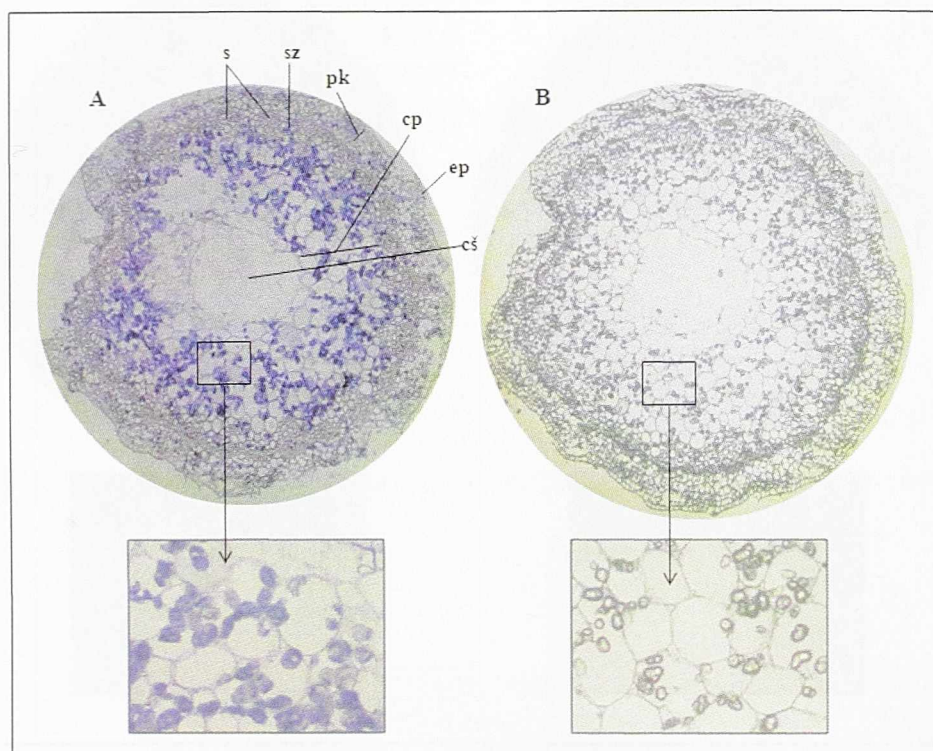
Uzimajući u obzir prethodno uočene promene ekspresije očigledno je da se *FeAP9* nivo povećava u heljdi pod uticajem različitih stresnih uslova.



Slika 21. Real-time PCR analiza ekspresije *FeAP9* gena u listovima heljde tretiranim 100 μM i 300 μM CdCl_2 . Vrednosti su generisane iz tri nezavisna merenja i na stubićima su prikazane standardne greške.

4.4.4. *In situ* RNK-RNK hibridizacija

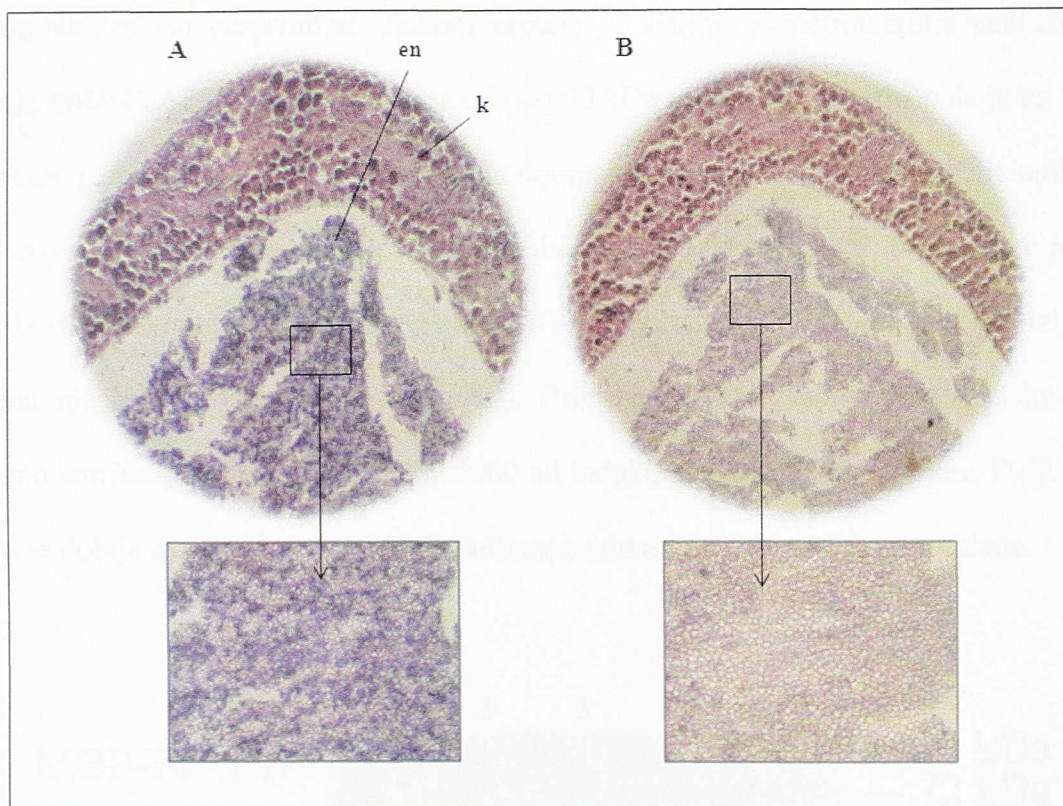
U cilju preciznijeg određivanja lokalizacije ekspresije *FeAP9* gena u različitim tkivima heljde rađena je *in situ* RNK-RNK hibridizacija. Kao proba u ovim eksperimentima korišćen je dioksgeninom obeležen antisens lanac *FeAP9* iRNK.



Slika 22. *In situ* RNK-RNK hibridizacija *FeAP9* na poprečnom preseku stabla heljde. Hibridizacija sa antisens probom (A) i sens probom kao negativnom kontrolom (B). **s** - sprovodni snopići, **sz** – sprovodni zrak, **pk** – primarna kora, **cp** – centralni parenhim, **ep** – epidermis i **cš** – centralna šupljina

U eksperimentima je korišćen sens lanac *FeAP9* iRNK kao negativna kontrola. Analizirani su poprečni preseki lista, stabla i korena, kao i uzdužni preseci semena i cveta heljde. Jedino je bilo moguće uočiti u poprečnom preseku stabla prisustvo signala u vakuolama ćelija centralnog parenhima (**Slika 22**). Takođe je analizirano seme heljde u srednjoj fazi razvića. Presek kroz seme koje je prethodno bilo oslobođeno od tvrde semenjače, napravljen je u nivou

embriona. Jak signal detektovan je u ćelijama endosperma, t.j. u delu semena namenjenom za deponovanje proteina (**Slika 23**). U oba slučaja signal je izostajao u negativnim kontrolama.



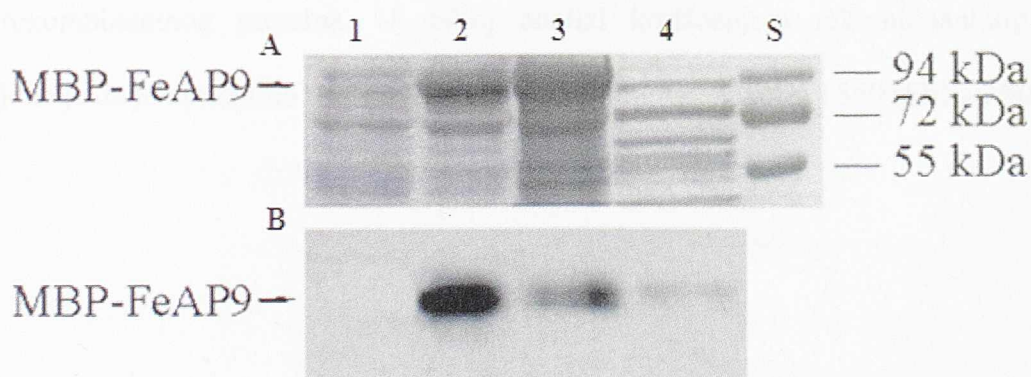
Slika 23. In situ RNK-RNK hibridizacija FeAP9 na preseku smena heljde. Hibridizacija sa antisens probom (A) i sens probom kao negativnom kontrolom (B). k – kotiledon, en – endosperm.

4.5. Analiza ekspresije FeAP9 proteina

4.5.1. Ekspresija rekombinantnog FeAP9 proteina

U cilju praćenja ekspresije FeAP9 proteina u različitim organima heljde, kao i tokom njihovog razvića bilo je neophodno napraviti antitela koja specifično prepoznaju aspartičnu proteinazu heljde. Za tu svrhu prethodno je trebalo proizvesti rekombinantni FeAP9 protein. U

cilju ekspresije FeAP9 rekombinantnog proteina kao i postizanja njegove veće solubilnosti, dizajnirana je fuzija MBP-FeAP9 u pMAL-c2X vektoru koji je potom korišćen za transformaciju Roseta-gammi bakterijskog soja. Nakon IPTG indukcije u test eksperimentu detektovan je veliki broj klonova koji su ekspimirali fuzioni protein. U daljim eksperimentima analizirali smo ponašanje MBP-FeAP9 fuzionog proteina od oko 90 kDa pri čemu je utvrđeno da je on pretežno lokalizovan u insolubilnoj frakciji t.j. u inkluzionim telima, dok je u solubilnoj frakciji protein bio jedva vidljiv nakon Coomassie Brilliant Blue G250 bojenja (**Slika 24A**). Rekombinantni protein iz obe frakcije je vizuelizovan anti-MBP antitelima u protein gel blot analizi čime je potvrđena njegova specifičnost (**Slika 24B**). Približno 500 µg solubilnog proteina je bilo prečišćeno korišćenjem amiloza rezina iz 1000 ml indukovane bakterijske kulture. Dalji pokušaji i trud da se dobije aktivna forma rekombinantnog enzima nisu dali pozitivne rezultate.

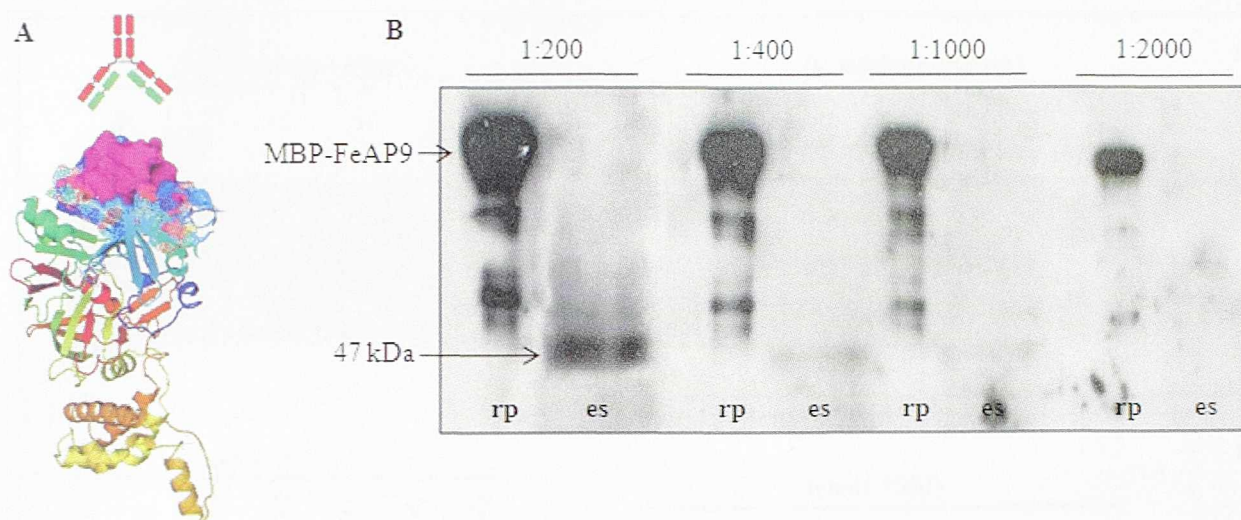


Slika 24. Ekspresija rekombinantnog FeAP9. SDS-PAGE - Coomassie brilliant blue bojenje totalnog proteinskog ekstrakta neindukovanih (1) i IPTG indukovanih (2) Rosetta-gami ćelija i insolubilne (3) i solubilne (4) frakcije indukovanih Rosetta-gami ćelija (A). Western blot analiza istih uzoraka (B).

4.5.2. Imunodetekcija FeAP9 proteina

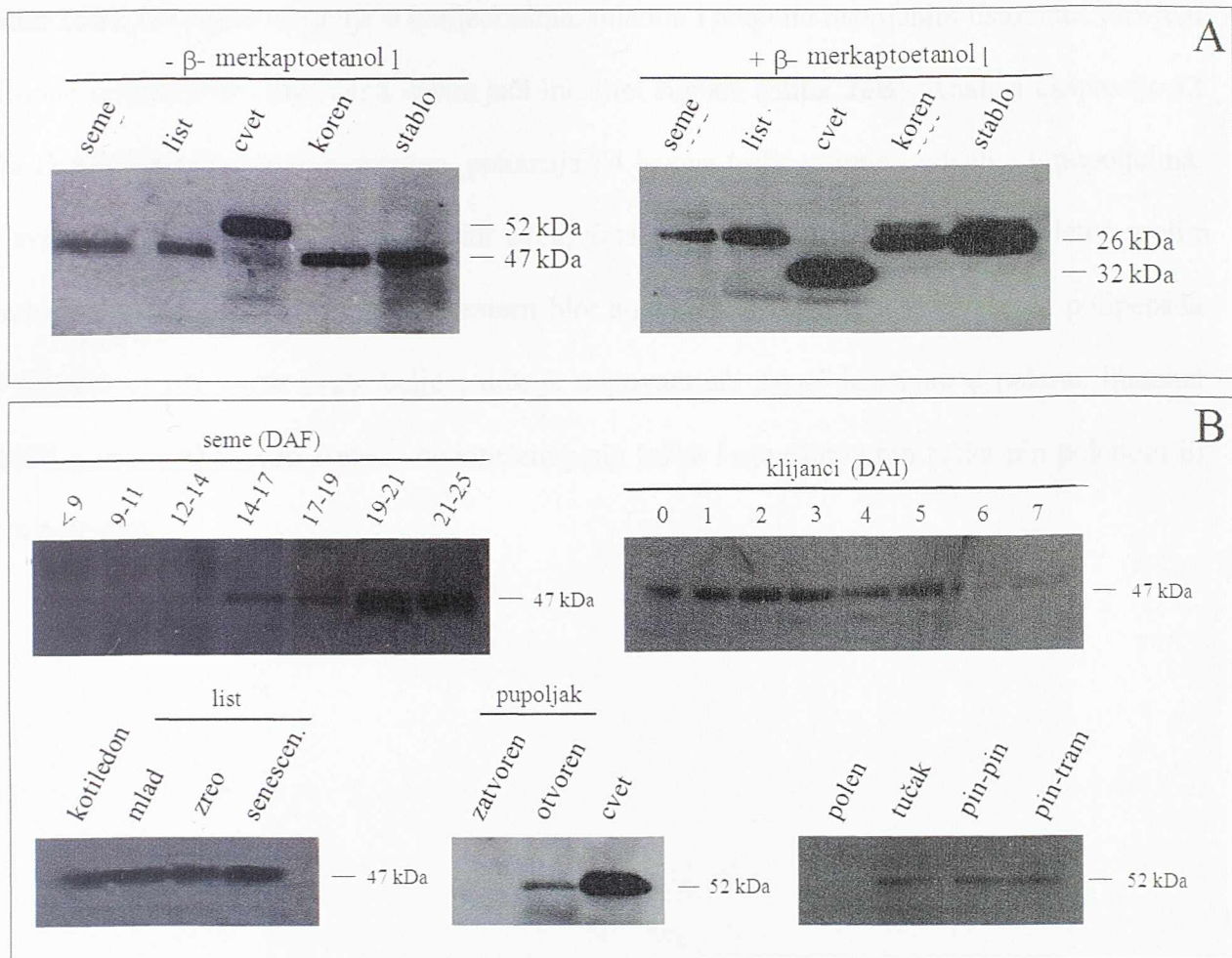
Obzirom da rekombinantni FeAP9 protein nije bilo moguće koristiti za imunizaciju životinja i proizvodnju antitela, jer je jedino bio solubilan u formi fuzionog proteina, sa MBP tagom, opredelili smo se za proizvodnju antitela na sintetički oligopeptid dizajniran na osnovu izvedene aminokiselinske sekvence FeAP9. Sinteza oligopeptida dužine 15 ak (HSKYKSSKSSTYVK), kao i proizvodnja poliklonskih antitela koja prepoznaju ovaj oligopeptid (anti-FeAP9 antitela) proizvedena su korišćenjem usluge komercijalnog servisa: BioGenes, Customised polyclonal antisera/antibodies (Berlin, Nemačka).

U cilju detektovanja FeA9 proteina u uzorcima različitih organa i tkiva heljde, korišćena su prethodno opisana antitela koja prepoznaju N-terminalni oligopeptid AP9 proteina (**Slika 25A**) i njihova specifičnost je potvrđena korišćenjem rekombinantne MBP-FeAP9 proteinske fuzije. Reaktivnost ovih antitela je potvrđena i ustanovljeno je da mogu da prepoznaju manje od 10 ng rekombinantnog proteina. U daljoj analizi korišćenjem rekombinantnog proteina ustanovljeno je da je optimalno razblaženje antitela za imunodetekciju 1:350 (**Slika 25B**).



Slika 25. Standardizacija Western blot detekcije anti-FeAP9 antitelom. Predikcija ksystalne strukture FeAP9 proteina sa naznačenom pozicijom oligopeptida (pink) za koji je pravljeno specifično antitelo (**A**) Western blot detekcija 10 ng FeAP9-MBP rekombinantnog proteina - **rp** i proteina od 47 kDa iz kiselog proteinskog ekstrakta semena – **es** (**B**) pri različitim razblaženjima anti-FeAP9 antitela.

U daljem radu je analizirano prisustvo *FeAP9* proteina primenom anti-*FeAP9* antitela u različitim organima heljde. Traka od oko 47 kDa je detektovana u totalnim proteinskim ekstraktima lista, korena, stabla i semena pri neredukujućim uslovima, t.j. u odsustvu β -merkaptetanola, dok je traka od oko 52 kDa uočena u ekstraktima cveta heljde pri istim uslovima. U prisustvu β -merkaptetanola, u svim analiziranim organima detektovano je prisustvo trake od 32 kDa, sa izuzetkom cveta gde se javlja polipeptid od oko 26 kDa (**Slika 26A**).



Slika 26. Western blot analiza FeAP9 proteina. Ekspresija u različitim organima u neredujućim i redukujućim uslovima (**A**) i u različitim fazama razvića analiziranih organa (**B**). Jednake količine proteina (30 μg) iz ukupnih proteinskih ekstrakata različitih organa heljde su nanešene na 12% gel i izvršen je transfer na PVDF membranu. Imunodetekcija je vršena korišćenjem poliklonskih anti-FeAP9 antitela.

Sledeći eksperimenti u kojima je praćeno prisustvo FeAP9 proteina u određenim organima za vreme njihovog razvića pokazali su da do dramatičnog porasta ekspresije FeAP9 dolazi u semenima tokom njihovog sazrevanja. Polipeptid od 47 kDa se javlja u fazi 14-17 DAF i tokom daljeg sazrevanja dolazi do njegove akumulacije (**Slika 26B**). U germinativnim semenima isti polipeptid je bio prisutan tokom prvih pet dana nakon imbibicije, dok šestog i sedmog dana nakon imbibicije dolazi do značajnog smanjenja nivoa polipeptida od 47 kDa

(Slika 26B). Isti signal se javlja u kotiledonima, mladim i potpuno razvijenim listovima, dok je u prirodno senescentnim listovima uočen jači intezitet signala (Slika 26B). Analiza ekspresije 52 kDa FeAP9 polipeptida u cvetovima, pokazuje da je ova traka potpuno odsutna u pupoljcima, pojavljuje se tek u delimično otvorenim cvetovima, i njen signal je najači u kompletno zrelim cvetovima (Slika 26B). Osim toga Western blot analizom detektovano je prisustvo polipeptida od 52 kDa u tučkovima cveta heljde, dok je odgovarajući signal izostajao u polenu. Intezitet signala nije se razlikovao između neoprašenog pin tučka i oprašenog pin tučka pin polenom ili trum polenom.

5. DISKUSIJA

Do sada su biljne aspartične proteinaze detektovane i prečišćene iz većeg broja različitih biljnih vrsta. Ipak, njihove biološke funkcije nisu dovoljno ispitane, kao što je to slučaj sa sisarskim, virusnim i mikrobijalnim AP. Podaci koji se odnose na moguće biološke funkcije biljnih AP koje su i dalje hipotetičke, prevashodno su proistekli iz analize ekspresije u određenim tkivima, pri različitim uslovima, kao i iz eksperimenata ko-lokalizacije sa potencijalnim proteinskim supstratima i eksperimentalnih *in vitro* dokaza degradacije ili obrade tih supstrata. Na osnovu navedenog, smatra se da su biljne AP uključene u senescenciju, programiranu ćelijsku smrt, odgovor na stres, reprodukciju, kao i obradu ili degradaciju rezervnih proteina. Identifikacija i analiza biljnih proteaza, između ostalog, od velikog je značaja i za razumevanje metabolizma rezervnih proteina. Poznato je da proteolitičko sečenje ima značajnu ulogu u sazrevanju rezervnih proteina, što je značajno za njihovo pravilno deponovanje u semenu, a kasnije i za njihovo ponovno aktiviranje (Gruis *et al.*, 2002) obezbeđujući tako kontinuitet životnog ciklusa biljke. Prekursorni polipeptidi se obrađuju ograničenom i kontrolisanom proteolizom do zrelih subjednica rezervnih proteina tokom razvika semena u ćelijama tkiva za skladištenje. Kada se steknu povoljni uslovi, nakon perioda dormancije u germinativnom semenu dolazi do limitirane proteolize specifičnim endopeptidazama, čime se rezervni proteini otvaraju i postaju dostupniji drugim endo i egzo-peptidazama koje potpuno degraduju proteinske rezerve.

Iz literature je poznato da heljdu (*Fagopyrum esculentum* Moench) odlikuje izuzetan kvalitet rezervnih proteina bogatih lizinom, treoninom, triptofanom i amino kiselinama koje

sadrže sumpor, za razliku od rezervnih proteina drugih žitarica. Zbog specifičnog aminokiselinskog sastava rezervni proteini heljde su u prethodnom periodu bili predmet izučavanja u našoj laboratoriji. Tako je analizirana je struktura i regulacija ekspresije gena koji kodiraju rezervne protein, a najveća pažnja posvećena je i najzastupljenijim RP (rezervni proteini) u heljdi: globulinima leguminskog i vicilinskog tipa (Brkljačić *et al.*, 1998; Maksimović *et al.*, 2000; Milisavljević *et al.*, 2004; Samardžić *et al.*, 2004; Milisavljević *et al.*, 2005).

Tokom analize RP uočeno je da proteinski ekstrakti semena heljde pokazuju endogenu proteolitičku aktivnost u kiselim uslovima kakvi pogoduju aktivnosti pepsina (Radović *et al.*, 1998). Na osnovu toga je pretpostavljeno da je za ovu proteolitičku aktivnost zaslužna aspartična proteinaza koja se nalazi u semenu heljde. Maksimalna aktivnost u prisustvu inhibitora serinskih, cisteinskih i metalo proteaza, na niskom pH 3, kao i izostanak aktivnosti u prisustvu pepstatina A, ukazala je da se radi o enzimu iz klase aspartičnih proteaza (Timotijević *et al.*, 2003). Nakon delimične biohemijske karakterizacije ukupne pepstatin A - senzitivne frakcije iz proteinskih ekstrakata semena heljde i afinitetnog prečišćavanja polipeptida od 47 kDa koji poseduje AP aktivnost, pristupilo se kloniranju i analizi gena za ovaj protein, što je tema ovog rada. U cilju rasvetljavanja bioloških funkcija biljnih aspartičnih proteinaza, o kojima se u principu još uvek malo zna, analizirana je njegova ekspresija u različitim uslovima i pokazano je da se ekspresija, osim što je prisutna u svim ispitivanim organima heljde, povećava pod uticajem različitih abiotičkih stresova.

U cilju određivanja cDNK koja kodira aspartičnu proteinazu heljde primenjen je PCR sa izrođenim prajmerima i ukupnom cDNK iz semena u srednjoj fazi razvića (**Slika 1**), imajući na umu da je najizrazitija AP aktivnost pronađena upravo u ovom organu (Timotijević *et al.*, 2003). Na ovaj način izolovane su parcijalne cDNK, koje kodiraju dve različite tipične aspartične

proteinaze heljde: *FeAP9* i *FeAP12* koje sadrže PSI region, karakterističan samo za biljne AP (**Slika 2**). Imajući u vidu da je u našoj laboratoriji opisana i struktura gena za jednu atipičnu AP heljde kojoj nedostaje PSI - *FeAPL1*, može se smatrati da se i u genomu heljde, kao i u Arabidopsisnom genomu, nalazi veći broj gena koji kodiraju različite proteine iz AP familije.

Zanimljivo je da bioinformatička analiza Arabidopsisnog genoma pokazuje da su najmalobrojnije AP zapravo tipične, t.j. one koje poseduju PSI domen. Obzirom da se pretpostavlja da je slična situacija i u genomima ostalih biljnih vrsta, čini se da je izraz “tipična” proteinaza neadekvatan. Izgleda da grupa “atipičnih” aspartičnih proteinaza sadrži daleko više članova, ali do sada većina njih još nije otkrivena i opisana. Na osnovu toga postavlja se pitanje zašto su AP koje sadrže PSI region najviše ispitivane i najbolje okarakterisane ako se zna da su najmanje zastupljene u genomu? Objašnjenje možda ima veze sa njihovom funkcijom u procesima koji su najviše istraživani ili su tipične proteinaze eksprimirane u većim količinama te ih je tako jednostavnije detektovati.

Analizom gena koji kodira aspartičnu proteinazu heljde *FeAP9* pokazano je da se gen sastoji iz 13 egzona i 12 introna (**Slika 7**). Poređenje dostupnih genomskih sekvenci tipičnih aspartičnih proteinaza poreklom iz biljaka ukazuje na to da je aranžman introna univerzalan obzirom da imaju visoku homologiju u pogledu distribucije introna kao i njihove dužine (**Slika 11**). Struktura gena *FeAP9* je najbližnja genu koji kodira AP iz pirinča. Ova dva gena se razlikuju od ostalih po izuzetno dugom drugom, sedmom i jedanaestom intronu. Sve veći broj biljnih ekspresionih studija pokazuje da intronske sekvence mogu povećati nivo ekspresije analiziranih gena, i ovaj fenomen opisan je u literaturi terminom “intronima posredovano pojačavanje ekspresije” (IME od engl. Intron Mediated Enhancement). Može se pretpostaviti da dugi introni pronađeni u okviru gena za aspartičnu proteinazu heljde mogu biti uključeni u regulaciju

ekspresije gena sa svojim pozitivnim i negativnim regulatornim sekvencama, kao što je to slučaj sa intronima drugih poznatih gena (Callis *et al.*, 1987; Dean *et al.*, 1989; Rethmeier *et al.*, 1997). Zanimljivo je da kod dva od tri gena koji kodiraju tipične AP Arabidopsisa nedostaje jedan intron u odnosu na opštu šemu intronskog aranžmana: u AtPasp2 nedostaje treći, a u AtPasp3 četvrti intron (Chen *et al.*, 2002), što ukazuje da je do manjih promena u aranžmanu introna dolazilo i kasnije tokom evolucije. Za razliku od tipičnih aspartičnih proteinaza, nucelin, OsAsp1 i nepentensin imaju drugačiju strukturnu organizaciju gena i sadrže manje introna nego tipične AP. Osim toga poznate su i neke AP, kao što su CND41 i heljdina *FeAPL1* koje u okviru gena ne sadrže introne. Imajući u vidu gore navedene činjenice, može se zaključiti da subiljni geni za tipične AP nastali od zajedničkog predačkog gena, različitog od onog od koga su nastale atipične AP. Takođe, podaci dobijeni iz analize strukture AP heljde potvrđuju hipotezu da su se male razlike između gena za tipične AP u pogledu aranžmana introna očigledno javile nakon razdvajanja monokotila od dikotila, obzirom da AP iz heljde i pirinča pokazuju najveću sličnost iako pripadaju različitim grupama: heljda je dikotila, a pirinač monokotila biljka.

Jedan od ciljeva ovog rada bilo je i određivanje 5' regulatornog regiona *FeAP9* gena. Iznenađujuće je bilo da analizom sekvence od 83 bp 5' netranslirajućeg regiona (UTR *od engl.* "UnTranslated Region") dobijenog metodom 5' RACE na cDNK *FeAP9*, nije bilo moguće odrediti ni jedan mogući start transkripcije. Osim toga interesantno je da preklapanjem dobijene *FeAP9* cDNK sekvence sa oko 400 bp dugim potencijalnim 5' regulatornim regionom dobijenim iz gDNK sekvence modifikovanim metodom 5' RACE, nije bilo moguće uočiti bilo kakvu homologiju. Jedna od pretpostavki bila je da se verovatno radi regulatornom regionu nekog drugog gena iz familije AP, iako je postojalo apsolutno poklapanje cDNK i gDNK nizvodno od ATG starta translacije. Iako je dobro poznato da se većina introna nalazi u okviru kodirajućih

sekvenci, od 2005. god. je objavljeno nekoliko radova kojima je potvrđeno postojanje neočekivanih introna u okviru 5' regulatornog regiona različitih biljnih gena (Curi *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2006). Ovakvi introni nazvani su lider intronima i njihovo otkriće je rasvetlilo kako je moguće da u nekim genima izostanak TATA sekvence u blizini starta transkripcije, ipak ne sprečava njihovu ekspresiju (Gottlieb & Ford, 2002). U ovim genima start transkripcije i TATA boks, očigledno se nalaze uzvodno od lider introna, što može biti i preko 2 kb dalje od starta translacije. Na osnovu podataka iz literature, izgleda da su lider introni češće javljaju kod biljnih gena. Pretpostavljeno je da je to slučaj i sa *FeAP9* genom, stoga su dizajnirani prajmeri od kojih jedan leži upravo u okviru 83 bp lider sekvence *FeAP9* cDNK, a drugi u okviru kodirajućeg regiona (**Slika 14**). Rezultati PCR pokazali su postojanje insercije od 755 bp, a analiza 5' i 3' krajeva ove insertovane sekvence pokazuje prisustvo signala za iskrajanje introna. Očigledno je na osnovu prethodnog, da gen za aspartičnu proteinazu heljde sadrži ovaj atipični lider intron.

Inače, bioinformatička analiza kojom je poređen genom i EST (EST *od engl.* Expressed Sequence Tags) model biljke *Arabidopsis*, ustanovljeno je da je mala, ali ipak značajna frakcija introna pronađena u okviru 5' ili 3' netranslirajućeg regiona (Chung *et al.*, 2006). Do sada je izolovan mali broj kompletnih tipičnih AP genskih sekvenci biljaka (Asakura *et al.*, 1995; Cruz de Carvalho *et al.*, 2004; Pimentel *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 2002). Za kardozin A i B je pokazano prisustvo lider introna, dok u genu vrlo slične strukture koji kodira kardozin D nije uočeno prisustvo ovog introna (Pimentel *et al.*, 2007). Naknadnom analizom 5' lider sekvenci cDNK koje kodiraju AP u biljkama kao što su: *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* i *Vigna unguiculata* su takođe pronađeni lider introni, što znači da većina poznatih biljnih AP sadrži ovaj intron u okviru 5' netranslirajućeg regiona. Iz toga proizilazi da je lider intron visoko konzervisana

karakteristika ove klase proteinaza. Ipak, uloga i biološki smisao lider introna još uvek je nepoznat i ostaje da bude detaljnije analiziran. Za sada je poznato da je na primer, dugački intron iz 5' UTR *EF1 α -A3* gena *Arabidopsis*a dovoljan da poveća ekspresiju mehanizmom koji zavisi od njegove dužine, utičući na stabilnost transkripta i efikasnost translacije (Chung *et al.*, 2006). Značaju ovih istraživanja doprinose eksperimenti u kojima je izvođeno deletiranje lider introna iz AP gena kardozina A i B (Pimentel *et al.*, 2007.). Zanimljivo je da u slučaju delecije lider introna iz *CardA* nije dolazilo do promene ekspresije, dok je kod *CardB* ovim postupkom izazvano kompletno blokiranje ekspresije gena. Iako su ispitivanja funkcionalnih posledica ovog fenomena na samom početku, ona ipak predstavljaju atraktivni nagoveštaj novog mehanizma regulacije genske ekspresije. U pogledu *FeAP9* gena, preostaje da se izoluje duži potencijalni regulatorni region uzvodno od lider introna, da se odredi start transkripcije, kao i da se izvrše funkcionalne promotorske analize. Obzirom da regulatorni sekvence, kao što su promotori i introni predstavljaju nekodirajuće polinukleotidne molekule koji igraju sastavni deo u ekspresiji gena, identifikacija ovih regulatornih sekvenci koji funkcionišu u biljkama bili bi od koristi za modifikovanje biljaka kako bi se dobile transgene biljke sa agronomski poželjnim karakteristikama metodama genetičkog inženjeringa. Pretpostavljamo da promotorski i regulatorni elementi iz *FeAP9* gena obzirom da se ovaj gen eksprimira u svim organima heljde, mogu biti korisni za direktnu kontrolu ekspresije transgena.

Dobijena *FeAP9* sekvenca je još jedna od genskih sekvenci biljaka koja može biti upotrebljena za filogenetsku analizu. Ova analiza je podrazumevala konstruisanje filogenetskog stabla i pozicioniranje *FeAP9* u odnosu na aspartične proteinaze drugih biljnih vrsta. Za konstrukciju dendrograma izabrane su tipične biljne aspartične proteinaze kojima su za potrebe analize izbačene "PSI" sekvence, kako bi se odredili evolutivni odnosi sa atipičnim AP kojima

nedostaje PSI, kao i sa AP životinjskog porekla koje pokazuju niži stepen homologije sa *FeAP9*. Bez obzira na eliminisanje PSI regiona, tipične aspartične proteinaze se grupišu i jasno odvajaju od atipičnih, što znači da je svrstavanje u kategorije tipičnih i atipičnih AP nezavisno od prisustva PSI sekvence. Jedino odstupanje od ove konstatacije su tipične aspartične proteinaze monokotila-ječma i pirinča, koje se grupišu uz atipične AP. Da li ovaj podatak govori o evolutivnom nastajanju ove dve grupe AP vezano za momenat odvajanja monokotila i dikotila, ostaje otvoreno pitanje koje traži veći broj podataka o AP genima i dodatnu evolutivnu analizu.

U ovom radu je takođe analizirana izvedena aminokiselinska sekvenca *FeAP9* čija je kompletna dužina od 1521 bp dobijena primenom metode 5' i 3' RACE (**Slika 3 i 4**). Poređenje aminokiselinske sekvence sa ostalim biljnim tipičnim aspartičnim proteinazama pokazuje izuzetno visok nivo homologije koji iznosi u proseku preko 85% (**Slika 6**). U sekvenci se jasno izdvaja nekoliko domena: signalni peptid od 24 aminokiseline (koji je dodatno potvrđen primenom programa SignalIP 3.0 Server: www.cbs.dtu.dk), autoinhibitorni propeptid dužine 44 aminokiseline, N i C polipeptid koji čine zreo enzim i PSI region dužine 104 aminokiseline koji razdvaja N i C polipeptid (**Slika 7**). Uočeno je da su najveće razlike između AP sekvenci u okviru signalnog peptida i prosegmenta. Ipak, strukturna organizacija *FeAP9* slična je ostalim biljnim AP strukturama te se može pretpostaviti da ovaj enzim podleže sličnom procesu obrade i sazrevanja kao i druge tipične proteinaze. Takođe se postavlja pitanje da li struktura može da ponudi informaciju koja se odnosi na moguću lokalizaciju ove konkretne AP.

Analizom izvedene primarne strukture *FeAP9* proteina detektovane su dve aminokiseline Lys i Tyr na pozicijama 11 i 13 u okviru N-terminalnog domena koje mogu takođe biti od funkcionalnog značaja i važnosti za razumevanje mehanizma obrade i aktivacije enzima. Kervinen *et al.*, 1999 su na osnovu analize kristalne strukture fitepsina ječma predložili

mehanizam inaktivacije profitepsina koji se pre svega bazira na blokiranju aktivnog mesta prosegmentom, t.j. autoinhibitornim domenom. Aktivacija proenzima se dešava kada u odgovarajućim odeljcima ćelije, najčešće vakuolama dođe do lokalnog snižavanja pH, usled čaga enzim sopstvenim delovanjem iseca autoinhibitorni prosegment. Sličan mehanizam se javlja i kod sisarskih želudačnih AP, kao što su progastričin i pepsinogen (James & Sielecki, 1986)). Međutim, pokazano je da kod ječamskog fitepsina, prvih trinaest aminokiselina iz N terminusa zrelog enzima takođe učestvuju u blokiranju aktivnog mesta. Upravo je za dve aminokiseline: Lys¹¹ i Tyr¹³ utvrđeno da su povezane jonskim interakcijama sa Asp ostacima u okviru aktivnog mesta i da su sledstveno tome uključene u mehanizme inaktivacije biljnih AP. Ovo svakako nije univerzalni mehanizam inaktivacije biljnih aspartičnih proteinaza, znajući da kardozini ne poseduju Lys/Tyr sekvencu, ni u N terminusu, ni u okviru prosegmenta. Iz tog razloga može se pretpostaviti da su veze prosegmenta i ostatka enzima kod kardozina fleksibilnije nego kod *FeAP9* heljde i fitepsina ječma.

Prisustvo domena koji se vezuju za lipide membrana kao što su sapozini i sapozinu slični domeni pronađeni u okviru PSI regiona *FeAP9* mogu biti hipotetički signali za vakuolarno sortiranje (Runeberg-Ross *et al.*, 1994, Ramalho-Santos *et al.*, 1997). Ispravnosti ove pretpostavke doprinose rezultati eksperimenata u kojima je PSI region deletiran iz fitepsina (AP) ječma, usled čega je dolazilo do kompletne sekrecije fitepsina van ćelija. (Törmäkangas *et al.*, 2001). Osim toga, pokazano je da fitepsin bez PSI regiona zadržava proteolitičku aktivnost što znači da ovaj domen nije neophodan za enzimatsku sposobnost, već očigledno ima neku drugu funkciju. Moglo se i očekivati da nedostatak PSI regiona ne dovodi do loše obrade enzima što je ključno za njegovu aktivnost, obzirom da sisarske proteinaze uopšte ne sadrže PSI. Zanimljivo je da se sisarska proteaza prokatepsin D tokom puta do lizozoma, preko ER i Goldžijevog aparata

nalazi u kompleksu sa prosapozinom C (Glickman & Kornfeld, 1993). Nakon stizanja do odredišta ovaj kompleks se raskida, što podseća na sudbinu biljnih AP iz kojih se nakon stizanja u vakuole PSI region iseca. Očigledno da je mehanizam sortiranja i značaj sapozina i sapozinu sličnog domena u ovom procesu veliki, međutim jedina razlika koja se može uočiti u odnosu na sisarske sisteme je da se AP i sapozinu sličan PSI domen kodiraju istim genom. Iako prethodno navedeni podaci jasno ukazuju na to da PSI ima funkciju nosioca signala za sortiranje i usmeravanje enzima na finalno odredište, ipak postoje izuzeci koji opovrgavaju ovu tvrdnju. Analiza lokalizacije fitepsina iz cvetova *Cinarae cardunculus*: kardozina A i kardozina B, pokazala je da, iako oba enzima sadrže PSI region, ipak finalno bivaju lokalizovani u potpuno različitim delovima tkiva. Kardozin B se detektuje u ekstraćelijskom matriksu oko provodnih tkiva, dok se kardozin A nalazi u proteinskim vakuolama kao i ćelijskom zidu ćelija koje izgrađuju papile žiga tučka (Faro *et al.*, 1998). Očigledno da uloga PSI regiona još uvek nije dovoljno jasna i njegovo prisustvo u AP ne ukazuje jednoznačno i obaveznu lokalizaciju u vakuolama. Moguće je da postoji neki još uvek neidentifikovani motiv u okviru AP proteina čije je prisustvo neophodno za pravilno obavljanje pretpostavljene funkcije PSI regiona, t.j. usmeravanje enzima u vakuolu. Takođe su i neki drugi strukturni motivi, različiti od sapozinskih domena PSI regiona pronađeni u okviru AP, a koji su mogući signali za vakuolarno sortiranje. Pokazano je da u ječamskom lektinu, C-terminalni peptid VF₂AE₁AIA pretstavlja dovoljan ciljani signalni protein za vakuolu. Sličan C terminalni motiv VG₂FAE₁EAA, koji je pronađen u *FeAP9* ali i u drugim biljnim AP može takođe predstavljati još jedan signal za sortiranje u vakuole (Domingos *et al.*, 2000).

Osim prethodnog, u okviru *FeAP9* sekvence na poziciji između 246 i 248 aminokiseline, pronađen unutrašnji KGE motiv. Ovaj motiv je po strukturi i naelektrisanju sličan RGD motivu

koji je karakterističan za integrin vezujuće proteine i može dati informaciju o prepoznavanju enzima sa specifičnim supstratom. Analiza predikovane aminokiselinske sekvence pokazuje da je ovaj motiv lokalizovan na površini molekula (**Slika 9**), što verovatno omogućava da se preko njega ostvare interakcije proteinaze i nekih drugih proteina. Nedavno su Simões *et al.*, 2005 pokazali da KGE motiv u kardozinu A posreduje u interakciji između proteinaze tučka i fosfolipaze Da iz proteinskog ekstrakta polena. Ovo otkriće ukazuje na moguću ulogu AP u biljnim putevima signalne transdukcije. Takođe obzirom da je pokazano da je *FeAP9* eksprimiran u svim analiziranim tkivima heljde osim u polenu (**Slika 26**), verovatno je da zahvaljujući KGE motivu, ovaj protein u cvetu ima funkciju koja nije vezana samo za proteolizu već i za prepoznavanje neke nepoznate komponente iz polena. Zanimljivo je da za razliku od *FeAP9*, *FeAP12* ne sadrži KGE motiv, već se između pozicija 246 i 248 nalazi RGQ. Iako RGQ iz *FeAP12* nije po naelektrisanju sličan KGE ili RGD motivima, analiza predikovane 3D structure (slika nije prikazana) ukazuje na to da je ova sekvencija takođe smeštena na površini molekula i da je možda uključena u uspostavljanje drugačijih interakcija, a samim tim verovatno je da ova dva enzima učestvuju u različitim biološkim procesima.

U daljem radu je analizirana ekspresija *FeAP9* gena. Preliminarne rezultate distribucije *FeAP9* ekspresije po organima i profila ekspresije u semenu tokom razvića, dobijene Northern blot - analizom (**Slika 14**), naknadno smo reanalizirali primenom metode RT PCR. Kako su dizajnirani prajmeri na osnovu 3'UTR - sekvence ovog određenog gena, verujemo da smo obezbedili veću specifičnost i time verodostojnije rezultate vezane za ekspresiju *FeAP9* u poređenju sa Northern blot analizom (**Slika 15**) (Milisavljević *et al.*, 2008). Pokazano je da se najveća ekspresija *FeAP9* u semenu dostiže u fazama 21-23 i 23-25 DAF, međutim obzirom da je RT PCR osetljivija metoda od metode Northern blot, uočeno je da se slaba ekspresija

pojavljuje već u fazi 9 DAF (**Slika 16**). Rezultati dobijeni u RT PCR analizi suštinski se poklapaju sa rezultatima Northern blot analize. Zanimljivo je da se jasno uočava da je profil ekspresije *FeAP9* sličan profilu ekspresije gena za 13S legumine i viciline (Samardžić *et al.*, 2004; Radović *et al.*, 1998). iRNK za RP počinju da se sintetišu u ranoj fazi, njihova ekspresija zatim raste, dostiže maksimum u srednjoj fazi sazrevanja semena i gasi se u zreloom semenu. Vreme eksprimiranja AP9 iRNK koje se podudara sa rezervnim proteinima, može ukazivati da ovaj gen ima ulogu u obradi RP tokom njihovog sazrevanja. Osim toga, dobijeni profil ekspresije značajno se razlikovao od profila ekspresije *FeAP12* koji kodira drugu tipičnu proteinazu heljde. *FeAP9* iRNK se detektuje u svima analiziranim organima: semenu, listu, stablu korenu i cvetu, dok je *FeAP12* tkivno specifično eksprimiran t.j. prisutan je samo u semenu, pretežno u ranoj fazi sazrevanja. Ovo ukazuje da je ekspresija *FeAP12* gena tkivno i vremenski regulisana. Rezultati dobijeni u analizi RT PCR ukazuju na činjenicu da je verovatno *FeAP9*, za razliku od *FeAP12*, značajan za neku generalnu biološku funkciju u svim organima, ili se može pretpostaviti da je uključena u različite procese u različitim biljnim organima. Dalji eksperimenti koji se zasnivaju na ko-imunoprecipitaciji sa specifičnim antitelima, mogli bi biti od koristi za identifikaciju supstratne specifičnosti. Ovo bi predstavljalo dodatni korak napred u razjašnjavanju funkcije *FeAP9*.

U cilju približavanja biološkoj ulozi *FeAP9* gena izvedeni su preliminarni eksperimenti koji su se zasnivali na metodi *in situ* RNK-RNK hibridizacije što je trebalo da nam obezbedi informaciju o tkivnoj i ćelijskoj lokalizaciji odgovarajućeg transkripta. *In situ* hibridizacija je inače moćna tehnologija koja se koristi za lokalizaciju ekspresije gena, kao i za detektovanje vremenskog i prostornog paternu genske ekspresije. Iako je prvi opisani i u prošlosti najčešće primenjivani metod zasnovan na radioaktivno obeleženim probama, mi smo se u našim

eksperimentima opredelili za ne-radioaktivni metod koji ima mnoge prednosti: veća senzitivnost, kraće vreme razvijanja signala i veća histološka rezolucija. Za obeležavanje probe korišćen je dioksigenin, izolovan iz biljke *Digitalis*, koji je pogodan za upotrebu, jer se eliminiše mogućnost pojave nespecifičnih signala, obzirom da je karakterističan samo za ovu biljku i ne sintetiše se u ostalim.

Jedini do sada uspešni eksperimenti *in situ* RNK-RNK hibridizacije sa FeAP9-DIG probom izvedeni su na presecima stabla i oljuštenog semena heljde. U poprečnom preseku stabla heljde *FeAP9* signal je detektovan u ćelijama centralnog parenhima (**Slika 22A**). Uočeno je da su ćelije centralnog parenhima stabla krupne, sa tankim zidovima i krupnim vakuolama iz kojih i potiče signal. Kako je poznato da ćelije parenhima korena i stabla imaju delimično ulogu u skladištenju hrane, nije začuđujuće što su ovde prisutne i proteaze, koje su najčešći pratioci proteina jer učestvuju u njihovom sazrevanju. Analiza preseka semena (**Slika 23A**) pokazuje prisustvo signala u endospermu. Endosperm inače okružuje embrion i obezbeđuje njegovu ishranu, te je zato bogat skrobom, rezervnim proteinima i uljem. U ječmu je takođe detektovano prisustvo HvAP u endospermu, i primećeno je da se ovaj protein akumulira tokom razvića semena (Törmäkangas *et al.*, 1994). Ovaj deo semena koji se tokom razvića drobi i prazni, poseduje amilolitičku sposobnost koja je odgovorna za mobilizaciju rezervi ugljenih hidrata neophodnih embrionu za vreme njegovog razvoja (Duffus & Cocharane, 1992). AP može služiti sličnoj funkciji učestvujući u hidrolizi ćelijskih proteina kako bi se obezbedile aminokiseline za rastući embrion. Ostali organi heljde su takođe bili uvršteni u analizu i fiksirani, međutim od njih nisu dobijeni kvalitetni i morfološki očuvani preseki. Verovatno je najkritičnije mesto u pripremanju kvalitetnih preparata dobra fiksacija, koja je u slučaju biljnih tkiva otežana zbog prisustva ćelijskog zida na površini biljnih ćelija. Ćelijski zid, osim toga, predstavlja barijeru kroz koju

specifična RNK proba treba da proдре, što je prevaziđeno ograničenom i kontrolisanom hidrolizom *FeAP9* probe čime je ukupna dužina od oko 1,5 kb smanjena na trećinu. Dodatni problem pretstavlja izlaganje preparata visokim temperaturama prilikom hibridizacije kako bi se izbegli nespecifični signali, što može dovesti do oštećenja preparata i narušavanja morfološke strukture.

Iako podaci iz literature ukazuju na to da proteaze imaju ulogu u adaptaciji biljnih ćelija na različite uticaje spoljašnje sredine (Pena, et al., 2006; Garcia-Lorenzo et al., 2006) postoji veoma malo informacija o odgovoru biljnih aspartičnih proteinaza na različite stimulse (Cruz de Carvalho *et al.*, 2001; Schaller & Ryan, 1996). Praćenje nivoa *FeAP9* ekspresije vršeno je primenom Real-time PCR pristupa. Ova metoda osim što je pružala mogućnost precizne kvantifikacije ekspresije, omogućavala je, odabirom visoko specifičnih prajmera dizajniranih iz veoma varijabilnih 3' netranslirajućih regiona, diskriminaciju signala koji mogu poticati sa drugih sličnih gena, kao što je u ovom slučaju na primer *FeAP12* gen. Međutim, za kvantifikaciju je bilo neophodno obezbediti dovoljno kvalitetne interne kontrole koje se stabilno eksprimiraju u svim ćelijama, u svim stupnjevima razvicia biljaka, kao i prilikom delovanja različitih spoljašnjih stimulusa. Obzirom da za heljdu nisu od ranije postojali opisani geni koji bi bili potencijalne interne kontrole, jedna od mogućnosti bila je gen za 26S rRNK, čija je sekvenca ranije identifikovana analizom cDNK biblioteke semena heljde (klon MM7 - dug 572 bp, Milisavljević, *neobjavljeni rezultati*). Iz literature je poznato da specifične 26S rRNK iz drugih biljaka mogu da se koriste za kvantifikaciju ekspresije gena od interesa prilikom različitih stresova, obzirom da nivo njegove ekspresije ne varira tokom tretmana (Singh *et al.*, 2004). Takođe, jedine sekvence prajmera dostupne iz literature su bile sekvence za specifično umnožavanje 5,8S rRNK heljde, koje su korišćene za određivanje zastupljenosti heljde u hrani

Real-time metodom (Hirao *et al.*, 2005). Kao treći referentni gen odabran je gen za histon 3, obzirom da su prajmeri specifični za histon 3 pirinča, dizajnirani na osnovu visoko konzerviranih sekvenci davali umnožavanje i sa cDNK heljde. Iako se ovaj gen stabilno eksprimira i koristi kao referentni gen (Nicot *et al.*, 2005), ipak treba imati u vidu da njegova ekspresija u listu neznatno pada u odgovoru na tretman abscisinskom kiselinom, dok nivo ekspresije pokazuje blagi porast u slučaju tretmana giberelinskom kiselinom (Takahashi *et al.*, 2006). Iz tog razloga nije preporučljivo da se histon 3 kao kontrola izbegava u ovim konkretnim tretmanima.

U ovom radu su na osnovu standardnih krivi određene efikasnosti Real-time PCR reakcija u kojima su pomenuti prajmeri korišćeni. Ustanovljeno je da je efikasnost reakcije mala za 5,8S rRNK, dok je za druga dva gena bila zadovoljavajuća (efikasnost: 90-100%, nagib standardnih kriva u opsegu 3,1 do 3,6, (Radonic *et al.*, 2004)). U daljim, konkretnim abiotičkim stresovima uvek su korišćene po dve kontrole: 26S rRNK i histon 3, i uočeno je među njima ne postoje razlike niti promene u njihovoj ekspresiji pri primenjenim tretmanima. S druge strane, za 5,8S rRNK ne samo da je pokazana loša efikasnost umnožavanja, već i da od uzorka do uzorka postoje velike varijacije u ekspresiji (slika nije prikazana). Poznato je da se policistronski rRNK prekursori transkript sastoji od 26S, 18S i 5,8S rRNK kodirajućih sekvenci, koje su razdvojene nefunkcionalnim ITS sekvencama (**ITS** od engl. **I**nternal **T**ranscribed **S**pacers). Kasnija obrada policistronskih prekursora podrazumeva isecanje ovih nefunkcionalnih sekvenci umetnutih između pojedinačnih rRNK. Kako je jedan od prajmera za 5,8S rRNK delimično iz ITS regiona, pretpostavka je da usled neuklađenosti u fazama obrade policistronske rRNK može doći do velike razlike u detektovanju 5,8S rRNK ekspresije. Očigledno je da se ovi prajmeri mogu koristiti samo za detektovanje gDNK heljde, kao i praćenje zastupljenosti heljde, na primer u mešovitim uzorcima hrane, a ne i za analizu ekspresije.

Dalje je u ovom radu predstavljena relativna kvantifikacija FeAP9 ekspresije u listu heljde koja je izlagana različitim abiotičkim stresovima. Senescencija izazvana mrakom, kao i suša, imaju sličan efekat utičući na povećanje *FeAP9* ekspresije, što jasno ukazuje na to da ovaj enzim može biti uključen u odgovor heljde na abiotički stres (**Slika 20A i 20B**). Razgradnja proteina, kao i njihovo recikliranje, koji zavise od nivoa proteolitičkih enzima, su esencijalni deo odgovora biljaka na uticaj stresa iz spoljašnje sredine (Hing *et al.*, 2004). U odgovoru na abiotički i biotički stres aminokiseline neophodne za izgradnju novih proteina obezbeđuju se degradacijom oštećenih i potencijalno štetnih proteina (Schaller, 2004). Očigledno je da se uloga *FeAP9* u ovim uslovima može povezati sa remobilizacijom azota, međutim moguće je da *FeAP9* ima neku specijalizovanu ulogu u transdukciji regulatornih signala pri abiotičkom stresu (Beers *et al.*, 2004). Takođe se može pretpostaviti da *FeAP9* prilikom senescencije ima ulogu u degradaciji hloroplasta, što je, usled gubitka hlorofila jedan od prvih uočljivih pokazatelja ulaska biljaka u senescenciju. Hloroplasti sadrže 75 do 80% totalnog azota u listu, uglavnom u okviru proteina i poznato je da za vreme senescencije hloroplastni proteini bivaju postepeno degradovani kako bi se iz njih remobilisao azot koji se šalje ka ostalim delovima biljke koji i dalje rastu (Wittenbach *et al.*, 1978). Proteoliza hloroplastnih proteina počinje u ranim fazama senescencije (Hörtensteiner & Feller, 2002), što je u korelaciji sa dobijenim rezultatima za *FeAP9*, gde se uočava da nivo *FeAP9* transkripta nakon porasta u početnim fazama suše, u kasnijim fazama senescencije ponovo pada. Ipak nije sasvim jasno kako pretpostavljena vakuolarna AP heljde može učestvovati u degradaciji hloroplastnih proteina obzirom da postoji jasna distinkcija u njihovoj lokalizaciji. Iako je najverovatnije da glavnu ulogu u ovom procesu igraju hloroplastne proteaze, ipak je pokazano elektronskom mikroskopijom da se hloroplasti mogu pomerati ka centralnoj vakuoli u živim ćelijama i da je čak moguće uočiti cele hloroplaste u samoj vakuoli

koji zatim podležu dejstvu litičkih enzima (Minamikawa *et al.*, 2001). Takođe se može pretpostaviti da aspartična proteinaza heljde u ranoj fazi senescencije svoju aktivnost prevashodno ispoljava degradujući Rubisco (ribuloza-bifosfat karboksilaza), koji je najzastupljeniji hloroplastni protein. Degradacija Rubisco proteina se i dešava u početnim fazama starenja, t.j. senescencije lista i to veoma brzo (Wittenbach *et al.*, 1978). Ovaj protein se oslobađa iz hloroplasta u citoplazmu odakle se usmerava ka vakuolama gde se hidrolizuje pod dejstvom proteaza (Chiba *et al.*, 2003), među kojima, shodno prethodnim rezultatima, može biti i *FeAP9* heljde.

U daljim eksperimentima je primećena povećana *FeAP9* ekspresija pod uticajem salicilne kiseline. Postoje brojni podaci koji ukazuju na činjenicu da je SA signal važan za otpornost biljaka prema stresu, kao i da svoju odbrambenu funkciju obavlja aktiviranjem raznih biljnih odmrambenih mehanizama (Shah *at al.*, 1999; Dat *et al.* 1998; Malamy *at al.*, 1990). Prema našim saznanjima, do sada ne postoje podaci koji se odnose na uticaj SA na biljne aspartične proteinaze. U ovom radu je pokazano da delovanje SA tokom 1 h povećava nivo *FeAP9* mRNK, na osnovu čega se može pretpostaviti da je ova proteinaza važan deo odbrambenih mehanizama heljde. Ovo mišljenje je potvrđeno činjenicom da ekspresija *FeAP9* takođe raste nakon povređivanja listova heljde hiruškom iglom, čime je imitiran napad patogenih organizama. Ovaj tretman povređivanjem je izveden kako bi se delimično simulirao mehanički stres koji nastaje prilikom napada biljnih vaši. Može se smatrati da smo ne samo mehaničkim povređivanjem već i primenom SA delimično oponašali efekte biotičkog stresa koji nastaje prilikom napada patogena, obzirom da je poznato da napad patogena indukuje SA posredovanu ekspresiju proteina povezanih sa patogenezom (Ohashi & Ohshima, 1992). Iz tog razloga bilo bi značajno analizirati način inter-regulacije između SA i *FeAP9* u cilju procene da li *FeAP9* igra efektornu funkciju u

odgovoru na patogene ili ima neku mnogo sofisticiraniju regulatornu funkciju. Zanimljivo je da se SA akumulira u prisustvu ultravioletnog zračenja u listovima duvana (Yalpany et al., 1994). Na osnovu ovoga pretpostavljeno je da UV kao ključni faktor koji deluje na biljni metabolizam, može imati uticaj i na FeAP9 preko SA akumulacije, međutim naši eksperimenti nisu potvrdili ovu hipotezu. Jedno od mogućih objašnjenja za izostajanje odgovora *FeAP9* gena na UV svetlo može biti posledica ekološke adaptacije heljde na visoke nadmorske visine. Pretpostavlja se da je usled izloženosti heljde UV zračenju, ova biljka razvila zaštitne mehanizme koji se zasnivaju na anti-UV aktivnosti polifenolnih jedinjenja, pre svega rutinu (Kreft et al., 2002; Suzuki et al. 2005).

Očigledno, aspartična proteinaza heljde učestvuje na razne načine u prilagođavanju biljaka promenama u spoljašnjoj sredini. Dodatno je analizirana ekspresija gena za *FeAP9* pod uticajem povišene koncentracije metala. Uočeno je da do značajnijeg porasta *FeAP9* ekspresije dolazi u listovima biljaka koje su gajene na podlogama koje su sadržavale 100 μM CdCl_2 , nakon 3h i nastavlja da raste i nakon jednog dana. Pri većoj koncentraciji (300 μM CdCl_2), primećuje se blagi porast posle 4,5 h, dok se nakon jednog dana nivo ekspresije vraća na nivo kontrole (**Slika 26**), što je verovatno posledica prevelike koncentracije teškog metala, koja ima toksičan efekat. Poznato je da, kao i u slučaju drugih štetnih uticaja spoljašnje sredine, pod uticajem teških metala, u biljkama dolazi do povećanja nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta kao što su H_2O_2 , O_2^- i OH, što za biljku predstavlja oksidativni stres. Pod njihovim dejstvom dolazi do karbonilacije proteina, ireverzibilnog oksidativnog procesa, koji vodi gubitku funkcija karbonilovanih proteina (Palma et al., 2002). Usled povećanja nivoa karbonilnih grupa može se pretpostaviti da dolazi do aktivacije proteinaza, čija bi uloga bila da eliminišu modifikovane proteine (Pena et al., 2006).

Na osnovu naših rezultata, može se smatrati da aspartična proteinaza heljde takođe učestvuje u odbrani biljke od toksičnih efekata teških metala.

Uzimajući u obzir sve navedene rezultate naših eksperimenata, istraživanje uticaja različitih abiotičkih stresova na ekspresiju *FeAP9* u listovima heljde jasno pokazuje aktivaciju *FeAP9* u stresnim uslovima i ukazuju na važnu ulogu ovog enzima u odgovoru heljde na stres.

Uprkos naporima da se eksprimira rekombinantni *FeAP9*, standardnim pristupom koji podrazumeva upotrebu pQE32 ekspresionog vektora i nekoliko različitih bakterijskih sojeva: (M15(pREP4) i BL21(DE3)pLysS) nismo uspeli da postignemo uspešnu produkciju proteina. Pretpostavljeno je da je razlog za neuspeh mogla biti razlika u raspoloživosti tRNK za sintezu proteina (codon usage) između *FeAP9* and *E.coli* koji je iznosio 19,87 % što je određeno analizom u programu: Codon Usage Analyzer (www.gcu.schoedl.de). U cilju prevazilaženja ovog problema za ekspresiju je korišćen Rosetta-gami bakterijski soj koji sadrži retke kodone i koji je transformisan MBP-*FeAP9* konstruktom u pMAL-c2X vektoru. Zahvaljujući MBP ("maltose binding protein") N terminalnom tagu, ovaj ekspresioni sistem bi trebalo da bude pogodan za povećanje solubilnosti hidrofobnih proteina koji se teško eksprimiraju. Ovaj sistem je bio uspešan za produkciju *FeAP9* proteina, međutim *FeAP9* je i dalje pretežno zaostajao u talogu (**Slika 24**). Kako fuzioni protein MBP-*FeAP9* prečišćen iz solubilne frakcije nije pokazivao nikakvu aktivnost nakon većeg broja pokušaja, pretpostavljeno je da *FeAP9* produkovan u ovom sistemu nije dobro obrađen te da ne poseduje korektno pozicionirane cisteine za uspostavljanje disulfidnih veza. Ovo ukazuje na neophodnost korišćenja drugih, kompleksnijih sistema za overekspresiju proteina, kao što su kvasci ili insekatske ćelije.

Cilj ekspresije rekombinantnog proteina bio je njegova primena u proizvodnji specifičnih antitela kojima bi bila praćena ekspresija proteina *FeAP9* u heljdi, kao i upotreba za biohemijsku

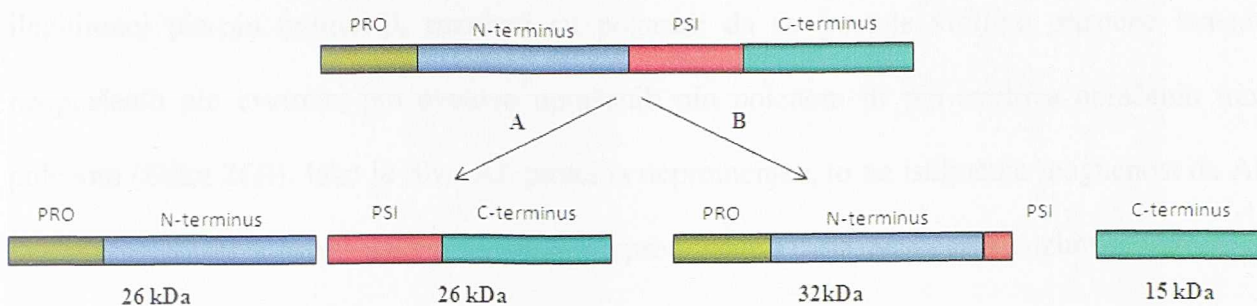
karakterizaciju proteinazne aktivnosti. Kako nije bilo moguće proizvesti nativan rekombinantni protein bez pratećeg taga, koji bi bio korišćen za produkciju antitela, opredelili smo se za antitela napravljena da prepoznaju sintetički oligopeptid iz N terminalnog regiona *FeAP9* enzima. Produkcija neaktivnog *FeAP9* je ipak bila svrsishodna u daljem radu, obzirom da je rekombinantni *FeAP9* bio iskorišćen za optimizaciju uslova za imunodetekciju sa antitelima napravljenim za prepoznavanje sintetičkog *FeAP9* oligopeptida (**Slika 25**).

Zanimljivo je da je analizom Western blot dobijen profil ekspresije *FeAP9* proteina u semenu koji se pokazao različitim u odnosu na profil ekspresije *FeAP9* gena koji je dobijen primenom metode RT PCR. Iako je iRNK *FeAP9* prisutna već u ranim fazama sazrevanja (9 DAF), *FeAP9* protein ne uočava se pre 14-17 DAF (**Slika 26B**). Ovo zapažanje ukazuje na to da se regulacija *FeAP9* ekspresije delimično obavlja na post-transkripcionom nivou, pri čemu je moguće da upravo lider intron ima ulogu u ovom delu regulacije obzirom da može povećati nivo stabilnosti transkripta (Curi *et al.*, 2005). Ipak, ne sme se zanemariti ni mogućnost da je razlog za razlike u fazama sazrevanja u kojima počinje da se detektuje prisustvo iRNK *FeAP9* i *FeAP9* proteina posledica razlike u osetljivosti PCR metode i metode imunodetekcije antitelima. Takođe je *FeAP9* bio prisutan i u prvim fazama germinacije (**Slika 26B**) što znači da verovatno učestvuje ne samo u obradi već i u degradaciji rezervnih proteina tokom klijanja. Iz literature je poznato da su biljne AP u većoj količini pronađene u germinativnom semenu, a za nekoliko prečišćenih enzima je pokazano da su sposobni da degraduju rezervne protein *in vitro* (Bleukx *et al.*, 1998; D'Hondt *et al.*, 1993; Hiraiwa *et al.*, 1997; *et al.*, Voigt *et al.*, 1995). Ovi enzimi mogu direktno učestvovati u modifikaciji i razgradnji rezervnih proteina ili mogu obrađivati ili aktivirati druge hidrolaze tokom razvića i klijanja. Proteinaze koje vrše degradaciju RP, mogu se

nakupljati u proteinskim telima, zajedno sa RP, u zimogenoj formi koja se aktivira za vreme klijanja semena (Muntz *at al.*, 2001).

Dalja analiza rezultata dobijenih Western blotom pokazuje da se pri neredukujućim uslovima detektuje FeAP9 MW od 47 kDa, dok se pri redukujućim uslovima uočava peptid od 32 kDa (**Slika 26A**). Polipeptid od 32 kDa predstavlja N terminalni deo enzima, s obzirom na to da antitelo prepoznaje upravo ovaj domen, koji je u redukujućim uslovima odvojen od kompletne proteinaze raskidanjem disulfidnih veza pomoću β -merkaptoetanol. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima prethodnih eksperimenata rađenih sa antitelima na fitepsin ječma koja su reagovala i sa AP heljde (Timotijevic *et al.*, 2003). Svi analizirani organi, osim cveta, prikazuju prisustvo polipeptida iste molekulske mase - polipeptid od 47 kDa se javlja i u kotiledonima, mladim listovima, kao i potpuno razvijenim listovima, dok je mnogo jači signal detektovan u prirodno senescentnim listovima. Ovi rezultati nisu neočekivani s obzirom na to da se već zna da je povećanje ekspresije AP povezano sa senescencijom. (Panavas *at al.*, 1999). Senescencija je finalni stupanj razvića biljaka ili njihovih pojedinačnih organa, ali ova pojava može biti izazvana i velikim brojem drugih spoljašnjih i unutrašnjih faktora kao što su starenje, biljni hormoni, biotički ili abiotički stres, produženo izlaganje mraku ili sezonske promene. Jedna od značajnih funkcija senescencije je relokalizacija azota do drugih delova biljke pre nego što se specifična struktura degraduje. Prisustvo proteolitičke aktivnosti u senescentnim listovima od ranije je poznato (Huffaker, 1990), ali, još uvek je diskutabilno da li ovi enzimi uzrokuju senescenciju ili su isključivo uključeni u remobilizaciju azota. Međutim kako se FeAP9 detektuje i u mladim listovima pre pojave senescencije, kao i kotiledonima (tkz. "listovima semena"), verovatno je da u ovom organu aspartična proteinaza ima i neku dodatnu, opštu funkciju.

Imunodetekcijom vršenom na proteinskim ekstraktima izolovanim iz cveta heljde pokazano je prisustvo polipeptida od 52 kDa pri neredukujućim uslovima i 26 kDa pri redukujućim uslovima. Polipeptid od 52 kDa je najzastupljenija u potpuno zrelih cvetovima, dok se slabiji signal detektuje u delimično otvorenim cvetovima, a potpuno izostaje u pupoljcima. Pretpostavlja se da je razlika između formi od 47 kDa i 52 kDa posledica alternativne posttranslacione obrade u različitim organima. Poznato je da u ječmu postoje dve forme AP, različite molekulske mase, a za koje je dokazano da su produkti istog gena. Oba enzima su heterodimeri molekulske mase od 47 kDa (32 + 16 kDa) i 40 kDa (29+11 kDa) (Sarkkinen *et al.*, 1992). Iako je pokazano da su obe forme aktivne, ipak je njihova ekspresija različita. Fitepsin molekulske mase od 47 kDa se eksprimira u svim analiziranim organima, dok manje forme (40 kDa) nema u korenu i izdanku. Smatra se da do razlike u molekulskoj masi dolazi usled drugačije posttranslacione obrade istog primarnog translacionog proizvoda. U slučaju forme veće molekulske mase pri sazrevanju dolazi samo do presecanja PSI regiona, ali ne i do njegovog potpunog iskrajanja, dok u slučaju manje forme, PSI region biva u potpunosti uklonjen. Na osnovu ovih podataka, može se zaključiti da primarni translacioni proizvod gena za *FeAP9*, biva različito obrađen u cvetu u odnosu na druge organe. Međutim zanimljivo je da iako *FeAP9* u cvetu ima veću molekulsku masu (52 kDa), ipak odgovarajući N terminalni polipeptid ima manju M_w (26 kDa) od onih koji su pronađeni u drugim organima (32 kDa). Poznato je da se PSI može različito iskrajati (Glathe *et al.*, 1998), te je pretpostavljen sledeći model obrade u cvetu i ostalim organima (**Slika 1**).



Slika 1. Model post-translacione obrade *FeAP9* u cvetu (A) i ostalim organima (B).

Kako bi se detaljnije pratila modifikacija primarnog translacionog proizvoda *FeAP9*, bilo bi neophodno u analizu uključiti antitela specifično pravljena da prepoznaju pojedinačne segmente AP proteina, kao što su C polipeptid i PSI region. Dodatna mogućnost koja objašnjava razliku između formi od 47 kDa i 52 kDa je da su ove različite forme produkti dva slična gena iz multigeneske AP familije.

Analizom ekspresije AP proteina u cvetu pokazano je da je ekspresija vremenski regulisana s obzirom na to da se u pupoljcima uopšte ne detektuje signal poreklom od ovog proteina, dok se u potpuno razvijenom cvetu uočava izuzetno jak signal (**Slika 26B**), što ukazuje na moguću ulogu *FeAP9* u seksualnoj reprodukciji. Takođe je ustanovljeno da se *FeAP9* detektuje u tučkovima cveta, a izostaje u polenu, na osnovu čega se može pretpostaviti da AP iz tučkova učestvovuje u prepoznavanju nekih od komponenti specifičnih za polen, kao što je ranije opisano. Dodatno smo ispitivali mogućnosti uloge *FeAP9* u zaustavljanju rasta polenove cevi u slučaju self-inkompatibilne polinacije. Dobro je poznato da su cvetovi heljde dimorfni: sa dugim stilosom (pin morf) i kratkim stilosom (tram morf) i da jedina legitimna polinacija može biti ostvarena između ova dva tipa (Miljuš-Đukić et al., 2004). Iako smo očekivali jak signal u

ilegitimnoj pin-pin polinaciji, rezultati su pokazali da ne postoje vidljive promene između neoprašenih pin cvetova, pin cvetova oprашenih pin polenom ili pin cvetova oprашenih tram polenom (**Slika 26B**). Iako je nivo AP proteina nepromenjen, to ne isključuje mogućnost da AP može učestvovati u ovom načinu seksualne reprodukcije putem povećanja enzimske aktivnosti (Miljuš-Đukić et al., 2007).

Strukturne karakteristike tipičnih aspartičnih proteinaza i specifični profil ekspresije ohrabrujući su za dalja istraživanja funkcije FeAP9 proteina, kako su ta istraživanja značajna za osnovnu nauku, posebno u pogledu kompleksne signalne mreže odgovora na stres. Takođe, rasvetljavanje funkcije *FeAP9* može biti od interesa i za primenu u poljoprivredi.

6. ZAKLJUČCI

1. Parcijalne sekvence cDNK koje kodiraju dva člana genske familije tipičnih aspartičnih proteinaza heljde: *FeAP9* i *FeAP12* su izolovane upotrebom degenerativnih prajmera na cDNK semena heljde u srednjoj fazi razvića. Za dalju analizu odabrana je *FeAP9* do čije se pune dužine od 1521 bp došlo modifikovanim metodama 5' i 3'RACE, a odgovarajući genomski fragment, ukupne dužine od 5374 bp dobijen je preklapanjem proizvoda amplifikacije iz tri reakcije u kojima su korišćeni prajmeri specifični za dati fragment gena.
2. U okviru kodirajuće sekvence *FeAP9* identifikovano je 12 introna i 13 egzona – struktura koja je prisutna u većini do sada poznatih gena za aspartične proteinaze. Struktura gena za *FeAP9* je najbližnja genu koji kodira aspartičnu proteinazu pirinča. Ova dva gena se razlikuju od drugih predstavnika iste klase po izuzetno dugom drugom, sedmom i jedanaestom intronu. U okviru nekodirajućeg regiona, uzvodno od ATG starta translacije, predikovan je „lider“ intron (dužine 755 bp) - visoko konzervisana karakteristika ove klase proteinaza.
3. Analiza izvedene aminokiselinske sekvence je pokazala da *FeAP9* ima strukturu karakterističnu za tipične aspartične proteinaze biljaka: konzervisano aktivno mesto DTG/DSG, PSI domen prisutan samo kod AP biljaka (104 ak), signalni peptid (22 ak) i propeptid (40 ak) koji ukazuju na potencijalni mehanizam obrade u formiranju zrelog aktivnog enzima.

4. Analizom „Northern blot” i metodom RT PCR pokazano je da se *FeAP9* eksprimira u svim analiziranim organima heljde – semenu, listu, korenu, stablu i cvetu. Specifičan profil ekspresije uočen je tokom sazrevanja semena sa maksimumom u fazi 21-23 DAF, što je sinhronizovano sa ekspresijom rezervnih proteina. Za razliku od *FeAP9*, *FeAP12* se eksprimira samo u semenu, gde je maksimalni nivo ekspresije detektovan u fazi <9 DAF.
5. Metodom Real-time PCR je detektovano povećanje ekspresije *FeAP9* pri izlaganju lista heljde faktorima abiotičkog stresa, kao što su: suša, mrakom izazvana senescencija i povećana koncentracija kadmijuma, dok promene nisu zabeležene u biljkama tretiranim UV zračenjem. Ekspresija se takođe povećava u uslovima kad je imitiran napad patogena, dakle biotički stres: mehaničkim povređivanjem lista ili primenom salicilne kiseline. Kompjuterskom predikcijom je potvrđeno prisustvo više potencijalnih cis-aktivirajućih regulatornih sekvenci u okviru 5' regulatornog regiona, koje mogu biti uključene u odgovor na različite hormonske stimulse (TCA-element i TGA-boks) i stimulse iz spoljašnje sredine kao što su svetlost (AE-boks), toplotni stres (HSE) i napad patogena (Box-W1).
6. Rekombinantni *FeAP9* protein u fuziji sa MBP tagom je proizveden u Rosetta-gami soju *E.coli*, kao heterolognom ekspresionom sistemu, gde je pretežno bio lokalizovan u inkluzionim telima. Kako *FeAP9* rekombinantni protein nije bilo moguće renaturisati i koristiti za proizvodnju antitela, sintetički oligopeptid iz N terminalnog regiona *FeAP9* proteina procenjen kompjuterskom predikcijom kao podesan epitop upotrebljen je za imunizaciju i proizvodnju poliklonskih anti AP9-antitela.

7. Analizom „Western blot“, uz primenu anti-AP9-antitela pri neredukujućim uslovima detektovano je prisustvo polipeptida od 47 kDa u semenu, listu, korenu i stablu, dok je u cvetu detektovan polipeptid od 52 kDa. U prisustvu β -merkaptoetanela na proteinskom profilu uočen je polipeptid od 32 kDa u svim analiziranim tkivima, osim u cvetu gde je identifikovan signal koji odgovara polipeptidu od 26 kDa, ukazujući na mogućnost različite post-translacione obrade aspartične proteinaze heljde u različitim organima

8. Imunodetekcijom je pokazano da se *FeAP9* protein akumulira tokom sazrevanja semena i da je prisutan u početnim fazama germinacije nakon čega postepeno nivo ovog proteina opada. *FeAP9* signal se javlja u svim fazama razvića lista, dok je u prirodno senescentnom listu intezitet signala najjači. Takođe, protein *FeAP9* se javlja u tučkovima potpuno razvijenog cveta.

7. LITERATURA

- Alekseeva F. **Technology of buckwheat cultivation.** Kishinev, USSR, 1981
- Amidon WJ, Pfeil JE, Gal S. **Modification of luciferase to be a substrate for plant aspartic proteinase.** *Biochem J* 1999; 343: 425-433
- An C-I, Fukusaki E, Kobayashi A. **Aspartic protease are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco.** *Planta* 2002; 214: 661-667
- Angelo AJ, Ory RL, Hansen HJ. **Localization of an acid proteinase in hempseed.** *Phytochemistry* 1969; 8: 1135
- Asakura T, Abe K, Arai S. **Evidence for the occurrence of multiple aspartic proteinases in rice seeds.** *Biosci Biotechnol Biochem* 1995; 59: 1793-1797
- Asakura T, Watanabe H, Abe K, Arai S. **Rice aspartic proteinase, oryzasin, expressed during seed ripening and germination, has a gene organization distinct from those of animal and microbial aspartic proteinase.** *Eur J Biochem* 1995; 232: 77-83
- Asakura T, Matsumoto I, Funaki J, Arai S, Abe K. **The plant aspartic proteinase-specific polypeptide insert is not directly related to the activity of oryzasin 1.** *Eur J Biochem* 2000; 267: 5115-5122
- Barret AJ & K McDonald. **Nomenclature: protease, proteinase and peptidase.** *Biol J Lett* 1986;
- Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. **Handbook of proteolytic enzymes.** Academic Press, Inc., London, 1998
- Barrett AJ & Rawlings ND. **Families clans of serine peptidases.** *Arch Biochem Biophys* 1995; 318: 247-250
- Barros RM and Malcata FX. **Modeling the kinetics of whey protein hydrolysis brought about by enzymes from *Cynara cardunculus*.** *J Agric Food Chem* 2000; 50: 4347-4356

- Beers EP, Jones AM, Dickerman AW. **The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis.** *Phytochem* 2004; 31: 43-58
- Belozersky MA, Dunaevsky YE, Rudenskaya GN, Stepanov VM. **Carboxyl proteinases from buckwheat seeds.** *Biochemistry* 1984; 49: 479-485
- Belozersky MA, Sarbakanova ST, Dunaevsky YE. **Aspartic proteinase from wheat seeds: isolation, properties and action on gliadin.** *Planta* 1989; 177: 321-326
- Bergamann M & Ross VF. **Enzymes of papain and their activation** 1936; 114: 717-726
- Berstein NK and James MN. **Novel ways to prevent proteolysis- prothitepsyn and proplasmepsin II.** *Curr Opin Struct Biol* 1999; 9: 684-689
- Bethke PC, Hillmer S, Jones RL. **Isolation of intact protein storage vacuoles from barley aleurone.** *Plant Physiol* 1996; 110: 521-529
- Bi X, Khush G, Bennet J. **The rice gene nucellin ortholog OsAsp1 encodes an active aspartic protease without a plant specific insert and is strongly expressed in early embryo.** *Plant Cell Physiol* 2005; 46: 87-98
- Biehl B, Heinrich H, Ziegeler-Berghausen H, Srivastava S, Xiong Q, Rassern D, Senyul VI, Hammor M. **The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process.** *Angew Bot* 1993; 67: 59-63
- Bleukx W, Brijs K, Torrekens S, Van Leuven F, Delcour JA. **Specificity of a wheat gluten aspartic proteinase.** *Biochim Biophys Acta* 1998; 1387: 317-324
- Blow DM. **Structure and mechanism of chymotrypsin.** *Acc Chem Res* 1976; 9: 145-152
- Bond HM and Bowles DJ. **Characterization of soybean endopeptidase activity using exogenous and endogenous substrates.** *Plant Physiol* 1983; 72: 345-347
- Borner GH, Sherrier DJ., Stevens TJ, Arkin IT, Dupree P. **Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A genomic analysis.** *Plant Physiol* 2002; 129: 486-499
- Bourgeois J. and Malek L. **Purification and characterization of an aspartyl proteinase from dry jack pine seeds.** *Seed Sci Res* 1991; 1: 139-147

- Bowles DJ. **Defense-related proteins in higher plants.** Annu Rev Biochem 1990; 59: 873
- Bradford MNA. **Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem 1976; 72: 248-254
- Brkljačić J, Majić D, Miljuš-Đukić J, Bratić A, Konstantinović M, Milisavljević M, Maksimović V. **The methalothionein-like gene from buckwheat: structural and functional analysis of the promoter region.** Int J Plant Sci 2005; 166: 889-900
- Brkljačić J, Maksimović V, Radović S, Savić A. **Identification of legumin like storage protein cDNA clone from cDNA library of developing buckwheat seed** 1998; 50: 15-20
- Brown JWS and Simpson CG. **Splice site selection in plant pre-mRNA splicing.** Annu Rev Plant Physiol 1998; 49: 77-93
- Callis J, Fromm ME, Walbot V. **Introns increase gene expression in cultured maize cells.** Gene Dev 1987; 1:1183-1200
- Cater SA, Lees WE, Hill J., Brzin J, Kay J., Phylip LH. **Aspartic proteinase inhibitors from tomato and potato are more potent against yeast proteinase A than cathepsin D.** Biochim Biophys Acta 2002; 1596: 76-82
- Chapman HA, Riese RJ, Shi G-P. **Emerging roles for cysteine proteases in human biology.** Ann Rev Physiol 1997; 59: 63-88
- Chen F & Foolad M. **Molecular organization of a gene in barley which encodes a protein similar to aspartic proteinase and its specific expression in nucellar cells during degeneration.** Plant Mol Biol 1997; 35: 821-831
- Chen X, Pfeil J, Gal S. **The three typical aspartic proteinase genes of *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed.** Eur J Biochem 2002; 269: 4675-4684
- Chenchik A, Moqadam F, Siebrt P. **Marathon cDNA amplification: A new method for cloning full-length cDNAs.** CLONTECHniques X 1995; 5-8

- Chitpintyol S. and Crabbe MJC. **Chymosin and aspartic proteinase.** Food Chem 1997; 61: 395-418
- Christeller JT, Farley PC, Ramsay RJ, Sullivan PA, Laing WA. **Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate.** Eur.J.Biochem 1998; 254: 160-167
- Chuman Y, Bergman A, Ueno T, Saito S, Sakaguchi K, Alaiva AA, Franzen B, Bergman T, Arnott D, Auer G, Appella E, Jörnvall H, Linder S. **Napsin A, a member of the aspartic protease family, is abundantly expressed in normal lung and kidney tissue and is expressed in lung adenocarcinomas.** FEBS Lett 1999; 462: 129-134
- Chung BYW, Simons C, Firth AE, Brown CM, Hellens RP. **Effect of 5' UTR introns on genes expression in *Arabidopsis thaliana*.** BMC Genomics 2006; 7: 120
- Church GM & Goldsbrough P. **Genomic sequencing.** Proc Natl Acad Sci USA 2002; 81: 1991-1995
- Cordeiro M, Jakob E, Puhan MS, Brodelius PE. **Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from *Cynara cardunculus*- a comparison to chymosin.** Milchwissenschaft 1992; 47: 683-687
- Cordeiro M, Pais MS, Brodelius PE. **Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*.** Physiol Plant 1994; 92: 645-653
- Costa J, Ashford DA, Nimtz M, Bento I, Frazão C, Esteves CL, Faro CJ, Kervinen J, Pires E, Verissimo P, Wlodawer A, Carrondo MA. **The glycosylation of the aspartic proteinases from barley (*Hordeum vulgare* L.) and cardoon (*Cynara cardunculus* L.).** Eur J Biochem 1997; 243: 695-700
- Cruz de Carvalho MH, d'Arcy-Lameta A, Roy-Macauley H, Gareil M, El Maarouf H, Pham-Thi A-T, Zuily-Fodil Y A. **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 Lett 2001; 492: 242-246

- Cruz de Carvalho M, Pham-Thi A, Gareil M, Arcy-Lameta A, Zuily Fodil Y. **Isolation and characterization of an aspartic proteinase gene from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp).** J Plant Physiol 2004; 161: 971-976
- Curi GC, Chan RL, Gonzalez DH. **The leader intron of *Arabidopsis thaliana* genes encoding cytochrome C oxidase subunit 5c promotes high-level expression by increasing transcript abundance and translation efficiency.** J Exp Bot 2005; 56: 2563-2571
- Dean C, Favreau M, Bond-Nutter D, Bedbrook J, Dunsmuir P. **Sequences downstream of translation start regulate quantitative expression of two petunia rbcS genes.** Plant Cell 1989; 1: 201-208
- D'Hondt K, Stack S, Gutteridge S, Vanderkechove J, Krebbers E, Gal S: **Aspartic proteinase genes in the Brassicaceae *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*.** Plant Mol Biol 1997, **33**: 187-192
- D'Hondt, Bosch D, Van Damme J, Goethals M, Vandekerckhove J, Krebbers E. **An aspartic proteinase present in seeds cleaves *Arabidopsis* 2S albumin precursors in vitro.** J Biol Chem 1993; 268: 20884-20891
- Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM. **Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings.** Plant Physiol 1998; 116: 1351-1357
- Davies DR. **The structure and function of the aspartic proteinases.** Ann Rev Biophys Chem 1990; 19: 189-215
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. **A plant DNA miniprep: version II.** Plant Mol Biol Rep 1983; 1: 19-21
- Doi E, Shibata D, Matoba T, Yonezawa D. **Characterization of pepstatin-sensitive acid protease in resting rice seeds.** Agric Biol Chem 1980, 44; 741-747
- Domingos A, Cardoso PC, Xue Z, Clemente A, Brodelius PE, Pais MS. **Purification, cloning and proteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitropa*.** Eur J Biochem. 2000; 267: 6824-6831

- Doyle JJ and Doyle JL. **A rapid RNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue.** Phytochem Bull 1987; 19: 11-15
- Duarte A, Pereira A, Cabrita A, Moir A, Pires E, Barros M. **The characterization of the collagenolytic activity of cardosin A demonstrates its potential application for extracellular matrix degradative processes.** Current Drug Discovery Technologies 2005; 2: 37-44
- Duffus CM & Cocharane MP. **Grain structure and composition.** In: Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology, Shewry, P.R., ed, C.A.B. International, Wellingford UK 1992; 291-317
- Dunaevsky YE, Sarbakanova ST, Belozersky MA. **Wheat seed carboxypeptidase and joint action on gliadin of proteases from dry and germinating seeds.** J Exp Bot 1989; 40: 1323-1325
- Dunaevsky YE, Belozersky MA, Voskoynikova NE. ***In vitro* reconstruction of the proteolytic system responsible for hydrolysis of the 13S globulin in buckwheat seeds.** FEBS Lett 1993; 324: 216-218
- Dunn BM. **Structure and mechanism of the Pepsin-like family of aspartic peptidases.** Chem Rev 2002; 102: 4431-4458
- Egas C, Lavoura N, Resende R, Brito RM, Pires E, de Lima, MC, Faro C. **The saposin-like domain of the plant aspartic proteinase precursor is a potent inducer of vesicle leakage.** J Biol Chem 2000; 275: 38190-38196
- Elpidina EN, Dunaevsky YE, Belozersky MA. **Protein bodies from buckwheat seeds.** J Exp Bot. 1990; 41: 969-977
- Faro C and Gal S: **Aspartic proteinase content of the Arabidopsis Genome.** Current Prot and Pept Sci 2005; 6: 493-500
- Faro C, Ramalho-Santos M, Vieira M, Mendes A, Simoes I, Andrade R, Verissimo P, Lin X, Tang J, Pires E. **Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase.** J Biol Chem 1999; 274: 28724-28729

- Faro C, Verissimo P, Lin Y, Tang J, Pires E. **Cardosin A and B, aspartic proteases from the flowers of cardoon.** *Adv Exp Med Biol* 1995; 362: 373-377
- Frázao C, Bento I, Costa J, Soares CM, Verissimo P, Faro C, Pires E, Cooper J, Carrondo MA. **Crystal structure of cardosyn A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp-containing aspartic proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus* L.** *J Biol Chem* 1999; 274: 27694-27701
- Fruton JS. **A history of pepsin and related enzymes.** *Q Rev Biol* 2002; 77: 127-147
- Fu H, Kim SY, Park WD. **High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus 4* sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequence and leader intron.**
- García-Lorenzo M, Sjödin A, Jansson S, Funk C. **Protease gene families in *Populus* and *Arabidopsis*.** *BMC Plant Biol* 2006; 6: 30
- Glathe S, Kervinen J, Nimtz M, Li GH, Tobin GJ, Copeland TD, Ashfort DA, Wlodawer A, Costa J. **Transport and activation of the vacuolar aspartic proteinase phytepsin in barley (*Hordeum vulgare* L.).** *J Biol Chem* 1998; 273: 31230-31236
- Glickman JN & Kornfeld S. **Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts.** *J Cell Biol* 1993; 123: 99-108
- Gottlieb LD & Ford VS. **The 5' leader of plant *PgiC* has an intron: the leader intron shows both the loss and maintenance of constraints compared with introns and exons in the coding region.** *Mol Biol Evol* 2002; 19: 1613-1623
- Gruis DF, Selinger DA, Curran JM, Jung R. **Redundant proteolytic mechanisms process seed storage proteins in the absence of seed-type members of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases.** *Plant Cell* 2002; 14: 2863-2882
- Guilloteau M, Laloi M, Michaux S, Bucheli P, McCarthy J. **Identification and characterization of the major aspartic proteinase activity in *Theobroma cacao* seeds.** *J Sci Food Agric* 2005; 85: 549-562

- Guruprasard K, Törmäkangas K, Kervinen J, Blundell TL. **Comparative modeling of barley aspartic proteinase: a structural rationale for observed hydrolytic specificity.** FEBS Lett 1994; 352: 131-136
- Grassmann W & Dyckerhoff H. **Über die Proteinase und die Polypeptidase der Hefe. 13. Abhandlung über Pflanzenproteasen in der von R. Willstätter und Mitarbeitern begonnenen Untersuchungsreihe.** Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem 1928; 179: 41-78.
- Hansen JD & Hannapel DJ. **A wound-inducible potato proteinase inhibitor gene expressed in non-tuber-bearing species is not sucrose inducible.** Plant Physiol 1992; 100: 164-169
- Hanahan D. **Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.** J Mol Biol 1983; 166: 557-580
- Heimgartner U, Pietrzak M, Geertsen R, Brodelius P, da Silva Figueiredo AC, Pais M.S. **Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*.** Phytochemistry 1990; 29:1405-1410
- Heing B, Ugrinovic K, Sustar-Vozlic J, Kidric M. **Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L., cultivars differing in sensitivity.** J Plant Physiol 2004; 519-530
- Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. **An aspartic endopeptidase is involved in the breakdown of propeptides of storage proteins in protein-storage vacuoles of plants.** Eur J Biochem 1997; 246: 133-141
- Hirao T, Imai S, Sawada H, Shiomi N, Hachimura S, Kato H. **PCR method for detecting trace amounts of buckwheat (*Fagopyrum* spp.) in food.** Biosci Biotechnol Biochem 2005; 69: 724-731
- Hooper NM. **Families of zinc metalloproteases.** Febs Lett 1994; 354: 1-6
- Hong X, Scofield DG, Lynch M. **Intron size, abundance and distribution within untranslated regions of genes.** Mol Biol Evol 2006; 23: 2392-2404

- Horne DS. **Casein interactions: casting light on the Black Boxes, the structure in dairy products.** *Int Dairy J* 1998; 8: 171-177
- Huber R. & Bode W. **Structural basis of the activation and action of trypsin.** *Acc Chem Res* 1978; 11: 114-122
- Huffaker RC. **Proteolytic activity during senescence of plants.** *New Phytol* 1990; 116: 199-231
- Inagami T. **Activation of peripheral blood neutrophils.** *J Hypertension* 1989; Suppl 2: S3-S8
- Irigoyen A, Izeo JM, Ibañez FC, Torre P. **Influence of rennet milk-clotting activity on the proteolytic and sensory characteristics of an ovine cheese.** *Food Chem* 2001; 72: 137-144
- James MNG & Sielecki AP. **Molecular-structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution.** *Nature* 1986; 319: 33-38
- Javornik B. **Studies on protein fractions and protein quality of buckwheat.** *Genetica* 1981; 13: 115-121
- Kervinen J, Kontturi M, Mikola J. **Changes in the proteinase composition of barley leaves during senescence in field conditions.** *Cereal Res Comm* 1990; 18: 191-197
- Kervinen J, Sarkkinen N, Kalkkinen N, Mikola L, Saarna M. **Hydrolytic specificity of the barley grain aspartic proteinase.** *Phytochemistry* 1993; 31: 799-803
- Kervinen J, Törmäkangas K, Runeberg-Roos P, Guruprasad K, Blundell T, Teeri TH. **Structure and possible function of aspartic proteinases in barley and other plants.** *Adv Med Biol* 1995; 362: 241-254
- Kervinen J, Tobi GJ, Costa J, Waugh DS, Wlodawer A, Zdanov A. **Crystal structure of plant aspartic proteinase prophytepsin: inactivation and vacuolar targeting.** *EMBO J* 1999; 18: 3947-3955
- Kirchhoff PM, Biehl B, Crone G. **Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation.** *Food Chem* 1989; 31: 295-298

- Kreft S, Strukelj B, Gaberscik A, Kreft I. **Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and HPLC method.** J Exp Bot 2002; 53: 1801-1804
- Kurtz JW & Lee KY. **NMR structure of lung surfactant peptide SP-B 11-25.** Biochemistry 2000; 41: 9627-9636
- Kuwabara T & Suzuki K. **Reversible changes in conformation of the 23 kDa protein of photosystem II and their relationships to the susceptibility of the protein to a proteinase from photosystem II membranes.** Plant Cell Physiol 1995; 36: 495-504
- Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 1970; 227: 680-685
- Lee D & Ryle AP. **Pepsinogen D. A fourth proteolytic zymogen from the pig gastric mucosa.** Biochem J 1967; 104: 735-741
- Liepinsh, E., Andersson, M., Ruyschaert, J.M, Otting, G. **Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin.** Nat Struct Biol 1997; 4: 793-795
- Lindholm P, Kuittinen T, Sorri O, Guo D, Merits A, Törmäkangas K, Runenberg-Roos P. **Glycosylation of phytepsin and expression of dad1, dad2 and ost1 during onset of cell death in germinating barley scutella.** Mech Dev 2000; 93: 169-173
- Lombardi L, Casani S, Ceccarelli N, Galleschi L., Picciarelli P, Lorenzi R. **Programmed cell death of the nucellus during *Secchium edule* Sw. seed development is associated with activation of caspase-like proteases.** J Exp Bot 2007; 58: 2949-2958
- Lopes, A, Teixeira G, Liberato MC, Pais MS, Clemente A. **New vegetal sources for milk clotting enzymes.** J Mol Catal 1997; 5:63-68
- Lucey JA. **Formation and physical properties of milk protein gels.** J Dairy Sci 2002; 85: 281-286
- Maganja DB, Strukelj B, Pungercar J, Gubensek F, Turk V, Kregar I. **Isolation and sequence analysis of the genomic DNA fragment encoding an aspartic**

- proteinase inhibitor homologue from potato (*Solanum tuberosum* L.)** Plant Mol Biol 1992; 20: 311-313
- Maksimović V, Varkonji-Gasić E, Radović S, Savić A. **The biosynthesis of 13S buckwheat seed storage protein.** J Plant Physiol 1996; 147: 759-761
- Malmy J, Carr JP, Klessing DF, Raskin I. **Salicylic acid: a likely endogenous signal in resistance response of tobacco viral infection.** Science 1990; 250: 1002-1004
- Mares M, Meloun B, Pavlik M, Kostka V, Baudys M. **Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family.** FEBS Lett 1989; 251: 94-98
- Martilla S, Jones BL, Mikkonen A. **Differential localization of two acid proteinases in germinating barley (*Hordeum vulgare*) seed.** Physiol.Plant 1995; 93: 317-327
- Matrisan LM. **The matrix-degrading metalloproteases.** Bioessays 1992; 14: 455-463
- Mikkonen A. **Activities of some peptidases and proteinases in germinating kidney bean.** Physiol Plant 1986; 68: 282
- Mikola J, Nummi M, Enari TM. **Effects of standing on protein extracts of barley grains.** Nature 1962; 195: 808-811
- Milisavljevic M, Timotijevic G, Radovic S, Brkljacic J Konstantinovic M, Maksimovic V. **Vicilin-like storage globulin from buckwheat seeds.** J. Agric. Food Chem. 2004; 195: 808-811
- Milisavljevic M, Konstantinovic M, Brkljacic J, Maksimovic V. **Isolation and computer analysis of the 5'-regulatory region of the seed storage protein gene from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench).** J. Agric. Food Chem. 2005 53: 2076-2080
- Milisavljević M, Timotijević G, Radović S, Konstantinović M, Maksimović V. **Two types of aspartic proteinases from buckwheat seed – Gene structure and expression analysis.** J Plant Physiol 2008; 165: 983-990

- Morris PC, Miller RC, Bowles DJ. **Endopeptidase activity in dry harvest-ripe wheat and barley grains.** Plant Sci 1985; 39: 121-124
- Murakami S, Kondo Y, Nakano T, Sato F. **Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells.** FEBS Lett 2000; 468: 15-18
- Mutlu A & Gal S. **Plant aspartic proteinase: enzymes on the way to a function.** Physiol Plant 199; 105:569-576
- Mutlu A, Pfeil JE, Gal S. **A probarley lecithin processing enzyme purified from Arabidopsis thaliana seeds.** Phytochemistry 1998; 47: 1453-1459
- Murashige T & Skoog F. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** Physiol Plant 1962; 15: 473-497
- Nakano T, Murakami S, Shoji T, Yoshida S, Yamada Y, Sato F. **A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleoids.** Plant Cell 1997; 9: 1673-1682
- Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L, Evers D. **Housekeeping gene selection for real-time PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress.** J Exp Bot 2005; 56: 2907-2914
- Ohashi Y & Ohshima M. **Stress-induced expression of genes for pathogenesis-related protein in plants.** Plant Cell Physiol 1992; 33: 819-826
- Panavas T, Pikula A, Reid PD, Rubinstein B, Walker EI. **Identification of senescence-associated genes from daylily petals.** Plant Mol Biol 1999; 40: 237-248
- Paris N, Stanley CM, Jones RL, Rogers JC. **Plant cells contain two functionally distinguished vacuolar compartments.** Cell 1996; 85 563-572
- Park H, Kusakabe I, Sakakibara Y, Kobayashi H. **Autoproteolytic processing of aspartic proteinase from sunflower seeds.** Biosci. Biotechnol. Biochem 2001; 65: 702-705
- Patel S & Latterich M. **The AAA team: related ATPases with diverse functions.** Trends Cell Biol 1998; 8: 65-67

- Pearl LH & Taylor WR. **A structural model for retroviral proteases.** Nature 1987; 329: 351-354
- Pena L, Tomaro M, Gallego S. **Effect of different metals on protease activity in sunflower cotyledons.** Electronic Journal of Biotechnology 2006; 9
- Pimentel C, Van Der Straeten D, Pires E, Faro C, Rodrigues-Pousada C. **Characterization and expression analysis of the aspartic protease gene family of *Cynara cardunculus* L.** FEBS J 2007; 274: 2523-2539
- Polanowski A, Wilusz T, Kolaczowska M, Wieczorek M, Wilimowska-Pelc A, Kuczek M. **Purification and characterization of aspartic proteases from *Cucumis sativus* and *Cucurbita maxima* seeds.** Aspartic proteinases and their inhibitors, Walter de Gruyter, New York 1985; 49-52
- Polgár L. **The catalytic triade of serine peptidases.** Cell Mol Life Sci 2005; 62: 2161-2172
- Pomeranz Y. **Aminoacid composition of buckwheat.** J Agric Food Chem 1972; 20: 270-274
- Ponting CP and Russell RB. **Saposins: circular permutations within genes encoding saposin homologues.** Trends Biochem Sci 1995; 20: 179-180
- Puente XS, Sanchez LM, Overall, CM, Lopez-Otin C. **Human and mouse proteases: comparative genomic approach.** Nat Rev Genet 2003; 4: 544-558
- Radlowski M, Kalinowski A, Adamczyk J, Krolkowski Z, Bartkowiak S. **Proteolytic activity in the maize pollen wall.** Physiol Plant 1996; 98: 172-178
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. **Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR.** Biochem Biophys Res Comm 2004; 313: 856-862
- Radović S, Maksimović V, Varkonji-Gasić E. **Characterization of buckwheat seed proteins.** J Agric Food Chem 1996; 44: 972-975

- Ramalho-Santos M, Verissimo P, Faro CJ, Pires E. **Action of bovine alpha s1-casein of cardosins A and B, aspartic proteinase from the flowers of the cardoon *Cynara cardunculus* L.** *Biochim Biophys Acta* 1996; 1297: 83-89
- Ramalho-Santos M, Pissara J, Verissimo P, Pereira S, Salema R, Pires E, Faro C. **Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L.** *Planta* 1997; 203: 204-212
- Ramalho-Santos M, Verissimo P, Cortes L, Samyn B, Van Beeumen J, Pires E, Faro C. **Identification and proteolytic processing of procardosin A.** *Eur J Biochem* 1998; 255: 133-138
- Ramos OHP & Selistre-de-Araujo. **Identification of metalloprotease gene families in sugarcane.** *Genet Mol Biol* 2001; 24: 1415-1421
- Rao JK, Erickson JW, Wlodawer A. **Structural and evolutionary relationship between retroviral and eukaryotic aspartic proteinases.** *Biochemistry* 1991; 30: 4663-4671
- Rawlings ND & Barret AJ. **Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism.** *Met Enzymol* 1995; 248: 105-120
- Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. **MEROPS: the peptidase database.** *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 160-164
- Rethmeir N, Seurinck J, Van Montagu M, Cornelissen M. **Intron-mediated enhancement of transgene expression in maize is a nuclear, gene-dependent process.** *The Plant J* 1997; 12: 895-899
- Roa I, Lopes MB, Mendiola FJ. **Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese.** *Food Res Int* 1999; 32: 413-419
- Rodrigo I, Vera P, Conejero V. **Degradation of tomato pathogenesis-related proteins.** *Plant Physiol* 1989; 184: 663-669
- Rodrigo I, Vera P, VanLoon LC, Conejero V. **Degradation of tobacco pathogenesis-related proteins.** *Plant Physiol* 1991; 95: 616-622
- Rowan AD. **The cysteine proteinases of the pineapple.** *Biochem J* 1990; 56: 249-253

- Runeberg-Roos P, Törmäkangas K, Ostman A. **Primary structure of a barley-grain aspartic proteinase. A plant aspartic proteinase resembling mammalian cathepsin D.** Eur J Biochem 1991; 202: 1021-1027
- Runeberg-Roos P, Kervinen J, Kovaleva V, Raikhel NV, Gal, S. **The aspartic proteinase of barley is a vacuolar enzyme that processes probarley lecitin *in vitro*.** Plant Physiol 1994; 105: 321-329
- Runeberg-Roos and Saarma. **Phytpsin, a barley vacular aspartic proteinase, is highly expressed during autolysis of developing tracheary elements and sieve cells.** Plant J 1998; 15: 139-145
- Salmia MA. **Proteinase activities in resting and germinating seeds of Scots pine, *Pinus sylvestris*.** Physiol.Plant. 1981; 53: 39-47
- Samardžić J, Milisavljević M, Brkljačić J, Konstantinović M, Maksimović V. **Characterization and evolutionary relationship of methionine-rich legumin-like protein from buckwheat.** Plant Physiol Biochem 2004; 42: 157-163
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Molecular cloning. A laboratory manual (second edition).** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Sarkkinen P, Kalkkinen N, Tilgman C, Siuro J, Kervinen J, Mikola L. **Aspartic proteinase from barley grains is related to mammalian lysosomal cathepsin D.** Planta 1992; 186: 317-323
- Schaller A & Ryan CA. **Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein.** Plant Mol Biol, 1996; 31: 1073-1077
- Schaller A. **A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases.** Planta 2004; 220: 183-197
- Schuette CG, Pierstorff B, Huettler S, Sandhoff K. **Sphingolipid activator proteins: proteins with complex functions in lipid degradation and skin biogenesis.** Glycobiology 2001; 11: 81R-90R

- Seelmeir S, Schmidt H, Turk V, von der Helm K. **Human immunodeficiency virus has an aspartic-type protease that can be inhibited by pepstatin A.** Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85: 6612-6616
- Seemüller E, Lupas A, Stock D, Löwe J, Huber R, Baumeister W. **The proteasome from *Thermoplasma acidophilum* is a threonine protease.** Science 1995; 268: 579-582
- Seife C. **Blunting nature's Swiss army knife.** Science 1997; 277: 1602-1603
- Shah Y and Klessing DF. **Salicylic acid: signal perception and transduction.** In: Hooykaas PJJ, Hall MA and Libbenga KR, Editors, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones, Elsevier Science, Amsterdam 1999: 513-541
- Simões I & Faro C. **Structure and function of plant aspartic proteinases.** Eur J Biochem 2004; 271: 2067-2075
- Simões I, Mueller E-C, Otto A, Bur D, Cheung AY, Faro C, Pires E. **Molecular analysis of the interaction between cardosin A and phospholipase D α .** FEBS J 2005; 272: 5786-5798
- Sims HA, Dunn-Coleman SN, Robson GD, Oliver GS. **Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi.** FEMS Microbiol 2004; 239: 95-101.
- Singh K, Raizada J, Bhardway, Ghawana S, Rani A, Singh H, Kaul K, Kumar S. **26S rRNA-based internal control gene primer pair for reverse transcription-polymerase chain reaction-based quantitative expression studies in diverse plant species.** An Biochem 2004; 335: 330-333
- Stachowiak D, Wilimowska-Pelc A, Kolaczowska M, Polanowski A, Wilusz T, Larsen L.B. **Aspartic proteinase from the seeds figleaf gourd (*Cucurbita ficifolia*).** Acta Biochem.Polonica 1994; 41: 181-182
- Steppek G, Behnke J, Buttle D, Duce I. **Natural plant cysteine proteinases as althelminctics.** TRENDS Parasit 2004; 20: 322-327
- Suzuki T, Honda Y, Mukasa Y. **Effects of UV-B radiation, cold and desiccation stress on rutin concentration and rutin glucosidase activity in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) leaves.** Plant Sci 2005; 168: 1303-1307

- Takahashi W, Oishi H, Ikeda S, Takamizo T, Komatsu T. **Molecular cloning and expression analysis of the replacement histone H3 gene of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*).** J Plant Physiol 2006; 163: 58-68
- Tang J & Wong RNS. **Evolution in the structure and function of aspartic proteases.** J Cell Biochem 1987; 33: 53-63
- Taylor B & Powell A. **Isolation of plant DNA and RNA.** Focus 1982; 4: 4-6
- Timotijević G, Radović S, Maksimović V. **Characterization of an aspartic proteinase activity in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds.** J Agric Food Chem 2003; 51: 2100-2104
- Timotijević G, Milisavljević M, Radović S, Konstantinović M, Maksimović V. **Ubiquitous aspartic proteinase as an actor in the stress response in buckwheat** J Plant Physiol 2009; in press
- Tökés YA, Woon WC, Chambers SM. **Digestive enzymes secreted by the carnivorous plant *Nephes macferlanei* L.** Planta 1974; 119: 39
- Törmäkangas K, Kervinen J, Östman A, Teeri TH. **Tissue-specific localization of aspartic proteinase in developing and germinating barley grains.** Planta 1994; 195: 116-125
- Törmäkangas K, Hadlington JL, Pimpl P, Hilmmer S, Brandizzi F, Teeri TH, Denecke J. **A vacuolar sortin domain may also influence the way in which proteins leave endoplasmatic reticulum.** Plant Cell 2001; 13: 2021-2032
- Tripathi LP & Sowdhamini R. **Cross genome comparisons of serine proteases in Arabidopsis and rice.** BMC Genomics 2006; 7: 200
- Turk B, Turk D, Turk V. **Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers.** Biochim Biophys Acta 2000; 1477: 98-111
- Vaccaro AM, Salvioli R, Tatti M, Ciaffoni F. **Sapogenins and their interaction with lipids.** Neurochem Res 1999; 24: 307-314

- Verissimo P, Faro C, Moir AJG, Lin Z, Tang J, Pires E. **Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L.** Eur J Biochem 1996; 235: 762-768
- Vetvicka V & Fusek M. **Activation of peripheral blood neutrophils and lymphocytes by human procathepsin D and insulin-like growth factor II.** Cell Immunol 1994; 156: 332-341
- Vieira M, Pissar J, Verissimo P, Castanheira P, Costa Y, Pires E, Faro C. **Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L.** Plant Mol Biol 2001; 45: 529-539
- Visser S, Slangen CJ, van Rooijen PJ. **Peptide substrates for chymosin (rennin). Interaction sites in κ -casein-related sequences located outside in the (103-108)-hexapeptide region that fits into the enzymes active-site cleft.** Biochem J 1987; 244: 553-558
- Voigh G, Biehl B, Heinrichs H, Kamaruddin S, Marsoner GM, Hugi A. **In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxylpeptidase.** Food Chem 1994; 49: 173
- Voigh G, Biehl B, Heinrichs H, Voigt J. **Aspartic proteinase levels in seeds of different angiosperm.** Phytochemistry, 1997; 44: 389-392
- Voigh G, Kamaruddin S, Heinrichs H, Wrann D, Senyuk V, Biehl B. **Developmental stage-dependent variation of the levels of globular storage protein and aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L.** Plant Mol Biol 2001; 45: 529-539
- Wen P-F, Chen J-Y, Kong W-F, Pan Q-H, Wan S-B, Huang W-D. **Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry.** Plant Sci 2005; 169: 928-934

- White PC, Cordeiro MC, Arnold D, Brodelius PE, Kay J. **Processing, activity and inhibition of recombinant cyprosin, an aspartic proteinase from cardoon (*Cynara cardunculus*).** J Biol Chem **1999**; 274: 16685-16693
- Wrobel R & Jones BL. **Appearance of endoproteolytic enzymes during the germination of barley.** Plant Physiol 1992; 100: 1508-1516
- Wlodawer R. **Proteasome: a complex protease with a new fold and a distinct mechanism.** Structure 1995; 3: 417-420
- Yalpany N, León J, Lawton MA, Raskin I. **Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco.** Plant Physiol 1993; 103: 315-321
- Yousif B, McMahon D, Shammet K. **Milk-clotting enzyme from *Solanum dobium* plant.** Int Dairy J 1996; 6: 637-644
- Xia Y, Suzuki H, Borevitz J, Blount J, Guo Z, Patel K, Dixon RA, Lamb C. **An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling.** Embo J 2004; 23: 980-988
- Zhang N & Jones BL. **Development of proteolytic activities during barley malting and their localization in the green malt kernel.** J Cereal Sci 1995; 22: 147-155





РД 20606



300160022

COBISS •