

Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

mr Nataša Božić

**Citosolne leucil-aminopeptidaze srednjeg
creva larvi *Morimus funereus***

Doktorska disertacija

Beograd, 2007.

MENTOR:

dr Zoran Vujčić, docent
Hemijski fakultet, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Dušan Sladić, vanredni profesor
Hemijski fakultet, Beograd

dr Vlatka Vajs, naučni savetnik
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju
Beograd

dr Vera Nenadović, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja
„Siniša Stanković“, Beograd

dr Jelisaveta Ivanović, naučni savetnik u penziji
Institut za biološka istraživanja
„Siniša Stanković“, Beograd

DATUM ODBRANE:

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za biohemiju, Hemijskog fakulteta i Centru za hemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom docenta dr Zorana Vujčića.

Mentoru, docentu dr Zoranu Vujčiću, zahvaljujem se na svesrdnoj pomoći u svakom trenutku izrade i pisanja ove teze. Zahvalna sam na neizmernim sugestijama i idejama, podršci i razumevanju, kao i prilici da budem saradnik u stvaralačkom entuzijazmu i naučnom pregalaštvu.

Disertacija je urađena u saradnji sa Odeljenjem za biohemiju i fiziologiju insekata, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Posebno se zahvaljujem dr Jelisaveti Ivanović, začetniku ove naučne oblasti kod nas i rukovodiocu odeljenja, dr Veri Nenadović što su me uvele u oblast biohemije i fiziologije insekata. Zahvalna sam na dragocenoj pomoći u prikupljanju materijala i hemikalija, brojnim i uvek svežim idejama i korisnim sugestijama i diskusijama tokom izrade i pisanja ovog rada.

Dr Dušanu Sladiću i Dr Vlatki Vajs zahvaljujem se na dragocenim sugestijama u toku izrade i pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se celokupnom kolektivu Nacionalnog parka Fruška gora, a specijalno Dejanu Stojanoviću, na nesebičnom angažovanju u prikupljanju uzoraka.

Zahvaljujem se svim dragim kolegama i prijateljima, pre svih Biljani, kao i kolegama iz laboratorije 483, Aleksandri i Urošu, i svim važnim osobama koje su pomogle da se ovaj rad realizuje, a najviše svojoj porodici.

Citosolne leucil-aminopeptidaze srednjeg creva larvi *Morimus funereus*

IZVOD

Ciljevi ovog rada su bili: razvijanje visoko osetljivog i kvantitativnog zimogramskog eseja za leucil-aminopeptidaze (LAP) i detekcija izoformi na osnovu zimograma u sirovom ekstraktu srednjeg creva larvi *M. funereus*; izolovanje glavne izoforme LAP srednjeg creva larvi *M. funereus* do homogenosti i molekulska i enzimska karakterizacija.

Opisan je opšti metod za detekciju leucil-aminopeptidazne aktivnosti nakon native poliakrilamidne gel elektroforeze *in situ*. Metod je zasnovan na diazotovanju *p*-nitroanilina, oslobođenog u gelu dejstvom leucil-aminopeptidaze na leucin-*p*-nitroanilid, koji je zatim kuplovan sa hromogenom, 1-naftilaminom, do pojave ružičaste azo-boje na mestu enzimske aktivnosti. Nađeno je da je metod reproduktivan sa koeficijentom varijacije manjim od 15% za 32-struki opseg, dok je obojena površina na mestu enzimske aktivnosti u linearnoj zavisnosti od enzimske aktivnosti.

Glavna izoforma leucil-aminopeptidaze srednjeg creva larvi *M. funereus* je prečišćena do homogenosti i okarakterisana. Specifična aktivnost LAP je porasla 292 puta prečišćavanjem sirovog ekstrakta srednjeg creva. Prečišćen enzim ima pH optimum 7,5 i preferencijalno hidrolizuje *p*-nitroanilide sa hidrofobnim aminokiselinama, sa najvećim V_{\max}/K_M za leucin-*p*-nitroanilid. Najefikasniji inhibitori su 1,10-fenantrolin sa K_i vrednošću od 0,12 mM i cistein sa K_i od 0,31 mM. EGTA je stimulisao aktivnost LAP. Zn^{2+} , Mg^{2+} i Mn^{2+} su pokazali bi-modalni efekat na aktivnost LAP. Prečišćeni LAP (nakon gel-filtracije na Superose 6 koloni) je imao molekulsku masu od 400 kDa i izoelektričnu tačku 6,2. SDS-PAGE-om je pokazana jedna proteinska traka na 67 kDa, što ukazuje da je enzim heksamer. Šest peptidnih sekvencija je dobijeno iz proteinske trake ESI/MS-MS analizom. Poređenjem dobijenih peptidnih sekvencija EMBL-EBI programom za analizu sekvencija sa sekvencijama iz BLASTP baze podataka pokazan je visok stepen identičnosti sa drugim aminopeptidazama insekata.

Ključne reči: leucil-aminopeptidaze, srednje crevo, izoforme, *Morimus funereus*, ksilofagne larve, *p*-nitroanilid, zimogram.

Cytosolic leucyl aminopeptidase from the midgut of *Morimus funereus* larvae

ABSTRACT

The aims of this work were: development of sensitive and quantitative zymogram assay for leucyl aminopeptidases (LAP) and detection of LAP isoforms in the crude midgut extract of *M. funereus* larvae; purification of major LAP from the midgut of *M. funereus* larvae to homogeneity and its molecular and enzymatic characterization.

A general method for detecting leucyl aminopeptidase activity after native polyacrylamide gel electrophoresis *in situ* is described. The method is based on diazotization of *p*-nitroaniline, liberated in the polyacrylamide gel by leucyl aminopeptidase action on leucine-*p*-nitroanilide and subsequent coupling with a chromogen, 1-naphthylamine, until a pink azo dye product at the position of enzyme activity is obtained. This method was found to be reproducible with the coefficient of variation below 15% for a 32-fold range, while the colored area of enzyme activity was in linear dependence to enzyme activity.

The major leucyl aminopeptidase from the midgut of *M. funereus* larvae was purified and characterised. Specific LAP activity was increased 292-fold by purification of the crude midgut extract. The purified enzyme had a pH optimum of 7,5 and preferentially hydrolysed *p*-nitroanilides containing hydrophobic amino acids in the active site, with the highest V_{\max}/K_M ratio for leucine-*p*-nitroanilide. The most efficient inhibitors were 1,10-phenanthroline having a K_i value of 0,12 mM and cysteine with K_i value of 0,31 mM. EGTA stimulated LAP activity. Zn^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} all showed bi-modal effects on LAP activity. The purified LAP (after gel-filtration on Superose 6 column) had molecular mass of 400 kDa with an isoelectric point of 6,2. SDS-PAGE revealed one band of 67 kDa, suggesting that the enzyme is a hexamer. Six peptide sequences from protein band were obtained using ESI/MS-MS analysis. Comparison of the obtained peptide sequences with the EMBL-EBI sequence analysis toolbox and the BLASTP database showed a high degree of identity with other insect aminopeptidases.

Keywords: leucyl aminopeptidase, midgut, isoform, Cerambycid beetle, *Morimus funereus*, xylophagous larvae, *p*-nitroanilide, zymogram.

Lista skraćenica korišćenih u tekstu

β -LGA	beta-laktoglobulin
1,10-Phe	1,10-fenantrolin
AD	veštačka dijeta (eng. artificial diet)
AMK	alanil-metil-ke-ton
ApNA	alanil- <i>p</i> -nitroanilid
APS	amonijum-persulfat
AS	amonijum-sulfat
bLAP	leucil-aminopeptidaza oćnog soćiva govećeta (eng. bovine lens leucyl aminopeptidase)
BSA	goveći serum albumin
Bt toksin	<i>Bacillus thuringiensis</i> toksin
CBB	(eng. coomassie brilliant blue)
CM	karboksi-metil
DEAE	dietil-aminoetil
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamid
DNA	dezoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
EGTA	etilenglikol-bis-(β -amino-etiletar) <i>N,N'</i> -tetrasirćetna kiselina
FPLC	brza tećna hromatografija proteina (eng. fast protein liquid chromatography)
HEPES	<i>N</i> -2-hidroksietilpiperazin- <i>N'</i> -2-etansulfonska kiselina
HPLC	visoko efikasna tećna hromatografija (eng. high performance liquid chromatography)
IEF	izoelektrićno fokusiranje
KpNA	lizil- <i>p</i> -nitroanilid
LAP	leucil-aminopeptidaza
LMW	male molekulske mase (eng. low molecular weight)
LpNA	leucin- <i>p</i> -nitroanilid
MM	molekulska masa
MpNA	metionil- <i>p</i> -nitroanilid
PAA	poliakrilamid
PAGE	poliakrilamidna gel elektroforeza
PBS	fosfatni pufer (eng. phosphate buffer saline)
pI	izoelektrićna taćka
PM	peritrofni matriks
pNA	<i>p</i> -nitroanilin
PUZ	pufer za uzorke
SA ₂ pNA	sukcinil-alanil-alanil- <i>p</i> -nitroanilid
SDS	natrijumdodecil-sulfat
TEMED	<i>N,N,N,N'</i> -tetrametil-etilendiamin
UV	ultraljubićasto (eng. ultraviolet)

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	OPŠTI DEO	3
2.1	Digestivni sistem insekata	7
2.1.1	Morfologija i organizacija	7
2.1.2	Kompartimentalizacija varenja	12
2.1.3	Digestivni enzimi	13
2.1.4	Mehanizmi kontrole sinteze i sekrecije digestivnih enzima insekata	14
2.1.5	Antinutritivni odbrambeni mehanizmi biljaka	15
2.2	Klasifikacija enzima	18
2.2.1	Egzopeptidaze	19
2.2.2	Klan MF, familija M17- familija leucil-aminopeptidaza	19
2.3.	Leucil-aminopeptidaze (životinjske i biljne)	21
2.3.1.	Ime i istorijat LAP	21
2.3.2	Aktivnost i specifičnost LAP	22
2.3.3	Hemijska struktura LAP	22
2.3.4	Biološka aktivnost LAP	24
2.3.5	Inhibitori LAP	25
2.3.5.1	Analozi amino kiselina	26
2.3.5.1.1	Aminoaldehidi	26
2.3.5.1.2	Derivati α -aminoborонатne kiseline	26
2.3.5.1.3	Fosfonska kiselina	27
2.3.5.1.4	Hidroksamati	27
2.3.5.1.5	Hlormetil ketoni	27
2.3.5.1.6	Tioli	27
2.3.5.2	Analozi peptida	27
2.3.6	Testovi za određivanje aktivnosti LAP	29
2.3.6.1	Testovi sa sintetičkim supstratima	29
2.3.6.1.1	Aminopeptidazni testovi	29
2.3.6.2	Zimogramska detekcija LAP	30
2.3.7	Prečišćavanje LAP	32
2.3.7.1	Opšte metode prečišćavanja	33
2.3.7.2	Afinitetna hromatografija	33
2.3.7.2.1	Supstrat-afinitetna hromatografija	34
2.3.7.2.2	Inhibitor-afinitetna hromatografija	34
2.3.7.2.3	Funkcionalna afinitetna hromatografija	34
2.3.7.2.4	Prečišćavanje aminopeptidaza afinitetnom hromatografijom	34
2.3.7.3	Prečišćavanje aminopeptidaza preparativnom elektroforezom	35
2.3.8	Homologija leucil-aminopeptidaza	35
2.4	Aminopeptidaze tvrdokrilaca	37
3.	NAŠI RADOVI	41
3.1	Larve <i>M. funereus</i>	42
3.1.1	Gajenje larvi <i>M. funereus</i>	43

3.1.2	Priprema sirovog ekstrakta srednjeg creva larvi <i>M. funereus</i>	45
3.1.3	Određivanje pH vrednosti lumena creva	45
3.1.4	Određivanje koncentracije proteina i leucil-aminopeptidazne aktivnosti	47
3.2	Zimogramska detekcija LAP	48
3.2.1	Priprema enzimskih ekstrakata	49
3.2.2	Nativna PAGE	49
3.2.3	Detekcija aktivnosti LAP na gelu nakon native PAGE	49
3.2.4	Određivanje linearnosti, osetljivosti i reproduktivnosti detekcije aktivnosti LAP na gelu nakon native PAGE	51
3.2.4.1	Priprema delimično prečišćene LAP iz kotiledona pasulja i detekcija aktivnosti na gelu nakon native PAGE	51
3.2.4.2	Analiza slika gelova	51
3.2.4.3	Linearnost, osetljivost i reproduktivnost zimogramske detekcije LAP	51
3.2.5	Zimogramska detekcija LAP izoformi iz kotiledona pasulja korišćenjem različitih aminoacil- <i>p</i> -nitroanilida	53
3.2.6	Zimogramska detekcija elastazi sličnih izoformi iz srednjeg creva larvi <i>M. funereus</i>	54
3.3	Detekcija izoformi i prečišćavanje glavne LAP	55
3.3.1	Gel-hromatografsko frakcionisanje proteina srednjeg creva larvi <i>M. funereus</i>	56
3.3.2	Hidrofobna hromatografija proteina srednjeg creva larvi <i>M. funereus</i>	59
3.3.3	Rehromatografija frakcija sa LAP aktivnošću spojenih nakon različitih gel-hromatografija na Sephadex G 200	60
3.3.4	SDS-PAGE frakcija sa LAP aktivnošću nakon rehromatografije na Sephadex G 200	61
3.3.5	6% Nativna PAGE frakcija sa LAP aktivnošću nakon rehromatografije na Sephadex G 200	62
3.3.6	6% Nativna PAGE sirovih ADJ ekstrakata	63
3.3.7	Nativna gradijent PAGE sirovog ADJ ekstrakta	65
3.3.8	Denaturišuća elektroforeza sirovog ADJ ekstrakta	65
3.3.9	Prečišćavanje glavne izoforme LAP	66
3.3.9.1	Gel-hromatografsko frakcionisanje proteina sirovog ADJ ekstrakta na Superose 6 FPLC koloni	66
3.3.9.2	Prečišćavanje preparativnom nativnom gradijent (4,5-8%) poliakrilamidnom gel-elektroforezom i gel-hromatografijom na Superose 6 FPLC koloni	67
3.4	Karakterizacija LAP	69
3.4.1	Određivanje molekulske mase LAP	69
3.4.2	Određivanje izoelektrične tačke LAP	71
3.4.3	Određivanje aktivnosti LAP	72
3.4.4	pH optimum	72
3.4.5	Određivanje K_M i V_{max} vrednosti	73
3.4.6	Određivanje supstratne specifičnosti nativnom PAGE	74
3.4.7	Ispitivanje dejstva inhibitora na LAP	75
3.4.8	Ispitivanje dejstva dvovalentnih metalnih katjona na LAP	77
3.4.9	ESI-MS/MS analiza	79
3.4.10	Analiza sekvencija	79
3.5	Zaključci	83

4.	EKSPERIMENTALNI DEO	85
4.1	Eksperimenti sa larvama	86
4.1.1	Gajenje larvi <i>M. funereus</i>	86
4.1.2	Priprema sirovog ekstrakta srednjeg creva larvi <i>M. funereus</i>	87
4.1.3	Određivanje pH vrednosti lumena creva	87
4.1.4	Određivanje koncentracije proteina po Bradford-u	88
4.1.5	Određivanje leucil-aminopeptidazne aktivnosti	89
4.2	Zimogramska detekcija LAP	90
4.2.1	Priprema enzimskih ekstrakata	90
4.2.2	Nativna PAGE	90
4.2.3	Detekcija aktivnosti LAP na gelu nakon nativne PAGE	94
4.2.4	Određivanje linearnosti, osetljivosti i reproduktivnosti detekcije aktivnosti LAP na gelu nakon nativne PAGE	95
4.2.4.1	Priprema delimično prečišćene LAP iz kotiledona pasulja i detekcija aktivnosti na gelu nakon nativne PAGE	95
4.2.4.2	Analiza slika gelova	96
4.2.4.3	Linearnost, osetljivost i reproduktivnost zimogramske detekcije LAP	96
4.2.5	Zimogramska detekcija LAP izoformi iz kotiledona pasulja korišćenjem različitih aminoacil- <i>p</i> -nitroanilida	96
4.2.6	Zimogramska detekcija elastazi sličnih izoformi iz srednjeg creva larvi <i>M. funereus</i>	96
4.3	Detekcija izoformi i prečišćavanje glavne LAP	97
4.3.1	Gel-hromatografsko frakcionisanje proteina srednjeg creva larvi <i>M. funereus</i>	97
4.3.2	Hidrofobna hromatografija proteina srednjeg creva larvi <i>M. funereus</i>	98
4.3.3	Rehromatografija frakcija sa LAP aktivnošću spojenih nakon različitih gel-hromatografija na Sephadex G-200	98
4.3.4	SDS-PAGE frakcija sa LAP aktivnošću nakon rehromatografije na Sephadex G-200	98
4.3.5	6% Nativna PAGE frakcija sa LAP aktivnošću nakon rehromatografije na Sephadex G-200	101
4.3.6	6% Nativna PAGE sirovih ADJ ekstrakata	101
4.3.7	Nativna gradijent PAGE sirovog ADJ ekstrakta	102
4.3.8	SDS-PAGE sirovog ADJ ekstrakta	103
4.3.9	Prečišćavanje glavne izoforme LAP	103
4.3.9.1	Gel-hromatografsko frakcionisanje proteina sirovog ADJ ekstrakta na Superose 6 FPLC koloni	103
4.3.9.2	Prečišćavanje preparativnom nativnom gradijent (4,5–8%) poliakrilamidnom gel-elektroforezom i gel-hromatografijom na Superose 6 FPLC koloni	104
4.4	Karakterizacija LAP	104
4.4.1	Određivanje molekulske mase LAP	104
4.4.2	Određivanje izoelektrične tačke LAP	105
4.4.3	Određivanje aktivnosti LAP	107
4.4.4	pH optimum	107
4.4.5	Određivanje K_M i V_{max} vrednosti	108
4.4.6	Određivanje supstratne specifičnosti	108

4.4.7	Ispitivanje dejstva inhibitora na LAP	109
4.4.8	Ispitivanje dejstva dvovalentnih metalnih katjona na LAP	110
4.4.9	ESI-MS/MS analiza	110
5.	LITERATURA	111

1. Uvod

Varenje kod insekata proučava se više od jednog veka, pa ipak je razumevanje ovog procesa daleko od kompletnog. Broj dostupnih podataka i radova koji se bave svim aspektima funkcije creva kod insekata, u poslednje vreme beleži rast, a za to postoje dva glavna razloga. Prvi je što je crevo insekata odličan eksperimentalni model za proučavanje funkcija creva uopšte, naročito zbog toga što su ove jedinke adaptirane na skoro sve vrste staništa i tipova hrane. Drugi razlog je u činjenici da je crevo insekta glavna spona između insekta i njegove okoline. Stoga je razumevanje funkcije creva esencijalno za razvoj metoda kontrole brojnosti insekata preko creva, kao što je primena transgenih, za insekta toksičnih, biljaka u kontroli fitofagnih insekata.

Larve *Morimus funereus* spadaju u ksilofagne larve, jer se razvijaju u kori i gornjim slojevima beljike većeg broja lišćara i nekih četinara. Larve se mogu naći na fiziološki oslabljenim stablima u prvim stupnjevima razgradnje drveta, kao i na ležacima i panjevima, te otuda nije zanemarljiv njihov ekonomski značaj. S obzirom na visok nivo inhibitora peptidaza i drugih biljnih odbrambenih molekula, a nizak nivo osnovnih hranljivih materija ksilofagne vrste koje se razvijaju u nepovoljnom supstratu, odnosno podaci o digestivnim enzimima ovih vrsta, koje su pritom prilagođene na život u različitim, promenljivim, sredinama zahvaljujući funkciji genetskih i plastičnih karakteristika jedinki u njihovim populacijama, u novije vreme dobijaju na značaju.

Leucil-aminopeptidaza (EC 3.4.11.1) je nađena u tkivima mnogih predstavnika kičmenjaka i beskičmenjaka. U digestivnom sistemu kičmenjaka i beskičmenjaka, aminopeptidaze imaju dominantnu ulogu u intermedijernoj i terminalnoj fazi varenja hidrolizujući delimično svarene oligopeptide do lako difundujućih molekula. Aminopeptidaze kod insekata, osim dobro poznate uloge u varenju hrane, imaju značajne uloge u procesima presvlačenja i regulaciji peptidnih neurotransmitera.

Relativno malo literaturnih podataka postoji o aminopeptidazama predstavnika Coleoptera. Najdetaljnije proučena aminopeptidaza predstavnika Coleoptera je mikrovilarna aminopeptidaza vrste *Tenebrio molitor*.

Kad je u pitanju familija Cerambycidae kojoj pripada *M. funereus* postoji veoma mali broj podataka o proteolitičkim enzimima, a o leucil-aminopeptidazama gotovo da nema nikakvih literaturnih podataka.

Dosadašnja istraživanja na polifagnim larvama vrste *M. funereus* su pokazala značajnu ulogu digestivnih enzima u razviću i procesima aklimatizacije i reakcije na stres, temperaturnog i nutricionog tipa.

Radi razjašnjavanja uloge vodeće peptidaze u polifagnoj prirodi larvi *M. funereus*, kao i produblivanja saznanja o biohemijskoj organizaciji digestivnih procesa kod familije Cerambycidae postavljeni su sledeći ciljevi ovog rada:

- razvijanje visoko osetljivog i kvantitativnog zimogramskog testa za leucil-aminopeptidaze (LAP) i detekcija izoformi na osnovu zimograma u sirovom ekstraktu srednjeg creva larvi *M. funereus*;
- izolovanje glavne izoforme LAP srednjeg creva larvi *M. funereus* do homogenosti;
- molekulska i enzimska karakterizacija (što bi obuhvatilo): MM, pI, broj subjedinića, parcijalnu sekvenciju (s pretragom homologih sekvencija sličnih enzima), katalitičke osobine, supstratnu specifičnost prema seriji pNA supstrata i ispitivanje uticaja raznih inhibitora i aktivatora.

2. Opšti deo

Život na planeti Zemlji, kakav mi poznajemo zavisi, u najprostijem smislu, od ciklusa proizvodnje i potrošnje. Ovaj ciklus skoro u potpunosti čine zelene biljke kao primarni proizvođači i insekti kao primarni potrošači. Zbog toga ova dva oblika života po brojnosti i raznolikosti prevazilaze sve druge višćelijske organizme. Oni su međusobno zavisni i formiraju jezgro oko kojega su izgrađeni svi kopneni i vodeni ekosistemi. Bez zelenih biljaka i organskih molekula koje proizvode tokom fotosinteze izumro bi ceo životinjski svet, a bez insekata i drugih razgrađivača, zelene biljke bi ubrzo ostale bez izvora hranljivih materija, a mrtva organska materija bi se akumulirala. Zbog svoje efikasnosti, insekti su neprevaziđeni čistači prirode. Procene su da je od kada je Carolus Linnaeus (1707–1778) ustanovio moderan sistem klasifikacije živih organizama (rod, vrsta) opisano preko 800 000 vrsta insekata (1). Poređenja radi, celo carstvo biljaka broji između 400 000 i 500 000 opisanih vrsta. Insekti predstavljaju više od polovine (oko 53%) danas poznatih vrsta organizama, slika 1, a pretpostavlja se da postoje milioni još neotkrivenih insekatskih vrsta i da je za sada poznata samo trećina ukupnih vrsta insekata.



Slika 1. Zastupljenost insekata na planeti Zemlji.

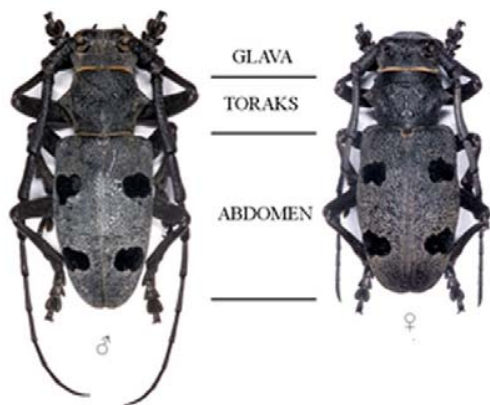
Dominantnost insekata, kao grupe, ne ogleda se samo u brojnosti, već i njihovoj distribuciji i gustini populacija, kao i rasprostranjenosti u skoro svim biološkim staništima. Zbog dominantnosti u kopnenim ekosistemima, insekti imaju uticaja na poljoprivrednu proizvodnju, šumske ekosisteme i zdravlje ljudi i domaćih životinja. Ekonomski uticaj se meri ne samo tržišnom vrednošću uništenih proizvoda, već i sredstava koji se troše za prevenciju

i kontrolu insekata štetočina. Iako je ove gubitke teško izračunati, ekonomisti se slažu da insekti unište oko 10% bruto nacionalnog proizvoda bogatih zemalja, odnosno 25% kod zemalja u razvoju (2). Međutim, bez obzira na to, insekti kao potrošači i razgrađivači, imaju ključnu ulogu u biogeohemijskom kruženju hranljivih materija, što se mora uzeti u obzir kada se primenjuju mere kontrole.

Razloge uspešnosti insekata kao grupe treba tražiti u sledećim činjenicama: insekti imaju zaštitni oklop (egzoskelet), mali su, većinom su letači i za kratko vreme produkuju veliki broj potomaka, imaju veliku adaptibilnost, a mnogi i kompletnu metamorfozu (1). Veličina i sposobnost letenja im omogućava da pobegnu od neprijatelja ili nepovoljnih uslova sredine i nasele nova staništa. Zbog toga što su mali potrebna im je mala količina hrane za razviće i reprodukciju. Reproductivan uspeh postižu zbog toga što ženke polažu veliki broj jaja, većinom oplodjenih, čiji je životni ciklus uglavnom kratak (2 – 4 nedelje). Kod insekata sa kompletnom metamorfozom, larva je prvenstveno adaptirana za hranjenje i rast, i nakupljanje energetske rezerve koje u nekim slučajevima mogu biti dovoljne za ceo životni ciklus insekta, dok je primarna funkcija adulta disperzija i reprodukcija. Visoka adaptibilnost se danas možda najbolje ogleda kroz značajnu rezistenciju na pesticide koja je opisana za više od 500 vrsta insekata.

Insekti su podeljeni u 32 reda, od kojih je najveći red Coleoptera odnosno tvrdokrilaca, sa 125 različitih familija i između 350 000 i 500 000 opisanih vrsta (3). Tvrdokrilci su ne samo najveći red insekata već i celokupnog carstva životinja. Jedna od četiri životinjske vrste na našoj planeti je tvrdokrilac, a godišnje se opiše oko 2 000 novih vrsta. Coleoptera su najzastupljenije u tropskim predelima, ali su se adaptirale na staništa na svim geografskim širinama.

Za klasifikaciju tvrdokrilaca značajna je spoljašnja anatomija, odnosno morfologija. Telo odraslog insekta pokriveno je kutikulom i sastavljeno od segmenata koji formiraju 3 regiona: **glaveni** na kome su složene oči i ocele, usni aparat i antene (čulni centar), **torakalni** koji sa dorzalne strane nosi krila, a sa abdominalne tri para člankovitih nogu (lokomotorni centar) i segmentirani **abdomen** čiji je poslednji segment prilagođen za parenje i polaganje jaja, slika 2. Kutikula (egzoskelet) nije samo zaštitni omotač oko tela već je i površina za koju su vezani mišići, barijera protiv isušivanja i senzorna površina. Antene su senzorni organi i to ne samo taktilni.



Slika 2. Spoljašnja anatomija adulta *M. funereus*.
♂ - mužjak, ♀ - ženka.

ekskretorni sistem (4).

Među tvrdokrilcima, vrste koje se hrane organima drvenastih i zeljastih biljaka (fitofagne vrste) su najzastupljenije u familijama Chrysomelidae, Curculionidae i Cerambycidae u koju spada i vrsta *Morimus funereus* Mulsant, slika 2 i 3.



Carstvo	Animalia
Tip	Arthropoda
Klasa	Insecta
Red	Coleoptera
Podred	Polyphaga
Familija	Cerambycidae
Rod	<i>Morimus</i>
Vrsta	<i>funereus</i> Mulsant
Naučno ime	<i>Morimus funereus</i> Mulsant, 1863

Slika 3. Larva *Morimus funereus*, levo – larva, desno – taksonomija.

Larve *M. funereus* spadaju u ksilofagne larve, jer se razvijaju u kori i gornjim slojevima beljike većeg broja lišćara i nekih četinara, najčešće predstavnika familija: Tiliaceae, Fagaceae, Corylaceae, Salicaceae, Fabaceae i Pinaceae (5). Larve se hrane floemom i obično se nalaze na ležacima, panjevima ili fiziološki oslabljenim stablima u prvim stupnjevima dekompozicije drveta. Larve su interesantne sa ekonomskog aspekta, jer iako izumiranje drveća obično nije povezano sa naseljavanjem *M.*

funereus, oštećenja hrastovih ležaka, koja nastaju dok se larve hrane drvetom, imaju negativan ekonomski značaj. S druge strane, postoji relativno malo podataka o digestivnim enzimima ksilofagnih vrsta koje se razvijaju u nepovoljnom supstratu, imajući u vidu nizak nivo osnovnih hranljivih materija (amino-kiselina, proteina, ugljenih hidrata), a visok nivo inhibitora peptidaza. Insekti prilagođeni na život u različitim, promenljivim, sredinama zahvaljujući funkciji genetskih i plastičnih karakteristika jedinki u njihovim populacijama (6), a koji su još i polifagne vrste, jako su interesantni za istraživanja. Razarajući drvenu masu u kojoj žive, larve pored drugih ksilofagnih organizama, gljiva i Protozoa, učestvuju u kruženju materije. Najnoviji podaci (7) ukazuju na značaj mikrobijalnih simbionata koji žive u crevu zglavkara u fiksaciji azota u terestričnim ekosistemima.

Dosadašnja istraživanja na polifagnim larvama vrste *M. funereus* su pokazala značajnu ulogu digestivnih enzima (peptidaza i amilaza) u razviću i procesima aklimatizacije i reakcije na stres, temperaturnog i nutricionog tipa (5, 8, 9). Međutim, malo se zna o biohemijskoj organizaciji digestivnih procesa kod ovih larvi. Za istraživanja na larvama ove vrste korišćene su larve iz prirode, kao i larve gajene u laboratorijskim uslovima.

Mogućnost uspešnog gajenja insekata u laboratorijskim uslovima je značajna za mnoge aspekte osnovne i primenjene nauke o insektima. Prethodnih pet decenija, razvoj veštačkih podloga jednostavnih za upotrebu doveo je do revolucije laboratorijskih postupaka za gajenje insekata. Značajno povećanje uzgajanja insekata, u dovoljnim količinama, tokom cele godine, obezbeđivalo je mnoga nova saznanja o insektima.

1908. godine je Bogdanov prvi put u potpunosti odgajio jednu vrstu insekta na veštačkoj podlozi. To je bila vrsta muve, *Calliphora vomitoria*, koja je uspešno odgajena na podlozi od peptona, mesnog ekstrakta, skroba i minerala (10). 1915. godine je Loeb uspeo da odgaji *Drosophila* spp. Prvi pravi proboj u razvijanju dijeta za insekte desio se 1935. godine, kada je Hobson uveo holesterol u dijetu za *C. vomitoria*. Tada je utvrđeno da je za mnoge insekte, za razliku od drugih životinja, holesterol neophodan u ishrani. Za oca moderne nauke o insekatskim dijetama smatra se Fraenkel, koji je u periodu 1940. – 1950. godine publikovao više različitih dijeta sa kazeinom. Fraenkel je identifikovao esencijalne hranljive faktore za ishranu i definisao mnoge druge pojmove koji su bili uvod za mnoge naučnike da dalje

razvijaju ovu oblast istraživanja, koja je doživela procvat 60-tih godina prošlog veka (10).

Međutim, i dalje postoje mnogi insekti za čije gajenje nisu razvijene zadovoljavajuće veštačke podloge. Prilikom razvijanja nove podloge treba imati u vidu prirodnu podlogu, funkciju komponenti veštačke podloge i uticaj pojedinačnih komponenata podloge na kvalitet podloge (11, 12).

Razvoj dijeta za insekte može se posmatrati kroz dva pravca. Jedan je razvoj novih dijeta za gajenje insekata u cilju dobijanja mase, a drugi razvoj dijeta kao alata za eksperimentalno proučavanje ishrane, fiziologije i ponašanja insekata. Ovaj drugi pravac podrazumeva hemijski definisanu hranljivu podlogu, koja je najčešće i skupa i zahtevna za spravljanje. S druge strane, podloge za gajenje insekata u cilju dobijanja mase, osim toga što moraju da zadovolje obnovne hranljive potrebe insekata, uglavnom su jeftine i jednostavno se pripremaju (13).

U laboratoriji, gajenje insekata na veštačkim podlogama ima nekoliko prednosti. Gajenje je generalno lakše od sakupljanja insekata na terenu, a insekti su dostupni za istraživanja tokom cele godine. Takođe, ispitivanja ishrane i metabolizma mogu se izvesti variranjem hemijskih i fizičkih karakteristika hranljive podloge i sve to pod strogo kontrolisanim uslovima.

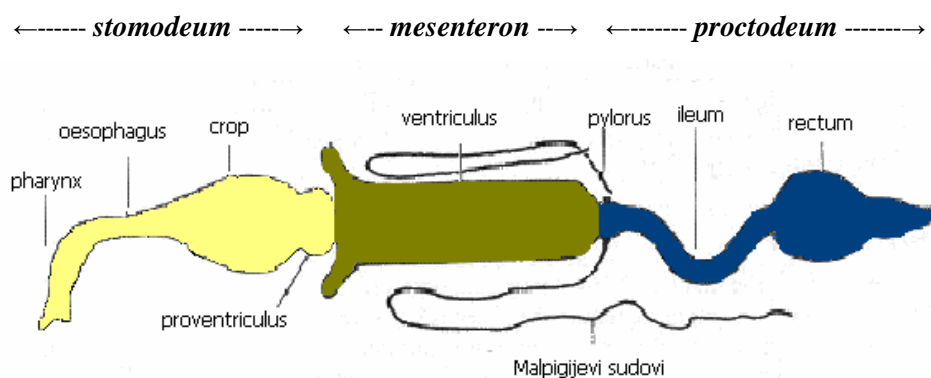
U praksi se veštačke podloge koriste za različite svrhe, za ispitivanje ishrane i metabolizma, toksikološke studije, proizvodnju insekatskih patogena, proizvodnju atraktanata i hormona i ispitivanja uslova za biološku kontrolu insekata (13).

2.1 Digestivni sistem

2.1.1 Morfologija i organizacija

Insekti imaju kompletan digestivni sistem, tj. proces varenja se odigrava u alimentarnom kanalu, koji se proteže celom dužinom tela, od usta do anusa. Uneta hrana putuje jednim smerom. Kompletni digestivni sistem predstavlja evolutivni napredak, jer omogućava funkcionalnu specijalizaciju, tj. različiti delovi sistema adaptiraju se za različite funkcije u varenju hrane, apsorpciji nutrijenata i ekskreciji. Digestivni sistem insekata, koji je shematski prikazan na slici 4, kod većine insekata ima oblik cevi sastavljene iz tri regiona koji se razlikuju po poreklu, strukturi i

funkciji: **prednje crevo (*stomodeum*)**, **srednje crevo (*mesenteron*)** i **zadnje crevo (*proctodeum*)**. Svaki deo je specijalizovan za tačno određene funkcije varenja hrane (14). Kod nekih insekata korišćenje u ishrani specifičnih supstrata dovelo je tokom evolucije do diferenciranja pojedinih regiona, formiranja npr. cekuma i nabora mezenterona, fermentativnih komora, rektalnih ampula i dr. Digestivni sistem je pričvršćen uz telesni zid prednjim i zadnjim mišićima, vezivnim tkivom i obimnom masom traheja. pH prednjeg creva često je sličan pH prednjeg mezenterona. pH u mezenteronu obično ima dobro izražen pH gradijent (15).



Slika 4. Digestivni sistem insekata.

Sa usnim aparatom insekata su povezane maksilarne, mandibularne, faringealne i labijalne žlezde, od kojih se kod tvrdokrilaca uglavnom nalaze mandibularne i labijalne. Labijalne žlezde kod većine insekata proizvode pljuvačku, čija količina zavisi od vlažnosti korišćene hrane. Često u pljuvački postoje i amilaza i invertaza koje započinju procese varenja, dok se kod insekata koji se hrane krvlju u pljuvački nalaze i antikoagulansi. Kod nekih predstavnika leptirova i Trichoptera labijalne žlezde sintetišu svilu.

Prednje crevo (*stomodeum*) je ektodermalnog porekla. Zid creva čine mišićni sloj i sloj spljoštenih epitelnih ćelija koje na apikalnoj površini imaju dobro izražen kutikularni sloj, intimu. Prednje crevo je diferencirano u četiri funkcionalna regiona: ždrelo (*pharynx*), jednjak (*oesophagus*) čija je funkcija transport hrane, voljka (*ingluvies*), prošireni region prednjeg creva u kome se hrana skladišti, a kod nekih vrsta započinje da vari, i region *proventriculus*-a sa ulogom u sitnjenju hrane i preusmeravanju hrane ka srednjem crevu od kojeg je ovaj region odvojen kardijalnim zaliskom.

Srednje crevo (*mesenteron*) je endodermalnog porekla. Izgrađeno je od jednoćelijskog epitela koji se oslanja na kontinualnu bazalnu laminu tj. bazalnu membranu. Tipična epitelna ćelija na vrhu ima dosta proširenja u obliku četke, tzv. mikrovile, koji omeđavaju lumen, odnosno prostor kroz koji se kreće hrana. Hrana je u lumenu odvojena od ćelija epitela zaštitnom strukturom, tzv. peritrofnim matriksom koji luče ćelije epitela. Peritrofni matriks (PM) je acelularna trodimenzionalna struktura sastavljena od hitinskih vlakana pričvršćenih za proteinsko-polisaharidni matriks. Polisaharidi su pretežno glikozaminoglikani. PM u srednjem crevu ima ulogu u zaštiti epitela i u varenju hrane (16). Uloge PM u varenju hrane ogledaju se kroz sledeća svojstva:

- Polupropustljivost

Ovime je omogućena selektivna propustljivost malih molekula iz lumena creva do digestivnih ćelija epitela i zadržavanje većih molekula. Propustljivost je veoma bitna i za usmeravanje *de novo* sintetisanih digestivnih enzima sa površine ćelije ka lumenu creva. Pore PM-a su prosečno 4 – 10 nm što je dovoljno za prolaz proteina reda veličine oko 20 kDa ali ne većih od 60 – 70 kDa. Eksperimentalno je pokazano da je prolaz molekula kroz PM jednosmeran (17). Na propustljivost utiču pH, jonska sila a naročito joni Ca^{2+} , koji neutrališu negativno naelektrisanje glikozaminoglikana što utiče na njihove konformacione promene i menjanje propustljivosti PM-a (17, 18). Propustljivost smanjuju lektini formirajući strukturu nalik gelu nepoznatog sastava na PM sa lumenske strane (19).

- Kompartimentalizacija digestivnih enzima

Ishrana većine insekata obiluje polimerima – celulozom i proteinima. Da bi se oni hidrolizovali do monomera potrebno je nekoliko koraka. Uloga PM-a je ključna za ove procese jer on omogućuje kompartimentalizaciju digestivnih enzima i polusvarenih proizvoda između endoperitrofnog (deo PM-a ka lumenu) i ekto-peritrofnog (deo PM-a ka mikrovilima epitela) prostora (15). Većina digestivnih enzima se sintetiše u epitelnim ćelijama srednjeg creva iz kojih se izbacuju putem sekretornih granula. Enzimi endopeptidaze i endoglukanaze prolaze kroz PM do lumena creva gde katalizuju hidrolizu polimera do manjih fragmenata koji se kroz PM kreću do ekto-PM prostora. Ovde enzimi egzopeptidaze i egzoglukanaze katalizuju hidrolizu ovih fragmenata do još kraćih oligomera i dimera. Sve ovo dovodi do povećanja efikasnosti varenja. U ekto-PM prostoru su enzimi većih molekulskih

masa, što ih sprečava da difunduju kroz PM prostor. Neki od ovih enzima su ukotvljeni u plazma membranu epitelnih ćelija digestivnog trakta. Enzimi endo-PM prostora su rastvorni i uglavnom malih molekulskih masa.

- Protok u suprotnom smeru

Terra i Ferreira (21) su predložili hipotezu po kojoj se digestivni enzimi iz endo-PM prostora recikliraju. Do reciklaže dolazi u zadnjem delu srednjeg creva do kog enzimi stižu nošeni strujom hrane. U tom delu srednjeg creva enzimi iz endo-PM prostora prolaze kroz PM do ekto-PM prostora odakle ih voda koja se kreće u suprotnom smeru od smera kretanja hrane vraća u prednji deo srednjeg creva u kome oni ponovo prelaze u endo-PM prostor i nastavljaju funkciju u varenju hrane. Terra i Ferreira su do ove hipoteze došli radeći eksperimente na *Rhynchosciara americana* (21) gde su pokazali da se digestivni enzimi vrlo malo ekskretuju. Reciklaža digestivnih enzima značajno povećava efikasnost upotrebe digestivnih enzima u varenju.

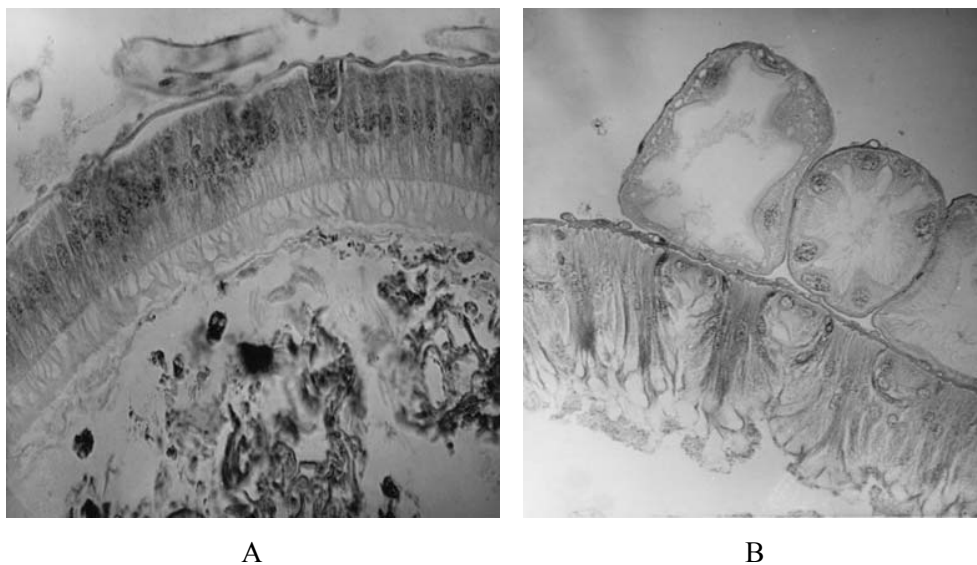
- Imobilizovanje enzima

PM deluje kao čvrst nosač za imobilizaciju digestivnih enzima čime se takođe sprečava gubitak enzima iz creva ekskrecijom. Takođe imobilizacijom se sprečava inaktivacija enzima denaturacijom čime se povećava ukupna efikasnost varenja. Enzimi su najverovatnije imobilizovani zarobljavanjem u prilog čega ide i činjenica da je povremeno potrebno kretanje enzima kroz PM. Neki istraživači smatraju da su peptidaze vezane za PM da bi sprečile nespecifično zapušavanje pora delimično svarenim materijalom (22).

U epitelu srednjeg creva postoji više vrsta ćelija. Najmasovnije su epitelne ćelije koje učestvuju u apsorpciji i sekreciji vode, sekreciji digestivnih enzima, varenju koje je vezano sa enzimima mikrovilarnih membrana i u apsorpciji hranljivih materija. Tu se nalaze i regenerativne ćelije koje obnavljaju epitel, ćelije koje verovatno imaju endokrinu funkciju i peharaste ćelije čija je funkcija kod leptirova u aktivnom transportu kalijumovih jona iz hemolimfe u lumen srednjeg creva. Srednje crevo je najčešće prosta cev koja varira u dijametru. Kod nekih grupa insekata na samom početku postoje proširenja tzv. divertikulumi a ostali deo srednjeg creva u kome se odvija varenje hrane poznat je i pod nazivom *ventriculus*. Čak i kad nema razlika u anatomske građi srednjeg creva postoje značajne funkcionalne razlike (23). Kod insekata koji se hrane biljnim tkivom srednje crevo je uglavnom kratko i široko

omogućujući brz protok hrane koje ima u velikoj količini ali je relativno niske hranljive vrednosti. Kod insekata koji se pretežno hrane proteinima srednje crevo je duže, omogućujući duže zadržavanje hrane visoke hranljive vrednosti i njeno bolje procesovanje i iskorišćavanje.

Na slici 5 prikazan je izgled uzdužnog preseka srednjeg creva larve *M. funereus*.



Slika 5. Srednje crevo *M. funereus*, A: prednji deo srednjeg creva. B: zadnji deo srednjeg creva.

Zadnje crevo (*proctodeum*) je kao i prednje crevo ektodermalnog porekla i na njemu se najčešće uočavaju tri regiona: *pylorus*, *ileum* i *rectum*. Epitelne ćelije zadnjeg creva su kuboidalne i na vrhu imaju sloj kutikule. Mišićni sloj kod ovog regiona je slabo razvijen. Na *pylorus*-u se nalaze pilorusni zalisci od kojih polaze ekskretorni organi insekata, *Malpigijevi sudovi* preko kojih se izbacuju amonijum-joni i voda. Srednji region zadnjeg creva *ileum*, često ima oblik cevi, mada je kod insekata koji u ishrani koriste celulozu, on često modifikovan u fermentativnu komoru. Zadnji region *proctodeum*-a, *rectum*, najčešće ima oblik izduženog meška tankih zidova izuzev na rektalnim papilama kod kojih su ćelije visoko prizmatične. *Rectum* i ponekad rektalne papile imaju veliku ulogu u resorpciji vode, soli i amino-kiselina iz urina (24).

2.1.2 Kompartmentalizacija varenja

Kod insekata postoji prostorna i vremenska odeljenost procesa varenja zbog postojanja PM i fluidnog fluksa koji su odgovorni za translokaciju enzima i proizvoda varenja. Značaj kompartmentalizaciji, radi razumevanja fizioloških procesa u crevu, pridaje se tek u novije vreme. Iako apsolutna količina svakog enzima prisutnog u srednjem crevu primarno zavisi od brzine i stope sekrecije, relativna distribucija enzimske aktivnosti između različitih delova srednjeg creva je osobenost svakog digestivnog sistema i ne zavisi od mehanizma kontrole sekrecije enzima.

Digestivni procesi u kojima se razgrađuju polimeri koji dominiraju u hrani ksilofagnih insekata, proteini, skrob, celuloza, hemiceluloza, odvijaju se u tri faze (25).

- U početnoj fazi hidrolaze kao što su tripsin, himotripsin, α -amilaza, celulaza, hemicelulaza, hidrolizuju hranljive polimere velikih molekulskih masa do oligomera.
- U drugoj, intermedijernoj fazi, hidrolaze dovode do nastajanja još kraćih oligomera i dimera kao što su dipeptidi, maltoza i celobioza.
- U trećoj fazi varenja dimeri se hidrolizuju do monomera dejstvom dipeptidaza, maltaza, celobijaza i drugih enzima.

Do ovog postulata došlo se eksperimentima na *R. americana* (25) gde je pokazano da se tripsin i α -amilaza izlučuju u ektoperitrofni prostor iz koga difunduju u endoperitrofni prostor u kome se odvija prva faza varenja. Aminopetidaze i trehalaze se izlučuju u ektoperitrofni prostor u kome se odvija druga faza varenja. Druge disaharidaze i dipeptidaze koje se nalaze u mikrovilima epitela učestvuju u finalnoj fazi varenja. Aminopeptidaze su nađene i kao slobodne u ekto-PM prostoru i kao membranske, vezane za mikrovilarnu membranu.

Ispitivanja distribucije α -amilaze i peptidaza duž alimentarnog kanala larvi vrsta *M. funereus* i *Cerambyx cerdo* pokazala su da je α -amilaza prisutna u prednjem delu mezenterona, a proteolitička aktivnost je konstatovana celom dužinom mezenterona (26).

Varenje kod insekata proučava se više od jednog veka, pa ipak je razumevanje ovog procesa daleko od kompletnog. Broj literaturnih podataka i radova koji se bave svim aspektima funkcije creva kod insekata u poslednje vreme beleži rast i za to

postoje dva glavna razloga. Prvi je to što je crevo insekata odličan eksperimentalni model za proučavanje funkcija creva uopšte, naročito zbog toga što su ove jedinice adaptirane na skoro sve vrste staništa i tipova hrane. Drugi razlog leži u činjenici da je crevo insekta glavna spona između insekta i njegove okoline. Stoga je razumevanje funkcije creva esencijalno za razvoj metoda kontrole brojnosti insekata preko creva, kao što je primena transgenih biljaka u kontroli fitofagnih insekata.

2.1.3 Digestivni enzimi

Uspeh insekata kao grupe najčešće se povezuje sa njihovom sposobnošću da u ishrani koriste vrlo raznovrsne organske materije čak i one koje su toksične za druge organizme (27), premošćavajući efekte peptidaznih inhibitora i toksičnih sekundarnih metabolita (28). Predstavnici insekata koji imaju veliki digestivni kapacitet su vrlo povoljni za proučavanje digestivne fiziologije, na prvom mestu karakteristika digestivnih enzima i njihove kompartmentalizacije u vremenu i prostoru.

Digestivni enzimi su hidrolitički enzimi koji katalizuju degradaciju molekula dodatkom molekula vode na specifičnu vezu. Kod insekata su nađene sve klase digestivnih enzima koje postoje kod sisara (28). To su:

- Glikozidaze (katalizuju razgradnju polisaharida i oligosaharida do prostih šećera).
- Lipaze (katalizuju hidrolizu masti do masnih kiselina i glicerola).
- Peptidaze (katalizuju hidrolizu proteina do amino-kiselina).

Peptidaze (proteolitički enzimi), digestivnog sistema odavno privlače pažnju fiziologa i biohemičara zainteresovanih za procese varenja proteina. Stoga su digestivne peptidaze među najbolje okarakterisanim enzimima, a mnoga današnja saznanja o proteinskoj strukturi i funkciji enzima omogućena su upravo proučavanjem peptidaza (29).

Proteolitički enzimi se obično biosintetišu kao neaktivni prekursori - zimogeni. U slučaju enzima digestivnog trakta, razlog je sprečavanje hidrolize proteina u tkivima koja ih sintetišu.

U prvom detaljnom ispitivanju porekla proteolitičke aktivnosti prisutne u digestivnom traktu insekata 1962. godine (30) ukazano je na značaj mikroorganizama

kao simbionata u digestivnom traktu insekata koji se prvenstveno ogleda u lučenju enzima amilaze i celulaze neophodnih za varenje hrane.

Neophodno je još podataka da bi se stvorila kompletna slika o katalitičkim osobinama peptidaza i evolutivnoj povezanosti ovih enzima između insekata i drugih organizama. Danas su okarakterisane različite peptidaze insekata i poređenjem sa sisarskim uočava se sličnost u aminokiselinskoj sekvenciji, ali i razlike u supstratnoj specifičnosti i ponašanju prema inhibitorima. Veliki broj peptidaza insekata javlja se u obliku multiplih formi (izoenzimi), pa se pretpostavlja da su glikoproteini. Na taj način smanjuje se hidroliza peptidaza jer šećerni deo štiti peptidazu od autodigestije (28).

2.1.4 Mehanizmi kontrole sinteze i sekrecije digestivnih enzima insekata

Mehanizmi kontrole su slabo izučeni jer su kompleksni i najverovatnije odvojeni (za sintezu i za sekreciju digestivnih enzima) (31). Sekretorne ćelije mogu biti konstitutivne i indukovane. Konstitutivne ćelije oslobađaju enzime ubrzo nakon sinteze i ne akumuliraju veliki broj sekretornih granula. Indukovane ćelije akumuliraju sekretorne granule koje oslobađaju pod dejstvom specifičnog fiziološkog signala. Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da se kod većine insekata koji se hrane biljkama (fitofage) i imaju kontinualnu ishranu, sekrecija enzima odvija preko konstitutivnih ćelija (32). Najviše primera indukovane sekrecije nalazi se kod insekata sa diskontinualnim tipom ishrane, insekata karnivora i hematofaga.

Tokom varenja nivo digestivnih enzima u srednjem cervu varira kod skoro svih ispitivanih insekata. Mehanizmi kontrole sinteze i sekrecije enzima mogu biti pod uticajem nervnog sistema, hormona, parakrine aktivnosti i prandijalnih mehanizama (kada supstancije iz hrane direktno interaguju sa sekretornim ćelijama) (33). Poznato je da unošenje nekih hranljivih sastojaka dovodi do stimulacije *de novo* sinteze enzima (34, 35). To uglavnom zavisi od koncentracije određenog hranljivog sastojka u ishrani a ne od količine unete hrane. U tom smislu su najviše proučavani proteini kao nutrijenti – regulatori enzimske aktivnosti. Zaključeno je da se nivo peptidaza povećava sa ako se poveća unos rastvornih proteina dok na povećanje ne utiču nerastvorni proteini, peptidi i amino-kiseline. Ova pozitivna korelacija je primećena za sve peptidaze endo-PM prostora pa se pretpostavlja da su sve one pod kontrolom jednog operona (36).

Metodama molekularne biologije je pokazano da je ekspresija digestivnih enzima daleko složenija nego što se pretpostavljalo. Kod komarca vrste *Aedes aegypti* su opisani tzv. “rani” i “kasni” tripsini prema ekspresiji tokom vremena. “Rani” tripsini se izlučuju u maloj količini u prvih par sati nakon uzimanja obroka i zatim nestaju. “Kasni” tripsini se izlučuju u velikoj količini 24 časa nakon uzimanja obroka i najveći procenat ukupne proteolitičke aktivnosti pripada njima, a oni zaostaju i nakon varenja. Pokazano je da su od tri tripsinska gena dva indukovana hranom (kasni tripsini) a jedan je konstitutivno transkribovan (rani tripsin) (31).

Kod larvi *M. funereus* postoje indirektni dokazi o hormonskoj kontroli regulacije opšte proteolitičke aktivnosti i aktivnosti α -amilaze dobijeni metodama ligature i injektiranjem ekstrakta mozga aktivnih larvi (37) ili sprečavanjem oslobađanja neurohormona iz medijalnih neurosekretornih ćelija delovanjem stresorne temperature (38).

2.1.5 Antinutritivni odbrambeni mehanizmi biljaka

Kada je reč o digestivnom sistemu insekata fitofaga neophodno je pomenuti i antinutritivne mehanizme biljaka koji dosta utiču na njegovu organizaciju i funkcionisanje. Biljke proizvode čitav arsenal odbrambenih molekula kao odgovor na napad insekata ili drugih uljeza. Iako je poznato preko hiljadu takvih prirodnih proizvoda, za svega par njih je jasan mehanizam dejstva. Pojam antinutrijenti u entomologiji podrazumeva komponente biljke koje smanjuju hranljivu vrednost hrane bilo hemijskom modifikacijom njenih komponenata, bilo formiranjem kompleksa sa nutrijentom ili utičući na varenje, apsorpciju ili iskorišćavanje nutrijenata (39). U novije vreme posvećuje se pažnja ovoj oblasti radi razvoja biljaka rezistentnih na insekte. Za svaku klasu nutrijenata postoje antinutrijenti pronađeni u biljkama, tabela 1.

Esencijalni hranljivi sastojci za insekte su slični esencijalnim sastojcima mnogih sisara. To su: voda, 10 esencijalnih amino-kiselina, lipidi, steroli, vitamini i minerali. Ono po čemu se razlikuju od većine ostalih životinja je to što su im neophodni askorbinska kiselina i steroli (40).

Tabela 1. Antinutrijenti u biljkama

Klasa nutrijenata	Potencijani antinutrijent
Amino-kiseline	Alkilujućí agensi (hinoni, epoksidi, aldehidi), inhibitori peptidaza, tiaminaze, transglutaminaze, diamin-oksídaze, peroksidaze, polifenol-oksídaze)
Ugljeni hidrati	Inhibitori amilaze, inhibitori glikozidaze
Masne kiseline (linolna i linoleinska)	Lipoksidaze, peroksidaze
Minerali	Oksalati, fitati, polifenoli
Steroli	Saponini
Vitamini	Askorbat-oksídaze, tiaminaze, lipoksidaze, hinoni
Voda	Diuretici

Biljni antinutrijenti mogu se grubo podeliti u nisko-molekulske i proteinske (39). Nisko-molekulske antinutrijenti su fitohemikalije koje direktno ili indirektno utiču na bioiskorišćavanje amino-kiselina, sterola, vitamina i minerala. Tako npr. alkilujućí agensi biljaka (hinoni, epoksidi, alkaloidi) reagujućí sa proteinima u hrani hemijski modifikuju određene amino-kiseline koje samim tim postaju neupotrebljive kao nutrijenti (41). Saponini kompleksiraju sterole i proteine umanjujućí im hranljivu vrednost (42), a u nekim slučajevima i inhibiraju aktivnost digestivnih enzima (43).

Najpoznatiji proteinski biljni antinutrijenti su inhibitori digestivnih enzima. To su proteini koji svoja antinutritivna dejstva ostvaruju direktno interakcijom sa digestivnim enzimima ili ćelijama srednjeg creva, odnosno digestivnim procesima. U biljkama su nađeni inhibitori serin-peptidaza, cistein-peptidaza, karboksipeptidaza i amilaza (39). Inhibitori serin-peptidaza se vezuju za aktivno mesto enzima i blokiraju ga formirajućí komplekse. Kada enzim ishidrolizuje peptidnu vezu inhibitora on ostaje vezan za enzim i sprečava pristup novog supstrata. Inhibitori karboksipeptidaza su mali polipeptidi koji formiraju komplekse sa karboksipeptidazama preko svog C-terminalnog kraja. I u ovom slučaju kada enzim ishidrolizuje peptidnu vezu inhibitora ovaj ostaje vezan za enzim i sprečava pristup supstrata. Inhibitori cistein-peptidaza pripadaju uglavnom familiji cistatina i manje su bitni za biljku u odbrani od insekata, jer se i sintetizuju u manjoj kolićini s obzirom na to da su cistein-peptidaze glavne peptidaze biljaka. Inhibitori se sintetizuju kao odgovor na mehanićko oštećenje tkiva

biljke napadom insekata (39), a sintetizuju se ne samo na mestu oštećenja, već u celoj biljci, čime sprečavaju insekte da se njome hrane.

Od kako su utvrđena dejstva inhibitora na rast i razviće insekata (44) izvedeni su mnogi eksperimenti *in vivo* korišćenjem veštačkih dijeta sa inhibitorima. Kako inhibitori ne dovode do velike smrtnosti jedinki u toku kraćeg vremenskog perioda, već utiču na smanjenje mase i brzine razvića, njihovi efekti se smatraju antinutritivnim, a ne toksičnim (39). Inhibicija digestivnih enzima nije jedini antinutritivni efekat inhibitora, glavni negativni efekat je gubitak nutrijenata zbog hiperprodukcije digestivnih enzima (45). Istraživanja su pokazala da prisustvo inhibitora u dijeti kod *Costelytra zealandica* na početku dovodi do pada aktivnosti peptidaza, da bi nakon 14 dana ona rapidno porasla (46). S obzirom na to da su interakcije inhibitora peptidaza i digestivnog sistema složene, ne mogu se posmatrati odvojeno od faktora kao što su: proteini, amino-kiseline ili drugi inhibitori proteolize (kondenzovani tanini).

Insekti mogu da prevaziđu dejstvo inhibitora peptidaza menjanjem svojih digestivnih peptidaza. Mnoge vrste tvrdokrilaca su preusmeravanjem na sintezu cistein-peptidaza prevazišle negativne efekte inhibitora serin-peptidaza (47), dok su neke vrste indukovane inhibitorima počele da sintetizuju peptidaze neosetljve na inhibitore (48).

Inhibitori amilaza sa amilazama grade nekovalentne lako-disosujuće komplekse i manje su efikasni od inhibitora peptidaza, jer polipepidni lanac ne može u potpunosti da liči na skrob i time ga zamaskira (39).

Lektini su grupa različitih proteina čija je zajednička osobina vezivanje za ugljene hidrate. Biljke akumuliraju lektine u skladišnim organima, naročito semenima. Njihova uloga u biljkama nije do kraja razjašnjenja, ali je činjenica da učestvuju u odbrani organizma od patogena. Prvi ekperiment koji je pokazao insekticidnu aktivnost lektina obuhvatio je PHA lektin (lektin iz pasulja) i *Callosobruchus maculatus* (49). Lektini koji su toksični za ovu vrstu su specifični za *N*-acetilgalaktozamin/galaktozu i *N*-acetilglukozamin, kao i lektini toksični za *Diabrotica undecimpunctata* (50). Međutim specifičnost lektina nije osnova toksičnosti, jer nisu svi toksični efekti koje lektini izazivaju posredovani vezivanjem za ugljene hidrate. Toksične efekte lektini ostvaruju: rezistencijom na proteolizu, vezivanjem za glikoproteine na površini crevnih ćelija ili za peritrofnu matriks, posredovanjem u interakcijama između crevne mikroflore i crevnih ćelija, mitogenim

efektom na ćelije creva i prolaskom kroz zid creva i migracijom u cirkulaciju izazivajući sistemske efekte na druge organe (39).

2.2 Klasifikacija enzima

Po preporuci Komiteta za nomenklaturu u upotrebi je termin “peptidaze”, kao sinonim za “peptid-hidrolaze”, za sve enzime koji hidrolizuju peptidnu vezu. Peptidaze se dele na egzopeptidaze koje deluju na, ili u neposrednoj blizini kraja polipeptidnog lanca i endopeptidaze koje deluju unutar polipeptidnog lanca. Termin peptidaze koji je sada u upotrebi je sinonim za termin proteaze koji je prvobitno bio u upotrebi, a odnosio se i na egzo- i na endopeptidaze, pri čemu se termin peptidaze odnosio na subklasu egzopeptidaze, a termin proteinaze na subklasu endopeptidaze (51).

- *EC 3. Hidrolaze*
 - *EC 3.4. Peptidaze*
 - *EC 3.4.11. Aminopeptidaze*
 - *EC 3.4.11.1 Leucil-aminopeptidaze*

Nomenklatura peptidaza predstavlja problem zbog specifičnosti koju je često teško definisati imajući u vidu da zavisi od prirode nekoliko aminokiselinskih ostataka u blizini peptidne veze koju hidrolizuju, kao i od konformacije polipeptidnog lanca supstrata. Stoga se, kao dodatni kriterijum klasifikacije uzima mehanizam katalize.

Endopeptidaze su podeljene u sub-supklase na osnovu katalitičkog mehanizma na serin-endopeptidaze, cistein-endopeptidaze, aspartat-endopeptidaze, metalo-endopeptidaze, treonin-endopeptidaze i endopeptidaze nepoznatog mehanizma dejstva.

U okviru egzopeptidaza razlikujemo enzime koji deluju na slobodni N- ili C-kraj oslobađajući samo jednu aminokiselinu (aminopeptidaze i karboksipeptidaze), od enzima koji oslobađaju dipeptide ili tripeptide (dipeptidil-peptidaze, tripeptidil-peptidaze, peptidil-dipeptidaze) kao i egzopeptidaze specifične za dipeptide (dipeptidaze) ili za terminalne supstituisane, ciklične ili izopeptidnom vezom povezane aminokiselinske ostatke (omega peptidaze).

2.2.1 Egzopeptidaze

Najpoznatiji i najbolje proučeni predstavnici egzopeptidaza su aminopeptidaze koje katalizuju hidrolizu amino-terminalne peptidne veze i karboksipeptidaze koje katalizuju hidrolizu karboksi-terminalne peptidne veze. Većina egzopeptidaza predstavlja metalopeptidaze, gde je Zn^{2+} najčešći kofaktor. Aminopeptidaze su široka klasa enzima od kojih su neki visoko specifični za samo jednu amino-kiselinu sa početka polipeptidnog lanca.

2.2.2 Klan MF, familija M17- familija leucil-aminopeptidaza

Jedna od najvažnijih internet baza podataka o peptidazama jeste MEROPS baza podataka (52). U ovoj bazi podataka peptidaze su klasifikovane hijerarhijski na osnovu strukturnih karakteristika. Svaka peptidaza svrstana je u određenu **familiju** na osnovu statistički značajnih sličnosti u aminokiselinskoj sekvenciji, a homogene (evolutivno povezane) familije grupisane su u **klanove**. Familija može sadržavati i samo jednu peptidazu ukoliko nije poznat njen homolog. Svaka familija se označava slovom koje određuje kom tipu katalize peptidaza pripada (M je oznaka za metalopeptidaze), kao i jedinstven broj. Neke familije podeljene su u supfamilije usled postojanja dokaza o vrlo davnoj divergenciji unutar familije.

Klan sadrži sve danas poznate peptidaze koje imaju zajedničko evolutivno poreklo. Predstavlja jednu ili više familija koje su evolutivno povezane što se ogleda kroz sličnosti u tercijarnoj strukturi ili poretkom amino-kiselina u katalitičkom mestu, a često i zajedničkim motivom u sekvenciji oko katalitičkih amino-kiselina. Klan se označava sa dva slova, prvo slovo predstavlja tip katalize familija koje pripadaju klanu. Neki klanovi podeljene su u supklanove usled postojanja dokaza o vrlo davnoj divergenciji unutar klana.

Prema MEROPS-u citosolna ili rastvorna leucil-aminopeptidaza pripada klanu MF, familiji M17 i ima MEROPS ID: M17.001. Klan MF sadrži samo jednu familiju, familiju M17, koja je familija bakterijskih i eukariotskih leucil-aminopeptidaza. LAP je prva metalopeptidaza za koju je pokazano da ima dva metalna jona neophodna za katalizu (53). Kod svih danas poznatih metalopeptidaza oba metalna jona su dvovalentna i koordinovana sa tri amino-kiseline i molekulom vode. Zbog toga što

jedna amino-kiselina vezuje oba metala, metalopeptidaze sa ko-katalitičkim metalnim jonima imaju 5 amino-kiselinskih metalnih liganada jer su metalni joni pentadentatno koordinovani.

Kristalna struktura najviše izučene leucil-aminopeptidaze, enzima iz očnog sočiva govečeta u kompleksu sa inhibitorom amastatinom (54) prikazana je na slici 6.



Slika 6. Kompleks leucil-aminopeptidaze očnog sočiva govečeta i inhibitora amastatina.

Katalitički cinkovi joni predstavljeni su kao svetlije sive sfere. Amino-kiseline ligandi cinka su predstavljeni modelom lopti i štapića i to: Lys250 pink, Asp255, Asp273 i Asp332 roze i Glu334 plavo. Katalitičke amino-kiseline su prikazane modelom lopti i štapića i to: Lys262 pink i Arg336 plavo. Amastatin je prikazan tamnije siv.

Leucil-aminopeptidaza očnog sočiva govečeta je homoheksamer sa aktivnim centrima smeštenim u unutrašnjosti (55). N- i C- terminalni domeni nisu međusobno strukturno slični, a N- terminalni domen nema strukturnu povezanost ni sa jednim danas poznatim proteinom. Cink ligandi i katalitičke amino-kiseline su smeštene na C- terminalnom domenu proteina. Joni cinka pentadentatno koordinuju slobodan enzim kao i enzim – supstrat kompleks. Jedan cinkov jon (Zn1) je vezan za Asp255 O^{δ1}, Asp332 O^{δ1} i Glu334 O^{δ1}, a drugi cinkov jon (Zn2) je vezan za Asp255 O^{δ1}, Lys250 NH₂, Asp273 O^{δ1} i Glu334 O^{δ1}. Zajedno, joni cinka vezuju i molekul vode koji na taj način postaje nukleofil. Osim liganada cinka, za aktivnost leucil-aminopeptidaze važna je i amino-kiselina Lys262 koja je elektrofil i čiji vodonik polarizuje karbonilnu grupu supstrata. Ranije se smatralo da Arg336 delujući kao

donor protona polarizuje drugi molekul vode čiji je proton u sastavu odlazeće grupe nakon raspadanja *gem*-diolnog intermedijera (56). Neuobičajeno za metalopeptidaze, nijedan histidin ne učestvuje u katalizi niti je ligand cinku. Cink ligandi se nalaze u okviru sledećih motiva:

- (Val/Ile)-Gly-**Lys**-(Gly/Ser)-Xaa-(Thr/Ile/Val)-Xbb-**Asp**-(Ser/Thr/Ala)-Gly-Gly, gde je Xaa-alifatična hidrofobna amino-kiselina a Xbb-uglavnom aromatična hidrofobna amino-kiselina;
- Met-Xaa-Xbb-**Asp**-(Met/Lys)-Xbb-Gly-(Ala/Ser/Gly)-(Ala/Gly). gde je Xaa-naelektrisana amino-kiselina a Xbb- Asn-Thr-**Asp**-Ala-**Glu**-Gly-Arg-Leu (57).

2.3. Leucil-aminopeptidaze (životinjske i biljne)

2.3.1. Ime i istorijat LAP

Lindstrøm-Lang je 1929. godine u ekstraktu svinjske intestinalne mukoze detektovao enzim koji je hidrolizovao leucilglicin 20 puta brže od glicilglicina (58). Tada je ova peptidaza imenovana kao dipeptidaza II, a 1936. godine je i parcijalno prečišćena i tada je bila poznata kao leucilpeptidaza (59). Iako je danas poznato da leucil-aminopeptidaza katalizuje hidrolizu širokog spektra peptida i amida, ime je ostalo. Da se LAP aktivira jonima magnezijuma i mangana pokazali su Johnson i saradnici 1936. i Berger i Johnson 1939. godine (59, 60). Istraživanja Spackman-a i saradnika 1955. godine na prečišćenoj LAP iz svinjskih bubrega doprinela su saznanjima o mnogim hemijskim i fizičkim osobinama enzima (61, 62). Himmelhoch je 1969. godine odredio cink-metaloenzimsku prirodu LAP-a (63).

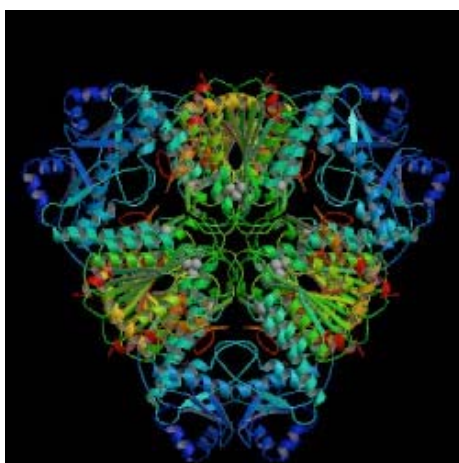
LAP je takođe jedan od sedam kristalizovanih proteina koji su prvi dobijeni u Sumner-ovoj laboratoriji (64). Identitet ovih proteinskih kristala bio je nepoznat u to vreme, pa je protein nazvan protein-fudbal zbog sličnosti sa loptom za američki fudbal. Pedeset godina kasnije utvrđeno je da je protein-fudbal u stvari LAP iz goveđe jetre (65). LAP je prvi dicink enzim kome je određena kristalna struktura atomske rezolucije (53). Još neki od često korišćenih naziva ovog enzima su i citosolna aminopeptidaza i peptidaza S.

2.3.2 Aktivnost i specifičnost LAP

Leucil-aminopeptidaze (3.4.11.1) su enzimi koji oslobađaju N-terminalne amino-kiseline i to prvenstveno leucin, ali i neke druge uključujući i prolin, ali ne i arginin i lizin. Ovi enzimi takođe hidrolizuju amide i metil-estre amino-kiselina, dok je brzina kojom hidrolizuju aril-amide veoma mala (51). Leucil-aminopeptidaza je potpuno okarakterisana kod različitih predstavnika biljaka, mikroorganizama, životinja i čoveka. Daleko najbolje je proučena leucil-aminopeptidaza očnog sočiva govečeta. Osobine enzima razlikuju se od organizma do organizma, počevši od pH optimuma (5–10 u zavisnosti od porekla), temperaturnog optimuma (26°C do 61°C) i molekulske mase (26,5 Kda–326 KDa). Razlike postoje i na nivou K_m i specifične aktivnosti, kao i na nivou metalnih jona neophodnih za aktivnost. Prema dosadašnjim saznanjima aktivatori različitih LAP mogu biti Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cl^- , Ca^{2+} i Br^- , ali nisu svi aktivatori pojedinačnih enzima (57).

2.3.3 Hemijska struktura LAP

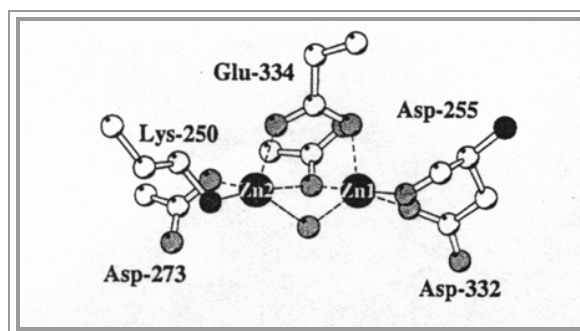
LAP iz očnog sočiva govečeta je homoheksamer molekulske mase 324 kDa, slika 7 (54).



Slika 7. Heksamerna struktura LAP iz očnog sočiva govečeta. Joni cinka su predstavljeni sivim sferama.

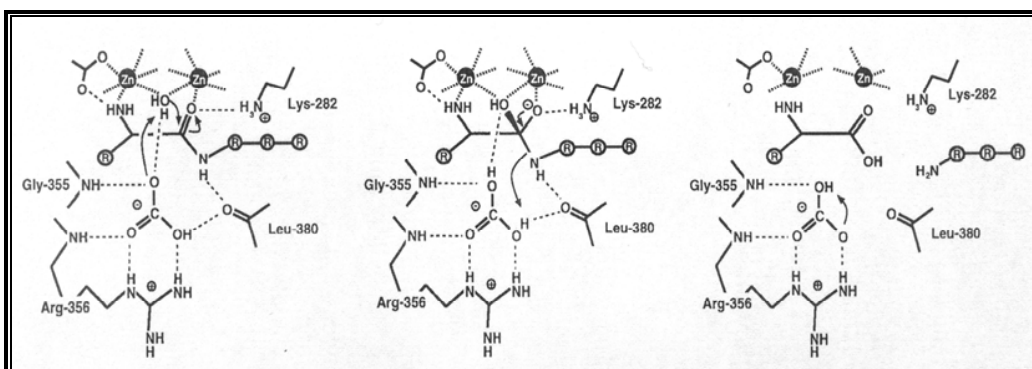
Monomer se sastoji od α -heliksa i β -pločica, N- terminalni domen ima 160 amino-kiselina a katalitički, C- domen, ima 327 amino-kiselina (57). Šest aktivnih mesta smešteno je u unutrašnjosti heksamera gde obrazuju šupljinu u obliku diska prečnika 15 Å i debljine 10 Å. Pristup šupljini obezbeđuje polarni kanal. Ova strukturna osobina objašnjava zašto LAP ne može da katalizuje hidrolizu dužih peptida ili proteina (66).

Jedno aktivno mesto sadrži dva pentadentatno koordinovana cinkova jona međusobno udaljena 3,0 Å (56), slika 8. Jedan ligand vode premošćuje dva jona cinka simetrično, a karboksilatni bočni lanci Asp273, Asp255, Asp332 i Glu334 kao i amino grupa Lys250 i karbonilna grupa Asp332 iz peptidne kičme koordinuju dimetalni centar.



Slika 8. Struktura di-cink klastera u aktivnom mestu LAP.

Predloženi reakcioni mehanizam hidrolize posredstvom LAP, prema Sträter-u i saradnicima (56, 67), shematski je prikazan na slici 9. Bikarbonatni jon koji se nalazi u blizini Arg336 (numerisanje prema LAP govečeta), odnosno Arg356 (numerisanje za PepA iz *Escherichia coli*, koja je prikazana na slici 9) ponaša se kao opšta baza, odnosno akceptor protona sa nukleofilnog molekula vode koji premošćava dva metalna jona. Proton se prebacuje na odlazeću amino-grupu peptida što omogućava raspadanje tetraedarskog *gem*-diolnog intermedijera. Joni cinka učestvuju u deprotonovanju nukleofila, a zajedno sa Lys282 i u polarizaciji supstratne karbonilne grupe i stabilizaciji prelaznog stanja (67). Funkcija bikarbonatnog jona ekvivalentna je ulozi karboksilatnog jona glutamata u aktivnom mestu ostalih metalopeptidaza koje imaju jedan ili dva katalitička cinka kod kojih je glutamat akceptor protona.



Slika 9. Mogući mehanizam katalize hidrolize peptidne veze leucil-aminopeptidazom prema Sträter-u i saradnicima.

Dva metalna jona u LAP pokazuju različito ponašanje prilikom izmene sa drugim jonima. Zn^{2+} u mestu 1 (Zn1) lako se izmenjuje sa drugim metalnim jonima, uključujući Mn^{2+} , Mg^{2+} i Co^{2+} . Izmena Zn^{2+} u mestu 1 jonima Mn^{2+} i Mg^{2+} dovodi do aktivacije LAP. $Zn2$ je mnogo čvršće vezan i može da se izmeni samo jonima Co^{2+} (57). Zamena bilo kog cinka u bilo kom mestu utiče na K_m i k_{cat} enzima.

2.3.4 Biološka aktivnost LAP

Leucil-aminopeptidaze su enzimi koji održavaju funkcionisanje ćelija kroz ključnu ulogu u izmenjivanju (“turnover“) peptida. Aktivnost LAP doprinosi procesovanju peptida pri MHC I prezentaciji antigena i procesovanju bioaktivnih peptida (oksitocin, vazopresin, enkefalini) (68). Mikrobne M17 LAP osim uloge u proteolizi imaju i sposobnost vezivanja za DNA. Zbog ove osobine oni su transkripcioni represori u kontroli biosinteze pirimidina, alginata i toksina kolere. Kod biljaka postoje indicije da LAP imaju odbrambene uloge, a učestvuju i u mejozi i membranskom transportu auksinskih receptora. Životinjske LAP najverovatnije imaju ulogu i u kontroli ćelijskog redukciono-oksidacionog statusa (69). To je izvedeno iz činjenice da LAP može da hidrolizuje Cys-Gly vezu. Cys-Gly je gradivni element glutaciona, glavnog ćelijskog odbrambenog molekula od oksidativnog stresa.

2.3.5 Inhibitori LAP

Sagledavanje mehanizama dejstva proteolitičkih enzima dopunjeno je i upotrebom inhibitora. Inhibitor je bilo koja supstancija koja smanjuje V_0 kada se doda reakciji enzim–supstrat. Inhibitori peptidaza su raznovrsni, kao i peptidaze i postoje samo neki generalni aspekti za predstavnike ove grupe. Oni mogu inhibirati enzim reverzibilno ili ireverzibilno (70). Reverzibilni inhibitori veoma brzo formiraju nekovalentne komplekse sa enzimom koji mogu da disosuju posle čega se enzimu vraća aktivnost. Postoje četiri tipa reverzibilnih inhibitora čija se priroda određuje kinetičkim metodama: kompetitivni inhibitori, nekompetitivni inhibitori, akompetitivni inhibitori i alosterični inhibitori.

Ireverzibilni inhibitori sa enzimom formiraju kovalentne derivate koji ne mogu da disosuju ili mogu da formiraju i veoma čvrsto vezane nekovalentne komplekse. Postoje inhibitori koji se nakon vezivanja za aktivno mesto enzima konvertuju u proizvod koji zatim reaguje kovalentno sa enzimom čime ga ireverzibilno inhibira. Ovakav tip inhibitora naziva se k_{cat} inhibitor i spada u najspecifičnije vrste inhibitora. Drugi ireverzibilni inhibitori obično su specifični za određenu grupu u bočnom lancu amino-kiseline u aktivnom mestu enzima. Ovakav tip reakcije zove se proteinska modifikacija, a ovi inhibitori su značajni jer se koriste za određivanje prirode grupa u aktivnom mestu enzima.

Inhibitori leucil-aminopeptidaza mogu se podeliti u dve kategorije (71):

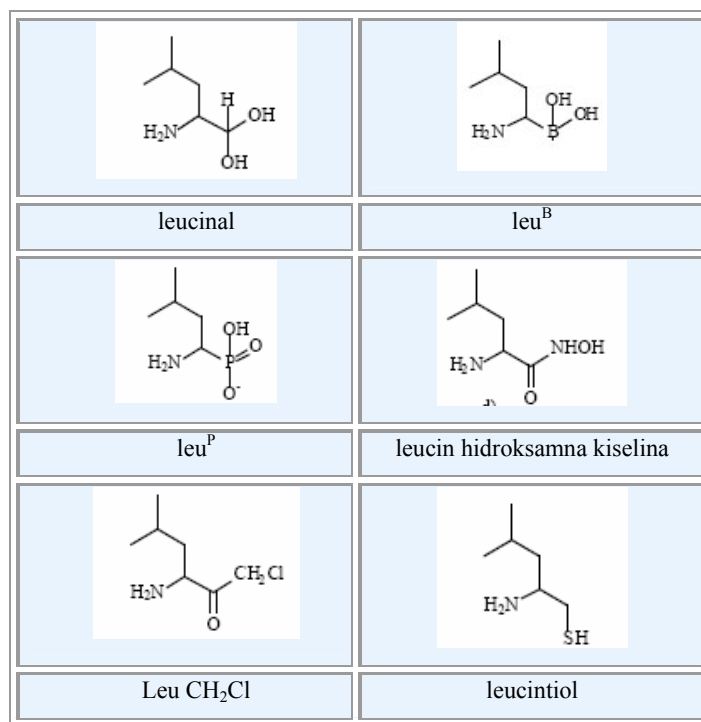
- analozi amino kiselina i
- analozi peptida.

Analozi amino-kiselina sadrže metal-vezujuću grupu koja interaguje sa aktivnim mestom enzima i N-terminalnu hidrofobnu grupu koja se vezuje za S1 vezujuće mesto u enzimu. Kod LAP iz očnog sočiva govečeta ovaj S1 džep je hidrofobnog karaktera, shodno tome analozi prirodnih amino kiselina sa hidrofobnim bočnim grupama su najefikasniji inhibitori. Ovaj džep je ujedno i objašnjenje supstratne specifičnosti bLAP enzima. Peptidni analozi pored ovoga sadrže i dodatne (P1, P2 itd.) ostatke koji povećavaju broj kompleksiranja sa enzimom. Sintetički inhibitori LAP su uglavnom analozi prelaznog stanja koji liče na *gem*-diolni intermedijer koji nastaje kao posledica nukleofilnog napada vode na peptidnu vezu. Prirodni inhibitori LAP biljnog porekla za sada nisu pronađeni.

2.3.5.1 Analози amino kiselina

2.3.5.1.1 Aminoaldehidi

α -aminoaldehidi su nisko-molekulski, jaki, kompetitivni inhibitori LAP (71). Među njima je najpotentniji L-leucinal, slika 10. On se vezuje za LAP u hidratizanoj, *gem*-diol formi u kojoj liči na intermedijer koji se formira nakon napada molekula vode na peptidnu vezu supstrata. Na slici 12 je prikazan kompleks enzim–leucinal.



Slika 10. Struktura amino-kiselinskih analoga.

2.3.5.1.2 Derivati α -aminoborodatne kiseline

Derivati α -aminoborodatne kiseline su kompetitivni, nisko-molekulski inhibitori LAP i najverovatnije se vezuju za enzim kao slobodna kiselina i inhibiraju ga na sličan način kao što peptidi borne kiseline inhibiraju serin-peptidaze (71). U aktivnom mestu enzima najverovatnije dolazi do interakcije atoma bora, koji ima trigonalnu geometriju, sa amino-kiselinama u aktivnom mestu enzima i formiranju tetraedarskog intermedijera - analoga prelaznog stanja enzima.

2.3.5.1.3 Fosfonska kiselina

Fosfonatni analozi amino-kiselina su efikasni inhibitori LAP jer zbog tetraedarske geometrije atoma fosfora, slika 10, postaju analozi prelaznog stanja enzima prilikom hidrolize. U aktivnom mestu enzima, negativno naelektrisani fosfonatni jon reaguje sa pozitivno naelektrisanim jonom cinka, što ga čini izuzetno efikasnim inhibitorom (71). Na slici 12 je prikazan kompleks enzim-leu^P.

2.3.5.1.4 Hidroksamati

Hidroksamatni derivati amino- i alifatičnih kiselina, slika 10, su efikasni, kompetitivni inhibitori citosolnih LAP. Hidroksamatni fragment formira bidentatni kompleks sa jonima cinka u aktivnom mestu enzima (71).

2.3.5.1.5 Hlormetil ketoni

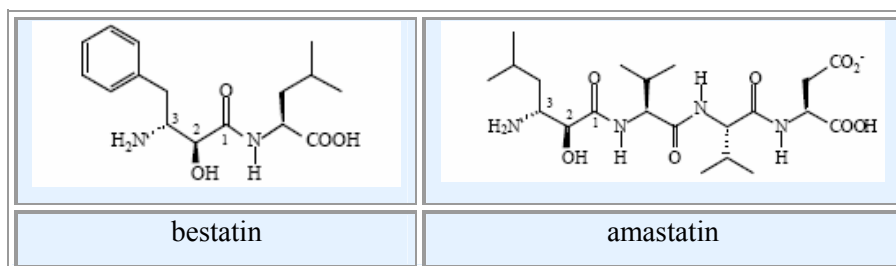
Hlormetil ketoni su umereni, kompetitivni inhibitori LAP. Način vezivanja za enzim nije poznat, međutim zbog karbonilne grupe ovih jedinjenja, slika 10, zbog koje liče na strukturne analoge supstrata, moguće je da reaguju reverzibilno sa nukleofilom u aktivnom mestu enzima i formiraju adukt koji liči na tetraedarski intermedijer u reakciji hidrolize (71).

2.3.5.1.6 Tioli

Tiolna jedinjenja, slika 10, za koje je poznato da su jaki metalni helatori, iznenađujuće su slabi inhibitori LAP. Moguće objašnjenje je korišćenje Mg²⁺Zn²⁺ metalohibrida LAP u eksperimentima sa tiolima, a Mg²⁺ nema visok afinitet za tiole (71).

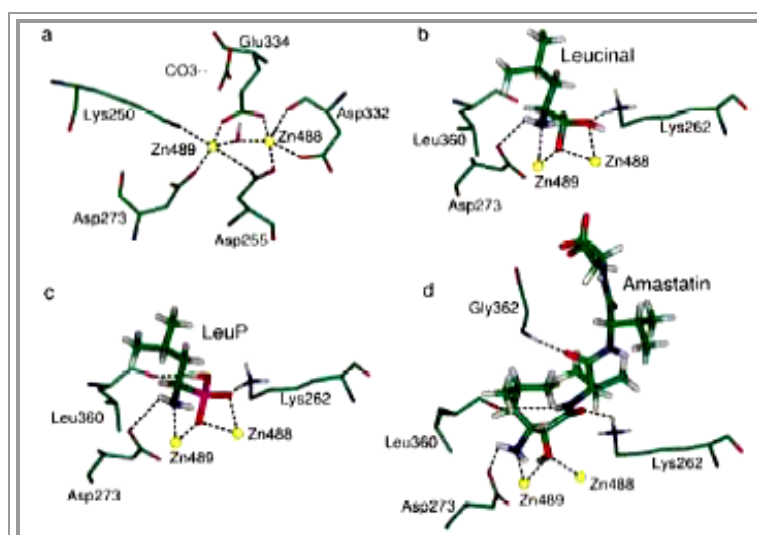
2.3.5.2 Analози peptida

Najpotentniji prirodni inhibitori LAP, bestatin (analog dipeptida) i amastatin (analog tetrapeptida), slika 11, su spori, čvrsto vezujući inhibitori i pretpostavlja se da su analozi prelaznog stanja u reakciji hidrolize (71).



Slika 11. Struktura peptidnih analoga bestatina i amastatina.

K_i za bestatin su reda veličine 10^{-9} za $Zn^{2+}Zn^{2+}$ LAP a za amastatin 10^{-8} . Na slici 12 je prikazan način vezivanja pojedinih inhibitora za enzim. P1 mesto amastatina i bestatina poseduje dodatni ugljenikov atom (C2) sa hidroksilnom grupom, tako da ovi P1 bočni lanci zauzimaju istu konfiguraciju kao D-amino kiseline. D-amino kiseline nisu povoljni supstrati za LAP. Oba inhibitora se bidentatno koordinuju sa Zn 489 u aktivnom mestu enzima preko N atoma iz N-terminalne α -amino grupe i P1 hidroksilnog kiseonika. Ovaj kiseonik čija je pozicija slična poziciji molekula vode u nativnom enzimu interaguje i sa Zn 488. Od peptidnih analoga bestatin i amastatin se najčešće koriste, a postoje još i mnogo manje efikasni inhibitori: sumporni derivati bestatina, fosfonati, ketometileni, peptidi itd.



Slika 12. Amino kiseline značajne za aktivno mesto bLAP i načini vezivanja sa inhibitorima: a) aktivno mesto nativnog bLAP, b) bLAP-leucinal kompleks, c) bLAP-Leu^P kompleks i d) bLAP-amastatin kompleks.

2.3.6 Testovi za određivanje aktivnosti LAP

Prirodni proteinski supstrati se retko koriste u rutinskom određivanju aktivnosti egzopeptidaza zato što postoji širok spektar sintetičkih supstrata kojima se lako određuje peptidazna aktivnost.

2.3.6.1 Testovi sa sintetičkim supstratima

Sintetički supstrati se dobijaju vezivanjem hromogenog supstituenta na amino- ili karboksilnu grupu amino-kiseline. Najjednostavniji supstrati podrazumevaju jednu amino-kiselinu kupovanu preko amino- ili karboksilne grupe za amin, kao što je 4-nitroanilin ili 2-naftilamin. Komercijalno su dostupni i supstrati sa fluorescentnim supstituentima kao što je 7-amino-4-metilkumarin. Sintetički supstrati se mogu podeliti na tri grupe (29):

1. endopeptidazni supstrati (nemaju slobodne N- i C-krajeve).
2. aminopeptidazni supstrati (imaju slobodan N- kraj).
3. karboksipeptidazni supstrati (imaju slobodan C- kraj).

2.3.6.1.1 Aminopeptidazni testovi

Sintetički estri karboksilne grupe amino-kiseline bili su među prvim sintetizovanim supstratima i pokazali su se kao veoma dobri, imajući u vidu esteraznu aktivnost peptidaza. Uvođenjem 4-nitroanilina i 2-naftilamina (29), poboljšana je osetljivost testova, jer oba jedinjenja kao i diazotovani derivati 2-naftilamina mogu da se detektuju spektrofotometrijski.

Spektrofotometrijska određivanja se zasnivaju na razlici u molarnoj apsorptivnosti supstrata i proizvoda. Poželjno je da ta razlika bude što veća i to u vidljivoj oblasti, pre nego u UV oblasti, zbog mogućih interferiranja supstancija sirovog ekstrakta. N-acetilovani derivati 4-nitroanilina imaju malu apsorpciju na talasnim dužinama oko 400 nm, za razliku od slobodnih amina. U određivanju aktivnosti peptidaza i aminopeptidaza primena amida i estara amino-kiselina je ograničena time što one mogu biti supstrat za nepeptidazne enzime sirovog ekstrakta.

Fluorimetrijski testovi su veoma osetljivi i zasnivaju se na fluorescentnom svojstvu amino-kiseline ili proizvoda. Značajni su za određivanje aktivnosti parcijalno

prečišćenih ili čistih enzimskih preparata, jer mnoge supstancije sirovog ekstrakta dovode do gašenja ili rasejavanja svetlosti (29). Najčešće se koriste supstrati sa 2-naftilaminom i 7-amino-4-metilkumarinom. Kada je u pitanju 7-amino-4-metilkumarinski supstrat, moguće je detektovati 0,5 µg/mL himotripsina pri 0,2 mM koncentraciji supstrata. Spektrofotometrijskom detekcijom himotripsina gde se koristi 4-nitroanilid kao supstrat detektuje se 10 µg/mL enzima što je za red veličine manje od fluorimetrijske detekcije.

Kada ništa drugo ne daje rezultate, mogu da se koriste radioaktivno obeleženi peptidi za određivanje aktivnosti. Testovi su veoma osetljivi, ali su supstrati skupi i radi se u specijalnim uslovima.

Razvijeni su i HPLC testovi kojima mogu da se visoko specifično detektuju peptidaze korišćenjem i proteinskih i sintetičkih supstrata.

2.3.6.2 Zimogramska detekcija LAP

Zimogram predstavlja detekciju enzima, uglavnom hidrolaza, nakon elektroforeze na različitim gelovima (poliakrilamid, skrob, agaroz, Sephadex). Termin *zimogram* prvi put se javlja 1957. godine (72) i odnosi se na trake skrobnog gela gde je enzimski aktivnost demonstrirana histoheimijskim bojenjem nakon elektroforeze. Zimogramska detekcija peptidaza poboljšava se 1974. godine u odnosu na detekciju histoheimijskim bojenjem, inkubiranjem peptidaza nakon elektroforeze sa specifičnim naftil-estrom i diazo-bojom, pri čemu se na mestu enzima stvara nerastvorna boja (73). Termin zimogram se koristi i za opisivanje tehnike u kojoj nakon SDS-PAGE peptidaze difunduju u agarozni gel u kome je inkorporiran protein, kao supstrat (74). To je tzv *kontaktni zimogram*. Nakon hidrolize i bojenja, na agaroznom gelu se vide jasna prosvetljenja na tamnoj podlozi.

Brojne su prednosti zimograma u odnosu na druge metode detekcija peptidaza. Tako npr., ako se "razvija" zimogram nakon SDS-PAGE moguće je proceniti relativnu molekulsku masu enzima ili njegovih multiplih formi. Ako u sirovom ekstraktu postoji kompleks peptidaza–prirodni inhibitor, peptidaza se može detektovati nakon elektroforeze u kojoj kompleks disosuje na sastavne komponente, pri čemu se mora voditi računa da mnogi enzimi ne mogu da se renaturišu nakon denaturišuće elektroforeze, naročito metalo-enzimi kojima SDS u toku elektroforeze

apstrahuje jon neophodan za aktivnost. Za takve enzime i enzime koji se tokom SDS-PAGE ireverzibilno denaturišu ili su aktivni samo ako su multimeri, koristi se detekcija nakon nativne PAGE (75) ili nakon IEF-a. Kada se karakteriše nova peptidaza, preporučuje se kombinacija zimogramskih metoda u cilju optimizacije uslova za detekciju i karakterizaciju enzima.

Kada se za detekciju enzima koriste sintetički supstrati, osim direktne vizualizacije na gelu, korišćenjem rastvornog supstrata, često se primenjuje i detekcija nakon transfera tj. printa proteina sa gela na nitroceluloznu membranu nakon završene elektroforeze (29). Kada se koriste 4-nitroanilidi kao sintetički supstrati, dobija se žuta boja u zimogramu koja se pojačava diazotovanjem 4-nitroanilina (29). Osetljivost metode je od oko 0,5 µg za tripsin i do 5 µg za himotripsin i elastazu.

Pronalaženje optimalnih uslova zimograma za svaki par enzim–supstrat (75), omogućava detekciju nanogramskih količina proteolitičkih enzima.

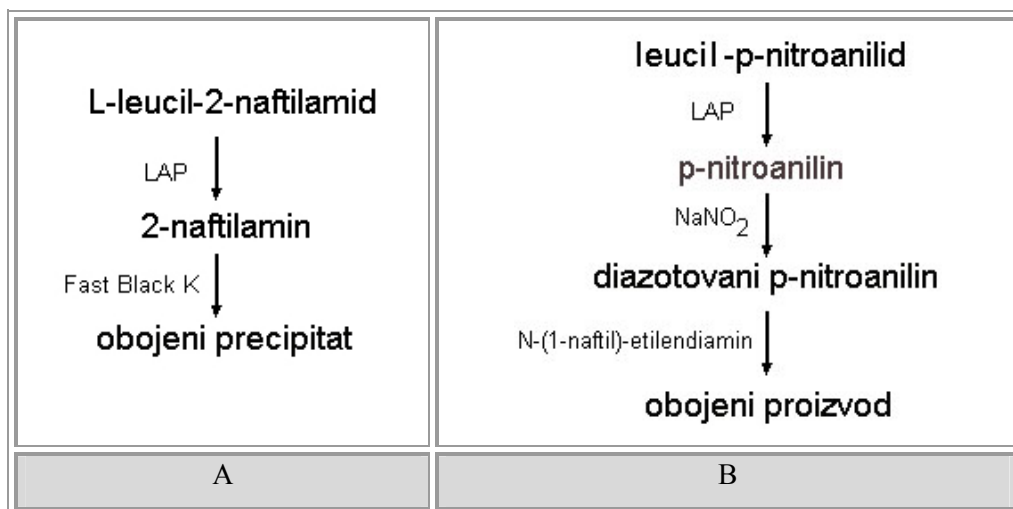
Zimogram kao metoda, omogućava ne samo detekciju i semikvantifikaciju peptidaza, već i ispitivanje uticaja inhibitora ili aktivatora na aktivnost peptidaza.

Spektar zimogramskih detekcija je izuzetno širok. Vizualizacija enzima nakon elektroforeze može biti zasnovana na hromogenim reakcijama, fluorogenim reakcijama, autoradiografiji, bioautografiji, dvodimenzionalnoj gel spektroskopiji i imunoblotu. Najčešće se koriste hromogene reakcije i to su one reakcije čiji je rezultat nastajanje hromofore na mestu enzimske aktivnosti. Ovoj grupi vizualizujućih tehnika pripada i azo-kuplujući sistem. Ovaj sistem podrazumeva dve osnovne komponente: diazonijum jon i sintetički supstrat specifičan za dati enzim koji je obično derivat naftola, naftilamina ili *p*-nitranilina.

Enzimskim dejstvom oslobođen naftol ili naftilamin kupluju se sa diazonijumovom soli pri čemu nastaje nerastvorni obojeni precipitat. Shematski prikaz reakcija dat je na slici 13 A.

Važno je napomenuti da je 2-naftilamin karcinogen, što je ujedno i veliki nedostatak ovog testa, a mana je i upotreba diazonijumovih soli koje u nekim slučajevima mogu da inhibiraju enzim.

Enzimskim dejstvom oslobođen *p*-nitroanilin, prvo se diazotuje a zatim kupluje sa hromogenom, najčešće *N*-(1-naftil)-etilendiaminom (76–78), Slika 13 B.



Slika 13. Shematski prikaz faza zimografske detekcije azo-kupljućih sistema. Sintetički supstrat je obično derivat naftola ili naftilamina (A) ili *p*-nitroanilina (B).

Rezultujući proizvod je ljubičasta azo-boja koja ne precipitira na elektroforetskom gelu, što je i glavni razlog zbog kojeg je ova procedura vizualizacije enzima direktno na gelu izbegavana od strane istraživača. U literaturi se može naći nekoliko eksperimenata kojima je pokušano prevazilaženje ovog problema, a koji su podrazumevali ili neku vrstu transfera sa gela na membranu nakon elektroforeze (76) ili sa gela na agarozni gel (77). Međutim, ukoliko se membrana inkubira duže u supstratu, nastale velike količine *p*-nitroanilida pri bojenju će dovesti do neželjenog bojenja pozadine.

Među brojnim, u literaturi opisanim (76, 77, 79–82), zimogramskim procedurama za detekciju i kvantifikaciju raznih peptidaza, vrlo je mali broj onih koje se odnose na leucil-aminopeptidazu (76, 79). Od navedenih tehnika nijedna se ne odnosi ni na detekciju enzima *in situ*, odnosno na gelu nakon elektroforeze, niti na kvantifikaciju detektovane enzimske aktivnosti, osim tehnike koja je razvijena u našoj laboratoriji (83).

2.3.7 Prečišćavanje LAP

Svako prečišćavanje enzima je izazov, ali prečišćavanje peptidaza se izdvaja po specifičnom problemu, kakav je autodigestija. U zavisnosti od postavljenog cilja prečišćavanja bira se stepen prečišćenosti peptidaza koji je potreban. Prečišćavanje se

prati odgovarajućim testom proteolitičke aktivnosti i SDS PAGE-om. Mora se imati u vidu da se kod testiranja sirovog ekstrakta na ukupne peptidaze mogu dobiti veoma male aktivnosti koje nisu realne, već su posledica kompeticije dodatog supstrata sa endogenim, prisutnim u ekstraktu. Mnoge peptidaze imaju endogeni inhibitor koji može da maskira aktivnost u sirovom ekstraktu. U tom slučaju aktivnost se može detektovati nakon gel-hromatografije. Ovi podaci moraju se imati u vidu kada se računa stepen prečišćenosti i prinos nakon svakog koraka prečišćavanja.

2.3.7.1 Opšte metode prečišćavanja

Koraci u prečišćavanju proteolitičkih enzima su najčešće određeni empirijski. Za efikasno prečišćavanje neophodno je upoznati se sa opštim osobinama peptidaza koje želimo da prečistimo. To se odnosi na termostabilnost, osetljivost na jonsku silu, pH, detergente i organske rastvarače. Važno je upoznati se sa osnovnim biohemijskim i katalitičkim osobinama enzima pre početka prečišćavanja što može biti od značaja za pripremanje pufera koji će se koristiti. Za prečišćavanje većine cistein-peptidaza koriste se puferi sa redukujućim agensima β -merkaptoetanolom ili ditioneitolom. Značajan je i podatak o lokalizaciji željenih enzima, da bi se dodao detergent (najčešće Triton X-100) za izolovanje membranskih enzima ili enzima iz organela.

Jonoizmenjivačka hromatografija se obično primenjuje na početku prečišćavanja kada su zapremine uzorka velike te se uzorak ujedno i koncentruje, a gel-hromatografija u kasnijim fazama kada se zapremina smanji. Od prirode uzorka zavisi koje će se hromatografske metode (jonoizmenjivačka, hidrofobna, gel-hromatografija) koristiti u prečišćavanju i kojim redosledom. U slučaju male zastupljenosti peptidaza od interesa u sirovom ekstraktu, metoda izbora može biti i preparativna elektroforeza ili HPLC.

2.3.7.2 Afinitetna hromatografija

Razvijene su mnoge afinitetne tehnike za prečišćavanje peptidaza koje se baziraju na katalitičkim i funkcionalnim osobinama enzima.

2.3.7.2.1 Supstrat-afinitetna hromatografija

Peptidaze koje pokazuju visoku aktivnost prema kazeinu ili hemoglobinu su potencijalno dobri kandidati za ovakav vid prečišćavanja. Teorijski, bilo koji protein može da se koristi kao supstrat, ali je kazein najpogodniji jer je jeftin. Najvažnije u ovoj tehnici je pronalaženje uslova koji će omogućiti specifične i reverzibilne interakcije između enzima i supstrata. Katepsin D je prečišćen korišćenjem hemoglobin-Sepharose (84), a kalpaini korišćenjem kazein-Sepharose (85).

2.3.7.2.2 Inhibitor-afinitetna hromatografija

Koriste se proteinski inhibitori peptidaza kuplovani sa čvrstim nosačem. I ovde je važno pronalaženje uslova koji će omogućiti specifične i reverzibilne interakcije između enzima i inhibitora. Za prečišćavanje serin-peptidaza koriste se opšti inhibitori (aprotinin, Trasylol^R). Za Trasylol^R-Sepharose na pH 8,0 vezuju se himotripsin i elastaza koji se eluiraju odvojeno puferima različite pH vrednosti (86). Najveći problem kod ovakvog tipa prečišćavanja jeste ireverzibilna priroda protein-inhibitor interakcija, pa se ne mogu koristiti svi inhibitori proteinskog tipa za prečišćavanja. U afinitetnoj hromatografiji koriste se i nisko-molekulski inhibitori i supstrati, naročito mikrobnog porekla (leupeptin, pepstatin, antipain, bestatin i himostatin).

2.3.7.2.3 Funkcionalna afinitetna hromatografija

Ova tehnika zasnovana je na funkcionalnim osobinama peptidaza. Na primer, organoživina jedinjenja koja interaguju sa sulfhidrilnim grupama cistein-peptidaza, značajna su za izolovanje ove grupe peptidaza. Sa ovakvih kolona cistein-peptidaze eluiraju se cisteinom, β -merkaptetanolom ili ditiotreitolum (29).

2.3.7.2.4 Prečišćavanje aminopeptidaza afinitetnom hromatografijom

Sintetički supstrati - analozi amino kiselina su se pokazali kao izuzetno specifični ligandi za sintezu afinitetnih matriksa za prečišćavanje aminopeptidaza.

Alanil-metil-kebon (AMK) kao afinitetni ligand je iskorišćen za sintezu AMK-Sepharose za prečišćavanje bakterijske alanil-aminopeptidaze (87). Arginin-Sepharose je primenjena za prečišćavanje aminopeptidaze iz polena *Parietaria judaica* (88). Hi-trap afinitetna kolona sa jonima Zn^{2+} upotrebljena je za prečišćavanje aminopeptidaze iz mišića govečeta (89). Princip ove afinitetne hromatografije zasniva se na vezivanju za jone cinka koji su u ovom slučaju inhibitori aminopeptidaze. Kao primer inhibitor-afinitetne hromatografije može poslužiti i prečišćavanje aminopeptidaze na CryIC-Sepharose koloni (90). CryIC je *Bacillus thuringiensis* (Bt) endotoksin, insekticidalni protein koji svoje toksično dejstvo ostvaruje vezivanjem za membransku aminopeptidazu kod nekih vrsta insekata.

2.3.7.3 Prečišćavanje aminopeptidaza preparativnom elektroforezom

Preparativna elektroforeza se koristi kada je zastupljenost aminopeptidaze u sirovom ekstraktu vrlo mala i praktično ju je nemoguće prečistiti jer se gubi u različitim koracima prečišćavanja, naročito hromatografskim. Preparativna elektroforeza je takođe metoda izbora i u slučaju postojanja multiplih izoformi aminopeptidaza u ekstraktu ukoliko se želi prečistiti jedna ili svaka ponaosob u jednom koraku. Kod multimernih enzima koristi se nativna preparativna elektroforeza. Upotrebom kontinualno-eluirajućih elektroforetskih sistema uspešno je i u dovoljnoj količini za sekvenciranje izolovana aminopeptidaza N iz svilene bube (91). Tri frakcije solubilne aminopeptidaze iz larvi *R. americana* su razdvojene i okarakterisane nakon preparativne elektroforeze u staklenim cevčicama a zatim frakcionisanjem poliakrilamida (92). Na ovaj način se dobija 65% enzimske aktivnosti u odnosu na enzimsku aktivnost nanetu na gel. Preparativnom elektroforezom kao poslednjim korakom u izolovanju prečišćena je i aminopeptidaza iz ploda kikirikija (93).

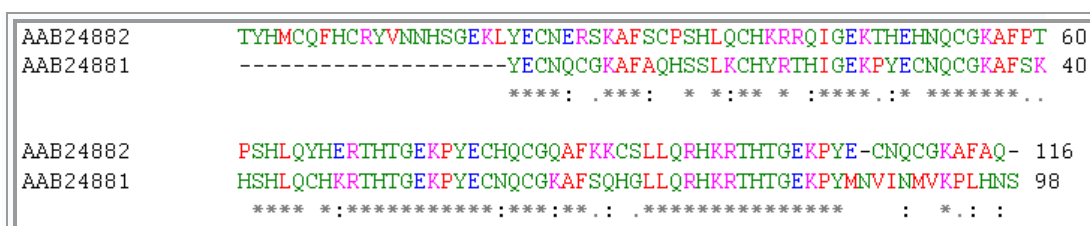
2.3.8 Homologija leucil-aminopeptidaza

Homologija među proteinima i DNA se obično zaključuje na osnovu sličnosti sekvencija. Ukoliko dva gena imaju skoro identičnu DNA sekvenciju, vrlo je verovatno da su homologni. Međutim, moguće je i da sličnost u sekvenciji nije posledica toga što potiču od zajedničkog pretka, kratke sekvencije mogu biti iste i

slučajno ili sekvencije mogu biti slične jer obe imaju istu funkciju, npr. vezivanje za transkripcione faktore. Takve sekvencije su slične ali ne i homologe.

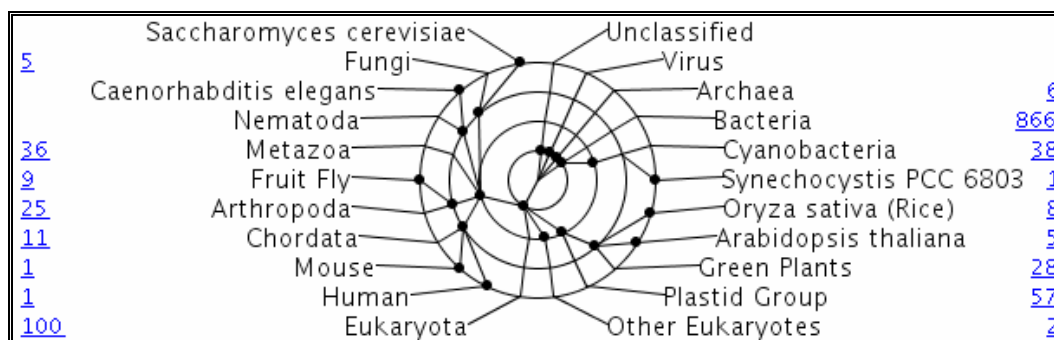
Za kvantifikovanje sličnosti među sekvencijama biomolekula koriste se izrazi procenat identičnosti i procenat sličnosti (94). Procenat identičnosti je mera zasnovana na činjenicama, dok pretpostavljena homologija mora biti podržana dokazima.

Kod proteina, homologe sekvencije su grupisane u familije. Slaganje sekvencija predstavlja način aranžmana primarnih sekvencija da bi se identifikovali slični ili identični regioni, koji su posledica funkcionalne, strukturne ili evolutivne sličnosti. Na slici 14 je prikazano slaganje aminokiselinskih sekvencija (94). Ukoliko se dve sekvencije koje vode poreklo od zajedničkog pretka ne slažu u potpunosti onda je najverovatnije tokom evolucije došlo do tačkastih mutacija. Slaganje aminokiselinskih sekvencija je obično pouzdanije od slaganja sekvencija nukleotida zato što su se tokom evolucije amino kiseline menjale sa nižom učestalošću od nukleotida. Takođe usled postajanja samo 4 nukleotida a 20 amino-kiselina veća je verovatnoća da će slučajne identičnosti pre nastati kod slaganja nukleotidnih sekvencija. Kod slaganja proteinskih sekvencija, procenat sličnosti amino kiselina u određenim mestima u proteinu predstavlja grubu meru konzerviranosti tog regiona ili motiva. Konzervativni regioni ukazuju na strukturni ili funkcionalni značaj. Postoji veliki broj algoritama, dostupnih na internetu koji omogućavaju slaganje sekvencija i analizu homologije.



Slika 14. Slaganje sekvencija dva humana cink-finger proteina korišćenjem algoritma ClustalW.

Na slici 15 je dat taksonomski prikaz sekvencija citosolnih LAP koje se mogu naći u InterPro bazi podataka (95) i broj, u ovom trenutku, određenih sekvencija u navedenoj kategoriji.



Slika 15. Citosolne LAP, taksonomski prikaz.

M17 LAP su visoko konzervativni na amino-kiselinskom nivou. Na osnovu toga *Lap* geni su identifikovani u preko 60 bakterijskih genoma i mnogih biljnih i životinjskih genoma. Sekvencije citosolne LAP određene su kod sledećih vrsta insekata: *Haemaphysalis longicornis* (šumski krpelj), *Aedes aegypti* (komarac prenosilac žute groznice), *Drosophila pseudoobscura* (voćna mušica) i *Anopheles gambiae* (malarični komarac) (95).

2.4 Aminopeptidaze tvrdokrilaca

Leucil-aminopeptidaza je nađena u tkivima mnogih predstavnika kičmenjaka i beskičmenjaka (15, 96). U digestivnom sistemu kičmenjaka i beskičmenjaka aminopeptidaze imaju dominantnu ulogu u intermedijernoj i terminalnoj fazi varenja hidrolizujući delimično svarene oligopeptide do lako difundujućih molekula. Aminopeptidaze su otkrivene u eritrocitima kičmenjaka, a njihova distribucija (aminopeptidaze N i A u mikrovilarnim membranama, leucil-aminopeptidaze i aminopeptidaze B u citosolu), kao i njihova fiziološka i biohemijska uloga bolje su proučene kod kičmenjaka nego kod beskičmenjaka (97). Veoma mali broj podataka postoji o slobodnim aminopeptidazama u intestinalnom lumenu insekata (98).

Kod klase insekata, aminopeptidaze su nađene u srednjem crevu predstavnika redova Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Orthoptera, Lepidoptera i Hymenoptera (99). Aminopeptidaze srednjeg creva nekih vrsta *Drosophila* i Lepidoptera su do detalja biohemijski okarakterisane. Aminopeptidaze kod insekata imaju značajne uloge u procesima presvlačenja (100) bilo preko aktivacije enzima koji učestvuju u presvlačenju bilo preko aktivacije hormona presvlačenja i regulaciji peptidnih

neurotransmitera (101), osim dobro poznate uloge u varenju hrane (102). Najbolje proučene insekatske aminopeptidaze prikazane su u tabeli 2 (15).

Tabela 2. Osobine aminopeptidaza izolovanih iz srednjeg creva insekata. Preuzeto iz knjige Biology of the insect midgut, Lehane, M.J. i Billingsley, P.F., Chapman and Hall, 1996.

Table 5. Properties of aminopeptidases isolated from insect midguts

Order	Species (Family)	Stage	Source	Purification degree	M_r	pH _o	K_m (mM)	Reference
Orthoptera	<i>Teleogryllus commodus</i> (Gryllidae)	Adult	S	Partial	94,000 (F)	8.0	0.53	Christeller <i>et al.</i> (1990)
Isoptera	<i>Trinervitermes trinervoides</i> (Termitidae)	Adult	S	Homogeneous	88,700 (F)	8.5	0.004	Van der Westhuizen <i>et al.</i> (1981)
Hemiptera	<i>Rhodnius prolixus</i> (Reduviidae)	Nymph	S	Crude	61,000 (U)	8.0	0.36	Ferreira <i>et al.</i> (1988)
Coleoptera	<i>Pteroporphus aequinoctialis</i> (Carabidae)	Adult	S	Crude	110,000 (U)	8.0	0.15	Ferreira <i>et al.</i> (1989)
	<i>Costelytra zealandica</i> (Scarabaeidae)	Larva	S	Partial	96,400 (F)	8.0	0.78	Christeller <i>et al.</i> (1989)
	<i>Atagenus megatoma</i> (Dermestidae)	Larva	S	Partial	126,000 (F)	7.5	0.32	Baker and Woo (1981)
	<i>Pyrearinus termitilluminans</i> (Elateridae)	Larva	S	Crude	118,000 (U)	8.0	0.60	Colepico-Neto <i>et al.</i> (1986)
	<i>Pyrophorus divergens</i> (Elateridae)	Larva	S	Crude	115,000 (U)	8.0	0.75	Colepico-Neto <i>et al.</i> (1987)
Hymenoptera	<i>Scaptotrogon bipunctata</i> (Apidae)	Larva	S	Crude	190,000 (U)	7.5	—	Schumaker <i>et al.</i> (1993)
Diptera	<i>Rhynchosciara americana</i> (Sciariidae)	Larva	S	Partial	115,700 (U)	8.0	0.5	Ferreira and Terra (1984)
	<i>Rhynchosciara americana</i> (Sciariidae)	Larva	S	Partial	117,000 (F)	7.5	0.8	Klinkowstrom <i>et al.</i> (1994b)
	<i>Rhynchosciara americana</i> (Sciariidae)	Larva	M	Partial	169,000 (U)	7.2	1.3	Ferreira and Terra (1986a,b)
	<i>Rhynchosciara americana</i> (Sciariidae)	Larva	M	Partial	107,000 (U)	7.2	1.8	Ferreira and Terra (1985)
	<i>Trichostia pubescens</i> (Sciariidae)	Larva	S	Crude	130,000 (U)	8.5	—	Espinoza-Fuentes <i>et al.</i> (1984)
	<i>Trichostia pubescens</i> (Sciariidae)	Larva	M	Crude	95,000 (U)	8.7	0.19	Espinoza-Fuentes and Terra (1986)
	<i>Trichostia pubescens</i> (Sciariidae)	Adult	M	Crude	210,000 (U)	9.0	0.47	Espinoza-Fuentes and Terra (1986)
	<i>Anopheles stephensi</i> (Culicidae)	Adult	S	Crude	552,000 (F)	8.0	0.28	Billingsley (1990)
	<i>Anopheles stephensi</i> (Culicidae)	Adult	M	Crude	123,000 (F)	8.0	0.33	Billingsley (1990)
	<i>Anopheles stephensi</i> (Culicidae)	Adult	M	Crude	32,000 (F)	8.0	0.01	Billingsley (1990)
	<i>Glossina morsitans</i> (Glossinidae)	Adult	S	Partial	163,700 (F)	8.0	—	Cheeseman and Gooding (1985)
	<i>Musca domestica</i> (Muscidae)	Larva	M	Crude	322,000 (U)	8.5	0.21	Terra <i>et al.</i> (1988c)
	<i>Musca domestica</i> (Muscidae)	Adult	M	Crude	200,000 (U)	8.5	0.13	Terra <i>et al.</i> (1988c)
	<i>Drosophila melanogaster</i> (Drosophilidae)	Larva	M	Partial	280,000 (F)	7.6	0.057	Walker <i>et al.</i> (1981)
Lepidoptera	<i>Tineola bisselliella</i> (Tineidae)	Larva	S	Partial	94,000 (F)	7.7	0.17	Ward (1975d)
	<i>Tineola bisselliella</i> (Tineidae)	Larva	S	Partial	240,000 (F)	8.4	0.3	Ward (1975c)
	<i>Erinyis ello</i> (Sphingidae)	Larva	M	Crude	122,000 (U)	8.0	0.36	Santos and Terra (1986a)
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Noctuidae)	Larva	S	Crude	107,000 (U)	7.4	—	Ferreira <i>et al.</i> (1994a)
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Noctuidae)	Larva	M	Crude	120,000 (U)	7.8	—	Ferreira <i>et al.</i> (1994a)

LAP kod insekata su nađene u citosolu (3.4.11.1, M17 LAP) i, mnogo češće, membranski vezane, tzv. aminopeptidaze N (3.4.11.2, M1 LAP). Ove dve vrste enzima se generalno razlikuju u strukturi, enzimskom mehanizmu katalize i biološkoj ulozi u organizmu (68). Katalitički domeni se razlikuju po metalopeptidaznom motivu (kod aminopeptidaza N to je motiv HEXXH). Za razliku od citosolnih aminopeptidaza koje su heksameri i vezuju dva katjona, M1 aminopeptidaze nisu heksameri i vezuju samo jedan katjon u aktivnom mestu. Membranski vezane aminopeptidaze uglavnom su homodimeri molekulske mase 110 kDa, glikozilovani, cink-zavisni enzimi, koji su široko rasprostranjeni u organizmu. Ovi enzimi su u membrani vezani bilo preko hidrofobnog peptida, bilo preko glikozil-fosfatidilinozitolne kotve. Da bi se prečistili neophodna je solubilizacija detergentima i enzimima.

Navedene razlike LAP iz familija M17 i M1 nisu toliko jasno izražene kod insekata. Za sada još uvek ne postoji nijedna insekatska aminopeptidaza koja je kristalizovana i čija je struktura time tačno određena, tako da su mnogi literaturni zaključci bazirani na pretpostavkama. Mnogi istraživači još uvek ne razlikuju enzime iz ove dve familije ili ne navode na kojem od ta dva su u stvari radili, što interpretaciju rezultata još više otežava.

Prve detaljnije studije o aminopeptidazama predstavnika Coleoptera urađene su na *Costelytra zealandica* (102) gde je delimično okarakterisana leucil-aminopeptidaza tako što joj je određena molekulska masa, pH optimum i K_m za hidrolizu LpNA.

Delimično prečišćenim aminopeptidazama vrste *Acanthscelides obtectus* određeni su pH optimum, temperaturni optimum i dejstvo nekih jona i inhibitora na aktivnost (103). LAP je detektovan i kod vrste *Leptinotarsa decemlineata* (104). Enzimu je određen pH optimum, dejstvo nekih dvovalentnih katjona i nekih inhibitora na hidrolizu LpNA. Istraživanja urađena na vrsti *Phaedon cochleariae* (105) ukazuju na moguću ulogu ovog enzima u rezistenciji na inhibitore peptidaza. Najdetaljnije proučena aminopeptidaza predstavnika Coleoptera je mikrovilarna aminopeptidaza vrste *Tenebrio molitor* (106).

Kod vrste *T. molitor* nađena je jedna membranski vezana aminopeptidaza kojoj je određen pH optimum, N-terminalna sekvencija, šećerna komponenta, molekulska masa, supstratna specifičnost, aktivno mesto i mehanizam dejstva. Leucil-aminopeptidaza od 80 kDa, slobodna i membranski vezana, koju inhibira bestatin i

visoke koncentracije 1,10-fenantrolina, detektovana je kod vrste *Melolontha melolontha* (107).

Kad je u pitanju familija Cerambycidae kojoj pripada *M. funereus* postoji veoma mali broj podataka o proteolitičkim enzimima (5, 8, 108–111), a naročito o LAP (112–114). Na osnovu nekih istraživanja (99) postoje sumnje da su se predstavnici Cerambycidae tokom evolucije preusmerili na serinsku (alkalnu) digestivnu strategiju i da nemaju cistein-proteinaze u sistemu za varenje. O LAP postoje podaci na vrsti *Anoplophora glabripennis* (115) i odnose se na pH optimum enzima u sirovom ekstraktu, koji se kod ove vrste kreće od 6 do 9 sa maksimumom na 7,5. Delimično je okarakterisana parcijalno prečišćena LAP iz srednjeg creva larvi *M. funereus* (113).

Izgleda da je prisustvo aminopeptidaza u različitim tkivima tokom različitog stupnja razvoja povezano sa njihovom opštom metaboličkom ulogom tj. regulacijom nivoa amino-kiselina i malih peptida u hemolimfi, što je od ključnog značaja za anabolizam proteina i održavanje osmotske stabilnosti (97, 116). Dosta informacija o aminopeptidazama danas postoji zahvaljujući studijama sa Bt toksinom koji se specifično vezuje za određene regione na ovom enzimu. Time je omogućena klasifikacija aminopeptidaza N kod Lepidoptera na 4 klase (117).

3. Naši radovi

Larve *M. funereus* se razvijaju u kori i gornjim slojevima beljike većeg broja lišćara i nekih četinara. Kod ksilofagnih larvi generalno, digestivni enzimi, naročito proteolitički, nedovoljno su proučeni. Hranljivi supstrat je nepovoljan ne samo sa nutricionog aspekta zbog male količine osnovnih hranljivih materija, već i zbog prisustva biljnih peptidaznih inhibitora i drugih antinutritivnih materija. Da bi naselile ovaj supstrat, ksilofagne vrste insekata su tokom evolucije razvile čitav niz bihevioralnih, morfoloških, fizioloških i biohemijskih adaptacija.

Dosadašnja istraživanja na larvama *M. funereus* bazirala su se na ispitivanju krioprotektivnih mehanizama i uloge neurohormona u regulaciji aktivnosti α -amilaze i opšte proteolitičke aktivnosti (5, 8, 108–111). Objedinjavanjem podataka dobijenih različitim hemijskim i biološkim metodama pokušali smo da dublje sagledamo mehanizam stresa i osnovu nutricionne plastičnosti kod ovih larvi. U okviru ranijih istraživanja opisane su i serin-peptidaze kod larvi gajenih na veštačkoj podlozi pod konstantnim laboratorijskim uslovima (112). Detektovani su i razni proteolitički enzimi od kojih je najzastupljeniji enzim leucil-aminopeptidaza (LAP). Ovaj enzim delimično je prečišćen i okarakterisan (113), a opisano je i prečišćavanje i osobine α -amilaze iz srednjeg creva (118). Ovi rezultati doprinose kako sagledavanju diverziteta proteolitičkih enzima individualne vrste insekata, tako i razumevanju uloge vodeće peptidaze u osvajanju novih biljaka domaćina.

Jedan od prvih problema koji je potrebno rešiti u radu s insektima je obezbeđivanje reproduktivnog materijala. Dodatnu komplikaciju predstavlja količina polaznog materijala, jer je katkada potrebno hiljade jedinki za određenu problematiku. Kod *M. funereus* to nije moguće ostvariti, jer je zaštićena vrsta na Evropskoj Crvenoj Listi iz 1991. godine i Svetskoj Crvenoj Listi iz 1996. godine, kao i u Uredbi o zaštiti prirodnih retkosti, Službeni glasnik 50/93. Zbog toga je razvijen postupak gajenja larvi u laboratorijskim, strogo kontrolisanim uslovima, počev od piljenja iz jaja. Ovakvi eksperimenti obezbeđuju reproduktivan materijal u dovoljnoj količini za

istraživanja, međutim, zbog uočenih razlika u distribuciji enzima kod različito odgajenih larvi, ovakav materijal nije dovoljan za sve tipove eksperimenata i radi poređenja neophodno je uvek imati i larve iz prirodnih uslova.

Prethodna istraživanja (113) su pokazala da su LAP najzastupljenije peptidaze sirovog ekstrakta srednjeg creva larvi *M. funereus* iz prirodnih uslova. Nađeno je da delimično prečišćena LAP nema striktnu supstratnu specifičnost, ali prvenstveno katalizuje hidrolizu *p*-nitroanilida koji sadrže hidrofobne amino kiseline sa K_M vrednošću za leucil-*p*-nitroanilid (LpNA) od 0,21 mM. Zimogramska analiza je pokazala prisustvo četiri različite izoforme LAP primenom različitih aminoacil-*p*-nitroanilidnih derivata. Radi razjašnjavanja uloge vodeće peptidaze u polifagnoj prirodi larvi *M. funereus*, kao i produblјivanja saznanja o biohemijskoj organizaciji digestivnih procesa kod familije Cerambycidae postavljeni su sledeći ciljevi ovog rada:

- razvijanje visoko osetljivog i kvantitativnog zimogramskog testa za leucil-aminopeptidaze i detekcija izoformi na osnovu zimograma u sirovom ekstraktu srednjeg creva larvi *M. funereus*,
- izolovanje glavne izoforme LAP srednjeg creva larvi *M. funereus* do homogenosti,
- molekulska i enzimska karakterizacija (što bi obuhvatilo): MM, pI, broj subjedinica, parcijalnu sekvenciju (s pretragom homologih sekvencija sličnih enzima), katalitičke osobine, supstratnu specifičnost prema seriji pNA supstrata i ispitivanje uticaja raznih inhibitora i aktivatora.

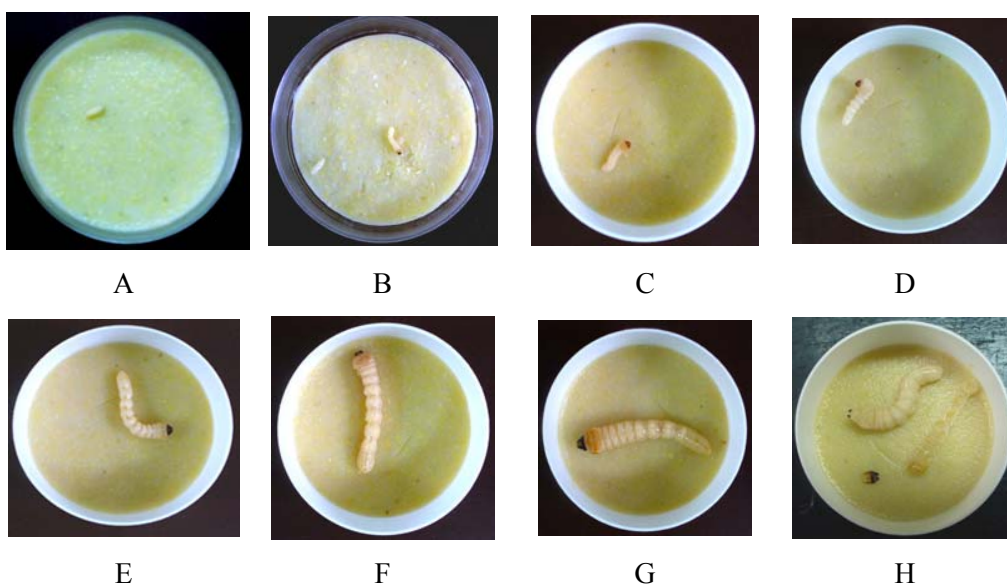
3.1 Larve *M. funereus*

U našem radu su korišćene larve *M. funereus* donete iz prirode (sa Fruške gore) sa hrastovih ležaka i panjeva u jesen i larve gajene od piljenja u laboratoriji. Za preliminarna istraživanja i za razvoj zimogramske detekcije korišćene su larve koje su nakon donošenja iz prirode, gajene na veštačkoj dijeti (119). Za izolovanje i karakterizaciju najaktivnije izoforme leucil-aminopeptidaze iz sirovog ekstrakta srednjeg creva larvi korišćene su larve ispiljene iz jaja u laboratoriji.

U ranijim istraživanjima (99) je pokazano da je zastupljenost proteolitičkih enzima u ukupnom pulu proteina manja od 1:1 000. Svi raniji homogenati bez obzira na veličinu i masu larvi, prema zimogramskoj detekciji LAP nativnom elektroforezom, imali su 4 izoforme LAP i isti proteinski profil nakon bojenja gela CBB-om. Zbog toga su žrtvovane sve raspoložive larve donete iz prirodnih uslova (150 komada) telesnih masa u rasponu od 0,2 – 1,7 g i masa creva u rasponu od 0,01 – 0,3 g, ukupne mase 19 g. Jedanaest larvi ispiljenih iz jaja u laboratoriji, telesnih masa u rasponu od 2,0 – 2,7 g i ukupne mase creva 4,41 g, žrtvovane su za prečišćavanje i karakterizaciju najaktivnijeg izoenzima leucil-aminopeptidaze.

3.1.1 Gajenje larvi *M. funereus*

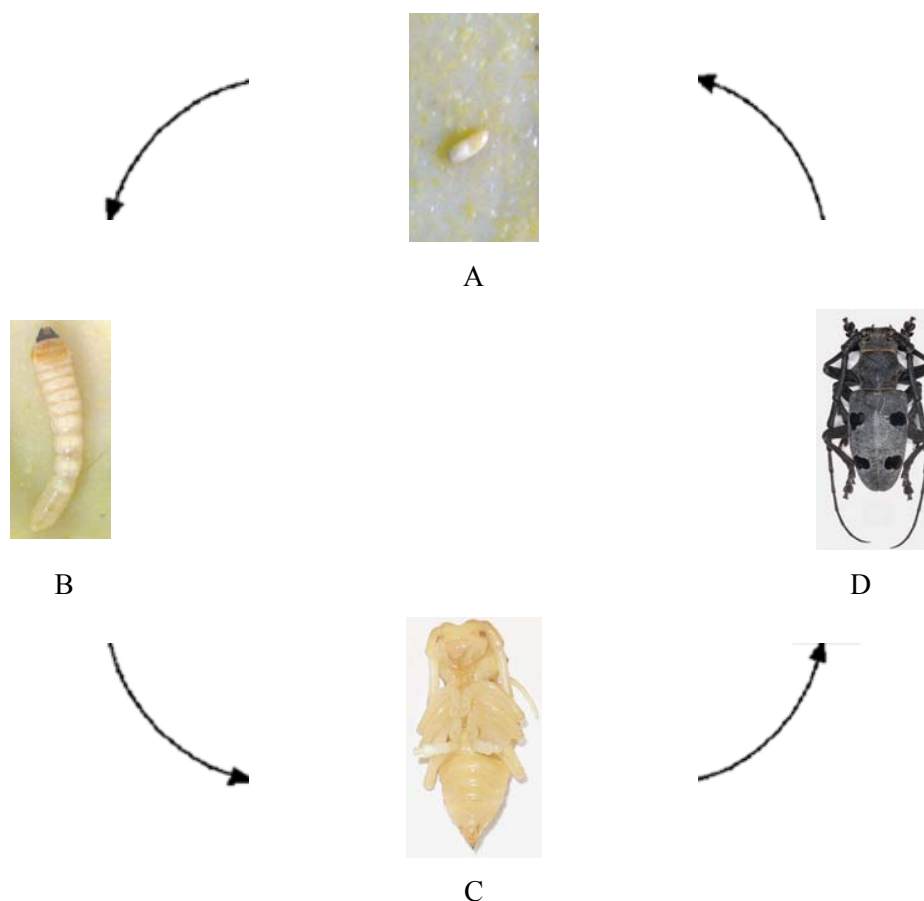
Larve su gajene u laboratorijskim uslovima od jaja. Adulti, odnosno odrasle jedinke *M. funereus*, su doneti sa Fruške gore, a zatim su postavljeni u plastične kutije sa otvorom za vazduh i hrastovim grančicama i korom kao glavnim izvorom hranljivih sastojaka. Kutije su držane u konstantnim laboratorijskim uslovima, na 23°C.



Slika 16. Različiti stadijumi razvića larvi *M. funereus*. A) Jaje. B) Ispiljena larva. C–G) Različiti larveni stupnjevi. H) Larva neposredno nakon presvlačenja.

Jaja su odmah po izleganju prebacivana na modifikovanu hranljivu podlogu za gajenje voćnih mušica, tzv. veštačku dijetu, slika 16, A. Prosečno nakon 7 dana iz jaja se ispile larve, koje se gaje na istoj podlozi, slika 16, B. Larve su gajene na konstantnoj temperaturi od 23°C i pri približno 80% vlažnosti vazduha (11). Podloga je menjana jednom nedeljno. Larve su gajene do petog ili šestog larvenog stupnja u zavisnosti od postignute telesne mase (preko 2,0 g), slika 16 C–G. Broj larvenog stupnja određen je brojem presvlačenja larve, tj. kada larva odbacuje košuljicu i mandibule i zamenjuje ih novim, slika 16, H.

Ukoliko se larve ostave na podlozi nakon šestog stupnja dolazi do ulutkavanja, slika 17, C. Lutka se gaji u navlaženim kutijama bez hrane, desetak dana pre nego što se preobrazi u adulta, slika 17, D.



Slika 17. Metamorfoza *M. funereus*. A) Jaje. B) Larva. C) Lutka. D) Adult. Uslovi gajenja su dati u tekstu.

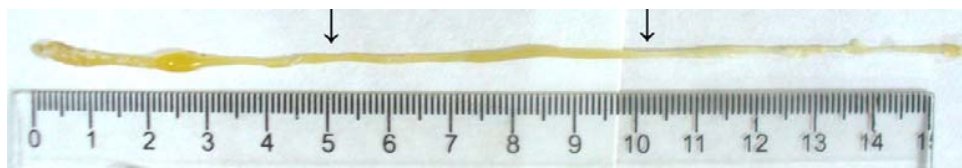
Razviće *M. funereus* se odvija kroz kompletnu metamorfozu koja podrazumeva ciklus jaje → larva → lutka → adult. Metamorfoza je jedna od ključnih komponenti uspešnosti insekata kao vrste. Mnogi insekti, uključujući tu i *M. funereus* imaju larve koje se po svojim osobinama i načinu ishrane značajno razlikuju od adulta. To omogućava insektu (larvi) korišćenje vrednih hranljivih resursa uz istovremeno širenje i naseljavanje novih staništa (adulti), čime se potencijal adaptacije i evolucije značajno uvećava.

3.1.2 Priprema sirovog ekstrakta srednjeg creva larvi *M. funereus*

Larve su žrtvovane u skladu sa zahtevima Etičkog komiteta Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Larve iz prirodnih uslova su odmah po prikupljanju ili mesec dana nakon gajenja na veštačkoj dijeti žrtvovane na ledu, a larve gajene u laboratoriji u petom i šestom stupnju razvića. Nakon dekapitacije srednje crevo je disekovano na ledu, a zatim su sva creva homogenizovana u ohlađenom avanu sa tučkom, 0,9%-nim natrijum hloridom u 20 mM acetatnom puferu pH 6,0 (1:2, m/V), uz dodatak silika-gela (0,3:1, m/m). Nakon homogenizacije, homogenati su ekstrahovani 90 minuta u frižideru, a nakon toga centrifugirani 10 minuta na 10 000 x g. Dobijeni ekstrakt (E) je odmašćen dodatkom iste zapremine ugljentetrahlorida (CCl₄) uz mešanje 5 minuta pa centrifugiranjem 2 minuta na 5 000 x g. Odmašćivanje je ponovljeno tri puta, a dobijeni bistri supernatanti su odvađeni i čuvani na -20°C do upotrebe. Talog nakon centrifugiranja je reekstrahovan (R), a nakon toga pri istim uslovima je dodat pufer za ekstrakciju koji je sadržavao i 2% Triton X 100, da bi se ekstrahovale eventualno prisutne membranske LAP (T). Homogenati larvi gajenih u laboratoriji (AD) i gajenih od jaja (ADJ) su pravljani na isti način, s tim što je odnos mase tkiva i pufera za homogenizaciju varirao u zavisnosti od raspoložive mase tkiva.

3.1.3 Određivanje pH vrednosti lumena creva

Prilikom žrtvovanja, tri različita srednja creva, slika 18, su podeljena na tri jednaka dela, Sadržaj lumena svakog dela je isceden na univerzalne test tračice za određivanje pH. U sadržaju svakog dela srednjeg creva ispitana je aktivnost leucil-aminopeptidaze.



Slika 18. Srednje crevo larvi *M. funereus*. Strelicama su označena mesta sečenja.

Dobijeni opsezi pH vrednosti delova srednjeg creva larvi *M. funereus* dati su u tabeli 3. U tabeli su takođe prikazane i pH vrednosti dobijene za neke predstavnike Coleoptera (120). Srednja creva su kod njih pre merenja podeljena na dva ili tri regiona, zavisno od insekata i od istraživača.

Tabela 3. pH vrednosti delova srednjeg creva nekih predstavnika Coleoptera. A-adult, L-larva.

Coleoptera	Prednji	Srednji	Zadnji
Carabidae (A)	6,4	-	6,6
Scarabaeidae (L)	8,2	10,4	10,5
Passalidae (A)	8,6	9,5	9,3
Dermestidae (A)	7,2	-	7,2
Bostrichidae (A)	6,0	-	7,1
Cucujidae (A)	6,4	-	6,1
Coccinellidae (A)	5,5	5,4	5,5
Tenebrionidae (A)	7,1	-	6,3
Tenebrionidae (L)	5,6	-	7,9
Chrysomelidae (L)	5,9	6,1	6,6
Curculionidae (A)	6,9	-	8,4
Cerambycidae (L)	6,2	6,9	7,1
<i>M. funereus</i>	5,5-6,0	8,0-8,5	8,5-9,0

Pretpostavlja se da je pH vrednost srednjeg creva direktna posledica adaptacije pretka insekata na određeni izvor hrane. Međutim, kako su potomci zbog hranjenja na različitim podlogama divergirali i dalje zadržavajući pH uslove pretka, danas je evidentno da je pH srednjeg creva u mnogo većoj meri filogenetski zavisano, nego što

ima veze sa tipom hrane. Bez obzira na to, primećeno je da je pH optimum amilaza u vezi sa luminalnim pH creva, što najčešće ne važi za druge enzime uključujući tu i aminopeptidaze (120).

Aktivnost LAP je detektovana u prednjem, srednjem i zadnjem delu srednjeg creva, zato su za pripremu sirovog ekstrakta uzimana cela srednja creva. Literaturni podaci o kompartmentalizaciji digestivnih enzima ukazuju na opšti model varenja unutar taksonomske kategorije (vrsta, rod, familija, red, klasa, razdeo, odnosno tip i carstvo). Adaptivne karakteristike insekata unutar iste taksonomske kategorije koji imaju različite izvore hranljivih materija evoluirale su iz istog osnovnog digestivnog modela, dok se kod insekata koji se hrane istim supstratom, ali ne pripadaju istoj taksonomskoj kategoriji, uprkos postojanju konvergentnih karakteristika, uočavaju različite prostorne organizacije varenja (120). Zbog svega navedenog, varenje kod insekata posmatra se ne samo sa aspekta hranljive podloge već i unutar filogenetske pripadnosti.

3.1.4 Određivanje koncentracije proteina i leucil-aminopeptidazne aktivnosti

Svakom homogenatu je određena koncentracija proteina po Bradford-u (121). Rezultati su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. Analiza ekstrakata srednjeg creva larvi *M. funereus*.

Ekstrakti	Konc. proteina (mg/mL)	Konc. proteina (mg/g creva)	Aktivnost LAP (U/mL)	Aktivnost LAP (U/mg x g ⁻¹)*
E	29,1	49,0	9,5	0,2
R	6,7	12,6	3,1	0,2
T	0,3	0,6	1,1	1,8
AD	2,0	13,3	1,8	0,1
ADJ	1,8	1,3	5,4	4,2

* obračunato po mg proteina po g creva.

Leucil-aminopeptidazna aktivnost je određivana spektrofotometrijski sa leucil-*p*-nitroanilidom (LpNA) kao supstratom. Reakciona smeša se sastojala od sirovog ekstrakta, 50 mM Tris-HCl pufera pH 7,5 i 1,0 mM LpNA u dimetilformamidu (DMF). Nakon 10 minuta na 30°C (122), reakcija je prekidana dodatkom 30%-ne

sirćetne kiseline. Količina oslobođenog *p*-nitroanilina (*p*NA) je određivana merenjem A_{410} (123), tabela 4. Jedna enzimaska jedinica (U) je definisana kao ona količina enzima koja katalizuje hidrolizu 1 μ mol *Lp*NA u minuti na 30°C.

U daljem radu od larva donetih iz prirodnih uslova, korišćen je sirovi ekstrakt E zbog najveće količine ekstrahovanih leucil-aminopeptidaza.

3.2 Zimogramska detekcija LAP

Prema nekim istraživačima (77) pravi proboj u određivanju peptidaza predstavlja uvođenje istog supstrata za detekciju aktivnosti na gelu nakon elektroforeze koji se koristi i kod spektrofotometrijskog određivanja aktivnosti, bez obzira na to što je proizvod reakcije rastvoran. To pojednostavljuje, kako praćenje prečišćavanja, tako i sam proces prečišćavanja željenog enzima. Da bi ova očigledna prednost mogla da se iskoristi u našem radu bilo je neophodno da se razvije metoda zimogramske detekcije sa *Lp*NA kao supstratom. Za određivanje aktivnosti LAP dva najpoznatija i u praksi najčešće korišćena sintetska supstrata su leucil-*p*-nitroanilid i leucil-naftilamid. Leucil-*p*-nitroanilid je mnogo osetljiviji od leucil-naftilamida i stoga mnogo više u upotrebi u spektrofotometrijskim testovima (77, 123, 125). Međutim, ova procedura vizualizacije enzima direktno na gelu nije razvijena jer je proizvod enzim-supstrat reakcije rastvorna ljubičasta azo-boja. Nekoliko eksperimenata kojima je pokušano prevazilaženje ovog problema, a koji su podrazumevali ili neku vrstu transfera sa gela na membranu nakon elektroforeze (76) ili sa gela na agarozni gel (77) nije dalo zadovoljavajuće rezultate. Nedostatak dužeg inkubiranja membrane u supstratu je nastanak velike količine *p*-nitroanilida koji pri bojenju dovodi do neželjeno jakog bojenja pozadine.

U ovom radu je razvijena poboljšana procedura vizualizacije LAP na gelu korišćenjem *Lp*NA tako da je nastali ljubičasti proizvod stabilan dovoljno dugo za validnu dokumentaciju i obradu rezultata.

Prethodno opisani problemi sa rastvorljivošću proizvoda prevaziđeni su uvođenjem 1-naftilamina umesto do tada korišćenog *N*-(1-naftil)-etilendiamina, jer 1-naftilamin sa *p*-nitroanilinom daje azo-boju manje rastvornu u vodi koja precipitira na gelu, što omogućava direktnu detekciju enzima na gelu, bez neželjenog bojenja pozadine i bez naknadnih transfera. Ovom metodom moguće je detektovati LAP iz

biljnog ili životinjskog porekla, što je potvrđeno primenom metode za detekciju LAP iz *M. funereus*, LAP iz pasulja i LAP iz bubrega svinje. Da bi metoda mogla pouzdano da se primenjuje utvrđen je linearni opseg kvantifikacije enzima, osetljivost i reproduktivnost metode.

3.2.1 Priprema enzimskih ekstrakata

Pasulj (*Phaseolus vulgaris*) i bubreg svinje su nabavljeni u lokalnim prodavnicama. Materijali su homogenizovani u ohlađenom avanu u 4 zapremine (mL/g) ohlađenog 0,9% NaCl u 50 mM acetatnom puferu, pH 6,0. Homogenati su centrifugirani 5 minuta na 5 000 x g, a lipidi su uklonjeni kombinovanjem rezultujućih supernatanata sa jednakim zapreminama CCl₄ mešanjem 5 minuta, nakon čega su centrifugirani 2 minuta na 5 000 x g.

Aktivnosti leucil-aminopeptidaza u dobijenim ekstraktima su određene kao što je opisano u odeljku 3.1.4, s tim što je kod ovih ekstrakata korišćen Tris-HCl pufer pH 8,5. 0,02 U (20 mU) različitih LAP je naneto na elektroforezu.

3.2.2 Nativna PAGE

PAGE (126) je urađena na 4% (m/V) koncentrujućem gelu (1,5 x 16,0 x 0,15 cm) i 10% (m/V) razdvajajućem gelu (5,5 x 16,0 x 0,15 cm). Najbolji rezultati u razdvajanju i enzimskoj detekciji dobijeni su sa gelovima debljine 1,5 mm. Elektroforeze su rađene na Hoefer SE 620 kadi za elektroforezu pri konstantnom naponu od 80 V, 2 časa na 4°C.

3.2.3 Detekcija aktivnosti LAP na gelu nakon native PAGE

Nakon završene elektroforeze gel je ispran dva puta po 10 minuta u destilovanoj vodi, a zatim ekvilibrisan u 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 5 minuta. Nakon toga, gel je potopljen u 2 mM rastvor supstrata (*LpNA*) u 50 mM Tris-HCl pH 8,5 i inkubiran je 10 minuta na 30°C. Diazotovanje oslobođenog *p*-nitroanilina urađeno je na sobnoj temperaturi uranjanjem gela u sveže napravljen 0,1% (m/V) rastvor NaNO₂ u 1 M HCl, 2 minuta. Višak NaNO₂ uklonjen je dodatkom 1% uree, blagim mešanjem gela u trajanju od 30 sekundi. Diazotovani gel je nakon toga uronjen u 0,025% (m/V)

rastvor 1-naftilamina u 22% (V/V) etanolu i blago je mešan 2–5 minuta dok se nije formirala jasna azo-boja (83). Rezultati detekcije LAP u sirovim ekstraktima bubrega svinje i kotiledona pasulja prikazan je na slici 19.



Slika 19. Zimogramska detekcija LAP. 1) bubreg svinje, 2) kotiledon pasulja.

Na ovaj način detektovane trake su značajno jasnije od traka detektovanih nakon transfera gela na NC membranu (rezultati nisu prikazani). Postoji relativno mali broj radova u literaturi koji se odnose na prečišćavanje i karakterizaciju LAP iz kotiledona pasulja (78, 127) i u njima se ne spominje postojanje izoformi LAP, a na slici 19 se vide 3 jasne izoforme.

Glavna prednost ove procedure je detekcija enzima *in situ*, što omogućava vizualizaciju svih izoformi koje se ne mogu detektovati uvek na membrani zbog lošeg ili vremenski nedovoljnog transfera. Na ovaj način je takođe izbegnuto i neželjeno jako bojenje pozadine koje je kod detekcije na membrani relativno često zastupljeno.

Poboljšanje metode postignuto je zamenom *N*-(1-naftil)-etilendiamina 1-naftilaminom čija je azo-boja manje rastvorna u 22% etanolu i zamenom amonijum-sulfamata ureom koja je mnogo efikasnija u gašenju nitrita. 22% je minimalni procenat etanola potreban za rastvaranje 1-naftilamina, a izabran je zbog sporijeg formiranja azo-boje i samim tim bolje kontrole reakcije.

Ova procedura je naročito korisna za osetljive enzime (naročito metalopeptidaze, kakva je i LAP), koji mogu biti inhibirani jonima i u tragovima. Upotreba komercijalnih diazonijumovih soli (Fast Blue B, Fast Red, TR i Fast Garnet GBC, najčešće korišćene za zimogramsku detekciju LAP), koje su nestabilne i moraju biti u obliku soli pri dužem čuvanju (79) na ovaj način je izbegnuta.

3.2.4 Određivanje linearnosti, osetljivosti i reproduktivnosti detekcije aktivnosti LAP na gelu nakon native PAGE

Za ispitivanje moguće upotrebe ovakvog zimograma za kvantifikaciju enzima bilo je neophodno utvrditi linearnost, osetljivost i reproduktivnost metode. Za ove svrhe korišćena je delimično prečišćena LAP iz kotiledona pasulja a dobijeni rezultati su obrađeni kompjuterski, ImageJ programom.

3.2.4.1 Priprema delimično prečišćene LAP iz kotiledona pasulja i detekcija aktivnosti na gelu nakon native PAGE

Zrna pasulja (100 g) su potopljena u destilovanu vodu i nakon što su ovlašeni tegumenti odstranjeni, homogenizovana u ohlađenom avanu s tučkom u 2 zapremine ohlađenog 15 mM Tris-HCl pufera, pH 7,5. Sirovi ekstrakt je centrifugiran 10 minuta na 10 000 x g. Supernatant je nanet na hromatografsku kolonu DEAE Sepharose, ekvilibrisanu 15 mM Tris-HCl puferom, pH 7,5. Nevezani proteini su isprani sa kolone startnim puferom. LAP je eluiran povećanjem jonske sile pufera, dodatkom 1 M NaCl u 15 mM Tris-HCl, pH 7,5. Frakcije u kojima je detektovana LAP aktivnost su spojene, a so je udaljena dijalizacijom korišćenjem Amicon P10 membrana. Dobijeni enzimski rastvor nakon ultrafiltriranja sadržavao je 2,25 U/mL prema LpNA.

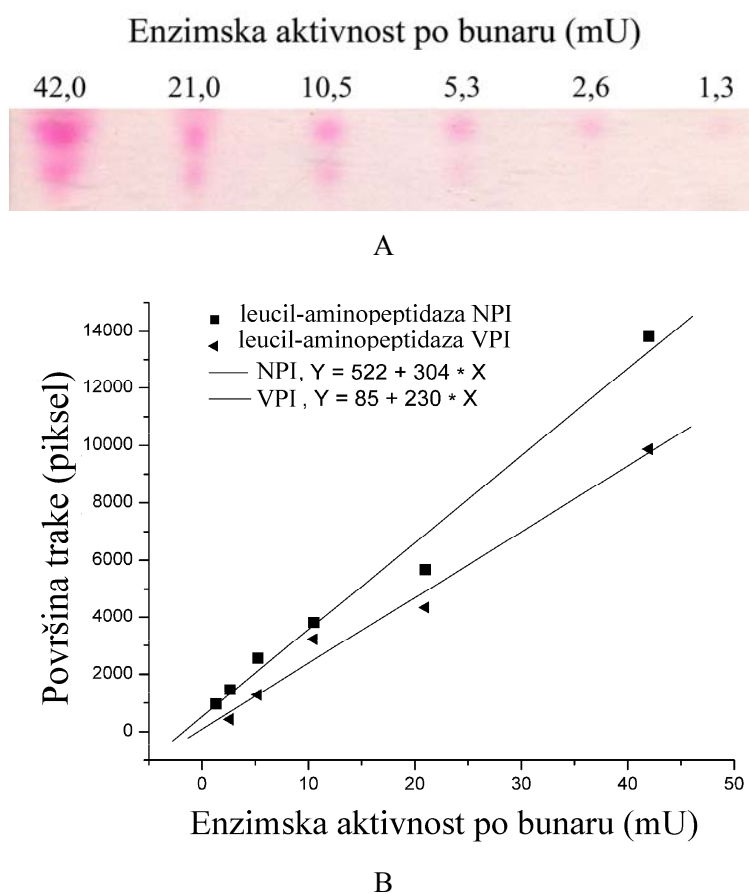
3.2.4.2 Analiza slika gelova

Gelovi su skenirani na Mustek BearPaw 2448TA Plus flatbed skeneru pri rezoluciji od 600 dpi. Analiza slika skeniranih gelova urađena je ImageJ programom koji je dostupan na Internetu (128) i koristi se za merenja površine tj. za relativni integralni intenzitet.

3.2.4.3 Linearnost, osetljivost i reproduktivnost zimogramske detekcije LAP

Serijska dvostruka razblaženja LAP iz kotiledona pasulja su napravljena sa puferom za uzorke, naneta na nativnu PAGE i detektovana prethodno opisanom zimogramskom metodom, odeljak 3.2.3. Na slici 20 A je prikazan zimogram

dvostrukih serijskih razblaženja LAP od 42,0 do 1,3 mU po bunaru i grafik linearnog opsega aktivnosti LAP u odnosu na površinu tamnih zona na gelu. Tamne površine koje odgovaraju aktivnostima obe izoforme LAP su izmerene ImageJ programom i nađeno je da je odnos između njih i nanetih jedinica enzima u bunaru linearan, slika 20 B.



Slika 20. A) Zimogram dve izoforme LAP iz kotiledona pasulja. Dvostruka serijska razblaženja LAP od 42,0 do 1,3 mU po bunaru su detektovana. B) Grafik linearnog opsega aktivnosti LAP u odnosu na površinu tamnih zona na gelu. Količina LAP odnosi se na veličinu obe tamne trake vidljive u jednoj putanji na gelu. NPI-niže pokretljiva izoforma, VPI-više pokretljiva izoforma.

Pri uslovima detekcije kao što su ovde opisani nađeno je da je granica detekcije metode 0,6 mU LAP po bunaru. Međutim, važno je napomenuti da je za

intenzitet nastale azo-boje kritična faza formiranje žutog *p*-nitroanilina. Drugim rečima, dužina trajanja enzim–supstrat reakcije određuje intenzitet finalne boje. Što je ovo vreme duže, veća je osetljivost opisane procedure.

Intergel reproduktivnost linearnog opsega kao i intragel varijacija LAP kvantifikacije urađena je kao što je opisano u literaturi (82, 129) za tri aktivnosti koje pokrivaju tridesetdvostruki opseg. Svaka aktivnost je nanescena jednom na tri različita gela a dobijeni rezultati slažu se sa linearnošću prikazanom na slici 20. Takođe, na tri različita gela, jedna količina enzima je naneta 6 puta (42,0, 10,5, 1,3 mU/bunaru). Podaci i statistika dati su u tabeli 5. Za sve tri količine enzimske aktivnosti koeficijent varijacije manji je od 15% što ukazuje na dobru reproduktivnost unutar testa.

Tabela 5. Reproductivnost “unutar gela” linearnog opsega detekcije aktivnosti LAP iz kotiledona pasulja.

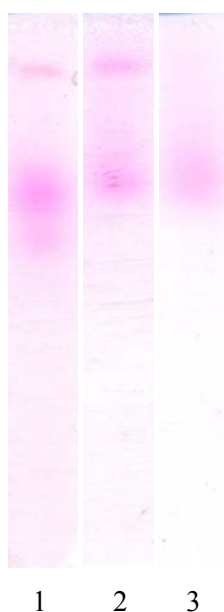
Naneta enzimaska aktivnost po bunaru (mU)	n	Površina (piksel)		Standardna devijacija (piksel)		Koeficijent varijacije (%)	
		I ^a	II ^b	I	II	I	II
42,0	6	14139	9023	1239	835	8,76	9,25
10,5	6	3665	2876	387	358	10,56	12,45
1,3	6	846	- ^c	126	-	14,8	-

^aLAP izoforma manje pokretljivosti, ^bLAP izoforma veće pokretljivosti, ^cne može se detektovati pod navedenim eksperimentalnim uslovima. Vrednosti (piksel) izmerene površine koja odgovara enzimskoj aktivnosti odnose se na obe izoforme LAP iz pasulja, pojedinačno.

3.2.5 Zimogramska detekcija LAP izoformi iz kotiledona pasulja korišćenjem različitih aminoacil-*p*-nitroanilida

Da opisana metoda detekcije LAP na gelu nakon native PAGE može da se izvede i sa drugim aminoacil-*p*-nitroanilidima, ustanovljeno je ponavljanjem procedure sa metionil-*p*-nitroanilidom (MpNA) kao pogodnim supstratom za mnoge LAP i lizil-*p*-nitroanilidom (KpNA) koji nije toliko pogodan supstrat za ovaj enzim.

Po 10 mU LAP iz kotiledona pasulja određeno prema *LpNA* naneto je u tri bunara elektroforetskog gela, a nakon završene elektroforeze enzimi su detektovani na način opisan u odeljku 3.2.3, slika 21. Vreme inkubiranja reakcija enzim–supstrat je produženo da bi se detektovale sve postojeće izoforme. Gel je zatim analiziran ImageJ programom da bi se kvantitativno uporedile dobijene izoforme različite specifičnosti.



Slika 21. Zimogram LAP izoformi iz pasulja nakon native PAGE prema tri različita supstrata. 1) *LpNA*, 2) *MpNA*, 3) *KpNA*.

Kao što se sa slike vidi LAP iz kotiledona pasulja nije striktno specifičan za *LpNA* iako se najviše (tri) izoformi detektuje sa ovim supstratom. *MpNA* je takođe dobar supstrat, prema kojem su aktivne dve izoforme LAP. Zbog većeg afiniteta prema nepolarnim amino-kiselinskim ostacima koje ima LAP, nije se očekivalo da *KpNA* bude pogodan supstrat, ali je ipak prema *KpNA* detektovana jedna aktivna izoforma LAP. Kvantitativnim poređenjem izoforme koja hidrolizuje sva tri supstrata pokazano je da je aktivnost izoforme prema *MpNA* 90% od iste aktivnosti prema *LpNA*, dok aktivnost prema *KpNA* iznosi 70% te aktivnosti. Izoforma manje pokretljivosti aktivna je prema *LpNA* 73% od iste aktivnosti prema *MpNA*.

3.2.6 Zimogramska detekcija elastazi sličnih izoformi iz srednjeg creva larvi *M. funereus*

Mogućnost primene opisane metode detekcije LAP na gelu nakon native PAGE i na druge enzime kojima su supstrati derivati aminoacil-*p*-nitroanilida, testirana je detekcijom elastazi sličnih enzima srednjeg creva larvi *M. funereus*. Detekcija je urađena na opisan način s tom razlikom što je supstrat u ovom slučaju bio sukcinil-alanil-alanil-*p*-nitroanlid (*SA₂pNA*), slika 22.



Slika 22. Zimogram elastazi sličnih izoformi iz srednjeg creva larvi *M. funereus* nakon native PAGE.

Sa slike se vidi da je na ovaj način detektovano postojanje dve izoforme elastazi-sličnih enzima srednjeg creva larvi *M. funereus*.

Ovom metodom zimogramske detekcije detektovane su dve izoforme LAP u srednjem crevu larvi *Cerambyx cerdo* iz prirode (114).

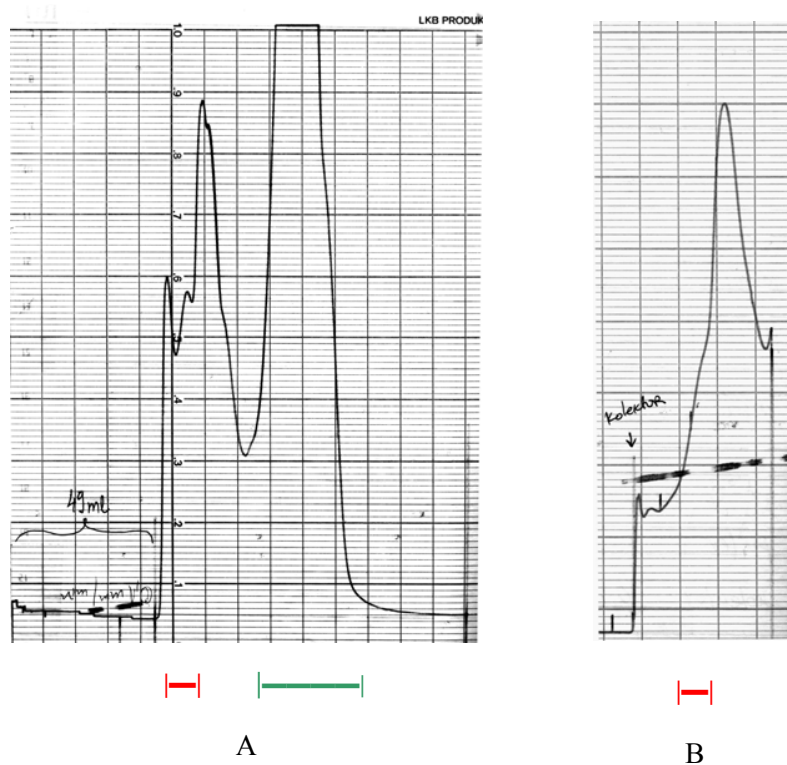
3.3 Detekcija izoformi i prečišćavanje glavne LAP

Detaljnim utvrđivanjem reproduktivnosti, pouzdanosti i primenjivosti metode zimogramske detekcije LAP značajno je olakšano praćenje prečišćavanja izoenzima iz kompleksne smeše, u ovom konkretnom slučaju izolovanje jedne izoforme od, kako je prethodno pokazano, četiri u sirovom ekstraktu srednjeg creva larvi *M. funereus*.

Naša ranija istraživanja (99) su pokazala da je LAP praktično nemoguće prečistiti nekom klasičnom hromatografskom metodom, osim delimično gel-hromatografijom, pri čemu se specifična aktivnost enzima povećava 8 puta. Klasični put prečišćavanja koji podrazumeva amonijumsulfatno fracionisanje – dijalizu – jonoizmenjivačku hromatografiju nije moguć, jer svaka od ovih metoda dovodi do drastičnog gubitka enzimske aktivnosti LAP-a. Tako, taloženjem AS-om gubi se 75% aktivnosti, dijaliza ukida aktivnost kvantitativno, a jonoizmenjivačka hromatografija u zavisnosti od pripreme uzorka. Obično se naneta aktivnost nije mogla dobiti u eluatu, bez obzira na to koji su jonoizmenjivači ili pufferi korišćeni. Probano je na DEAE i CM Sepharose. Dovoljna početna količina materijala u ovom radu omogućila je da se isprobaju razne kombinacije hromatografskih metoda.

3.3.1 Gel-hromatografsko frakcionisanje proteina srednjeg creva larvi *M. funereus*

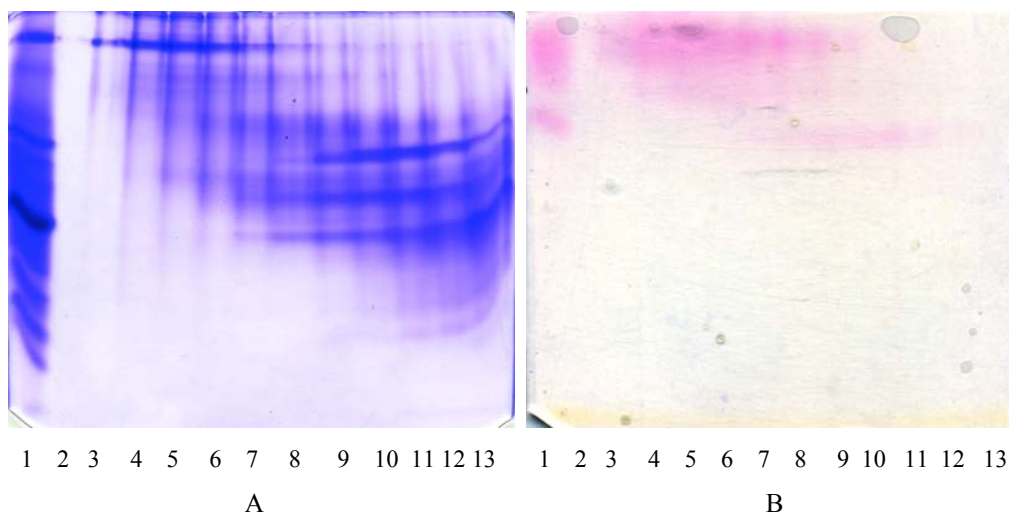
E - ekstrakt je frakcionisan gel-hromatografijom, na četiri različita matriksa (Sephadex G 100, Sephadex G 200, Sephacryl S 200 i Sepharose 6B CL). 4 mL E uzorka (29,1 mg/mL proteina) je naneto na Sephacryl S 200 i Sephadex G 100 kolonu, a po 2,5 mL uzorka iste koncentracije na kolone Sephadex G 200 i Sepharose 6B CL (1,6 x 60 cm) na sobnoj temperaturi i eluirano 0,15 M NaCl u 20 mM acetatnom puferu pH 6,0 pri protoku od 10 mL/h .



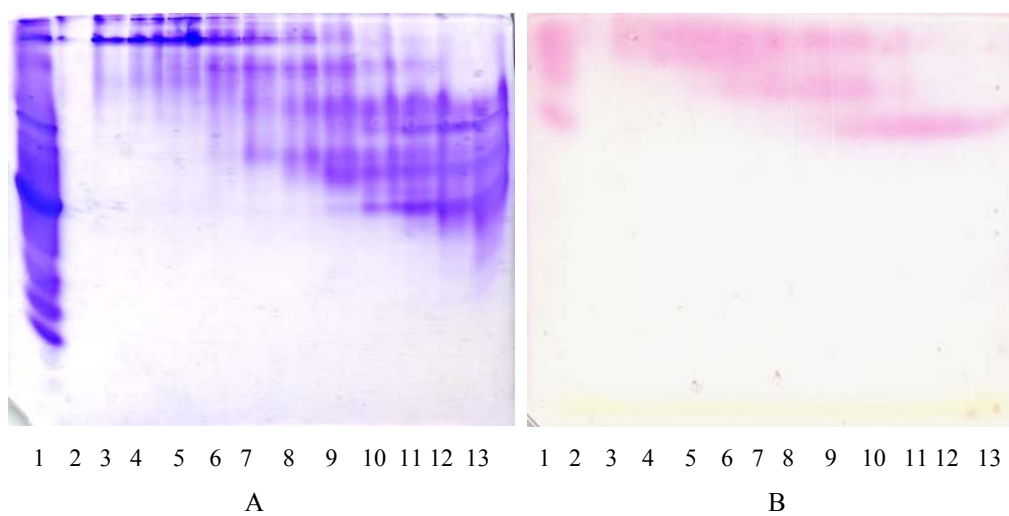
Slika 23. Hromatogram dobijen nakon frakcionisanja proteina sirovog ekstrakta (E) gel-hromatografijom. A) Sephadex G 100, B) Sephadex G 200. |—| - Frakcije sa LAP aktivnošću. |—| - Pigmentni materijal.

Kolone su kalibrisane molekulskim markerima (BSA, 67 kDa; β -LGA, 36 kDa i lizozim, 14,4 kDa). Sakupljane su frakcije od 1,5 mL u kojima je merena apsorbanacija na 280 nm. Hromatogrami dobijeni nakon frakcionisanja na Sephadex-u

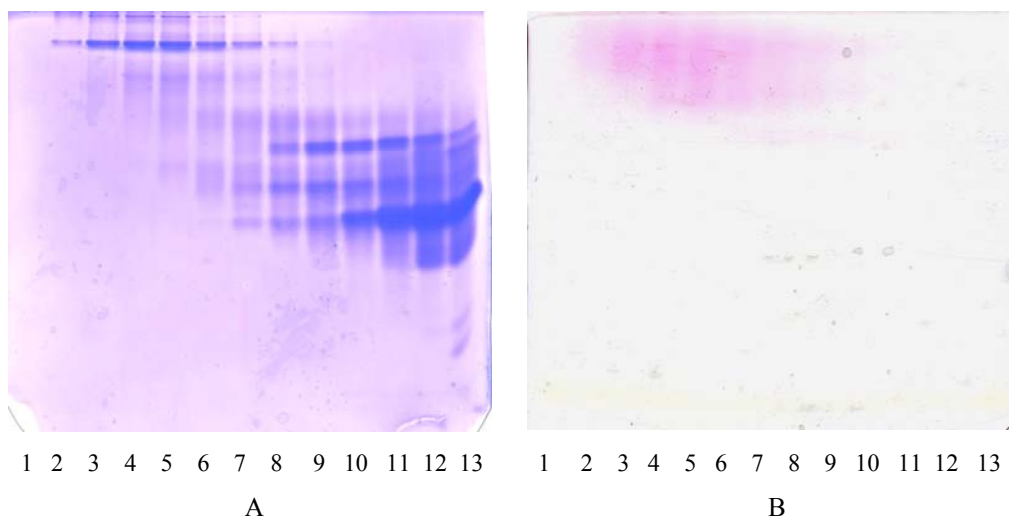
G 100 i Sephadex-u G 200 su prikazani na slici 23. Hromatogrami na kolonama Sephacryl S 200 i Sepharose 6B CL nisu prikazani zbog toga što su slični prikazanima, a i nisu od koristi za praćenje prečišćenosti LAP. Frakcije su testirane na aktivnost LAP, a one u kojima je enzim detektovan su analizirane nativnom elektroforezom (126) i zimogramskom detekcijom (83). Na slikama 24–27 su prikazani dobijeni rezultati.



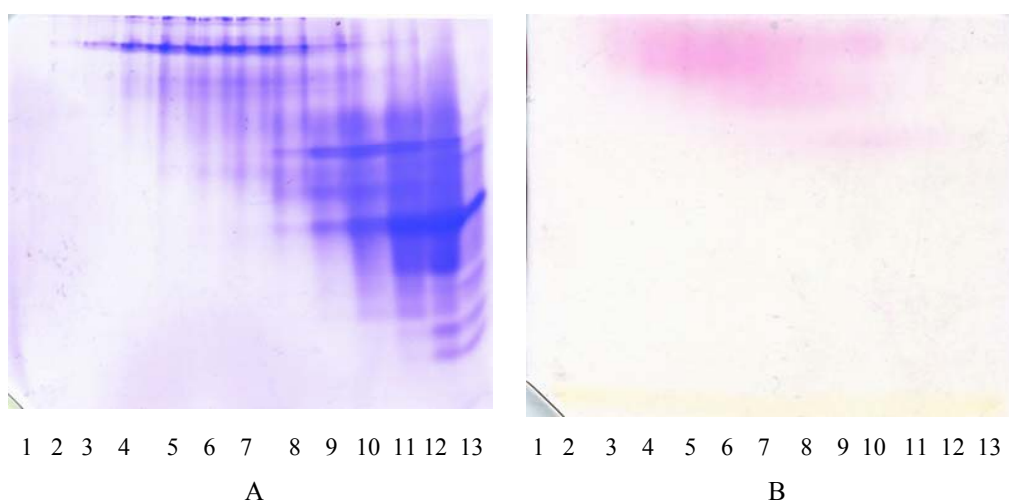
Slika 24. Razdvajanje proteina gel-hromatografijom na Sephadex G 100. 1: E, 2 – 13: frakcije 2 – 13. A) Nativna elektroforeza. B) Zimogram.



Slika 25. Razdvajanje proteina gel-hromatografijom na Sephadex G 200. 1: E, 2 – 13: parne frakcije 2 – 24. A) Nativna elektroforeza. B) Zimogram.



Slika 26. Razdvajanje proteina gel-hromatografijom na Sephacryl S 200. 1–13: frakcije 10 – 22. A) Nativna elektroforeza. B) Zimogram.



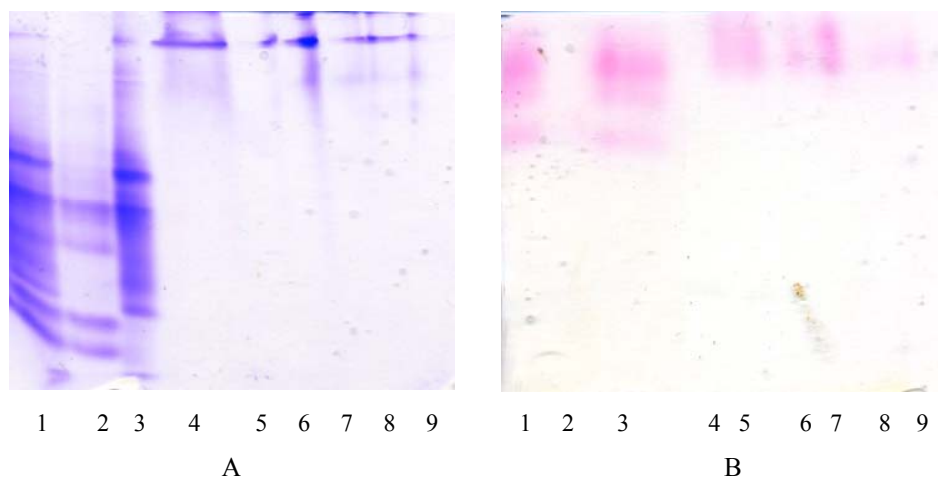
Slika 27. Razdvajanje proteina gel-hromatografijom na Sepharose 6B CL. 2 – 13: neparne frakcije 23 – 45. A) Nativna elektroforeza. B) Zimogram.

Naša ranija istraživanja (99, 113) su pokazala da LAP u srednjem crevu larvi *M. funereus* iz prirodnih uslova postoji u četiri izoenzimska oblika. Prethodno opisanom procedurom za zimogramsku detekciju LAP na gelu nakon native PAGE to je potvrđeno.

Sa prethodnih elektroforegrama i zimograma može se utvrditi da se 4 različite izoforme delimično razdvajaju u svim navedenim hromatografijama na manje-više sličan način. Jedino je izoforma najmanje molekulske mase ovim hromatografijama razdvojena od ostalih, ali u tim frakcijama ima i najviše drugih proteina u odnosu na ostale izoforme. Ova forma je pri tome i najmanje aktivna tako da bi se verovatno najteže pratila prilikom daljeg prečišćavanja, odnosno gubici bi bili preveliki. Što se ostalih izoformi tiče, prve dve svuda silaze zajedno sa kolone, a ubrzo sa njima silazi i treća izoforma. Kombinacijom rezultata dobijenih korišćenjem različitih gel-hromatografija teško je proceniti njihove molekulske mase, ali sve su veće od 200 kDa. Moguće je da su u pitanju i oligomerni proteini.

3.3.2 Hidrofobna hromatografija proteina srednjeg creva larvi *M. funereus*

Kako nije bilo zadovoljavajućih rezultata u razdvajanju glavne, odnosno, najintenzivnije LAP izoforme, sirovi ekstrakt E (slika 28, bunar 1) i frakcija 11 nakon Sephacryl S 200 (koja je smeša prve dve, po veličini, izoforme) (bunar 4), su nanete na hidrofobnu hromatografiju.



Slika 28. Razdvajanje proteina hidrofobnom hromatografijom na Phenyl Sepharose. A) Nativna elektroforeza. B) Zimogram.

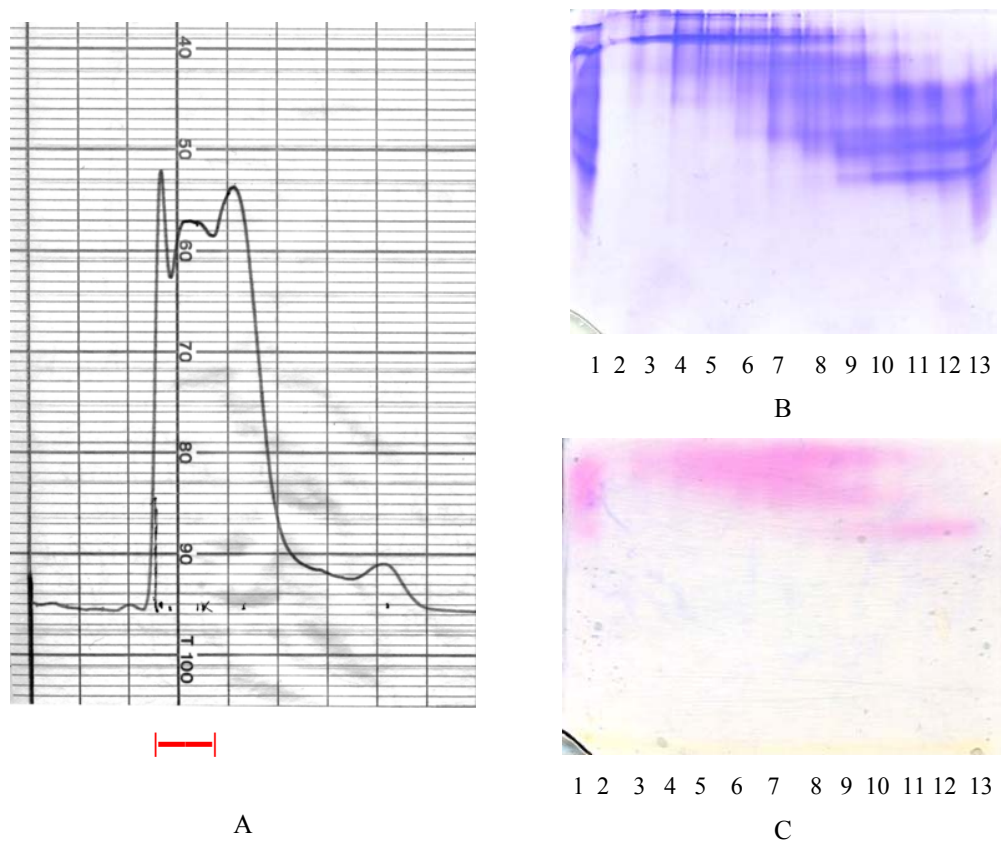
Kolona napakovana Phenyl Sepharose-om je ekvilibrisana u 2M NaCl, a proteini iz uzoraka (prethodno pomešanih sa 4M NaCl, 1:1) su eluirani smanjenjem jonske sile pufera (povećanjem udela vode u njemu), a zatim vodom i na kraju 50% etilenglikolom. Na slici 28 su prikazani dobijeni rezultati nakon nativne elektroforeze i zimogramske detekcije. Frakcija u kojoj je detektovan LAP nakon hromatografije sirovog ekstrakta prikazana je na slici 28, bunar 3. Nakon hromatografije frakcije 11 nakon Sephacryl S 200 LAP je detektovan u frakcijama nakon eluiranja vodom slika 28, bunar 6 i nakon eluiranja etilenglikolom, slika 28, bunar 7–9.

Sa slike se vidi da, ni hidrofobnom hromatografijom nije dobijena ni jedna enzimski čista forma LAP, iako je postignuto dalje delimično prečišćavanje.

3.3.3 Rehromatografija frakcija sa LAP aktivnošću spojenih nakon različitih gel-hromatografija na Sephadex G 200

Poznato je da rehromatografija delimično prečišćenih proteina, zbog niže koncentracije i manje nespecifičnih reakcija sa matriksom, nekada može da dovede do povećanja stepena prečišćenosti željenog proteina. Izabrana je rehromatografija na Sephadex G 200, jer je od svih gel-hromatografija dala najbolje razdvajanje izoformi. Nanet je uzorak delimično prečišćenog LAP dobijen spajanjem frakcija u kojima je detektovana LAP aktivnost nakon prethodno opisanih različitih gel-hromatografija. Uslovi hromatografije bili su kao što je opisano u 3.3.1. Frakcije nakon hromatografije su testirane na aktivnost LAP, a one u kojima je enzim detektovan su analizirane nativnom elektroforezom i zimogramskom detekcijom. Rezultati su prikazani na slici 29.

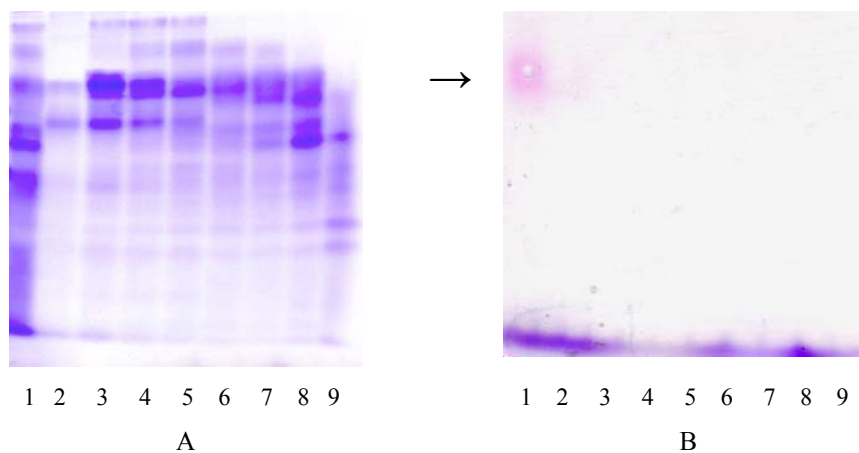
Rehromatografisanjem nije dobijeno značajno bolje razdvajanje izoformi ali su udaljeni drugi, kontaminirajući proteini. I dalje je jedina enzimski čista izoforma ona najmanje molekulske mase, ali ima najviše drugih proteina.



Slika 29. Razdvajanje proteina rehromatografisanjem delimično prečišćenog LAP na Sephadex G 200. A) Hromatogram. |—| - Frakcije sa LAP aktivnošću. B) Nativna elektroforeza. C) Zimogram. 1: početni uzorak, 2 – 13: frakcije 2 – 13.

3.3.4 SDS-PAGE frakcija sa LAP aktivnošću nakon rehromatografije na Sephadex G 200

Kako je jedan od ciljeva dobijanje čiste izoforme kojoj bi se ne samo okarakterisale enzimske osobine već i sekvencija, bilo je neophodno proveriti da li se enzim renaturiše nakon SDS-PAGE. Ovo iz razloga što za sekvenciranje proteina on mora biti poslat na SDS-PA gelu, a da se putem zimograma potvrdi da je to leucil-aminopeptidaza a ne neki drugi protein srednjeg creva. Rezultati razdvajanja proteina rehromatografisanjem na Sephadex-u G 200 praćeni SDS-PAGEom (130) kao i zimogram nakon renaturisanja enzima prikazan je na slici 30.



Slika 30. Razdvajanje proteina rehromatografisanjem na Sephadex G-u 200. 1: E, 2: frakcija 3, 3: frakcija 5, 4: frakcija 6, 5: frakcija 7, 6: frakcija 9, 7: frakcija 10, 8: frakcija 11, 9: frakcija 13. A) SDS-PAGE. B) Zimogram. Strelicom je označen položaj LAP aktivnosti.

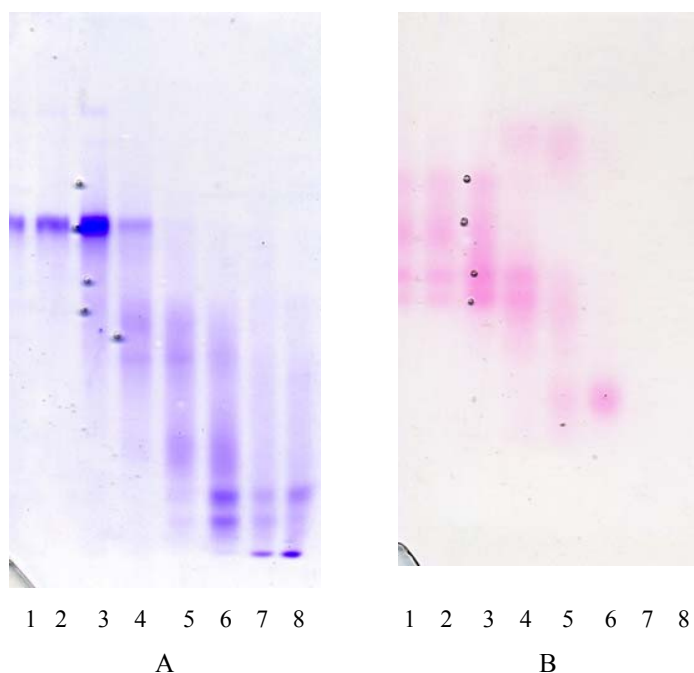
Jedino u sirovom ekstraktu se na zimogramu nakon renaturacije LAP mogla detektovati enzimaska aktivnost što je potvrdilo pretpostavku da je zastupljenost izoformi u frakcijama nakon rehromatografisanja na Sephadex G 200 izuzetno mala.

3.3.5 6% Nativna PAGE frakcija sa LAP aktivnošću nakon rehromatografije na Sephadex G 200

Kako enzimski čistu izoformu LAP nije bilo moguće dobiti hromatografskim metodama, u obzir su uzete elektroforetske tehnike prečišćavanja. Za kreiranje odgovarajuće preparativne elektroforeze bilo je neophodno povećati dužinu gela za razdvajanje i smanjiti procenat akrilamida u gelu, jer su u pitanju izoforme velikih molekulskih masa, ne bi li se postiglo bolje razdvajanje. Za razdvajanje izoformi izabran je 6% nativni PAG na elektroforetskom sistemu Hoefler SE 620 Ruby. Rezultati su prikazani na slici 31. Prikazana je svaka druga frakcija sa detektovanom LAP aktivnošću nakon rehromatografije na Sephadex G 200.

Razdvajanjem izoformi na 6% PA gelu detektuje se čak sedam izoformi, ali se nijedna od njih ne vidi na gelu bojenom CBB-om. Mala zastupljenost enzima koji se pritom javlja u više izoformi u sirovom ekstraktu srednjeg creva larvi *M. funereus*

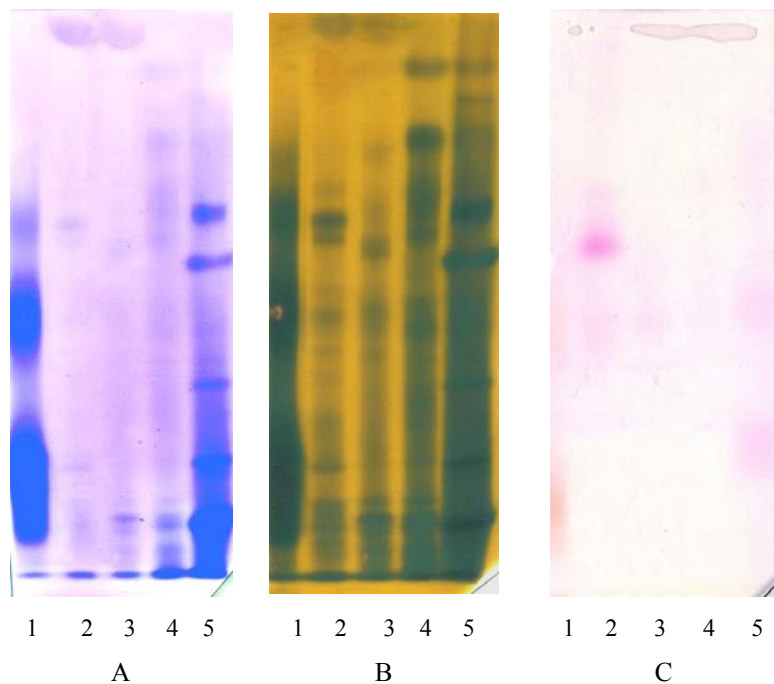
donetih iz prirodnih uslova predstavlja glavni i praktično nerešiv problem za izolovanje enzimski čiste forme LAP za strukturna proučavanja.



Slika 31. 6% nativna elektroforeza proteina rehromatografisanih na Sephadex G 200. 1: frakcija 3, 2: frakcija 3, 3: frakcija 5, 4: frakcija 7, 5: frakcija 9, 6: frakcija 11, 7: frakcija 13, 8: frakcija 14. A) Nativna elektroforeza. B) Zimogram.

3.3.6 6% Nativna PAGE sirovih ADJ ekstrakata

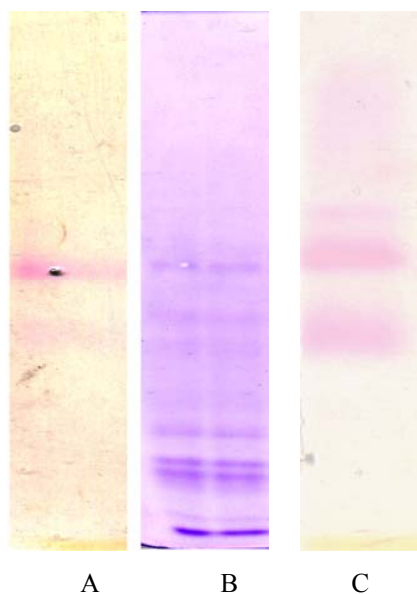
Da bi se prevazišao ovaj problem odgajene su larve u laboratoriji od piljenja, na veštačkoj dijeti bogatoj proteinima koja indukuje peptidaze. U odeljku 3.1.4 data je koncentracija proteina i enzimska aktivnost različitih sirovih ekstrakata larvi *M. funereus*. Kada se uporede sirovi ekstrakt creva larvi donetih iz prirode E i sirovi ekstrakt creva larvi odgajenih u laboratoriji od jaja (ADJ) vidi se da prvi ima mnogo veću koncentraciju proteina dok je ukupna aktivnost LAP obračunata po mg proteina po g creva značajno manja. Elektroforetski, bojeno CBB-om i srebrom (131), i zimogramski to izgleda kao na slici 32.



Slika 32. 6% Nativna PAGE različitih sirovih ekstrakata creva larvi *M. funereus*. 1: obojeni marker BSA, 2: ADJ, 3: AD, 4: E stari, 5: E. A) Nativna elektroforeza bojena CBB. B) Nativna elektroforeza bojena srebrom. C) Zimogram.

Larve gajene od piljenja u laboratoriji imaju najveću enzimsku aktivnost i najmanje ukupnih proteina u sirovom ekstraktu srednjeg creva. To, kao i raspored izoformi, ukazuje na veću verovatnoću izolovanja enzimski čiste izoforme LAP iz ekstrakta ADJ. Najaktivniji LAP izoenzim uzorka ADJ, slika 32 C, bunar 2, poklapa se sa proteinskom trakom vidljivom i na gelu bojenom CBB-om, slika 32 A, bunar 2 i na gelu bojenom srebrom, slika 32 B, bunar 2. Međutim, zbog postojanja još jedne proteinske trake manje pokretljivosti u neposrednoj blizini, uzorak ADJ je ponovo razdvojen preparativnom elektroforezom na gradijentnom PA gelu za razdvajanje umesto 6%-nom.

3.3.7 Nativna gradijent PAGE sirovog ADJ ekstrakta



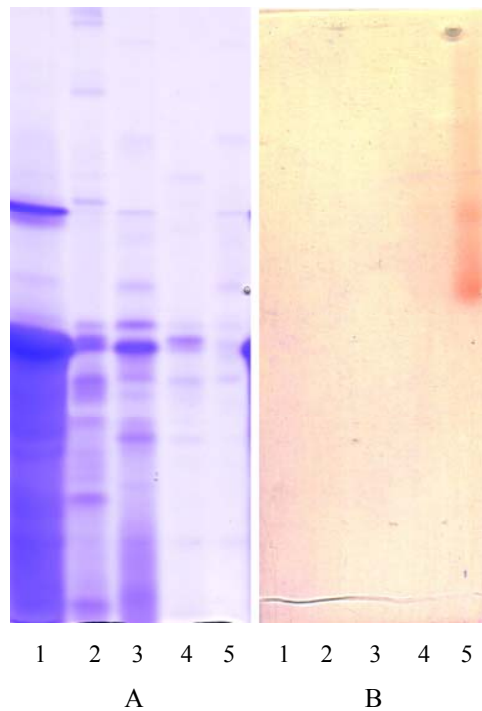
Slika 33. Razdvajanje izoformi ADJ na 4,5–8% gradijentnom gelu. A) Zimogram. B) Elektroforegram. C) Zimogram nakon liofilizacije ADJ.

Za razdvajanje je korišćena 4,5–8% nativna gradijent PAGE (132) na Hofer SE 620 sistemu. Rezultati su prikazani na slici 33. Uzorak ADJ je koncentrovan liofilizovanjem i nanet na gradijentni gel da se utvrdi da li liofilizacija smanjuje enzimsku aktivnost. Sa slike se vidi da uzorak ADJ nakon razdvajanja na gradijent gelu ima tri jasne izoforme od kojih je najaktivnija srednja i kojoj odgovara proteinska traka u gelu bojenom CBB-om. Liofilizacija ne utiče na enzimsku aktivnost, a ona je značajno pojačana na gelu nakon liofilizovanja.

3.3.8 Denaturišuća elektroforeza sirovog ADJ ekstrakta

Za razdvajanje proteina različitih sirovih ekstrakata creva larvi *M. funereus*, u denaturišućim uslovima slika 34, korišćen je 10% SDS-PAGE. Nakon završene elektroforeze gel je inkubiran u 1% Tritonu X 100, a zatim su enzimi u gelu detektovani zimogramski.

Sa slike se vidi da se samo LAP iz ADJ renaturiše. Ovo je još jedna potvrda veće zastupljenosti, a možda i veće stabilnosti enzima ADJ u odnosu na sirovi ekstrakt larvi donetih iz prirodnog staništa.

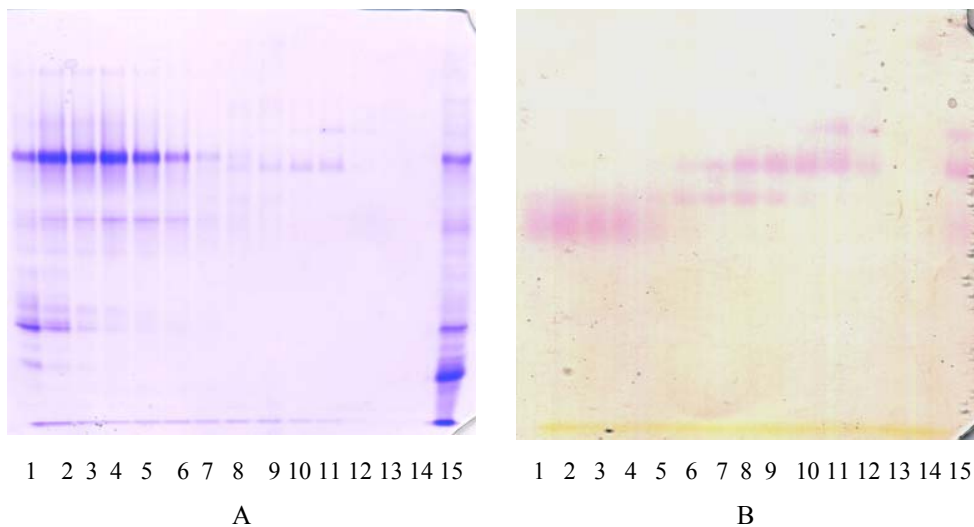


Slika 34. SDS-PAGE različitih sirovih ekstrakata creva larvi *M. funereus*. 1: E, 2: E stari, 3: AD stari, 4: AD, 5: ADJ. A) Elektroforegram. B) Zimogram nakon renaturacije.

3.3.9 Prečišćavanje glavne izoforme LAP

3.3.9.1 Gel-hromatografsko frakcionisanje proteina sirovog ADJ ekstrakta na Superose 6 FPLC koloni

Sirovi ADJ ekstrakt je frakcionisan gel-hromatografijom, na Superose 6 FPLC koloni. 250 μ L ADJ uzorka (9,0 mg/mL proteina) je naneto na Superose 6 kolonu (10 x 300 mm) na sobnoj temperaturi i eluirano fosfatnim puferom (PBS) pH 7,2 pri brzini protoka od 0,2 mL/min. Kolona je kalibrisana molekulskim markerima (ferritin 440 kDa; aldolaza 158 kDa; BSA 67 kDa i ovalbumin 43 kDa). Sakupljane su frakcije od 200 μ L i testirane na aktivnost LAP, a one u kojima je enzim detektovan su analizirane nativnom elektroforezom i zimogramski. Na slici 35 su prikazani dobijeni rezultati.



Slika 35. 6% nativna elektroforeza proteina sirovog ekstrakta larvi gajenih od jaja (ADJ) frakcionisanih gel-hromatografijom na Superose 6. 1 – 14: frakcije 8 – 21, 15: ADJ. A) Elektroforegram. B) Zimogram.

Sa slike se vidi da je razdvajanje izoformi delimično uspelo pri ovim uslovima, odnosno da se ni glavna niti bilo koja druga izoforma nije dobila ni enzimski ni elektroforetski čista. Iz zimograma, slika 35 B, postaje jasno da u sirovom ekstraktu ADJ postoje četiri izoforme i da je glavna treća po pokretljivosti. Na osnovu zimograma, kao prvi korak u prečišćavanju izabrana je preparativna nativna elektroforeza kao jedina mogućnost.

3.3.9.2 Prečišćavanje preparativnom nativnom gradijent (4,5-8%) poliakrilamidnom gel elektroforezom i gel-hromatografijom na Superose 6 FPLC koloni

Nekoliko preparativnih nativnih gradijent (4,5-8%) poliakrilamidnih gel elektroforeza je korišćeno za izolovanje glavne LAP izoforme iz sirovog ekstrakta. Ukupno je korišćen 1 mL (9,0 mg proteina/mL) sirovog ekstrakta creva. Enzimi su detektovani na gelu, nakon čega je gel ispran vodom 2 puta po 10 minuta a zatim ekvilibrisan u 50 mM Tris-HCl puferu, pH 7,5 2 puta po 5 minuta. Gel je zatim potopljen u rastvor $LpNA$ u 50 mM Tris puferu pH 7,5 i inkubiran na 30°C 10 minuta. Najjače obojeni žuti deo gela, koji odgovara glavnoj LAP izoformi je isečen i homogenizovan u dvostrukoj masi vode, da bi se enzim ekstrahovao. Dobijeni

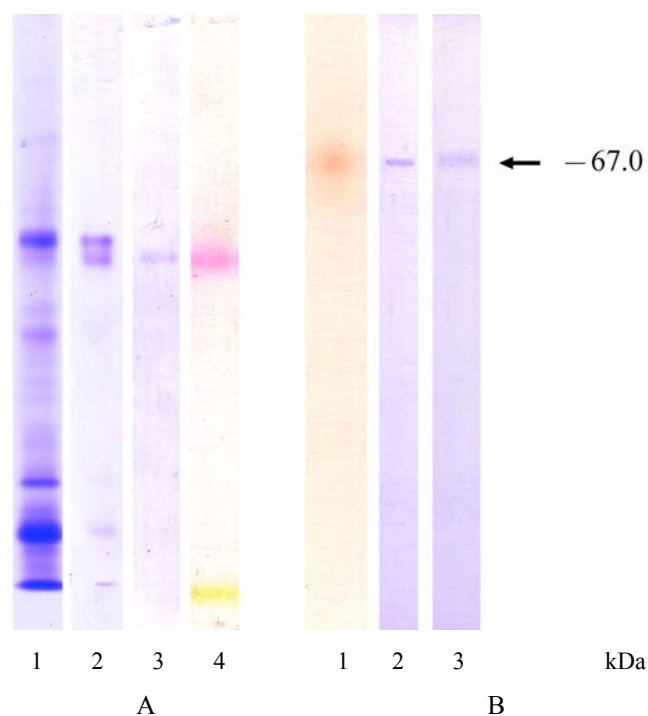
preparat LAP-a je dalje prečišćen gel-hromatografijom na Superose 6 koloni (10 x 300 mm) FPLC sistema za hromatografiju. Kolona je prethodno ekvilibrisana 50 mM fosfatnim puferom (PBS) pH 7,2 pri brzini protoka od 0,2 mL/min. Frakcije od 200 µL su sakupljane i testirane na aktivnost LAP.

Tabela 6. Prečišćavanje glavne LAP izoforme srednjeg creva larvi *M. funereus*.

Faza prečišćavanja	Ukupni proteini (µg)	Ukupna aktivnost (U)	Specifična aktivnost (U/mg)	Stepen prečišćavanja	Prinos (%)
Sirovi ekstrakt srednjeg creva	8990,0	34,5	3,8	1	100
Eluat nakon native PAGE	107,7	11,4	105,8	28	33
FPLC Superose 6	8,3	9,2	1108,4	292	27

U tabeli 6 i na slici 36 su sumirani rezultati prečišćavanja. Dobijeni LAP je iz sirovog ekstrakta (slika 36, bunar 1) prečišćen 292 puta sa prinosom od 27% i homogen je u nativnoj PAGE (slika 36 A, bunar 3), i SDS-PAGE (slika 36 B, bunari 2 i 3). Enzimska čistoća je potvrđena zimogramskom detekcijom u gelu nakon PAGE (slika 36, bunar 4) i SDS-PAGE sa vidljivom trakom na 67 kDa (slika 36 B, bunar 1).

LAP je najaktivnija peptidaza srednjeg creva larvi *M. funereus* (113). Skoro je nađeno da je aminopeptidazi slična aktivnost određena prema LpNA takođe najveća kod muve (133). Razdvajanje izoformi LAP kod *M. funereus* LAP je postignuto nakon što je sirovi ekstrakt razdvojen preparativnom nativnom elektroforezom, a zatim je glavna izoforma eluirana iz gela i prečišćena gel-hromatografijom na Superose 6 FPLC koloni. Po ovoj proceduri glavna izoforma LAP je homogena u SDS-PAGE i na osnovu zimogramskog određivanja aktivnosti u gelu.



Slika 36. PAGE profil prečišćavanja glavne LAP izoforme iz srednjeg creva larvi *M. funereus*. A) Nativna PAGE. B) SDS-PAGE. kDa: Molekulska masa koja odgovara LAP.

3.4 Karakterizacija LAP

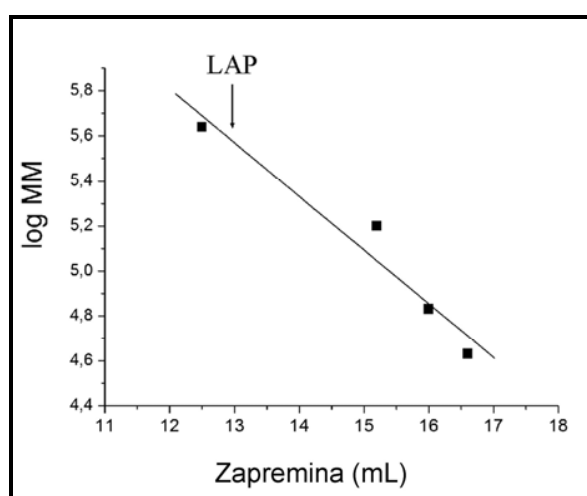
3.4.1 Određivanje molekulske mase LAP

Molekulska masa (MM) nativnog enzima je određena gel-hromatografijom na Superose 6 FPLC koloni. Za kalibraciju kolone korišćeni su standardni proteini poznatih molekulskih masa: feritin (440 000 Da), aldolaza (158 000 Da), goveđi serum albumin (67 000 Da) i ovalbumin (43 000 Da).

Molekulska masa subjedinica LAP je određena SDS-PAG elektroforezom poređenjem sa standardima (LMW-SDS marker kit, GE Healthcare), odnosno α -laktoalbumin, 14 400 Da; tripsin-inhibitor, 20 100 Da; karbo-anhidraza, 30 000 Da; ovalbumin, 43 000 Da; albumin, 67 000 Da i fosforilaza b, 97 400 Da. Nakon elektroforeze gelovi su obojeni CBB-om, a deo gela sa uzorcima tretiranim neredukujućim puferom je inkubiran u 1% Triton X 100 na sobnoj temperaturi 45

min. Aktivnost LAP prema LpNA u gelu je detektovana po prethodno opisanoj proceduri (poglavlje 3.2.3).

Prema SDS-PAGE, izračunata molekulska masa iznosi 67 kDa, slika 36, 1 B. Prečišćena glavna izoforma LAP rechromatografisana na Superose 6 FPLC koloni daje jedan pik na 12,9 mL, koji odgovara molekulskoj masi od 400 kDa, slika 37. Ovi podaci ukazuju da je glavni *M. funereus* LAP heksamer.

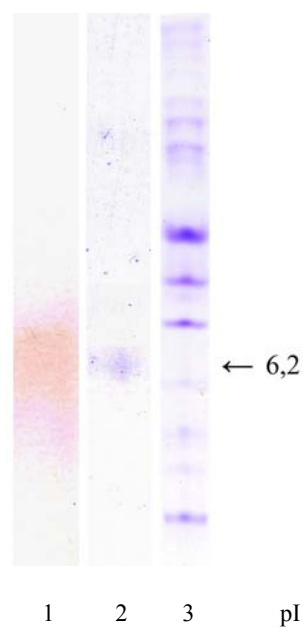


Slika 37. Kalibracija Superose 6 kolone i određivanje molekulske mase glavne izoforme LAP *M. funereus*. Strelicom je označena eluciona zapremina LAP.

U prirodi postoji veoma širok spektar poznatih aminopeptidaza sa opsezima molekulskih masa od 53 do 140 kDa po subjedinici. Aminopeptidaze mogu biti monomeri, heksameri i oktameri (134). S obzirom na to da molekulska masa jedne subjedinice LAP iznosi 67 kDa a native forme enzima 400 kDa, verovatno je da je glavna izoforma *M. funereus* LAP heksamer. U smislu molekulske mase glavna LAP *M. funereus* nema sličnosti sa nekim drugim aminopeptidazama srednjeg creva insekata bilo membranskim bilo slobodnim. Iznenadjuće, po MM LAP liči na aminopeptidazu iz hemolimfe gubara (135) koja je takođe heksamer, molekulske mase od oko 420 kDa. Ovo samo potvrđuje kompleksnost aminopeptidaza insekata, kako u strukturi, tako i u lokaciji i fiziološkim ulogama u organizmu.

3.4.2 Određivanje izoelektrične tačke LAP

Izoelektrično fokusiranje (136) je urađeno na Multiphor II sistemu za elektroforezu. 7,5% akrilamidni gel sa amfolitima pH opsega 3,0 – 10,0 je fokusiran pri konstantnoj snazi od 7 W 1,5h na 10 °C. Kao pI markeri korišćeni su standardni proteini i boje (Broad pI kit, GE Healthcare) odnosno: amiloglukozidaza (3,50), metil crveno (3,75), tripsin-inhibitor (4,55), β -laktoglobulin A (5,20), karboanhidraza B – goveđa (5,85), karboanhidraza B – humana (6,55), kisela forma mioglobina (6,85), bazna forma mioglobina (7,35), kiseli lektin sočiva (8,15), srednji lektin sočiva (8,45), bazni lektin sočiva (8,65) i tripsinogen (9,30). Nakon završene elektroforeze jedan deo gela je obojen CBB-om, a na drugom delu gela je detektovana LAP aktivnost prema LpNA. pI, određen izoelektričnim fokusiranjem je 6,2, slika 38. Jedna traka (slika 38, bunar 2) potvrđuje homogenost izolovanog proteina.



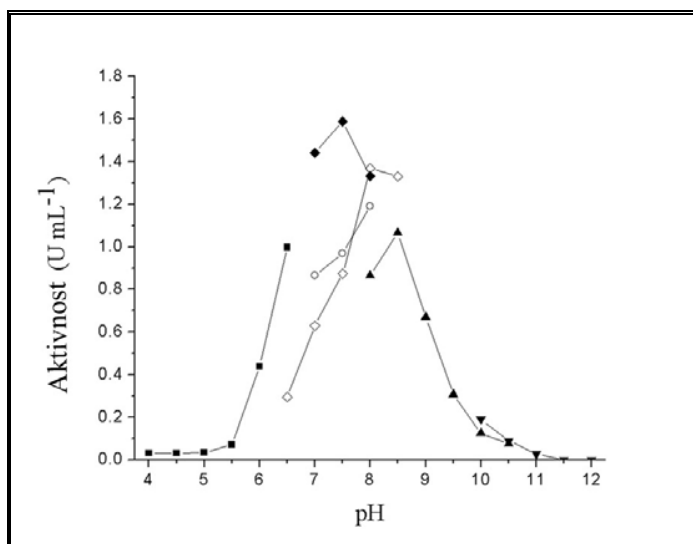
Slika 38. Izoelektrično fokusiranje glavne izoforme LAP *M. funereus*. 1: Zimogramska detekcija na gelu. 2: Bojenje proteina CBB-om. 3: Standardni proteini poznatih pI vrednosti, pI vrednost LAP koja je označena strelicom. Kiseli kraj je dole.

3.4.3 Određivanje aktivnosti LAP

Enzimsku aktivnost prema LpNA određena je spektrofotometrijski merenjem apsorbancije na 410 nm, kao što je opisano u odeljku 3.1.4. 1 μL sirovog ekstrakta ili prečišćenog enzima je inkubiran u 50 mM HEPES puferu pH 7,5 a zatim je dodat 1,0 mM LpNA u 2% DMF. Inkubiranja (na 30°C) trajala su 10 minuta za sirovi ekstrakt i 30 minuta za prečišćeni enzim.

3.4.4 pH optimum

Za određivanje pH optimuma aktivnosti LAP prema LpNA, korišćeno je 1 μL prečišćenog enzima i serija 50 mM pufera, u opsegu pH od 4,0 do 12,0. (acetat, pH 4,0–6,5; fosfat I, pH 6,5–8,5; borat, pH 8,0–10,5; Tris-HCl, pH 7,0–8,0; HEPES, pH 7,0–8,0; fosfat II, pH 10,0–12,0). Kontrolne probe koje su sadržavale samo supstrat pokazale su da nijedan od pufera ne indukuje hidrolizu supstrata.



Slika 39. Efekti pH na aktivnost glavne LAP izoforme *M. funereus*. Korišćeni puferi: ■ – acetat; ◇ – fosfat I; ○ – Tris-HCl; ◆ – HEPES; ▲ – borat i ▼ – fosfat II. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost tri različita merenja (standardne greške su bile manje od 5% od srednjih vrednosti).

Optimum LAP aktivnosti prema *LpNA* kao supstratu je između pH 7,0 i 8,5. Maksimum LAP aktivnosti varira u zavisnosti od korišćenog pufera. Maksimalna LAP aktivnost u HEPES puferu je na pH 7,5, slika 39. Enzim nije aktivan u puferima pH vrednosti ispod 5,0 i iznad 11,0.

Dobijeni pH optimumi su slični pH optimumima LAP-ova izolovanih iz srednjeg creva nekih drugih predstavnika Coleoptera kao što su *Acanthoscelides obtectus* (103) i *Costelytra zealandica* (102), a takođe i nekih predstavnika drugih redova insekata. Primeri za to su *Rhynchosciara americana* (92) i *Spodoptera littoralis* (122). Optimalno pH 7,5 takođe je nađeno za aminopeptidaze srednjeg creva nekih predstavnika Coleoptera (104, 115).

3.4.5 Određivanje K_M i V_{max} vrednosti

Početne brzine enzimi katalizovanih reakcija određene su korišćenjem *pNA* supstrata u opsezima koncentracija od 0,08 do 2,25 mM. Dobijeni podaci obrađeni su nelinearnom regresijom pomoću GraphPad Prism 3.0 programa i prikazani su u tabeli 7.

Tabela 7. Kinetički parametri glavne LAP izoforme srednjeg creva larvi *M. funereus*. K_M i V_{max} vrednosti date su kao srednja vrednost \pm standardna greška.

Supstrat	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	V_{max} / K_M
<i>LpNA</i>	$0,22 \pm 0,03$	$1,91 \pm 0,07$	8,68
<i>MpNA</i>	$0,17 \pm 0,03$	$1,25 \pm 0,05$	7,35
<i>ApNA</i>	$0,96 \pm 0,14$	$4,47 \pm 0,24$	4,66
<i>KpNA</i>	$0,59 \pm 0,11$	$0,61 \pm 0,04$	1,03

Kinetika LAP katalizovanih reakcija korišćenjem četiri različita *p*-nitroanilidna supstrata (*LpNA*, *MpNA*, *ApNA* i *KpNA*) je u saglasnosti sa principima Michaelis-Menten-ove jednačine. Najniže K_M vrednosti, 0,17 i 0,22 mM, uočene su prema *MpNA* i *LpNA*, kao supstratima (Tabela 7). Najviša V_{max} vrednost od 4,47

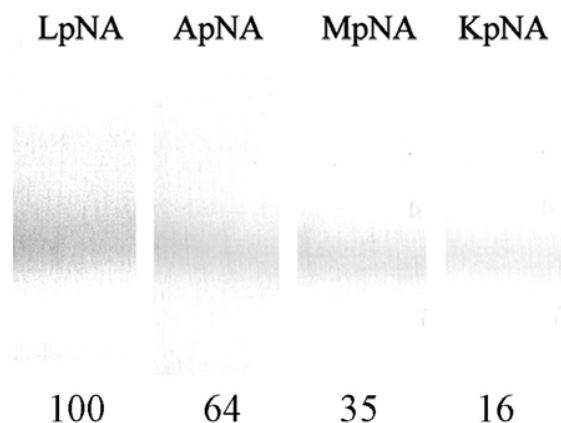
$\mu\text{mol min}^{-1}$ po mL enzima dobija se sa *ApNA* kao supstratom. Odnos V_{max} / K_M je najveći za *LpNA* (8,68) čime je pokazano da je on najpogodniji supstrat.

Dobijeni podaci koji se odnose na supstratnu specifičnost glavne LAP izoforme *M. funereus* slažu se sa literaturnim podacima o aminopeptidazama *Anopheles stephensi* (98) i *S. littoralis* LAP (122). U svim slučajevima enzimi pokazuju veći afinitet za nepolarne amino-kiseline kao što su leucin, metionin i alanin nego za polarne amino kiseline kao što je bazna amino-kiselina lizin.

3.4.6 Određivanje supstratne specifičnosti nativnom PAGE

Nativna PAGE je korišćena za ispitivanje LAP aktivnosti prema različitim *pNA* supstratima. LAP aktivnost je detektovana zimogramom kao što je opisano u odeljku 3.2.3. Nakon elektroforeze, gel je isečen na 4 dela. Svaki deo gela je ispran 2 puta po 10 minuta vodom a zatim inkubiran u 50 mM Tris-HCl puferu, pH 7,5 2 puta po 5 minuta. Nakon toga gel je potopljen u rastvor *LpNA*, *ApNA*, *MpNA* ili *KpNA* u 50 mM Tris puferu pH 7,5 i inkubiran na 30 °C 10 minuta. Diazotovanje oslobođenog *p*-nitroanilina izvedeno je na sobnoj temperaturi, potapanjem gela u sveže pripremljen rastvor natrijum-nitrita u 1 M HCl 2 minuta. Višak natrijum-nitrita uklonjen je dodatkom 1% uree u trajanju od 30 sekundi, uz blago mešanje. Diazotovan gel je zatim uronjen u etanol koji sadrži 1-naftilamin i blago mešan oko 5 minuta, dok se ne formira jasna ljubičasta azo-boja. Slike skeniranih gelova analizirane su kao što je opisano u odeljku 3.2.4.2.

Kvantitativna analiza sve četiri enzimske aktivne trake, slika 40, ukazuje na to da traka aktivna prema *LpNA* supstratu ima najveći intenzitet i stoga je *LpNA* najpogodniji supstrat. *ApNA* je manje efikasan supstrat, sa 64% od *LpNA* aktivnosti. *MpNA* i *KpNA* su još manje efikasni (36% i 16% od *LpNA* aktivnosti). Hidroliza *KpNA* je spora, ali ne bi trebalo da se zanemari jer kao što se sa zimograma vidi aktivnost LAP prema *KpNA* detektuje se ukoliko postoji dovoljno vremena za razvijanje žute boje u zimogramu.



Slika 40. Zimogram glavne izoforme LAP (nakon native PAGE) srednjeg creva *M. funereus* prema četiri različita supstrata: *LpNA*, *ApNA*, *MpNA* i *KpNA*. Brojevi predstavljaju aktivnost LAP (%) kvantifikovanu ImageJ-om. Najveća aktivnost (prema *LpNA*) je označena kao 100.

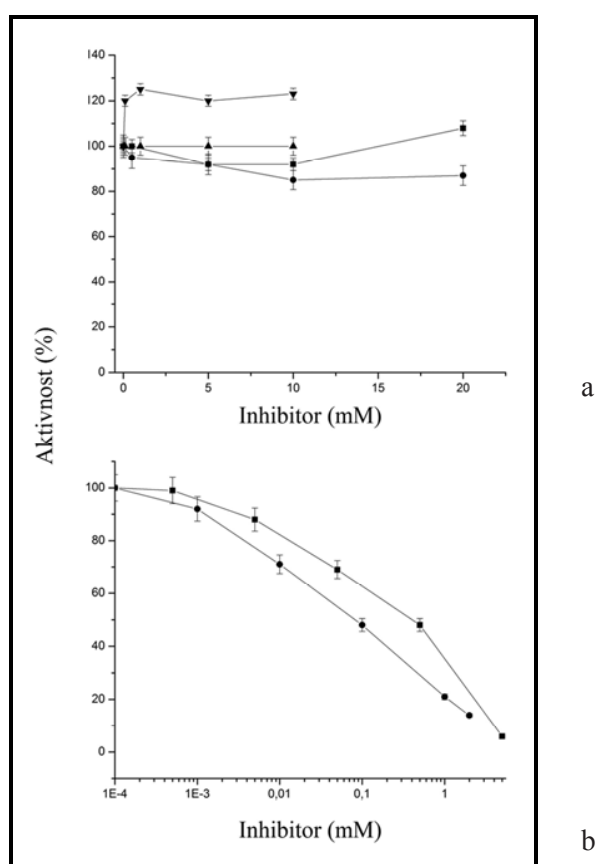
3.4.7 Ispitivanje dejstva inhibitora na LAP

Ispitivana se dejstva različitih agenasa (1,10-fenantrolin, EDTA, EGTA, cistein, citrat i imidazol) na LAP aktivnost. 1 μL prečišćenog enzima je preinkubiran sa različitim koncentracijama određenog inhibitora 10 minuta na 30°C pre dodatka *LpNA* (finalne koncentracije supstrata bile su u opsegu od 0,1 do 1 mM) u reakcionu smešu (3.4.3). Hidroliza supstrata praćena je na spektrofotometru na 410 nm u intervalima od 30 sekundi tokom 15 min na 30°C, slika 41. K_i , IC_{50} , K_M i V_{\max} vrednosti u prisustvu 1 mM 1,10-fenantrolina i 1 mM cisteina su dobijene korišćenjem GraphPad Prism 3.0 programa. Rezultati su prikazani u tabeli 8.

Tabela 8. Inhibicija glavne LAP izoforme srednjeg creva larvi *M. funereus*. Vrednosti su date kao srednja vrednost \pm standardna greška.

Inhibitor	K_M (mM)	V_{\max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	K_i (mM)	IC_{50} (mM)	Tip inhibicije
Cistein	0,35 \pm 0,09	1,91 \pm 0,20	0,31 \pm 0,07	0,47 \pm 0,09	Kompetitivna
1,10-fenantrolin	0,23 \pm 0,03	0,33 \pm 0,01	0,12 \pm 0,03	0,18 \pm 0,02	Nekompetitivna

Najefikasniji inhibitor LAP aktivnosti od testiranih inhibitora je 1,10-fenantrolin (K_i vrednost od 0,12 mM, IC_{50} vrednost od 0,18 mM) (slika 41, tabela 8). Cistein je takođe značajan inhibitor (K_i vrednost od 0,31 mM, IC_{50} vrednost od 0,47 mM). Natrijum citrat (10 mM i 20 mM) vrlo malo (oko 15%) inhibira LAP aktivnost. Imidazol (20 mM) aktivira LAP 8% dok EDTA nema efekta na aktivnost LAP. Međutim EGTA (0,1 mM – 10 mM) aktivira LAP preko 20%.



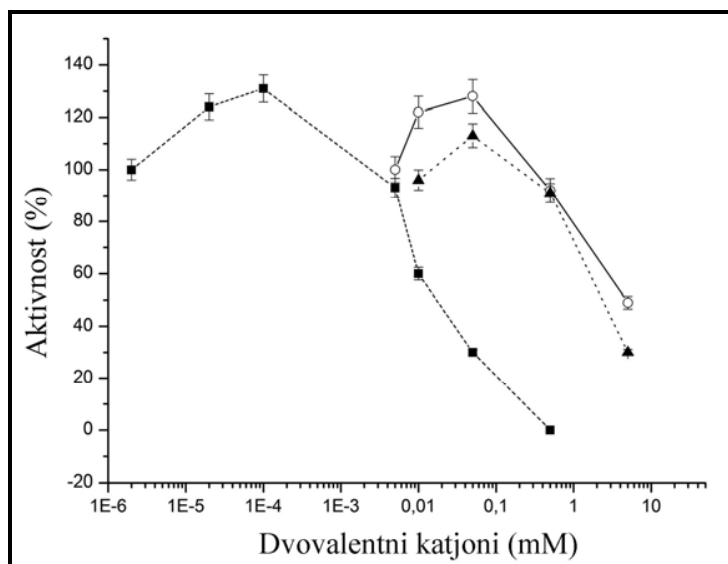
Slika 41. Efekti različitih jedinjenja na aktivnost glavne izoforme LAP *M. funereus*. a) ■ – imidazol; ● – citrat; ▲ – EDTA i ▼ – EGTA. b) Dozno-zavisna inhibicija: ■ – cistein i ● – 1,10-fenantrolin. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost tri različita merenja (standardne greške su bile manje od 5% od srednjih vrednosti).

Za razliku od naših ranijih podataka o delimično prečišćenoj LAP (113), a što je pak zajedničko s nekim LAP izolovanim iz insekata, prečišćena glavna izoforma *M. funereus* LAP je neosetljiva na dejstvo EDTA (104, 116, 137). Dokaz da je glavna izoforma LAP metalopeptidaza je inhibicija aktivnosti nakon inkubiranja sa helirajućim agensom 1,10-fenantrolinom. Ovaj agens inhibira LAP nekompetitivno, smanjujući mu V_{\max} prema LpNA kao supstratu i pri tom ne utičući na K_M vrednost. K_i vrednost od 0,12 mM i IC_{50} od 0,18 mM ukazuju na to da je 1,10-fenantrolin potentan inhibitor glavne izoforme LAP iz srednjeg creva *M. funereus*. IC_{50} od $2,3 \pm 0,5$ mM uočena je pri 1,10-fenantrolinom posredovanoj inhibiciji aminopeptidaze *Psoroptes spp.* (137), dok je LAP aktivnost srednjeg creva *S. littoralis* inhibirana 50% dodatkom 7 mM 1,10-fenantrolina (122). Cistein se pokazao kao takođe jak inhibitor sa K_i vrednošću 0,31 mM, i odgovarajućom IC_{50} vrednošću 0,47 mM. Cistein inhibira LAP kompetitivno tako što mu povećava K_M prema LpNA kao supstratu pri čemu ne utiče na V_{\max} vrednost. Pokazano je da 5 mM cistein inhibira 75% aktivnosti aminopeptidaze *S. littoralis* (122).

3.4.8 Ispitivanje dejstva dvovalentnih metalnih katjona na LAP

U ovim ispitivanjima su korišćeni $ZnSO_4$, $MgSO_4$ i $MnCl_2$ kao izvori dvovalentnih katjona. Različite koncentracije katjona su inkubirane sa 1 μ L prečišćenog enzima 10 minuta na 30°C pre dodatka LpNA u reakcionu smešu (3.4.3). Aktivnost LAP je praćena na 410 nm u intervalima od 30 sekundi, tokom 15 minuta na 30°C.

Prisustvo katjona (Zn^{2+} , Mg^{2+} i Mn^{2+}) ima bi-modularno dejstvo na aktivnost LAP, (LAP aktivnost raste pri niskim koncentracijama katjona a inhibira se pri većim koncentracijama katjona), slika 42. Zn^{2+} ima inhibitorno dejstvo pri koncentracijama preko 5 μ M. Nasuprot tome, 10 nM Zn^{2+} aktivira LAP preko 30%. 0,5 mM Zn^{2+} kompletno inhibira LAP. Mg^{2+} i Mn^{2+} pokazuju slične efekte, aktivatori su pri koncentracijama od 50 μ M a inhibitori pri koncentracijama od 0,5 mM. Mn^{2+} je efikasniji inhibitor od Mg^{2+} , dok je Mg^{2+} neznatno veći aktivator od Mn^{2+} kada se posmatraju iste koncentracije ova dva katjona.



Slika 42. Efekti metalnih divalentnih katjona na aktivnost glavne izoforme LAP *M. funereus*. (---■---) – Zn²⁺; (—○—) – Mg²⁺ i (- -▲ - -) – Mn²⁺. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost tri različita merenja (standardne greške su bile manje od 5% od srednjih vrednosti).

M17 familija Zn-zavisnih egzopeptidaza, kojoj pripadaju i leucil-aminopeptidaze, sadrži dva katalitička jona Zn²⁺ (57). Ova dva metalna jona u LAP pokazuju različito ponašanje pri izmenama: u mestu 1, Zn²⁺ se brzo izmenjuje sa drugim metalnim jonima uključujući Mn²⁺, Mg²⁺ i Co²⁺ (138, 139). Zamena Zn²⁺ za Mn²⁺ ili Mg²⁺ u mestu 1 aktivira LAP. Zn²⁺ u mestu 2 je mnogo čvršće vezan i može se izmeniti samo sa Co²⁺ (140). Aktivnost LAP srednjeg creva larvi *M. funereus* modulira se u prisustvu različitih Mn²⁺ i Mg²⁺ koncentracija, slično kao u slučaju citosolnih LAP krpelja (141) i šugarca (137). Veće koncentracije ovih jona (u odnosu na koncentraciju enzima u rastvoru) aktiviraju LAP iz *M. funereus* dok koncentracije iznad 1 mM smanjuju enzimsku aktivnost pokazujući na taj način bi-modularni efekat sličan onom koji ima Zn²⁺. Bi-modularni efekat Zn²⁺ uočen je i kod Zn²⁺-zavisne aminopeptidaze N iz srednjeg creva *Bombyx mori* (91). Visoke koncentracije Zn²⁺ (u mM opsegu) često inhibiraju metalopeptidaze zbog formiranja cink-monohidroksida koji premošćuje katalitički cinkov jon sa bočnim lancem u aktivnom mestu enzima (70).

3.4.9 ESI-MS/MS analiza

Proteinska traka koja odgovara LAP aktivnosti je isečena sa neredukujućeg SDS-PA gela i podvrgnuta tripsinizaciji u gelu (142). Dobijeni peptidi su prečišćeni i koncentrovani korišćenjem C₁₈ ZipTips matriksa (Millipore, Billerica, MA, USA) prema instrukcijama proizvođača. Peptidi su eluirani u 3,5 µL smeše acetonitril/voda (1:1) koja je sadržavala i 0,1% mravlje kiseline, a zatim analizirani korišćenjem ESI-MS/MS na Q-TOF ultima API masenom spektrometru (Micromass, Manchester, UK). Podaci o jonskim fragmentima dobijeni su pomoću nanoprotlačnog elektrospreja uz argon kao kolizionni gas. MS/MS spektri su procesovani MaxEnt 3 (MassLynx 4,0) da bi se dobila lista pikova, a zatim su analizirani korišćenjem PepSeq (MassLynx 4,0) manualnim modulom. Dobijene peptidne sekvencije date su u tabeli 9.

3.4.10 Analiza sekvencija

Poređenje dobijenih peptidnih sekvencija sa amino kiselinama aminopeptidaza raznih predstavnika insekata, korišćenjem BLASTP baze podataka (143) pokazalo je da između njih postoji visok stepen identičnosti, tabela 9.

EMBOSS algoritam (144) slaganja parova je korišćen za poređenje svih 6 dobijenih peptidnih sekvencija sa aminokiselinskim sekvencijama aminopeptidaza nekih pripadnika reda Coleoptera, tabela 10. Kompletna sekvencija aminopeptidaza *Tribolium castaneum* i *Tenebrio molitor* postoji u BLAST databazi (143), a sekvencija *T. castaneum* aminopeptidazi sličnoj LAP pronađena je u bazi UniProt (145). Slični regioni celokupne sekvencije ove tri aminopeptidaze su poređeni sa svih 6 dobijenih peptida aminopeptidaze *M. funereus*. Procenti sličnosti su sastavni deo informacija koje se dobijaju korišćenjem EMBOSS algoritma, gde je u obzir uzeto slaganje sličnih amino-kiselina npr. leucin/metionin, tirozin/fenilalanin ili glutaminska kiselina/asparaginska kiselina.

Pronađena je velika sličnost sa aminopeptidazama N vrsta *Tribolium castaneum* i *Tenebrio molitor* a nešto manja sličnost uočena je sa citosolnim aminopeptidazama (sličnim LAP) vrste *T. castaneum*.

Može se reći da postoji velika sličnost peptidnih sekvencija LAP sa amino kiselinama aminopeptidaza drugih insekata i visok stepen sličnosti sa sekvencijama aminopeptidaza *T. castaneum* i *T. molitor*. *M. funereus* LAP ima identične amino-

kiselinske sekvencije kako sa citosolnom LAP (3.4.11.1), tako i sa membranskom aminopeptidazom N (3.4.11.2). Kompletna amino-kiselinska sekvencija omogućíće detaljniju analizu veza između strukture i funkcije enzima, a takođe i bolji uvid u polifagnu prirodu *M. funereus*.

Tabela 9. Slaganje peptida glavne LAP izoforme srednjeg creva larvi *M. funereus* sa aminokiselinskim sekvencijama aminopeptidaza nekih predstavnika insekata.

Izvori enzima	Enzimi	Peptidi	Identičnost (%)
<i>Morimus funereus</i>	Leucil-aminopeptidaza	AQITDDVL	100
<i>Helicoverpa armigera</i>	Aminopeptidaza APN1	AQIVDDVM	75
<i>Bombyx mori</i>	Aminopeptidaza N	AQIVNDVL	75
<i>Lymantria dispar</i>	Aminopeptidaza N4	AQIIDDVF	75
<i>Spodoptera exigua</i>	Aminopeptidaza N4	AQIVNDVL	75
<i>Plutella xylostella</i>	Aminopeptidaza N2	AQIVDDVF	75
<i>Morimus funereus</i>	Leucil-aminopeptidaza	LLTTQFE	100
<i>Aedes aegypti</i>	Aminopeptidaza N	IATTQFE	86
<i>Helicoverpa armigera</i>	Aminopeptidaza N1	MATTQFQ	57
<i>Bombyx mori</i>	Aminopeptidaza N	YATTQFQ	57
<i>Spodoptera exigua</i>	Aminopeptidaza N	MATTQFQ	57
<i>Morimus funereus</i>	Leucil-aminopeptidaza	GNNLVVTQQR	100
<i>Helicoverpa armigera</i>	Aminopeptidaza N4	GNN-VVT	86
<i>Spodoptera litura</i>	Aminopeptidaza N	IVVEQKR	71
<i>Plodia interpunctella</i>	Aminopeptidaza	NNVVPQ	71
<i>Plutella xylostella</i>	Aminopeptidaza N4	GGFPVTVRR	50
<i>Manduca sexta</i>	Aminopeptidaza N	GGFPVLTVRR	40
<i>Morimus funereus</i>	Leucil-aminopeptidaza	AENYLVTLK	100
<i>Apis mellifera</i>	Slična leucil-aminopeptidazi	ALKILVTLM	56
<i>Plodia interpunctella</i>	Aminopeptidaza	EENYLIRRQ	55
<i>Aedes aegypti</i>	Aminopeptidaza N	LENYLQVKY	44
<i>Morimus funereus</i>	Leucil-aminopeptidaza	SSYTTEWT	100
<i>Aedes aegypti</i>	Xaa-pro aminopeptidaza	EAETTEWN	50
<i>Plutella xylostella</i>	Aminopeptidaza N	SSYTLATD	50
<i>Aedes aegypti</i>	Aminopeptidaza N	SSYTDARG	50
<i>Helicoverpa armigera</i>	Aminopeptidaza APN2	SSYTSVKK	50

Masna slova označavaju identične amino kiseline, a italik slova označavaju nesigurne amino kiseline L/I, F/M i K/Q.

Tabela 10. Slaganje peptida glavne LAP izoforme srednjeg creva larvi *M. funereus* sa aminokiselinskim sekvencijama aminopeptidaza nekih predstavnika Coleoptera.

Izvori enzima	Peptidi	I (%)	S (%)	Peptidi	I (%)	S (%)
<i>M. funereus</i> LAP	SSYTTEWT			<u>Q</u> VGNNL <u>V</u> VT <u>Q</u> OR		
<i>T. castaneum</i> APN	⁹³¹ SSITTEST ⁹³⁸	75	75	³⁷⁹ ELDKQFVV TQVQ ³⁸⁸	33	50
<i>T. molitor</i> APN	³⁴⁹ DLVTTK WW ³⁵⁶	38	50	⁵⁰³ RNGDDVV VTQER ⁵¹²	50	83
<i>T. castaneum</i> sličan LAP	³⁰⁸ ANF SPKWV ³¹⁵	13	75	¹⁷⁶ KMG AFLAVAQGS ¹⁸⁷	25	42
<i>M. funereus</i> LAP	AQITDDVLE YAK			<u>G</u> LL <u>T</u> T <u>Q</u> F <u>E</u> CF <u>R</u> R		
<i>T. castaneum</i> APN	⁶⁰⁷ AQIVDD YYN F AK ⁶¹⁸	58	67	¹⁵⁶ FLGTTQ FQPTSA ¹⁶⁷	42	50
<i>T. molitor</i> APN	⁶⁰⁸ AQIVDD YYN F AR ⁶¹⁹	50	67	¹⁵⁸ YLGTTQ FQPTHA ¹⁶⁹	42	50
<i>T. castaneum</i> sličan LAP	³⁶⁹ KQ MTD N AAYDVN ³⁸⁰	25	42	⁸⁸ KL ATWKFQDFKT ⁹⁹	33	50
<i>M. funereus</i> LAP	AENYL VTLK			<u>E</u> LWD <u>Y</u> L <u>E</u> PV <u>S</u> I <u>E</u> R		
<i>T. castaneum</i> APN	³²⁴ SNSYLQ S I K ³³²	33	78	⁸⁷ TL TNLLVPVEIEN ⁹⁹	46	54
<i>T. molitor</i> APN	³⁰⁶ MEN WL I TYR ³¹⁵	44	78	³¹⁹ LL WD P LE--SSNR ³²⁹	54	54
<i>T. castaneum</i> sličan LAP	¹⁵⁰ AER ALELSK ¹⁵⁹	44	44	³⁸ K PSDELELISEER ⁵⁰	46	62

I = identičnost; S = sličnost; masna slova označavaju identične amino-kiseline, a italik slova označavaju slične amino-kiseline amino-kiselinama peptida glavne LAP izoforme srednjeg creva larvi *M. funereus*; podvučena slova označavaju nesigurne amino kiseline L/I, F/M i K/Q.

Ranije je pomenuto da se druge izoforme ne vide na zimogramu nakon SDS-PAG elektroforeze. To potvrđuje kompleksnu prirodu LAP izoformi koje su prisutne u srednjem crevu larvi *M. funereus*. Izoforme mogu nastati tokom post-translacionih modifikacija (na primer, različito glikozilovanje) ili usled postojanja multigenih familija. Multiple izoforme povećavaju sposobnost adaptacije na različite izvore hrane i omogućavaju prevazilaženje aktivnosti biljnih inhibitira peptidaza (107). Stoga, postojanje višestrukih enzimskih izoformi kod larvi *M. funereus* može poslužiti kao objašnjenje njegove polifagne prirode.

Slobodne aminopeptidaze su lokalizovane npr. u citosolu humanih eritrocita. S druge strane, malo se zna o slobodnim aminopeptidazama u intestinalnim lumenima (107). Kod većine do sada proučavanih insekata, aminopeptidaze su lokalizovane

unutar apikalnog epitela membrane srednjeg creva, za koju su vezane preko glikozilfosfatidilinozitolnog sidra (96).

Glavna izoforma LAP prisutna u rastvornoj frakciji ekstrakta srednjeg creva larvi *M. funereus* pokazuje mnoge osobine tipične za citosolnu LAP (EC 3.4.11.1). Ovo je važno imajući u vidu činjenicu da se kod insekata glavne količine citosolne aminopeptidaze mogu naći uglavnom kod evolutivno nižih insekata Adepthaga (npr. Orthoptera, Hemiptera, Coleoptera), dok se kod evolutivno viših insekata Polyphaga (npr. Coleoptera, Diptera i Lepidoptera) aminopeptidaze nalaze uglavnom vezane za mikrovilarnu membranu ćelija srednjeg creva (106).

Činjenica da se insekatske aminopeptidaze razlikuju od sisarskih u smislu supstratne specifičnosti i ponašanja prema inhibitorima opravdava potrebu izučavanja osobina specifičnih digestivnih enzima insekata. Dalje izučavanje digestivnih enzima larvi *M. funereus*, sa posebnim akcentom na kompartmentalizaciji enzima, supstratnoj specifičnosti i preferiranju supstrata, računajući tu i prirodne, produbiće naša saznanja o digestivnom procesu ove polifagne cerambicidne vrste, a time i o opštoj biohemiji razvića.

3.5 Zaključci

- Utvrđeno je da pH vrednosti prednjeg, srednjeg i zadnjeg dela srednjeg creva larvi *M. funereus* iznose redom: 5,5–6,0, 8,0–8,5 i 8,5–9,0 a da se LAP detektuje duž celog srednjeg creva pa da za homogenizaciju creva u cilju izolovanja LAP treba uzimati cela srednja creva.
- Razvijena je nova procedura vizualizacije LAP i sličnih enzima na gelu korišćenjem LpNA odnosno supstrata pNA tipa, koja daje ljubičasti proizvod, dovoljno dugo stabilan za kvantitativnu obradu rezultata. Zimogramskom procedurom enzimi se detektuju *in situ*, čime se detektuju sve prisutne izoforme. Utvrđena je linearnost, osetljivost i reproduktivnost zimogramske metode.
- Razdvajanjem izoformi LAP sirovog ekstrakta srednjeg creva larvi *M. funereus* donetih iz prirode na 6% PA gelu detektuje se sedam izoformi, a razdvajanjem izoformi LAP sirovog ekstrakta srednjeg creva larvi *M. funereus* gajenih u laboratoriji od jaja detektuju se 4 izoforme LAP.
- Razdvajanje izoformi LAP kod *M. funereus* LAP je postignuto nakon što je sirovi ekstrakt razdvojen preparativnom nativnom elektroforezom, a zatim je glavna izoforma eluirana iz gela i prečišćena gel-hromatografijom na Superose 6 FPLC koloni. Po ovoj proceduri glavna izoforma LAP je homogena prema SDS-PAGE i zimogramskom određivanju aktivnosti u gelu.
- Prema SDS-PAGE i gel-hromatografiji na Superose 6 FPLC koloni glavni *M. funereus* LAP je heksamer, mase subjedinice 67 kDa, ukupne mase 400 kDa.
- Određena je pI vrednost od 6,2, izoelektričnim fokusiranjem.
- Određen je pH optimum glavne izoforme LAP koji iznosi od 7,0–8,5 sa maksimumom na pH 7,5.
- Utvrđena je specifičnost prema supstratima i ona je data nizom: LpNA > MpNA > ApNA > KpNA. Kvantitativnom analizom nakon zimogramske detekcije potvrđeno je da je LpNA najpogodniji supstrat.
- Najefikasniji inhibitor LAP aktivnosti od testiranih inhibitora je 1,10-fenantrolin, koji inhibira LAP nekompetitivno, dok je cistein značajan kompetitivni inhibitor. Natrijum citrat vrlo malo inhibira LAP aktivnost,

imidazol slabo aktivira LAP, a EGTA aktivira LAP preko 20%, dok EDTA nema efekta na aktivnost LAP.

- Prisustvo katjona (Zn^{2+} , Mg^{2+} i Mn^{2+}) ima bi-modularno dejstvo na aktivnost LAP (LAP aktivnost raste pri niskim koncentracijama katjona a inhibira se pri većim koncentracijama katjona).
- Postoji velika sličnost peptidnih sekvencija LAP sa sekvencijama amino-kiselina aminopeptidaza drugih insekata i visok stepen sličnosti sa sekvencijama aminopeptidaza *T. castaneum* i *T. molitor*. *M. funereus* LAP ima identične amino-kiselinske sekvencije kako sa citosolnom LAP (3.4.11.1) tako i sa membranskom aminopeptidazom N (3.4.11.2).
- Glavna izoforma LAP prisutna u solubilnoj frakciji ekstrakta srednjeg creva larvi *M. funereus* pokazuje mnoge osobine tipične za citosolnu LAP (EC 3.4.11.1).
- Glavna izoforma LAP se jedina renaturiše u zimogramu nakon SDS-PAG elektroforeze. To potvrđuje kompleksnu prirodu LAP izoformi koje su prisutne u srednjem crevu larvi *M. funereus*.
- Rezultati ovog rada (146) kao i neki naši prethodni rezultati navode na zaključak da insekti imaju ceo pul digestivnih enzima, ali da od korišćene hrane zavisi njihov relativni odnos.

4. Eksperimentalni deo

Spisak glavne korišćene opreme

Q-TOF ultima API maseni spektrometar, Micromass

FPLC sistem Pharmacia LCC501-plus

Tehnička vaga Mettler PE 3600

Analitička vaga Mettler

Kada za horizontalnu elektroforezu Pharmacia FBE-3000

Ispravljač Pharmacia ECPS 2000/300

Protočni vodeni termostat Multitemp 2209 LKB, Bromma

Vertikalna mini kada domaće izrade

Kada za horizontalnu elektroforezu Pharmacia LKB Multiphor II

Ispravljač Pharmacia Biotech, EPS 3500

Protočni vodeni termostat Pharmacia Biotech, Multitemp III

Magnetna mešalica IKA Mag Rec G

Vibraciona mešalica Tehnica EV -100

Pisač Pharmacia, model 481

UV ćelija 2238 Uvicord S II, LKB

Kolektor 2112 Redirac LKB

Kolona 1,6 x 60 cm LKB

Spektrofotometar UV-VIS-NIR PU 8630 Philips

pH metar Checker s kombinovanom elektrodom

Konduktometar WTW LF521, inoLab

Mikrotalasna pećnica, Samsung

Centrifuga Tehnica LO-72

Centrifuga, miniSpin plus, Eppendorf

Sušnica Sutjeska

4.1 Eksperimenti sa larvama

4.1.1 Gajenje larvi *M. funereus*

Adulti *M. funereus* su gajeni u plastičnim kutijama sa otvorom za vazduh i hrastovim grančicama i korom kao glavnim izvorom hranljivih sastojaka. Kutije su držane u konstantnim laboratorijskim uslovima, na 23°C. Jaja su odmah po izleganju prebacivana na Petrijeve šolje sa veštačkom dijetom koja predstavlja modifikaciju Robertsonove dijete za gajenje voćne mušice.

Sastav podloge:

Kukuruzno brašno	40 g
Agar	4 g
Suvi kvasac	10 g
Šećer	10 g
Voda	400 mL
Nipagin u etanolu (0,2 g/mL)	5 mL

Podloga se priprema tako što se sve supstancije odmere, pomešaju i skuvaju kao kačamak, a kada se malo prohladi i pre nego što se zgusne dodaje se nipagin. Zatim se podloga razlije u kutije za gajenje larvi i kada se ohladi skroz očvrstne. Tokom gajenja, podloge se zamenjuju svežim jednom nedeljno.

Larve su gajene do petog ili šestog larvenog stupnja u zavisnosti od postignute telesne mase (preko 2,0 g). Broj larvenog stupnja određen je brojem presvlačenja larve, kada larva odbacuje košuljicu i mandibule i zamenjuje ih novim. 11 larvi je od piljenja do žrtvovanja (prosečno 3 meseca) gajeno u laboratoriji na ovaj način.

Larve *M. funereus* su od prikupljanja u prirodi (23.11.2002. i 29.11.2002) gajene u laboratoriji na prirodnom supstratu (hrast), na sobnoj temperaturi u uslovima koji simuliraju prirodne, a nekoliko je zatim prebačeno i do žrtvovanja (mesec dana) odgajeno na veštačkoj dijeti.

4.1.2 Priprema sirovog ekstrakta srednjeg creva larvi *M. funereus*

Nakon dekapitacije, srednja creva su disekovana na ledu, a zatim homogenizovana u ohlađenom avanu sa tučkom, 0,9%-nim natrijum hloridom u 20 mM acetatnom puferu pH 6,0 (1:2), uz dodatak silika gela (0,3:1). Pufer je pripremljen na sledeći način:

20 mM Acetatni pufer pH 6,0:

Glacijalna sirćetna kiselina	1,14 mL
destilovana voda do	1 L

Podušeno pH na 6,0 1 M NaOH.

Nakon homogenizacije, homogenati su dodatno ekstrahovani 90 minuta u frižideru, a nakon toga centrifugirani 10 minuta na 10 000 x g. Dobijeni ekstrakti su zatim odmaščeni dodatkom jednake zapremine CCl₄ i centrifugiranjem na 5 000 x g, 2 minuta. Odmaščivanje je ponovljano tri puta, a dobijeni bistri supernatanti su odvađeni i čuvani na -20°C do upotrebe.

Creva larvi gajenih od piljenja u laboratoriji su homogenizovana na isti način i ekstrakt je za dalji rad pripremljen na isti način. Odnos tkiva, silika-gela i pufera za homogenizaciju je bio 1,41g : 0,5g : 7,0 mL.

4.1.3 Određivanje pH vrednosti lumena creva

Prilikom žrtvovanja, tri različita srednja creva su podeljena na tri jednaka dela. Sadržaj lumena svakog dela je isceden na univerzalne test tračice za određivanje pH. Korišćene su Merck-ove univerzalne indikator tračice pH 0–14 i prokuvana destilovana voda kojom je potpomognuto razmazivanje sadržaja creva po tračici.

4.1.4 Određivanje koncentracije proteina po Bradford-u

Potrebni rastvori:

1. Koncentrovana boja, Coomassie brilliant blue G-250 (CBB G-250)

CBB G-250	100 mg
95% etanol	50 mL
H ₃ PO ₄	100 mL
destilovana voda do	200 mL

Boja se rastvori u etanolu, pa se dodaju redom kiselina i voda do finalne zapremine.

2. Rastvor BSA za standardnu krivu u opsegu 20 do 150 µg u 100 µL, odnosno 0,2 do 1,5 mg/mL. Za standardnu krivu i za uzorak se koristi isti pufer, npr. PBS.

BSA (1mg/mL) (µL)	dest. voda (µL)	finalna zapremina (µL)	BR (mL)	finalna konc. µg/mL	koncentracija µg/0,1 mL
10	90	100	5	100	10
20	80	100	5	200	20
30	70	100	5	300	30
40	60	100	5	400	40
50	50	100	5	500	50
60	40	100	5	600	60
70	30	100	5	700	70
80	20	100	5	800	80
90	10	100	5	900	90
100	-	100	5	1 000	100
-	100	100	5	-	- ¹

¹ Slepa proba, BR-Bradford-ov reagens.

3. Bradford-ov reagens.

Potrebni rastvori:

rastvor 1	100 mL
destilovana voda do	500 mL

Sveže procedeni rastvor je stabilan 2 – 3 nedelje na sobnoj temperaturi.

Postupak:

1. U 100 μ L rastvora (uzorak + pufer) dodaje se 5 mL razblaženog rastvora boje.
2. Promeša se na vibracionoj mešalici (vortex-u).
3. Nakon 5 minuta meri se apsorbancija na 595 nm. Uzorcima se meri apsorbancija u toku 30 minuta, ali ne u kvarcnim kivetama.

4.1.5 Određivanje leucil-aminopeptidazne aktivnosti

Za određivanje aktivnosti LAP je korišćen supstrat leucin-*p*-nitroanilid (1 mg u 75 μ L formamida) finalne koncentracije 1 mM u reakcionoj smeši. Aktivnost je određivana u 50 mM Tris-HCl puferu pH 7,5 ili 50 mM HEPES puferu pH 7,5 na optimalnom pH za leucil-aminopeptidazu. Enzim i supstrat su termostatirani odvojeno 10 minuta, a zatim pomešani. Reakcije su trajale 10 minuta nakon čega su prekidane dodatkom 30%-ne sirćetne kiseline. Apsorbancija je merena na 410 nm. Puferi su pripremljeni na sledeći način:

50 mM Tris-HCl pH 7,5:

Tris	6,05 g
destilovana voda do	1 L

Podušeno pH na 7,5 1 M HCl.

50 mM HEPES pH 7,5:

HEPES	11,92 g
destilovana voda do	1 L

Podušeno pH na 7,5 1 M HCl.

4.2 Zimogramska detekcija LAP

4.2.1 Priprema enzimskih ekstrakata

Pasulj (*Phaseolus vulgaris*) i bubreg svinje su nabavljeni u lokalnim prodavnicama. Materijali su homogenizovani u ohlađenom avanu u 4 zapremine (mL/g) ohlađenog 0,9% NaCl i 50 mM acetatnom puferu, pH 6,0. Pufer je pripremljen na sledeći način:

50 mM acetatni pufer pH 6,0:

Glacijalna sirćetna kiselina	2,86 mL
destilovana voda do	1 L

Podušeno pH na 6,0 1 M NaOH.

Homogenati su centrifugirani 5 minuta na 5 000 x g, a lipidi su uklonjeni kombinovanjem rezultujućih supernatanata sa jednakim zapreminama CCl₄, nakon čega su centrifugirani 2 minuta na 5 000 x g.

4.2.2 Nativna PAGE

Potrebni rastvori, način pripreme rastvora i tok rada

1. Monomerni rastvor (30% T², 2,7% C). Oznaka ovog rastvora u tablici je AA.

akrilamid	58,4 g
bisakrilamid	1,6 g
destilovana voda do	200,0 mL

2. Pufer za razdvajajući gel, (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8). Oznaka u tablici je Tris pH 8,8.

Tris	36,30 g
destilovana voda do	200,00 mL
4 M HCl do	pH 8,8

² T je g akrilamida + g bisakrilamida u 100 mL rastvora, C je g bisakrilamida u odnosu na zbiru masu akrilamida i bisakrilamida. Obe vrednosti se izražavaju u procentima.

3. Pufer za koncentrujući gel, (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8). Oznaka ovog rastvora u tablici je Tris pH 6,8.

Tris	6,0 g
destilovana voda do	100,0 mL
4 M HCl do	pH 6,8

4. Inicijator (amonijum-persulfat) 10% m/V. Oznaka ovog rastvora u tablici je APS.

APS	0,2 g
destilovana voda do	2,0 mL

5. Rastvor za nadslojavanje (2-butanol ili *n*-butanol zasićen vodom).

<i>n</i> -butanol ili 2-butanol	100 mL
destilovana voda	do postojanog donjeg sloja vode

Rastvor se pre upotrebe promućka i ostavi da se slojevi razdvoje. Koristi se gornji sloj.

6. Pufer za obradu uzoraka (PUZ)

rastvori za PUZ	za 25 mL, 3X ³
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	9,38 mL
99% glicerol	7,5 mL
ili 85% glicerol	9,0 mL
0,1% bromfenol-plavo	1,5 mL
destilovana voda do	25,0 mL

Priprema uzoraka:

Uzorci se mešaju sa puferom za uzorke (PUZ) u odnosu 2:1.

³Za razblažene uzorke.

7. Pufer za elektroforezu (0,025 M Tris, 0,192 M glicin, pH 8,3), radni pufer i 10 puta koncentrovaniji pufer, koji se do upotrebe čuva zamrznut.

komponente	1 x	10 x
Tris	3,0 g	30 g
glicin	14,4 g	144 g
destilovana voda do	1,0 L	1,0 L

8. Rastvor za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje (50% (V/V) metanol, 10% (V/V) sirćetna kiselina)

metanol	500 mL
sirćetna kiselina	100 mL
destilovana voda do	1L

9. Rastvor boje (0,1% (m/V) CBB , 50% (V/V) metanol, 10% (V/V) sirćetna kiselina).

CBB G ili R 250	0,5 g
rastvor 8 do	500,0 mL

10. Rastvor za obezbojavanje (5% (V/V) metanol, 7% (V/V) sirćetna kiselina).

metanol	50 mL
sirćetna kiselina	70 mL
destilovana voda do	1 L

Priprema gela i postupak:

Dezaerisani rastvor gela za razdvajanje se sipa između ploča. Nakon sipanja rastvora za gel površina se nadsloji rastvorom 5 ili vodom. Kada je polimerizacija donjeg gela završena sipa se dezaerisani rastvor za koncentrujući gel. U rastvor se stavi "češalj".

Kada je polimerizacija gornjeg gela završena, izvadi se češalj, a nastali "bunarčići" se operu i u njih unesu uzorci. Voltaža je konstantna (80 V) dok uzorci uđu u gel za razdvajanje, a povišava se od 150 do 400 V do kraja rada ili se sve vreme drži konstantna struja od 12 mA kroz koncentrujući gel i 25 mA kroz razdvajajući gel.

Nakon završene elektroforeze, deo gela se boji da bi se detektovali proteini, a drugi deo se podvrgava zimogramskoj detekciji, da bi se detektovao LAP.

rastvori	gel za razdvajanje (10%)	gel za koncentrovanje (4%)
AA	3,33	0,66
Tris pH 8,8	2,5	-
Tris pH 6,8	-	1,25
destilovana voda	4,0	3,0
temed	0,004	0,005
dezaeracija 5– 10 minuta		
APS	0,05	0,025
finalna zapremina	10,0 mL	5,0 mL

Detekcija CBB-om R 250

Postupak bojenja rastvorom 9 za gel debljine 1 mm prikazan je niže, uz napomenu da se sve faze izuzev fiksiranja mogu smanjiti na polovinu kada se radi sa gelom debljine 0,75 mm.

faza	rastvor	vreme (min)
ispiranje	dest. voda	1
fiksiranje	12	20
bojenje	13	20
obezbojavanje	12	20
obezbojavanje	14	preko noći

Alternativno, gel se može nakon fiksiranja bojiti 0,005%-nim rastvorom CBB-a u 7%-noj sirćetnoj kiselini preko noći. U ovom slučaju obezbojavanje nije potrebno.

4.2.3 Detekcija aktivnosti LAP na gelu nakon native PAGE

Potrebni rastvori:

1. 50 mM Tris-HCl pufer pH 8,0

Tris	6,05 g
destilovana voda do	1 L

Podešeno pH na 8,0 1 M HCl.

2. Rastvor supstrata LpNA

LpNA-HCl	5 mg
rastvor 1	30,0 mL

3. Rastvor azotaste kiseline

NaNO ₂	30 mg
1 M HCl	30,0 mL

Rastvor se pravi neposredno pre upotrebe.

4. Rastvor uree (1%)

urea	0,3 g
destilovana voda do	30,0 mL

5. Reagens za razvijanje boje

1-naftilamin	7 mg
etanol	6,6 mL
destilovana voda do	30,0 mL

Tok rada:

faza	rastvor	vreme (min)
ispiranje	dest. voda	2x5
pufisanje	1	2x5
izlaganje supstratu	2	10
diazotovanje	3	2
prekidanje	4	0,5
razvijanje boje	5	2–5

Između svake faze gel se kratko ispira vodom.

4.2.4 Određivanje linearnosti, osetljivosti i reproduktivnosti detekcije aktivnosti LAP na gelu nakon native PAGE

4.2.4.1 Priprema delimično prečišćene LAP iz kotiledona pasulja i detekcija aktivnosti na gelu nakon native PAGE

Zrna pasulja (100 g) su potopljena u destilovanu vodu i nakon što su ovlašeni tegumenti odstranjeni, homogenizovana u ohlađenom avanu s tučkom u 2 zapremine (mL/g) ohlađenog 15 mM Tris-HCl pufera, pH 7,5. Pufer je pripremljen na sledeći način:

15 mM Tris-HCl pufer pH 7,5:

Tris	1,8 g
destilovana voda do	1 L

Podušeno pH na 7,5 1 M HCl.

Sirovi ekstrakt je centrifugiran 10 minuta na 10 000 x g. Supernatant je nanet na hromatografsku kolonu DEAE Sepharose, ekvilibrisanu u 15 mM Tris-HCl puferu, pH 7,5. Nevezani proteini su isprani sa kolone startnim puferom. LAP je eluiran povećanjem jonske sile pufera, dodatkom 1M NaCl u 15 mM Tris-HCl, pH 7,5.

Frakcije u kojima je detektovana LAP aktivnost su spojene, a so je udaljena dijafiltracijom korišćenjem Amicon P10 membrana.

4.2.4.2 Analiza slika gelova

Analiza slika skeniranih gelova urađena je ImageJ programom. Program je korišćen za merenja površine tj. za relativni integralni intenzitet. Gelovi su skenirani na Mustek BearPaw 2448TA Plus flatbed skeneru pri rezoluciji od 600 dpi. Za ispitivanje linearnosti, osetljivosti i reproduktivnosti metode više istih gelova kao i gelova sa rastućom koncentracijom enzima je skenirano i obrađeno ImageJ programom.

4.2.4.3 Linearnost, osetljivost i reproduktivnost zimogramske detekcije LAP

Serijska dvostruka razblaženja LAP iz kotiledona pasulja su napravljena sa puferom za uzorke (rastvor 6, odeljak 4.2.2), naneta na nativnu PAGE i detektovana prethodno opisanom zimogramskom metodom, odeljak 4.2.3.

4.2.5 Zimogramska detekcija LAP izoformi iz kotiledona pasulja korišćenjem različitih aminoacil-*p*-nitroanilida

Procedura detekcije LAP izoformi opisana u odeljku 4.2.3, je ponovljena sa metionil-*p*-nitroanilidom (MpNA) kao supstratom i lizil-*p*-nitroanilidom (KpNA) kao supstratom.

Po 10 mU LAP iz kotiledona pasulja određeno prema LpNA naneto je u tri bunara elektroforetskog gela, a nakon završene elektroforeze enzimi su detektovani na način opisan u odeljku 4.2.3, Slika. Gel je zatim analiziran ImageJ programom da bi se kvantitativno uporedile dobijene izoforme različite specifičnosti.

4.2.6 Zimogramska detekcija elastazi sličnih izoformi iz srednjeg creva larvi *M. funereus*

Procedura detekcije LAP izoformi opisana u odeljku 4.2.3, je ponovljena sa sukcinil-alanil-alanil-*p*-nitroanilidom (SA₂pNA) kao supstratom za elastazi slične

enzime. Uzorak je bio sirovi ekstrakt E, kome je enzimska aktivnost detektovana nakon razdvajanja u nativnoj PAGE.

4.3 Detekcija izoformi i prečišćavanje glavne LAP

4.3.1 Gel-hromatografsko frakcionisanje proteina srednjeg creva larvi *M. funereus*

Sephadex G-100 i G-200 su pripremljeni na sledeći način: po 10 g praškastog gela ostavljeno je preko noći da bubri u 300 mL 0,15 M NaCl u 20 mM acetatnom puferu pH 6,0 na 37°C. Pufer je pripremljen na sledeći način:

20 mM acetatni pufer pH 6,0:

glacijalna sirćetna kiselina	1,14 mL
NaCl	9 g
destilovana voda do	1 L

Podušeno pH na 6,0 1 M NaOH.

Posle bubrenja gelovi su dezaerisani 30 minuta i sipani u kolone. Kolone su ekvilibrisane preko noći prethodno dezaerisanim puferom 0,15 M NaCl u 20 mM acetatnom puferu pH 6,0. Hidrostatički pritisak je bio 12–20 cm. V_0 kolone određene su propuštanjem 0,01%-nog rastvora plavog dekstrana kroz kolonu. Kolona koja je korišćena tokom izrade ovog rada bila je dimenzija 1,6 x 60 cm. U cilju određivanja molekulskih masa kolona je kalibrisana standardnim molekulskim markerima: lizozimom (14,4 kDa), β -laktoglobulinom (36 kDa) i goveđim serum-albuminom (67 kDa). Na kolonu je naneto 2 mL E ekstrakata creva larvi *M. funereus*, odnosno 26,7 mg/mL proteina. Kolona je eluirana 0,15 M NaCl u 20 mM acetatnom puferu pH 6,0 pri konstatnom protoku na sobnoj temperaturi. Sakupljane su frakcije od 1,5 mL kojima je merena apsorbancija na 280 nm.

Frakcije su testirane na aktivnost LAP, a one u kojima je enzim detektovan su analizirane nativnom elektroforezom (odjeljak 4.2.2) i zimogramskom detekcijom (odjeljak 4.2.3).

4.3.2 Hidrofobna hromatografija proteina srednjeg creva larvi *M. funereus*

Kolona napakovana Phenyl Sepharose-om je ekvilibrisana u 2M NaCl, a proteini iz uzoraka (prethodno pomešanih sa 4M NaCl, 1:1) su eluirani smanjenjem jonske sile pufera (povećanjem udela vode u njemu), a zatim vodom i na kraju 50% etilenglikolom. Frakcije su testirane na aktivnost LAP, a one u kojima je enzim detektovan su analizirane nativnom elektroforezom (odjeljak 4.2.2) i zimogramskom detekcijom (odjeljak 4.2.3).

4.3.3 Rehromatografija frakcija sa LAP aktivnošću spojenih nakon različitih gel-hromatografija na Sephadex G-200

Nanet je uzorak delimično prečišćenog LAP dobijen spajanjem frakcija u kojima je detektovana LAP aktivnost nakon prethodno opisane 4 različite gel hromatografije. Rehromatografisanje je urađeno pri istim uslovima kao u odeljku 4.3.1. Frakcije su testirane na aktivnost LAP, a one u kojima je enzim detektovan su analizirane nativnom elektroforezom (odjeljak 4.2.2) i zimogramskom detekcijom (odjeljak 4.2.3).

4.3.4 SDS-PAGE frakcija sa LAP aktivnošću nakon rehromatografije na Sephadex G-200

Potrebni rastvori, način pripreme rastvora i tok rada:

Potrebni rastvori su isti kao za nativnu elektroforezu (odjeljak 4.2.2) uz dodatak rastvora detergenta koji se priprema na sledeći način:

1. Rastvor detergenta 10% (m/V) SDS (natrijum-dodecilsulfat).

SDS	10,0 g
destilovana voda do	100,0 mL

Puferi koji se razlikuju od onih za nativnu elektroforezu pripremaju se na sledeći način:

2. Pufer za obradu uzoraka (PUZ)

rastvori za PUZ	za 25 mL, 3X
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	9,38 mL
85% glicerol	9,0 mL
čvrst SDS	1,5 g
0,1% bromfenol-plavo	1,5 mL
komercijalni β -merkaptoetanol	3,75 mL
destilovana voda do	25,0 mL

Priprema uzoraka:

Uzorci se pomešaju sa puferom za uzorke (PUZ) u odnosu 2:1. Rezultujući rastvor se tretira najčešće zagrevanjem 3 minuta na ključalom vodenom kupatilu. Ređe se proteini denaturišu 1 sat na 37°C, 30 minuta na 60°C ili inkubiranjem preko noći na sobnoj temperaturi.

3. Pufer za elektroforezu (0,025 M Tris, 0,192 M glicin, 0,1% SDS pH 8,3), radni pufer i 10 puta koncentrovani pufer, koji se do upotrebe čuva zamrznut.

komponente	1 x	10 x
Tris	3,0 g	30 g
glicin	14,4 g	144 g
10% SDS	10,0 mL	0,1 L
destilovana voda do	1,0 L	1,0 L

Priprema gela:

rastvori	gel za razdvajanje (10%)	gel za koncentrovanje (4%)
AA	3,33	0,66
Tris pH 8,8	2,5	-
Tris pH 6,8	-	1,25
destilovana voda	4,0	3,0
temed	0,004	0,005
dezaeracija 5–10 minuta		
SDS	0,10	0,05
APS	0,05	0,025
finalna zapremina	10,0 mL	5,0 mL

Dezaerisani rastvor gela za razdvajanje se sipa između ploča. Nakon sipanja rastvora za gel površina se nadsloji rastvorom 6 ili vodom. Kada je polimerizacija donjeg gela završena sipa se dezaerisani rastvor za koncentrujući gel. U rastvor se stavi "češalj".

Kada je polimerizacija gornjeg gela završena, izvadi se češalj, a nastali "bunarčići" se operu i u njih unesu uzorci. Voltaža je konstantna (80 V) dok uzorci uđu u gel za razdvajanje, a povišava se od 150 do 400 V do kraja rada ili se sve vreme drži konstantna struja od 12 mA kroz koncentrujući gel i 25 mA kroz razdvajajući gel. Nakon završene elektroforeze, deo gela se boji da bi se detektovali proteini, a drugi deo se podvrgava zimogramskoj detekciji (odjeljak 4.2.2), da bi se detektovao LAP tako što se gel ispira vodom a zatim i 1% Tritonom X 100 u trajanju od 45 minuta.

Detekcija CBB-om R 250

Priprema rastvora i postupak za bojenje opisan je kod 4.2.2.

4.3.5 6% Nativna PAGE frakcija sa LAP aktivnošću nakon rehromatografije na Sephadex G-200

Potrebni rastvori, kao i postupak rada su isti kao u odeljku 4.2.2. Jedino što se razlikuje je priprema gela. Gel se priprema na sledeći način:

rastvori	gel za razdvajanje	gel za koncentrovanje
	(6%)	(4%)
AA	3,0	0,66
Tris pH 8,8	3,75	-
Tris pH 6,8	-	1,25
destilovana voda	8,25	3,0
temed	0,006	0,005
dezaeracija 5–10 minuta		
APS	0,075	0,025
finalna zapremina	15,0 mL	5,0 mL

4.3.6 6% Nativna PAGE sirovih ADJ ekstrakata

Postupak izrade elektroforeze je isti kao što je opisano u prethodnom odeljku 4.3.5.

Gel je obojen srebrom po proceduri datoj u Tabeli. Nakon završene elektroforeze gel se pažljivo prenese u staklenu šolju. Tehnika detekcije je jako osetljiva i gel se tokom rada ne sme dodirivati rukama ili stavljati u posuđe koje nije apsolutno čisto. Kratko se ispere destilovanom vodom (1 minut). Gel se prvo fiksira, pa potom ispira. Rastvori za korake 8 i 10 se prave neposredno pre upotrebe. Za sve faze rada koristi se veoma čisto posuđe, bidestilovana voda i predestilovani rastvarači. Za svaki korak koristi se oko 200 mL rastvora po gelu, izuzev za korak 3.

rastvori	vreme (min)
1. Ispiranje destilovanom vodom	1
2. 50% metanol, 20% TCA, 2% CuCl ₂ (100 mL, 40 g, 4 g do 200 mL vode)	15
3. 10% etanol, 5% sirćetna kiselina (100 mL, 50 mL u 1L dest. vode)	10
4. 0,01% KMnO ₄ (0,1 g u 1 L dest. vode)	10
ispiranje 2 puta destilovanom vodom	1
5. 10% etanol, 5% sirćetna kiselina	10
6. 10 % etanol (100 mL etanola u 1 L dest. vode)	10
ispiranje 2 puta destilovanom vodom	1
7. destilovana voda	10
8. 0,1% AgNO ₃ (0,2 g u 200 mL dest. vode)	10
ispiranje destilovanom vodom	20 sekundi
9. 10% K ₂ CO ₃ (20 g u 200 mL dest. vode)	1
10. 2% K ₂ CO ₃ , 0,01 % formaldehid (10 g K ₂ CO ₃ , 125 µL HCHO u 500 mL destilovane vode)	do pojave traka
11. 10% etanol, 5% sirćetna kiselina ispiranje destilovanom vodom	20 sekundi 20 sekundi
12. čuvanje u 0,02% K ₂ CO ₃ (0,2 g K ₂ CO ₃ u 1L dest. vode)	neograničeno

4.3.7 Nativna gradijent PAGE sirovog ADJ ekstrakta

Potrebni rastvori, kao i postupak rada su isti kao u odeljku 4.2.2 a gel se priprema na sledeći način:

rastvori	gel za razdvajanje		gel za koncentrovanje
	(4,5%)	(8%)	(4%)
AA	2,25	4,0	0,66
Tris pH 8,8	3,75	3,75	-
Tris pH 6,8	-	-	1,25
destilovana voda	9,0	7,15	3,0
temed	0,006	0,006	0,005
dezaeracija 5–10 minuta			
APS	0,75	0,75	0,025
finalna zapremina	15,0 mL	15,0 mL	5,0 mL

Gradijentni gel se priprema tako što se odvojeno naprave dva rastvora akrilamida od 4,5% i 8% i oba se sipaju u gradijentni sud (svaki rastvor u jedan krak suda), zatim se pusti da se pomešaju i uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici preko creva se naliva u prethodno zapakovan sendvič.

4.3.8 SDS-PAGE sirovog ADJ ekstrakta

Postupak je isti kao što je opisano u odeljku 4.3.4.

4.3.9 Prečišćavanje glavne izoforme LAP

4.3.9.1 Gel-hromatografsko frakcionisanje proteina sirovog ADJ ekstrakta na Superose 6 FPLC koloni

Sirovi ADJ ekstrakt je frakcionisan gel-hromatografijom, na Superose 6 FPLC koloni. 250 µL ADJ uzorka (9,0 mg/mL proteina) je naneto na Superose 6 kolonu (10 x 300 mm) na sobnoj temperaturi i eluirano fosfatnim puferom (PBS) pH 7,2 pri brzini protoka od 0,2 mL/min. Pufer je pripremljen na sledeći način:

50 mM PBS pH 7,2:

Primarni natrijum-fosfat	6,95 g
NaCl	0,9 g
destilovana voda do	1 L

Podešeno pH na 7,2 1 M NaOH.

Kolona je kalibrisana molekulskim markerima (ferritin 440 kDa; aldolaza 158 kDa; BSA 67 kDa i ovalbumin 43 kDa). Sakupljane su frakcije od 200 μ L i testirane na aktivnost LAP, a one u kojima je enzim detektovan su analizirane nativnom elektroforezom (odjeljak 4.2.2) i zimogramskom detekcijom (odjeljak 4.2.3).

4.3.9.2 Prečišćavanje preparativnom nativnom gradijent (4,5–8%) poliakrilamidnom gel-elektroforezom i gel-hromatografijom na Superose 6 FPLC koloni

Nekoliko preparativnih nativnih gradijent (4,5–8%) poliakrilamidnih gel elektroforeza (odjeljak 4.3.7) je korišćeno za izolovanje glavne LAP izoforme iz sirovog ekstrakta. Ukupno 1 mL (9,0 mg proteina/mL) sirovog ekstrakta creva je korišćeno. Nakon elektroforeze LAP je detektovan na gelu. Gel je ispran vodom 2 puta po 10 minuta a zatim ekvilibrisan u 50 mM Tris-HCl puferu, pH 7,5 2 puta po 5 minuta. Zatim je gel potopljen u rastvor LpNA u 50 mM Tris puferu pH 7,5 i inkubiran na 30°C 10 minuta. Najjače obojeni žuti deo gela, koji odgovara glavnoj LAP izoformi je isečen i homogenizovan u dvostrukoj zapremini vode da bi se protein ekstrahovao. Dobijeni preparat LAP-a je dalje prečišćen gel hromatografijom na Superose 6 koloni (10 x 300 mm) FPLC sistema za hromatografiju. Kolona je prethodno ekvilibrisana 50 mM fosfatnim puferom (PBS) pH 7,2 pri brzini protoka od 0,2 mL/min. Koršćeni su puferi koji su pripremljeni kao što je opisano u odeljcima 4.1.5 i 4.3.9.1.

4.4 Karakterizacija LAP

4.4.1 Određivanje molekulske mase LAP

Molekulska masa nativnog enzima je određena gel hromatografijom na Superose 6 FPLC koloni. Za kalibraciju kolone korišćeni su standardni proteini poznatih molekulskih masa: ferritin (440 000 Da), aldolaza (158 000 Da), goveđi serum albumin (67 000 Da) i ovalbumin (43 000 Da). Uslovi rada su opisani u 4.3.9.2.

Molekulska masa subjedinica LAP je određena SDS-PAG elektroforezom poređenjem sa standardima (LMW-SDS marker kit, GE Healthcare), odnosno α -

laktoalbumin (14,4 kDa), tripsin inhibitor (20,1 kDa), karbo-anhidraza (30,0 kDa), ovalbumin (43,0 kDa), albumin (67,0 kDa) i fosforilaza b (97,4 kDa). Uslovi rada su dati u 4.3.4. Aktivnost LAP prema LpNA u gelu je detektovana kao što je opisano u 4.2.3.

4.4.2 Određivanje izoelektrične tačke LAP

Izoelektrično fokusiranje je urađeno na focusing Multiphor II sistemu za elektroforezu prema uputstvu proizvođača. Kao pI markeri korišćeni su standardni protein i boje (Broad pI kit, GE Healthcare) odnosno: amiloglukozidaza (3,50), metil crveno (3,75), tripsin-inhibitor (4,55), β-laktoglobulin A (5,20), karboanhidraza B – goveđa (5,85), karboanhidraza B – humana (6,55), kisela forma mioglobina (6,85), bazna forma mioglobina (7,35), kiseli lektin sočiva (8,15), srednji lektin sočiva (8,45), bazni lektin sočiva (8,65), tripsinogen (9,30). Nakon završene elektroforeze jedan deo gela je obojen CBB-om a na drugom delu gela je detektovana LAP aktivnost prema LpNA kao što je opisano u 4.2.3.

Potrebni rastvori, način pripreme rastvora i tok rada:

Priprema 7,5%-nog gela:

akrilamid (30%)	3,75 mL
amfoliti pI 3–10,5	0,75 mL
glicerol (50%)	4,0 mL
destilovana voda	6,5 mL
temed	12 μL
dezaeracija par minuta	
APS	75 μL

Rastvor za polimerizaciju se nadsloji *n*-butanolom prethodno zasićenim vodom ili umesto toga prekrije parafilmom. Nakon jednog sata polimerizovanja sendvič se pažljivo otvori i postavi na hladnjak. Hladnjak se nakvasi destilovanom vodom. Ploča se postavlja tako da se tečnost ravnomerno rasporedi u obliku filma ispod ploče. Višak rastvora koji ploča istisne ukloni se papirnom vatom.

Elektrodni rastvori:

Anodni elektrolit 75 mM H ₂ SO ₄	
koncentrovana H ₂ SO ₄	1,02 mL
destilovana voda do	250 mL

Katodni elektrolit 150 mM NaOH	
NaOH	0,3 g
destilovana voda do	50 mL

U guč bocu se stavi sveže prokuvana destilovana voda i hidroksid. Rastvor se ohladi uz dezaeraciju. Elektrodni papiri se umoče u odgovarajuće rastvore i prosuše u sendviču od papirne vate, skoro do suva. Tako pripremljene trake se stave na gel, a platinske elektrode preko njih.

Uslovi rada:

temperatura 10°C

Priprema i nanošenje uzoraka:

Uzorci sa prečišćenom glavnom LAP izoformom su naneti nerazblaženi.

Fokusiranje:

faza	U (V)	I (mA)	P (W)	vreme (min)
početak	200– 250	27–30	2	30
fokusiranje	do 1 000	do 7	7	90
kraj	do 1 200	do 7	10	3

Nakon fokusiranja gel je obojen.

Bojenje, potrebni rastvori i tok rada:

1. Fiksir

TCA 120g
destilovana voda do 1 L

2. Boja CBB R u fiksiru (45/10/45, metanol/sirćetna kiselina/voda, V/V/V)

0,1% CBB R	1 mL
fiksir (12% TCA) do	100 mL

Posle fiksiranja i bojenja gel se prebacuje u normalni fiksir (50/10/40, metanol/sirćetna kiselina/voda, V/V/V) ili 7% sirćetnu kiselinu i trake postaju plavo obojene. Zimogramskom detekcijom LAP je urađena kao što je opisano (odjeljak 4.2.3).

4.4.3 Određivanje aktivnosti LAP

Aktivnost je određivana kao što je opisano u odeljku 4.1.5.

4.4.4 pH optimum

pH optimum leucil-aminopeptidaze je ispitivan u pH opsegu od 4–12, prateći aktivnost enzima prema LpNA (4.1.5.), korišćenjem serije pufera:

puferi i molaritet	pH
50 mM acetatni pufer	4,0–6,5
50 mM fosfatni pufer I	6,5–8,5
50 mM Tris-HCl	7,0–8,0
50 mM HEPES	7,0–8,0
50 mM boratni pufer	8,0–10,5
50 mM fosfatni pufer II	10,0–12,0

Priprema Tris-HCl i HEPES pufera opisana je u 4.1.5, a ostali se prave na sledeći način:

1. 50 mM acetatni pufer

glacijalna sirćetna kiselina	2,85 mL
destilovana voda do	1 L

Podušeno odgovarajuće pH 1 M NaOH.

2. 50 mM fosfatni pufer I

primarni natrijum-fosfat	6,95 g
destilovana voda do	1 L

Podešeno odgovarajuće pH 1 M NaOH.

3. 50 mM fosfatni pufer II

sekundarni natrijum-fosfat	11,4 g
destilovana voda do	1 L

Podešeno odgovarajuće pH 1 M NaOH.

4. 50 mM boratni pufer

borna kiselina	3,1 g
destilovana voda do	1 L

Podešeno odgovarajuće pH 1 M NaOH.

4.4.5 Određivanje K_M i V_{max} vrednosti

Početne brzine enzimski katalizovanih reakcija određene su korišćenjem *p*NA supstrata (*Lp*NA, *Mp*NA, *Ap*NA i *Kp*NA) u opsezima koncentracija od 0,08 do 2,25 mM. Aktivnost je određivana kao što je to opisano (4.1.5), s tim što je umesto prekidanja reakcije dodatkom sirćetne kiseline, raden kontinualni test određivanja aktivnosti, praćen promenom apsorbancije u jedinici vremena na 410 nm, u trajanju od 10 minuta. Postupak pravljenja HEPES pufera koji je korišćen u ovim eksperimentima je dat u odeljku 4.1.5.

4.4.6 Određivanje supstratne specifičnosti

Zimogramskom detekcijom nakon native elektroforeze (4.2.3) upoređena je i aktivnost LAP prema različitim hromogenim supstratima, *Lp*NA, *Mp*NA, *Ap*NA i *Kp*NA, pri čemu za sve supstrate važe isti uslovi rada opisani u 4.2.3. Postupak

pripreme rastvora dat je u **4.2.3**, a rastvori MpNA, ApNA i KpNA se prave na sledeći način:

1. Rastvor supstrata MpNA

MpNA-HCl	5 mg
rastvor 1 iz 4.2.3	30,0 mL

2. Rastvor supstrata ApNA

ApNA-HCl	5 mg
rastvor 1 iz 4.2.3	30,0 mL

3. Rastvor supstrata KpNA

KpNA-HCl	5 mg
rastvor 1 iz 4.2.3	30,0 mL

4.4.7 Ispitivanje dejstva inhibitora na LAP

LAP je preinkubiran sa različitim koncentracijama određenog inhibitora (1,10-fenantrolin, EDTA, EGTA, cistein, citrat i imidazol) 10 minuta na 30 °C pre dodatka LpNA (finalne koncentracije supstrata bile su u opsegu od 0,1 do 1 mM). Hidroliza supstrata praćena je na merenjem apsorbancije na 410 nm u intervalima od 30 sekundi, tokom 15 min na 30 °C. U tabeli su date finalne koncentracije inhibitora korišćenih u eksperimentu:

EDTA (mM)	EGTA (mM)	Imidazol (mM)	Citrat (mM)	Cistein (mM)	1,10-fenantrolin (mM)
10	10	20	20	5	2
5	5	10	10	0,5	1
1	1	5	5	0,05	0,1
0,1	0,1	0,5	0,5	0,005	0,01
-	-	-	-	0,0005	0,001

4.4.8 Ispitivanje dejstva dvovalentnih metalnih katjona na LAP

U ovim ispitivanjima su korišćeni ZnSO₄, MgSO₄ i MnCl₂ kao izvori dvovalentnih katjona. Različite koncentracije katjona su inkubirane sa LAP na 30 °C 10 minuta pre dodatka LpNA u reakcionu smesu. Aktivnost LAP je praćena na 410 nm, u intervalima od 30 sekundi, tokom 15 minuta na 30 °C. U tabeli su date finalne koncentracije korišćenih soli u eksperimentu.

ZnSO ₄ (mM)	MgSO ₄ (mM)	MnCl ₂ (mM)
0,5	5	5
0,05	1	1
0,01	0,5	0,5
0,005	0,05	0,05
0,001	0,01	0,01
0,0001	-	-
0,00002	-	-

4.4.9 ESI-MS/MS analiza

Proteinska traka koja odgovara aktivnosti LAP je podvrgnuta tripsinizaciji u gelu. Dobijeni peptidi su prečišćeni i koncentrovani korišćenjem C₁₈ ZipTips matriksa (Millipore, Billerica, MA, USA) prema instrukcijama proizvođača. Peptidi su eluirani u 3,5 µl smese acetonitril/voda (1:1) koja je sadržavala i 0,1% mravlje kiseline a zatim analizirani korišćenjem ESI-MS/MS na Q-TOF ultima API sistemu (Micromass, Manchester, UK). Podaci o jonskim fragmentima donijeni su pomoću nanoprotocnog elektrospreja uz argon kao kolizioni gas. MS/MS spektri su procesovani MaxEnt 3 (MassLynx 4.0) da bi se dobila lista pikova a zatim su analizirani korišćenjem PepSeq (MassLynx 4.0) manualnim modulom.

5. Literatura

1. http://www.cals.ncsu.edu/course/ent425/library/tutorials/importance_of_insects/class_of_distinction.html
2. http://www.cals.ncsu.edu/course/ent425/library/tutorials/importance_of_insects/importance_of_insects.html
3. <http://www.earthlife.net/insects/six01.html>
4. <http://www.ivyhall.district96.k12.il.us/4th/kkhp/1insects/bugmenu.html>
5. Ivanović, J., Đorđević, S., Ilijin, L., Janković-Tomanić, M. i Nenadović, V., *Comp. Biochem. Physiol.* **132A**, 555–566 (2002).
6. Rossiter, M.C., *Oecologia* **87**, 288–294 (1991).
7. Nardi, J.B., Mackie, R.I. i Dawson, J.O., *J. Insect Physiol.* **48**, 751–763 (2002).
8. Ivanović, J., Janković-Hladni, M., Nenadović, V., Frušić, M. i Stanić, V., u: *Endocrinological Frontiers in Physiological Insects Ecology*, urednici: Sehna, F.Z., Zabža, A. i Denlinger, D., Wrocław Technical Press, Wrocław (1988).
9. Ivanović, J., u: *Hormones and Metabolism in Insect Stress*, urednici: Ivanović, J. i Janković-Hladni, M., CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston (1991).
10. Cohen, A. C., u: *Insect Diets: Science and Technology*, urednik: Cohen, A. C., CRC Press, Taylor & Francis group (2004).
11. Ivanović, J., Janković-Hladni, M., Stanić, V., Nenadović, V. i Frušić, M., *Comp. Biochem. Physiol.* **94A**, 167–171 (1989).
12. Stanić, V., Janković-Hladni, M., Ivanović, J. i Nenadović, V., *Entomol. exp. appl.* **51**, 261–267 (1989).
13. Singh, P., u: *Artificial diets for insects: a compilation of references with abstracts (1970–72)*, urednici: Crosby, T.K. i Shearer, A.R., Government printer, Wellington, New Zealand (1974).
14. Chapman, R.F., *The Insects Structure and Function*, The English Universities Press LTD, London, str. 39 (1969).
15. Terra, W.R. i Ferreira, C., *Comp. Biochem. Physiol.* **109B**, 1–62 (1994).

16. Tellam, R.L., u: Biology of the insect midgut, urednici: Lehane, M.J. i Billingsley, P.F., Chapman and Hall, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras (1996).
17. Zhuzhikov, D.P., *J. Insect Physiol.* **10**, 273–278 (1964).
18. Lehane, M.J., *J. Insect Physiol.* **22**, 1551–1557 (1976).
19. Miller, N. i Lehane, M.J., *J. Insect Physiol.* **39**, 139–144 (1993).
20. Eisemann, C.H., Donaldson, R.A., Pearson, R.D., Cadogan, L.C., Vuocolo, T. i Tellam, R. L. *Entomol. Exp. Appl.* **72**, 1–10 (1994).
21. Terra, W.R. i Ferreira, C., *J. Insect Physiol.* **27L**, 325–331 (1981).
22. Terra, W.R., *Annu. Rev. Entomol.* **35**, 181–200 (1990).
23. Wigglesworth, V.B., *The Principles of Insect Physiology*, sedmo izdanje, Methnen, London (1972).
24. Chapman, R.F., *The Insects Structure and Function*, The English Univrsities Press LTD, London, str. 49 (1969).
25. Terra, W.R., Ferreira, C., i de Bianchi, A.G., *J. Insect Physiol.* **25**, 487–494 (1979).
26. Ivanović, J. i Milanović, M., *Matica srpska, Zbornik za prirodne nauke* **39**, 171–175 (1970).
27. Terra, W.R. i Cristofolletti, P.T., *Comp. Biochem. Physiol.* **113B**, 725–730 (1996).
28. Terra, W.R., Ferreira, C., Jordão, B.P. i Dillon, R.J., u: Biology of the insect midgut, urednici: Lehane, M.J. i Billingsley, P.F., Chapman and Hall, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras (1996).
29. *Proteolytic enzymes: A practical approach*, urednici: Beynon, R.J. i Bond, J.S., IRL Press, Oxford (1994).
30. Henry, M., *Transcriptions of the New York Academy of Sciences*, Ser. II, **28**, 676–683 (1962).
31. Lehane, M.J., Müller, H.M. i Crisanti, A., u: Biology of the insect midgut, urednici: Lehane, M.J. i Billingsley, P.F., Chapman and Hall, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras (1996).
32. Lehane, M.J., u: *The microscopic anatomy of invertebrates - insect structure*, urednik: Locke, M., John Wiley, Chichester (1996).
33. Lehane, M.J., Blakemore, D., Williams, S. i Moffatt, M.R., *Comp. Biochem. Physiol.* **110B**, 285–289 (1995).

34. Felix, C.R., Betschart, B., Billingsley, P.F. i Freyvogel, T.A., *Insect Biochem.* **21**, 197–203 (1991).
35. Blakemore, D., Williams, S. i Lehane, M.J., *Comp. Biochem. Physiol.* **110B**, 301–307 (1995).
36. Schneider, F., Houseman, J.G. i Morrison, P.E., *Insect Biochem.* **17**, 859–862 (1987).
37. Ivanović, J., Janković-Hladni, M. i Milanović, M., u: Neurosecretion and Neuroendocrine Activity; Evolution, Structure and Function, urednici: Bergman, W., Oksehe, A., Polenov, A. i Schorrer, B., Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin (1978).
38. Leković, S., Lazarević, J., Nenadović, V. i Ivanović, J., *Eur. J. Entomol.* **98**, 13–18 (2001).
39. Felton, G.W. i Gatehouse, J.A., u: Biology of the insect midgut, urednici: Lehane, M.J. i Billingsley, P.F., Chapman and Hall, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras (1996).
40. McFarlane, J.E., u: Fundamentals of insect physiology, urednik: Blum, M.S., Wiley, New York (1985).
41. Felton, G.W., *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **32**, 107–130 (1996).
42. Potter, S.M., Jimenez-Flores, R., Pollack, J., Lone, T.A., Berber-Jimenez, M.D., *J. Agric. Food. Chem.* **41**, 1287–1291 (1993).
43. Ishaaya, I., u: Insect – plant interactions, urednici: Miller, J.R. i Miller, T.A., Springer-Verlag, New York (1986).
44. Lipke, H., Fraenkel, G.S. i Liener, I.E., *J. Agric. Food. Chem.* **2**, 410–415 (1954).
45. Liener, I.E., Toxic constituents of plant foodstuff, drugo izdanje, Academic Press, New York (1980).
46. Dymock, J.J., Laing, W.A., Shaw, B.D., Gatehouse, A.M.R. i Christeller, J.T., *N.Z. J. Zool.* **19**, 123–131 (1992).
47. Gatehouse, A.M.R., Butler, K.J., Fenton, K.A., i Gatehouse, J.A., *Entomol. Exp. Appl.* **39**, 279–286 (1985).
48. Jongasma, M.A., Bakker, P.I., Peters, J., Bosch, D. i Stiekema, W.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 8041–8045 (1995).
49. Janzen, D.H., Juster, H.B. i Liener, I.E., *Science*, **192**, 795–796 (1976).
50. Czapla, T.H. i Lang, B.A., *J. Econ. Entomol.* **83**, 2480–2485 (1990).
51. Enzyme Nomenclature 1984 of IUB, Academic Press, New York (1984).
52. <http://merops.sanger.ac.uk/>

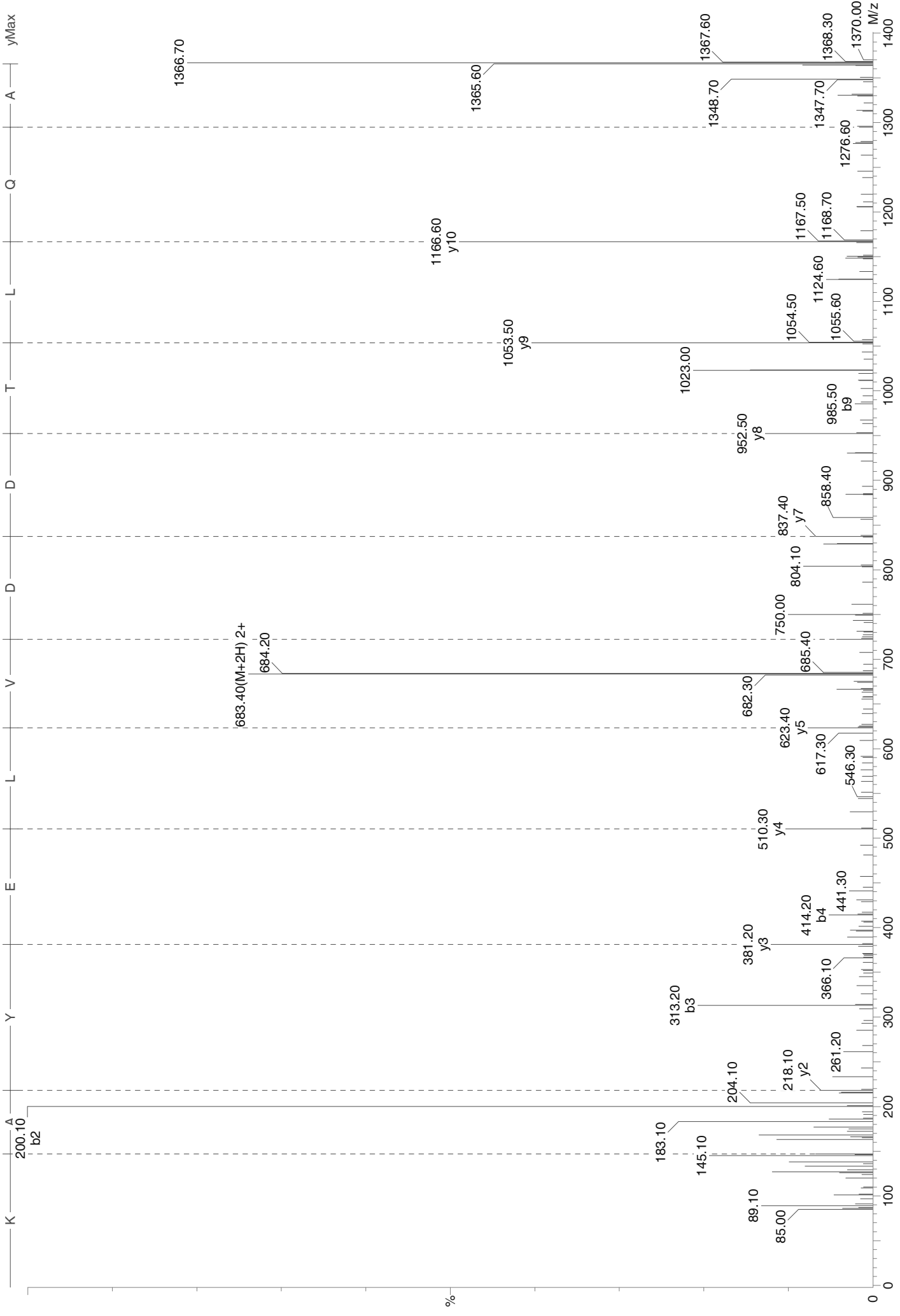
53. Burley, S.K., David, P.R., Taylor, A. i Lipscomb, W.N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6878–6882 (1990).
54. <http://www.pdb.org/pdb/explore.do?structureId=1BLL>
55. Kim, H. i Lipscomb, W. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5006–5010 (1993).
56. Sträter, N. i Lipscomb, W.N., *Biochemistry* **34**, 14792–14800 (1995).
57. Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F., u: Handbook of proteolytic enzymes, urednici: Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F., Academic press, New York, 987–1551 (1998).
58. Lindestrøm-Lang, K., *Z. Physiol. Chem.* **182**, 151–174 (1929).
59. Johnson, M.J., Johnson, G.H. i Peterson, W.H., *J.Biol.Chem.* **116**, 515–526 (1936).
60. Berger, J. i Johnson, M.J., *J.Biol.Chem.* **130**, 641–654 (1939).
61. Spackman, D.H., Smith, E.L. i Brown, D.M., *J.Biol.Chem.* **212**, 255–269 (1955).
62. Smith, E.L. i Spackman, D.H., *J.Biol.Chem.* **212**, 271–299 (1955).
63. Himmelhoch, S.R., *Arch. Biochem. Biophys.* **134**, 597–602 (1969).
64. Dounce, A.L. i Allen, P.Z., *Trends Biochem. Sci.* **13**, 317–320 (1988).
65. Dounce, A.L. i Allen, P.Z., *Arch. Biochem. Biophys.* **257**, 13–16 (1987).
66. Kim, Y.S., Kim, Y.W. i Slesinger, M.H., *Biochim. Biophys. Acta* **370**, 283–296, (1974).
67. Sträter, N., Sun, L., Kantrowitz, E.R. i Lipscomb, W.N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11151–11155 (1999).
68. Matsui, M., Fowler, J.H. i Walling, L., *J. Biol. Chem.* **387**, 1535–1544, 2006.
69. Cappiello, M., Alterio, V., Amodeo, P., Del Corso, A., Scaloni, A., Pedone, C., Moschini, R., De Donatis, G.M., De Simone, G. i Mura, U., *Biochemistry* **45**, 3226–3234, 2006.
70. Salvesen, G. i Nagase, H., u: Proteolytic enzymes: A practical approach, urednici: Beynon, R.J. i Bond, J.S., IRL Press, Oxford, 83–104 (1994).
71. Grembecka, J. i Kafarski, P., *Mini Rev. Med. Chem.* **I**, 133–144 (2001).
72. Hunter, R.L. i Market C.L., *Science* **125**, 1294–1295 (1957).
73. Sweetman, F. i Ornstein, L., *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 327–339 (1974).
74. Granelli-Piperno, A. i Reich, E., *J. Exp. Med.* **148**, 223–234 (1978).
75. Lantz, M.S. i Ciborowsky, P., *Meth. Enzymol.* **235**, 563–594 (1994).
76. Ohlsson, B.G., Weström, B.R. i Karlsson, B.W., *Anal. Biochem.* **152**, 239–244 (1986).

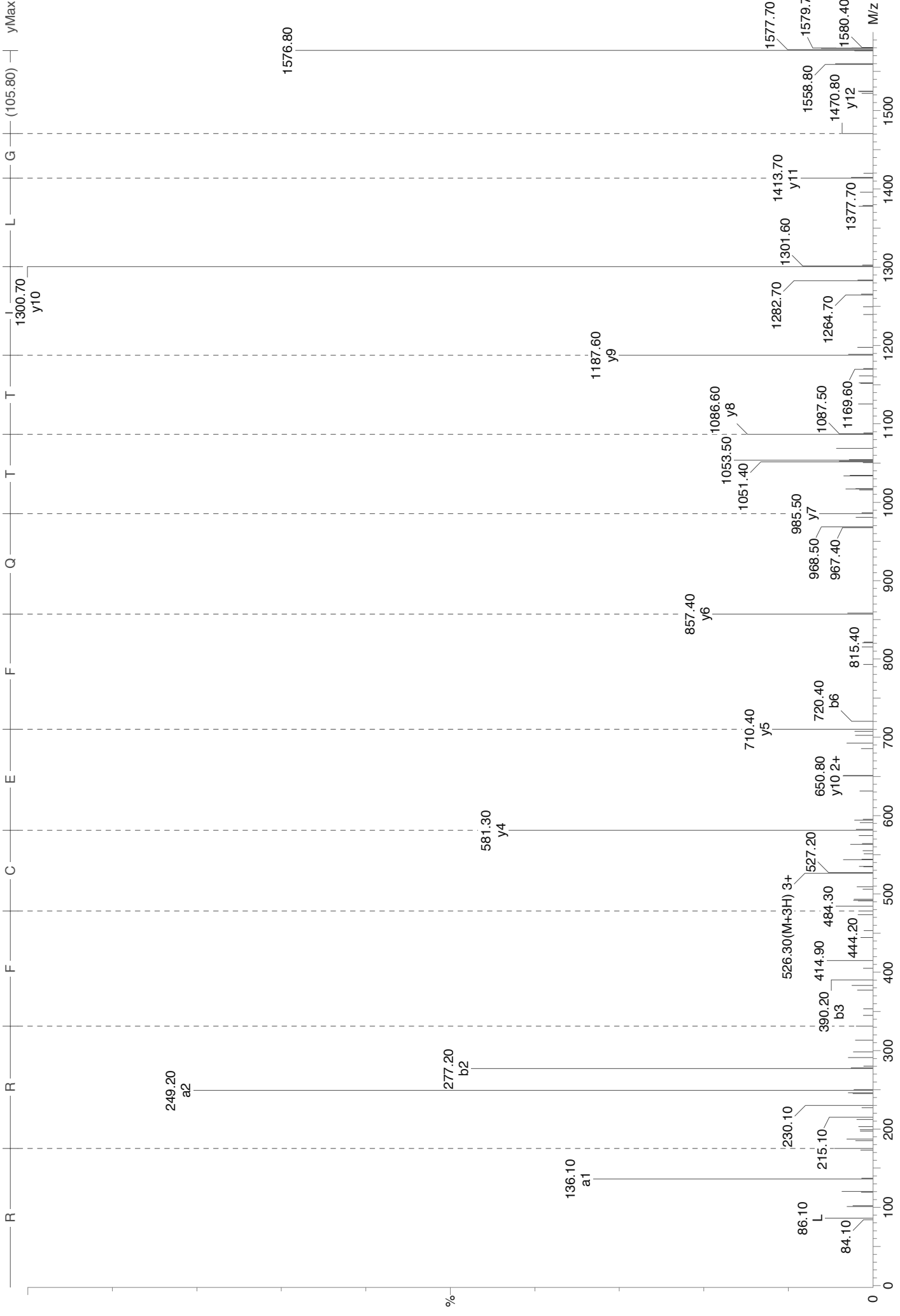
77. Brewer, G.J., *An Introduction to Isozyme Techniques*, Academic Press, New York (1970).
78. Mikkonen, A., *Physiol. Plant.* **84**, 393–398 (1992).
79. Manchenko, G. P., *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic gels*, drugo izdanje, CRC Press, Boca Raton, FL 400–430 (2003).
80. Hou, W.C., Chen, H.J., Chen, T.E. i Lin, Y.H., *Electrophoresis* **20**, 486–490 (1999).
81. Le, J., Dauchot, P., Perrot, J.L., Cambazard, F., Frey, J. i Chamson, A., *Electrophoresis* **20**, 2824–2829 (1999).
82. Till, O., Baumann, E. i Linss, W., *Anal. Biochem.* **292**, 22–25 (2001).
83. Božić, N. i Vujčić, Z., *Electrophoresis* **26**, 2476–2480 (2005).
84. Smith, R. i Turk, V., *Eur. J. Biochem.* **48**, 245–254 (1974).
85. Croall, D.E. i DeMartino, G.N., *J. Biol. Chem.* **258**, 5660–5665 (1983).
86. Baugh, R. i Travis, J., *Biochemistry* **15**, 836–841 (1976).
87. Jahreis, G., Peters, K. i Kirschke, H., *J. Biochem. Biophys. Methods* **49**, 491–505 (2001).
88. Cortes, L., Carvalho, A.L., Todo-Bom, A., Faro, C., Pires, E. i Verissimo, P., *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**, 878–884 (2006).
89. Migita, K. i Nishimura, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1110–1117 (2006).
90. Luo, K., Lu, Y. i Adang M.J., *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, 783–791 (1996).
91. Hua, G., Tsukamoto, K., Taguchi, R., Tomita, M., Miyajima, S. i Ikezawa, H., *Biochim. Biophys. Acta.* **1383**, 301–310 (1998).
92. Klinkowstrom, A.M., Terra, W.R. i Ferreira, C., *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **27**, 301–315 (1994).
93. Ovando, M.E.O., Isola, M.C., Maldonado, A.M. i Franzoni L., *Plant Science* **166**, 1143–1148 (2004).
94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
95. <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>
96. Reeck, G., Oppert, B., Denton, M., Kanost, M., Baker, J.E. i Kramer, K.J., u: *Proteases: New Perspectives*, urednik: Turk, V., Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin (1999).
97. Del Lama, M.A., Bezerra, R.M., Egea Soares, A.E. i Ruvolo-Takasusuki, M.C.C., *Apidologie* **32**, 25–35 (2001).
98. Billingsley, P.F., *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **15**, 149–163 (1990).

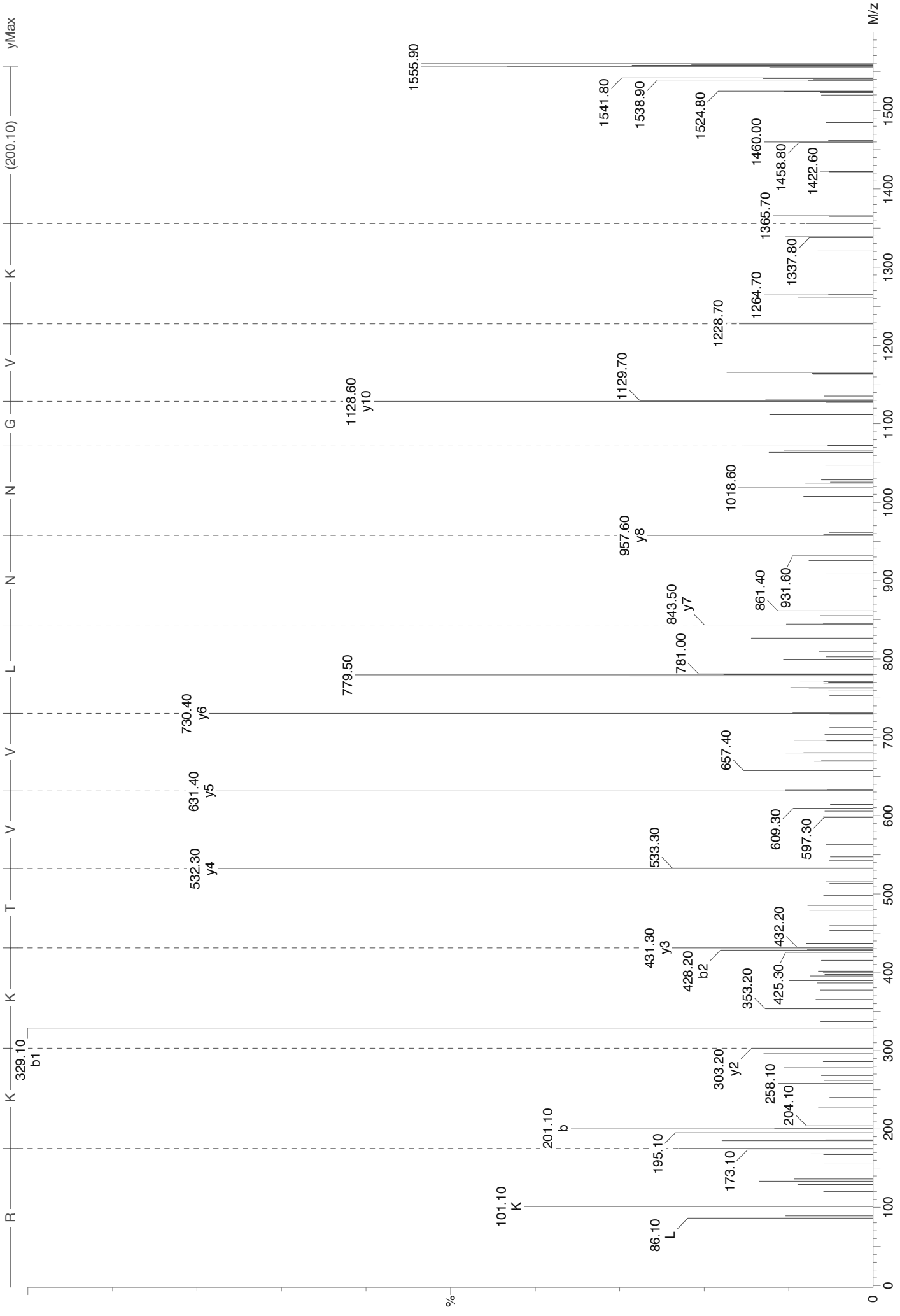
99. Božić, N., Karakterizacija proteaza srednjeg creva larvi strižibube *Morimus funereus*, magistarski rad, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, (2003).
100. Hong, X.Q., Bouvier, J., Wong, M.M., Yamagata, G.Y.L. i McKerron, J.H., *Exp. Parasitol.* **76**, 127–133 (1993).
101. Ahmad, S. i Ward, P.E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **252**, 643–650 (1990).
102. Christeller, J.T., Shaw, B.D., Gardiner, S.E. i Dymock, J., *Insect. Biochem.* **19**, 221–231 (1989).
103. Osuala, C.I., Donner, R.L. i Nielsen, S.S., *Comp. Biochem. Physiol.* **107B**, 241–248 (1994).
104. Novillo, C., Castanera, P. i Ortego, F., *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **36**, 181–201 (1997).
105. Girard, C., Le Metayer, M., Bonade-Bottino, M., Pham-Delegue, M.H. i Jouanin, L., *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**, 229–237 (1998).
106. Cristofolotti, P.T. i Terra, W.R., *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 807–819 (1999).
107. Wagner, W., Mohrlen, F. i Schnetter, W., *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **32**, 801–812 (2002).
108. Ivanović, J., Janković, M. i Milanović, M., *Comp. Biochem. Physiol.* **50A**, 125–130 (1975).
109. Ivanović, J., Janković-Hladni, M., Đorđević, S., Lazarević, J. i Stamenović, S., *Comp. Biochem. Physiol.* **103A** 679–686 (1992).
110. Ivanović, J., Đorđević, S., Janković-Hladni, M. i Nenadović, V., *Comp. Biochem. Physiol.* **112A**, 233–239 (1995).
111. Nenadović, V., Janković-Hladni, M., Prolić, Z. i Ivanović, J., u: Zaštita bilja danas i sutra, urednici: Šestović, M., Nešković, N.K. i Perić, I., Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd (1994).
112. Đurđević, A., Vujčić, Z., Jankov, R., Nenadović, V. i Ivanović, J., *Arch. Biol. Sci. Belgrade* **49 (3–4)**, 19–20 (1997).
113. Božić, N., Vujčić, Z., Nenadović, V. i Ivanović, J., *Comp. Biochem. Physiol.* **134B**, 231–241 (2003).
114. Božić, N., Vujčić, Z., Nenadović, V. i Ivanović, J., *Arch. Biol. Sci. Belgrade* **56(1–2)**, 1P–2P (2004).
115. Bian, X., Shaw, D.B., Han, Y. i Christeller, T.J., *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **31**, 23–37 (1996).
116. Valaitis, A.P., *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 139–149 (1995).

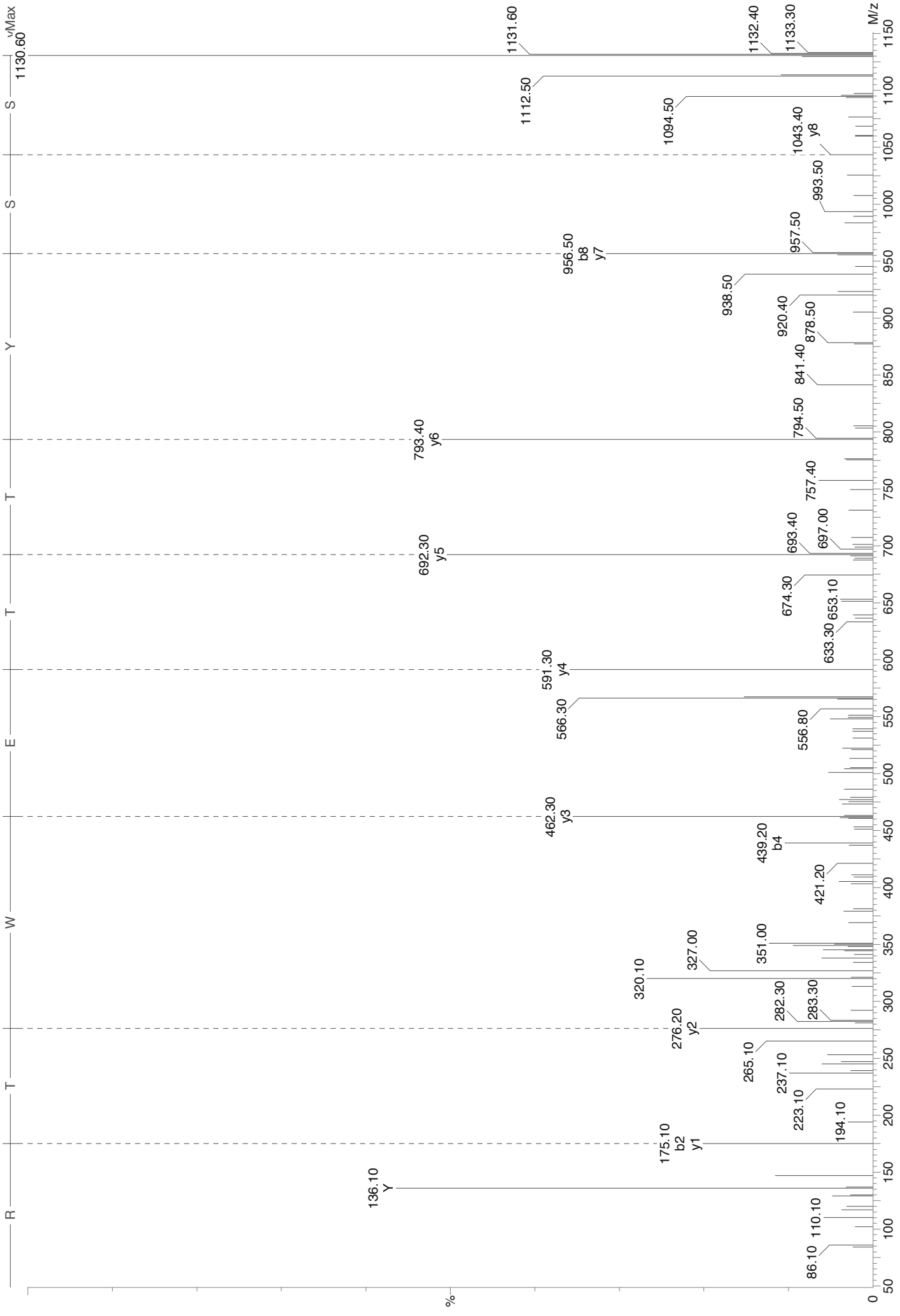
117. Nakanishi, K., Yaobi, K., Nagino, Y., Hara, H., Kitami, M., Atsumi, S., Miura, N. i Sato, R., *FEBS Lett.* **519**, 215–220 (2002).
118. Dojnov, B., Božić, N., Nenadović, V., Ivanović, J. i Vujčić Z., *Comp. Biochem. Physiol.* **149**, 153–160 (2008).
119. Roberts, D.B., u: *Drosophila: A practical approach*, urednik: Roberts, D.B., IRL Press, Oxford, 15–19 (1986).
120. Terra, W.R., Ferreira, C. i Baker, J.E., u: *Biology of the insect midgut*, urednik: Lehane, M.J. i Billingsley, P.F., Chapman and Hall, London-Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras (1996).
121. Bradford, M.M., *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
122. Lee, M.J. i Anstee, J.H., *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 63–71 (1995).
123. Erlanger, B.F., Kokowsky, N. i Cohen, W., *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 271–278 (1961).
124. Roy, A.C., Saha, N., Tan, S.M., Kamarul, F.Z., Ratnam, S.S., *Electrophoresis* **13**, 396–397 (1992).
125. Oya, M., Wakabayashi, T., Yoshino, M., Mizutani, S., *Physiol. Chem. Phys.* **8**, 327–335 (1976).
126. Davis, B. J., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404–427 (1964).
127. Abdala, A. P., Takeda, L. H., Freitas, Jr. J. O., Alves, K. B., *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**, 1489–1492 (1999).
128. <http://rsb.info.nih.gov/ij>
129. Leber, T. M., Balkwill, F. R., *Anal. Biochem.* **249**, 24–28 (1997).
130. Laemmli, U.K., *Nature* **227**, 680–685 (1970).
131. Ansorge, W., *J. Biochem. Biophys. Meth.* **11**, 13–20 (1985).
132. Margolis, J. i Kenrick, K.G., *Anal. Biochem.* **25**, 347–362 (1968).
133. Blahovec, J., Kostecka, Z. i Kocisova, A., *Vet. Med.* **51(4)**, 139–144 (2006).
134. Taylor, A., *FASEB J.* **7**, 290–298 (1993).
135. Masler, E.P., Kovaleva, E.S., *Comp. Biochem. Physiol.* **116 B**, 11–18 (1997).
136. Vujčić, Z., *Praktikum iz eksperimentalne biohemije*, Rantec, Beograd (2002).
137. Nisbet, A.J. i Billingsley, P.F., *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 1123–1131 (2002).
138. Carpenter, F.H. i Vahl, J.M., *J. Biol. Chem.* **248**, 294–304 (1973).
139. Thompson, G.A. i Carpenter, F.H., *J. Biol. Chem.* **251**, 1618–1624 (1976).
140. Allen, M.P., Yamada, A.H. i Carpenter, F.H., *Biochemistry* **22**, 3778–3783 (1983).

141. Hatta, T., Kazama, K., Miyoshi, T., Umemiya, R., Liao M., Inoue, N., Xuan, X., Tsuji, N. i Fujisaki, K., *Int. J. Parasitol.* **36**, 1123–1132 (2006).
142. Larsson, T., Bergström, J., Nilsson, C. i Karlsson, K-A., *FEBS Lett.* **469**, 155–158 (2000).
143. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>
144. <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>
145. http://www.ebi.uniprot.org/entry/UniRef90_UPI0000D5577E
146. Božić, N., Ivanović, J., Nenadović, V., Bergström, J., Larsson T. i Vujčić, Z., *Comp. Biochem. Physiol.* DOI: 10.1016/j.cbpb.2007.11.006 (2007).









BIOGRAFIJA

*Nataša Božić je rođena 02. novembra 1975. godine u Beogradu, Republika Srbija. Diplomirala je na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar, 2000. godine. 2003. godine je odbranila magistarsku tezu pod nazivom „Karakterizacija proteaza srednjeg creva larvi *Morimus funereus*”.*

Član je Srpskog hemijskog društva, Srpskog biohemijskog društva i Entomološkog društva Srbije.

Do sada je objavila 5 radova u časopisima međunarodnog značaja R 51-a, 4 rada u časopisima međunarodnog značaja R 52, 3 rada u časopisima nacionalnog značaja i po dva saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja, štampana u izvodu.

Прилог

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Потписани/а

Изјављујем да је електронска верзија моје докторске дисертације

„Цитосолне леуцил-аминопептидазе средњег црева ларви *Morimus funereus*“

коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду** истоветна штампаној верзији која се налази у фонду Универзитетске библиотеке „Светозар Марковић“.

Потпис

У Београду, 15.04.2014.



Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Божић Наташа

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Цитосолне леуцил-аминопептидазе средњег црева ларви *Morimus funereus*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 03.04.2014. године



Прилог 2.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Цитосолне леуцил-аминопептидазе средњег црева ларви *Morimus funereus*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис

У Београду, 03.04.2014. године