

Univerzitet u Beogradu  
Biološki fakultet

Doktorska disertacija

ANALIZA EKSPRESIJE, AKTIVNOSTI  
I LOKALIZACIJE FeAPLI - NOVOG TIPIA  
ASPARTIČNE PROTEINAZE HELJDE  
-*Fagopyrum esculentum* Moench-

mr Mira Milisavljević

Beograd, 2009.





Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

Prvo bih želela da se zahvalim dr Vesni Maksimović, rukovodiocu naše laboratorije, na razumevanju, podršci i ohrabrivanju koje mi je uvek pružala kada sam nailazila na probleme tokom rada.

Profesorki Svetlani Radović se zahvaljujem na podršci i što je uvek bila spremna za diskusije i rešavanje teorijskih i praktičnih problema i što uvek deli svoje veliko „biljno“ znanje sa nama. Takođe, hvala joj na podršci i na velikom angažmanu u posredovanju na raznim većima.

Dr Đorđu Firi se zahvaljujem što je pristao da kao član komisije učestvuje u kritičkoj oceni ovog rada.

Celoj ekipi Laba 08, sa kojom je uvek prijatno provoditi vreme, hvala što su uvek uz mene i spremni u svakom trenutku da mi se nađu. Miletu hvala na tehničkoj podršci i vedrom duhu koji unosi u lab.

Sneži, Kušić, Aci, Danijeli i ostalim kolegama, hvala na pomoći.

Mojoj porodici hvala na ljubavi, strpljenju, poverenju i podršci koje mi pružaju, a za koje nemam dovoljno pravih reči da izrazim svoju zahvalnost.



# APSTRAKT

Iz biblioteke cDNK semena heljde u srednjoj fazi sazrevanja prethodno je izolovana cDNK koja kodira atipičnu aspartičnu proteinazu (FeAPL1), a zatim i odgovarajući genomski fragment koji, osim kodirajuće sekvence, sadrži i 5'-regulatorni region u kome su uočeni *cis*-elementi koji mogu učestvovati u regulaciji ekspresije ovog gena pod uticajem faktora spoljašnje sredine i opredeljavati njegovu seme-specifičnu ekspresiju.

U ovom radu urađena je detaljna analiza ekspresije gena FeAPL1 po organima heljde na nivou RNK upotrebom metoda RT-PCR i Real Time RT-PCR, a analizom Western blot na nivou proteina. Umnošci slabog intenziteta su uočeni u fazama sazrevanja semena do stadijuma 14 DAF, za kojima sledi naglo povećanje količine transkripta u stadijumu 14-17 DAF, nakon čega dolazi do smanjenja količine RNK. Profil ekspresije proteina prati profil ekspresije RNK. U listu, korenu, stablu i cvetu uočene su male količine transkripta, ali odgovarajući protein nije bio prisutan.

Kako je kompjuterskom analizom predikivano više *cis*-aktivirajućih elemenata u promotorskom regionu gena za FeAPL1, njegova ekspresija je praćena i pod uticajem stresogenih faktora spoljašnje sredine (UV zračenje, mrak, mehanička povreda, suša, salicilna kiselina), ali značajne promene u ekspresiji nisu oučene ni u jednom ispitivanom slučaju.

U cilju dobijanja proteina u količini pogodnoj za biohemijsku analizu i produkciju antitela, korišćeno je nekoliko ekspresionih sistema: *E. coli*, *P. pastoris* i kultura insekatskih ćelija. Zadovoljavajuća ekspresija dobijena je jedino pri upotrebi konstrukta rMBP-FeAPL1 u soju Rosetta-gami *E. coli* u kome je dobijen solubilisan rekombinantni fuzioni proteina koji, nakon proteolitičke obrade, poseduje enzimsku aktivnost na pH 3,0, inhibiranu pepstatinom A.

Rekombinantni protein, rFeAPL1-His<sub>6</sub>, od ~55 kDa, je eksprimiran u ćelijskoj liniji duvana BY-2 u kome je detektovana pepstatin A senzitivna enzimska aktivnost na pH 3,0 bez prethodne proteolitičke obrade. Veća molekulska masa u odnosu na predikovanu (46 kDa) ukazuje na verovatnu glikozilaciju proteina. Imunocitohemijskom analizom i analizom proteina protoplasta transformisanih BY-2 ćelija je utvrđeno da je FeAPL1 lokalizovan u ćelijskom zidu. Na osnovu dobijenih rezultata diskutovane su potencijalne funkcije proteinaze FeAPL1.

# ABSTRACT

Aspartic proteinase gene (*FeAPL1*) was isolated previously from cDNA library of developing buckwheat seed. Corresponding genome fragment comprised of coding sequence and 5'-regulatory region with *cis*-acting elements involved in seed-specific expression and in regulation of gene expression under different environmental conditions.

Herein, detailed analysis of gene and protein expression was investigated using RT-PCR, Real Time RT-PCR and Western blot analysis. RNA and protein were expressed at low level in early stages of seed development (<14 DAF), reached peak at 14-17 DAF stage and decreased in later developmental phases. Weak expression was also detected in leaf, root, shoot and flower, but protein was completely absent.

Since the presence of *cis*-acting elements was predicted in promoter region, *FeAPL1* gene expression in leaves was monitored after exposure of buckwheat to different stress conditions (UV light, dark, mechanical injury, drought, salicylic acid) but no change in expression level could be observed.

In order to get amount of purified protein suitable for biochemical characterization and antibodies production, recombinant *FeAPL1* was produced in several expression systems: *E. coli*, *P. pastoris* and insect cell culture. Soluble recombinant fusion protein, rMBP-*FeAPL1*, was produced in Rosetta-gami strain of *E. coli*. After proteolytic processing, recombinant protein gained activity at pH 3.0 which was inhibited by protease inhibitor pepstatin A.

r*FeAPL1*-His<sub>6</sub> protein of approximately 55 kDa in size was overexpressed in tobacco BY-2 cell line. Experimentally determined size greater than calculated from its open reading frame (46 kDa) indicated that the *FeAPL1* was glycosylated. r*FeAPL1*-His<sub>6</sub> exhibited pepstatin A-sensitive enzymatic activity at pH 3.0 without previous proteolytic processing. Immunocytochemistry and protein analysis of protoplast of transformed BY-2 cells showed extracellular localization of r*FeAPL1*-His<sub>6</sub>, in cell wall. According to obtained results, potential functions of *FeAPL1* have been discussed.

# SKRAĆENICE

ABA	abscisinska kiselina
ABRE	ABA-responsive element (element koji učestvuje u odgovoru na ABA)
ak	aminokiselina
AP	aspartična proteinaza
APL	AP-like, atipična , novi tip aspartičnih proteinaza, aspartična proteinaza
bp	bazni par
BSA	bovine serum albumin (albumin goveđeg seruma)
cDNK	komplementarna DNK
CDR1	constitutive disease resistance
CND41	chloroplast nucleoid DNA binding protein
DAF	(days after flowering)- dani nakon cvetanja
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
Dof	DNA binding with one finger (DNK-vezivni domen koji sadrži jedan "cinkani prstić")
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
ERE	ethylene response element= GCC blok (element koji učestvuje u odgovoru na etilen)
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
His <sub>6</sub>	polihistidinski tag
GRAS	generally regarded as safe
HvAP	aspartična proteinaza ječma ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)
IPTG	izopropiltio-β-D-galaktozid
iRNK	informaciona RNK
kDa	kilodalton
MBP	maltose binding protein
OsAsp1	atipična aspartična proteinaza iz pirinča ( <i>Oryza sativa</i> )
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction (reakcija lančanog umnožavanja segmenata DNK)
PRO	propeptid

---

PRP	pathogenesis-related protein (protein vezan za patogenezu)
PSI	plant specific insert
PMSF	phenylmethanesulphonyl fluoride
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RE	restrikcioni enzim
rRNK	ribozomalna RNK
RP	rezervni protein
RT	reverzna transkripcija
SDS	natrijum dodecil sulfat
SFM	serum free medium
SEF	soybean embryo factor
SP	signalni peptid
Tris	tris (hidroksimetil) aminometan
tRNK	transportna RNK
UTR	untranslated region (netranslirajući region)
<i>wt</i>	wild-type

# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>I</b>
1.1	ASPARTIČNE PROTEINAZE .....	1
1.2	BILJNE ASPARTIČNE PROTEINAZE .....	3
1.2.1	Ime i istorija .....	3
1.2.2	Primarna struktura .....	4
1.2.3	Trodimenzionalna struktura .....	7
1.2.4	Novi tip biljnih aspartičnih proteinaza (atipične aspartične proteinaze) .....	8
1.2.5	Distribucija u tkivima i organima .....	12
1.2.6	Funkcija .....	13
1.3	HELJDA .....	15
1.3.1	Aspartične proteinaze heljde .....	16
1.3.1.1	FeAPL1 .....	18
1.4	EKSPRESIONI SISTEMI .....	21
1.5	BY-2 ĆELIJSKA LINIJA .....	25
<b>2</b>	<b>CILJ</b> .....	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>28</b>
3.1	OSNOVNE PROCEDURE RADA SA DNK .....	28
3.1.1	Izolovanje genomske DNK iz BY-2 ćelija .....	28
3.1.2	Izolovanje plazmida iz bakterija .....	28
3.1.3	Izolovanje rekombinantnog bakmida iz E. coli DH10BAC soja .....	30
3.1.4	Elektroforeza DNK na gelu od agaroze .....	30
3.1.5	Prečišćavanje fragmenata DNK sa gela od agaroze .....	30
3.1.6	Prečišćavanje PCR produkata .....	31
3.1.7	Digestija DNK restrikcionim enzimima .....	31
3.1.8	Ligacija DNK sa plazmidnim vektorima .....	31
3.1.9	PCR .....	32
3.1.10	RT-PCR i Real Time RT PCR .....	33
3.1.11	Priprema ekspresionih konstrukata .....	34
3.1.12	Sekvenciranje DNK .....	38



---

3.2	OSNOVNE PROCEDURE RADA SA RNK .....	38
3.2.1	Izolovanje ukupne RNK iz biljnog materijala .....	38
3.2.2	Elektroforeza RNK na denaturišućem gelu od agaroze.....	39
3.3	OSNOVNE PROCEDURE RADA SA PROTEINIMA .....	40
3.3.1	Izolovanje ukupnih proteina iz biljnog materijala .....	40
3.3.2	Acetonska precipitacija.....	40
3.3.3	Određivanje koncentracije proteina.....	40
3.3.4	Elektroforeza proteina .....	40
3.3.5	„Western blot“ analiza.....	41
3.3.6	Proteinazni eseji u „rastvoru“ .....	42
3.3.7	Imunocitohemija.....	43
3.4	RAD SA BAKTERIJAMA .....	43
3.4.1	Bakterijski sojevi, vektori i medijumi .....	43
3.4.2	Uzgajanje i održavanje bakterija .....	44
3.4.3	Priprema kompetentnih bakterija za „Heat shock“ transformaciju .....	45
3.4.4	Priprema elektrokompetentnih bakterija <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	45
3.4.5	Transformacija <i>E. coli</i> toplotnim stresom („Heat shock“ transformacija) ....	45
3.4.6	Transformacija <i>A. tumefaciens</i> elektroporacijom .....	46
3.4.7	Ekspresija rekombinantne proteinaze FeAPL1 (rFeAPL1) u sojevima <i>E. coli</i>	46
3.4.7.1	Citoplazmatska ekspresija rFeAPL1 .....	46
3.4.7.2	Brza procedura za detekciju klonova koji proizvode rFeAPL1 .....	46
3.4.7.3	Optimizacija uslova ekspresije rFeAPL1 .....	47
3.4.7.4	Prečišćavanje u nativnim uslovima .....	48
3.4.7.5	Prečišćavanje u denaturišućim uslovima.....	48
3.4.8	Renaturacija strukture (“refolding”) rHis <sub>6</sub> -FeAPL1 .....	49
3.4.9	Periplazmatska ekspresija rFeAPL1 u <i>E. coli</i> .....	48
3.5	RAD SA KVASCEM <i>PICHA PASTORIS</i> .....	50
3.5.1	Uslovi gajenja i medijumi.....	50
3.5.2	Transformacija kvasca <i>P. pastoris</i> i indukcija ekspresije .....	51
3.6	RAD SA KULTUROM INSEKATSKIH ĆELIJA .....	52
3.6.1	Priprema konstrukta.....	52
3.6.2	Ekspresija rFeAPL1 u insekatskim ćelijama Sf9 .....	52

---

3.7	RAD SA BILJNIM MATERIJALOM .....	53
3.7.1	Biljni materijal.....	53
3.7.2	Stres tretmani heljde .....	54
3.7.3	Transformacija BY-2 ćelija .....	55
3.7.4	Pravljenje BY-2 protoplasta .....	56
3.7.5	Transformacija listova duvana.....	56
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>57</b>
4.1	ANALIZA EKSPRESIJE GENA ZA FEAPL1 U RAZLIČITIM ORGANIMA HELJDE .....	57
4.2	ANALIZA EKSPRESIJE GENA ZA FEAPL1 POD UTICAJEM STRESOGENIH FAKTORA ...	59
4.3	ANALIZA EKSPRESIJE PROTEINA FEAPL1 U RAZLIČITIM ORGANIMA HELJDE .....	60
4.4	PRODUKCIJA REKOMBINANTNOG FEAPL1 U HETEROLOGNIM SISTEMIMA (E. COLI , P. PASTORIS, INSEKATSKE ĆELIJE).....	61
4.4.1	Ekspresija rFeAPL1 u E. coli .....	61
4.4.1.1	Ekspresija rHis <sub>6</sub> -FeAPL1 .....	61
4.4.1.2	Ekspresija rMBP-FeAPL1 .....	63
4.4.1.3	Enzimaska aktivnost rMBP-FeAPL1 .....	64
4.4.2	Ekspresija rFeAPL1 u P. pastoris .....	66
4.4.3	Ekspresija rFeAPL1 u kulturi insekatskih ćelija .....	67
4.5	EKSPRESIJA RFEAPL1 U BILJNIM ĆELIJAMA .....	68
4.5.1	Enzimaska aktivnost rFeAPL1-His <sub>6</sub> .....	70
4.5.2	Ćelijska lokalizacija rFeAPL1-His <sub>6</sub> .....	72
<b>5</b>	<b>DISKUSIJA.....</b>	<b>75</b>
5.1	EKSPRESIJA RFEAPL1 U HETEROLOGNIM SISTEMIMA .....	75
5.2	EKSPRESIJA FEAPL1 U BILJKAMA .....	80
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>90</b>

# 1 UVOD

## 1.1 Aspartične proteinaze

Proteini su najraznovrsniji organski molekuli živih sistema, neophodni za sve aspekte njihovog funkcionisanja. Oni čine strukturne komponente, rezervne materije i deluju kao katalizatori biohemijskih reakcija-enzimi.

Enzimi označeni kao proteaze (peptidaze, proteinaze) katalizuju hidrolitičku razgradnju proteina uvođenjem molekula vode u peptidnu vezu. Proteolitička obrada peptidnih veza je jedna od najzastupljenijih i najvažnijih enzimskih modifikacija proteina. Ona omogućava selektivnu obradu prekursora u zrele proteine koji zauzimaju određenu konformaciju čime je omogućena njihova lokalizacija i specifična funkcija; degradaciju nepravilno foldovanih proteina; razgradnju proteina u toku normalnog ćelijskog ciklusa.

Proteaze se mogu klasifikovati na osnovu molekulske mase, naelektrisanja ili supstratne specifičnosti, ali je danas prihvaćena njihova klasifikacija na osnovu aminokiselina u aktivnom mestu, mehanizma proteolize i trodimenzionalne strukture. Četiri osnovne klase proteaza su: serinske, cisteinke, aspartične i metaloproteinaze.

Aspartične proteinaze (AP) su široko rasprostranjene među kičmenjacima, biljkama, nematodama, kvascima, bakterijama i virusima (Davies DR., 1990; Dunn BM., 2002). Prema bazi podataka MEROPS (<http://www.merops.ac.uk>), aspartične proteinaze su svrstane u 14 familija na osnovu homologije aminokiselinskih sekvenci. Većina biljnih AP je u okviru A1 familije zajedno sa pepsinu sličnim proteinazama iz drugih organizama. Sve do sada okarakterisane aspartične proteinaze iz familije A1 sadrže dve asparaginske kiseline u aktivnom mestu, aktivne su na kiselom pH, hidrolizuju peptidne veze između hidrofobnih aminokiselina, zauzimaju specifičnu dvodomensku trodimenzionalnu strukturu i specifično su inhibirane pepstatinom A (Rawlings & Barret, 1995).



Većina saznanja o ulozi aspartičnih proteinaza proističe iz studija na životinjskim i mikrobijalnim enzimima. Najbolje okarakterisani predstavnici AP iz familije A1 su pepsin, gastricin, renin, katepsini D i E, napsini, himozin, kvaščeva proteinaza A, kandidapepsini, koje imaju vrlo raznovrsne funkcije.

Napsini A i B su detektovani u plućima i bubrezima i visoko su eksprimirani kod bolesnika obolelih od adenokarcinoma.

Katepsin D je lizosomalna aspartična proteinaza uključena u proces programirane ćelijske smrti. Sintetiše se u normalnim i malignim ćelijama pod kontrolom steroidnih hormona i moguće je da učestvuje u razgradnji ekstracelularnog matriksa. Jedna od pretpostavljenih funkcija ovog enzima je sazrevanje i degradacija endometrijuma za vreme menstrualnog ciklusa. Zbog povećane ekspresije u malignim tkivima, katepsin D se koristi kao biološki marker za procenu odgovora na preoperativnu hemoterapiju različitih kancera. Katepsin E je endozomalna peptidaza koja je uključena u obradu antigena od strane MHC kompleksa antigen prezentirajućih ćelija.

Pepsin i himozin predstavljaju želudačne digestivne enzime, dok renin katalizuje prvi korak u formiranju angiotenzina II i tako učestvuje u regulaciji krvnog pritiska i balansa elektrolita u organizmu.

Kvaščeva proteinaza A je vakuolarna proteinaza neophodna za aktivaciju drugih vakuolarnih proenzima. Aspartične proteinaze roda *Candida* su glavni faktori patogeneze kod kandidaza (Monod *et al.*, 2002).

Takođe dobro okarakterisana aspartična proteinaza iz familije A2 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. Aktivan je na neutralnom pH i učestvuje u maturaciji humanog virusa imunodeficijencije sečenjem gag-pol poliproteina na osam mesta između hidrofobnih aminokiselina.

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  $\beta$  peptida, čiji agregati dovode do

Alchajmerove bolesti. Presenilin je ciljna proteinaza za dizajniranje različitih inhibitora u cilju lečenja ovog oboljenja (Dunn BM., 2002).

Većina aspartičnih proteinaza familije A1 se sintetiše kao prepropolipeptid, koji se zatim prevodi u aktivni protein, isecanjem signalnog peptida, a zatim i propeptida koji ima ulogu održavanja stabilnosti proenzima čime se zimogen prevodi u aktivnu formu. Asparaginske kiseline koje čine aktivno mesto, kao i okolne sekvence su visoko konzervirane. Enzimi poseduju dvodomensku strukturu, što ukazuje da su aspartične proteinaze verovatno nastale duplikacijom predačkog gena. Rekombinantni proteini, koji predstavljaju pojedinačne domene pepsina A, formiraju aktivne homodimere, imitirajući hipotetički predački protein (Lin *et al.*, 1992). 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, 1991).

## 1.2 Biljne aspartične proteinaze

### 1.2.1 Ime i istorija

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 Cinare (*Cynara cardunculus* L.) i ječma (*Hordeum vulgare* L.). Cvetovi Cinare 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 Cinare (Cordeiro *et al.*, 1992; Heimgartner *et al.*, 1990). Kasnije je ova grupa preimenovana u ciprozini 1, 2 i 3 (cyprosyl *od engl.* **cynara protease-syn**) i određena je njihova primarna struktura (Cordeiro *et al.*, 1994). Druga dva fitepsina, izolovana iz

cvetova Cinare i označena kao kardozin A i B, naknadno su intenzivnije proučavani (Barros & Malcata, 2002; 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-Roos *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-Roos *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 mikrobijalnim AP. Međutim, mnogi fitepsini sadrže dodatnu proteinsku sekvencu od oko 100 amino kiselina označenu kao PSI (**p**lant-specific **i**nsert), (Mutlu & Gal, 1999). Aminokiselinska sekvencu ovog domena nema homologiju sa sisarskim ili mikrobijalnim AP, tako da PSI predstavlja jedinstvenu strukturnu karakteristiku aspartičnih proteinaza.

## 1.2.2 Primarna struktura

Većina biljnih aspartičnih proteinaza se sintetiše kao jednolančani preproenzim koji se zatim proteolitički obrađuje do zrelog proteina koji može biti jedno ili dvolančani. Aminokiselinske sekvence izvedene iz nekoliko postojećih cDNK ukazuju da je primarna struktura prekursora veoma slična. Prekursor se sastoji iz hidrofobnog N-terminalnog **signalnog peptida** od oko 20 aminokiselina koji vodi polipeptid u lumen endoplazmatičnog retikuluma, **prosegmenta** od oko 40 aminokiselina i N- i C-**terminalnih domena** zrelog proteina rastavljenih insertom od oko 100 aminokiselina koji je nađen samo kod biljaka i zato nazvan **PSI** (od **P**lant **S**pecific **I**nsert). Kod nekoliko



izučениh zimogena, utvrđeno je da je prosegment uključen u inaktivaciju, pravilno foldovanje, stabilnost i intraćelijsku lokalizaciju. PSI segment ima strukturu sličnu sapozinima i njegova funkcija je još uvek nejasna (Chen *et al.*, 2002).

U ovu šemu se ne uklapa nekoliko novootkrivenih biljnih gena, koji ne poseduju PSI domen, a neki ni prosegment, te su stoga označene kao novi tip biljnih aspartičnih proteinaza ili atipične aspartične proteinaze (AP-like, APL), kako bi se razlikovale od tipičnih aspartičnih proteinaza. Do danas je okarakterisano nekoliko proteinaza ovog tipa, kao što su nucelin iz ječma (Chen & Foolad, 1997), CDR1 (constitutive disease resistance) iz *Arabidopsis* (Xia *et al.*, 2004), CND41 (chloroplast nucleoid DNA binding protein) iz duvana (Nakano *et al.*, 1997), aspartična proteaza 1 (OsAsp1) iz pirinča (Bi *et al.*, 2005), nepentesini I i II iz karnivore biljke *Nepenthes* (Athauda *et al.*, 2004) i FeAPL1 iz heljde (Milisavljević *et al.*, 2008).

Najveći stepen homologije između tipičnih AP je u okviru N- i C- terminalnih domena i iznosi prosečno oko 60%, dok sa katepsinom D imaju 45% homologije (Simoes & Faro, 2004).

U N- terminalnom domenu zrelog proteina nalaze se dve asparaginske kiseline u okviru konsenzus sekvenci DTG i DSG. Pored prisustva PSI sekvence, DSG je takođe specifičnost biljnih AP, jer se kod mikrobijalnih i sisarskih AP na oba mesta nalaze DTG sekvence. Jedino zelena alga *Chlamydomonas reinhardtii* ima DTG/DTG motiv. Kod nekih gljiva i protozoa asparaginske kiseline su u okviru DTG/DSG motiva (<http://www.merops.ac.uk>). Evolutivni i biološki značaj ove promene nije jasan.

PSI sekvenca ne pokazuje homologiju sa sisarskim i mikrobijalnim AP, ali je veoma slična sapozinima iz sisarskih ćelija (Guruprasad *et al.*, 1994). 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). Kao i svi članovi sapozinske familije, PSI sadrži šest konzerviranih cisteina, prolin i tirozin/fenilalanin ostatke i mesto za glikozilaciju. Trodimenzionalna struktura PSI domena ječamskog profitepsina pokazuje tipičnu kompaktnu globularnu strukturu sastavljenu od pet amfipatičnih  $\alpha$ -heliksa međusobno povezanih sa tri disulfidne veze (Kervinen *et al.*, 1999).

Jedna od pretpostavljenih funkcija PSI domena je da on predstavlja ciljni signal za vakuole. Naime, na osnovu kristalne strukture ječamskog fitepsina (Kervivnen *et al.*, 1999), identifikovano je moguće mesto za vezivanje za membranu u PSI regionu i susednim sekvencama zrelog proteina. Ovo mesto bi omogućilo kontakt fitepsina sa membranama kao i sa receptorima vezanim za membrane u Goldžijevom kompleksu. Tako 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). Ovi autori takođe ukazuju da ovaj domen može imati ulogu i u tome kako fitepsin napušta endoplazmatični retikulum.

PSI region može imati 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 uticaj PSI regiona na pravilnu obradu i pakovanje prekursorskog proteina. Ekspresija pirinčanog fitepsina, orizasinal, u *E. coli* sa ili bez PSI regiona nije imala efekta na enzimsku aktivnost procesovanog enzima. Međutim način obrade je izmenjen (Asakura *et al.*, 2000). Kada je fitepsin Cinare-cinaraza bila ekspimirana u *Pichia pastoris* bez PSI regiona, neobrađeni i pogrešno upakovani prekursorski protein je akumuliran ukazujući na ulogu PSI regiona u korektnom pakovanju i obradi enzima (White *et al.*, 1999).

Proteolitička obrada tipičnih biljnih aspartičnih proteinaza započinje kotranslacionim uklanjanjem signalnog peptida, za kojim slede isecanje prosegmenta i totalno ili parcijalno uklanjanje PSI inserta, što vodi formiranju zrelog enzima čija je domenska organizacija slična sisarskim i mikrobijalnim aspartičnim proteinazama. Ova selektivna proteoliza može biti autokatalitička i/ili uključivati dodatne proteaze (Khan *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 1999).

Aktivacija prokardozina A, tokom sazrevanja cveta, obuhvata isecanje kompletne PSI sekvence, nakon čega se iseca i prosegment. Ova autokatalitička konverzija u aktivnu formu se dešava unutar vakuola gde se protein i akumulira (Ramalho-Santos *et al.*, 1998). Sličan mehanizam je opisan i za rekombinantni protein orizasin 1, iz pirinča (Asakura *et al.*, 2000).

Profitepsin, iz korena ječma, se obrađuje u dve dvolančane forme, uklanjanjem dela PSI sekvence i prosegmenta. Produkti dobijeni u *in vitro* eksperimentima se razlikuju od onih detektovanih *in vivo*, pa se pretpostavlja da je za potpuno sazrevanje proteina, pored autokatalize, neophodno i prisustvo drugih proteinaza (Glathe *et al.*, 1998).

Isecanjem prosegmenta i PSI inserta rekombinantnog prociprozina, dobijaju se dve subjedinice zrelog proteina koje su spojene disulfidnom vezom, što nije slučaj *in vivo*. Zato se pretpostavlja da su u ovu obradu uključene ćelijske proteinaze i da se ne radi o autokatalitičkom procesu (White *et al.*, 1999).

### 1.2.3 Trodimenzionalna struktura

Kristalne strukture aspartičnih proteinaza su utvrđene većinom kod sisarskih AP, kao što su pepsin, gastricin, himozin, renin, katepsin D, dok je kod biljnih AP utvrđena struktura samo ječamskog profitepsina (Kervivnen *et al.*, 1999) (Slika I) i zrelog kardoizina iz Cinare (Frazao *et al.*, 1999). Obe aspartične proteinaze su dvolančani proteini, čija je struktura slična ostalim aspartičnim proteinazama. Sekundarnu strukturu čine većinom  $\beta$ -lanci i vrlo malo  $\alpha$ -heliksa. Molekuli su dvodomenski, sa aktivnim mestom smeštenim u udubljenju između dva „ $\beta$ -barrel“ domena. Aspartati iz katalitičkog mesta su smešteni na dnu udubljenja koje je prekriveno sa šest lanaca  $\beta$ -naborane ploče koji štite unutrašnje hidrofobno jezgro. Tri konzervirane disulfidne veze stabilizuju strukturu, a polipeptidni lanci su povezani hidrofobnim interakcijama i vodoničnim vezama.

Strukturalna karakterizacija ječamskog profitepsina, dala je dodatne informacije o samom prosegmentu i PSI regionu. N-terminalni region je uključen u formiranje šest lanaca  $\beta$ -naborane ploče, dok se deo prosegmenta koji formira heliks približava aktivnom





mestu i delimično ga zaklanja. 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, terciarna struktura PSI domena je stabilizovana pomoću tri disulfidne veze (Kervivnen *et al*, 1999).



Slika I. Kristalna struktura fitepsina ječma (preuzeto iz Kervinen *et al.*, 1999)

#### 1.2.4 Novi tip biljnih aspartičnih proteinaza (atipične aspartične proteinaze)

Najviše saznanja u pogledu sekvence, trodimenzionalne strukture, lokalizacije, proteolitičke specifičnosti i funkcije biljnih aspartičnih proteinaza potiče iz istraživanja tipičnih aspartičnih proteinaza, koje se karakterišu prisustvom signalnog peptida, prosegmenta i PSI sekvence. Međutim, poslednjih godina otkriveno je nekoliko AP koje nemaju ovu tipičnu strukturu aspartičnih proteinaza. Zajednička karakteristika ovog novog tipa AP je da ne poseduju PSI domen. Sve APL poseduju 12 poziciono visoko konzerviranih cisteina, ali podaci o potencijalnim disulfidnim vezama za sada ne postoje.

**CND41 ("chloroplast nucleoid DNA binding protein"):** Među prvim okarakterisanim AP-like je CND41 izolovana iz hloroplasta ćelija kulture duvana. Ovo je

jedna od retkih aspartičnih proteinaza koja ima dvostruku funkciju: DNK vezujući protein i proteinaza (Murakami *et al.*, 2000).

CND41 cDNK kodira protein od 502 ak, predviđene molekulske mase od 53 kDa. N-terminalni kraj čini tranzitni peptid dužine 120 ak, koji predstavlja signal za hloroplastnu lokalizaciju, hidrofoban je i bogat serinom i treoninom. Zreo protein je dug 382 ak sa molekulskom masom od 40,5 kDa. N-terminalni region zrelog proteina je izrazito bogat lizinom. Ovaj region formira „helix-turn-helix“ motiv. Eksprimiranjem prekursora i njegovih deletiranih formi u *E.coli*, utvrđeno je da je ovaj motiv esencijalan za vezivanje za DNK, pri čemu je ta interakcija nespecifična. Nizvodno od ovog motiva postoji i „Zn-finger“ motiv, koji bi kroz interakcije sa „helix-turn-helix“ motivom mogao da učestvuje u vezivanju proteina za DNK ili u polimerizaciji monomera (Nakano *et al.*, 1997).

CND41 je prečišćen i *in vitro* pokazuje proteolitičku aktivnost na kiselom pH (pH 2,0-4,0), sa širokom supstratnom specifičnošću. Inhibiran je sa  $Fe^{3+}$ , NADPH i nukleozid trifosfatima, što može biti odraz usklađivanja proteolize sa hloroplastnim metabolizmom. Za razliku od većine AP, pokazuje slabu osetljivost na pepstatin A (Murakami *et al.*, 2000).

Eksperimenti sa antisens transgenim biljkama, kao i sa biljkama koje overeksprimiraju CND41, pokazuju da je CND41 uključen u senescenciju listova. Antisens biljke pokazuju smanjenu senescenciju u odnosu na *wt* biljke. Kod *wt* biljaka CND41 iRNK i protein se akumuliraju u starijim listovima (listovima u senescenciji), dok u mladim listovima nisu detektovani. Ovo je u korelaciji sa degradacijom Rubisca (ribuloza 1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza) koja je izražena u starijim listovima (Kato *et al.*, 2004). Takođe je utvrđeno da se sa starenjem listova akumulira obrađena, nešto kraća forma CND41 proteina i da je upravo ona proteolitički aktivna forma enzima. Pretpostavlja se da domen bogat lizinom, koji je odgovoran za vezivanje za DNK, ima ulogu negativnog regulatora proteazne aktivnosti, slično prosegmentu tipičnih AP, koji blokira aktivno mesto. Ovo je u saglasnosti sa činjenicom da je proteazna aktivnost CND41 inhibirana sa DNK, na fiziološkom pH, u *in vitro* uslovima (Kato *et al.*, 2005).

**CDR1 ("constitutive disease resistance"):** CDR1 je aspartična proteinaza izolovana iz listova mutantnih linija *Arabidopsis*, koje su pokazivale povećanu otpornost na patogenu bakteriju *Pseudomonas syringae*.

CDR1 cDNK kodira protein od 437 ak sa signalnim peptidom od 25 ak. Kao i kod tipičnih AP, konsenzus sekvence DTG/DSG formiraju aktivno mesto proteinaze. Gen za CDR1 ne poseduje introne.

Po predikciji, protein je ekstracelularni, što je potvrđeno eksperimentima u ćelijskoj kulturi duvana fuzionisanjem signalnog peptida sa GFP peptidom, što dovodi do sekrecije GFP u medijum. Takođe, detektovana je i u prečišćenoj interćeljijskoj tečnosti listova *Arabidopsis*. Fuzioni konstrukt CDR1-GFP je lokalizovan na ćelijskoj periferiji i/ili interćeljijskom prostoru epidermalnih ćelija korena.

Proteazna aktivnost CDR1 je dokazana, ali se rezultati razlikuju u zavisnosti od porekla samog proteina. Kada je prečišćena iz solubilne frakcije *E. coli* BL21 ćelija (Suzuki *et al*, 2004), pokazuje slabu aktivnost u širokom opsegu pH (2,0-8,0) na BSA kao supstratu, inhibirana je sa NADPH, ali ne i sa pepstatinom A. Kada je refoldovana (Simoes *et al*, 2007) pokazuje uzak opseg pH 6,2-6,5, inhibiciju sa GSSG, Zn<sup>+</sup>, a sa pepstatinom A samo parcijalnu inhibiciju, seče kazein i insulin, ali ne i BSA i aktivna je kao dimer. Za razliku od rekombinantnih CDR1, nativna je u potpunosti inhibirana pepstatinom A (Xia *et al*, 2004).

U *wt* biljkama, CDR1 je slabo konstitutivno eksprimiran i ekspresija je indukovana nakon infekcije patogenima. Transgene biljke sa overekspresijom CDR1 imaju povećan nivo rezistencije na patogene, i to kako lokalne, tako i sistemske rezistencije. Kod ovih biljaka, ekspresija odbrambenih gena (R gena) je i do 200 puta veća u odnosu na *wt* biljke. Lokalizovanom indukcijom CDR1 gena u određenim listovima, utvrđena je ekspresija R gena i u udaljenim listovima, koji nisu inficirani i gde CDR1 iRNK nije bila detektovana. Ovo je ukazalo na postojanje nekog endogenog mobilnog signala, koji omogućava sistemsku odbranu od patogena. Proteazna aktivnost CDR1 je neophodna u indukciji lokalnog i sistemskog odgovora (oni izostaju ukoliko se inhibira proteazna aktivnost CDR1 pepstatinom A) (Xia *et al.*, 2004).

**Nucelin:** cDNK nucelina poreklom iz plodnika ječma kodira protein od 410 ak, sa pretpostavljenom molekulskom masom 45 kDa i pI 7,2. Primarna struktura je ukazala da se radi o aspartičnoj proteinazi sa konzerviranim DTG/DSG motivom. PSI domen i pro region nisu uočeni, a signalni peptid na N-terminusu je dug 24 ak.

Gen za nucelin sadrži 8 egzona i 7 introna.

Prvi rezultati Northern analize i *in situ* hibridizacije su pokazali da je ovaj gen eksprimiran samo u nucelarnim ćelijama, po čemu je i dobio ime. Najveća ekspresija je detektovana u ćelijama koje podležu apoptozi nakon fertilizacije, pa je pretpostavljeno da ovaj protein ima ulogu u programiranoj ćelijskoj smrti (Chen & Foolad, 1997). Noviji rezultati pokazuju da se nucelin eksprimira pored nucelarnih ćelija i pre i posle fertilizacije i u nezrelim embrionima. Protein kodiran ovim genom nije izolovan (Bi *et al.*, 2005).

**Aspartična proteinaza pirinča (OsAsp1):** Nucelinski ortolog-*OsAsp1* izolovan iz pirinča kodira protein od 410 ak, sa konzerviranim aktivnim mestom DTG/DSG, koji ne poseduje PSI domen. N-terminalni signalni peptid (23 ak) ukazuje da bi ovaj protein mogao biti ekstracelularni, mada je SRL sekvenca koja je signal za lokalizaciju u peroksizomima uočena na C-terminalnom kraju proteina.

Rekombinantni *OsAsp1* produkovan u *E. coli* i refoldovan, autokatalitički iseca propeptid, smešten iza signalnog peptida, na pH 3,5 i zreo protein pokazuje proteolitičku aktivnost.

*In situ* hibridizacija je dala detaljne podatke o ekspresiji ovog gena u toku razvića cveta. Pre fertilizacije gen je eksprimiran u anterama, nucelusu, integumentu, a posle fertilizacije u ranom embrionu, nucelusu i aleuronskom sloju (Bi *et al.*, 2005).

**Nepentesini I i II:** Za karnivore biljke iz roda *Nepenthes* se zna da sekretuju aspartične proteinaze koje učestvuju u digestiji plena. Dve proteinaze od ukupno sedam koliko ih je do sada okarakterisano, spadaju u grupu atipičnih AP, jer ne poseduju PSI domen. Označene su kao nepentesin I i nepentesin II.

cDNK nepentesina I i II kodiraju prepolipeptide od 507 i 508 ak, sa konzerviranim DTG/DSG motivom. Nepentesin I, na osnovu predikcije, sadrži šest mesta glikozilacije,





dok nepentesin II nema ni jedno. Pokazuju visoku stabilnost u širokom opsegu pH (pH 3-10), kao i na visokoj temperaturi, 50°C. Nepentesin I ima nešto veću stabilnost, što je verovatno uslovljeno disulfidnim vezama i većom glikozilacijom u odnosu na nepentesin II. Imunohistohemijska bojenja su pokazala da se ovi proteini sintetišu u parenhimskim ćelijama koje okružuju sekretorne žlezde, odakle se sekretuju i verovatno učestvuju u digestiji plena. Autori smatraju da se AP sintetišu kao zimogeni koji se ne akumuliraju, već brzo sekretuju u fluid i aktiviraju. Homologija aminokiselinske sekvence sa tipičnim aspartičnim proteinazama je veoma mala, oko 20%, i analiza filogenetskog stabla pokazuje da se ova dva proteina mogu svrstati u istu grupu sa nucelinom, CND41, OsAsp1, koja je filogenetski udaljena od tipičnih aspartičnih proteinaza (Athauda *et al.*, 2004).

### 1.2.5 Distribucija u tkivima i organima

Do sada prečišćene aspartične proteinaze 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, kao što su kardozin B Cinare, AP kompira, CDR1 Arabidopsisa i aspartične proteinaze karnivorih biljaka iz roda *Nepenthes*.

U Cinari, cinaraze kao i kardozin A i B su prisutni u tučkovima cvetova, a nedavno su kardozini detektovani i u semenu (Pereira *et al.*, 2008). iRNK ciprozina se javljaju 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.*, 1997), dod je u semenu lokalizovan u proteinskim telima ćelija embriona i ćelijskom zidu ćelija kotiledona i endosperma (Pereira *et al.*, 2008). Kardozin B se akumulira u ćelijskom zidu i ekstracelularnom matriksu provodnog tkiva tučka (Vieira *et al.*, 2001) i u prvim satima imbibicije semena (Pereira *et al.*, 2008). Ovi podaci ukazuju na činjenicu da aspartične proteinaze Cinare, iako slične po svojoj primarnoj strukturi, imaju različitu tkivnu i vremensku ekspresiju.

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 (Bethke *et al.*, 1996; Marttila *et al.*, 1995), kao i u lisnim i cvetnim vakuolama (Paris *et al.*, 1996; Runeberg-Roos *et al.*, 1994). U korenu ječma, fitepsin je u najvećoj meri prisutan u trahejalnim elementima u razviću i u sitastim ćelijama (Runeberg-Roos & 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. Nucelin iz ječma se sintetiše u semenu i to u nucelarnim ćelijama, kao i u nezrelom embrionu.

Dve sekretorne aspartične proteinaze su izolovane iz listova duvana, krompira i paradajza (Rodrigo *et al.*, 1989; Rodrigo *et al.*, 1991). AP je takođe lokalizovana 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 T. & Suzuki K., 1995) i u hloroplastima listova duvana. AP su prisutne i u organima za hvatanje insekata kod insektivornih biljaka (An *et al.*, 2002; Chung-Il *et al.*, 2002; Athauda *et al.*, 2004). Dve aspartične proteinaze kakaa su različitim intenzitetom ekspimirane tokom sazrevanja semena (Laloi *et al.*, 2002). Kod suncokreta i pirinča su takođe identifikovane aspartične proteinaze u germinativnom semenu (Asakura *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2000).

## 1.2.6 Funkcija

Distribucija u različitim organima i tkivima mnogih biljnih vrsta ukazuje da aspartične proteinaze igraju važnu ulogu u mnogobrojnim proteolitičkim procesima u ćelijama i vanćelijskom prostoru. Zbog nedostatka informacija o prirodnim supstratima kao i nedostatka mutanata, o funkcijama AP se malo zna i one su još uvek samo pretpostavljene. Ovi enzimi mogu biti 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 A. & Gal S., 1999).

Aspartične proteinaze su u većoj količini pronađene u germinativnom semenu i za nekoliko prečišćenih enzima pokazano je da su sposobne da degraduju rezervne proteine *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. 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-Roos *et al.*, 1994; Törmäkangas *et al.*, 1994). Osim toga, u skorijim istraživanjima, fitepsini su dovedeni u vezu sa programiranom ćelijskom smrću u razvoju traheja u korenu ječma (Lundholm *et al.*, 2000; Runeberg-Roos & Saarna, 1998) i u degenerisanim nucelarnim ćelijama ovarijuma ječma (Chen & Foolad, 1997).

Dve aspartične proteinaze iz semena kakaa imaju podeljene uloge. Jedna vrši obradu rezervnih proteina u toku sazrevanja semena i njihovu hidrolizu na početku germinacije, dok druga degraduje rezervne proteine u toku germinacije semena (Laloi *et al.*, 2002).

Aspartične proteinaze u cvetnim organima *Cinara* 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 tučka, na putu prolaska polenove cevi do jajne ćelije (Vieira *et al.*, 2001), kao i nucelarnom tkivu embrionove kesice, gde njegova ekspresija koareliše sa programiranom ćelijskom smrću nucelarnih ćelija (Figueiredo *et al.*, 2006).

Ekstracelularna AP prečišćena iz lista paradajza i duvana degraduje PRP (*od engl. pathogenesis-related protein*) *in vitro*. Osetljivost PRP na AP aktivnost i kodistribucija ovog enzima sa PRP ukazuje da se biološka aktivnost ovih odbrambenih proteina može

regulisati dejstvom aspartičnih protinaza (Rodrigo *et al.*, 1989; Rodrigo *et al.*, 1991). Pronađeno je da AP aktivnost izrazito raste u stresnim situacijama. Na primer, ekspresija enzima paradajza i krompira sistemski je indukovana u lišću nakon njegovog povređivanja (Hansen & Hannapel, 1992, 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 aspartične proteinaze (Panavas *et al.*, 1999). Ekstracelularne aspartične proteinaze iz krtole (StAP1) i lista (StAP3) krompira su uključene u odbranu od patogena *Fusarium solani* i *Phytophthora infestans* vezujući se za površinu spora i hifa ovih patogena, nakon čeg dovode do permeabilizacije ćelijske membrane i smrti ćelija (Mendieta *et al.*, 2006).

Proteazna aktivnost fluida u organima za hvatanje insekata, karnivornih biljaka iz roda *Nepenthes*, potiče uglavnom od aspartičnih proteinaza (An *et al.*, 2002; Chung-II *et al.*, 2002).

### 1.3 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 % (Aleksjeva, 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 %), (Pomeranz, 1972; 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 (Aleksееva, 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,  $\alpha$ -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.

### 1.3.1 Aspartične proteinaze heljde

Tokom analize rezervnih proteina heljde, uočena je proteolitička aktivnost ukupnog ekstrakta semena heljde na kiselom pH (Radović, 1998). Aktivnost je detektovana na rezervnim proteinima semena heljde, BSA, kazeinu i hemoglobinu. Kako je utvrđeno da je proteoliza značajno redukovana u prisustvu pepstatina A, pretpostavilo se da potiče od aspartičnih proteinaza. Deatljnija analiza je pokazala da proteolitička aktivnost postoji u listu, zreloom semenu, kao i i semenu u toku sazrevanja sa maksimumom aktivnosti u fazi 17-21 DAF. Maksimum proteolitičke aktivnosti na pH 3,1 i inhibicija od 80% sa pepstatinom A su potvrdili da ona potiče većim delom od aspartične/aspartičnih proteinaza. „*In gel*“ esejima sa inkorporiranim BSA kao supstratom je utvrđeno da aktivnost potiče od proteinaze Mw 47 kDa. Ova proteinaza je sastavljena od dve

subjedinice povezane disulfidnom/disulfidnim vezama: 31 i 16 kDa. Prisustvo ove AP u fazama sazrevanja semena kada dolazi do sinteze RP ukazuje na potencijalnu ulogu u sazrevanju RP. Kako je prisutna i tokom germinacije, nije isključena njena uloga i u drugim fiziološkim procesima kao što je degradacija proteina.

Ukupni vodeni ili kiseli ekstrakti semena heljde u razviću, kao i zrelog semena heljde imaju sposobnost koagulacije mleka. Poređenjem profila hidrolize  $\kappa$ -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 (Timotijević *et al.*, 2003).

Iz biblioteke cDNK semena u srednjoj fazi sazrevanja izolovana su dva gena koja kodiraju tipične aspartične proteinaze-FeAP9 (AY826351) i FeAP12 (AY826352) koje pokazuju visok stepen homologije, ali se razlikuju po profilu ekspresije. Dok je FeAP9 prisutna u svim organima, ekspresija FeAP12 je ograničena na seme.

FeAP9 proteinaza (Mw 47 kDa) je detektovana u semenu, listu, korenu i stablu, dok je u cvetu detektovana Mw iznosila 55 kDa, što je verovatno posledica posttranslacionih modifikacija u ovom organu. Sinteza proteina koja počinje u 14-17 DAF i dostiže maksimum 19-25 DAF, a detektuje se i tokom prvih 5 dana germinacije semena, ukazuje na moguću ulogu FeAP9 u maturaciji i regulisanoj degradaciji rezervnih proteina.

Najveća količina FeAP9 protinaze od 55 kDa je detektovana u zreлом cvetu, nešto manja u parcijalno otvorenim pupoljcima, dok je u zatvorenim pupoljcima nije bilo. Pored ovoga, FeAP9 je bila prisutna samo u tučku, ali ne i u polenu. Moguće je da je FeAP9 receptorni molekul koji učestvuje u prepoznavanju specifične polenske komponente u interakciji polen-tučak. Ovo je pokazano za kardozin A iz *C. cardunculus* koja vezuje fosfolipazu Da preko RGD motiva. U prilog ovoj pretpostavci ide i prisustvo KGE motiva u FeAP9, koji je sličan RGD motivu po naelektrisanju i strukturi.

FeAP9 je uključena i u odgovor na različite abiotičke i biotičke stresogene faktore. Tako je pokazano se ekspresija FeAP9 u listu povećava pod dejstvom suše, mehaničke povrede, UV-B zračenja, salicilne kiseline koja imitira napad patogena i u toku senescencije indukovane mrakom (Timotijević *et al.*, 2009).

Svi ovi rezultati ukazuju da FeAP9 učestvuje u različitim fiziološkim procesima, kako u procesima razvića, tako i u odgovoru na stres.

### 1.3.1.1 FeAPL1

Pored prethodno opisanih tipičnih AP, iz biblioteke cDNK semena u srednjoj fazi sazrevanja je izolovana cDNK koja kodira „atipičnu“ AP, označenu kao FeAPL1. Analiza izvedene aminokiselinske sekvence je pokazala prisustvo DTG/DSG konzerviranog katalitičkog mesta i odsustvo PSI regiona, na osnovu čega je i svrstana u novi tip AP.

Poređenjem ove izvedene aminokiselinske sekvence sa sekvencama iz baze podataka, utvrđeno je da *FeAPL1* pokazuje najveći stepen homologije sa atipičnim aspartičnim proteinazama. Nivoi homologije izraženi u procentualnoj zastupljenosti identičnih, odnosno sličnih aminokiselina pokazani su tabelarno (Tabela I).

Gen	% identičnih ak	% sličnih ak
<b>nepentesin I</b> ( <i>Nepenthes gracilis</i> )	32%	46%
<b>nepentesin II</b> ( <i>Nepenthes gracilis</i> )	31%	45%
<b>CND41</b> ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	30%	45%
<b>CDR1</b> ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	30%	45%
<b>nucelin</b> ( <i>Hordeum vulgare</i> )	22%	40%
<b>OsAsp1</b> ( <i>Oryza sativa</i> )	23%	38%

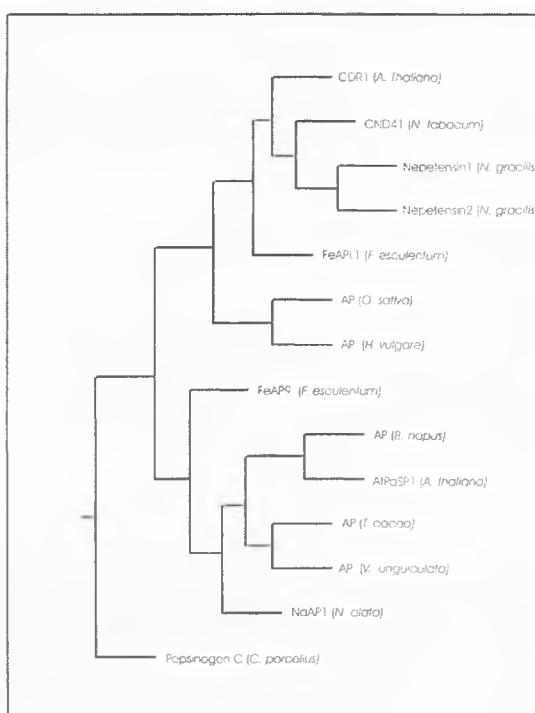
Tabela I. Tabelarni prikaz procenata homologije FeAPL1 sa atipičnim aspartičnim proteinazama drugih biljnih vrsta.

Stepen homologije sa ostalim biljnim AP je niži (oko 35% sličnosti). Konzerviranost ak sekvence je najveća oko aktivnog mesta. Pored toga, 12 Cys je prisutno kod svih do sada okarakterisanih APL, ali ne i kod drugih AP. Predikovana su četiri mesta N-glikozilacije na pozicijama 113 (NCTF), 130 (NKSS), 154 (NCST) i 357 (NITG). U

zavisnosti od korišćenog programa, signalni peptid (SP) je dugačak ili 20 ili 30 aminokiselina. Predikcije nisu pokazale postojanje dodatnih sekvenci za lokalizaciju.

Sa AP vertebrata i fungi, najveća homologija, u opsegu 34-38%, ustanovljena je sa pepsinogenom C, katepsinom D, reninom miša i čoveka, proteinazom A pekarskog kvasca, kandidapepsinom 1 i 2.

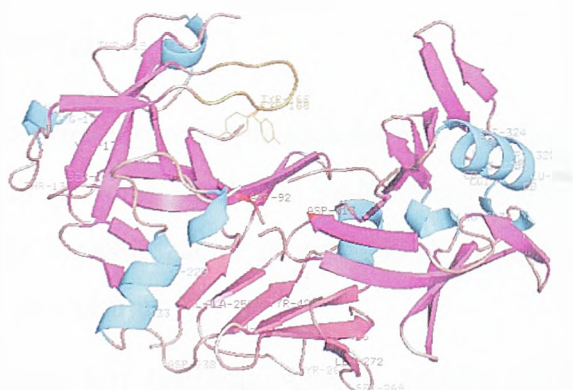
Evolucionarna studija je uključivala konstruisanje filogenetskog stabla iz koga se vidi da geni biljnih aspartičnih proteinaza pripadaju dvema granama. *FeAPL1* se jasno grupiše sa ostalim APL genima i oni su jasno razdvojeni od grupe koju čine geni tipičnih AP (Slika II). Ovim se potvrđuje analiza homologije na nivou aminokiselinske sekvence.



**Slika II.** Filogenetske pozicije biljnih aspartičnih proteinaza. Nepentesis 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); FeAP9, *Fagopyrum esculentum* (AAV84085), TcAP1, *Theobroma cacao* (CAC86003); NaAP1, *Nepenthes alata* (BAB20969); AP *Brassica napus* (AAB03108); AtPasp1, *Arabidopsis thaliana* (AAL08259); AP *Vigna unguiculata* (AAB03843); pepsinogen C, *Cavis porcellus* (M88652)



Predikovana 3D struktura FeAPL1 se poklapa sa kristalografski analiziranim trodimenzionalnim strukturama aspartičnih proteinaza, za koje je u funkcionalnim esejima pokazana enzimaska aktivnost. Jasno se uočava dvodomenska organizacija proteina (slika III). N- domen, sadrži DTG, a C-domen DSG- konsenzus sekvencu koje formiraju aktivno mesto, smešteno u udubljenju između dva domena. Na dnu udubljenja se nalazi šest lanaca  $\beta$ -naborane ploče koji štite hidrofobno jezgro proteina. Uočen je i konzervirani tirozin na poziciji 168 koji učestvuje u formiranju „oboda“ udubljenja i omogućava pravilno pozicioniranje supstrata u odnosu na aktivno mesto. Ovaj tirozin je konzerviran kod svih analiziranih biljnih i životinjskih AP. S obzirom da u modelovanje proteina nije ušlo prvih 60 ak N-terminalnog regiona, prisustvo prosegmenta ovom analizom nije ustanovljeno.



Slika III. Prikaz pretpostavljene trodimenzionalne strukture FeAPL1

Ekspresija FeAPL1 gena je ograničena samo na seme. Ekspresija se jasno uočava već od 9-11 DAFa, raste i dostiže pik u srednjoj fazi, od 14-17 DAFa, ulazi u fazu opadanja u toku 19-21 DAFa i u zreлом semenu skoro potpuno nestaje (Milisavljević *et al*, 2008).

U sklopu genomskog klona *FeAPL1*, okarakterisan je i uzvodni potencijalno regulatorni region dužine 1134 bp. Kompjuterskom predikcijom pronađeno je više cis-aktivirajućih elemenata, koji pokazuju manji ili veći stepen sličnosti („core and matrix similarity“) sa *cis*-elementima različitih biljnih promotora. Do sada su izolovana samo tri

potencijalna promotora biljnih AP (nucelin, OsAsp1 i orizasin), tako da se samo poređenjem sekvenci njihovih regulatornih elemenata, bez funkcionalnih analiza ne može zaključivati o funkciji ovih proteina. Ono što se uočava jeste da većina pretpostavljenih *cis*-regulatornih elemenata pripada, grubo rečeno, dvema grupama: elementi uključeni u regulaciju gena koji se aktiviraju pri stresnim uslovima spoljašnje sredine (ABRE, Gbox, RITA1 (ACE- PC), ERE1, Wbox) i elementi odgovorni za ekspresiju u semenu (DOF1 (Pbox), GCN4, SP8BF (SPF1), SEF3, SEF4). Jedina upadljiva razlika je odsustvo RY elementa, “jakog” seme-specifičnog *cis*-elementa u *gFeAPLI*, inače prisutnog u 5' uzvodnim regionima ostale tri aspartične proteinaze. Ovaj element deluje kao pozitivni regulator transkripcije u semenu, ali i kao negativan u ostalim tkivima. Za ove tri AP je pokazano da se eksprimiraju samo u semenu, pa prisustvo ovog *cis*-elementa nije iznenađujuće (Milisavljević M., 2005).

## 1.4 Ekspresioni sistemi

Danas je u upotrebi veliki broj ekspresionih sistema koji omogućavaju produkciju velike količine rekombinantnih proteina različitih biohemijskih osobina. Zahvaljujući ovim sistemima omogućena je karakterizacija proteina koje je teško ili nije moguće prečistiti iz organizama koji ih proizvode.

Ekspresioni “domaćini” mogu biti bakterije, kvasci, ćelijske kulture insekatskih i sisarskih ćelija ili celi organizmi (biljke i neke životinje). Izbor ekspresionog sistema zavisi od veličine, strukture i stabilnosti proteina za ekspresiju i zahteva za njegove posttranslacione modifikacije (Jonasson *et al.*, 2002).

Najeksploatisaniji sistem je Gram-negativna bakterija *Escherichia coli* kako zbog svoje jednostavnosti, dobro proučene genetike, dostupnosti velikog broja vektora i sojeva, stalnih unapređivanja sistema, tako i zbog relativno niske cene. Iako je u širokoj upotrebi, problemi kao što su nepravilno “foldovanje”, nedostatak biološke aktivnosti ili slab prinos rekombinantnog proteina su relativno česta pojava (Georgiou G., 1996).

Glavni faktori koji utiču na efikasnost ovog sistema u produkciji rekombinantnih proteina su:

- 1) Jak i dobro regulisan promotor. Najčešći su (izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid) IPTG-inducibilni promotori koji su regulisani produktom lacI gena-lac represorom. Mana ovih promotora je nepotpuno utišavanje u neindukujućim uslovima, što je ozbiljan problem pri produkciji toksičnih proteina.
- 2) Ekspresioni sojevi. Koriste se mutanti za svoje prirodne proteaze koje bi mogle degradovati rekombinantni protein. Određeni sojevi imaju narušene gene za *trx*B i *gor* reduktaze, čime je omogućeno formiranje disulfidnih veza u citoplazmi, što je od značaja za produkciju proteina sa disulfidnim vezama.
- 3) Razlika u korišćenju kodona (Codon usage difference) između *E. coli* i transgena. Koriste se sojevi sa genima za tRNK za retke kodone prisutne u transgenu.
- 4) Solubilnost rekombinantnog proteina koja zavisi od količine, disulfidnih veza, hidrofobnosti rekombinantnog proteina kao i od izbora fuzionog partnera-taga (Swartz, 2001). Iako najčešće korišćeni polihistidinski tag ( $\text{His}_6$  tag) ili glutation S-transferaza (GST tag), oni nisu izbor za overekspresiju nesolubilnih proteina. Tagovi kao što su tioredoksin, MBP (Maltose Binding Protein), NusA (transcription termination anti-terminator factor) (Terpe 2003), SUMO (Butt, 2005) su visoko solubilni proteini sa solubilizirajućim efektom na svoje fuzione partnere.

Nesolubilne proteinske agregate je moguće solubilizovati upotrebom detrdženata kao što su urea i guanidinium-hidrohlorid. Renaturaciju strukture ovakvih proteina je moguće izvršiti metodama kao što su dijaliza, brza dilucija i refolding na kolonici (Middelberg A., 2002; Sørensen *et al.*, 2003a). Optimizacija uslova za renaturaciju strukture je uglavnom dugotrajna i retko rezultuje zadovoljavajućim prinosom proteina.

U poređenju sa bakterijskim sistemima, kvasci pokazuju brojne prednosti po pitanju ekspresije heterolognih proteina:

- 1) Kao jednoćelijski mikroorganizmi, za razliku od ostalih eukariotskih sistema jednostavni su za kultivisanje i manipulaciju.
- 2) Mogućnost posttranslacionih obrada proteina i formiranje disulfidnih veza

- 3) Kvasci imaju sposobnost izlučivanja proteina u medijum u solubilnoj i biološki aktivnoj formi, što u znatnoj meri olakšava njihovo prečišćavanje.
- 4) Kao nepatogeni, GRAS organizmi (eng. Generally Regarded As Safe – opšte smatrani bezbednim) našli su primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Pekarski kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*, već dugo vremena predstavlja model organizam u biohemijskim i genetičkim istraživanjima, tako da su njegova genetika, biohemija, molekularna genetika i molekularna biologija dobro proučene, zbog čega se intenzivno koristi za produkciju heterolognih sistema.

Pre tridesetak godina otkrivena je sposobnost nekih kvasaca da kao jedini izvor ugljenika i energije koriste metanol. Ovi kvasci su okarakterisani kao metilotrofni kvasci i njima pripadaju četiri roda: *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* i *Torulopsis* (Lee and Komagawa, 1980). Mogućnost jeftine sinteze metanola iz prirodnog gasa metana vrlo brzo je učinila ove organizme popularnim sistemima za proizvodnju rekombinantnih proteina. U *P. pastoris* eksprimirano je oko 400 heterolognih proteina, a popularnosti ovog ekspresionog sistema doprinelo je nekoliko faktora:

1. prisustvo jednog od najjačih i strogo regulisanih promotora gena za alkoholnu oksidazu (AOX1),
2. sličnost ovog ekspresionog sistema sa *S. cerevisiae*, jednim od najbolje okarakterisanih ekspresionih sistema moderne biologije i mogućnost primene istih tehnika u molekularno genetičkim manipulacijama,
3. mogućnost gajenja ovih organizama u fermentoru do vrlo velikih ćelijskih gustina.

Heterologni proteini u *P. pastoris* mogu biti eksprimirani intracelularno ili sekretovani u medijum. Kako ovaj kvasac izlučuje malu količinu endogenih proteina u medijum i kako medijum za gajenje ne sadrži dodatne proteine, sekretovani heterologni proteini predstavljaju najveći deo proteina medijuma i stoga se lako izoluju i prečišćavaju (Tschopp *et al.*, 1987; Cregg *et al.*, 1987).

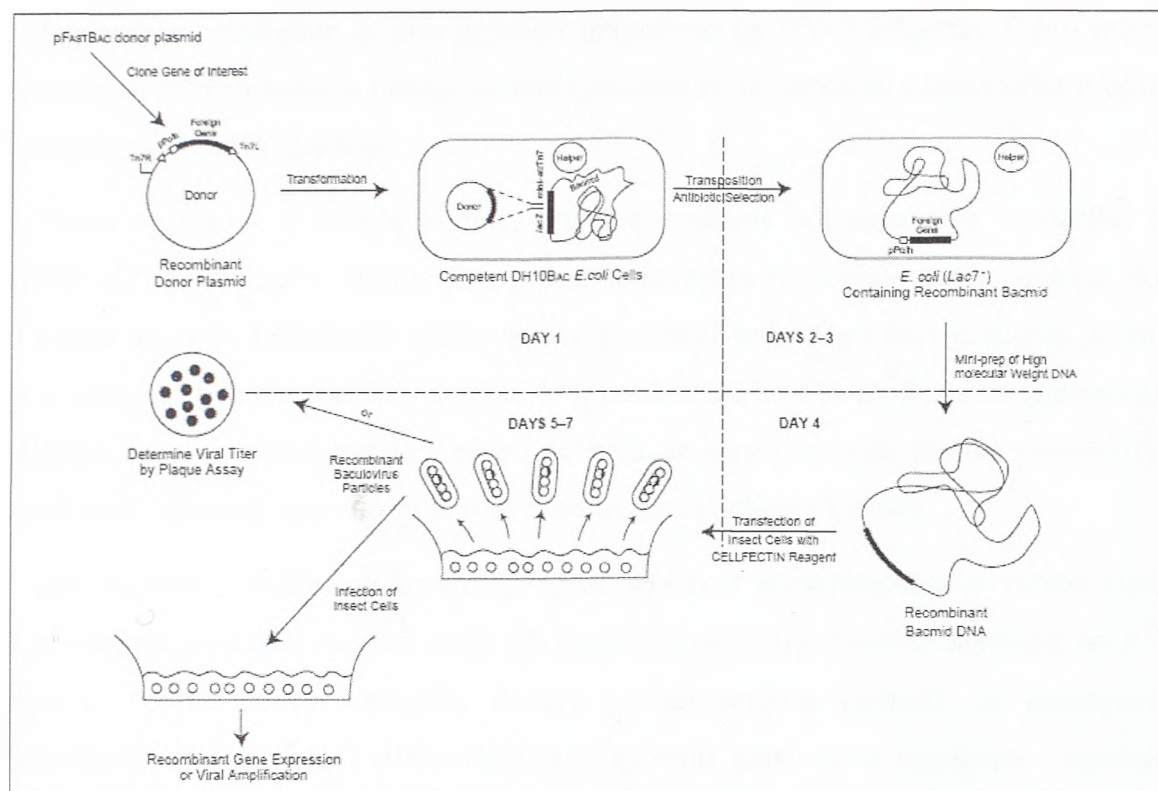
Pored mogućnosti sinteze i sekrecije stranih proteina, *P. pastoris* je sposobna da njihovu funkcionalnost obezbedi i posttranslacionim modifikacijama. Obrada signalne



sekvence, foldovanje i formiranje disulfidnih veza dešavaju se slično kao i kod viših eukariota, dok se O- i N-glikozilacija unekoliko razlikuju. Nađeno je da pozicije na kojima dolazi do glikozilacije u *P. pastoris* ne odgovaraju uvek onima kod izvornog organizma, a takođe mogu glikozilovati i prirodno neglikozilovane proteine.

Bakulovirusni ekspresioni vektor sistem (BEVS) je takođe jedan od najiskorišćenijih eukariotskih sistema za produkciju rekombinantnih proteina. Prednosti ovog sistema su nepatogenost bakulovirusa za sisare i biljke, uzak opsega vrsta insekata koje inficiraju, genom bakulovirusa sadrži sve genetičke informacije potrebne za infekciju (nema upotrene "helper" virusa ili ćelijskih linija), pogodni su za dobijanje solubilnog rekombinantnog proteina u velikoj količini koji se lako prečišćava iz kasne faze infekcije, posttranslacione modifikacije, formiranje disulfidnih veza u produkovanom proteinu. Pored ovoga, dostupan je i veliki broj insekatskih ćelijskih linija. Najširu primenu našla je Sf9 ćelijska linija *Spodoptera frugiperda*, mada se u različitim ćelijskim linijama, jedan protein može ponašati različito u smislu nivoa ekspresije, solubilnosti i posttranslacionih modifikacija (Hink *et al.*, 1991).

Nastajanje rekombinantnog bakmida i ekspresija u Bac-to-Bac ekspresionom sistemu korišćenom u ovom radu je prokazano na slici IV.



Slika IV. Šematski prikaz produkcije rekombinantnih proteina u kulturi insekatskih ćelija (preuzeto iz Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques)

## 1.5 BY-2 ćelijska linija

Od prvog objavljenog rada na BY-2 liniji u bazičnim istraživanjima ćelijskog ciklusa (Nagata *et al.* 1992), ova kultura biljnih ćelija u suspenziji naglo dobija na važnosti. Intenzivan rast i mogućnost sinhronizacije ćelijskog ciklusa su osobine koje su bile presudne da se fenomeni biljne molekularne biologije počnu intenzivnije izučavati na BY-2 ćelijskoj liniji.

BY-2 ćelije služe kao model proliferišućih, nediferenciranih i diferenciranih ćelija u zavisnosti od faze ćelijskog ciklusa. Razlog ove pomalo zbunjujuće činjenice je da su suspenzije pogodnije za manipulaciju i mogu lakše da se indukuju različiti fiziološki odgovori nego što je to slučaj sa biljkama. Iako su biljke nezamenljive kad su u pitanju proučavanja tkiva i organa, kao i interakcije među njima, BY-2 ćelije postepeno zauzimaju primat u izučavnjima na ćelijskom nivou.

Izučavanje citoskeleta je bilo naročito intenzivno na BY-2 ćelijama. Biljni proteini asocirani sa mikrotubulama i aktin vezujući proteini su biohemijski okarakterisani upravo na model sistemu BY-2 ćelija.

Mada su, kao i u svakoj kulturi, prisutne značajne somaklonalne varijacije, ova ćelijska kultura je visoko homogena i pokazuje izuzetnu sposobnost umnožavanja, što je od velike važnosti i značajno olakšava mnoga istraživanja. Ogromna prednost je što se BY-2 suspenzija može podeliti na veliki broj podkultura koje se međusobno zanemarljivo razlikuju, pa se izvršeni tretmani mogu porediti uz zanemarivanje razlika proisteklih iz somaklonih varijacija u kratkom vremenu od trenutka deljenja kulture.

Zahvaljujući pouzdanosti kontrole, reproducibilnost eksperimenata je veoma visoka, pa je moguće izučavati dejstva različitih supstanci na ćelije. Dejstvo hormona na BY-2 ćelije je veoma dobro istraženo. Znanja o fenomenima vezanim za percepciju i transdukciju signala kao i diferencijalnu ekspresiju gena su u mnogome razjašnjeni zahvaljujući mogućnosti da se na ovom sistemu izvede relativno veliki broj eksperimenata u relativno kratkom periodu.

Tako su BY-2 ćelije široko prihvaćena ćelijska linija kao model sistem u proučavanju biljnih ćelija. Dodatna prednost u odnosu na neke druge sisteme je mogućnost relativno lake transformacije ćelija. Stabilno transformisani kalusi i suspenzije se lako održavaju i relativno su zahvalne za manipulaciju. Veze između ćelija su slabije u poređenju sa drugim biljnim kulturama i pokazuju znatno manju tendenciju da formiraju kompaktne kaluse. Mikrokalusi u BY-2 tečnoj kulturi su sastavljeni od 5-10 ćelija (Gynheung A., 1985).

Glavni nedostatak BY-2 ćelijske linije je slabija dostupnost publikovanih podataka o duvanu (*Nicotiana tabacum*) u poređenju sa model sistemima kao što su *Arabidopsis thaliana* i *Oryza sativa*. Međutim ogromne prednosti BY-2 ćelija čine ovu kulturu rado korišćenim sistemom za najrazličitija istraživanja molekularne i ćelijske biologije viših biljaka, tako da se saznanja o ovoj kulturi akumuliraju izuzetnom brzinom (Nagata *et al.* 2004).

---

## 2 CILJ

Najviše saznanja u pogledu lokalizacije i proteolitičke specifičnosti, a time i funkcije biljnih aspartičnih proteinaza, potiče iz istraživanja tipičnih AP, koje se karakterišu prisustvom signalnog peptida, prosegmenta i PSI sekvence. Za razliku od tipičnih, u biljnom svetu je delimično okarakterisano svega nekoliko „atipičnih“ aspartičnih proteinaza (APL) o čijim se osobinama i funkcijama malo zna. Postojanje dva tipa AP je jedinstveno u biljnom svetu i podaci o APL su dragoceni jer mogu da ukažu da li postoji specijalizacija funkcije definisana strukturom.

Tema ovog rada upravo se odnosi na jednu od sedam do sada opisanih atipičnih aspartičnih proteinaza-APL iz heljde. cDNK koja kodira atipičnu AP- FeAPL1 (Acc. no DQ241824) je izolovana iz biblioteke cDNK srednje faze sazrevanja semena heljde. Nakon detaljne analize strukture gena, cilj ovog rada je karakterizacija proteina FeAPL1, od analize biohemijskih osobina do ćelijske i tkivne lokalizacije, što sve predstavlja osnovu za određivanje funkcije ovog proteina.



## 3 MATERIJAL I METODE

### 3.1 Osnovne procedure rada sa DNK

#### 3.1.1 Izolovanje genomske DNK iz BY-2 ćelija

Genomska DNK iz BY-2 ćelija je izolovana sa QIAGEN DNeasy®Plant Mini Kit (Qiagen) po uputstvu proizvođača, uz modifikacije. BY-2 ćelije (250 µl) su centrifugirane na 200 g 1 min. Na ćelije je dodato 400 µl pufera A1 i 4 µl Rnaze A i sonifikovano 1 do 2 s. Smeša je prvo inkubirana na 65°C 10 min uz povremeno mućkanje, a potom i na ledu 5 min sa 130 µl pufera AP2. Nakon centrifugiranja na 20000 g 5 min, supernatant je nanesen na QIAshredder Mini Spin kolonicu, koja vezuje neliziran materijal i centrifugiran na 20000 g 2 min. U lizat je dodat 1,5 volumen pufera AP3/E i smeša je naneta na DNeasy Mini Spin kolonicu. Vezivanje DNK je vršeno centrifugiranjem na 6000 g 1 min. Nakon dva pranja sa po 500 µl pufera AW, genomska DNK je eluirana inkubacijom od 5 min sa 100 µl pufera AE. Rastvorena DNK je sakupljena centrifugiranjem na 8000 g 1 min.

#### 3.1.2 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 µl 10 mM EDTA, pH 8,0. Dodavano je 25 µl 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 µl 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 brzjoj proceduri na sledeći način: 1,5 ml prekonoćne bakterijske kulture je kratko centrifugiran u mikrocentrifugi, a talog resuspendovan u 300 µl 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 µl 3 M Na-acetata pH 5,2, smeša je promućkana i kratko centrifugirana 2 min. Supernatantu je dodavan 1 ml hladnog 96% etanola. Talog dobijen centrifugiranjem (10 min na 13000 obr/min) je ispiran 70% etanolom, sušen i rastvaran u 20 µl 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 µl pufera P1 koji obezbeđuje alkalne uslove za liziranje bakterija. Nakon dodavanja 250 µl pufera P2 i 350 µl pufera N3 koji obezbeđuju visoku koncentraciju soli za precipitaciju genomske DNK i vezivanje plazmidne DNK za silika kolonice, 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 µl vode. Ovako prečišćeni plazmidi su korišćeni za sekvenciranje, transformacije i PCR.

Za dobijanje veće količine plazmida, korišćene su prekonoćne kulture od 50 do 100 ml, iz kojih su plazmidi izolovani po brzjoj proceduri, uz proporcionalno povećanje volumena svih pufera, a zatim su takvi plazmidi nanošeni na QIAprep Spin kolonice i dalje je rađeno po prethodno opisanom protokolu.

### 3.1.3 Izolovanje rekombinantnog bakmida iz *E. coli* DH10BAC soja

Četiri ml prekončne kulture DH10BAC soja je staloženo centrifugiranjem na 14000 g 1 min. Talog je resuspendovan u 800  $\mu$ l Rastvora I (15 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml RNaza A). Nakon dodavanja 800  $\mu$ l Rastvora II (0,2 N NaOH, 1% SDS), smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 5 min. Genomska DNK je staložena inkubiranjem 5 min na ledu u prisustvu 800  $\mu$ l 3 M natrijum acetata i centrifugiranjem na 14000 g 10 min. U izdvojeni supernatant je dodato 2,2 ml izopropanola i smeša je inkubirana na ledu 15 min. Bakmidna DNK je staložena ponovnim centrifugiranjem i talog je opran 2 puta sa 70% etanolom. Nakon sušenja na vazduhu, DNK je rastvorena u 30  $\mu$ l vode. Bakmidna DNK je čuvana na 4°C do upotrebe.

### 3.1.4 Elektroforeza DNK na gelu od agaroze

Fragmenti DNK razdvajani su elektroforezom na gelu od agaroze (Serva) 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  $\mu$ 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).

### 3.1.5 Prečišćavanje fragmenata DNK sa gela od agaroze

Za prečišćavanje fragmenata DNK kraćih od 10 kb korišćen je QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), a za fragmente duže od 10 kb QIAEX II Gel Extraction Kit. DNK je razdvajana elektroforezom na 1,5% gelu od SeaKem GTG agaroze (FMC BioProducts), koja ne inhibira enzimske reakcije.

QIAquick Gel Extraction Kit: Nakon elektroforeze, fragmenti DNK od interesa su isečani i inkubirani u 3 zapremine pufera QG u odnosu na zapreminu gela na 50°C 10 min uz povremeno mućkanje, nakon čega je dodavana 1 zapremina gela izopropanola, radi

povećanja prinosa fragmenata <500 bp i >4 kb. Smeša je nanošena na QIAquick kolonice i centrifugirana na 13000 obrt/min 1 min. Kolonice su zatim prane sa 500  $\mu$ l pufera QG i 750  $\mu$ l pufera PE. Radi oslobađanja od viška etanola koji bi inhibirao enzimske reakcije, kolonice su dodatno centrifugirane pod istim uslovima bez dodavanja pufera. Elucija DNK sa kolonica vršena je sa 50  $\mu$ l vode centrifugiranjem na 13000 obrt/min 1 min.

QIAEX II Gel Extraction Kit: Isečeni fragmenti su inkubirani sa 3 volumena pufera QX1 i 10  $\mu$ l QIEX II kuglica na 50°C 10 min, uz povremeno mućkanje. Kuglice su staložene centrifugiranjem 30 s i oprane sa po 500  $\mu$ l pufera QX1 i PE. Nakon sušenja na vazduhu, DNK je eluirana sa 20  $\mu$ l vode.

### 3.1.6 Prečišćavanje PCR produkata

Za prečišćavanje PCR produkata od enzima, nukleotida, prajmera i soli korišćen je QIAquick PCR purification kit (Qiagen), po uputstvu proizvođača. U PCR reakciju je dodavano 5 volumena pufera PB u odnosu na zapreminu PCR smeše. Vezivanje DNK za QIAquick kolonicu je vršeno centrifugiranjem na 13000 obrt/min 1 min. Nakon pranja kolonice sa 750  $\mu$ l pufera PE i dodatnog centrifugiranja, DNK je eluirana sa 30 do 50  $\mu$ l vode ili pufera EB (10 mM Tris, pH 8,5)

### 3.1.7 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 1 do 2 sata, pri koncentraciji enzima od oko 5 U/ $\mu$ g DNK. Digestije su inkubirane na temperaturi preporučenoj od strane proizvođača (za većinu enzima 37°C, a za *Sma*I 30°C) i po isteku vremena su prekidane inkubacijom na 65°C.

### 3.1.8 Ligacija DNK sa plazmidnim vektorima

Ligacija DNK je vršena sa po 50 ng plazmidnih vektora pGEM-T Easy, pQE32, pMAL-c2X, pMAL-p4X, pFastBac HTB i sa po 150 ng pPIC9K i pBINAR-EGFP. Insert je bio u 3 puta molarnom višku u odnosu na vektor. Reakciona smeša je inkubirana preko noći na 4°C, Za ligaciju sa vektorima pQE32, pMAL-c2X, pMAL-p4X, pFastBac HTB,



pPIC9K i pBINAR-EGFP korišćeno je 3 U T4 DNK ligaze u 1X Rapid Ligation puferu (Fermentas).

Za ligaciju inserta sa vektorom pGEM-T Easy, korišćene su komponente iz pGEM-T Easy Vector Systems kita (Promega).

### 3.1.9 PCR

U 0,5 ml epruvetama pomešani su 10-20 ng DNK matrice, 0,2 mM dNTP smeša, 0,2  $\mu$ M prajmeri i odgovarajući pufer i polimeraza u zapremini 25 ili 50  $\mu$ l. Za kratke fragmente (ispod 500 bp) korišćena je AmpliTaq Gold DNK polimeraza (Applied Biosystems), a za duže fragmente, gde je bilo potrebno dobiti umnoške sa tačnom nukleotidnom sekvencom, korišćena je Advantage2 polimeraze (Clontech), koja u sebi sadrži i malu količinu *Pfu* polimeraze kojom se obezbeđuje tačnost umnožavanja. 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.

Imena prajmera i njihove sekvence su prikazani u tabeli 1. Profili PCR reakcija kao i parovi prajmera koji su korišćeni za pripremu ekspresionih konstrukata su prikazani u tabeli 2, a za RT PCR i Real Time RT PCR u poglavlju 3,1.10.

F8	gttcttgacacggggagcagc
R83	gacgattcgatacaagggagc
H3f	gaaattcgcaagtaccagaagag
H3r	ccaacaaggtatgcctcagc
rtAPLf	ccaaggagattgaggacagtgc
rtAPLr	tcggtgacaagtgagaaataatcg
YFPf	gtgaagttcgagggcgacac
YFPPr	ccttgatgccgttctctgc

P3	atgcccgggatgccacttctctc
P4	ggaattccttaatTTTTGGATCGATCACATTGTTG
P5	gtcaagcttaatTTTTGGATCGATCACATTGTTG
P6	atgcccggggccacatttccttg
P6His	atgcccgggcatcaccatcaccatcacgccacatttccttg
P8	gtcgacttaatTTTTGGATCGATCACATTGTTG
P9	ggtaccatgccacttctctc
P11	ggtaccatTTTTGGATCGATCACATTGTTG
P13	ggtaccggcgggcgggcgag
P16	tgtacatggccacatttccttg
BAC5	ccatgggagccacatttccttg
GEX3	gcgggccgcttaatTTTTGGATCGATAACATTGTTG
pUC/M13f	cccagtcacgacgttgtaaaacg
pUC/M13r	agcggataacaatttcacacagg

Tabela 1. Prikaz imena i sekvenci prajmera korišćenih u PCR reakcijama

### 3.1.10 RT-PCR i Real Time RT PCR

Za sintezu prvog lanca cDNK, 1  $\mu$ g poli(A)RNK je inkubiran sa 10  $\mu$ M oligoheksamernim prajmerima (Applied biosystems) 2 min na 70°C u finalnoj zapremini od 5  $\mu$ l. Smeša je zatim prebacivana na led 2 min i potom kratko centrifugirana. Dodat je 10X M-MuLV pufer pH 8,3 (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT) (BioLabs), 10 mM dNTP smeša i 200 U M-MuLV reverzne transkriptaze (BioLabs). Reakcija je tekla 1h na temperaturi od 37°C. Reakcija je zaustavljena inkubiranjem na 65 °C 15 min.

Nakon reakcije reverzne transkripcije, 10 puta razblažena sintetisana cDNK je korišćena kao matrica za PCR reakcije. Sekvence prajmera su date u Tabeli 1, a parovi prajmera i profili PCR reakcija u Tabeli 2.

PAROVI PRAJMERA	TARGET cDNK	PROFIL PCR REAKCIJE	DUŽINA PCR PRODUKTA
H3f/H3r	Histon 3	94°C/3min;	150 bp
rtAPLf/rtAPLr	FeAPL1	(94°C/30s, 60°C/30s, 72°C/30s) 25X	148 bp
YFPf/YFP <sub>r</sub>	EGFP	94°C/3min;	154 bp
YFPf/rtAPL <sub>r</sub>	EGFP-FeAPL1	(94°C/30s, 58°C/30s, 72°C/1	1497 bp
rtAPLf/YFP <sub>r</sub>	FeAPL1-EGFP	min) 28X	819 bp

Tabela 2. Prajmeri i profili RT-PCR reakcija.

Real time RT PCR je rađen u zapremini od 25  $\mu$ l, sa po 0,2  $\mu$ M svakog prajmera u 1X SYBER Green PCR smeši (Applied Biosystems). PCR je raden u ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Profil reakcije je preporučen os strane proizvođača (2 min na 50°C, 10 min na 95°C i (95°C/15 s, 60°C/1 min)x40 ciklusa). Sve PCR reakcije su rađene u triplikatu i sa kontrolom koja nije sadržavala matricu. Akumulacija PCR produkata je detektovana u realnom vremenu i analizirana u okviru 7500 System Software (Applied Biosystems) u okviru koga su određene i efikasnosti korišćenih prajmera, kao i standardne greške.

### 3.1.11 Priprema ekspresionih konstrukata

Za pripremu ekspresionih konstrukata, svi PCR umnošci su prvo ligirani sa vektorom pGEM-T Easy i sekvencirani. Inerti sa tačnom nukleotidnom sekvencom su isecani iz vektora sa odgovarajućim restrikcionim enzimima, ekstrahovani iz gela i ligirani sa odgovarajućim ekspresionim vektorom. Ligacionom smešom su prvo transformisane

DH5 $\alpha$  kompetentne ćelije, odakle su izolovani rekombinantni plazmidi u većoj količini. Prečišćenim plazmidima su transformisani odgovarajući ekspresioni sojevi. Prajmeri, profili PCR reakcija, ekspresioni konstrukti, vektori i sojevi su prikazani u Tabeli 3.



EKSPRESIONI SISTEM	PRAJMERI U PCR REAKCIJI	MATRICA	PROFIL PCR REAKCIJE	RESTRIKCIONA MESTA NA PRAJMERIMA	EKSPRESIONI KONSTRUKT	EKSPRESIONI VEKTOR (RE za linearizaciju)	EKSPRESIONI SOJ
<i>E. coli</i>	P6/P5	FeAPL1 cDNK (P3/P4 + vektor pGEM-T Easy)	94°C/3min; (94°C/30s, 60°C/30s, 68°C/ 90s) 5X; (94°C/30s, 68°C/2 min)20X; 72°C/5min	<i>SmaI/HindIII</i>	FeAPL1-His <sub>6</sub> (bez SP)	pQI32 ( <i>SmaI/HindIII</i> )	M15, BL21-pLysS, BL21-RIL, BL21-RP, Rosetta-gami
					MBP-FeAPL1 (bez SP)		pMAL-c2X pMAL-p4X ( <i>XmnI/HindIII</i> )
<i>Pichia pastoris</i>	P3/P4	FeAPL1 cDNK (P3/P4 + vektor pGEM-T Easy)	94°C/3min; (94°C/30s, 45°C/30s, 68°C/ 90s) 5X; (94°C/30s, 72°C/2 min)20X; 72°C/5min	<i>SmaI/EcoRI</i>	FeAPL1 (sa SP)	pPIC-9K ( <i>SnaBI/EcoRI</i> )	GS115
	P6/P4				FeAPL1 (bez SP)		
	P6His/P4				His <sub>6</sub> -FeAPL1 (bez SP)		

Kultura Insekataskin ćelija	BACS/GEX3	94°C/3min; (94°C/30s, 48°C/30s, 68°C/ 90s) 5X; 94°C/30s, 68°C/2 min) 20X; 68°C/5min	<i>NcoI/NodI</i>	His <sub>6</sub> -FeAPL1 (bez SP)	pFastBac HTB ( <i>NcoI/NodI</i> ) Transformacija DH10BAC Izolovanje BAKMIDA	SP9
	P9/P10	94°C/3min; (94°C/30s, 33°C/30s, 68°C/ 90s) 5X; (94°C/30s, 62°C/30s,68°C/90s)20X; 68°C/5min	<i>KpnI/SalI</i>	FeAPL1-His <sub>6</sub> (sa SP)		
Biljke		94°C/3min; (94°C/30s, 45°C/30s, 68°C/ 90s) 5X; (94°C/30s, 62°C/30s,68°C/90s)20X; 68°C/5min	<i>KpnI</i>	FeAPL1-GFP (sa SP)	pBINAR-EGFP Transformacija <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105	BY-2 ćelije, <i>Nicotiana benthamiana</i>
	P16/P8	94°C/3min; (94°C/30s, 50°C/30s, 68°C/ 90s) 5X; 94°C/30s, 68°C/2 min) 20X; 68°C/5min	<i>BsrGI/SalI</i>	GFP-FeAPL1 (bez SP)		
	P9/P13	94°C/3min; (94°C/30s, 45°C/30s, 72°C/ 30s) 5X; (94°C/30s, 60°C/30s,72°C/30s)20X; 72°C/5min	<i>KpnI</i>	SP-GFP		

Tabela 3. Priprema ekspresionih konstrukata- prajmeri, profili PCR reakcija, ekspresioni konstrukti, vektori i sojevi

### 3.1.12 Sekvenciranje DNK

Sekvenciranje DNK je rađeno na kapilarnom sekvenceru ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems) u Padovi, Italija.

## 3.2 Osnovne procedure rada sa RNK

### 3.2.1 Izolovanje ukupne RNK iz biljnog materijala

Ukupna RNK izolovana je iz 0,1-5 g tkiva heljde ili listova duvana po modifikovanoj metodi Doyle & Doyle, 1987. Da bi se inaktivirala RNK-aza, 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 min.

Tkivo je zamrzavano u tečnom azotu i mleveno u fini prah. Dodavana su tri volumena toplog ekstrakcionog pufera (2% CTAB; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 2% PVP i 20 mM DTT), i smeša je ostavljena u vodenom kupatilu na 65°C dok temperatura ekstrakcione smeše ne dostigne datu temperaturu. Zatim je dodavan isti volumen smeše SEVAG (izoamilalkohol:hloroform=24:1) i blago je mućkano da bi se izmešale organska i vodena faza. Razdvajanje faza je vršeno centrifugiranjem 10 min na 5000 obr/min u kliničkoj centrifugi (Ependorf) 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 ribonukleinske kiseline taložene dodavanjem 2 M LiCl i inkubiranjem na -80°C 1 h. Nakon centrifugiranja 15 min na 5000 obr/min, dobijeni talog je prosušen na vazduhu i rastvoren u 30 µl H<sub>2</sub>O. Uklanjanje DNK je vršeno dodavanjem 2 µl *DNase* I (Pharmacia) i inkubacijom 1 h na 37°C. Dalje prečišćavanje RNK je rađeno sa RNeasy Plant Mini kitom (Qiagen). Vodeni rastvor RNK je mešan sa 350 µl RLT pufera sa 20 mM DTT, zatim je dodato 250 µl etanola i smeša je potom nanošena na Rneasy Mini spin kolonu. Nakon centrifugiranja na 10000 obrt/min 30 s, kolonice su prane 2 puta sa po 500 µl pufera RPE. Posle svakog pranja kolonice su centrifugirane u istim uslovima. Elucija RNK je vršena sa 30 do 50 µl RNase-free vode.

Za izolovanje RNK iz BY-2 ćelija, korišćen je RNeasy Plant Mini kit (Qiagen), po uputstvu proizvođača. Izmenjen je bio samo početni korak, gde je nakon dodavanja 450 µl

RLT pufera i 40 mM DTT u talog BY-2 ćelija (400  $\mu$ l ćelijske suspenzije je staloženo 1 min na 200 g), vršena sonifikacija 1 do 2 s. Rastvor je inkubiran na 56°C, 1 do 3 min. Lizat je nanet na QIAshredder spin kolonicu i centrifugiran 2 min. U supernatant je dodato 0,5 volumena etanola i uzorak je nanet na RNeasy Mini spin kolonu. Nakon centrifugiranja na 10000 obrt/min 30 s, kolonice su prane sa 700  $\mu$ l pufera RW1 i 2 puta sa po 500  $\mu$ l pufera RPE. Posle svakog pranja kolonice su centrifugirane u istim uslovima. Elucija RNK je vršena sa 30 do 50  $\mu$ l RNase-free vode. Uklanjanje DNK iz RNK izolata vršena je pomoću DNA-free DNase Treatment and Removal kit (Ambion), prema uputstvu proizvođača. U ~45  $\mu$ l izolovane RNK, dodavano je 5  $\mu$ l 10X DNase I pufera i 1  $\mu$ l DNase I i smeša je inkubirana na 37°C 30 min. DNaza I je inaktivirana inkubiranjem sa 5  $\mu$ l Dnase Inactivation reagensa na sobnoj temperaturi 2 min. Nakon centrifugiranja na 10000 g 90 s, supernatant sa prečišćenom RNK je prebacivan u čistu tubu.

### 3.2.2 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 pufer, 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% saharoza) i 1  $\mu$ 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 25S 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.



### 3.3 Osnovne procedure rada sa proteinima

#### 3.3.1 Izolovanje ukupnih proteina iz biljnog materijala

Za izolovanje totalnih proteina iz biljaka ili ćelijskih suspenzija, korišćeni su: kiseli rastvor (1M NaCl, 1% Triton-X100), u koji je, nakon mešanja sa biljnim materijalom, dodavana koncentrovana HCl do postizanja pH 4,0 i neutralni pufer (10 mM Tris, pH 7,5, 0,5 M NaCl).

Klijanci, semena, listovi, koren, stablo i cvet heljde, kao i listovi duvana su prvo zaleđeni u tečnom azotu, a zatim sprášeni tučkom u avanu do finog praha, a BY-2 ćelije i protoplasti su staloženi na 100 g 5 min. U ovako pripremljeni buljni materijal, dodavano je 2 do 3 volumena odgovarajućeg pufera u odnosu na masu biljnog materijala. Smeša je sonifikovana tri puta po 10 s na ledu. Dobijena suspenzija je centrifugirana u mikrofugi 15 min na 10000 g, na 4 °C. Supernatanti su čuvani na -20°C, ukoliko nisu odmah korišćeni.

#### 3.3.2 Acetonska precipitacija

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 na 9000 g, na 4° C.

#### 3.3.3 Određivanje koncentracije proteina

Određivanje koncentracije proteina rađeno je po Bradfordu, 1976. 2,5-10 µL proteinskog ekstrakta mešano je sa 790-797,5 µL vode i 200 µL Bradford reagensa (Bio-Rad). Koncentracija proteina određivana je merenjem apsorbancije na spektrofotometru Amersham Biosciences Ultrospec 3300 pro.

#### 3.3.4 Elektroforeza proteina

Svi proteinski ekstrakti, prečišćeni rekombinantni proteini, kao i produkti digestija specifičnih supstrata u proteinaznim esejima, vizuelizovani su SDS-PAGE metodom koja je vršena u diskontinuiranom sistemu gelova (modifikacija metode po Leammli, 1970).

Korišćena je aparatura za vertikalnu elektroforezu na pločama BioRad. 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  $\beta$ -merkaptetoanol 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% 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% APS. Gelovi su nalivani između ploča tako da gel za razdvajanje predstavlja 1/4 celog gela. Dimenzije ploča su 7 x 5 cm (BioRad), a debljine gelova 1,5 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 20mA.

Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini u gelovima su fiksirani i bojeni 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).

### 3.3.5 „Western blot“ analiza

U imunoblot esejima korišćena su komercijalna mišija Anti-His monoklonska antitela (Qiagen) i Anti-MBP antiserum zeca (New England Biolabs).

Dva sintetička peptida, C-IPIYARNKSSTVQS (124-137 aminokiseline FeAPL1) i CLVSHRFDDTPQSGD (230-244 aminokiseline) su služila za produkciju poliklonskih Anti-FeAPL1 antitela u zečevima. Svi koraci, od sinteze peptida do afinitetnog prečišćavanja antitela na sintetičke peptide su urađeni od strane „Custom Antibody and Immunoassay Services“ kompanije Biogenes GmbH, Berlin, Nemačka.

Rekombinantni FeAPL1 i proteinski ekstrakti su nakon elektroforeze na SDS-PAGE transferovani na PVDF membranu (Millipore) u Fastblot B43 transfer system (Biometra), po uputstvu proizvođača. Nakon elektroforeze, gel je inkubiran u katodnom puferu (25 mM Tris-HCl, pH10,4, 40 mM glicin, 20% (v/v) metanol) 5 min. PVDF membrana je pripremljena za transfer tako što je kratko potopljena u metanol, isparna u vodi 5 min i

inkubirana u anodnom puferu 2 (25 mM Tris-HCl, pH 10,4, 20% (v/v) metanol) 5 min. Anoda je nakvašena anodnim puferom 1 (300 mM Tris-HCl, pH 10,4, 20% (v/v) metanol) i na nju su slagani redom: 2 sloja 3MM papira nakvašena anodnim puferom 1, 1 sloj 3MM papira nakvašen anodnim puferom 2, PVDF membrana, gel i 3 sloja 3MM papira nakvašena katodnim puferom). Transfer je trajao 35 do 40 min pri struji od 4,5 mA po 1 cm<sup>2</sup> membrane. Nakon transfera, svi dalji koraci rađeni su na sobnoj temperaturi.

Za detekciju sa Anti-His i Anti-MBP antitelima, membrane su oprane u TBST puferu (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl i 0.1% Tween-20) i inkubirane u bloking puferu (5% nemasno mleko u TBST puferu) preko noći na 4°C. Membrane su inkubirane sa Anti-MBP antiserumom (1:10000 razblaženje) u TBST puferu tokom 1 h. Nakon pranja u TBST puferu, 3 puta po 5 min, membrane su inkubirane sa anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Sigma) (1:10000 razblaženje) u TBST puferu i ponovo oprane 3 puta po 5 min.

Za detekciju sa anti-FeAPL1 antitelima, korišćena je ista procedura kao za Anti-His i Anti-MBP antitela, s tim što je korišćen pufer PBS (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, and 0,1% Tween-20, pH 7,5) i anti-FeAPL1 antitela (1:100 razblaženje).

U svim slučajevima, hemiluminiscencija je detektovana upotrebom ECL-Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) prema uputstvu proizvođača. Membrane su prekrivene rastvorom reagenasa A i B, u odnosu 40:1 i inkubirane 5 min na sobnoj temperaturi i eksponirane prislanjanjem na X-ray film (Kodak) 3 do 10 s.

### 3.3.6 Proteinazni eseji u „rastvoru“

Proteinski ekstrakti (50µg) ili prečišćeni rekombinantni proteini (3 µg do 20 µg) su pomešani sa 10-20 µg BSA, kazeina ili hemoglobina u 100 µl odgovarajućeg pufera. Reakcione smeše su inkubirane u toku 15 min, 30 min, 1 h, 3 h i preko noći na 37°C i potom analizirane na SDS-PAGE.

Puferi korišćeni za digestije:

0,1 M Na-citrat, pH 3,0 i pH 4,0; 0,1 M Na-acetat, pH 5,0; 0,1 M fosfat, pH 6,0 i pH 7,0; 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, bez ili sa proteaznim inhibitorima: PMSF (1 mM), EDTA (10 mM) i antipain (100 µM), pepstatin A (10 µM).

### 3.3.7 Imunocitohemija

Netransformisane i transformisane 7 dana stare suspenzije BY-2 ćelija (500  $\mu$ l) su oprane u 1xPBS puferu (140 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.2) i fiksirane u rastvoru 3% paraformaldehida u 1xPBS puferu 1h na sobnoj temperaturi. Nakon 5 min pranja u rastvoru 0.1 M glicina u 1xPBS puferu i čistom 1xPBSu, ćelije su inkubirane 15 min u rastvoru 1% celulaze i 0.5% macerozima u 1xPBS puferu. Oprane ćelije su nanete na pločice tretirane poly-L-Lys i osušene na vazduhu. Permeabilizacija ćelija je vršena sa 1% Triton X-100 u 1xPBSu tokom 10 min, zatim su oprane i blokirane rastvorom 1% BSA u PBS 10 min. Nakon jednočasovne inkubacije sa anti-FeAPL1 antitelima (1:100 razblaženje) u vlažnoj atmosferi, pranja i inkubacije sa sekundarnim anti-rabbit FITC-conjugated antitelima (Sigma) (1:200), BY-2 ćelije su oprane u 1xPBS i H<sub>2</sub>O. Nukleusi su obojeni fluorescentnom bojom DAPI (0.5  $\mu$ g/ml, Qbiogene). Fluorescencija je detektovana na fluorescentnom mikroskopu (Olympus BX51) sa ekscitacionim filterom 450-490 nm i emisionim filterom 515-560 nm..

## 3.4 Rad sa bakterijama

### 3.4.1 Bakterijski sojevi, vektori i medijumi

SOJEVI *E. coli*:

**M15(pREP4)** (Qiagen): Nal<sup>s</sup> Str<sup>s</sup> rif<sup>s</sup>, lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> raecA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup>

**BL21 (DE3)pLysS** (Promega): F<sup>-</sup>, ompT, hsdSB (rB<sup>-</sup>,mB<sup>-</sup>), dcm, gal,  $\lambda$ (DE3), pLysS, Cam<sup>r</sup>

**BL21(DE3)(RIL)** (Stratagene):F<sup>-</sup> ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal  $\lambda$ (DE3) endA Hte (argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>)

**BL21(DE3) (RP)** (Stratagene): F<sup>-</sup> ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal  $\lambda$ (DE3) endA Hte (argU proL Cam<sup>r</sup>)

**Rosetta-gami** (Novagen):  $\Delta$ (ara-leu)7697  $\Delta$ lacX74  $\Delta$ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'(lac<sup>+</sup>lacI<sup>q</sup> pro) gor522::Tn10 trxB pRARE(Cam, Kan, Str, Tet)



**DH10BAC** (Invitrogen) F<sup>-</sup> *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74*  
*recA1 endA1 araD139* Δ (*ara,leu*)7697 *galU galKλ rps nupG/bMON14272/pMON7124*

**DH5α** F<sup>-</sup> *endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 deoR nupG lacZ* Δ M15 *hsdR17*

Soj *Agrobacterium tumefaciens*:

**EHA105**, genotype C58 pTiBo542; T-region::aph, Km(S); A281 derivative harboring pEHA101, T-DNA replaced with nptII, elimination of T-DNA boundaries unconfirmed, super-virulent

VEKTORI:

p**GEM-T Easy** (Promega), p**QE32** (Qiagen), p**MAL-c2X**, p**MAL-p4X** (New England Biolabs), p**PIC-9K** (Invitrogen), p**FastBac HTB** (Invitrogen), p**BINAR-EGFP**

Hranljivi medijumi:

**LB** medijum: 1% (w/v) tripton; 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) ekstrakt kvasca, pH 7,5.<sup>23</sup> sa ili bez 0,2% glukoze

**SOC** medijum: 2% (w/v) tripton; 0,5% (w/v) ekstrakt kvasca; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM glukoza (Hanahan, 1983).

**LA** hranljiva podloga-LB medijum sa 1,5% (w/v) agrom

### 3.4.2 Uzgajanje i održavanje bakterija

Kulture *E. coli* za potrebe transformacije i izolovanja plazmida su uzgajane preko noći na 37°C na čvrstom ili tečnom LB medijumu uz dodatak odgovarajućih antibiotoka. 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.

Kulture *Agrobacterium tumefaciens*, soj EHA105, su gajene u mraku na 28°C u tečnom ili čvrstom LB medijumu u prisustvu 10μg/ml rifampicina.

### 3.4.3 Priprema kompetentnih bakterija za „Heat shock“ transformaciju

LB medijum (100 ml) je inokulisan sa kolonijama poraslim na čvrstoj podlozi. Bakterije su gajene na 37°C uz intenzivnu aeraciju (180 obrt/min) do postizanja  $OD_{600}=0,3-0,4$ . Rast bakterijske kulture zaustavljan je premeštanjem na led i inkubiranjem 10-15 min. Od ovog momenta sve je rađeno na ledu, hladnim nastavcima i rastvorima. Bakterije su centrifugirane 15 min na 6000 obrt/min u SS34 rotoru. Talog ćelija je resuspendovan u 100 ml hladnog 0,1 M  $CaCl_2$  i inkubiran na ledu 15 min i centrifugiran 15 min na 6000 obrt/min u SS34 rotoru. Ćelije su resuspendovane u 8 ml hladnog RF2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM  $CaCl_2$ , 15% glicerol, pH 6,8) i inkubirane na ledu 15 min, nakon čega su razdeljene u alikvote od po 50  $\mu$ l. Ovako pripremljene ćelije su brzo smrznute u tečnom azotu i čuvane najmanje 6 meseci na -70°C.

### 3.4.4 Priprema elektrokompetentnih bakterija *Agrobacterium tumefaciens*

200 ml YEP medijuma (1% kvašćev ekstrakt, 1% tripton-pepton, 0,5% NaCl, pH 7,0) je inokulisan sa 2 ml sveže prekonocne kulture bakterija. Bakterije su gajene na 29°C uz mućkanje (250 obrt/min) do postizanja  $OD_{600}=0,3$ . Od ovog momenta sve je rađeno na ledu, hladnim nastavcima i rastvorima. Bakterije su centrifugirane 10 min na 5000 obr/min na 4°C. Talog ćelija je resuspendovan u 20 ml hladnog, 1mM HEPES-a, pH 7,0 i centrifugiran 10 min na 5000 obr/min na 4°C. Ovaj korak je ponavljan dva puta. Zatim su ćelije resuspendovane u 2 ml hladnog 10% glicerola i razdeljivane u porcije od po 40  $\mu$ l. Ovako pripremljene ćelije su brzo smrznute u tečnom azotu i čuvane najmanje 6 meseci na -70°C.

### 3.4.5 Transformacija *E. coli* toplotnim stresom („Heat shock“ transformacija)

Alikvoti od po 50  $\mu$ l kompetentnih bakterija (DH5 $\alpha$ , M15(pREP4, BL21 (DE3)pLysS, BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, BL21-CodonPlus(DE3)-RP, Rosetta-gami, DH10BAC), skladištenih na -80°C, su otopljeni na sobnoj temperaturi i inkubirani sa 50 ng vektora ili

ligacione smeše na ledu 30 min-1h. Smeša je inkubirana 90 s na 42°C u vodenom kupatilu i potom je brzo prebačena na led 5 min. Oporavak na 37°C u LB medijumu, uz intenzivnu aeraciju (220 obrt/min), trajao je 1h, nakon čega su bakterije razmazivane na LA podloge sa odgovarajućim antibioticima i gajene na 37°C preko noći.

DH10BAC kompetentne ćelije su transformisane na isti način uz nekoliko modifikacija. Inkubacija na 42°C je trajala 45 s, a oporavak je vršen na 37°C uz intenzivnu aeraciju (225 obrt/min) u toku 4 h u SOC medijumu. Ćelije su razmazivane na LA podlogu sa 50 µg/ml kanamicina, 7 µg/ml gentamicina, 10 µg/ml tetraciklina, 100 µg/ml Bluo gal i 40 µg/ml IPTG. Šolje su inkubirane na 37°C 2 dana. Bele krupne kolonije su birane za proveru prisustva rekombinantnog bakmida.

### 3.4.6 Transformacija *A. tumefaciens* elektroporacijom

Transformacija EHA105 soja *Agrobacterium tumefaciens* je rađena elektroporacijom na uređaju BIO RAD Gene pulser pod uslovima od 25 µF, 200 Ω i 2.5 kV u BioRad kivetama sa razmakom između elektroda od 2 mm. Smeša je sadržavala 40 µl bakterija i 200 ng vektora. Bakterije su oporavljane 2 do 4 h na 28°C, uz intenzivnu aeraciju (220 obrt/min) u LB medijumu i potom razmazivane na LA podloge sa 50 µg/ml kanamicina i 10 µg/ml rimfapicina i inkubirane 2 do 3 dana na 28°C.

### 3.4.7 Ekspresija rekombinantne proteinaze FeAPL1 (rFeAPL1) u sojevima *E. coli*

#### 3.4.7.1 Citoplazmatska ekspresija rFeAPL1

Ekspresioni vektori pQE32 i pMAL-c2X sa insertom FeAPL1 cDNA su korišćeni za transformaciju kompetentnih *E. coli* sojeva M15, BL21(DE3)pLysS, BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, BL21-CodonPlus (DE3)-RP i Rosetta-gami.

#### 3.4.7.2 Brza procedura za detekciju klonova koji proizvode rFeAPL1

Bakterijske kulture (2 ml) su gajene preko noći, na 37°C u LB medijumu koji je sadržavao: 100 µg/ml ampicilina i 25 µg/ml kanamicina u slučaju M15 soja, 100 µg/ml ampicilina i 34,5 µg/ml hloramfenikola u slučaju svih BL21 sojeva i 100 µg/ml

ampicilina, 15 µg/ml kanamicina, 12,5 µg/ml tetraciklina i 34,5 µg/ml hloramfenikola u slučaju Rosetta-gami soja.

500 µl prekonoćnih kultura je inokulisano u 1,5 ml prethodno zagrejanog LB medijuma sa antibioticima. Za gajenje bakterija koje su bile transformisane sa rekombinantnim vektorom pMAL-c2X korišćen je LB medijum sa 0,2% glukozom (sa antibioticima). Kulture su rasle 30 min na 37°C uz intenzivnu aeraciju (180 obt/min), nakon čega je ekspresija indukovana dodatkom IPTG u finalnoj koncentraciji od 1 mM i mešanje je nastavljeno naredna 3 h na 37°C.

Indukovane kulture (1 ml) su centrifugirane 1 min na 14000 obrt/min u mikrocentrifugi. Talozi su resuspendovani u 100 µl pufera B (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8,0). Lizati (10 µl) su analizirani na SDS-PAGE.

Klonovi koji su proizvodili rekombinantni protein su selektovani za analizu solubilnosti proteina. Talozi indukovanih kultura (po 1 ml) su resuspendovani u odgovarajućim puferima. Za sojeve sa vektorom pQE32 korišćen je "Lysis" pufer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0), a za sojeve sa vektorom pMAL-c2X korišćen je "Column" pufer (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA). Lizati su sonifikovani 3 puta po 10 s (SONIPENIO 150 MSE (UK) LTD) na ledu i centrifugirani 15 min na 14000 obrt/min na 4°C. Talozi su potom resuspendovani u 100 µl pufera B. Supernatanti (20 µl) i talozi (10 µl) su analizirani na SDS-PAGE .

### 3.4.7.3 Optimizacija uslova ekspresije rFeAPL1

Klonovi koji su produkovali najveću količinu rekombinantnog proteina su dalje korišćeni za produkciju proteina na velikoj skali. Odgovarajući LB medijum (500 ml do 3 l) sa antibioticima je inokulisan sa prekonoćnom kulturom u odnosu 1:50 i bakterije su gajene na 37°C, uz intenzivnu aeraciju, do dostizanje OD<sub>600</sub> 0.5-1,1. Ekspresija je potom indukovana dodatkom IPTG u finalnim koncentracijama 0,1, 0,3, 0,5 ili 1 mM.

Kulture su gajene na različitim temperaturama (16, 25, 30 ili 37°C) u trajanju od 15 min, 30 min, 1, 2, 3, 5, 7 h. Čelije su taložene centrifugiranjem 20 min na 4000 g, na sobnoj temperaturi. Talozi su resuspendovani u Lysis puferu ili njegovim modifikacijama (300 mM ili 1 mM NaCl, sa ili bez 0,2% Triton-X 100 ili Tween 20, 10% ili 50% glicerol i 10 mM β-merkaptioetanol) ili u Column puferu. Dva do pet ml pufera je dodavano po gramu ćelija. Resuspendovane ćelije su inkubirane 30 min na ledu uz dodatak 1 mg/ml



lizozima. Nakon sonifikacije (3 puta po 10 s na ledu), lizati su centrifugirani 20 min na 10000 g na 4°C. Supernatanti i talozi su analizirani na SDS-PAGE.

Supernatanti su korišćeni za prečišćavanje rekombinantnog proteina u nativnim, a talozi za prečišćavanje u denaturišućim uslovima i „refolding“ FeAPL1.

#### 3.4.7.4 Prečišćavanje u nativnim uslovima

Nakon sonifikacije ćelija i centrifugiranja, supernatanti su pomešani sa 200 µl do 1 ml prethodno opranih 50% Ni-NTA rezina (ekspresija sa vektora pQE32) ili amiloza rezina (ekspresija sa vektora pMAL-c2X) i lagano mućkani obrtanjem, na 4°C 1 h ili preko noći. Rezine su sakupljene centrifugiranjem 30 s na 1000g. Nakon taloženja, Ni-NTA rezine su prane 2 do 4 puta u 5-10 volumena pufera za pranje (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0), u trajanju od po 30 min na 4°C i protein je eluiran sa 200 µl do 1 ml elucionog pufera (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0) tokom 1 h do preko noći. Amiloza rezine su prane na isti način, uz upotrebu Column pufera, dok je protein eluiran sa Column puferom koji je sadržavao 10 mM maltozu. Prečišćeni proteini su analizirani SDS-PAGE i Western blot metodama.

#### 3.4.7.5 Prečišćavanje u denaturišućim uslovima

Talozi resuspendovani u puferu B su pomešani sa 200 µl do 1 ml prethodno opranih 50% Ni-NTA rezina i lagano mućkani obrtanjem, na sobnoj temperaturi 1 h. Nakon centrifugiranja, rezine su oprane u 5 ml pufera B i 2 do 3 puta u puferu C (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 6,3) u trajanju od po 30 min. Rekombinantni FeAPL1 je eluiran u 1 do 2 ml pufera E (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 4,5) tokom 1 h i analiziran SDS-PAGE i Western blot metodama.

#### 3.4.7.6 Periplazmatska ekspresija rFeAPL1 u *E. coli*

Ekspresioni vektor pMAL-p4X sa insertom FeAPL1 cDNA je korišćen za transformaciju kompetentnih *E. coli* sojeva BL21(DE3)pLysS i Rosetta-gami.

Bakterije su gajene u LB medijumu sa 0,2% glukozom u prisustvu odgovarajućih antibiotika.

50 ml LB medijuma je inokulisano sa 5 ml prekonocne kulture i bakterij su gajene na 37°C na 180 obrt/min do dostizanja OD<sub>600</sub> 0,5. Ekspresija je indukovana dodatkom IPTG u finalnoj koncentraciji od 1 mM i šejkiranje je nastavljeno naredna 3h na 25°C.

Indukovane kulture su centrifugirane na 5000 obrt/min 10 min na 4°C. Talozi su resuspendovani u 10 ml rastvora 30 mM Tris, pH 8,0 i 20 % saharoza. Nakon dodavanja EDTA (finalno 1 mM), bakterije su inkubirane na sobnoj temperaturi 10 min i centrifugirane pod istim uslovima. Talog je resuspendovan u 8 ml hladnog 5 mM MgSO<sub>4</sub> i inkubiran na ledu uz mućkanje 10 min. Nakon centrifugiranja, izdvojen je supernatant koji predstavlja periplazmatsku proteinsku frakciju koja je, ukoliko nije odmah korišćena, do upotrebe čuvana na -20°C.

Za afinitetno prečišćavanje rMBP-FeAPL1 na amiloza rezinama, u prečišćenu periplazmatsku frakciju je dodavan Tris pH 7,4 (finalno 20 mM) i dalje je rađeno kao što je opisano za prečišćavanje citosolnog rMBP-FeAPL1.

### 3.4.8 Renaturacija strukture (“refolding”) rHis<sub>6</sub>-FeAPL1

Refolding afinitetno prečišćenog rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 je rađen dijalizom i brzom dilucijom u nekoliko pufera.

Prečišćen protein (200 µl) je u stavljan u plastične tube od 0,5 ml koje su zatvarane crevom za dijalizu (pore size 12000 Da MWCO, Sigma), stavljane u plutajući nosač koji je uranjan u pufer za dijalizu tako da rastvor proteina bude u kontaktu sa crevom za dijalizu i uronjen u pufer. Dijaliza je rađena na 4°C, u 1,5-2 l odgovarajućeg pufera, uz mešanje na magnetnoj mešalici 16 h do 24 h.

Brza dilucija (rapid dilution) je rađena tako što je u prethodno ohlađeni pufer (4°C), rastvor proteina dodavan kap po kap pri protoku 1 ml/30 min. Količina proteina i pufera su varirali, ali je finalna koncentracija proteina bila <0,1 mg/ml. Rastvor za dijalizu je sve vreme mešan na magnetnoj mešalici. Nakon dodavanja proteina, mešanje je nastavljeno 24- 48 h na 4°C. Rastvor proteina je ukoncentrisan preko Amicon Ultra 15 kolonica (Millipore).

## “REFOLDING” PUFERI:

**Pufer I**

200 mM Tris-HCl pH 8,0  
 10 mM EDTA  
 1 M L-Arg  
 0,1 M PMSF  
 5 mM redukovani glutation  
 0,5 mM oksidovani glutation

**Pufer II**

20 mM HEPES, pH7,8  
 40 mM NaCl  
 0,2 mM EDTA  
 1 nM DTT  
 5%glicerol

Sastav ostalih pufera, u kojima su refoldovane druge aspartične proteinaze je dat na <http://refold.med.monash.edu.au>.

### 3.5 Rad sa kvascem *Pichia pastoris*

Za ekspresiju rekombinantnog FeAPL1, korišćen je *Pichia pastoris* soj GS115 (his4) (Invitrogen). FeAPL1 cDNK je ligirana sa ekspresionim vektorom pPIC9K (Invitrogen). Rekombinantni vektori, linearizovani sa *Bgl*III restrikcionim enzimom, su korišćeni za transformaciju GS115 soja.

#### 3.5.1 Uslovi gajenja i medijumi

Kvasci su gajeni na bogatoj **YPD** podlozi (2% glukoza, 2% bakto-pepton, 1% kvašćev ekstrakt, pH 6,5). Za selekciju His<sup>+</sup> transformanata, korišćena je minimalna **MD** podloga (2% glukoza, 0,5% amonijum sulfat, 0,17% azotna baza kvasca, rastvor aminokiselina (0,5% L-metanol, 0,5% L-glutaminska kiselina, 0,5% L-lizin, 0,5% L-leucin, 0,5% L-izoleucin), 1,7% agar). Tečni medijumi za gajenje i indukciju ekspresije su bili: **BMGY** (2% bakto-pepton, 1% kvašćev ekstrakt, 0,13% kvašćeve azotne baze, 0,04% biotin, 1% glicerol, 10% 1M kalijum fosfatni pufer, pH 6,0) i **BMMY** (isti sastav kao i **BMGY**, osim zamene glicerola 0,5% metanolom). Rast u tečnim medijumima je uvek bio na 30°C, uz intenzivnu aeraciju, 220 obrt/min. Problem kontaminacije je rešavan uvođenjem antibiotika tetraciklina u koncentracijama 10 ili 100 µg/ml medijuma, u zavisnosti od dužine kultivacije.

### 3.5.2 Transformacija kvasca *P. pastoris* i indukcija ekspresije

Za transformaciju kvašćevih ćelija korišćen je EasyComp Transformation Kit (Invitrogen). Nekompetentne ćelije su pripremane za transformaciju hemijskim putem, tako što su gajene u 10 ml YPD medijuma na 30°C, uz snažnu aeraciju, do OD<sub>600</sub> 0,6-1,0. Sakupljanje ćelija je vršeno centrifugiranjem na 500 g 5 min na sobnoj temperaturi. Ćelije su zatim resuspendovane u jednakoj zapremini Rastvora I i ponovo taložene. Talog je ponovo resuspendovan u 1 ml Rastvora I. Po 50 µl takve suspenzije je korišćeno za transformisanje jednim plazmidnim uzorkom. Po preporuci proizvođača, ćelije su pre korišćenja zamrznute na -80°C.

Zapremina DNK rastvorene u vodi, dodavane ćelijskoj suspenziji, bila je manja od 5 µl (oko 3 µg plazmidne DNK). Po dodavanju DNK, u smešu DNK/ćelije dodavan je 1 ml Rastvora II. Transformaciona reakcija je inkubirana na 30°C 1 h, uz povremeno mešanje. Nakon inkubacije, ćelije su izlagane termičkom stresu u trajanju od 10 min na 42°C. Ćelije su zatim podeljene u dva alikvota i svaki od njih je oporavljan u 1 ml YPD medijuma inkubiranjem na 30°C, uz intenzivno mućkanje 1h. Ćelije su staložene na 3000 g 5 min na sobnoj temperaturi. Svaki alikvot ćelija je resuspendovan u 500 µl Rastvora III, a zatim su spojeni. Nakon ponovljenog centrifugiranja, talog je resuspendovan u 100 µl Rastvora III.

Ćelije su utrljavane na MD podlogu i inkubirane 2-3 dana na 30°C. Transformisani His<sup>+</sup> mutanti su prebacivani na YPD podlogu sa 0,2 mg/ml G418 antibiotika i rasli 2 do 3 dana na 30°C. Ćelije sa šolja u prebacivane u 10 ml BMGY medijuma sa 10 µg/ml tetraciklina i inkubirani preko noći na 30°C na 200 obrt/min. 10 ml svežeg BMGY medijuma sa 100 µg/ml tetraciklina je inokulisano sa 10 µl prekonoćne kulture i inkubirano pod istim uslovima 3 dana. Ćelije su staložene na 6000 obrt/min 10 min na sobnoj temperaturi. Talog je resuspendovan u 10 ml BMMY medijumu sa 100 µg/ml tetraciklina i ćelije su gajene 7 dana. Indukcija ekspresije je vršena dnevnim dodavanjem metanola u finalnoj koncentraciji 0,5%. Ćelije su taložene centrifugiranjem na 6000 obrt/min 45 min na 4°C, a proteini medijuma su precipitirani i analizirani na SDS-PAGE.



## 3.6 Rad sa kulturom insekatskih ćelija

### 3.6.1 Priprema konstrukta

FeAPL1 cDNK (BAC5/GEX3) je ligirana sa ekspresionim vektorom pFastBac HTB (Invitrogen) iza taga od 6 histidina i pod kontrolom polihedrinskog promotora. Ligacionom smešom su transformisane DH5 $\alpha$  ćelije, iz kojih je potom, izolovan rekombinantni plazmid. Ovim vektorom su transformisane DH10BAC kompetentne bakterije koje sadrže bakulovirusni „shuttle“ vektor (bakmid) i „helper“ plazmid i u kojima dolazi do formiranja rekombinantnog bakmida koji sadrži željeni konstrukt za ekspresiju. Nakon izolovanja bakmida, prisustvo inserta u rekombinantnom bakmidu je provereno PCR reakcijom sa prajmerima pUC/M13f/pUC/M13r. Profil PCR reakcije je bio: 94°C/5min; (94°C/45 s, 50°C/45 s, 72°C/ 5 min) 35X

### 3.6.2 Ekspresija rFeAPL1 u insekatskim ćelijama Sf9

Za ekspresiju rekombinantnog FeAPL1, korišćene su Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) insekatske ćelije (Invitrogen). Ćelije su gajene kao adherentna kultura na 27°C, u TC-100 medijumu (Invitrogen) sa 10% FBS. Po dostizanju kofluentnosti, ćelije su pasażirane u odnosu 1:5.

4  $\mu$ l bakmidne DNK (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) je pomešano sa 96  $\mu$ l medijuma, a 6  $\mu$ l Cellfectin reagensa je razblažen u 100  $\mu$ l medijuma. Ove dva rastvora su spojena, smeša je lagano promešana i inkubirana 45 min na sobnoj temperaturi kako bi se formirao DNK-lipidni kompleks.

Za potrebe transfekcije, 0,9x10<sup>5</sup> Sf9 ćelija u 2 ml Sf-900 II SFM medijuma (Gibco BRL) je zasejano u petri šolje dijametra 35 mm. Ćelije su inkubirane na 27°C 1 h kako bi se zalepile za dno suda. Ćelije su, potom, isprane sa Sf-900 II SFM medijumu 2 puta. DNK-lipidni kompleks je razblažen sa 800  $\mu$ l ovog medijuma i dodat u ćelije, koje su, zatim, inkubirane 5 h na 27°C. Nakon uklanjanja DNK-lipidnog kompleksa, u ćelije je dodato 2 ml kompletnog medijuma i njihovo gajenje je nastavljeno pod istim uslovima do pojave znakova kasne viralne infekcije (odlepljivanje sa dna petri šolje, granulacija, liza ćelija). Ćelije su dnevno proveravane pod svetlosnim mikroskopom počevši od 24 h nakon transfekcije. Nakon što su primećeni znaci kasne virusne infekcije, medijum je sakupljen,

centrifugiran na 1000 g 5 min i čist supernatant koji sadrži virusne partikule (P1 viralni stok) je čuvan u mraku na 4°C. Za preliminarnu detekciju ekspresije, ćelije su odlepljene sa dna suda, sakupljene centrifugiranjem na 1000 g 5 min, oprane 2 puta sa po 2 ml 1xPBS puferom i finalno staložene centrifugiranjem. Talog je resuspendovan u 300 µl pufera 20 mM Tris, pH 8,0 i 150 mM KCl, sonifikovan 2 puta po 15 s i centrifugiran na 20000 g 10 min. Po 30 µl supernatanta i taloga resuspendovanog u 300 µl istog pufera su analizirani na SDS-PAGE.

## 3.7 Rad sa biljnim materijalom

### 3.7.1 Biljni materijal

Heljda (*Fagopyrum esculentum* Moench, cv. Darja) i duvan (*Nicotiana benthamiana*) su uzgajani u stakleniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

Kod heljde, period od pojave cveta do zrelog semena traje oko 30 dana. Seme 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 DAF (od engl. »Days After Flowering«), kao što je uobičajeno u literaturi. Semena su sakupljana iz različitih faza sazrevanja: <9 DAF, 9-11 DAF; 11-14 DAF; 14-17 DAF; 17-19 DAF; 19-21 DAF i 23-28 DAF.

Različiti biljni organi heljde su sakupljani i ukoliko nisu korišćeni odmah u svežem stanju, zamrzavani su u tečnom azotu i čuvani na -70°C. Zrela semena nisu zamrzavana, već su čuvana na suvom mestu na sobnoj temperaturi.

BY-2 ćelijska linija duvana je gajena u TSC medijumu (tobacco suspension cell) na 26°C u mraku uz intenzivnu aeraciju (130 obrt/min) (Nagata *et al*, 1992). Tečne kulture su održavane tako što su alikvoti od po 2,5 ml 7 dana stare kulture prebacivani u 25 ml svežeg TSC medijuma.

## MEDIJUMI:

**TSC medijum, pH 5,8**

1X MS-macro  
 1X MS-micro  
 1X LS-modified Vitamins  
 1X Fe-EDTA  
 1X KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 0,2 mg/l 2.4-D  
 3% Saharoza

**Prekokultivacioni TSC medijum, pH 5,3**

1X MS-macro  
 1X MS-micro  
 0,1X LS-modified Vitamins  
 1X Fe-EDTA  
 1X KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 0,2 mg/l 2.4-D  
 3% Saharoza

## STOKOVI RASTVORA:

**MS-macro soli 10X**

19,0 g/l KNO<sub>3</sub>  
 16,5 g/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
 4,4 g/l CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
 3,7 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O  
 1,7 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Fe-EDTA 100X**

3,725 g/l Na<sub>2</sub>-EDTA  
 1,115 g/l FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 500X**

92,5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**MS-micro soli 1000X**

16,9 g/l MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
 8,6 g/l ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O  
 6,2 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>  
 0,25 g/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>  
 0,025 g/l CoCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O

**LS-modified Vitamins 500X**

50,0 g/l Myo-Inositol  
 0,5 g/l Thiamine HCL

**2.4-D**

10,0 mg/ml (u 50% Etanolu)

### 3.7.2 Stres tretmani heljde

Za senescenciju izazvanom mrakom, biljke su gajene u mraku 1, 2, 3, 5, 7 9 i 11 dana, nakon čega su sakupljeni zreli listovi i brzo smrzanani u tečnom azotu.

Za stres suše, zrele biljke nisu zalivane 13 dana. Listovi su sakupljeni nakon 3, 5, 7, 9, 11, 13 i 15 dana.

Mehaničke povrede lista su vršene ubadanjem lista iglom (10 uboda po listu) i listovi su sakupljeni nakon 1, 2 i 3 dana.

Izlaganje biljaka UV-B zračenju (290-320 nm) je vršeno u trajanju od 1, 2 i 24 h, kako je opisano kod Jovanović *et al*, 2006. Korišćena je UV-B lampa (HPQ 100 W Phillips)

postavljena 15 cm iznad biljaka. UV spektar je filterisan kroz 0,13 mm celulozno acetatni filter koji ne propušta UV-C svetlost. Biljke su primale  $49 \text{ kJ m}^{-2}$  efektivnog UV-B zračenja.

Simulacija napada patogena je vršena inkubacijom listova u salicilnoj kiselini (SA) po Wen *et al*, 2005., sa modifikacijama. Listovi su isečeni na delove (približne površine od  $1 \text{ cm}^2$ ) i uronjeni u „equilibrium“ pufer, a zatim prebačeni u petri šolje sa po 20 ml inkubacionog pufera sastavljenog od „equilibrium“ pufera i  $200 \mu\text{M}$  SA i inkubirani 1, 3 i 5 h. Kontrolni listovi su inkubirani u inkubacionom puferu sa destilovanom vodom umesto SA.

### 3.7.3 Transformacija BY-2 ćelija

Transformacija BY-2 ćelija je rađena modifikovanom metodom po Gynheung A., 1985. BY-2 ćelije su pre transformacije gajene u modifikovanom TSC medijumu, pH 5,3 sa 10 puta manjom količinom vitamina (prekocultivacioni TSC).

Talozi prekonoćnih kultura *A. tumefaciens* su resuspendovani u 5% saharozi. Pet ml 3 dana stare BY-2 suspenzije je inokulisano sa resuspendovanim bakterijskim ćelijama u prisustvu  $300 \mu\text{M}$  acetosiringona i inkubirano 48 h na  $26^\circ\text{C}$  u petri šolji, bez mešanja.  $\text{OD}_{600}$  prekonoćnih kultura *A. tumefaciens* je bila u opsegu 0,8 do 2,7, pri čemu je zapremina dodavane bakterijske suspenzije varirala tako da je finalna koncentracija bakterija u kokultivatu bila ekvivalentna onoj prisutnoj u  $200 \mu\text{l}$  prekonoćne kulture optičke gustine 1,1 ( $0,24 \times 10^9$  po ml kokultivata).

BY-2 ćelije su potom oprane dva puta sa po 15 ml svežeg TSC medijuma i jedanput sa TSC medijumom sa antibioticima ( $100 \text{ mg/l}$  kanamicina,  $500 \text{ mg/l}$  karbenicilina i  $500 \text{ mg/l}$  cefotaksima). Posle svakog pranja, ćelije se centrifugirane u blagim uslovima 5 min na  $120 \text{ g}$ , sa ubrzanjem 4 i bez kočenja na sobnoj temperaturi. Zatim su razlivene na TSC čvrstu podlogu koja je sadržavala  $200 \text{ mg/l}$  kanamicina,  $250 \text{ mg/l}$  karbenicilina i  $250 \text{ mg/l}$  cefotaksima i gajene do pojave kalusa od 4 do 11 nedelja.

Pasažiranje kalusa na nove šolje, vršeno je kada dostignu 1 do 3 mm u prečniku. Vršeno je uvek jedno pasažiranje na novu čvrstu podlogu sa antibioticima, nakon čega su transformisani kalusi (prečnika 5 do 10 mm) prebacivani u 25 ml TSC medijuma sa  $50 \text{ mg/l}$  kanamicina, a bez cefotaksima i karbenicilina, pritiskanjem kalusa uz ivice erlenmajera, u cilju rasparčavanja kalusa i omogućavanja što većem broju ćelija da se



oslobode u tečni medijum. U tečnom medijumu su gajene u standardnim uslovima sa 25 mg/l kanamicina. Normalno pasažiranje se može obaviti kad ćelije postignu gustinu 7 dana stare kulture, što se obično dešava 5 do 10 dana nakon razbijanja kalusa.

### 3.7.4 Pravljenje BY-2 protoplasta

Četiri dana stare suspenzije BY-2 ćelija su prebacivane u 25 ml svežeg TSC medijuma i gajene 3 dana. Dva ml ovih ćelija je pomešano sa 6 ml digestivnog medijuma (1% celulaza „Onozuka R-10“, 0,2% macerozim R-10, 0,1% pektolijaza Y-23 (Zakult Pharmaceutical Ind. Co., LTD) u 0,45 M manitolu, 25 mM MES, 8 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 5,6) i inkubirana u mraku na 30°C uz lagano mešanje (39 obrt/min), 1h 30 min. Nakon centrifugiranja na 80 g 7 min, talozi su lagano resuspendovani u 2 ml rastvora 0,35 M saharoze i 5 mM CaCl<sub>2</sub> i nanešeni na približno 6 ml istog rastvora. Nakon centrifugiranja na 80 g 10 min, prečišćeni protoplasti su formirali tanak površinski sloj. Ovako spremljeni protoplasti su potom oprani dva puta u rastvoru 0,5 M manitol, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% MES, pH 5,8. Nakon drugog centrifugiranja na 80 g 10 min, protoplasti su bili spremni za proteinsku izolaciju.

### 3.7.5 Transformacija listova duvana

Listovi 4 do 5 nedelja starih biljaka duvana su tranzijentno transformisani upotrebom špric infiltracije. Prekonoćne kulture transformisanih bakterija *A. tumefaciens* (10 do 50 ml) su centrifugirane na 3000 obrt/min 25 min na sobnoj temperaturi. Talozi su resuspendovani u H<sub>2</sub>O do OD<sub>600</sub> 0,1, 0,3 ili 1,0 i inkubirane 1h na sobnoj temperaturi. Bakterije su ubrizgavane špricom na naličje lista. U jednu polovinu lista, infiltrirana je kontrola (*A. tumefaciens* sa praznim vektorom), a u drugu polovinu bakterije transformisane rekombinantnim vektorom koji sadrži željeni insert. Nakon 24, 48, 72 h, 4, 5 i 7 dana, listovi su posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51).

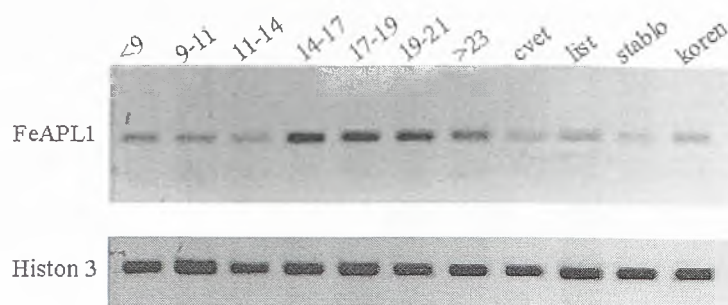
## 4 REZULTATI

### 4.1 Analiza ekspresije gena za FeAPL1 u različitim organima heljde

Kako je ranije utvrđeno analizom Northern blot ukupne RNK izolovane iz semena (u različitim fazama sazrevanja), lista, klijanaca (u različitim fazama klijanja), korena, cveta, cvetnih pupoljaka, kao i lista i cveta u senescenciji, ekspresija gena za FeAPL1 je ograničena samo na seme. Ekspresija se jasno uočava već od 9-11 DAFa, raste i dostiže maksimum u srednjoj fazi sazrevanja, od 14-17 DAFa, ulazi u fazu opadanja u toku 19-21 DAFa i u zreлом semenu skoro potpuno nestaje (Milisavljević *et al*, 2008).

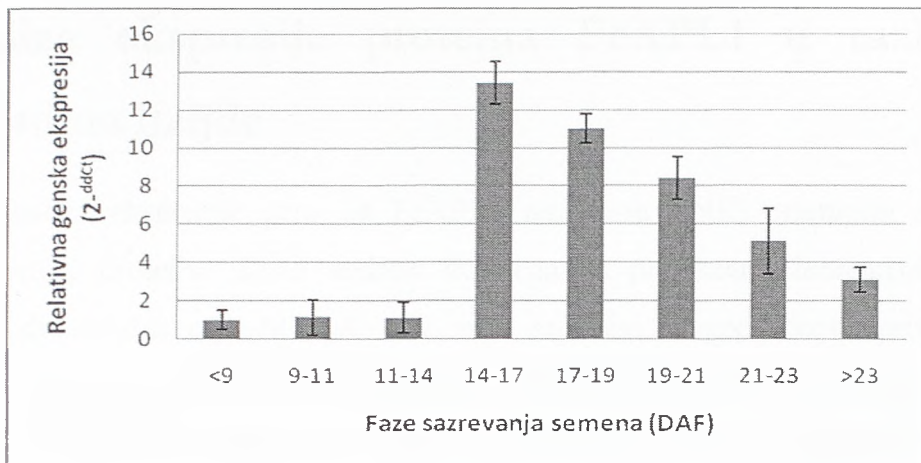
Radi detaljnije analize i reevaluacije pomenutih rezultata, ekspresija gena za FeAPL1 po organima je praćena metodama RT-PCR i Real Time RT-PCR, upotrebom prajmera rtAPL1f/rtAPL1r specifičnih za gen. Kao referentni gen korišćen je gen za histon 3, čiji su prajmeri dizajnirani na osnovu sekvence odgovarajućeg gena iz duvana.

RNK je izolovana iz semena u različitim fazama sazrevanja (<9 DAF, 9-11 DAF, 11-14 DAF, 14-17 DAF, 17-19 DAF, 19-21 DAF, >23 DAF), cveta, lista, stabla i korena. Produkti amplifikacije dobijeni u RT-PCRu su prikazani na slici 1. Amplikoni odgovarajuće veličine (~150 bp) se uočavaju u svim tkivima, kao i jasno definisani profil u toku sazrevanja semena. Produkti amplifikacije cDNK slabog intenziteta se uočavaju u fazama <9 DAF, 9-11 DAF i 11-14 DAF, za kojima sledi naglo povećanje količine transkripta u fazi 14-17 DAF, nakon čega dolazi do smanjenja količine RNK do faze 23 DAF. U ostalim organima, detektovane su slabe RNK trake, koje nisu bile uočene Northern blot analizom (slika 1).



Slika 1. Analiza ekspresije gena za FeAPL1. Produkti RT-PCRa sa prajmerima rtAPL1f/rtAPLr iz semena u fazama sazrevanja: <9 DAF, 9-11 DAF, 11-14 DAF, 14-17 DAF, 17-19 DAF, 19-21 DAF i >23 DAF, cveta, lista, stabla i korena. Kao endogena kontrola korišćen je histon 3, koji je umnožen sa prajmerima H3f/H3r na istim cDNK.

Detaljnija analiza ekspresije u semenu je urađena metodom Real Time RT-PCR, upotrebom istih prajmera. Akumulacija PCR produkata je detektovana u realnom vremenu i analizirana upotrebom programskog paketa 7500 System Software (Applied Biosystems) u okviru koga su analizirane efikasnosti korišćenih prajmera i standardne greške. Relativna kvantifikacija je predstavljena kao  $2^{-ddCt}$ , gde je ddCt razlika normalizovanih dCt vrednosti (Ct gena za FeAPL1- Ct gena za histon 3) u odnosu na dCt kalibratora za koga je uzeta ekspresija gena za FeAPL1 u semenu u fazi <9 DAF. Dobijeni rezultati se poklapaju sa rezultatima dobijenim metodom RT-PCR. I ovde se uočava nagli skok ekspresije (~13 puta) u fazi 14-17 DAF u odnosu na faze do 14 DAF gde je ekspresija niska i ujednačena, a u fazama >17 DAF dolazi do postepenog opadanja ekspresije (slika 2).



Slika2. Relativna kvantifikacija genske ekspresije gena za FeAPL1 analizirana metodom Real Time RT-PCR tokom faza sazrevanja semena: <9 DAF, 9-11 DAF, 11-14 DAF, 14-17 DAF, 17-19 DAF, 19-21 DAF, 21-23 DAF i >23 DAF. Vertikalnim linijama su predstavljene standardne greške.

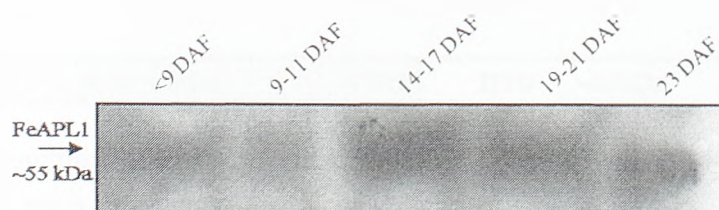
## 4.2 Analiza ekspresije gena za FeAPL1 pod uticajem stresogenih faktora

Kompjuterskom predikcijom potencijalnog promotorskog regiona FeAPL1 pronađeno je više *cis*-aktivirajućih elemenata uključenih u regulaciju gena koji se aktiviraju pri stresnim uslovima spoljašnje sredine (ABRE-regulacija ekspresije pod uticajem ABA i različitih tipova sredinskih stresova, Gbox-regulacija pod dejstvom svetlosnog zračenja, RITA1 (ACE- PC)-odgovor na UV-B talase plavog dela spektra, ERE1-regulacija etilenom, Wbox- za vezivanje WRKY proteina koji učestvuju u SA posredovanom odgovoru na patogene) (Milisavljević *et al.*, 2007). Zbog prisustva ovih elemenata, analizirana je ekspresija gena FeAPL1 pod uticajem nekoliko faktora spoljašnje sredine. Heljda je izlagana UV zračenju, suši, mraku koji dovodi do senescencije, mehaničkoj povredi i salicilnoj kiselini koja simulira napad patogena. Iz listova tretiranih biljaka je izolovana RNK i nakon reakcije reverzne transkripcije, relativna zastupljenost FeAPL1 cDNK je analizirana metodom Real Time PCR, upotrebom istih prajmera i endogene kontrole korišćenih i pri analizi profila ekspresije po organima heljde. Ni u jednom slučaju nije uočena promena nivoa ekspresije pod uticajem ispitivanih stresogenih faktora. Sve detektovane promene su bile u okviru standardne greške, te samim tim nisu bile statistički značajne.

### 4.3 Analiza ekspresije proteina FeAPL1 u različitim organima heljde

Nakon analize ekspresije gena za FeAPL1 na nivou RNK, pristupilo se analizi ekspresije samog proteina. Kako antitela dobijena na prečišćeni denaturisani rHis<sub>6</sub>-FeAPL1, produkovan u soju M15 *E. coli*, nisu pokazivala specifičnost, pristupilo se imunizaciji zečeva sa sintetisanim peptidima C-IPIYARNKSSTVQS (124-137 ak) i CLVSHRFDDTPQSGD (230-244 ak), što je urađeno od strane kompanije Biogenes GmbH, Berlin kao komercijalna usluga. Specifičnost afinitetno prečišćenih poliklonskih Anti-FeAPL1 antitela je potvrđena metodom Western blot na prečišćenom rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 kao i na ukupnom proteinskom ekstraktu transformisanog M15 soja. Kao kontrola korišćen je preimunoserum.

Ovako dobijenim anti-FeAPL1 antitelima su analizirani ukupni kiseli i neutralni proteinski ekstrakti semena, lista, cveta, stabla, korena i klijanaca metodom Western blot. Proteini su razdvojeni na 12% SDS gelu i prebačeni na membranu. Antitelima je detektovana proteinska traka od ~55 kDa samo u ekstraktima semena, dok u drugim organima heljde protein nije eksprimiran. Nije bilo razlike između kiselih i neutralnih ekstrakata. Proteinski profil prati profil ekspresije RNK, tj. najveća količina proteina je prisutna u fazi sazrevanja semena 14-17 DAF, kada je detektovana i najveća količina RNK (slika 1). U ranijim fazama proteina ima manje, a nakon 17 DAF dolazi do opadanja količine proteina. (slika 3).



Slika 3. Western blot analiza ukupnih kiselih ekstrakata semena heljde u fazama sazrevanja: <9 DAF, 9-11 DAF, 14-17 DAF, 19-21 DAF i 23 DAF Anti-FeAPL1 antitelima.

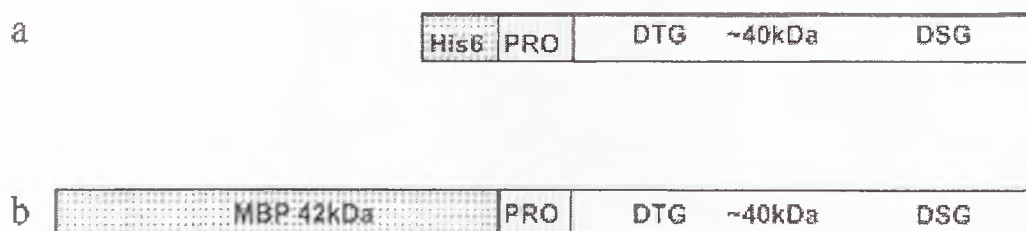


## 4.4 Produkcija rekombinantnog FeAPL1 u heterolognim sistemima (*E. coli*, *P. pastoris*, insekatske ćelije)

Nakon karakterizacije FeAPL1 cDNK (Milisavljević *et al*, 2008) i analize ekspresije, jedan od prvih koraka u određivanju funkcije je analiza osobina samog proteina. Za dobijanje proteina, prvo su korišćeni heterologni ekspresioni sistemi u kojima je moguće proizvoditi protein u većoj količini pogodnoj za njegovu biohemijsku karakterizaciju, kao i za produkciju antitela.

### 4.4.1 Ekspresija rFeAPL1 u *E. coli* (Milisavljević *et al*, 2009)

Za produkciju rFeAPL1, kodirajući region bez signalnog peptida (SP) (produkt umnožavanja prajmerima P6/P5) je kloniran u vektore pQE32, pMAL-c2X i pMAL-p4X kako je opisano u poglavlju Materijal i metode 3.1.11 i rezultujućim konstruktima su transformisani različiti ekspresioni sojevi *E. coli*. Kloniranjem u vektor pQE32, dobijen je konstrukt rHis<sub>6</sub>-FeAPL1, a kloniranjem u vektore pMAL-c2X i pMAL-p2X konstrukt rMBP-FeAPL1 (Šema 1a i 1b). rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 i rMBP-FeAPL1 kodiran sa vektora pMAL-c2X su lokalizovani u citoplazmi, dok se rMBP-FeAPL1 kodiran sa pMAL-p2X sekretuje u periplazmatski prostor zahvaljujući prisustvu signalne sekvence MBP proteina.

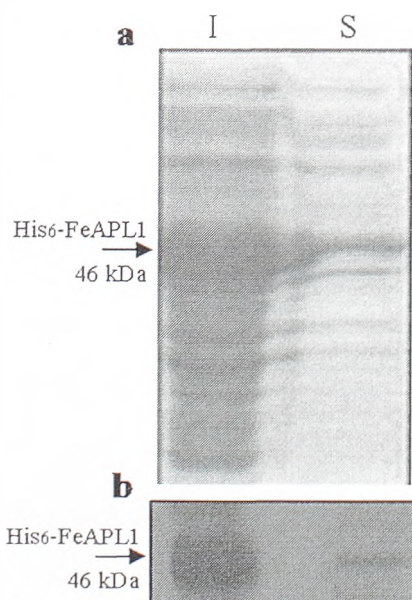


Šema 1. Šema rekombinantnih konstrukata: (a) rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 i (b) rMBP-FeAPL1. His<sub>6</sub> – polihistidinski tag; PRO -PRO segment FeAPL1; DTG i DSG - konsenzus sekvence katalitičkog mesta; MBP- (Maltose Binding Protein) tag.

#### 4.4.1.1 Ekspresija rHis<sub>6</sub>-FeAPL1

Za produkciju rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 korišćeno je nekoliko ekspresionih sojeva *E. coli* sa različitim osobinama: M15(pREP4), BL21(DE3)pLysS, BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, BL21-CodonPlus (DE3)-RP i Rosetta-gami. Nakon selekcije transformanata, indukovano

je po 8 klonova svakog soja i testirano na prisustvo rekombinantnog proteina brzom procedurom (Materijal i metode 3.4.7.2). Soj Rosetta-gami jedini nije produkovao protein, za razliku od ostalih sojeva u kojima je detektovan rekombinantni protein od oko 46 kDa u bar po 3 klona svakog soja. Značajne razlike u količini proteina nisu uočene među klonovima različitih sojeva. Svi klonovi koji su proizvodili protein su dalje korišćeni za određivanje lokalizacije, tj. solubilnosti rHis<sub>6</sub>-FeAPL1. Nakon indukcije ekspresije, ćelijski talozi su resuspendovani u nativnom „Lysis“ puferu, sonifikovani i centrifugirani. Obe frakcije (talog i supernatant) su analizirani na 12% SDS gelu (Slika 4a). U svim klonovima, velika količina rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 je bila lokalizovana u talogu, tj. u nesolubilnim inkluzionim telima, što se lako detektovalo bojenjem SDS gela Coomassie bojom. Pošto u solubilnoj frakciji (supernatantu) nije bila vidljiva proteinska traka odgovarajuće veličine, proteinske frakcije su analizirane Western blot metodom upotrebom Anti-His antitela (Qiagen) koja prepoznaju polihistidinski tag. Antitelima je detektovan rekombinantni protein u obe frakcije, ali je signal poreklom iz solubilne frakcije bio daleko slabiji zbog male količine proteina (Slika 4b). Kao kontrole uvek su korišćeni izolovani proteini netransformisanih bakterija.



Slika 4. Ekspresija rHis<sub>6</sub>-FeAPL1. (a) Coomassie brilliant blue G250 bojenje 12 % SDS gela sa nesolubilnom (I) solubilnom (S) frakcijom proteinskog ekstrakta transformisanog soja M15. (b) Western blot hibridizacija istih frakcija sa Anti-His antitelima.

Kako bi se poboljšala solubilnost rHis<sub>6</sub>-FeAPL1, varirani su uslovi gajenja i lize bakterija. Za ovu svrhu izabran je po jedan klon svakog soja. Bakterije (500 ml do 3 l) su

gajene do  $OD_{600}$  od 0,5 do 1,1 pre indukcije, a indukovane su na temperaturama od 16, 25, 30 i 37°C, u trajanju od 15 min, 30 min, 1, 2, 3, 5 i 7 h pri koncentracijama IPTG 0,1, 0,3, 0,5 i 1 mM. Sastav pufera za lizu je menjan u pokušaju da se prečisti što veća količina solubilnog proteina. Varirana je količina soli (300 mM ili 1 mM NaCl), glicerola (10 ili 50%), prisustvo detrdženata (0,2% Tween 20 ili Triton X-100) i prisustvo 10 mM  $\beta$ -merkaptetanola. Rekombinantni protein u solubilnim frakcijama je detektovan anti-His antitelima, ali nije uočeno povećanje količene solubilnog rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 ni u jednom analiziranom slučaju.

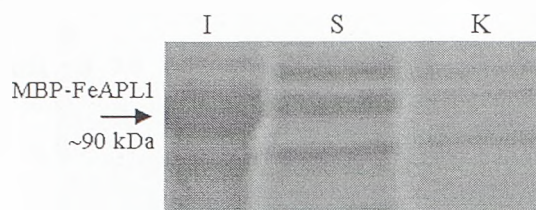
Prečišćavanje rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 vršeno je na Ni-NTA rezinama iz 500 ml do 3 l indukovane bakterijske kulture (Materijal i metode 3.4.7.4 i 3.4.7.5). Prinosi su bili do 30  $\mu$ g solubilnog i do 15 mg denaturisanog rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 po 1 l indukovane bakterijske kulture.

Za renaturaciju strukture („refolding“) rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 prečišćenog iz inkluzionih tela korišćene su dijaliza, brzo razblaživanje („rapid dilution“) i „refolding“ na Ni-NTA kolonama u nekoliko rastvora (Materijal i metode 3.4.8). Uspešnost je proveravana testiranjem proteazne aktivnosti na BSA, hemoglobinu i kazeinu kao supstratima. Nijedna metoda nije dala rezultate (nije detektovana proteazna aktivnost), a u slučaju refoldinga na kolonici, protein nije mogao biti eluiran. Prečišćeni solubilni rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 takođe nije posedovao proteaznu aktivnost.

#### 4.4.1.2 Ekspresija rMBP-FeAPL1

Kako bi se povećala solubilnost rFeAPL1, napravljen je konstrukt rMBP-FeAPL1 u vektorima pMAL-c2X i pMAL-p2X, za citosolnu i periplazmatsku ekspresiju u sojevima BL21(DE3)pLysS i Rosetta-gami.

Za dobijanje citoplazmatskog rekombinantnog proteina, indukovano je 500 ml ili 1 l transformisanih bakterijskih kultura  $OD_{600}$  0,5 sa 1 mM IPTG, na 25°C 3h. Testirano je po 4 klona svakog soja. U oba soja, fuzioni rekombinantni protein od ~90 kDa ( $M_{W_{MBP}}$  ~42 kDa i  $M_{W_{FeAPL1}}$  ~46 kDa) je detektovan na SDS gelu i u solubilnoj frakciji i u inkluzionim telima, pri čemu je veća količina proteina bila lokalizovana u inkluzionim telima (Slika 5). Solubilni rMBP-FeAPL1 je prečišćavan na amiloza rezinama iz 500 ml do 1 l indukovane bakterijske kulture sa prinosom do 1 mg po litru.



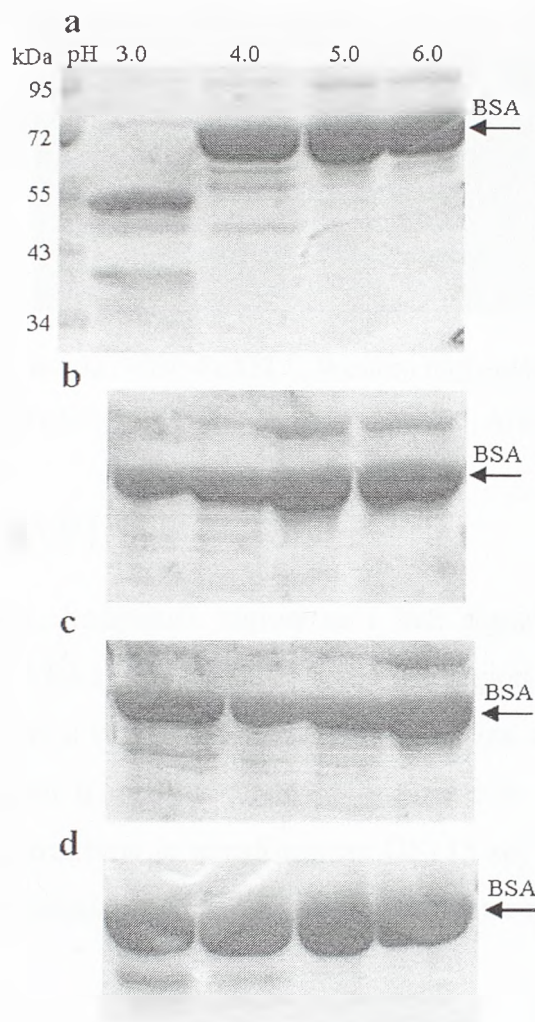
Slika 5. Ekspresija rMBP-FeAPL1. Coomassie brilliant blue G250 bojenje 12 % SDS gela sa nesolubilnom (I) i solubilnom (S) frakcijom proteinskog ekstrakta transformisanog soja Rosetta-gami i totalnim proteinskim ekstraktom netransformisanih ćelija (K).

Periplazmatski rMBP-FeAPL1 je eksprimiran pod istim uslovima kao i citoplazmatski protein. U svim klonovima (po 4 klona oba soja) je detektovano prisustvo rMBP-FeAPL1 odgovarajuće Mw od ~90 kDa Western blot hibridizacijom sa Anti-MBP antitelima (Biolabs). Zbog male količine periplazmatskog rMBP-FeAPL1, protein nije detektovan Coomassie bojenjem SDS gela. Prečišćavanje rekombinantnog proteina je vršeno na amiloza rezinama. Periplazmatske frakcije kao i prečišćeni rMBP-FeAPL1 su testirani na proteznu aktivnost na BSA kao susptratu i digestija nije detektovana ni u jednom slučaju.

#### 4.4.1.3 Enzimaska aktivnost rMBP-FeAPL1

Da bi se testirala proteolitička aktivnost prečišćenog solubilnog rMBP-FeAPL1 iz citoplazme BL21(DE3)pLysS i Rosetta-gami ćelija, rastuća količina enzima (3, 10 ili 20  $\mu\text{g}$ ) je pomešana sa 20  $\mu\text{g}$  BSA, kazeina ili hemoglobina u puferima različitog pH (3,0-8,0). Produkti proteolize su analizirani na 12% SDS-PAGE (slika 6). Uočena je jedino proteoliza BSA u 0,1 M citratnom puferu pH 3,0 sa rMBP-FeAPL1 prečišćenim iz Rosetta-gami ćelija. U prisustvu 10  $\mu\text{M}$  pepstatina A, specifičnog inhibitora aspartičnih proteainaza, proteoliza BSA nije uočena. Prečišćeni supernatant iz netrasformisanih BL21/Rosetta-gami ćelija, kao i sam BSA u odgovarajućim puferima su korišćeni kao kontrole.

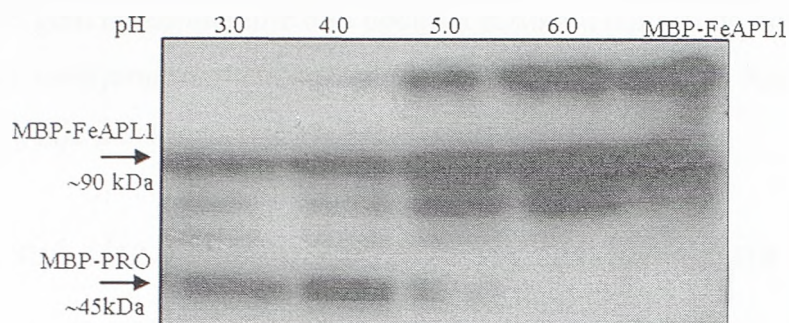




Slika 6. Enzimaska aktivnost rMBP-FeAPL1. Coomassie brilliant blue G250 bojenje 12 % SDS gelova. (a) Proteoliza BSA sa prečišćenim solubilnim rMBP-FeAPL1 iz Rosetta-gami ćelija u puferima pH 3,0, 4,0, 5,0 i 6,0. Sa leve strane je prikazan Page-Ruler proteinski marker (Fermentas). (b) Iste reakcije u prisustvu pepstatina A. (c) Proteoliza BSA sa prečišćenim bakterijskim proteinama iz netransformisanih *R. gamii* ćelija. (d) Sam BSA u istim puferima.

Iste reakcije su korišćene za analizu autoproteolitičke obrade rMBP-FeAPL1 (Western blot hibridizacijom sa anti-MBP antitelima). Na nižim pH (3,0 i 4,0), dolazi do smanjenja količine kompletnog rMBP-FeAPL1 (~90 kDa) i pojave proteina od ~45 kDa, koji bi mogao da odgovara fuzionom proteinu MBP-PRO segment. Ovo bi moglo značiti da FeAPL1 poseduje PRO segment koji se autokatalitički iseca iz aktivnog enzima, kao što je slučaj sa velikim brojem AP. U puferima višeg pH, ova traka bleđi, a povećava se količina kompletnog rekombinantnog proteina (Slika 7). U prisustvu 10  $\mu$ M pepstatina A, obrada proteina je izostala.





Slika 7. Autoproteolitička obrada rMBP-FeAPL1. Western blot analiza reakcija prikazanih na slici 6a i prečišćeni rMBP-FeAPL1 u „Column“ puferu, pH 7,5, Anti-MBP antitelima.

#### 4.4.2 Ekspresija rFeAPL1 u *P. pastoris*

Za produkciju rFeAPL1, kodirajući region sa i bez signalnog peptida (produkti umnožavanja prajmerima P3/P4 i P6/P4), kao i kodirajući region sa N-terminalnim His<sub>6</sub> tagom (P6His/P4) su klonirani u vektor pPIC9K (Invitrogen) iza  $\alpha$  signalnog peptida koji omogućava sekreciju proteina u medijum. Nakon linearizacije sa *Bgl*III restrikcionom enzimom, razultujućim konstruktima je transformisan GS115 soj *P. pastoris*. GS115 soj ne poseduje enzim histidin dehidrogenazu, te ne može rasti na minimalnim podlogama koje ne sadrže histidin.

U transformisanim ćelijama, dolazi do integracije vektora u genom kvasca, tačnije, u slučaju *Bgl*III linearizacije, do dvostruke rekombinacije praćene zamenom AOX1 gena heterolognom DNK (vektorom). Ovakvi transformanti imaju His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> fenotip (rastu na minimalnom podlogama bez histidina i sporo iskorišćavaju metanol kao izvor ugljenika; eng. **Methanol utilization slow**).

Selekcija transformanata je prvo vršena na minimalnoj MD podlozi, gde su rasli His<sup>+</sup> transformanti. Nakon ove selekcije, kolonije su prebacivane na YPD podloge sa selektivnim markerom, antibiotikom G418, na kojima je izvršena selekcija na prisustvo gena za ekspresiju.

Indukcija ekspresije je rađena na maloj skali, u 10 ml BMMY medijuma na 30°C na 200 obrt/min u trajanju 1 do 7 dana. U medijum su dodate i kazaminokiseline koje bi smanjile eventualnu proteolizu rekombinantnog proteina. Indukcija ekspresije je vršena dodavanjem 0,5% ili 1% metanola jednom dnevno. Dnevni alikvoti od po 1 ml su taloženi i proteini medijuma su precipitairani, a ćelije resuspendovane u puferu za uzorak i

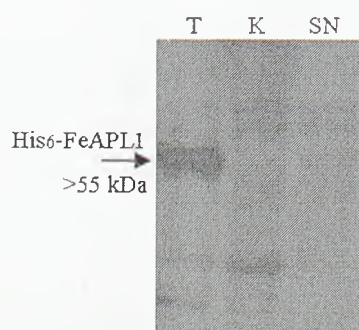
analizirani na SDS gelu na kojima nije bilo uočljiva razlika u odnosu na kontrolu (ćelijski proteini i proteini medijuma netransformisanih kvasaca). Takođe, ni Anti-His, ni anti-FeAPL1 antitelima nije detektovano prisustvo rFeAPL1.

#### 4.4.3 Ekspresija rFeAPL1 u kulturi insekatskih ćelija

Kodirajući region FeAPL1 bez signalnog peptida (produkt umnožavanja prajmerima BAC5/GEX3) je ligirana sa ekspresionim vektorom pFastBac HTB (Invitrogen) iza His<sub>6</sub> taga i pod kontrolom polihedrinskog promotora. Nakon formiranja rekombinantnog bakmida u DH10BAC *E. coli* ćelijama, prečišćenim rekombinantnim bakmidom su transformisane Sf9 insekatske ćelije.

Ćelije su dnevno proveravane pod svetlosnim mikroskopom. Počevši od 24 h nakon transformacije, mogle su se uočiti morfološke promene koje prate tok infekcije: blago povećanje dijametra ćelija, povećanje nukleusa, koji je ispunjavao veći deo ćelije, povećana granulacija. Nakon 4 do 5 dana uočeni su i znaci kasne infekcije, odleplivanje ćelija sa dna suda i liza ćelija. U ovoj fazi, dolazi do oslobađanja virusnih partikula u medijum (P1 viralni stok), koji je sakupljen i čuvan u mraku na 4°C.

Za preliminarnu detekciju ekspresije rekombinantnog proteina rHis<sub>6</sub>-FeAPL1, ćelije, isprane od medijuma sa virusima, su lizirane u nativnom puferu (20 mM Tris, pH 8,0 i 150 mM KCl) i solubilna i nesolubilna frakcija su analizirane metodama SDS-PAGE i Western blot upotrebom Anti-His antitela. Kao kontrola su korišćene netransformisane Sf9 ćelije inkubirane samo sa selfektinom („cellfectin“) bez bakmida. Antitelima je detektovan rekombinantni protein molekulske mase >55 kDa u nesolubilnoj frakciji, dok ga u solubilnoj frakciji i kontroli nije bilo (Slika 8). Zbog nesolubilnosti rHis<sub>6</sub>-FeAPL1, nije se išlo u dalje pokušaje ekspimiranja rekombinantnog proteina u većoj količini i nije rađena provera proteolitičke aktivnosti.



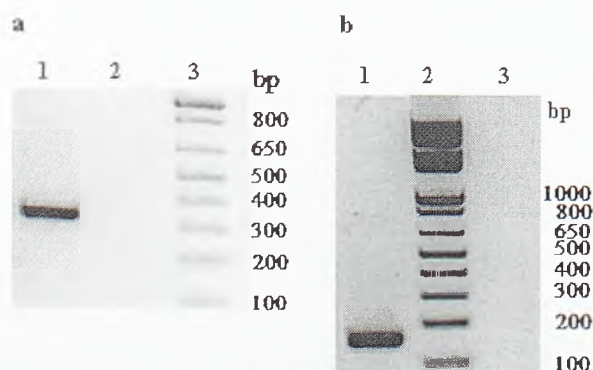
Slika 8. Ekspresija rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 u kulturi insekatskih ćelija. Western blot analiza nesolubilne (T) i solubilne (SN) frakcije proteinskog ekstrakta transfektovanih insekatskih ćelija Sf9 i proteinski ekstrakt ćelija inkubiranih sa selfektinom (K), Anti-His antitelima.

## 4.5 Ekspresija rFeAPL1 u biljnim ćelijama

Zbog poteškoća sa ekspresijom FeAPL1 u heterolognim sistemima, kao što su nesolubilnost proteina (ekspresija u bakterijama i insektima), teško dobijanje solubilnog proteina u većoj količini (rMBP-FeAPL1), kao i potpuno odsustvo produkcije proteina u *P. pastoris*, pristupilo se ekspresiji FeAPL1 u BY-2 ćelijskoj liniji duvana i listovima duvana *N. benthamiana*.

Transformacija BY-2 ćelija je vršena posredstvom bakterija *A. tumefaciens* (Materijal i metode 3.7.3) koje su nosile rekombinantni vektor pBINAR-EGFP u kome je EGFP sekvenca zamenjena sa konstruktom FeAPL1-His<sub>6</sub> (produkt umnožavanja sa prajmerima P9/P10). Kalusi, porasli na selektivnoj čvrstoj podlozi su pasažirani na novu čvrstu podlogu, a potom su razbijeni na pojedinačne ćelije u tečnom TSC medijumu.

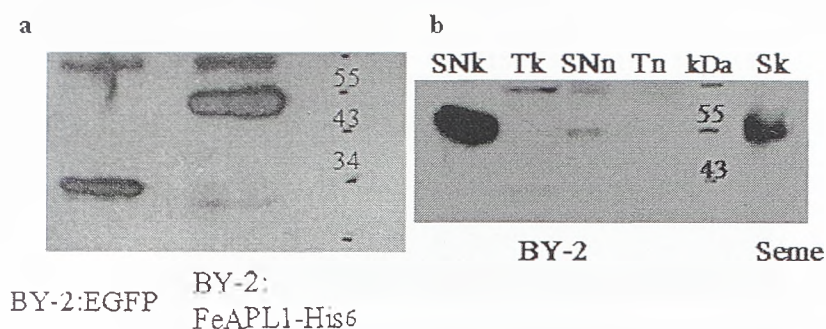
Posle 2 pasažiranja u tečnom medijumu, vršena je provera stabilne transformacije BY-2 ćelija PCR reakcijom na izolovanoj genomske DNK kao matrici, upotrebom prajmera F8/R83 specifičnih za gen (slika 9a). Dobijeni amplikon je bio odgovarajuće dužine (383 bp). Amplifikacija je izostala na kontrolnoj DNK izolovanoj iz BY-2 ćelija transformisanih sa vektorom pBINAR-EGFP. Ekspresija transgena je proveravana metodom RT-PCR upotrebom prajmera rtAPLf/rtAPLr (slika 9b). Dobijen je umnožak od 150 bp, koji je izostao iz kontrole (cDNK BY-2 ćelija transformisanih vektorom pBINAR-EGFP).



Slika 9. Stabilna transformacija BY-2 ćelija. (a) Produkti amplifikacije sa prajmerima F8/R83 na genomskoj DNK izolovanoj iz BY-2 ćelija transformisanih sa konstruktom FeAPL1-His<sub>6</sub> (1) i vektorom pBINAR-EGFP (2). „1 kb+“ DNK marker (3). (b) Produkti RT-PCRa, sa prajmerima rtAPL1f/rtAPLr, iz BY-2 ćelija transformisanih sa konstruktom FeAPL1-His<sub>6</sub> (1), BY-2 ćelija transformisanih sa vektorom pBINAR-EGFP (3), „1 kb+“ DNK marker (2).

Totalni kiseli proteinski ekstrakti netransformisanih i transformisanih ćelija su analizirani metodom Western blot, anti-FeAPL1 antitelima. U proteinskom izolatu transformisanih ćelija detektovan je protein od ~55 kDa (slika 10a). Celokupna količina proteinaze se nalazila u solubilnoj frakciji i pri izolaciji u kiselom i u neutralnom puferu (slika 10b). Proteinska traka iste veličine je uočena u ukupnom kiselom proteinskom ekstraktu semena srednje faze sazrevanja (slika 10b).





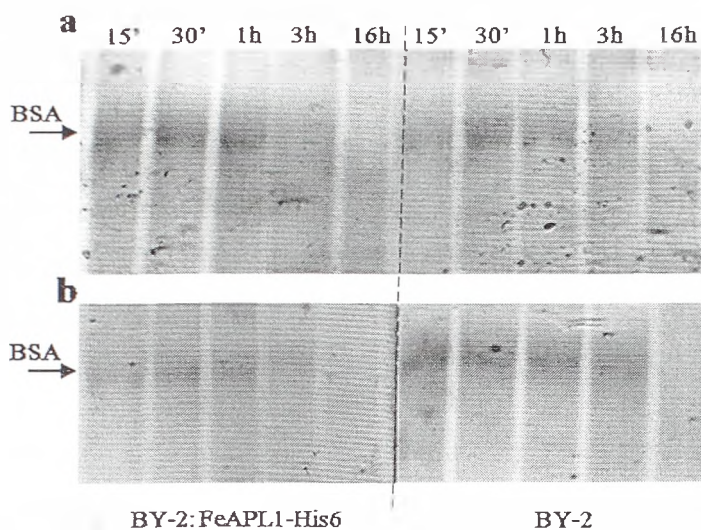
Slika 10. Ekspresija FeAPL1-His<sub>6</sub> u BY-2 ćelijama. (a) Western blot analiza ukupnih kiselih proteinskih ekstrakata BY-2 ćelija transformisanih sa vektorom pBINAR-EGFP i konstruktom FeAPL1-His<sub>6</sub>, Anti-FeAPL1 antitelima. (b) Western blot analiza proteinskih ekstrakata BY-2 ćelija transformisanih sa konstruktom FeAPL1-His<sub>6</sub> i semena u srednjoj fazi sazrevanja. SNk-solubilna frakcija kiselog ekstrakta, SNn- solubilna frakcija neutralnog ekstrakta, Tk-nesolubilna frakcija kiselog ekstrakta, Tn- nesolubilna frakcija neutralnog ekstrakta i Sk-kiseli ekstrakt semena srednje faze sazrevanja. Označene su molekulske mase proteinskog markera Page Ruler (Fermentas).

Tranzijentna transformacija listova duvana istim konstruktom nije rezultovala sintezom proteina, iako je RT-PCR reakcijom detektovan transkript odgovarajuće dužine.

#### 4.5.1 Enzimaska aktivnost rFeAPL1-His<sub>6</sub>

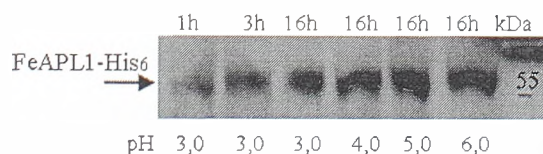
Kako bi se testirala proteolitička aktivnost, 50 µg ukupnog kiselog ili neutralnog proteinskog ekstrakta transformisanih BY-2 ćelija je inkubirano na 37°C sa po 10 µg BSA, kazeina ili hemoglobina u puferima različitog pH (3,0-8,0) u prisustvu inhibitora cisteinskih, serinskih i metaloproteinaza. Produkti proteolize nastali nakon 15 min, 30 min, 1h, 3h i 16 h (preko noći) su analizirani na 12% SDS-PAGE (slika 11). Uočena je potpuna proteoliza BSA sa kiselim proteinskim ekstraktom u 0,1 M citratnom puferu pH 3,0 nakon 3 h i 16 h digestije. Proteoliza BSA je uočena nakon 16 h i u ostalim reakcijama (u puferima pH (3,0-8,0) sa i bez pepstatina A) kao i sa ekstraktom netransformisanih BY-2 ćelija, te se digestija BSA nakon ovog vremena može pripisati endogenim proteazama. Sam BSA u istim puferima je bio stabilan. U prisustvu 10 µM pepstatina A, specifičnog inhibitora aspartičnih proteaza, izostala je digestija BSA u 0,1 M citratnom puferu pH 3,0 nakon 3 h, što ukazuje da je aktivnost FeAPL1 zaustavljena ovim inhibitorom. Sa drugim supstratima i u drugim puferima, proteoliza nije detektovna.





Slika 11. Enzimsko aktivnost rFeAPL1-His<sub>6</sub> eksprimiranog u BY-2 ćelijama. Coomassie brilliant blue G250 bojenje 12 % SDS gelova. (a) Proteoliza BSA u 0,1 M citratnom puferu nakon 15 min, 30 min, 1, 3 i 16 h sa totalnim proteinskim ekstraktom transformisanih BY-2 ćelija bez pepstatina A. (b) Iste reakcije u prisustvu 10 μM pepstatina A. Sa desne strane su prikazane kontrolne reakcije- proteoliza BSA sa totalnim proteinskim ekstraktom netransformisanih BY-2 ćelija u istom puferu.

Iste reakcije su korišćene za analizu autoproteolitičke obrade rFeAPL1-His<sub>6</sub> metodom Western blot, anti-FeAPL1 antitelima (slika 12). U svim puferima, pa i u 0,1 M citratnom puferu pH 3,0 u kome je došlo do digestije BSA, detektovan je samo rFeAPL1-His<sub>6</sub> odgovarajuće Mw, ~55 kDa, što ukazuje da FeAPL1 poseduje proteaznu aktivnost bez prethodne proteolitičke obrade, tj. uklanjanja potencijalnog PRO segmenta.



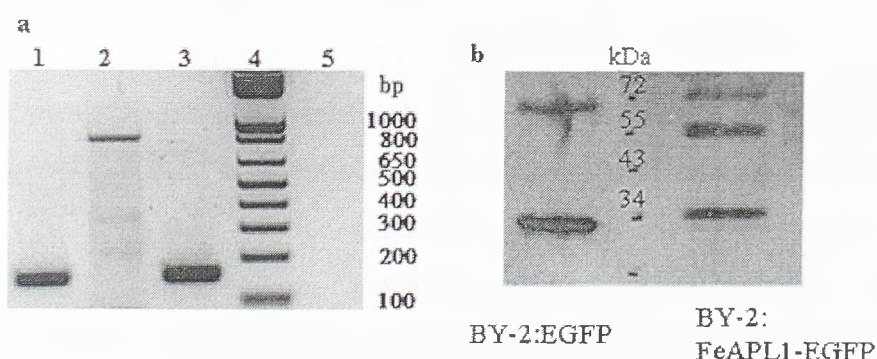
Slika 12. Western blot analiza reakcija proteolize BSA nakon 1, 3 i 16 h u puferu pH 3,0 i nakon 16 h u puferima pH 4,0, 5,0 i 6,0, Anti-FeAPL1 antitelima. Označene su molekulske mase proteinskog markera Page Ruler (Fermentas).

Ovi rezultati su kontradiktorni onim dobijenim u slučaju rMBP-FeAPL1, koji ukazuju na postojanje PRO segmenta koji se uklanja na nižim pH (pH 3,0 i 4,0).

## 4.5.2 Ćelijska lokalizacija rFeAPL1-His<sub>6</sub>

Pokušaj određivanja lokalizacije je vršen preko fuzionisanja FeAPL1 cDNK sa marker genom GFP, čiji protein od ~26 kDa, fluorescira nakon osvetljavanja talasnom dužinom od 488 nm. U ovu svrhu su korišćeni fuzioni konstrukti sa N ili C terminalnim marker genom EGFP: FeAPL1-EGFP, EGFP-FeAPL1, SP-EGFP (u vektoru pBINAR-EGFP). Navedeni konstrukti su korišćeni za transformaciju BY-2 ćelija i listova duvana *N. benthamiana*.

BY-2 ćelije su stabilno transformisane konstruktom FeAPL1-EGFP. Metodom RT-PCR, upotrebom prajmera rtAPLf/rtAPLr i rtAPLf/YFPPr, su detektovani transkripti odgovarajuće dužine (slika 13a). Međutim, fluorescencija poreklom od fuzionog proteina FeAPL1-EGFP nije uočena. Western blot analizom Anti-FeAPL1 antitelima nije detektovan rekombinantni protein Mw očekivane za fuzioni protein, već je detektovan protein od ~55 kDa, čija Mw odgovara Mw samog proteina FeAPL1 (slika 13b).

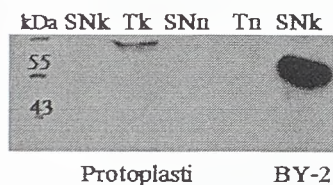


Slika 13. Stabilna transformacija BY-2 ćelija sa konstruktom FeAPL1-EGFP. (a) RT-PCR sa prajmerima YFPf/YFPPr (1), rtAPLf/YFPPr (2) i rtAPL1f/rtAPLr (3). Kontrolna amplifikacija sa prajmerima rtAPL1f/rtAPLr netransformisanih BY-2 ćelija (5). Označene su molekulske mase DNK markera 1 kb+ (Invitrogen) (4). (b) Western blot analiza proteinskih ekstrakata transformisanih BY-2 ćelija, Anti-FeAPL1 antitelima. Označene su molekulske mase proteinskog markera Page Ruler (Fermentas).

Osim BY-2 ćelija, tranzijentno su transformisani i listovi duvana sa konstruktima FeAPL1-EGFP, EGFP-FeAPL1 i SP-EGFP. Iako su transkripti detektovani u reakciji RT-PCR svih transformanata, fluorescencija nije uočena ni u jednom slučaju sem u pozitivnoj kontroli- listovima transformisanim sa vektorom pBINAR-EGFP.

Kako eksperimenti sa reporter proteinom GFP nisu dali odgovor vezan za unutarćelijsku lokalizaciju, pristupilo se analizama sa Anti-FeAPL1 antitelima.

FeAPL1-His<sub>6</sub> transformisane BY-2 ćelije su korišćene za pravljenje protoplasta, tj. ćelija bez ćelijskog zida. Western blot analizom ukupnog proteinskog ekstrakta protoplasta, anti-FeAPL1 antitelima nije detektovano prisustvo rFeAPL1-His<sub>6</sub>, što je ukazalo na potencijalnu lokalizaciju rFeAPL1-His<sub>6</sub> u ćelijskom zidu (slika 14).

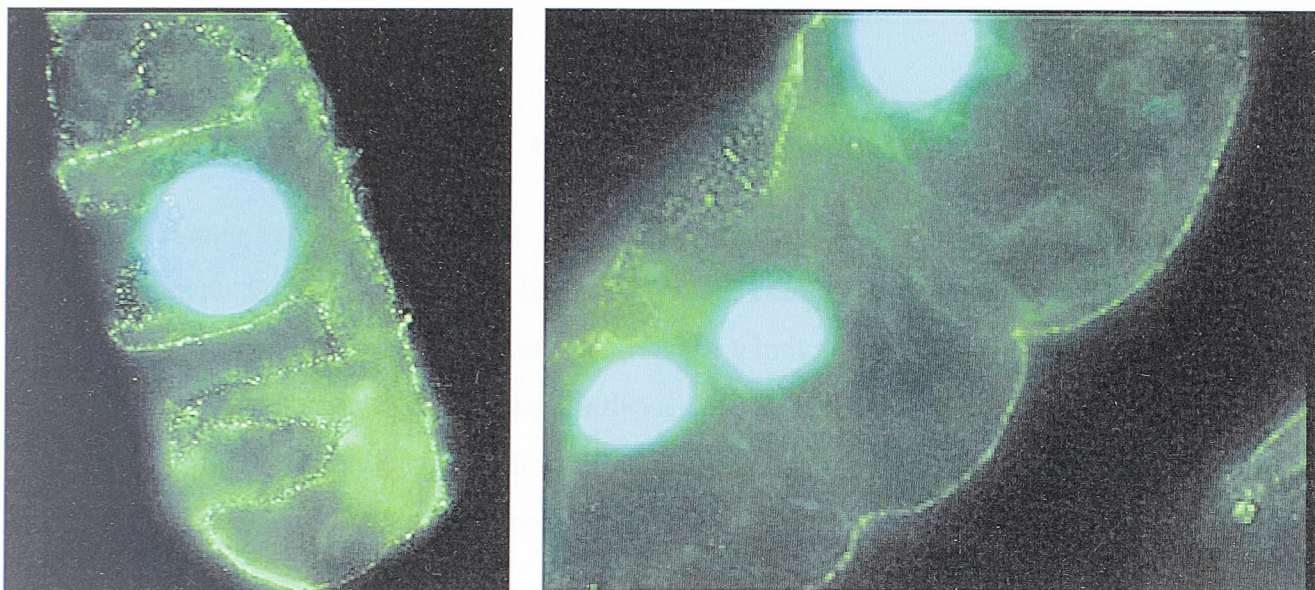


Slika 14. Western blot analiza proteinskih ekstrakata transformisanih BY-2 ćelija i njihovih protoplasta Anti-FeAPL1 antitelima. SNk-solubilna frakcija kiselog ekstrakta, SNn- solubilna frakcija neutralnog ekstrakta, Tk-nesolubilna frakcija kiselog ekstrakta, Tn- nesolubilna frakcija neutralnog ekstrakta. Označene su molekulske mase proteinskog markera Page Ruler (Fermentas).

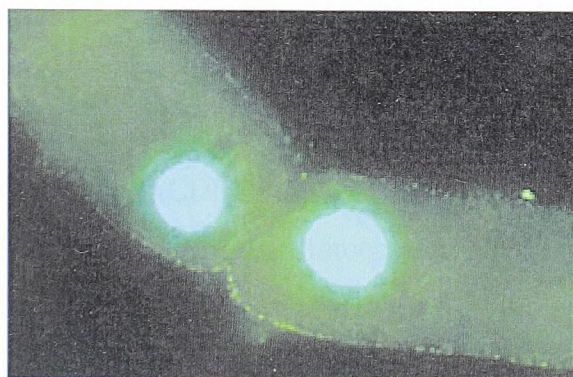
Kako bi se proverila prethodna pretpostavka, lokalizacija FeAPL1 u transformisanim BY-2 ćelijama je određivana imunocitohemijskom analizom. Transformisane BY-2 ćelije su fiksirane na mikroskopske pločice, inkubirane sa anti-FeAPL1 antitelima, a potom i sekundarnim FITC konjugovanim antitelima (Materijal i metode 3.3.7). Kod transformisanih ćelija uočeni su tačkasti fluorescentni signali na površini ćelije (Slika 15a). Fluorescencija je odsustvovala kod netransformisanih ćelija (slika 15b).



a



b



Slika 15. Imunocitohemijska analiza lokalizacije rFeAPL1-His<sub>6</sub> eksprimiranog u BY-2 ćelijama. (a) i transformisane ćelije, (b) netransformisane BY-2 ćelije. rFeAPL1-His<sub>6</sub> (zeleno) je detektovan sekundarnim FITC-konjugovanim antitelima (Sigma). Nukleusi su obojeni fluorescentnom bojom DAPI (plavo). Fluorescencija je detektovana na fluorescentnom mikroskopu Olympus BX51.

Ova dva eksperimenta ukazuju na lokalizaciju rFeAPL1-His<sub>6</sub> u ćelijskom zidu transformisanih BY-2 ćelija.

## 5 DISKUSIJA

### 5.1 Ekspresija rFeAPL1 u heterolognim sistemima

Prečišćavanje veće količine enzima iz biljnog materijala je tehnički komplikovano, kako zbog male količine prisutne u biljnim tkivima, tako često i nestabilnosti enzima. Pored ovoga, ni cena velikog broja hromatografskih tehnika koje se moraju primeniti da bi se dobio kvalitetan izolat nije zanemarljiva. Drugi način za dobijanje proteina je ekspresija u nekom heterolognom sistemu, kao što su *E. coli*, kvasci, ili insekatske ćelije, gde je moguće dobiti veliku količinu proteina prečišćenog i do 95% homogenosti.

Aspartične proteaze spadaju u gupu proteina koji su teški za produkciju u heterolognim sistemima, naročito u *E. coli*. Većina uspešno proizvedenih AP u *E. coli* su lokalizovane u inkluzionim telima, sa narušenom nativnom strukturom i za postizanje njihove aktivnosti bilo je potrebno uraditi „refolding“, tj. renaturaciju nativne strukture. Takav je slučaj sa OsAsp1-APL iz pirinča (Bi *et al.*, 2005), deletiranim formama CND41-APL iz duvana (Nakano *et al.*, 1997), CDR1-APL iz Arabidopsisa (Simoes *et al.*, 2007), kardozinom A-tipičnom AP iz *C. cardunculus* (Simoes *et al.*, 2005), kandidapepsinom iz *C. tropicalis* (Lin *et al.*, 1993), svinjskim pepsinom A (Lin *et al.*, 1989), prohimozinom govečeta (Menzella *et al.*, 2002), humanim prokatepsinom D (Conner & Richo, 1992). Sa druge strane, prijavljena je uspešna produkcija ciprozina u *P. pastoris* (White *et al.*, 1999) i fitepsina u insekatskim ćelijama (Glathe *et al.*, 1998).

*E. coli* je po pravilu prvi izbor za ekspresiju većine novih proteina, kako zbog svoje jednostavnosti, dobro proučene genetike, dostupnosti velikog broja vektora, stalnih unapređivanja sistema, tako i zbog relativno niske cene (Georgiou G., 1996). Uprkos ovim činjenicama, a uzevši u obzir prethodno opisane probleme u produkciji aspartičnih proteinaza u *E. coli*, prvi sistem izabran za ekspresiju FeAPL1 je bio kvasac *Pichia pastoris*, kao najjednostavniji eukariotski ekspresioni sistem. Korišćenje ovog sistema je relativno jednostavno i jeftino u poređenju sa drugim eukariotskim sistemima, sa visokim prinosom rekombinantnog proteina (10-15 mg/l), u kome su moguće posttranslacione modifikacije i formiranje disulfidnih veza što je naročito od značaja za cisteinom bogate proteine kao što je FeAPL1.



FeAPL1 sa i bez signalnog peptida, kao i u fuziji sa N-terminalnim His<sub>6</sub> tagom je uveden u "shuttle" vektor pPIC9K, iza  $\alpha$  signalnog peptida kojim se obezbeđuje sekrecija rekombinantnog proteina u hranljivi medijum. Prednost sekrecije je to što je u medijumu prisutan mali broj kvašćevih proteina, te je prečišćavanje rekombinantnog proteina znatno olakšano. Takođe, na osnovu predikcije lokalizacije, FeAPL1 je ekstracelularni protein (Milisavljević M., 2005), što je prednost za ekspresiju u ovom sistemu. Međutim, ekspresija nije detektovana ni sa jednim konstruktom. Verovatan razlog je razlika u raspoloživim tRNK u ovom sistemu (eng. codon usage difference). Naime, razlika između FeAPL1 i *P. pastoris* u korišćenim kodonima je čak 34,53% na osnovu analize u okviru programa "Graphical Codon Usage Analyser" ([www.gcua.schoedl.de](http://www.gcua.schoedl.de)). Najveće razlike su uočene u kodonima CGC za Arg i CTC za Leu koji su najviše zastupljeni u FeAPL1, a malo u *P. pastoris*. Drugi razlog može biti velika nestabilnost rFeAPL1. Radi sprečavanja proteolize rekombinantnog proteina, u medijum su dodavane 1% kazaminokiseline koje stabilizuju pH medijuma i predstavljaju supstrat za ekstracelularne proteaze čime se smanjuje degradacija rekombinantnog proteina. Kako su analizirane i ćelije i medijum na prisustvo proteina, isključena je mogućnost inhibicije sekrecije u medijum.

Zbog nemogućnosti ekspresije FeAPL1 u *P. pastoris*, pripremljeni su konstrukti za ekspresiju u nekoliko sojeva *E. coli* sa različitim osobinama u pogledu regulacije ekspresije i korišćenja retkih kodona. Iako su aspartične proteinaze produkovane u ovom ekspresionom sistemu završavale u inkluzionim telima, ovaj sistem nudi velike mogućnosti variranja svih njegovih učesnika, čime se može u znatnoj meri uticati na ponašanje eksprimiranog proteina. Bez eksperimentalne provere ne može se pouzdano predvideti efikasnost sistema za dati protein, bez obzira na podatke o prethodno eksprimiranim njemu sličnim proteinima.

Kodirajući region FeAPL1 je fuzionisan sa N-terminalnim His<sub>6</sub> tagom i ovim konstruktom (rHis<sub>6</sub>-FeAPL1) je transformisano nekoliko sojeva *E. coli* (Milisavljević *et al.*, 2009). Polihistidinski tag je izabran jer je slab antigen, mali je, neutralan je na pH 8,0 i kao takav, u većini slučajeva, ne utiče na lokalizaciju i "foldovanje" fuzionog partnera, a samim tim ne remeti njegovu strukturu i funkciju. Takođe, omogućava afinitetno prečišćavanje fuzionog proteina preko Ni-NTA rezina koje čvrsto interaguju sa polihistidinskim tagom (Georgiou G., 1996).

Pošto je razlika u korišćenju kodona („codon usage”) između FeAPL1 i *E. coli* 27,89% (Graphical Codon Usage Analyser <http://gcua.schoedl.de>), za ekspresiju su

izabrani sojevi koji poseduju plazmide sa genima za retke tRNK za Arg, Ile i Leu (soj BL21(DE3)(RIL)) i Arg i Pro (soj BL21(DE3)(RP)), kako bi se izbegli potencijalni problemi sa sintezom proteina. Pokazalo se da nema razlike u količini proizvedenog rekombinantnog proteina među korišćenim sojevima (M15, BL21(DE3)pLysS, BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, BL21-CodonPlus (DE3)-RP), te da, u ovom slučaju, razlika u korišćenim kodonima nije od značaja za efikasnost ekspresije.

Ovaj ekspresioni sistem se pokazao kao veoma efikasan u smislu količine sintetisanog rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 (50 mg/l bakterijske kulture). Međutim, osnovni problem je bio skoro potpuna nerastvorljivost proteina, tj. formiranje inkluzionih tela-agregata delimično i potpuno denaturisanih proteina. Faktori koji utiču na formiranje inkluzionih tela mogu biti: visoka lokalna koncentracija rekombinantnog proteina, redukujuća sredina citoplazme *E. coli* (visoka koncentracija glutationa) koja onemogućava formiranje disulfidnih veza, nedostatak posttranslacionih modifikacija, nepravilna interakcija sa šaperonima i drugim enzimima uključenim u *in vivo* "folding", intermolekularne interakcije i povećana agregacija slabo solubilnih intermedijera u procesu zauzimanja native strukture. Pored ovih opštih faktora, značajan uticaj na nesolubilnost rHis<sub>6</sub>-FeAPL1, je sama njegova primarna struktura. Atipične AP, pa i FeAPL1, poseduju 12 cisteina koji mogu učestvovati u formiranju disulfidnih veza, ali za sada nema eksperimentalnih podataka koliko i koji cisteini učestvuju u formiranju disulfidnih veza. Kako je svih 12 rezidua visoko konzervirano među APL, oni su zasigurno veoma važni za pravilno "foldovanje" proteina koji vodi ka nativnoj strukturi, a samim tim se i obezbeđuje njegova funkcionalnost. Najverovatnije je da rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 zbog nemogućnosti formiranja disulfidnih veza, počinje nepravilno "foldovanje", čime se nesolubilni hidrofobni regioni smeštaju na površinu i zajedno sa gore pomenutim faktorima, protein postaje sklon agregaciji.

Za ovaj tip cisteinom bogatog proteina, veoma je teško naći uslove kako gajenja i indukcije bakterijskih kultura, tako i prečišćavanja proteina, koji će omogućiti pravilno formiranje intramolekulskih, a sprečiti formiranje intermolekulskih disulfidnih veza i formiranje proteinskih agregata. U tu svrhu, bakterije u različitim fazama rasta (OD<sub>600</sub> 0,5-1,1) su indukovane manjom količinom IPTG (0,1, 0,3 i 0,5 mM) kraće vreme (15 min, 30 min, 1 h) i na nižoj temperature. Ovi faktori mogu dovesti do smanjenja koncentracije proteina i povećanja njegove solubilnosti.

Sastav „Lysis” pufera je menjan u cilju povećanja količine prečišćene solubilne frakcije. Povećana je koncentracija soli (sa 300 mM na 1 M NaCl) koja interferira sa formiranjem jonskih veza, dodavani su nejonski detrdženti (0,2% Tween-20 ili Triton X-100) koji povoljno utiču na solubilizaciju proteina, glicerol (10 ili 50%) koji sprečava hidrofobne interakcije između proteina i  $\beta$ -merkaptotanol koji sprečava formiranje disulfidnih veza.

Kako promena uslova indukcije i prečišćavanja nisu poboljšali solubilnost rHis<sub>6</sub>-FeAPL1, afinitetno prečišćen denaturisani protein je podvrgnut “refoldingu”. Puferi, korišćeni za ovu svrhu su sadržavali supstance koje u zavisnosti od koncentracije utiču na formiranje disulfidnih veza ( $\beta$ -merkaptotanol, DTT, redoks sistem, kao što je oksidovani/redukovani glutation, koji održava redoks potencijal rastvora) i supstance koje smanjuju hidrofobne interakcije i povećavaju solubilnost (L-Arg, glicerol, nejonski detrdženti). Prečišćeni denaturisan protein u rastvoru 8 M uree, je ovim puferima izlagan postepeno, tj. postepeno je urea uklanjana iz rastvora procesom dijalize u velikoj zapremini “refold” pufera. Tokom dijalize, protein je duži vremenski period izložen intermedijernim koncentracijama uree u kojima još uvek nije potpuno zauzeo nativnu konformaciju, ali i nije potpuno denaturisan i kao takav je vrlo sklon agrergaciji, što je i bio slučaj sa rHis<sub>6</sub>-FeAPL1. Pokušaj da se ovo izbegne je bio brzo uklanjanje uree procesom brze dilucije u “refold” puferima, ali je protein i u ovom slučaju agregirao. Pored ova dva načina, protein vezan za Ni-NTA matriks je postepeno ispiran puferima sa smanjenom količinom uree, ali protein nije mogao biti eluiran sa kolonice.

Iako nisu iscrpljene sve mogućnosti refoldinga, jer je komponente pufera i njihove koncentracije moguće kombinovati na veliki broj načina, racionalniji pristup je bio da se isprobaju kombinacije različitih tagova i ekspresionih sistema. Pored ovoga, nije retkost da refoldovani protein ima drugačije osobine u odnosu na nativni. Takav je primer sa CDR1 proteinazom eksprimiranom u *E. coli*. Kada je prečišćena iz solubilne frakcije (Suzuki *et al*, 2004), pokazuje slabu aktivnost u širokom opsegu pH (2,0-8,0), na BSA kao supstratu, inhibirana je sa NADPH, ali ne i sa pepstatinom A. Kada je refoldovana (Simoes *et al*, 2007) pokazuje uzak opseg pH 6,2-6,5, inhibiciju sa GSSG, Zn<sup>+</sup>, a sa pepstatinom A samo parcijalnu inhibiciju, seče kazein i insulin, ali ne i BSA i aktivna je kao dimer. Za razliku od rekombinantnih CDR1, nativna je u potpunosti inhibirana pepstatinom A (Xia *et al*, 2004).

Radi povećanja solubilnosti FeAPL1, cDNK je klonirana nizvodno od *malE* gena koji kodira MBP (maltose binding protein), čime je dobijen konstrukt MBP-FeAPL1 u okviru ekspresionog vektora pMAL-c2X, koji obezbeđuje citoplazmatsku ekspresiju. MBP protein poseduje solubilizirajući efekat na strukturno, funkcionalno, hemijski i evoluciono udaljene proteine (Kapust & Waugh, 1999). Postoji nekoliko pretpostavljenih mehanizama njegovog delovanja, ali bez čvrstih eksperimentalnih dokaza. Nekoliko radova ukazuje da se MBP ponaša kao opšti molekularni šaperon u fuziji sa nekim proteinom. Uočeno je nekoliko klastera hidrofobnih aminokiselina na površini MBP proteina koji bi mogli služiti kao mesta vezivanja nepotpuno foldovanih fuzionih partnera i na taj način sprečavati agregaciju rekombinantnih proteina (Spurlino *et al.*, 1991). Mutacije u nekim od ovih aminokiselina narušavaju stabilnost MBPa i njegova solubilizirajuća svojstva (Fox. *et al.*, 2001).

MBP-FeAPL1 je overekspimiran u BL21 (DE3)pLysS i Rosetta-gami ćelijama. Oba soja su proizvodila zadovoljavajuću količinu solubilnog proteina. Rosetta-gami soj je izabran zbog svoje oksidujuće citoplazme (zbog inaktiviranih glutation i tireodoksin reduktaza) koja omogućava formiranje disulfidnih veza. Pored toga, ovaj soj poseduje tRNK za retke kodone: AGG, AGA (Arg) AUA (Ile), CUA (Leu), CCC (Pro) i GGA (Gly). Kombinacija MBP taga i ovog soja je bila kritična za pravilno foldovanje i pravilno pozicioniranje cisteina za formiranje disulfidnih veza. Nativna struktura je omogućila funkcionalnost-proteolitičku aktivnost koja je detektovana proteolizom BSA na kiselom pH (3,0). Na kiselom pH, dolazi do smanjenja količine fuzionog proteina (~90 kDa) i pojave proteinske trake od ~45 kDa, koja bi mogla odgovarati fuzionom proteinu MBP-PRO segment FeAPL1 proteina. Ovo bi moglo značiti da FeAPL1 poseduje PRO segment, koji se uklanja iz aktivnog enzima, kao što je to slučaj sa većinom AP biljaka (Simoes & Faro, 2004). Proteinska traka od 45 kDa je bila uočena i na pH 3,0, 4,0 i 5,0, dok je BSA hidrolizovan samo na pH 3,0. Jedno od objašnjenja bi moglo biti da se na pH 3,0, kada se MBP+PRO autokatalitički ukloni, protein ostaje u nativnoj konformaciji i poseduje proteaznu aktivnost. Na višim, ali kiselim pH, protein autokatalitički uklanja MBP+PRO segment, ali nakon odvajanja MBP, dolazi do delimične denaturacije proteina i on gubi enzimsku aktivnost.

Kontrolne reakcije su isključile mogućnost digestije BSA od strane zaostalih bakterijskih proteinaza pri prečišćavanju MBP-FeAPL1, drugih klasa proteinaza ili nespecifične degradacije u kiselom puferu. Tako, hidroliza BSA je odsustvovala u



reakcijama sa prečišćenim proteinima netransformisanih ćelija, u samom puferu ili u prisustvu 10  $\mu$ M pepstatina A.

Činjenica da je digestija uočena samo sa BSA kao supstratom, a ne sa hemoglobinom i kazeinom, se može interpretirati kao moguća uska supstratna specifičnost FeAPL1, ali su za ovu tvrdnju neophodni eksperimenti sa različitim prirodnim i sintetičkim supstratima.

Periplazmatski prostor predstavlja pogodnu sredinu za ekspimiranje proteina bogatih cisteinom, jer je u njemu moguće formiranje disulfidnih veza. Međutim, u slučaju rMBP-FeAPL1, periplazmatska lokalizacija nije dovela do aktivacije i proteolitička aktivnost nije detektovana.

Drugi eukariotski ekspresioni sistem korišćen za produkciju rFeAPL1 je kultura insekatskih ćelija Sf9. Ovaj eukariotski sistem takođe omogućava relativno visok prinos rekombinantnog proteina, kao i posttranslacione modifikacije, formiranje disulfidnih veza i pravilno foldovanje ekspimiranog proteina. Nakon transfekcije kulture insekatskih ćelija sa konstruktom His<sub>6</sub>-FeAPL1, u prvoj analizi ćelija na prisustvo rekombinantnog proteina, nakon oslobađanja P1 virusnog stoka, rHis<sub>6</sub>-FeAPL1 je detektovan samo u talogu, tj. nesolubilnoj frakciji koja sadrži denaturisani protein (~55 kDa). Kako bi produkcija na velikoj skali i prečišćavanje ovakvog proteina zahtevalo i naknadnu renaturaciju njegove strukture ("refolding"), ovaj sistem nije dalje korišćen za overekspresiju. Iako citoplazma insekatskih ćelija omogućava formiranje disulfidnih veza, verovatno je došlo do favorizacije intermolekulskih veza i agregacije proteina.

## 5.2 Ekspresija FeAPL1 u biljkama

BY-2 ćelije su široko prihvaćena ćelijska linija kao model sistem u proučavanju biljnih ćelija. Dodatna prednost u odnosu na neke druge sisteme je mogućnost relativno lake transformacije ćelija. Stabilno transformisani kalusi i suspenzije se lako održavaju i relativno su zahvalne za manipulaciju.

Rekombinantni protein (FeAPL1-His<sub>6</sub>) od oko 55 kDa je detektovan u proteinskom ekstraktu BY-2 ćelija, što je veća masa u odnosu na predikovanu od 46 kDa, tako da je ovaj protein, najverovatnije glikozilovan, što je u skladu sa kompjuterskom predikcijom po kojoj FeAPL1 poseduje 4 mesta glikozilacije (Milisavljević M., 2005). Proteolitička aktivnost ukupnog kiselog i neutralnog proteinskog ekstrakta je testirana u puferima



različitog pH (3,0-8,0) na BSA, hemoglobinu i kazeinu kao supstratima. Kao i u slučaju citosolnog rMBP-FeAPL1 eksprimiranog u *E. coli*, detektovana je jedino digestija BSA sa kiselim ekstraktom u 0,1 M citratnom puferu pH 3,0, koja je izostala u prisustvu pepstatina A. Digestija je uočena nakon 3 h, dok je nakon 16 h proteoliza BSA detektovana u svim reakcijama (kiselim i neutralnim ekstraktima na pH 3,0-8,0 sa i bez pepstatina A) kao i u kontrolnoj reakciji (BSA u puferu sa proteinskim ekstraktom netransformisanih BY-2 ćelija). Ovo ukazuje da su i native proteaze BY-2 ćelija (a koje nisu inhibirane korišćenim inhibitorima) uključene u digestiju BSA. Iako je i u kiselom i u neutralnom proteinskom ekstraktu, rFeAPL1-His<sub>6</sub> detektovan u solubilnoj frakciji, do proteolize BSA nije došlo u reakciji sa neutralnim ekstraktom proteina u puferu pH 3,0 što ukazuje na znatnu osetljivost enzima na pH.

Ključna razlika u odnosu na rMBP-FeAPL1 je što kod rFeAPL1-His<sub>6</sub> nije uočena autokatalitička obrada, tj. uklanjanje potencijalnog PRO segmenta. Kako je Western blot analizom ukupnog ekstrakta semena, anti-FeAPL1 antitelima detektovan protein iste Mw kao i rFeAPL1-His<sub>6</sub> proizveden u BY-2 ćelijama, verovatno je da se u slučaju rMBP-FeAPL1 došlo do nespecifične obrade proteina. Jedan od razloga može biti da u prokariotskom sistemu, protein nije zaštićen posttranslacionim modifikacijama (npr. glikozilacijom) od delovanja proteinaza, što je slučaj u biljnim ćelijama.

Ukoliko FeAPL1 ne poseduje autoinhibitorni PRO segment, u regulaciji njegove aktivnosti su uključeni drugi mehanizmi kao što je npr. postojanje specifičnog inhibitora ili delovanje komponenti ćelijskog zida koje sterički mogu da blokiraju aktivnost, pozicioniraju je na odgovarajuću lokalizaciju, ili sprečavaju njenu degradaciju. Pošto je lokalizovana na površini ćelije i ne skladišti se, već sinteza proteina prati sintezu RNK, FeAPL1 je verovatno aktivna vrlo brzo nakon sekrecije u ćelijski zid gde je potrebno da odmah obavi proteolizu supstrata. Moguće je da, u fazama sazrevanja semena kada se FeAPL1 najviše eksprimira, dolazi do promena oksido-redukcionog stanja površine ćelija u kojima se eksprimira, što omogućava pravilno formiranje disulfidnih veza i aktivaciju FeAPL1. Tako se pretpostavlja da enzimska aktivnost CDR1, apoplastne APL koja je aktivna bez prethodne proteolitičke obrade, može biti regulisana promenom redukcionog stanja ćelija koje se dešava nakon napada patogena kada se i indukuje ekspresija CDR1 (Simoes *et al.*, 2007).

Kod FeAPL1 proteina proizvedenih u oba sistema, detektovana je aktivnost na pH 3,0. Detaljnije analize aktivnosti nisu rađene i vrlo je verovatno da fine razlike postoje

između ova dva rekombinantna proteina i u pogledu pH optimuma i kinetike, jer posttranslacione modifikacije mogu uticati i na biohemijske karakteristike proteina. Nakon Ni-NTA afinitetnog prečišćavanja proteina iz transformisanih BY-2 ćelija biće moguće detaljno okarakterisati enzimsku aktivnost u smislu kinetike, pH i temperaturnog optimuma.

Određivanje ćelijske lokalizacije FeAPL1 je pokušano preko fluorescentnog reporter proteina EGFPa (enhanced green fluorescent protein). Protein GFP ima veoma široku primenu u biologiji zbog nekoliko karakteristika: fluorescencija ne zahteva dodatne kofaktore ili supstrate, te detekcija zahteva samo ekscitaciju svetlošću od 395-475 nm; relativno mala Mw (~27 kDa) proteina koji se može fuzionisati i N i C-terminalno; stabilan je u prisustvu velikog broja denaturišućih agenasa i proteaza, na širokom opsegu pH i temperatura; nije toksičan; ne interferira sa normalnim ćelijskim procesima. (Ottenschlager *et al*, 1999). Iako određivanje lokalizacije preko GFP fuzija ima široku upotrebu, postoje podaci da isti protein lokalizuje različito u zavisnosti da li je GFP fuzionisan C- ili N-terminalno. U studijama lokalizacije proteina *S. cerevisiae*, ispostavilo se da su pouzdaniji konstrukti sa C-terminalnim GFP (Palmer. & Freeman, 2004). Takođe, Huh *et al*, 2003 su ustanovili, analizirajući lokalizaciju proteina *S. cerevisiae* na velikoj skali sa C-terminalnim GFPem, da iako se u 80% slučajeva lokalizacija podudara sa prethodno objavljenim rezultatima, najveći procenat grešaka se javio kod proteina lokalizovanih u ćelijskom zidu, endoplazmatičnom retikulumu i peroksizomima, najverovatnije jer dolazi do maskiranja signalnih sekvenci smeštenih na C terminusu proteina. Sa druge strane, N terminalni GFP može da maskira potencijalne signalne sekvence smeštene na N terminusu proteina (Weimann *et al*, 2001). Zbog toga je za određivanje lokalizacije FeAPL1, korišćena i N- i C-terminalna fuzija sa GFP proteinom. EGFP je fuzionisan sa kodirajućim regionom FeAPL1 ili njegovim signalnim peptidom (SP). Tako je za transformaciju BY-2 ćelija korišćen konstrukt FeAPL1-EGFP, a konstrukti FeAPL1-EGFP, EGFP-FeAPL1 i SP-EGFP su korišćeni za transformaciju listova duvana. Kao kontrole korišćene su transformacije sa samim vektorom pBINAR-EGFP. Kod BY-2 ćelija, fluorescencija je detektovana samo u kontrolnim ćelijama. Iako je detektovana fuziona FeAPL1-EGFP iRNK, anti-FeAPL1 antitelima nije detektovan fuzioni protein, već protein od ~55 kDa (Mw samog FeAPL1). Svi konstrukti su sekvencirani sa više prajmera, tako da je isključena mogućnost da je u PCR reakciji generisana mutacija koja je dovela do stvaranja stop kodona (nonsense mutacija). Jedan

od razloga može biti nestabilnost fuzionog proteina koji se folduje na način da je dostupan ćelijskim proteazama. Korišćenje listova duvana za lokalizaciju proteina preko EGFPa omogućava brzo dobijanje rezultata nakon tranzijentne transformacije, za razliku od stabilne transformacije BY-2 ćelija za koju je potrebno 3 do 4 meseca. Međutim, fluorescencija nije detektovana ni sa jednim konstruktom, sem u pozitivnoj kontroli. Iako su detektovane iRNK konstrukata, proteini nisu sintetisani. Analizom sekvence utvrđeno je da postoji razlika u korišćenju kodona FeAPL1 i *N. benthamiana* koja iznosi 39,3%, što može biti i jedan od razloga neekspimiranja rFeAPL1 u listovima duvana.

Imunocitohemijski, upotrebom anti-FeAPL1 antitela na BY-2 ćelijama, dobijeni su tačkasti signali na samoj površini ćelija. Western blot analizom ukupnog proteinskog ekstrakta BY-2 ćelija transformisanih sa konstruktom FeAPL1-His<sub>6</sub> sa istim antitelima detektuje se protein od oko 55 kDa, koji nije prisutan u protoplastima transformisanih BY-2 ćelija. Ova dva rezultata ukazuju na ekstracelularnu lokalizaciju FeAPL1, u ćelijskom zidu.

Mali je broj podataka o ulozi ekstracelularno lokalizovanih biljnih proteaza. Zbog teškog izolovanja proteina ćelijskog zida, malo se zna o kvalitativnoj i kvantitativnoj zastupljenosti proteina u ćelijskom zidu. Najveći broj podataka odnosi se na proteine i enzime koji su funkcionalno vezani za polisaharidni matriks ćelijskog zida (celuloza sintaze, glikozid hidrolaze, karbohidrat esteraze, transglikozilaze, polisaharid liaze, peroksidaze, ekspanzini). Zbog različitih strukturnih i biohemijskih osobina proteina ćelijskog zida, ne postoji jedinstven protokol kojim bi se izolovali svi proteini, već u zavisnosti od tipa ciljnih proteina, primenjuju se različiti protokoli. Sve metode izolovanja proteina ćelijskog zida dovode do kontaminacije proteinima iz drugih ćelijskih kompartmana (Lee *et al.*, 2004). Neinvazivnim metodama kao što su vakuum infiltracija ili izolovanje proteina iz hranljivog medijuma ćelijskih suspenzija (Borderies *et al.*, 2003; Bourdard *et al.*, 2005; Charmont *et al.*, 2005), ne mogu se izolovati čvršće vezani proteini, već samo slabo vezani ili slobodni ekstracelularni proteini. Sa druge strane, primenom invazivnih metoda, upotrebom jakih soli, helatorskih agenasa (EDTA, CDTA) i denaturišućih agenasa (urea) koji mogu ekstrahovati čvršće vezane proteine (Bayer *et al.*, 2006; Chivasa *et al.*, 2002), gube se proteini koji su slabim hidrofobnim ili Van der Valsovom interakcijama vezani za ćelijski zid. Pored toga, sve metode, koliko god da su neinvazivne, bar delimično narušavaju integritet plazma membrane, što za posledicu ima kontaminaciju intracelularnim proteinima, naročito baznim koji se lako vezuju za kiseli

polisaharidni matriks ćelijskog zida (Jamet *et al.*, 2006). U svim dosadašnjim studijama proteoma ćelijskog zida, identifikuju se proteini koji se ne bi očekivali na osnovu kompjuterskih predikcija. To su najčešće poznati intracelularni proteini ili proteini koji nemaju identifikovan signalni peptid. Ovi „nekanonski“ proteini su ili kontaminacija ili ekstracelularni proteini koji se izbacuju iz ćelije nekim alternativnim putem (čije je postojanje pokazano kod sisara i kvasaca) ili imaju još uvek nedefinisane SP, ili su nastali alternativnim splajsingom (Chivasa *et al.*, 2002). Pored ovih problema, proteomi ćelijskih zidova različitih biljnih tkiva i ćelija u suspenziji, se značajno razlikuju u proteinskom sastavu. Tako, izolovani proteini ćelijske suspenzije, etioliranih hipokotila i listova rozete Arabidopsisa, od oko 200 proteina imaju zajedničkih svega 11 (Jamet *et al.*, 2006). Značajan broj svih tipova proteinaza je pronađen prilikom različitih izolovanja proteina ćelijskog zida, međutim, za samo mali broj njih je istražena funkcija. Među proteinazama mogu se sresti i one za koje je prethodno utvrđena unutarćelijska lokalizacija, kao što je CND41 iz Arabidopsisa ili pepsin-like proteinaza, ali nije jasno da li su u pitanju kontaminacije ili proteinaze sa više lokalizacija (Boudart *et al.*, 2005).

Arabidopsisna aspartična proteinaza, (Acc. no. At3g52500) koja pokazuje najveći stepen homologije (46% identičnih i 61% sličnih aminokiselina) sa FeAPL1 je identifikovana u tri nezavisne studije proteoma ćelijskog zida: izolovanjem čvrsto vezanih proteina iz prečišćene frakcije ćelijskog zida tri dana stare ćelijske suspenzije Arabidopsisa upotrebom jakih haotropnih i denaturišućih agenasa (CaCl<sub>2</sub>, SDS, DTT, PVP) (Bayer *et al.* 2006); izolovanjem slabo vezanih proteina iz istih ćelija, upotrebom 1M NaCl (Borderies *et al.*, 2003); izolovanjem N-glikozilovanih ekstracelularnih proteina zrelih stabljika Arabidopsisa pomoću konkavalin A sefaroze (Minic *et al.*, 2007).

Među najdetaljnije okarakterisanim biljnim ekstracelularnim proteinazama su serinske endopeptidaze SDD1 i ALE1, serinska karboksipeptidaza BRS1, cisteinske proteinaze RCR3 i NbCathB i aspartična proteinaza CDR1. Ove proteinaze učestvuju kako u procesima razvića biljaka (SDD1, ALE1, BRS1), tako i u odgovoru na biotički stres (RCR3, NbCathB, CDR1). SDD1 je lokalizovana u plazma membrani stominih ćelija i smatra se da je odgovorna za formiranje signala, koji prenosi informaciju do susednih epidermalnih ćelija, kojim se sprečava formiranje stome od susednih ćelija. ALE1 je sekretovana proteinaza endosperma i učestvuje u formiranju kutikule embriona. Način nije jasan, ali se može pretpostaviti da aktivira enzime uključene u deponovanje kutikule. BRS1 proteinaza ćelijskog zida doprinosi percepciji brasinosteroidnog hormona rasta.



RCR3 je apoplastna papain-like cisteinska proteinaza uključena u rezistenciju na buđ *Cladosporium fulvum*. NbCathB je neophodna za hipersenzitivni odgovor izazazan „nonhost“ patogenima. Smatra se da je ekstracelularna i da je na neki način uključena u transdukciju signala (van der Hoorn, 2008). CDR1 je uključena u odbranu od patogena *Pseudomonas syringae* i najverovatnije formiranjem mobilnog signala vodi ka sistemski stečenoj rezistenciji. Detektovana je u prečišćenoj interćeljskoj tečnosti listova *Arabidopsis*, kao i u hrenljivom medijumu stabilno transformisanih BY-2 ćelija. Fuzioni konstrukt CDR1-GFP je lokalizovan na ćelijskoj periferiji i/ili interćeljskom prostoru epidermalnih ćelija korena (Suzuki *et al.*, 2004). Pored ovih, i jedna tipična AP kardozin B iz *C. cardunculus*, koja poseduje PSI, je lokalizovana u ćelijskom zidu i ekstracelularnom matriksu provodnog tkiva tučka, na putu prolaska polenove cevi do jajne ćelije (Vieira *et al.*, 2001), kao i nucelarnom tkivu embrionove kesice, gde njegova ekspresija koareliše sa programiranom ćelijskom smrću nucelarnih ćelija (Figueiredo *et al.*, 2006). Može se pretpostaviti da omogućava remodelovanje i slabljenje ćelijskog zida, čime olakšava prolazak polenove cevi kroz tučak. Ova proteaza je nađena i u semenu, u prvim satima imbibicije i pretpostavlja se da omogućava prve stupnjeve germinacije, omekšavajući tkivo za prolazak radikule (Pereira *et al.*, 2008).

Primeri AP lokalizovanih na ćelijskoj površini susreću se i kod kvasaca. Najbolje izučeni su kod *S. cerevisiae* i različitih vrsta *Candida*. Japsini (eng. Yapsins) su aspartične proteinaze otkrivene kod *S. cerevisiae*, a zatim i kod drugih kvasaca. Karakterišu se uskom supstratnom specifičnošću i poseduju „GPI-anchored“ domen (modifikovani su glikozilfosfatidilinozitolom). Lokalizovani su ili u ćelijskoj membrani i/ili u ćelijskom zidu, a pretpostavljena funkcija je uloga u formiranju ćelijskog zida i/ili njegovom remodelovanju. Postojanje određenih mutanata ukazuje da su verovatno uključeni u regulaciju sinteze  $\beta$ -glukana. S obzirom da ne postoji ni jedan podatak o prirodnim supstratima ovih enzima, njihova tačna funkcija je i dalje spekulativna (Gagnon-Arsenault *et al.*, 2006). Aspartične proteinaze kandida (SAPs 1-10) su glavni faktori virulentnosti humanih kandidaza. SAP1-8 su sekretovane proteaze uključene u različite faze infektivnog toka, SAP9 i 10 su japsinu slične i najverovatnije su uključene u remodelovanje i separaciju ćelijskog zida tokom deobe i adheziju za epitelijalne ćelije (Albrecht *et al.*, 2006).

Sve ovo ukazuje da je potreban veći broj podataka kako bi se govorilo o funkciji FeAPL1. FeAPL1 svojom proteaznom aktivnošću može da menja strukturu ćelijskog

zida, modifikujući enzime koji učestvuju u njegovoj sintezi i remodelovanju. Tako, vijabilnost transformisanih i *wt* BY-2 ćelija u TSC medijumu je bila podjednaka, ali se razlika uočavala pri pranju ćelija PBS puferom tokom pripreme za imunocitohemijsku analizu. Transformisane ćelije su se slabije taložile, nisu se mogle razbiti na pojedinačne ćelije, već su ostajale agregirane. Takođe, mikroskopski je uočena veća zastupljenost liziranih i agregiranih ćelija u odnosu na *wt* BY-2. Moguće da FeAPL1 menja kompoziciju ćelijskog zida, utičući na neki protein/enzim funkcionalno vezan za polisaharidni matriks. S obzirom da se nalazi u ćelijskom zidu i pokazuje proteolitičku aktivnost u *in vitro* eksperimentima, trebalo bi proveriti da li je neki od enzima, koji učestvuje u metabolizmu ćelijskog zida, potencijalni supstrat FeAPL1 enzima.

Analiza potencijalnog promotora gena za FeAPL1 ukazuje da bi FeAPL1 mogao da učestvuje u odgovoru na stresogene faktore. U sklopu *gFeAPL1*, okarakterisan je i uzvodni, potencijalni promotorski region dužine 1134 bp. Kompjuterskom predikcijom pronađeno je više *cis*-aktivirajućih elemenata, koji pokazuju manji ili veći stepen sličnosti sa *cis*-elementima različitih biljnih promotora. Većina pretpostavljenih *cis*-regulatornih elemenata pripada, grubo rečeno, dvema grupama: elementi odgovorni za ekspresiju u semenu i elementi uključeni u regulaciju gena koji se aktiviraju pri stresnim uslovima spoljašnje sredine (ABRE-regulacija ekspresije pod uticajem ABA i različitih tipova sredinskih stresova, Gbox-regulacija pod dejstvom svetlosnog zračenja, RITA1 (ACE-PC)-odgovor na UV-B talase plavog dela spektra, ERE1-regulacija etilenom, Wbox- za vezivanje WRKY proteina koji učestvuju u SA posredovanom odgovoru na patogene). Analiza ekspresije FeAPL1 gena je praćena u listu gde je detektovan nizak nivo ekspresije. Iako je ekspresija najveća u semenu, gde ima karakterističan profil, uticaj stresa je prvo praćen na listu kao metabolički izuzetno aktivnom organu koji je i najizloženiji uticajima spoljašnje sredine. Pored toga, ne treba isključiti mogućnost da FeAPL1 može da ima različite uloge u različitim tkivima, kao što je pokazano za FeAP9 (Timotijević *et al.*, 2009). Međutim, tretmani heljde stresogenim faktorima (suša, mrak, mehanička povreda, UV-B zračenje, salicilna kiselina) nisu doveli do promene ekspresije FeAPL1 gena u listu.

Sa druge strane, FeAPL1 je eksprimiran u većoj količini samo u semenu, dok je u drugim tkivima RNK detektovana u tragovima. Jasno definisan profil ekspresije tokom sazrevanja semena, ukazuje na potencijalnu ulogu u nekom razvojnom procesu. Proces sazrevanja semena heljde nije detaljno proučen i ne postoje podaci o celularnim

promenama u toku sazrevanja. Jedini podaci su vezani za faze sazrevanja do 5 DAFa. U ovoj fazi, već je formiran torpedo stadijum razvića embriona, kotiledoni počinju da se izdužuju, započinje degeneracija suspenzora, nucelarni sloj se u nivou halaze multiplicira, na mikropilarnom kraju ostaje jednoslojan, a endosperm koji nastaje kao nećelijski, već tokom 3 DAFa započinje celularizaciju koja se nastavlja i tokom 5 DAF-a. Iza ove faze, morfogenezne promene su prekinute periodom maturacije kada dolazi do nagomilavanja rezervnih materija. Detaljnih podataka o kasnijim promenama u semenu nema. Dakle, u fazama kada je FeAPL1 najviše eksprimiran, već je završena embriogeneza, dolazi do izduživanja ćelija embriona, nakupljanja rezervnih materija u kotiledonima, a endosperm je celularan. Nema podataka da li dolazi do degeneracije nekih struktura, formiranja novih, ili je samo u pitanju izduživanje i rast postojećih ćelija. Profil ekspresije FeAPL1 ne isključuje mogućnost da je posredno ili neposredno vezan za metabolizam rezervnih proteina, ali lokalizacija u ćelijskom zidu ne ide u prilog ovoj pretpostavci. Imunohistohemijska analiza anti-FeAPL1 antitelima, kao i RNK *in situ* hibridizacija na preseccima semena u različitim fazama zrelosti, nisu dale rezultate i nema podataka o tkivnoj lokalizaciji unutar semena, što otežava pretpostavljanje funkcije FeAPL1.

Iako nije došlo do promene ekspresije FeAPL1 gena u listu pod dejstvom stresogenih faktora, nije isključena mogućnost da ovi faktori indukuju ekspresiju u drugim organima, te bi praćenje promene količine transkripta gena u npr. korenu, stablu i semenu u različitim fazama sazrevanja bili od velikog značaja za određivanje funkcije FeAPL1. Pored ovoga, *in vitro* eksperimenti sa transformisanin BY-2 ćelijama bi mogli dati odgovor o njegovoj uključenosti u odgovor na stres. Tako bi transformacija BY-2 ćelija promotorom FeAPL1 gena u fuziji sa reporter genom kao što je GUS, ukazala da li je ekspresija regulisana na nivou transkripcije, tj. da li se ekspresija menja pod dejstvom različitih stresogenih faktora. U prisustvu transgena FeAPL1, smeštenog u ćelijskom zidu, odgovor BY-2 ćelija na stres bi mogao biti modifikovan, što bi se pratilo na nivou vijabilnosti samih ćelija, i na nivou marker-gena za odgovarajući signalni put karakterističan za dati stres. Mutanti FeAPL1 u katalitičkom mestu i van njega bi ukazali da li je za njegovu biološku ulogu neophodna proteazna aktivnost.

## 6 ZAKLJUČCI

1. Metodama RT PCR i Real Time RT PCR utvrđeno je da gen za FeAPL1 ima specifičan ekspresioni profil u semenu heljde: nisku ekspresija u fazama <9 DAF, 9-11 DAF i 11-14 DAF, za kojima sledi naglo povećanje količine transkripta u fazi 14-17 DAF, a zatim lagano smanjenje količine RNK do faze 23 DAF. Metodom Western blot konstatovano je da proteinski profil prati profil ekspresije RNK u semenu. U listu, cvetu, korenu i stablu detektovana je mala količina RNK, dok protein nije ekspimiran.

2. Pod uticajem ispitivanih abiotičkih faktora stresa (UV zračenje, mrak, suša, mehanička povreda) i salicilne kiseline koja simulira napad patogena (biotički stres) nije detektovana promena u ekspresiji gena za FeAPL1 u listovima heljde.

3. Rekombinantni protein rFeAPL1 je ekspimiran u nekoliko heterolognih ekspresionih sistema: *P. pastoris*, kultura insekatskih ćelija i *E. coli*. Dobijeni su sledeći rezultati:

- Protein nije sintetisan jedino u kvascu, najverovatnije usled velike “codon usage” razlike.
- U kulturi insekatskih ćelija Sf9, rFeAPL1 sa polihistidinskim tagom je bio nesolubiln.
- U *E. coli*, rFeAPL1 sa polihistidinskim tagom je ekspimiran u velikoj količini, ali je bio lokalizovan u inkluzionim telima.
- Produkcija rFeAPL1 proteina sa MBP tagom u Rosetta-gami soju *E. coli* je dovela do sinteze solubilnog rekombinantnog fuzionog proteina. Enzimska aktivnost, detektovana na pH 3,0 na BSA kao supstratu, izostala je dodavanjem pepstatina A, specifičnog inhibitora aspartičnih proteinaza. U puferima kiselog pH, detektovana je proteolitička obrada fuzionog proteina, koja ukazuje na postojanje potencijalnog autoinhibitornog PRO segmenta.

4. Stabilna transformacija BY-2 ćelijske linije duvana konstruktom FeAPL1-His<sub>6</sub>, dovela je do produkcije rekombinantnog proteina od oko 55 kDa. Protein slične Mw je



detektovan i u semenu heljde. Kao i u slučaju rMBP-FeAPL1, detektovana je enzimska aktivnost na pH 3,0 na BSA kao supstratu, koja je izostala dodavanjem pepstatina A. U ovom sistemu nije detektovana proteolitička obrada fuzionog proteina FeAPL1-His<sub>6</sub>. Veća Mw (55 kDa) u odnosu na predikovanu (46 kDa), ukazuje na verovatnu glikozilaciju proteina.

5. Na osnovu odsustva rekombinantnog proteina rFeAPL1-His<sub>6</sub> u protoplastima izvedenim od transformisanih BY-2 ćelija, pretpostavljena je lokalizacija proteina u ćelijskom zidu. Imunocitohemijiskom analizom Anti-FeAPL1 antitelima, detektovan je FeAPL1-His<sub>6</sub> na površini transformisanih BY-2 ćelija, čime je ova pretpostavka potvrđena.

---

## 7 LITERATURA

Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J.R., Schaller, M., de Groot, P., Maccallum, D., Odds, F.C., Schäfer, W., Klis, F., Monod, M., Hube, B., Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions, *J.Biol.Chem.*, **2006**, 281, 688-694

Alekseeva, F., Technology of buckwheat cultivation, **1981**, Kishinev, USSR

An, C-I., Fukusaki, E., Kobayashi, A., Aspartic proteinases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco, *Planta*, **2002**, 214, 661-667

Asakura, T., Abe, K., Arai, S., Evidence for the occurrence of multiple aspartic proteinases in rice seeds, *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, **1995**, 59, 1793-1794

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

Athauda, S., Matsumoto, K., Rajapakshe, S., Kuribayashi, M., Kojima, M., Kubomura N., Iwamatsu, A., Shibata, C., Inoue, H. and Takahashi, K., Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases, *Biochem J.*, **2004**, 381, 295-306

Barros, R.M. & Malcata, F.X., Modeling the kinetics of whey protein hydrolysis brought about by enzymes from *Cynara cardunculus*, *J Agric Food Chem.*, **2002**, 50, 4347-4356

Bayer E.M., Bottrill A.R., Walshaw J., Vigouroux M., Naldrett M.J., Thomas C.L., Maule A.J., Arabidopsis cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology, *Proteomics*, **2006**, 6, 301-311

Bethke, P.C., Hillmer, S., Jones, R.L., Isolation of intact protein storage vacuoles from barley aleurone, *Plant Physiol.*, **1996**, 110, 521-529

Bi, X., Khush, G. and Bennett 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

Bleukx, W., Brijs, K., Torrekens, S., Van Leuven, F., Delcour, J.A., Specificity of a wheat gluten aspartic proteinase, *Biochim.Biophys.Acta*, **1998**, 1387, 317-324

Borderies, G., Jamet, E., Lafitte, C., Rossignol, M., Jauneau, A., Boudart, G., Monsarrat, B., Esquerré-Tugayé, M.T., Boudet, A., Pont-Lezica, R., Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis, *Electrophoresis*, **2003**, 24, 3421-3432

Boudart, G., Jamet, E., Rossignol, M., Lafitte, C., Borderies, G., Jauneau, A., Esquerré-Tugayé, M.T., Pont-Lezica, R., Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics, *Proteomics*, **2005**, 5, 212-221

Butt, T.R., Edavettal, S.C., Hall, J.P., Mattern, M.R., SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins, *Protein Expr Purif.*, **2005**, 43, 1-9

Charmont, S., Jamet, E., Pont-Lezica, R., Canut, H., Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds, *Phytochemistry*, **2005**, 66, 453-461

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.E. and Gal, S., The three typical aspartic proteinase genes of *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed, *Eur. J. Biochem.*, **2002**, 262, 4675-4684

Chivasa, S., Ndimba, B.K., Simon, W.J., Robertson, D., Yu X.L., Knox J.P., Bolwell P., Slabas A.R., Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall, *Electrophoresis*, **2002**, 23, 1754-1765

Chung-Il, A., Fukasaki, E. and Kobayashi A., Aspartic proteinases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco, *Planta*, **2002**, 214, 661-667

Conner, G. E., Richo, G., Isolation and characterization of a stable activation intermediate of the lysosomal aspartyl protease cathepsin D, *Biochemistry*, **1992**, 31, 1142-1147

Cordeiro, M., Jakob, E., Puhan, M.S., Brodelius, P.E., Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from *Cynara cardunculus*- a comparison to chymosin, *Milchwissenschaft*, **1992**, 47, 683-687

Cordeiro, M., Pais, M.S., Brodelius, P.E., Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*, *Physiol.Plant.*, **1994**, 92, 645-653

Costa, J., Ashford, D.A., Nimtz, M., Bento, I., Frazão, C., Esteves, C.L., Faro, C.J., Kervinen, J., Pires, E., Verissimo, P., Wlodawer, A., Carrondo, M.A., The glycosylation of the aspartic proteinases from barley (*Hordeum vulgare* L.) and cardoon (*Cynara cardunculus* L.), *Eur.J.Biochem.*, **1997**, 243, 695-700

Cregg, J. M., Tschopp, J. F., Stillman, C. A., Siegel, R., Akong, M., Craig, W. S., Buckholz, R. G., Madden, K. R., Kellaris, P. A., Davis, G. R., Smiley, B. L., Cruze, J., Torregrossa, R., Velicelebi, G. and Thill, G. P., High level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Bio/Technology*, **1987**, 5, 479-485

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

Davies, D.R., The structure and function of the aspartic proteinases, *Ann Rev Biophys Chem.*, **1990**, 19, 189-215

D'Hondt, K., 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

Doyle & Doyle, A rapid RNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemical Bulletin*, **1987**, 19, 11-15

Dunn, B.M., The structure and mechanism of pepsin-like family of aspartic peptidases, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 4431-4458



Egas, C., Lavoura, N., Resende, R., Brito, R.M., Pires, E., de Lima, M.C., 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, E.N., Dunaevsky, Y.E., Belozersky, M.A. Protein bodies from buckwheat seeds, *J.Exp.Bot.*, **1990**, 41, 969-977

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

Figueiredo, R., Duarte, P., Pereira, S., Pissarra, J., The embryo sac of *Cynara cardunculus* ultrastructure of the development and localisation of the aspartic proteinase cardosin B, *Sex Plant Reprod.*, **2006**, 19, 93-101

Fox, J.D., Kapust, R.B., Waugh, D.S., Single amino acid substitutions on the surface of *Escherichia coli* maltose-binding protein can have a profound impact on the solubility of fusion proteins, *Protein Sci.*, **2001**, 10, 622-630

Frãzao, C., Bento, I., Costa, J., Soares, C.M., Verissimo, P., Faro, C., Pires, E., Cooper, J., Carrondo, M.A., 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

Gagnon-Arsenault, I., Tremblay, J., Bourbonnais, Y., Fungal yapsins and cell wall: a unique family of aspartic peptidases for a distinctive cellular function, *FEMS Yeast Res.*, **2006**, 6, 966-978

Georgiou, G., Protein engineering: Principles and Practice (Cleland, J.L. and Craik, C.S., eds.), 101-127, *Wiley-Liss, New York*, **1996**

Glathe, S., Kervinen, J., Nimtz, M., Li, G.H., Tobin, G.J., Copeland, T.D., Ashfort, D.A., 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

Guruprasad, K., Törmäkangas, K., Kervinen, J., Blundell, T.L., Comparative modeling of barley aspartic proteinase: a structural rationale for observed hydrolytic specificity, *FEBS Lett.*, **1994**, 352, 131-136

- Gynheung, A., High efficient transformation of cultured tobacco cells, *Plant Physiol*, **1985**, 79, 568-570
- Hanahan, D., Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol*, **1983**, 166, 557-580
- Hansen, J.D. & Hannapel, D.J., A wound-inducible potato proteinase inhibitor gene expressed in non-tuber-bearing species is not sucrose inducible, *Plant Physiol.*, **1992**, 100, 164-169
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., da Silva Figueiredo, A.C., Pais, M.S.S., Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*, *Phytochemistry*, **1990**, 29, 1405-1410
- Hink, W.F., Thomsen, D.R., Davidson, D.J., Meyer, A. L., Castellino, F., Expression of three recombinant proteins using baculovirus vectors in 23 insect cell lines, *J. Biotechnol. Prog.*, **1991**, 7, 9-14.
- 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
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., O'Shea, E.K., Global analysis of protein localization in budding yeast, *Nature*, **2003**, 425, 686-691
- Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., Pont-Lezica, R.F., Cell wall proteins: a new insight through proteomics, *Trends Plant Sci*, **2006**, 11, 333-339
- Javornik, B., Studies on protein fractions and protein quality of buckwheat, *Genetica*, **1981**, 13, 115-121
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., ke Nygren, P., Stahl, S., Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2002**, 35, 91-105
- Kapust, R. B., Waugh, D. S., *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused, *Protein Sci.*, **1999**, 8, 1668-1674

Kato, Y., Murakami, S., Yamamoto, Y., Chatani, H., Kondo, Y., Nakano, T., Yokota, A., Sato, F., The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco, *Planta*, **2004**, 220, 97-104

Kato, Y., Yamamoto, Y., Murakami, S., Sato, F., Post-translational regulation of CND41 protease activity in senescent tobacco leaves, *Planta*, **2005**, 222, 643-651

Kervinen, J., Sarkkinen, N., Kalkkinen, N., Mikola, L., Saarma, M., Hydrolytic specificity of the barley grain aspartic proteinase, *Phytochemistry*, **1993**, 31, 799-803

Kervinen, J., Tobi, G.J., Costa, J., Waugh, D.S., Wlodawer, A., Zdanov, A., Crystal structure of plant aspartic proteinase prophytepsin: inactivation and vacuolar targeting, *EMBO J.*, **1999**, 18, 3947-3955

Khan, A.R. & James, M.N., Molecular mechanism for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes, *Protein Sci.*, **1998**, 7, 815-836

Khan, A.R., Khazanovich-Bernstein, N., Bergmann, E.M. & James, M.N., Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursor, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1999**, 96, 10968-10975

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, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **1970**, 227, 680-685

Laloi, M., McCarthy, J., Morandi, O., Gysker, C. and Bucheli, P., Molecular and biochemical characterisation of two aspartic proteinases TcAP1 and TcAP2 from *Theobroma cacao* seeds, *Planta*, **2002**, 215, 754-762

Lee, S.J., Saravanan, R.S., Damasceno, C.M., Yamane, H., Kim, B.D., Rose, J.K., Digging deeper into the plant cell wall proteome, *Plant Physiol Biochem.*, **2004**, 42, 979-988

Lee, J.D. & Komagawa, K., Taxonomic study of methanol assimilating yeast, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **1980**, 26, 133-158

Lin, X.L., Wong, R.N., Tang, J., Synthesis, purification, and active site mutagenesis of recombinant porcine pepsinogen., *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 4482

Lin, X.L., Lin, Y.Z., Koelesh, G., Gustchina, A., Wlodawer, A., And Tang, J., Enzymatic activities of two chain-pepsinogen, two-chain pepsin and amino-terminallobe of pepsinogen, *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 17257-17263

Lin, X., Tang, J., Koelsch, G., Monod, M., Foundling, S., Recombinant candidropsin, an extracellular aspartic protease from yeast *Candida tropicalis*. *Escherichia coli* expression, purification, zymogen activation, and enzymic properties., *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 20143-20147

Lundholm, 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

Marttila, S., Jones, B.L., Mikkonen, A., Differentil localization of two acid proteinases in germinating barley (*Hordeum vulgare*) seed, *Physiol.Plant*, **1995**, 93, 317-327

Mendieta, J.R., Pagano, M.R., Munoz, F.F., Daleo, G.R., Guevara, M.G., Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization, *Microbiology*, **2006**, 152, 2039-2047

Menzella, H.G., Gramajo, H.C., Ceccarelli, E.A., High recovery of prochymosin from inclusion bodies using controlled air oxidation, *Protein Expr. Purif.*, **2002**, 25, 248-255

Middelberg, A., Preparative protein refolding, *Trends Biotechnol*, **2002**, 20, 437-443

Milisavljević, M., Cloning and analysis of gene coding for novel type of aspartic proteinase from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), M.Sc. thesis, **2005**

Milisavljević, M.D., Timotijević, G.S., Radović, S.R., Konstantinović, M.M., Maksimović, V.R., Isolation and structural analysis of gene coding for a novel type of aspartic proteinase from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), *Arch. Biol. Sci.*, **2007**, 59, 119-124

Milisavljević, M.D., Timotijević, G.S., Radović, S.R., Konstantinović, M.M., Maksimović, V.R., Two types of aspartic proteinases from buckwheat seed--gene structure and expression analysis, *J. Plant Physiol.*, **2008**, 165, 983-990





Milisavljević, M.D., Papić, D.R., Timotijević, G.S., Maksimović, V.R., Successful production of recombinant buckwheat cysteine-rich aspartic protease in *E. coli*“, *J.Serb.Chem. Soc.*, **2009**, 74, 607-618

Minic, Z., Jamet, E., Négroni, L., Arsene der Garabedian, P., Zivy, M., Jouanin, L., A sub-proteome of *Arabidopsis thaliana* mature stems trapped on Concanavalin A is enriched in cell wall glycoside hydrolases, *J. Exp. Bot.*, **2007**, 58, 2503-2512

Monod, M., Capoccia, S., Lechenne, B., Zaugg, C., Holdom, M. And Jousson, O., Secreted proteases from pathogenic fungi, *Int. J. Med. Microbiol.*, **2002**, 292, 405-419

Morris, P.C., Miller, R.C., Bowles, D.J., 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 proteinases: enzymes on the way to a function, *Physiol.Plantarum*, **1999**, 105, 569-576

Nagata, T., Nemoto Y. and Hasezawa, S., Tobacco BY2 cell line as the "Hela" cell in the cell biology of higher plants, *Int. Rev. Cytol.*, **1992**, 132, 1-30.

Nagata, T., Hasezawa S., Inzé D., Tobacco BY-2 Cells in Biotechnology in Agriculture and Forastry, **53**, **2004**

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

Ottensschläger, I., Barinova, I., Voronin, V., Dahl, M., Heberle-Bors, E., Touraev, A., Green fluorescent protein (GFP) as a marker during pollen development, *Transgenic Res.*, **1999**, 8, 279-294

Palmer, E., Freeman, T., Investigation into the use of C- and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays, *Comp. Funct. Genomics.*, **2004**, 5, 342-353

Panavas, T., Pikula, A., Reid, P. D., Rubinstein, B., Walker, E.L., Identification of senescence-associated genes from daylily petals, *Plant Mol.Biol.*, **1999**, 40, 237-248

Paris, N., Stanley, C.M., Jones, R.L., Rogers, J.C. Plant cells contain two functionally distinguished vacuolar compartments, *Cell*, **1996**, 85, 563-572

Park, H., Yamanaka, N., Mikkonen, A., Kusakabe, I. & Kobayashi, H., Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2000**, 64, 931-939

Pearl, L.H. and Taylor, W.R., A structural model for retroviral proteases, *Nature*, **1987**, 329, 351-354

Pereira, C.S., da Costa, D.S., Pereira, S., Nogueira, F. de M., Albuquerque P.M., Teixeira J., Faro, C., Pissarra, J., Cardosins in postembryonic development of cardoon: towards an elucidation of the biological function of plant aspartic proteinases, *Protoplasma*, **2008**, 232, 203-213

Pomeranz, Y., Aminoacid composition of buckwheat, *J.Agric.Foodchem.*, **1972**, 20, 270-274

Radlowski, M., Kalinowski, A., Adamczyk, J., Krolikowski, Z., Bartkowiak, S., Proteolytic activity in the maize pollen wall, *Physiol.Plant.*, **1996**, 98, 172-178

Radović, S. Characterization of buckwheat seed storage proteins, *PhD thesis*, **1998**, University of Belgrade

Ramalho-Santos, M., Pissarra, 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

Rao, J.K., Erickson, J.W., Wlodawer, A., Structural and evolutionary relationship between retroviral and eucaryotic aspartic proteinases, *Biochemistry*, **1991**, 30, 4663-4671

Rawlings, N.D. & Barrett, A.J., Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism, *Met Enzymol*, **1995**, 248, 105-120

Rodrigo, I., Vera, P., Conejero, V., Degradation of tomato pathogenesis-related proteins, *Plant Physiol.*, **1989**, 184, 663-669





Rodrigo, I., Vera, P., Van Loon, L.C., Conejero, V. Degradation of tobacco pathogenesis-related proteins, *Plant. Physiol.* **1991**, 95, 616-622

Runeberg-Roos, P., Kervinen, J., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Gal, S., The aspartic proteinase of barley is a vacuolar enzyme that processes lecithin in vitro, *Plant Physiol.*, **1994**, 105, 321-329

Runeberg-Roos, P. & Saarna, M., Phytapsin, a barley vacuolar aspartic proteinase, is highly expressed during autolysis of developing tracheary elements and sieve cells, *Plant J.*, **1998**, 15, 139-145

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

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular cloning. A laboratory manual (second edition), *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **1989**

Sarkkinen, P., Kalkkinen, N., Tilgmann, 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, C.A., Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein, *Plant Mol. Biol.*, **1996**, 31, 1073-1077

Schuetz, C.G., Pierstorff, B., Huettler, S., Sandhoff, K., Sphingolipid activator proteins: proteins with complex functions in lipid degradation and skin biogenesis, *Glycobiology*, **2001**, 11, 81R-90R

Simoes, 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, A. Y., Faro, C., Pires, E., Molecular analysis of the interaction between cardosin A and phospholipase D $\alpha$ . Identification of RGD/KGE sequences as binding motifs for C2 domains., *FEBS J.*, **2005**, 272, 5786-98

Simões, I., Faro, R., Bur, D., Faro, C., Characterization of recombinant CDR1, an Arabidopsis aspartic proteinase involved in disease resistance, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 31358-65

Sørensen, H.P., Sperling-Petersen, H.U., Mortensen, K.K., Dialysis strategies for protein refolding. Preparative streptavidin production, *Protein Expr. Purif.*, **2003**, 32, 252–259

Spurlino, J.C., Lu, G.Y., Quioco, F.A., The 2.3-A resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 5202-5219

Suzuki, H., Xia, Y., Cameron, R., Shadle, G., Blount, J., Lamb, C., Dixon, R.A., Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack, *J. Exp. Bot.*, **2004**, 55, 169-179

Swartz, J. R., Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2001**, 12, 195–201

Terpe K., Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, 60, 523–533

Timotijević, G., Radović, S. and Maksimović, V., Characterization of an aspartic proteinase activity in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 2100-2104

Timotijević, G.S., Milisavljević, M.D., Radović, S.R., Konstantinović, M.M., Maksimović, V.R., Ubiquitous aspartic proteinase as an actor in the stress response in buckwheat, *J. Plant Physiol.*, **2009**, *in press*

Törmäkangas, K., Kervinen, J., Östman, A., Teeri, T.H., Tissue-specific localization of aspartic proteinase in developing and germinating barley grains, *Planta*, **1994**, 195, 116-125

Törmäkangas, K., Hadlington, J.L., Pimpl, P., Hilmmer, S., Brandizzi, F., Teeri, T.H., Denecke, J., A vacuolar sortin domain may also influence the way in which proteins leave endoplasmic reticulum, *Plant Cell*, **2001**, 13, 2021-2032

Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A., Gingeras, T. R., Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*, *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 15, 3859-3876

Vaccaro, A.M., Salvioli, R., Tatti, M., Ciaffoni, F., Saposinins and their interaction with lipids, *Neurochem. Res.*, **1999**, 24, 307-314

van der Hoorn, R.A. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2008**, 59, 191-223

Verissimo, P., Faro, C., Moir, A.J.G., 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

Vieira, M., Pissara, 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.Bol.*, **2001**, 45, 529-539

Voigt, J., Kamaruddin, S., Heinrichs, H., Wrann, H., Senyuk, V. and Biehl, B., Developmental stage-dependant variation of the levels of globular storage protein and aspartic endoprotease during ripening and germination of *Theobroma cacao* seeds, *J. Plant. Physiol.*, **1995**, 144, 299-307

Weimann, S., Weil, B., Wellenreuther, R., Toward a catalog of human genes and proteins: sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs, *Genome Res*, **2001**, 11, 422-435

White, P.C., Cordeiro, M.C., Arnold, D., Brodelius, P.E., Kay, J., Processing, activity and inhibition of recombinant cyprosin, an aspartic proteinase from cardoon (*Cynara cardunculus*), *J.Biol.Chem.*, **1999**, 274, 16685-16693

Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., Dixon, R.A. & Lamb, C., An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signaling, *EMBO J.*, **2004**, 23, 980-988

Zhang, N. & Jones, B.L., Development of proteolytic activities during barley malting and their localization in the green malt kernel, *J.Cereal Sci.*, **1995**, 22, 147-155









PD 20622



300160351

COBISS \*