

Biokemijska karakterizacija proteina RRAS2 iz spužve *Eunapius subterraneus* ; Istraživačka nastava kemije

Lazarin, Leonarda

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:021274>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Leonarda Lazarin

**Biokemijska karakterizacija proteina RRAS2 iz
spužve *Eunapius subterraneus***

Istraživačka nastava kemije

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre edukacije biologije i kemije

Zagreb, 2023. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Helene Četković, znanstvene savjetnice, i neposrednim voditeljstvom Antee Talajić, mag. ing. biotechn.

Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec.

Mentor metodičkog dijela rada je izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Geni spužvi povezani s nastankom raka (CanSponGE) (IP-2019-04-5382).

Zahvale

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Heleni Četković koja mi je pružila priliku za izradu diplomskog rada u Laboratoriju za molekularnu genetiku. Hvala na strpljenju, susretljivosti i uloženom vremenu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem asistentici Antei Talajić, mag. ing. biotechn. na uloženom trudu, vremenu i pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Zahvaljujem i ostalim članovima Laboratorija za molekularnu genetiku na Institutu Ruđer Bošković na ugodnom radnom okruženju i pomoći.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Draginji Mrvoš-Sermek na pomoći i uloženom vremenu prilikom izrade metodičkog dijela diplomskog rada.

Zahvaljujem i doc. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec, nastavnici ovog diplomskog rada, na stručnim savjetima, trudu i strpljenju.

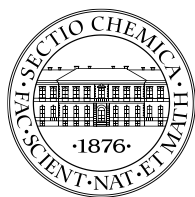
Na kraju hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci u svakom trenutku.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XII
ABSTRACT	XIV
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Spužve	3
2.1.1. Osnovna građa tijela spužvi.....	3
2.1.2. Morfološka raznolikost spužvi.....	4
2.1.3. Razmnožavanje spužvi.....	4
2.1.4. Klasifikacija i biološka raznolikost spužvi.....	5
2.1.5. <i>Eunapius subterraneus</i> – ogulinska špiljska spužvica	5
2.1.6. Spužve kao modelni organizmi.....	6
2.2. Protein RRAS2	8
2.2.1. Struktura i mehanizam djelovanja proteina RRAS2.....	8
2.2.2. Posttranslacijske modifikacije proteina RRAS2.....	10
2.2.3. Signalne kaskade u kojima sudjeluje RRAS2	11
2.2.4. Uloga RRAS2 u onkogenezi i Noonanovom sindromu.....	13
§ 3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Osnovni materijali i kemikalije	15
3.1.2. Puferi.....	15
3.1.3. Proteini, enzimi i koenzimi.....	16
3.1.4. Boje i markeri.....	16
3.1.5. Plazmidi	16
3.1.6. Oligonukleotidi i nukleinske kiseline	17
3.1.7. Hranjive podloge za uzgoj i oporavak bakterija.....	17
3.1.8. Ostali materijali i uređaji	17
3.2. Metode.....	19
3.2.1. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze	19
3.2.2. Agarozna gel elektroforeza	21
3.2.3. Izolacija DNA iz agaroznog gela	22
3.2.4. Kloniranje DNA u ekspresijski vektor.....	22
3.2.5. Razgradnja DNA fragmenata i plazmida restrikcijom endonukleazama	24

3.2.6. Ligacija	25
3.2.7. Transformacija soja BL21+ bakterije Escherichia coli.....	26
3.2.8. PCR reakcija na kolonijama	27
3.2.9. Izolacija plazmidne DNA	28
3.2.10. Provjera rekombinantnog plazmida restriksijskim enzimima (digestijom) i sekvenciranjem.....	28
3.2.11. Probna indukcija prekomjerne ekspresije proteina	29
3.2.12. Sonikacija.....	31
3.2.13. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu	31
3.2.14. Western analiza.....	32
3.2.15. Prekomjerna indukcija proteina (velika indukcija)	34
3.2.16. Izolacija proteina	34
3.2.17. Ultrafiltracija	36
3.2.18. Mjerenje koncentracije proteina	36
3.2.19. Test određivanja GTPazne aktivnosti proteina.....	37
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	40
4.1.1. Umnažanje cDNA koja kodira protein RRAS2 iz spužve Eunapius subterraneus lančanom reakcijom polimeraze.....	40
4.1.2. Kloniranje cDNA koja kodira protein RRAS2 iz spužve Eunapius subterraneus u ekspresijski vektor pET28b pomoću specifično osmišljenih početnica.....	41
4.1.3. Razgradnja plazmida pET28b restriksijskim endonukleazama (NdeI/BamHI)	43
4.1.4. Transformacija soja BL21+ bakterije Escherichia coli rekombinantnim plazmidom pET28b_EsuRRAS2.....	44
4.1.5. PCR reakcija na kolonijama	44
4.1.6. Provjera rekombinantnog plazmida pET28b_EsuRRAS2 restriksijskim enzimima (digestijom) i sekvenciranjem.....	45
4.1.7. Probna indukcija prekomjerne ekspresije proteina	49
4.1.8. Western analiza.....	50
4.1.9. Izolacija proteina	51
4.1.10. Ultrafiltracija i mjerenje koncentracije proteina.....	52
4.1.11. Test određivanja GTPazne aktivnosti proteina.....	53
§ 5. ZAKLJUČAK	57
§ 6. ISTRAŽIVAČKA NASTAVA KEMIJE (METODIČKI DIO).....	58
6.1. UVOD.....	58
6.2. LITERATURNI PREGLED	58
6.2.1. Definicija i ciljevi istraživačke nastave.....	58
6.2.2. Prednosti i nedostaci istraživačke nastave	61
6.2.3. Enzimi	62

6.2.4. Katalaza	64
6.3. PRIPREMA ZA NASTAVU	67
6.3.1. Pregled kurikuluma i školskih udžbenika.....	67
6.3.2. Pregled školskih udžbenika.....	67
6.4. PRIJEDLOG NASTAVNOG SATA	69
6.4.1. Objašnjenje nastavnog sata	69
6.4.2. Priprema materijala i metoda za nastavni sat	70
6.4.3. Tijek nastavnog sata.....	72
6.5. ZAKLJUČAK METODIČKOG DIJELA	78
§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	79
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	81
§ 9. DODATAK.....	XV
9.1. Radni listić – enzimi.....	xv
§ 10. ŽIVOTOPIS	XIX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

BIOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA PROTEINA RRAS2 IZ SPUŽVE *Eunapius subterraneus* ISTRAŽIVAČKA NASTAVA KEMIJE

Leonarda Lazarin

Rak je jedna od najrasprostranjenijih bolesti današnjice i često se javlja uslijed mutacija ili promjena u ekspresiji gena koji kodiraju za proteine uključene u kontrolu rasta i razvoja stanica. RRAS2 je primjer takvog proteina te pripada skupini malih GTPaza. Često je prekomjerno eksprimiran u različitim tipovima raka kod ljudi. Homolog proteina RRAS2 pronađen je i kod evolucijski puno starijih i jednostavnijih životinja – spužvi. Spužve predstavljaju dobar modelni organizam jer imaju jednostavnu morfologiju, a kompleksan genom, te većina gena iz spužvi pokazuje značajnu očuvanost s homologima kod kralješnjaka. Kako bismo dobili bolji uvid u biokemijske karakteristike homologa RRAS2 iz spužve *Eunapius subterraneus*, klonirana je spužvina cDNA za RRAS2 te unesena u odgovarajući ekspresijski vektor. Napravljena je prekomjerna ekspresija rekombinantnog proteina u bakteriji *Escherichia coli*. Analizirana je i potvrđena intrinzična GTPazna aktivnost spužvinog proteina RRAS2, što ukazuje na očuvanost biokemijskih svojstava ovog onkogeno.

U metodičkom dijelu ovog rada dan je prijedlog nastavnog sata temeljen na istraživačkoj nastavi, za odabranu temu (*Enzimi*). Pregledana je stručna i udžbenička literatura, oblikovani su prikladni didaktičko-metodički materijali te su navedeni mogući problemi koji se mogu javiti tijekom izvedbe nastavnog sata istraživačkog učenja.

(87 + xix stranica, 38 slika, 19 tablica, 97 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: GTPaze, istraživačka nastava, rak, RRAS2, spužve

Mentor: dr. sc. Helena Četković, zn. savjetnica

Neposredni voditelj: Antea Talajić, mag. ing. biotechn.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Mentor metodičkog dijela: izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

2. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

3. izv. prof. dr. sc. Mirela Sertić Perić

Zamjena: prof. dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija

Datum diplomskog ispita: 23. veljače 2023.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE RRAS2 PROTEIN FROM THE SPONGE *Eunapius subterraneus* INQUIRY-BASED CHEMISTRY EDUCATION

Leonarda Lazarin

Cancer is one of the most widespread diseases nowadays and often occurs due to mutations or changes in the expression levels of genes that control cell growth and development. RRAS2 is one of such proteins and a small GTPase. The homologue of the human RRAS2 was found in evolutionarily much older and simpler animals – sponges. Despite their simple morphology, sponges have a complex genome with many genes very similar to their vertebrate homologues. To get a better insight into the biochemical characteristics of the RRAS2 homologue from the sponge *Eunapius subterraneus*, the cDNA for RRAS2 was cloned and inserted into an appropriate expression vector. *E. coli* cells were chemically transformed for the expression of the RRAS2 recombinant protein. The GTPase activity of the sponge RRAS2 was analyzed and confirmed, which indicates that the biochemical properties of this oncogene are evolutionary conserved.

In the methodological part, a proposal of inquiry-based lesson, for the selected topic (Enzymes) is given. Professional and textbook literature was reviewed, appropriate didactic-methodical materials were designed, and possible problems that may arise during the implementation of the inquiry-based learning were highlighted.

(87 + xix pages, 38 figures, 19 tables, 97 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: cancer, GTPases, inquiry-based education, RRAS2, sponges

Mentor of research part: dr. sc. Helena Četković, Senior Scientist

Assistant mentor: Antea Talajić, mag. ing. biotechn.

Supervisor: dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor

Mentor of methodical part: dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek, Associate Professor

Reviewers:

1. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek, Associate Professor

2. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor

3. dr. sc. Mirela Sertić Perić, Associate Professor

Substitute: dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija, Professor

Date of exam: February 23th 2023

§ 1. UVOD

Stanični procesi poput diobe strogo su regulirani brojnim faktorima kao što su receptori na staničnoj membrani, različite signalne molekule koje prenose signale dalje do jezgre, kao i transkripcijski faktori te represori transkripcije.¹ Geni koji sudjeluju u kontroli rasta i diferencijacije, a njihovom mutacijom ili prekomjernom ekspresijom dolazi do transformacije stanica, odnosno razvoja tumora, nazivaju se onkogeni. Razvoj tumora može biti i rezultat inaktivacije gena uključenih u kontrolu stanične diobe ili programirane stanične smrti (apoptoze), tj. tumor supresorskih gena. Rak je jedna od najsmrtonosnijih bolesti danas, a može se opisati kao posljedica pogrešaka unutar višestaničnog organizma. Osim genetskih faktora, razvoju raka mogu pridonijeti i razni fizički, kemijski ili biološki karcinogeni, te vjerojatnost njegove pojave raste sa životnom dobi.^{2,3} Iako je predmet proučavanja već desetljećima, još se uvijek ne zna dovoljno o mehanizmima nastanka raka i maligne transformacije, te stoga predstavlja jednu od najsloženijih ljudskih bolesti.

Protein RRAS2 (engl. *Ras-related protein R-Ras2*) sudjeluje u kontroli proliferacije, preživljavanja i migracije stanica te je primjer proteina čijom prekomjernom ekspresijom može doći do pojave tumora.⁴ Kao i ostale male GTPaze, RRAS2 alternira između GTP-vezanog odnosno aktivnog, i GDP-vezanog odnosno inaktivnog stanja. Dugotrajnim aktivnim stanjem, npr. uslijed mutacija, ili prekomjernom ekspresijom proteina, potiče se proliferacija stanica koja može dovesti do razvoja tumora. Homolog proteina RRAS2, kao i homolozi brojnih drugih ljudskih gena povezanih s nastankom raka, pronađeni su kod evolucijski puno starijih organizama – spužvi.⁵

Spužve (Porifera) su najjednostavnije građene i funkcionalno organizirane mnogostanične životinje (carstvo Metazoa). S obzirom da ne grade prava tkiva ni organe svrstane su u posebnu skupinu Parazoa. Pretpostavlja da su se prve odvojile od zajedničkog pretka svih Metazoa prije 800 milijuna godina.^{1,6,7} Zbog toga proučavanje spužvi omogućava jedinstveni uvid u rani evolucijski razvoj životinja.⁸ Osim toga, analizom genoma i transkriptoma spužvi otkriveno je kako su geni spužvi uvelike strukturno i funkcijski očuvani u odnosu na gene kompleksnijih višestaničnih životinja poput kralježnjaka.^{9,10} Proučavanje gena povezanih s nastankom raka u jednostavnijim organizmima, poput spužvi, pruža nam bolji uvid u njihove osnovne stanične funkcije. Također, proučavanje raka iz evolucijske perspektive inovativan je

pristup boljem razumijevanju mehanizama nastanka raka, budući da se rak pojavio zajedno s pojavom višestaničnosti.^{1,5}

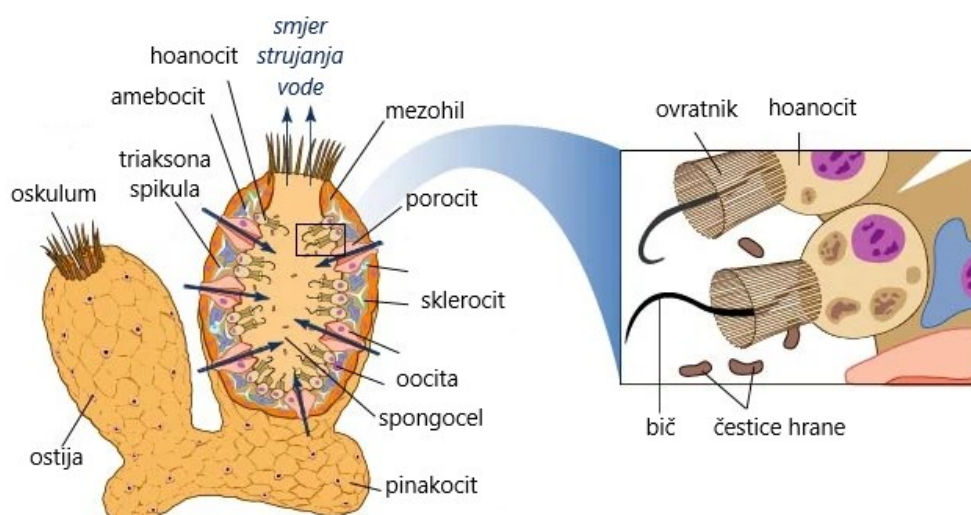
Cilj istraživanja diplomskog rada bio je okarakterizirati protein RRAS2 iz spužve *Eunapius subterraneus* u svrhu boljeg razumijevanja osnovne fiziološke funkcije ovog proteina povezanog s nastankom raka prije njegove diverzifikacije i specijalizacije. Pritom su korištene brojne metode poput lančane reakcije polimerazom, kloniranja cDNA koja kodira za protein RRAS2 u odgovarajući ekspresijski vektor pomoću specifično dizajniranih početnica, prekomjerne ekspresije i pročišćavanja proteina RRAS2 te određivanja njegove intrinzične GTPazne aktivnosti.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Spužve

2.1.1. Osnovna građa tijela spužvi

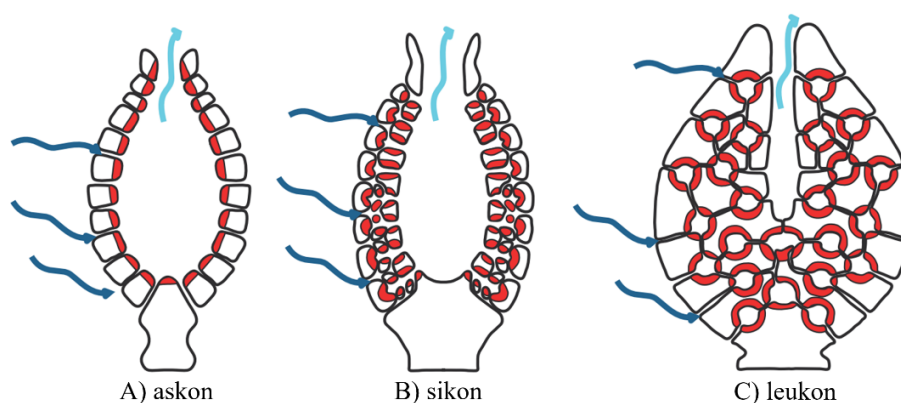
Spužve (Porifera) su sesilne, uglavnom morske, višestanične životinje kod kojih sve životne funkcije obavljaju specijalizirane stanice s visokim stupnjem nezavisnosti. Raspored pojedinih tipova stanica dijeli spužve u dva sloja, unutarnji (hoanoderma) i vanjski (pinakoderma), između kojih je želatinozni matriks (mezohil). Unutarnji sloj čine bičaste stanice s ovratnikom od mikrovila (hoanociti). Oni filtriraju planktonske organizme i sitni detritus koji se nalazi u šupljini (spongocelu) te su osnova akvifernog sustava spužvi. Mezohil čine skeletni elementi te različiti tipovi pokretnih amebocita. Prema funkciji amebociti mogu biti skleroblasti (grade skelet od spikula), kolenociti (proizvode fibrilarne kolagene, npr. spongin), miociti (kontrakcije oskuluma), arheoblasti (totipotentne stanice), kromociti (sadrže pigmente) te desmociti (žljezdana uloga). Pinakodermu sačinjavaju cjevaste stanice (porociti) i epidermalne pločaste stanice (pinakociti). Porociti svojim stezanjem i opuštanjem reguliraju jačinu protoka vode kroz ulazne kanaliće (ostije).⁶ Na slici 1 prikazan je osnovni plan građe tijela spužvi.



Slika 1. Plan građe tijela spužvi (Porifera). Preuzeto i prilagođeno sa ref. 11.

2.1.2. Morfološka raznolikost spužvi

Evolucijski razvoj spužvi je bio usmjeren ka povećanju površine za filtraciju hranjivih čestica, tako da spužve prema kompleksnosti akvifernog sustava mogu biti askonoidne, sikonoidne i leukonoidne (slika 2). Kod najjednostavnije građenih, askonoidnih spužvi, voda sa suspendiranim hranjivim česticama ulazi kroz porocite u spongocel obložen hoanocitama. Daljnji razvoj vodio je ka vodoravnom nabiranju stijenke tijela, odnosno formiranju epidermalnih džepova obloženih hoanocitama. Takvu građu imaju sikonoidne spužve. Kod leukonoidnih spužvi dolazi do dodatnog, vertikalnog nabiranja tj. formiranja bičastih komorica umjesto spongocela.^{6,12}



Slika 2. Osnovni građevni oblici spužvi – askon (A), sikon (B) i leukon (C). Plave strelice označavaju smjer protoka vode, a crvenom bojom je označena hoanoderma. Preuzeto i prilagođeno sa ref. 13.

2.1.3. Razmnožavanje spužvi

Spužve se mogu razmnožavati nespolno i spolno. Nespolno se mogu razmnožavati stvaranjem gemula ili redukcijskih tijela u nepovoljnim uvjetima. Nakupljanjem arheocita i trofocita u loptaste nakupine dolazi do formiranja gemule, koja se nakon toga odvaja od matične jedinice i razvija u zasebni organizam. Drugim načinom spužve smanjuju svoje tijelo u loptastu strukturu do pojave povoljnih uvjeta. Spolno se spužve razmnožavaju stvaranjem spermija (iz hoanocita) i jajnih stanica (iz hoanocita ili arheocita), odnosno spužve su hermafroditi (protoandrija ili protoginija). Kod oviparnih vrsta gamete se akvifernim sustavom oslobađaju u vodu i oplodnja se događa u slobodnoj vodi. Nakon toga slijedi razvoj planktonske ličinke (amfiblastule ili parenhimule), njezino prisanjanje za podlogu i razvoj nove jedinice. Kod viviparnih vrsta spermatozoidi ulaze u akviferni sustav susjednih jedinki, pronalaze oocitu i oplodnja se dešava u mezohilu. Postoji i treći način, opisan kod razreda Calcarea, kod kojeg hoanociti hvataju spermatozoide, zatvaraju ih u intracelularni vezikul, hoanociti gube bičeve te kao amebociti migriraju do oocite.^{6,8,12}

2.1.4. Klasifikacija i biološka raznolikost spužvi

Do danas je opisano preko 10 000 vrsta spužvi i od toga oko 300 slatkovodnih.¹⁴ Najčešće se dijele prema građi skeleta u razrede Calcarea (vapnenjače), Hexactinellida (staklače) i Demospongia (kremenorožnjače), a od nedavno se izdvaja i razred Homoscleromorpha.¹²

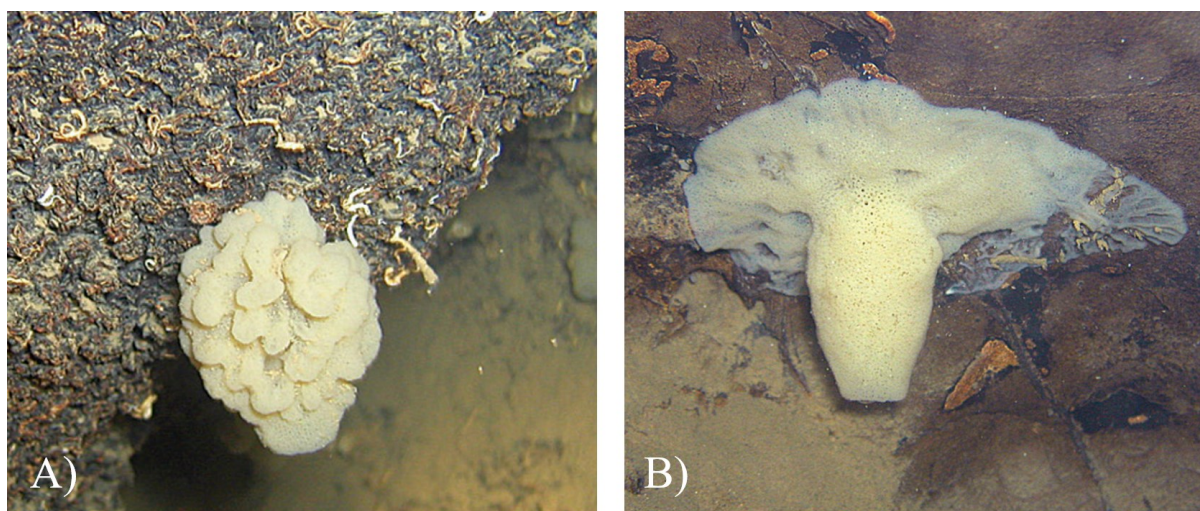
Sa 85 % vrsta najrasprostranjeniji i najbrojniji je razred Demospongia. Skelet im je najčešće sačinjen od spikula sa SiO₂ povezanih sponginoznim nitima, dok je nekima skelet samo organskog podrijetla tj. od spongina (*Spongia officinalis* (obična spužva) i *Aplysina aerophoba* (promjenjiva sumporača)). U Jadranu se mogu naći i *Geodia cydonium* (velika kremenjača), *Tethya aurantium* (morska naranča), *Suberites domuncula* (narančasta plutača), *Cliona viridis* te brojne druge. Ovom razredu pripadaju jedine slatkovodne spužve (porodica Spongillidae), među kojima su značajne *Spongilla lacustris* i *Ephydatia fluviatilis*. Pripadaju im i dubokomorske karnivorne spužve poput *Asbestopluma hypogea*.

Kod Calcarea skelet grade spikule od kalcijeva karbonata. Neki od predstavnika ove skupine u Jadranu su pripadnici roda Clathrina (askonoidne) te sikonoidne vrste *Sycon raphanus* i leukonoidne *Leuconia aspera*. Skelet razreda Hexactinellida, kao što samo ime govori, grade šestoosne spikule od silicijeva dioksida, a tijelo im je specifično građeno u obliku vrča. Jedan od predstavnika ove skupine je *Euplectella aspergillum* (venerina košarica).⁶

2012. godine na temelju molekularne analize izdvojen je i četvrti razred spužvi, Homoscleromorpha. Spužve iz ovog razreda prije su bile svrstavane kao porodica ili podred u razredu Demospongia. Homoscleromorpha su najmanja skupina, a razlikuju se od drugih razreda po prisutnosti bazalne membrane koja dovodi do morfogeneze tkiva sličnije drugim životinjama (Eumetazoa). Spikule, ako ih imaju, su tetraaksijalne, a osim u skleratoblastima mogu se proizvoditi i u epitelnim stanicama.¹²

2.1.5. *Eunapius subterraneus* – ogulinska špiljska spužvica

Ogulinska špiljska spužvica *Eunapius subterraneus* jedina je podzemna slatkovodna spužva na svijetu, ujedno i endem Hrvatske. Pripada porodici slatkovodnih spužvi Spongillidae, odnosno razredu Demospongiae. Iako je prvi puta pronađena još 1977. (špilja Zala, okolica Ogulina), nije potpuno opisana do 1986. godine. Dvije podvrste, tipska ogulinska špiljska spužvica *Eunapius subterraneus subterraneus* i rudnička špiljska spužvica *Eunapius subterraneus mollisparpanis* dosad su zabilježene na 21 lokalitetu.



Slika 3. *Eunapius subterraneus* (ogulinska špiljska spužvica). A) jajoliki oblik habitusa, B) tanjurasti oblik habitusa. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 15.

Kao stigobiont ima specifična obilježja špiljskih organizama poput depigmentacije te vjerojatno usporenog metabolizma i promijenjene fiziologije. Stabilnost abiotičkih čimbenika poput temperature (7-11 °C), kao i manjak kompetitora pričvršćenih za podlogu, poput algi, prednosti su koje im nude špiljski uvjeti. Žive pričvršćene za stijene špilje ili na kamenitoj podlozi, u zoni slabijeg strujanja vode i skoro uvijek u zoni potpune tame. Kao i kod drugih predstavnika kremenorožnjača, skelet im je građen od mreže spikula povezanih nitima spongina, a spikule su velike i malo zakrivljene. Nespolno se razmnožavaju formiranjem gemula u malim skupinama na podlozi.

Kod podvrste *E. s. subterraneus* opisana su dva oblika habitusa. Prvi oblik habitusa je jajolik do valjkast, a površina im je nepravilno izbrazdana. Drugi oblik, tanjurasti, karakterizira baza kojom se pričvršćuju za podlogu, dok je na drugom dijelu tijela veliki oskulum. Spužvice tanjurastog habitusa imaju pravilniju površinu tijela bez brazda (slika 3). Oblik habitusa vjerojatno određuje brzina strujanja vode špiljskim kanalima.^{13,15,16}

2.1.6. Spužve kao modelni organizmi

Spužve su idealni modeli za istraživanje prijelaza od jednostaničnih organizama prema „pravim“ višestaničnim životinjama, s obzirom da su skupina koja se prva odvojila od drugih životinja te posjeduju karakteristike jednostavnih jednostaničnih Protista i složenijih životinja. Ernest Haeckel prvi je uočio sličnosti između građe tijela spužvi razreda vapnenjača i Cnidaria, smatrajući hoanoderm homolognom strukturom gastroderma, a spužvin pinakoderm homolognom strukturom ektoderma. Analiza ekspresije gena uključenih u specijalizaciju

životinjskog endomezodema, eksprimiranih u hoanodermu podržava Haeckelovu ideju da je spužvin hoanoderm homologan s gastrodermisom žarnjaka, iako neki i dalje smatraju da su navedene strukture evoluirale zasebno.⁸ Pretpostavlja se i da su hoanociti spužvi i Choanoflagellata, jednostaničnih i kolonijalnih Protista homologne strukture, na temelju sličnosti načina života, morfologije i totipotentne prirode oba oblika stanica. Ipak, filogenetski odnosi između spužvi te Protista i viših Eumetazoa, odnosno pitanje homologije struktura, ostaje otvoreno.^{8,7}

Analizom genoma i transkriptoma spužvi identificirani su i opisani brojni homolozi proteina povezanih s proliferacijom i napretkom staničnog ciklusa. Otkriveno je i da brojni od njih pokazuju veći stupanj očuvanosti sa kralježnjacima, u odnosu na homologe iz bližih organizama, npr. *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster*.^{17,18} Neki od njih su protein-kinaze, odnosno protein-tirozin-kinaze (SRC, BTK) koje kontroliraju prijenos signala unutar stanica. Također, identificirani su i homolozi regulatora stanične apoptoze (FAU, ribosomski proteini), supresora metastaziranja (NME1), tumor-supresorskih gena (p53) te onkogena (myc, Ras) i dr. te je uočeno kako su njihova svojstva uvelike očuvana kod spužvi.^{1,9,10,17-22}

Poznato je da mutacijom ili promjenom aktivnosti gena uključenih u staničnu suradnju dolazi do razvoja raka, koji se i sam vjerojatno razvio s pojavom višestaničnosti.¹⁰ Bolje razumijevanje biokemijskih svojstava i temeljnih fizioloških funkcija homologa gena kod jednostavnijih životinja, bez tkiva i pravih organa, potencijalno može unaprijediti i naše razumijevanje funkcije homolognih proteina kod čovjeka.²⁰

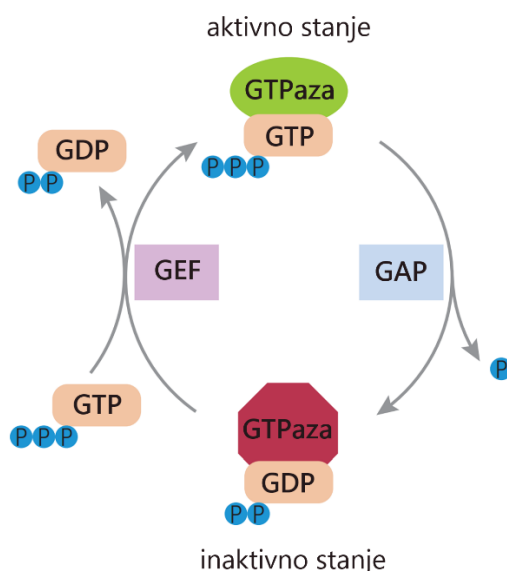
Spužve mogu biti predmet istraživanja i zbog svoje sposobnosti regeneracije pojedinih dijelova tijela, ali i cijelog organizma iz zasebnih stanica. Zanimljivo je i kako spužve izlučuju mnogobrojne bioaktivne tvari, koje osim što imaju ekološku ulogu mogu ciljano djelovati na aktivnosti različitih signalnih puteva staničnog ciklusa te je zamijećeno kako mogu imati antitumorska svojstva u kulturi ljudskih stanica. Često su takvi sekundarni metaboliti u stvari produkti simbiotskih mikroorganizma spužvi.^{1,8}

2.2. Protein RRAS2

2.2.1. Struktura i mehanizam djelovanja proteina RRAS2

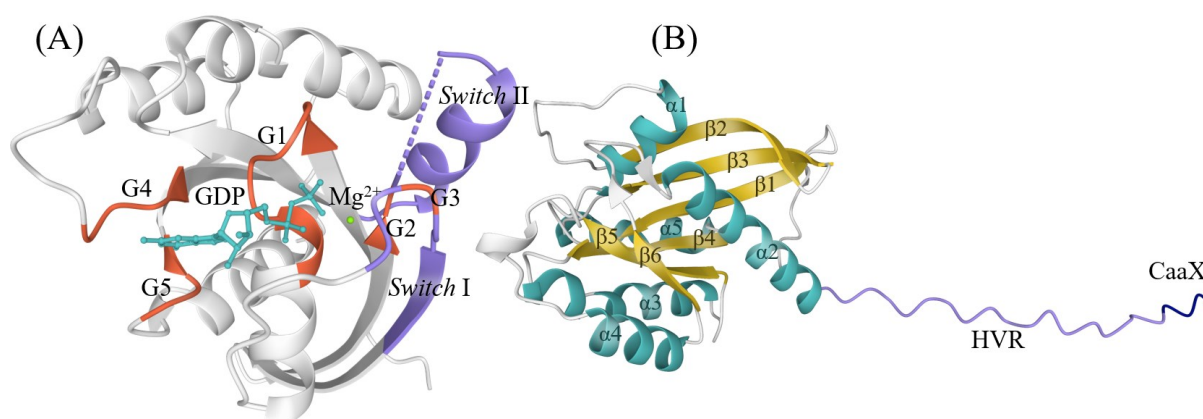
RRAS2 (poznat i kao TC21) član je superobitelji proteina Ras, malih GTPaza koje reguliraju niz staničnih procesa, uključujući proliferaciju, diferencijaciju, unutarstanični transport, regulaciju proteina citoskeleta te staničnu smrt (apoptozu).²³ Evolucijski je najsirođniji drugim članovima podobitelji proteina RRAS (RRAS/RRAS1 i MRAS/RRAS3), ali dijeli brojne funkcije i mehanizme s „klasičnim“ proteinima RAS (HRAS, NRAS i KRAS).²⁴

GTPaze djeluju kao „molekulski prekidači“, kružeći između stanja vezanog na gvanozin-5'-trifosfat (GTP, aktivno stanje) i stanja vezanog na gvanozin-5'-difosfat (GDP, inaktivno stanje) (slika 4).²⁵ S obzirom da pokazuju vrlo visok afinitet prema nukleotidima gvanina te hidroliziraju GTP jako sporo (10^{-3} - 10^{-6} s⁻¹), regulacija izmjene tih dvaju stanja odvija se pomoću proteina GEF (engl. *guanin nucleotide exchange factors*) i GAP (engl. *GTPase activating proteins*). Oni ubrzavaju intrinzičnu aktivnost GTPaze za 5 do 10 redova veličine, ponekad i više. GEF proteini aktiviraju GTPaze čime dolazi do otpuštanja GDP-a iz aktivnog mjesta i kako je koncentracija GTP-a u stanici deseterostruko viša od koncentracije GDP-a, GTP se odmah nakon toga može vezati za slobodnu regiju vezanja nukleotida. GAP proteini ubrzavaju hidrolizu GTP-a čime se otpušta anorganski fosfat (P_i). GDP ostaje vezan za GTPazu koja je tada u inaktivnom stanju.^{26,27}



Slika 4. Ciklus kruženja GTPaza između aktivnog GTP-vezanog stanja i inaktivnog GDP-vezanog stanja. Proteini GEF (engl. *guanin nucleotide exchange factors*) i GAP (engl. *GTPase activating proteins*) ubrzavaju tu izmjenu. Preuzeto i prilagođeno sa ref. 26.

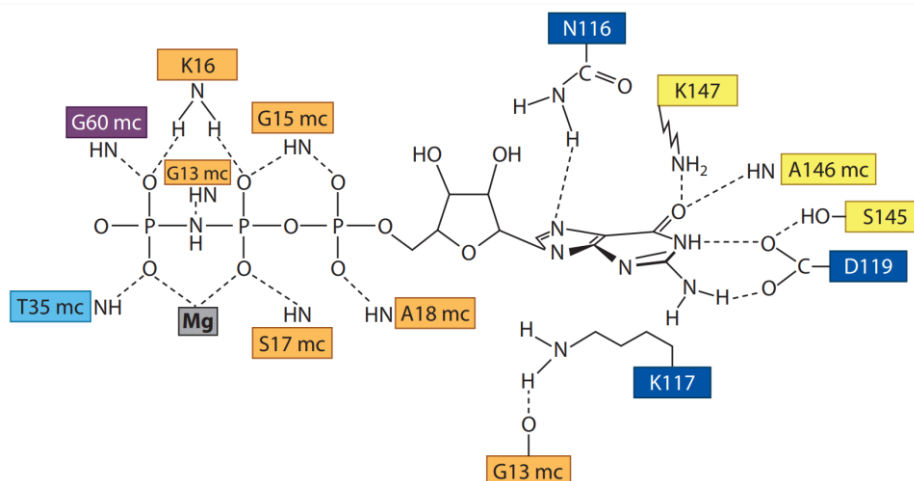
Protein RRAS2 (204 aminokiselinska ostatka), za kojeg kodira istoimeni gen, sastoji se od GTP-vezne domene (G-domene) i varijabilne regije na C-terminalnom kraju. Primarnu strukturu G-domene čini pet G motiva (G1-G5) koji kodiraju za visokoočuvane ostatke odgovorne za visoki afinitet prema nukleotidima i hidrolitičku aktivnost. Sekundarnu strukturu G-domene čini pet α -zavojnica (α 1- α 5) i šest β -ploča (β 1- β 6) (slika 5). Varijabilni C-terminalni kraj sastoji se od hipervarijabilne regije (HVR) i CaaX motiva (detaljnije objašnjeno u poglavlju 2.2.2.).



Slika 5. Sekundarna struktura proteina RRAS2 u GDP-vezanom stanju. Na slici (A) crveno su označeni G1-G5 motivi G domene. Ljubičastom bojom su označene *Switch I* i *Switch II* regije. Ligand (Mg^{2+} ion) označen je zelenom bojom. Tirkiznom bojom označen je supstrat (GDP). Na slici (B) svijetlo ljubičastom bojom označena je hipervarijabilna regija (HVR), a tamno plavom CaaX motiv na C-terminalnom kraju proteina. Kreirano pomoću molstar.org; korištene strukture PDB:2ERY (A) i AlphaFold:P62070 (B).

Izmjena aktivnog i inaktivnog stanja posredovana je konformacijskim promjenama u mobilnim regijama *Switch I* (α 1/ β 1 petlja) i *Switch II* (β 3/ α 2 petlja, α 2 i α 2/ β 4 petlja). G1 motiv (GxxxxGKS/T; x – bilo koja aminokiselina) kodira za fosfat-vezujuću petlju. P-petlja fiksira fosfatne skupine nukleotida preko vodikovih interakcija NH-skupina okosnice polipeptida i bočnog ogranka Lys16. G2 motiv (xTx) pripada *Switch I* regiji, a taj treoninski ostatak ostvaruje vodikove interakcije sa γ -fosfatom te sudjeluje u koordinaciji Mg^{2+} iona u GTP-vezanom stanju. Kod klasičnog proteina H-Ras očuvani Gly60 (odgovara Gly68 kod RRAS2) iz regije *Switch II* (G3 motiv, DxxG) također je uključen u stabilizaciju Mg^{2+} iona i vezanje γ -fosfata. G4 (N/TKxD) i G5 (C/SAK/L/T) motivi odgovorni su za specifično prepoznavanje i vezanje gvanin dušičnih baza. Na slici 6 prikazane su interakcije aminokiselinskih ostataka G-domene klasičnog HRAS proteina s gvanozin-5'-difosfatom.

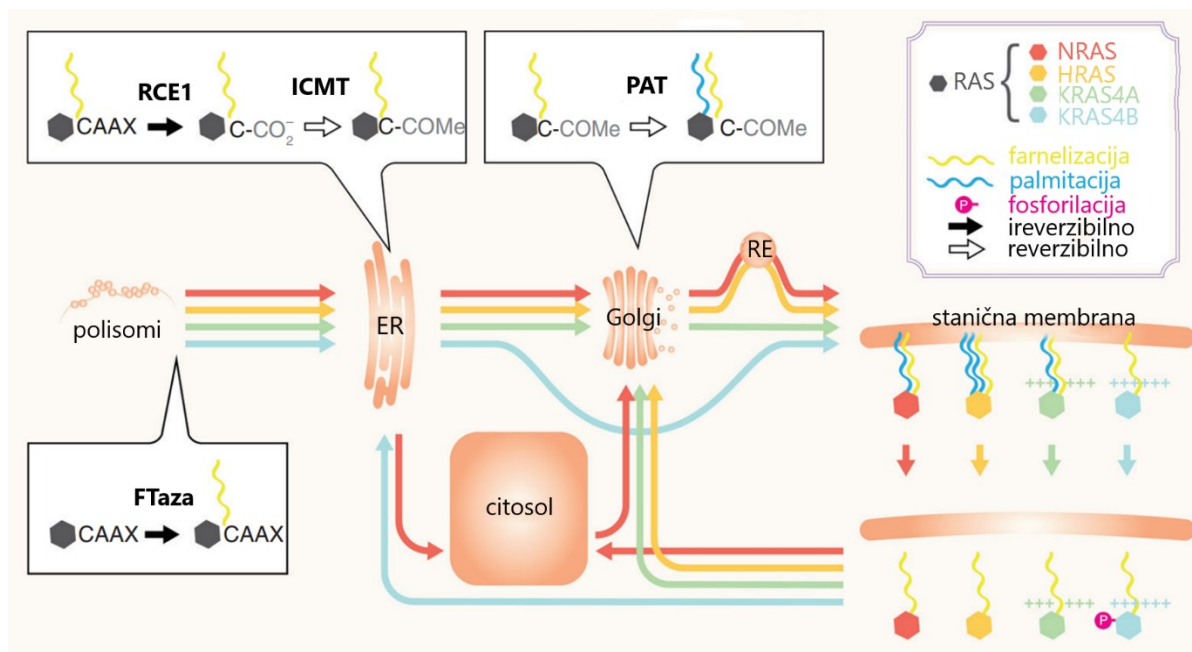
Hidroliza GTP-a odvija se kroz nukleofilni napad molekule vode na γ -fosfat uslijed čega dolazi do prekida fosfo-monoesterske veze i odvajanja $P\gamma O_3$ skupine sa GDP-a. Nakon toga slijedi vraćanje *Switch* regija u relaksiranu konformaciju, te se takva promjena naziva mehanizam „napete opruge“ (engl. *loaded spring mechanism*).²⁷⁻³⁰



Slika 6. Shematski prikaz interakcija proteina G (H-Ras) sa GTP-om. Označeni su aminokiselinski ostaci G-domene (G1 – narančasta, G3 – ljubičasta, G4 – tamno plava, G5 – žuta) te *Switch* I regije (svijetlo plava). Preuzeto s ref. 29.

2.2.2. Posttranslacijske modifikacije proteina RRAS2

Vežanje proteina Ras za staničnu membranu posredovano je serijom posttranslacijskih modifikacija zahvaljujući specifičnom CaaX motivu (C=cistein, aa=alifatska aminokiselina, X=terminalna aminokiselina) na njihovom C-terminalnom kraju.²⁸ Nakon translacije, RRAS2 može biti enzimski izopreniliran kao i klasični proteini RAS (H-,K-,NRAS) dodatkom C-14 farnezil skupine enzimom farnezil-transferazom ili dodatkom 20-C geranilgeranila enzimom geranilgeranil-transferazom (slika 7). Enzim se veže na RRAS2 u citosolu i dodaje lipidnu skupinu preko sulfidne (tioeterske) veze na cisteinski aminokiselinski ostatak CaaX motiva. Izoprenilacijom se povećava hidrofobnost proteina, a time i afinitet za endoplazmatski retikulum, čime se omogućava daljnja modifikacija proteina. CaaX sekvenca dalje postaje supstrat za endoproteazu RCE1 koja uklanja -aaX tripeptid. Zatim enzim ICMT esterificira α -karboksilnu skupinu, neutralizirajući negativni naboj na C-terminalnom kraju. Samo izoprenilirani proteini puno se slabije vežu za staničnu membranu tako da se često dodaje i reverzibilni sekundarni dodatak, 16-C palmitinska skupina. Kod proteina RAS cisteinski ostatak je obično palmitiran preko sulfidne veze (*S*-palmitacija).^{31,32} Tumor-supresorski protein Sirt6 regulira aktivnost proteina RRAS2 deacetilacijom lizinskih ostataka na C-terminalnom kraju, vjerojatno prijenosom acetilne skupine s Cys199.³³



Slika 7. Posttranslacijske modifikacije klasičnih proteina RAS (NRAS, KRAS i HRAS). FTaza – farnetil-transferaza, RCE1 – Ras-konvertirajući enzim 1 (proteaza), ICMT – izoprenilcisteinkarboksimetil-transferaza, PAT – palmitoil-aciltransferaza, ER – endoplazmatski retikulum, Golgi – Golgijev aparat, RE – reciklirajući endosom. Preuzeto i prilagođeno sa ref. 31.

Zabilježeno je i kako MAPK-kinaze ERK1/2 posttranslacijski modificiraju RRAS2 fosforilacijom na aminokiselinskim ostacima Ser186 (HVR) čime se ne mijenja njeno lokalizacija u stanici nego povećava aktivacija, a time i onkogeni potencijal.³⁴

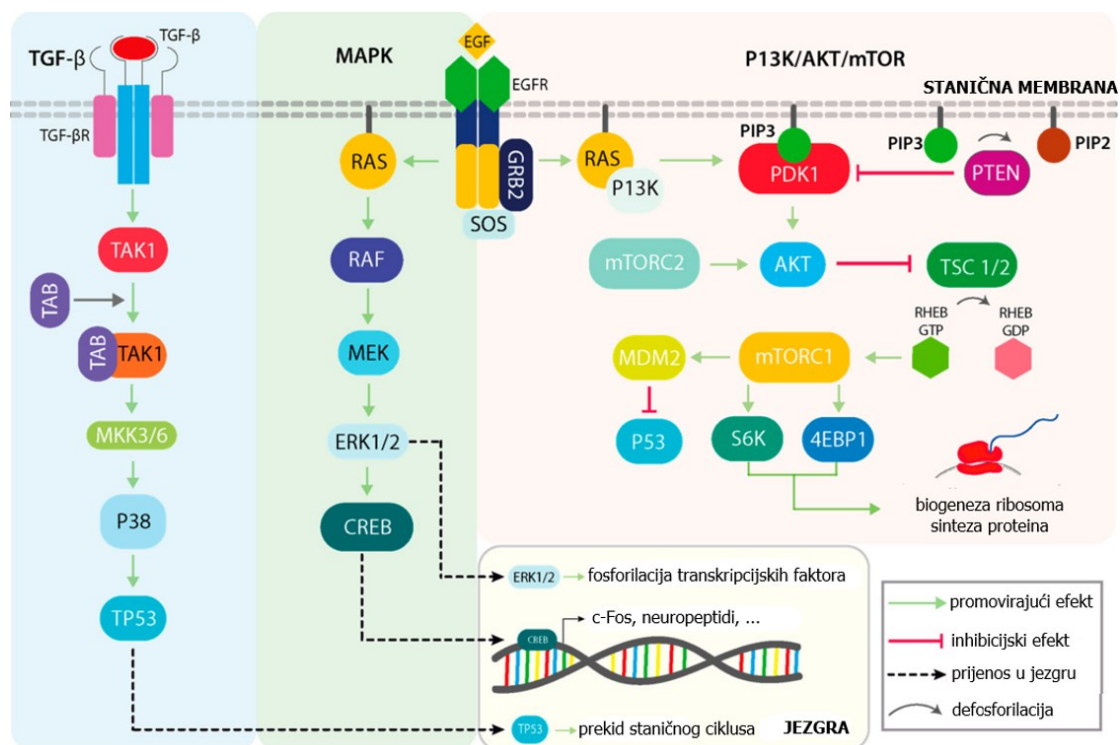
2.2.3. Signalne kaskade u kojima sudjeluje RRAS2

Klasični proteini Ras i RRAS2 pokazuju međusobno visoku sačuvanost aminokiselinskog slijeda, stoga dijele i brojne regulatore ciklusa izmjene između inaktivnog i aktivnog stanja. Zajednički proteini GAP su Gap1m, p120, NF-1 i R-Ras GAP, a GEF-ovi RasGRF1/CDC25, RasGRF2/CDC42, C3G, CalDAG-GEFI-III, SOS1, RasGRP1-3.³⁵⁻³⁷ Sukladno tome, iako slabije, RRAS2 može aktivirati RAS signalne puteve poput Raf1/MEK/Erk i PI3K/Akt/mTOR (slika 8). Ras/Raf/MEK/Erk signalnom kaskadom faktori rasta reguliraju ekspresiju gena i staničnu proliferaciju, vezanjem na receptore iz skupine tirozinskih protein-kinaza (RTK). Nakon transautofosforilacije receptora, slijedi aktivacija RAS-a, koji dalje aktivira serin/reonin-kinazu Raf1/CRAF. Aktivirani Raf (kinaza MAPK-kinaze) fosforilira i MEK (MAPK-kinaza). MEK zatim fosforilira, odnosno aktivira kinazu ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*). ERK1/2 dalje može aktivirati transkripcijske faktore u

jezgri stanice. Osim kinaze ERK, u mitogen-aktivirajuće protein-kinaze (MAPK) ubrajamo i p38 i c-Jun NH₂-terminalnu kinazu (JNK).^{38,24}

RRAS2 može ostvarivati interakcije s fosfatidilinozitol-3-kinazom (PI3K) te aktivirati njezine nizvodne signalne efektore, protein-kinazu B (PKB ili Akt) i mTOR (ciljna molekula rapamicina u sisavaca). PI3K/Akt/mTOR signalna kaskada je također aktivirana preko receptora na površini stanice (RTK) i RAS-a te njezina aktivacija dovodi do sinteze proteina uključenih u kontrolu rasta, proliferacije i stanične smrti. PI3K fosforilira fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat (PIP₂) do PIP₃ koji omogućuje translokaciju Akt-a do stanične membrane. Akt fosforilira niz supstrata među kojima je i mTOR koji kontrolira razne stanične procese, uključujući i translaciju proteina.^{38,39}

Još jedan signalni put kojim RRAS2 može potaknuti onkogenu transformaciju stanice je onaj posredovan MAPK p38. Pri normalnim uvjetima TGF- β aktivira protein-serin-kinazu 1 (TAK1) što dovodi do aktivacije p38, JNK i NF- κ B, a time i prekida staničnog ciklusa. Uočeno je kako aktivacijom mutiranog RRAS2 stanice gube osjetljivost na inhibitor rasta TGF- β što inducira onkogenu transformaciju.⁴⁰



Slika 8. Paralelni prikaz fizioloških uloga MAPK (proteinske kinaze aktivirane mitogenom) i PI3K/Akt/mTOR signalnih puteva. PI3K – fosfatidilinozitol-3-kinaza, AKT – protein-kinaza B, mTOR – engl. *mammalian target of rapamycin*, RAF – RAF onkogen, MEK – MAPK/ERK protein-serin-kinaza 1/2, RTK – receptor tirozinskih protein-kinaza. PTEN – fosfataza i homolog tenzina (negativni regulator). Preuzeto i prilagođeno sa ref. 41.

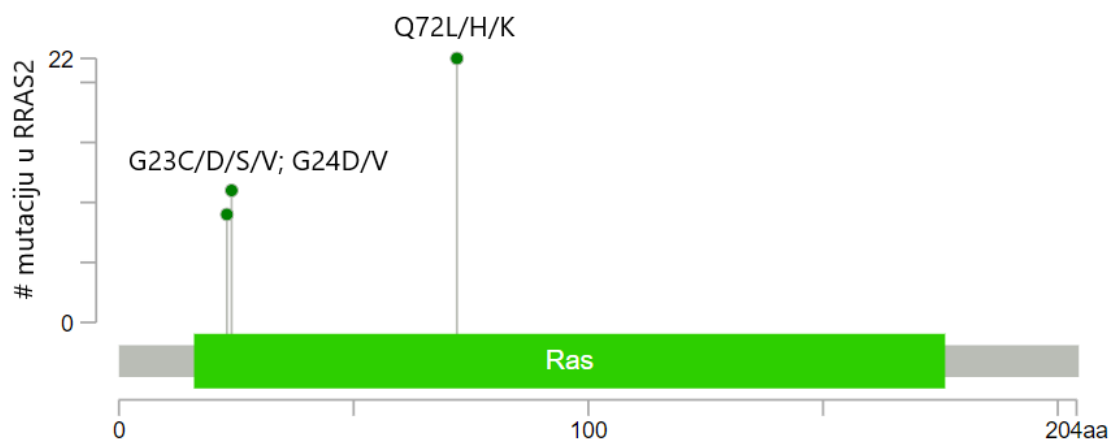
2.2.4. Uloga RRAS2 u onkogenezi i Noonanovom sindromu

RRAS2 sudjeluje u regulaciji mnogobrojnih staničnih procesa, kao što su stanična proliferacija, preživljavanje i migracija stanica, a njegova funkcijska disregulacija povezana je s onkogenezom.²⁴ Iako je fiziološka uloga proteina RRAS2 relativno slabo istražna, utvrđeno je kako sudjeluje u pravilnom funkcioniranju središnjeg živčanog, imunološkog i krvožilnog sustava. Na primjer, RRAS2 potreban je za preživljavanje populacija zrelih T i B limfocita jer interagira s podjedinicama receptora T i B stanica (TCR i BCR) kroz aktivaciju PI3K signalnog puta. Također, važan je čimbenik za efikasan imunski odgovor germinalnih centara jer sudjeluje u regulaciji metabolizma B limfocita. Germinalni centri su privremene strukture nastale interakcijom B i T stanica nakon prepoznavanja antigena u perifernim limfoidnim organima. Nedavno je pokazano kako prekomjerna ekspresija divljeg tipa RRAS2 doprinosi razvoju kronične limfocitne leukemije kod miševa, a razvoj bolesti moguć je i kod ljudi.^{39,42}

S druge strane, mutirane forme superobitelji proteina Ras mogu dovesti do značajnog smanjenja intrinzične aktivnosti, onemogućavanja inaktivacije proteina Ras, a samim time i indukcije onkogenske transformacije. Nedavno je pokazano i kako mutirana forma RRAS2^{q72L} može izazvati razvoj širokog spektra tumora te da sudjeluje u inicijaciji i održavanju tumora.^{43,44}

RRAS2 je uključen i u razvoj Noonanovog sindroma (NS), razvojnog poremećaja kojeg obilježavaju karakteristične deformacije lica, nizak rast, različiti kardiološki defekti te niz drugih abnormalnosti. Tri varijante proteina RRAS2 s mutiranim aminokiselinskim ostacima Gly22-Gly26, Ala70 i Gln72 nađene kod osoba s NS, a prethodno su identificirane kod različitih tipova tumora. Strukturnom analizom utvrđeno je da su mutirani aminokiselinski ostaci lokalizirani u blizini regije vezanja nukleotida te su uključeni u stabilizaciju *Switch* regija, preko kojih se ostvaruju interakcije s efektorima. Opaženo je i kako putem aktivacije RAS/MAPK kaskade utječu na staničnu morfologiju i raspored citoskeleta. Kod RRAS2^{Ala70Thr} varijante (regija *Switch* II) biokemijskom analizom je potvrđeno da dolazi do povećane intrinzične i GEF aktivnosti te smanjene hidrolize GTP-a u usporedbi s divljim tipom.^{4,45}

Mutacije povezane sa razvojem tumora i Noonanovog sindroma prikazane su na slici 9.



Slika 9. Mutacije u genu *rras2* povezane s razvojem raka i Noonanovog sindroma. Izrađeno pomoću *cBioPortal.org.*, ref. 46.

RRAS2 jedini je član porodice RRAS koji pokazuje sposobnost transformacije usporedivu s klasičnim proteinima Ras, no za razliku od klasičnih proteina Ras, mutacije u genima koji kodiraju za članove porodice RRAS rijetko se javljaju kod karcinoma čovjeka. Umjesto toga, prekomjerna ekspresija divljeg tipa proteina najčešće je povezana sa rakom. Prekomjerna ekspresija RRAS2 zabilježena je kod raka dojke, usne šupljine, jednjaka, kože, središnjeg živčanog sustava te limfoma i osteosarkoma.⁴²

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Osnovni materijali i kemikalije

Glicin (Sigma-Aldrich), Tris baza (Sigma-Aldrich), Tween 20 (Sigma-Aldrich), izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid, IPTG (Sigma-Aldrich), natrijev dodecil sulfat, SDS (Sigma-Aldrich), akrilamid:bisakrilamid u omjeru 29:1 (Sigma-Aldrich), amonijev persulfat, APS (Serva), *N,N,N,N*-tetrametiletilendiamin, TEMED (Sigma-Aldrich), agaroza (Sigma-Aldrich), BD Bacto Agar (Becton, Dickinson and Company), kanamicin sulfat (Sigma-Aldrich), redestilirani glicerol (Gram-mol), metanol (Gram-mol), 96 %-tna octena kiselina (Gram-mol), ditiotreitrol, DTT (Sigma-Aldrich), imidazol (Sigma-Aldrich), etilendiaminotetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat, KOMPLEKSAL III (Sigma-Aldrich), β -merkaptotanol (Merck), kalcijev klorid dihidrat (Kemika), magnezijev klorid heksahidrat (Kemika), natrijev klorid, krist. (Kemika), apsolutni etanol (Gram-mol).

3.1.2. Pufferi

- TAE puffer (1 mM Tris baza, 1 mM octena kiselina, 1 mM EDTA, pH 8,0)
- CaCl_2 puffer za kemijsku transformaciju bakterija (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl_2 , 10 mM CaCl_2)
- TBST puffer (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH = 7,5, 0,1 % Tween 20)
- puffer za proteine (500 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DTT), korišten prilikom male indukcije
- pufferi za izolaciju proteina:
 - puffer za nespecifično vezanje proteina, 10 mmol/L (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol)
 - puffer za nespecifično vezanje proteina, 20 mmol/L (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol)
 - puffer za nespecifično vezanje proteina, 40 mmol/L (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 40 mM imidazol)

- pufer za nespecifično vezanje proteina, 300 mmol/L (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 300 mM imidazol)
- pufer za pohranu proteina (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10 % glicerol)
- pufer za elektrotransfer (3,03 g Tris baza, 14,4 g glicin, 20 % metanol)
- 10x pufer za elektroforezu na SDS-poliakrilamidnom gelu (30 g/L Tris, 144 g/L glicin, 10 g/L SDS)
- pufer za odbojavanje poliakrilamidnog gela (25 % metanol, 7 % octena kiselina)

3.1.3. Proteini, enzimi i koenzimi

Q5 DNA-polimeraza s odgovarajućim puferima (NEB), restrikcijski enzimi *NdeI* i *BamHI* s odgovarajućim puferima (Thermo Fisher Scientific), ElectroLigase (NEB), *Premix Ex Taq* (TaKaRa), lizozim (Sigma-Aldrich).

3.1.4. Boje i markeri

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck), etidijev bromid (Boehringer Mannheim), 6x Gel Loading Dye, Purple (Thermo Fisher Scientific), 4x pufer za nanošenje proteinskih uzoraka (200 mM Tris-HCl (pH 6,8), 8 % SDS, 40 % glicerol, 4 % β -merkaptotanol, 50 mM EDTA, 0,08 % bromfenol plavo), bromfenol plavo (Serva), *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio-Rad). *GeneRulerTM DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific), *MassRulerTM DNA Ladder Mix* (Thermo Fischer Scientific).

3.1.5. Plazmidi

Korišten je ekspresijski vektor pET-28b(+) (Novagen). Plazmid pET28b omogućava ekspresiju rekombinantnih proteina s histidinskim privjeskom (His₆ tag) na N- ili C-terminalnom kraju što pomaže prilikom izolacije i pročišćavanja proteina. Gen za rezistenciju na kanamicin, KanR, omogućava selekciju plazmida. Ishodište replikacije *ori* omogućava replikaciju plazmidne DNA. RBS (engl. *ribosome binding site*) je mjesto vezanja ribosoma, kako bi se mRNA mogla prevesti u proteinsku sekvencu.

3.1.6. Oligonukleotidi i nukleinske kiseline

- izolirana cDNA iz ogulinske špiljske spužvice *Eunapius subterraneus*
- dNTP-ovi (10 μ M, TaKaRa)
- početnice za vektor pET28b:
 - T7-promotor: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
 - T7-terminator: 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'
- početnice za umnažanje fragmenta sa cDNA:
 - F_ERRAS2_start : 5' ACGATGGCGGCCAACAAAGACCTAAC 3'; 26 nukleotida
 - R_ERRAS2_stop : 5' GGAGCTCACAGAATTACACATTTCTTC 3'; 27 nukleotida
- početnice za reamplifikaciju fragmenta RRAS2 za ugradnju u ekspresijski vektor:
 - F_ERRAS2_pET28b_NdeI:
5' GTCTAGCATATGGCGGCCAACAAAGACCTAACCG 3'
 - R_ERRAS2_pET28b_BamHI:
5' CTAGACGGATCCTCACAGAATTACACATTTCTTC 3'

3.1.7. Hranjive podloge za uzgoj i oporavak bakterija

- SOC medij (2 % tripton, 0,5 % kvašćev ekstrakt, 10 mmol/L NaCl, 2,5 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L MgSO₄, 20 mmol/L glukoza)
- LB medij tekući (5 g/L kvašćev ekstrakt, 10 g/L tripton, 5 g/L NaCl)
- LB medij kruti (5 g/L kvašćev ekstrakt, 10 g/L tripton, 5 g/L NaCl, 12 g/L agar)
- TB tekući medij (12 g/L pepton, 24 g/L kvašćev ekstrakt, 9,4 g/L dikalijev fosfat, 2,2 g/L monokalijev fosfat)

3.1.8. Ostali materijali i uređaji

- Uređaji: PCR uređaj T100TM Termal Cyclor (BIO RAD), uređaj za soniciranje Ultrasonic processor 130 watt (Cole-Parmer), spektrofotometar DeNovix DS-11 (DeNovix), uređaj za mjerenje luminiscencije Infinite M200 plate reader (Tecan), centrifuge (Eppendorf Microcentrifuge 5415, IEC Centra MP4 centrifuge, Kendro Multifuge 3 S-R Heraeus), uređaj za detekciju kemiluminiscencije Uvitec Alliance Q5

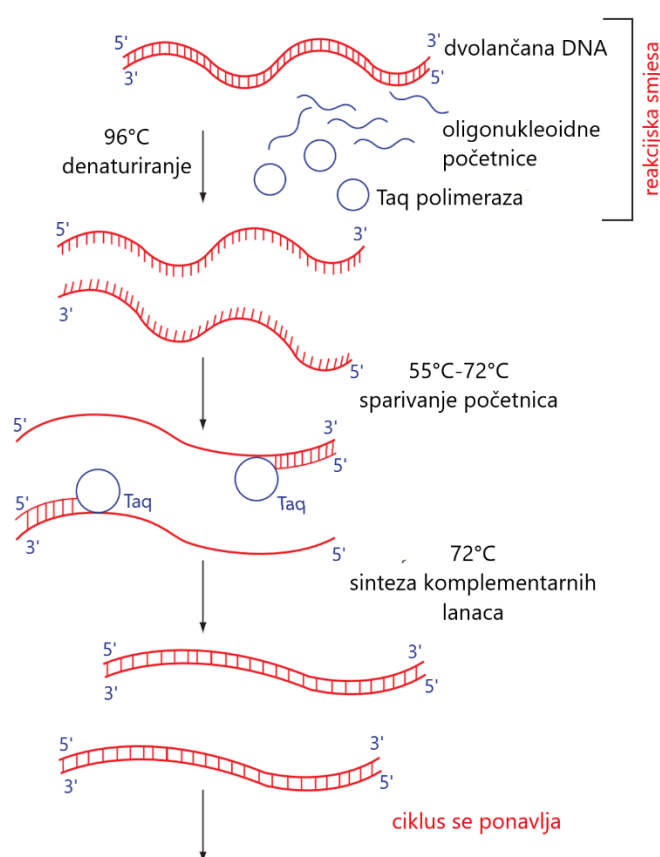
mini (Uvitec), uređaj za vizualizaciju DNA G:box EF Gel Documentation System (Syngene)

- komercijalni kompleti za: izolaciju DNA iz agaroznog gela, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), izolaciju plazmidne DNA iz prekonoćne kulture, QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), mjerenje intrinzične GTPazne aktivnosti, GTPase-Glo Assay (Promega)
- materijali za *western blot*: mlijeko u prahu za blokiranje (engl. *Blotting-Grade Blocker*, BIO RAD), nitrocelulozna membrana (GE Healthcare), otopina za detekciju Amersham ECL Select Western Blot Detection Reagents (GE Healthcare)
- materijali za izolaciju i pročišćavanje proteina: filter nastavci za šprice 0,22 µm (Termo Fisher Scientific), TALON smola (TaKaRa), centrikon Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (Minipore)

3.2. Metode

3.2.1. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze

Kao kalup za umnažanje cDNA koja kodira za protein RRAS2 korištena je komplementarna DNA (cDNA) spužve *Eunapius subterraneus* sintetizirana u Laboratoriju za molekularnu genetiku.^{5,47} Lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) je *in vitro* tehnika umnažanja sekvence DNA koja se sastoji od tri koraka. Ciklus se ponavlja oko 30 puta. U prvom koraku dvolančana DNA se razmata, odnosno denaturira zagrijavanjem reakcijske smjese na temperaturu iznad 90 °C. Snižavanjem temperature na 40-60 °C dolazi do prijanjanja početnica (engl. *primers*) na razmotani kalup DNA.



Slika 10. Prikaz lančane reakcije polimeraze za umnažanje fragmenta DNA. Preuzeto sa ref. 48.

Početnice su kratki oligonukleotidi (20 do 30 nukleotidnih ostataka) komplementarni krajevima DNA sekvence koju želimo umnožiti. Dizajniraju se na način da budu jedinstvene i specifične za željenu sekvencu kako ne bi došlo do umnažanja drugih sekvenci te se dodaju u suvišku radi sprječavanja ponovnog spajanja razmotanih lanaca. U trećem koraku temperatura se dovodi na optimalnu za rad termostabilne DNA-polimeraze (oko 72 °C), koja katalizira sintezu komplementarnog lanca. Novosintetizirani lanci onda služe kao kalupi za sintezu u

sljedećem ciklusu. Za reakciju je još potrebno dodati i smjesu sva četiri deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP-ova) koji služe kao građevni elementi za DNA sintezu. Korišteni pufer sadrži i Mg^{2+} katione za optimalno djelovanje DNA-polimeraze. Ovaj enzim djeluje na način da produljuje polipeptidni lanac u 5'→3' smjeru, dodajući nukleotide na slobodnu 3'-OH skupinu početnica (slika 10).⁴⁹

Temperatura prijanjanja početnica T_a , obično se određuje kao temperatura 5 °C niža od temperature na kojoj je polovica polipeptidnog lanca razmotana (T_m – temperatura mekšanja). Ona ovisi o sastavu nukleotidnog slijeda, kao i o duljini i koncentraciji početnica. Veći udio gvanina i citozina povisuje T_a , budući da se povezuju trima vodikovim vezama. Ako je temperatura prijanjanja preniska može doći do nespecifičnog vezanja početnica i umnažanja neželjenih dijelova sekvence. S druge strane, ako je temperatura previsoka, moguće da se početnice neće efikasno slijepiti za kalup.

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za umnažanje gena za protein RRAS2 sa cDNA spužve *E. subterraneus*.

Reagens	Volumen/ μ L	Konačna koncentracija
SYBR Premix Ex Taq (2X)	12,5	1X
Uzvodne početnice (10 μ M)	1	0,4 μ M
Nizvodne početnice (10 μ M)	1	0,4 μ M
Kalup (cDNA iz spužve)	0,2	< 500 ng (2054,3 ng/ μ l)
NFW	do 25	-

Ukupni volumen reakcijske smjese od 25 μ L (tablica 1) unesen je u PCR uređaj (BIO RAD) uz odabir uvjeta reakcije navedenih u tablici 2.

Za pozitivnu kontrolu umjesto početnica za RRAS2 stavljene su početnice za citokrom-oksidadazu. Za negativnu kontrolu umjesto DNA kalupa stavlja se voda bez nukleaza (engl. *Nuclease Free Water*, NFW).

Tablica 2. Uvjeti PCR reakcije za umnažanje cDNA koja kodira za protein RRAS2 iz spužve *E. subterraneus*.

Korak	Temperatura/°C	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	30 s	1
Denaturacija	95	30 s	30
Sparivanje početnica	57	30 s	
Produljenje	72	45 s	
Završno produljenje	72	5 min	1

3.2.2. Agarozna gel elektroforeza

Uspješnost umnažanja fragmenata PCR reakcijom analizira se elektroforezom na agaroznom gelu. Elektroforeza označava kretanje električki nabijenih čestica (poput nukleinskih kiselina ili proteina) pod utjecajem električnog polja. Agarozna je linearni polisaharid D-galaktoze i 3,6-anhidro-L-galaktoze povezanih glikozidnim vezama.

Agaroznom gel elektroforezom razdvajaju se DNA molekule prema njihovoj veličini. Zahvaljujući negativnom naboju na fosfatnim skupinama, polinukleotidni spojevi migriraju prema pozitivnom polu (anodi). Za održavanje konstantnog ionizacijskog stanja, odnosno kako bi se održala stalna mobilnost molekula, koristi se odgovarajući pufer. Usporedbom položaja umnoženog fragmenta s markerom, provjerava se odgovara li veličina dobivenog fragmenta veličini gena od interesa. Veličina pora molekuskog sita određena je početnom koncentracijom agaroze. Veće koncentracije agaroze osiguravaju manju veličinu pora i obrnuto.⁴⁹

1 %-tni agarozni gel pripremi se otapanjem 0,5 g suhe agaroze u 50 mL 1xTAE pufera koji sadrži etidijev bromid, zagrijavanjem do vrenja, odnosno do pojave bistre otopine. Nakon otapanja agaroze, smjesa se izlije u kadicu za izradu agaroznih gelova te se stavi češljic kako bi se formirale jažice. Hlađenjem otopine polimerne molekule se povezuju vodikovim vezama i dolazi do formiranja gela. Etidijev bromid koristi se za vizualizaciju DNA fragmenata u gelu, budući da interkalira između baznih parova DNA i fluorescira narančasto pobuđen UV svjetlom. Uzorcima DNA dodaje se 6x Loading Dye ukoliko je potrebno, a korišteni marker je *MassRulerTM Ladder Mix*. UV Transiluminatorom se fotografira rezultat razdvajanja molekula.

3.2.3. Izolacija DNA iz agaroznog gela

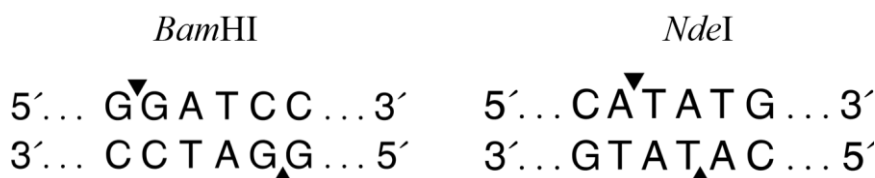
U agaroznom gelu linearni se polimeri povezuju slabim vodikovim interakcijama pa se nakon razdvajanja elektroforezom umnoženi DNA fragmenti mogu relativno jednostavno izolirati iz gela. Za izolaciju DNA fragmenata korišten je *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN).

DNA fragment izreže se iz gela korištenjem čistog skalpela. Izrezani DNA fragment se izvaže i doda se tri puta veći volumen QG pufera (5,5 M guanidin tiocijanat, 20 mM Tris HCl pH 6,6) na jedan volumen izrezanog fragmenta gela (100 mg gela ~ 100 µL). Slijedi inkubacija 10 minuta pri 50 °C, uz vorteksiranje svakih 2-3 minute dok se sav gel ne otopi. Nakon toga se dodaje jedan puta volumen izopropanola i pomiješa. Izopropanol smanjuje dielektričnu konstantu otopine i dodatno olakšava vezanje DNA za membranu. QIAquick spin kolona se umetne u tubicu volumena 2 mL, stavi se uzorak otopljenog gela i centrifugira 1 minutu pri 13000 rpm. Postupak se ponovi za sav otopljeni gel. Visoka koncentracija soli i kiseli pH pomažu vezanju DNA za silikatnu membranu QIAquick spin kolone. Ono što je prošlo kroz kolonicu (engl. *flow-trough*, FT) se ukloni. Sljedeće se doda 500 µL QG pufera na kolonu i centrifugira 1 minutu, FT se baci. Za ispiranje dodaje se 750 µL PE pufera (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 80 % etanol) na kolonicu i ponovno centrifugira 1 minutu. Etanol povećava topljivost dodanih soli i omogućava njihovo ispiranje s kolone. Sve prošlo kroz kolonicu se baci i ponovno centrifugira 1 minutu kako bi se uklonio preostali pufer za ispiranje. QIAquick kolonica se stavi na novu tubicu od 1,5 µL. DNA se eluira dodatkom 50 µL EB pufera (10 mM Tris-HCl pH 8,5) 1 minutu. Niža koncentracija soli i viši pH omogućavaju otpuštanje DNA sa membrane.

3.2.4. Kloniranje DNA u ekspresijski vektor

Prije unošenja u ekspresijski vektor pET28b, izolirani i pročišćeni plazmid i fragment za željeni protein trebaju biti porezani istim restriktivnim endonukleazama. Restriktivne endonukleaze tipa II su enzimi koji bakterijama omogućuju razgradnju strane DNA, npr. iz bakteriofaga, ali imaju i vrlo važnu ulogu u tehnologiji rekombinantne DNA. Restriktivni enzimi prepoznaju specifične sljedove u dvolančanoj DNA (restriktivna mjesta) duljine 4 do 6 parova baza, vežu se na njih i specifično ih cijepaju tako da hidroliziraju fosfodiesterske veze između nukleotida. Sekvence koje prepoznaju najčešće su palindromi, odnosno komplementarne su same sebi. Nakon rezanja mogu nastati tzv. stršeci odnosno ljepljivi ili tupi krajevi koji se dalje mogu komplementarno sparivati vodikovim nekovalentnim

interakcijama.⁵⁰ Prilikom izbora restrikcijskih mjesta treba obratiti pažnju da nukleaze režu izvan, ali dovoljno blizu našeg fragmenta od interesa, ali i da ne režu nigdje drugdje u plazmidu. Iz tog razloga su za umnažanje cDNA koja kodira za protein RRAS2 odabrane restrikcijske endonukleaze *Bam*HI i *Nde*I (slika 11).



Slika 11. Restrikcijska mjesta za enzime *Bam*HI i *Nde*I. Preuzeto s ref. 51.

Za umnažanje fragmenta korištena je Q5 High-Fidelity DNA polimeraza, a temperatura taljenja (T_m) određena je uz pomoć *NEB Tm Calculator*-a (ref. 52).

Prilikom dizajniranja početnica za umnažanje fragmenta RRAS2, na 5'-kraj početnica nadodaje se slijed koji odgovara restrikcijskim mjestima za izabrane endonukleaze, *Nde*I i *Bam*HI. Oligonukleotidni sljedovi dizajniranih početnica su:

F_ERRAS2_pET28b_*Nde*I: 5' GTCTAGCATATGGCGGCCAACAAAGACCTAACCG 3'
 R_ERRAS2_pET28b_*Bam*HI: 5' CTAGACGGGATCCTCACAGAATTACACATTTCTTC 3'

Sastav i uvjeti PCR reakcije navedeni su u tablicama 3 i 4. Nakon provedene reakcije uzorci se nanose na prethodno pripravljeni agarozni gel zajedno s markerom te se provodi elektroforeza kako bi se provjerila uspješnost i točnost PCR reakcije.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za umnažanje cDNA koja kodira za protein RRAS2 početnicama s restrikcijskim mjestima (*Nde*I/*Bam*HI).

Reagens	Volumen/ μ L	Konačna koncentracija
Q5 reakcijski pufer (5X)	10	1X
dNTP-ovi (10 μ M)	1	200 μ M
Uzvodne početnice (10 μ M)	2,5	0,5 μ M
Nizvodne početnice (10 μ M)	2,5	0,5 μ M
Kalup DNA	8,5	< 1000 ng
Q5 polimeraza	0,5	0,02 U/ μ L
NFW	25	-

Tablica 4. Uvjeti PCR reakcije

Korak	Temperatura/°C	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98	30 s	1
Denaturacija	98	10 s	35
Sparivanje početnica	72	20 s	
Produljenje	72	20 s	
Završno produljenje	72	2 min	1

3.2.5. Razgradnja DNA fragmenata i plazmida restriktivnim endonukleazama

U sljedećem koraku umnoženi DNA fragment s restriktivnim mjestima za *NdeI/BamHI*, kao i sam cirkularni plazmid pET28b, potrebno je pocijepati kako bi se mogli povezati ligacijom. Sastav pripremljenih reakcijskih smjesa navedeni su u tablicama 5 i 6. Pripremljena reakcijska smjesa se inkubira 45 minuta na 37 °C bez treskanja.

Tablica 5. Sastav reakcijske smjese za razgradnju DNA fragmenata restriktivnim endonukleazama *NdeI* i *BamHI*

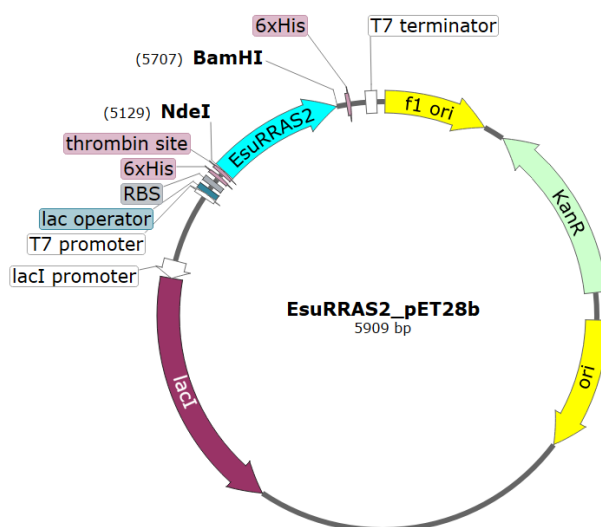
Reagens	Volumen/μL
DNA fragment	0,4 μg/60 μl
10x Fast Digest pufer	6
Restriktivni enzim <i>NdeI</i>	2
Restriktivni enzim <i>BamHI</i>	2
NFW	do 60

Tablica 6. Sastav reakcijske smjese za razgradnju plazmida pET28b restriktivnim endonukleazama *NdeI* i *BamHI*

Reagens	Volumen/μL
Plazmid pET28b	1 μg/20 μL
10x Fast Digest pufer	2
Restriktivni enzim <i>NdeI</i>	1
Restriktivni enzim <i>BamHI</i>	1
NFW	do 20

Nakon inkubacije provodi se agarozna gel elektroforeza kako bismo provjerili uspješnost razgradnje plazmida. Pocijepani plazmid izreže se i izolira iz gela. DNA fragment za RRAS2 izolira se iz otopine.

Na slici 12 prikazan je korišteni ekspresijski vektor pET28b(+) (engl. *plasmid Expression vector under T7 control*). Plazmidi su kratke cirkularne molekule DNA čija je replikacija i nasljeđivanje neovisno o bakterijskom kromosomu. Iako nisu nužni za preživljavanje bakterija, plazmidi im mogu dati određenu selekcijsku prednost.



Slika 12. Ekspresijski vektor pET-28b(+) s ugrađenom cDNA za spužvin protein RRAS2 za unos u BL21+ stanice. RBS – engl. *ribosome binding site*. Kreirano pomoću *SnapGene Viewer*, ref. 53.

3.2.6. Ligacija

Reakcijom ligacije povezuju se vektor pET28b i fragment EsuRRAS2 pocijepani restriktivnim enzimima *NdeI/BamHI*. Ljepljivi krajevi lanaca nastali djelovanjem restriktivskih endonukleaza mogu se spontano povezivati vodikovim vezama, ali za kovalentno povezivanje potrebna je DNA-ligaza. Taj enzim katalizira nastajanje fosfodieterske veze između 3'-OH i 5'-PO₄²⁻ skupina dvaju nukleotida.

Masa inserta, odnosno PCR produkta određena je prema formuli:

$$m(\text{insert})/\text{ng} = \frac{m(\text{vektor})/\text{ng} \times \text{duljina}(\text{insert})/\text{pb}}{\text{duljina}(\text{vektor})/\text{pb}} \times \text{molarni omjer insert/vektor}.$$

Uzeta masa vektora iznosi 60 ng, a molarni omjer inserta i vektora je 3:1. Smjesa se prvotno inkubira na sobnoj temperaturi (25 °C) oko 30 minuta, nakon čega se DNA-ligaza inaktivira inkubacijom na 65 °C kroz 15 minuta. Sastav ligacijske smjese naveden je u tablici 7.

Tablica 7. Sastav ligacijske smjese.

Reagens	Volumen/ μL
Pufer za elektroligazu	5
Elektroligaza	1
Insert (EsuRRAS2)	2,9 (19,52 ng)
Vektor pET28b	1,2 (60 ng)
NFW	do 11

3.2.7. Transformacija soja BL21+ bakterije *Escherichia coli*

Transformacija je proces kojim bakterijska stanica prima stranu DNA. Kako bi bakterijske stanice postale kompetentne za transformaciju trebaju biti tretirane fizičkim ili kemijskim putem. Objema metodama postiže se da membrana bakterijske stanice postane kratkotrajno propusna što omogućava ulazak plazmida u stanicu. Fizikalnom metodom (elektroporacijom) stanice su podvrgnute kratkotrajnom, ali jakom električnom polju koje uzrokuje otvaranje prolaznih pora na membrani i omogućuje unos plazmidne DNA u stanicu. Kemijskom transformacijom kompetentne stanice inkubiraju se na ledu u otopini koja sadrži Ca^{2+} ione, uz dodatak plazmidne DNA. Nakon toga slijedi „toplinski šok“ uranjanjem bakterijskih stanica u toplu kupelj na 37 ili 42 °C. Mehanizam transformacije nije sasvim razjašnjen, ali se smatra se da Ca^{2+} ioni neutraliziraju negativan naboj stanične stijenke, kako bi negativno nabijena DNA mogla proći kroz otvore u membrani.⁴⁹

Provedena je kemijska transformacija miješanjem 2 μL plazmida s 50 μl BL21+ stanica i 25 μl CaCl_2 pufera za transformaciju. Reakcijska smjesa prvotno se inkubira 30 minuta na ledu, a zatim se stanice stavljaju 2 minute na 37 °C. Nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi stanicama je dodan SOC medij bez antibiotika za oporavak kroz 1 sat na 37 °C uz trešnju pri 215 rpm. Nakon toga, stanice se nacjepljuju na krute LB podloge s kanamicinom i stave na prekonoćni uzgoj pri 37 °C.

3.2.8. PCR reakcija na kolonijama

Od bakterijskih stanica naraslih na pločama preko noći nasumično se odabiru kolonije. Zatim se provodi PCR reakcija umnažanja kako bi se razabrale kolonije kod kojih je unesen plazmidni vektor, a s njime i gen za RRAS2. Korištene su početnice za T7-promotor i T7-terminator pET28b vektora i ExTaq polimeraza. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 10 μL pripravljena je prema tablici 8. Uvjeti reakcije postavljeni su na PCR uređaju prema tablici 9.

Tablica 8. Sastav reakcijske smjese za provjeru ugradnje plazmidnog vektora pET28b(+) u BL21+ stanice *E. coli*.

Reagens	Volumen/ μL
Input DNA	Kolonija uzeta nastavkom mikropipete
T7p početnica	0,3
T7t početnica	0,3
<i>Premix Ex Taq</i>	5
NFW	do 10

Tablica 9. Uvjeti PCR reakcije na kolonijama.

Korak	Temperatura/ $^{\circ}\text{C}$	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	3 min	1
Denaturacija	95	30 s	35
Sparivanje početnica	50	45 s	
Produljenje	72	75 s	
Završno produljenje	72	5 min	1

Uspješnost PCR reakcije na kolonijama provjerena je agaroznom gel elektroforezom.

3.2.9. Izolacija plazmidne DNA

Izolacija plazmidne DNA iz odabranih bakterijskih kolonija prvi je korak za provjeru transformacije bakterija metodom digestije plazmida. Iz prekonocne bakterijske kulture izolira se plazmidna DNA tehnikom alkalne lize bakterijskih stanica prema QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) protokolu.

5 mL prekonocne bakterijske kulture se centrifugira pri 8000 rpm (6800 x g) 3 minute na sobnoj temperaturi. Bakterijske stanice se zatim resuspendiraju u 250 µL pufera P1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNaza A). RNaza A cijepa fosfodiesterske veze između ribonukleotida i specifično djeluje nakon pirimidinskih nukleotida, a EDTA sudjeluje u destabilizaciji membrane. Zatim se doda 250 µL pufera P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) i promiješa okretanjem dok otopina ne bude bistra. SDS dodatno destabilizira staničnu membranu i denaturira prisutne proteine, a pomoću NaOH se denaturira bakterijska DNA. Zatim se doda 350 µL pufera N3 (4,2 mol/L gvanidin-hidroklorid, 0,9 mol/L kalijev acetat pH 4,8), promiješa okretanjem i centrifugira 10 minuta pri 13000 rpm. N3 pufer neutralizira otopinu čime se bakterijska DNA i proteini istalože, a plazmidna DNA se može renaturirati i vezati na membranu. 800 µL supernatanta se nanese na QIAprep spin kolonu, centrifugira 30-60 sekundi, nakon čega se sve prošlo kroz membranu baci. Kolona se ispiri sa 750 µL pufera PE (10 mmol/L Tris-HCl pH 7,5, φ = 80 % etanol), centrifugira 30-60 sekundi i ponovno se sve proteklo kroz kolonu baca. Dodatkom etanola istaloži se preostala bakterijska DNA. Zatim se centrifugira još 1 minutu kako bi se uklonili ostaci PE pufera. QIAprep kolona se prebaci u čistu tubicu od 15 mL za centrifugiranje, eluira sa 50 µL NFW i inkubira 5-10 minuta na sobnoj temperaturi. Još jednom se centrifugira 1 minutu pri 13000 rpm.

3.2.10. Provjera rekombinantnog plazmida restrikcijским enzimima (digestijom) i sekvenciranjem

Iako nije nužna, s obzirom da je napravljena provjera PCR reakcijom na kolonijama, provjera restrikcijским enzimima još jedan je način utvrđivanja je li plazmid koji sadrži gen od interesa unesen u bakterijske stanice. Pripravi se reakcijska smjesa sastava kao u tablici 10 te se inkubira 45 minuta na 37 °C bez treskanja. Nakon toga razgrađeni plazmid nanesen je na agarozni gel.

Tablica 10. Sastav smjese za digestiju rekombinantnog plazmida pET28b_EsuRRAS2 restrikcijским endonukleazama *NdeI* i *BamHI*.

Reagens	Volumen/ μL
pET28b_EsuRRAS2	1 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$
10x Fast Digest pufer	2
Restrikcijски enzim <i>NdeI</i>	1
Restrikcijски enzim <i>BamHI</i>	1
NFW	do 20

Kolonije za koje je PCR reakcijom na kolonijama ili pak izolacijom i digestijom plazmida utvrđeno da imaju fragment od interesa poslane su na sekvenciranje.

Za sekvenciranje metodom po Sangeru pripremljeno je 200-500 ng plazmida zajedno s početnicom T7p ili T7t (0,5 μL) i vodom bez nukleaza do ukupnog volumena od 14 μL . Sekvenciranje je jedini način kojim možemo biti sigurni da osim što je fragment ugrađen, nije došlo do mutacija, pomaka okvira čitanja i sl. Dobivena sekvenca analizirana je u programima MEGA7⁵⁴, Clustal X2⁵⁵ i GeneDoc⁵⁶ i prevedena je u proteinsku sekvencu pomoću bioinformatičkog alata Expasy⁵⁷.

3.2.11. Probna indukcija prekomjerne ekspresije proteina

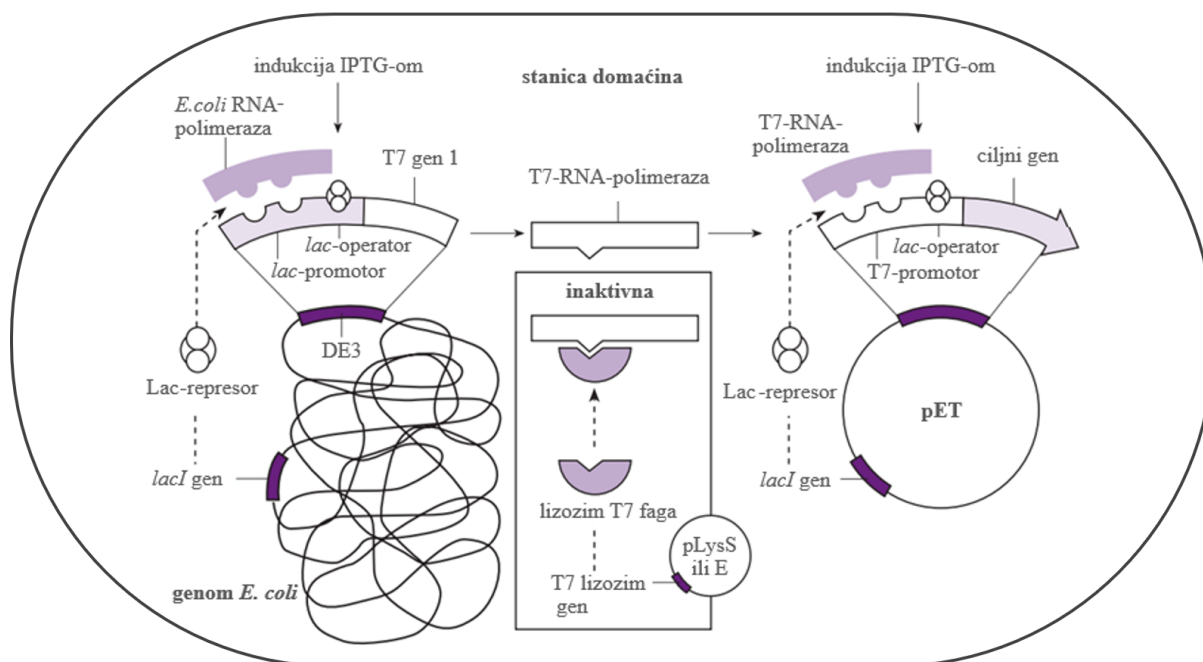
Malom (probnom) indukcijom utvrđuje se može li se protein uspješno prekomjerno eksprimirati i izolirati iz bakterijskih stanica *E. coli* BL21+ bez prekomjernog taloženja.

Nakon što je sekvenciranjem potvrđeno da je cDNA za RRAS2 pravilno ugrađena u plazmid pET28b, započinje se sa sintezom ciljnog proteina. Pripreme se tekući LB i TB mediji s antibiotikom kanamicinom (35 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Vrhom plastičnog nastavka mikropipete lagano se dodirne odabrana kolonija na ploči i uroni u 3 mL tekućeg LB odnosno TB medija i stavi na prekonocni uzgoj na temperaturi 37 °C uz 220 rpm. Važno je plastične tubice, u kojima se uzgajaju bakterije, ostaviti lagano otvorene radi aeracije.

Nakon prekonocnog uzgoja bakterijske stanice se razrjeđuju u omjeru 1:100. U 25 mL LB odnosno TB medija s kanamicinom doda se po 250 μL prekonocne bakterijske kulture. Stanice se stave u termoblok na 37 °C uz okretaje 220 rpm dok ne postignu optičku gustoću $\text{OD}_{600}=0,6-0,8$. Mjerenjem optičke gustoće utvrđuje se jesu li stanice u eksponencionalnoj fazi rasta. Nakon što dosegnu željenu optičku gustoću uzima se po 4 mL svake bakterijske

kulture kao neinducirana kontrola i centrifugira se pri 13000 rpm 1 min na 4 °C.

U svakom mediju uspoređuje se i utjecaj temperature na ekspresiju proteina pa se u LB ili TB mediju ista kolonija uzgaja na 30 °C i na 16 °C. Svaka bakterijska kultura raspoređuje se u dvije tubice i za indukciju se dodaje 0,8 mM IPTG za uzgoj stanica na 30 °C kroz 2-3 sata i 0,1 mM IPTG za uzgoj na 16 °C preko noći. Djelovanje IPTG-a omogućeno je elementima iz bakterijskog *lac*-operona i bakteriofaga T7. Sustav pET/T7 opisan je na slici 13.



Slika 13. Shematski prikaz sustava pET/T7. Kada nije prisutan induktor, gen *lacI* je aktivan, Lac-represor se sintetizira i veže se na *lac*-operator te sprečava vezanje bakterijske RNA-polimeraze za *lac*-promotor. T7-terminator zaustavlja transkripciju T7-RNA-polimeraze. Dodatkom induktora, IPTG-a ili laktoze, Lac-represor disocira s *lac*-operatora i bakterijska RNA-polimeraza može započeti transkripciju gena za T7-RNA-polimerazu, koja se potom može vezati za T7-promotor i transkribirati ciljani gen. Budući da ipak može doći do vezanja bakterijske RNA-polimeraze na T7-promotor, postoji dodatni način kontrole. Ekspiriranjem lizozima T7 faga inaktivira se T7-RNA-polimeraza, čime se dodatno smanjuje ekspresija sa T7-promotora prije indukcije. Preuzeto i prilagođeno sa ref. 58.

Nakon uzgoja sve stanice se spuštaju centrifugiranjem pri 13000 rpm jednu minutu na 4 °C. Centrifugiranjem se istalože u vodi netopljivi dijelovi stanice poput staničnih membrana i organela, kao i netopljivi citosolni proteini, a u supernatantu ostaju topljivi citosolni proteini. Talozci induciranih stanica se resuspendiraju u 1 mL, a neinduciranih stanica u 250 µL pufera za proteine (500 mM NaCl, 25 mM Tris, 1 mM DTT). DTT ima ulogu u reduciranju disulfidnih mostova u proteinima, a natrijev klorid održava fiziološke uvjete kakvi su u stanici.

3.2.12. Sonikacija

Uzorke nakon toga soniciramo na ledu, kako bi se destabilizirala i razorila stanična membrana. Neinducirani uzorci se soniciraju dva puta po 10 s, a inducirani četiri puta po 30 s (pri amplitudi 40). Između svakog ponavljanja uzorci se ostave na ledu barem 1 minutu. Sonikator uronjen u suspenziju stanica periodički generira visokofrekvencijske (ultrazvučne) valove. Kako ultrazvučni valovi putuju kroz tekući medij, kreiraju se regije niskog i visokog tlaka. U regijama niskog tlaka dolazi do kavitacije prijelazom tekućine u plinovito stanje, nakon čega se u regijama visokog tlaka mjehurići plina urušavaju, šireći „šok valove“ i uzrokujući lizu stanica. Ovom metodom oslobađa se značajna količina topline, stoga je potrebno uzorke za vrijeme sonikacije držati na ledu.⁴⁹ Nakon soniciranja uzorci se dalje pripremaju za elektroforezu na poliakrilamidnom gelu.

3.2.13. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu

Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu radi na istom principu kao i agarozna elektroforeza, ali su poliakrilamidni gelovi pogodniji za razdvajanje proteina i manjih molekula DNA i RNA. Nabijene molekule gibaju se pod utjecajem električne sile, opirući se sili trenja zbog viskoznosti otopine. Manje molekule razdvajaju se od većih jer brže putuju kroz matriks gela.⁴⁹

Dva gela su pripravljena prema sastavu navedenom u tablici 11. Smjesa proteina prvo prolazi kroz gel za sabijanje, a zatim gel za razdvajanje. Gel za sabijanje koncentrira proteinski uzorak u uski pojas prije nego uđu u gel za razdvajanje. To se postiže razlikom u ionskoj jakosti i pH-vrijednosti između dvaju gelova.

Tablica 11. Sastav poliakrilamidnog gela s SDS-om za razdvajanje proteina elektroforezom.

Gel za razdvajanje (12 %-tni)		Gel za sabijanje (5 %-tni)	
mQ H ₂ O	4,35 mL	mQ H ₂ O	3,1 mL
1,5 M Tris, pH=8,8	2,52	0,5 M Tris, pH=6,8	1,26 mL
10 % SDS	100 µL	10 % SDS	50,1 µL
40 % AA	3 mL	40 % AA	0,63 mL
10 % APS	50 µL	10 % APS	2,5 µL
TEMED	10 µL	TEMED	5,1 µL

Gel nastaje polimerizacijom akrilamida i *N,N*-metilenbisakrilamida. Reakcija se odvija mehanizmom slobodnih radikala. *N,N,N,N*'-tetrametilendiamid (TEMED) djeluje kao katalizator reakcije, a reakcija je inicirana dodatkom amonijeva peroksodisulfata (APS).

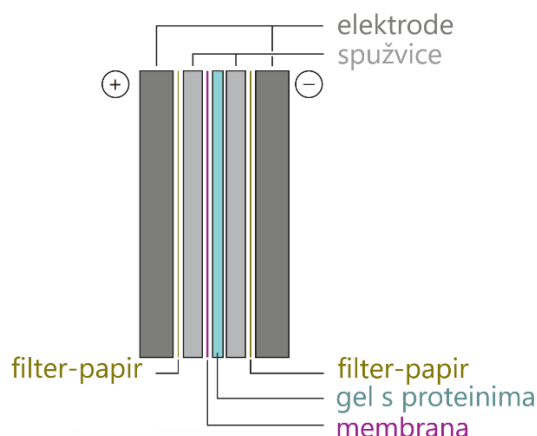
Za razliku od polinukleotidnih lanaca, polipeptidni lanci nemaju konstantan naboj zbog različitog naboja bočnih ogranaka proteina ovisnom o pH-vrijednosti otopine. Anionski deterđent natrij-dodecilsulfat (SDS) se veže na aminokiselinske ostatke polipeptidnog lanca, osiguravajući ukupni negativni naboj svih proteina. S obzirom da je količina vezanog SDS-a po jedinici mase konstantna, omjer naboja i mase kod svih proteina je jednak i pokretljivost polipeptida ovisi samo o njihovoj molekulskoj masi.⁴⁹

Lizirani uzorci centrifugiraju se 30 minuta pri 13000 rpm na 4 °C. Supernatanti se prebace u nove tubice, a talozi se resuspendiraju u puferu za proteine, u 1 mL za inducirane stanice ili u 300 µL za neinducirane stanice. Uzorci se pomiješaju sa 4X SDS bojom te se denaturiraju pri 96 °C kroz 4 minute. Kako bi se uzorci ohladili prije nanošenja na gel, vrte se na led na dvije minute. Nakon toga se spuste te se u jažice gela nanosi po 15 µL supernatanta odnosno 5 µL taloga. Osim uzoraka, na gel se nanosi i 2,5 mL markera za proteine. U kadnicu za elektroforezu dodaje se SDS Gel Running pufer do oznake te se aparatura priključi na izvor istosmjernе struje. Elektroforeza se provodi najprije na 96 V kroz 15 minuta, dok uzorci ne uđu u gel za razdvajanje, a nakon toga na 120 V kroz 1 h.

3.2.14. *Western analiza*

Metoda *western blot* koristi se za detekciju specifičnih elektroforetski razdvojenih proteina prijenosom na odgovarajuću membranu i obilježavanjem proteina od interesa specifičnim antitijelima. Transfer proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu vrši se elektroblokiranjem.⁴⁹

Spužvice i filter papiri za transfer potope se u puferu za transfer. Važno je istisnuti sve mjehuriće zraka iz aparature kako se ne bi ometao prijenos proteina. Gel se drži u puferu za transfer, a membrana aktivira u metanolu 1 minutu. Sve zajedno se stavlja u hladnu sobu na magnetsku miješalicu i transfer se vrši pri 100 mA (oko 40 V) preko noći. Aparatura za transfer opisana je na slici 14.



Slika 14. Prikaz postave aparature za *western blot* analizu. Sastavnice tzv. „sendvič“ konstrukcije slažu se redom od bijele prema crnoj stani: spužvica, filter-papir, membrana, gel, pa filter-papir i spužvica. Nakon istiskivanja mjehurića zraka sve sklopljeno se stavlja u kadicu za transfer, dodaje se magnet, led i pufer za transfer do oznake. Preuzeto i prilagođeno sa ref. 49.

Nakon transfera membrana se ispiru u PBS puferu 10 minuta. Potom se boja u *amidoblack*-u 30 sekundi i odmah stavi u otopinu za odbojavanje 2 puta kroz 30 minuta. Nakon fotografiranja, membrana se pretretira metanolom 5 sekundi i ispiru 4 puta po 2 minute u reH₂O. Nakon toga, membrana se inkubira u puferu TBST (150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl pH 7,4, 0,1 % TWEEN 20) 2 puta po 15 minuta. Membrana se blokira u 5 % *blocking*-u (250 mg *blocking agent* + 5 ml TBST) kroz 1 sat. Sredstvo za blokiranje se koristi kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela na membranu jer se veže za dijelove membrane gdje nema našeg proteina. Nakon toga se dodaje otopina primarnog antitijela anti-His (mouse) (1:2500) i membrana inkubira kroz 1 sat. Otopina primarnog antitijela se priprema tako da se doda 2 μL antitijela u 5 ml 5 % *blocking*-a. Primarna antitijela vežu se samo za naš specifični protein, budući da je obilježen histidinskim privjeskom. Zatim se s membrane ispiru nevezana primarna antitijela 3 puta po 10 minuta u TBST puferu. Dodaje se unaprijed pripremljena otopina sekundarnog antitijela anti-mouse-HRP (1:5000) (1 μl antitijela u 5 ml 5 % *blocking*-a) i inkubira kroz 1 h na miješalici. Sekundarna antitijela prepoznaju naše primarno antitijelo i pomažu vizualizaciji specifičnog proteina. Membrana se zatim ponovo ispiru 3 puta po 10 minuta u TBST puferu. Sljedeće se priredi otopina za razvijanje membrane Amersham ECL Select Western Blot Detection Reagents (GE Healthcare) te dodaje u tubicu omotanu folijom, kako ne bi bila izložena svjetlosti. Membrana se stavlja unutar plastične folije, doda se otopina za razvijanje i inkubira u mraku kroz 1 minutu. Nakon toga membrana se premjesti na novu foliju i stavlja u uređaj za detekciju kemiluminiscencije Uvitec Alliance Q5 mini (Uvitec).

3.2.15. Prekomjerna indukcija proteina (velika indukcija)

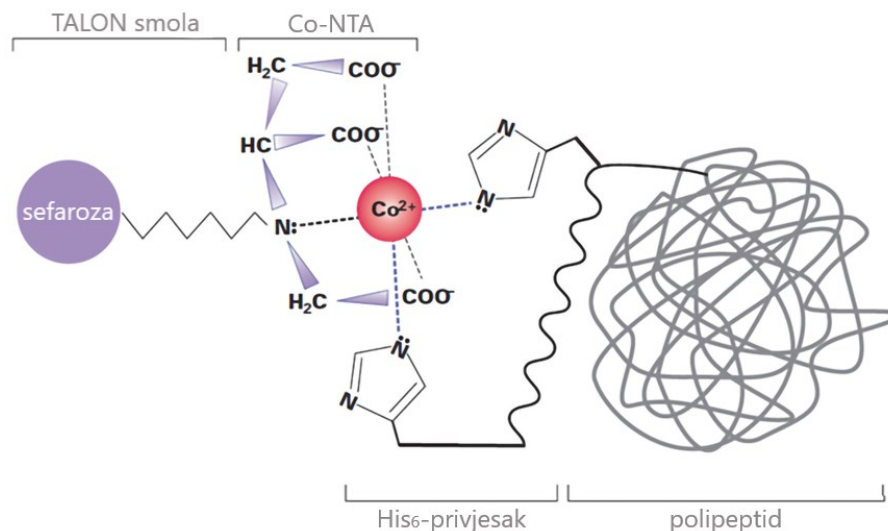
Izvodi se na isti način kao i probna indukcija, samo u većem volumenu u svrhu sinteze veće količine proteina. Uvjeti prekomjerne indukcije proteina određeni su probnom indukcijom.

Pripremi se tekući LB medij s kanamicinom. Vrškom nastavka za mikropipetu dodirne se kolonija stanica (BL21+) i uroni u 12 mL prethodno pripremljenog LB medija s antibiotikom kanamicinom (35 µg/mL) i stavi na prekončni uzgoj na temperaturi 37 °C uz 220 rpm. Sljedeće jutro doda se 10 mL prekončne bakterijske kulture u 1000 mL LB medija s kanamicinom (razrjeđenje 1:100) i uzgaja na 37 °C uz trešnju pri 220 rpm do optičke gustoće $OD_{600}=0,6-0,8$. Na 1000 mL bakterijske kulture dodaje se 100 µL 1 M IPTG-a te se stavi na prekončni uzgoj na 16 °C uz trešnju pri 220 rpm (oko 19 h). Nakon toga se stanice spuste centrifugiranjem 30 minuta pri 4 °C na 4300 rpm i ostave preko noći na –80 °C.

Talag stanica se resuspendira u 50 mL WA pufera (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol). Dodaje se inhibitor proteaza pripremljen na način da se 1 tableta otopi u 2 mL WA pufera i razrijedi 25 puta, te lizozim (1 mg/mL) i inkubira 10 minuta na ledu. Uzorci se nakon toga soniciraju 3-5 puta po 3,5 minuta pri amplitudi 30 (puls oko 11-12) dok otopina ne bude bistra. Uzorke centrifugiramo pri 12500 rpm na 4 °C kroz 30 minuta kako bi se odvojile veće nečistoće, pa supernatanti se prebace u nove tubice. Centrifugiranje se ponavlja pri istim uvjetima, supernatant se prebaci u staklenu posudu i profiltrira kroz 0,22 µm filter.

3.2.16. Izolacija proteina

Protein se izolira afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionima (engl. *Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC). Metoda se temelji na velikom afinitetu histidinskog privjeska prema dvovalentnim metalnim kationima. Na N- ili C-terminalnom kraju proteina dodan je nukleotidni nastavak koji kodira za afinitetni privjesak, u ovom slučaju niz od šest histidinskih ostataka (His₆). Metalni ioni poput Ni²⁺ ili Co²⁺ tvore kompleks s imobiliziranim kelirajućim agensom, poput nitrilotriacetatne kiseline (NTA) (slika 15). Na kromatografsku smolu veže se protein od interesa preko afinitetnog privjeska, dok se sve ostalo ispiri sa kromatografske kolone. Nakon toga se pročišćeni protein eluira otopinom imidazola koji kompetitivno istiskuje histidinski privjesak.⁴⁹



Slika 15. Prikaz vezanja heksahistidinskog privjeska na Co-NTA sefarozu. Nitrilotriacetatna (NTA) skupina je tridentatni ligand koji koordinira ione kobalta s četiri koordinacijska mjesta, a fleksibilnom poveznicom je vezana na sefarozu. Na preostala dva koordinacijska mjesta vežu se bočni ogranci histidina iz His₆ privjeska. Pri neutralnom pH histidin je većinom u deprotoniranom obliku, pa preko slobodnog elektronskog para može koordinirati ione Co²⁺. Preuzeto i prilagođeno sa ref. 59.

Kolona za pročišćavanje proteina pripremi se ispiranjem hladom MQ vodom, zatim se dodaje 400 μ L kromatografske smole s kobaltom (TALON Metal Affiniti Resin, TaKaRa) i ispiru WA puferom. Co²⁺ ioni su prikladniji u ovom slučaju od Ni²⁺ jer pružaju veću specifičnost vezanja, a ime i veću čistoću produkta. Nakon ispiranja, kromatografska smola s kobaltom i pufer WA dodaju se profiltriranom supernatantu i slijedi inkubacija u trajanju od 20 minuta pri 4°C uz rotaciju plastične tubice kako bi se što bolje vezao protein. Supernatant i kromatografska smola s kobaltom zajedno se dodaju na kolonu i resuspendiraju nastavkom mikropipete. Prvo se prikupi *flow trough* (FT), pa se kolona ispiru s 10 mL pufera za nespecifično vezanje proteina koji sadrži 10 mM imidazol (WA), zatim 10 ml pufera koji sadrži 20 mM imidazol (WB) te 10 ml pufera koji sadrži 40 mM imidazol (WC) kako bi se uklonili ostali proteini i nečistoće, a frakcije se sakupljaju odvojeno i čuvaju radi provjere na poliakrilamidnom gelu. Nakon ispiranja slijedi elucija proteina od interesa puferom za proteine koji sadrži visoku koncentraciju imidazola, 300 mM (E). Za eluciju se koristi 5 ml navedenog pufera (300 mM imidazol) te se sakupljaju odvojene frakcije u kojima se očekuje protein od interesa (dva puta po 2 mL (E1 i E2) i 1 mL (E3)). Detaljniji sastavi pufera za nespecifično vezanje proteina navedeni su u odlomku 3.1.2. Puferi.

Prisutnost proteina u dobivenim frakcijama provjerava se metodom po Bradford-u. 5 μ L svake sakupljene frakcije dodaje se u 15 μ L Bradford reagensa (zakiseljena boja Coomassie

Brilliant Blue G-250) i promatra promjena boje. Vežanjem na protein dolazi do pomaka apsorpcijskog maksimuma sa 470 nm na 595 nm, što se uočava kao promjena boje iz narančaste u plavu. Navedena provjera pomaže nam uočiti u kojim je frakcijama prisutna veća količina proteina (proporcionalno intenzitetu plave boje) te je li potrebno nastaviti eluciju proteina s kolone.

Dobivene frakcije (FT, WA, WB, WC, E1-3) provjeravaju se SDS-PAGE elektroforezom na poliakrilamidnom gelu, te se frakcije koje sadrže željeni protein čuvaju na ledu do ukoncentriravanja i promjene pufera proteinu.

3.2.17. Ultrafiltracija

Prije pohrane ili promjene pufera potrebno je ukoncentrirati protein. Korišten je centrikon *Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices* prosječne veličine pora 10 K (10 kDa) i volumena 5 mL. Odabrana veličina pora membrane ovisi o molekularnoj masi proteina, i obično se odabire veličina upola manja od molekulske mase proteina.

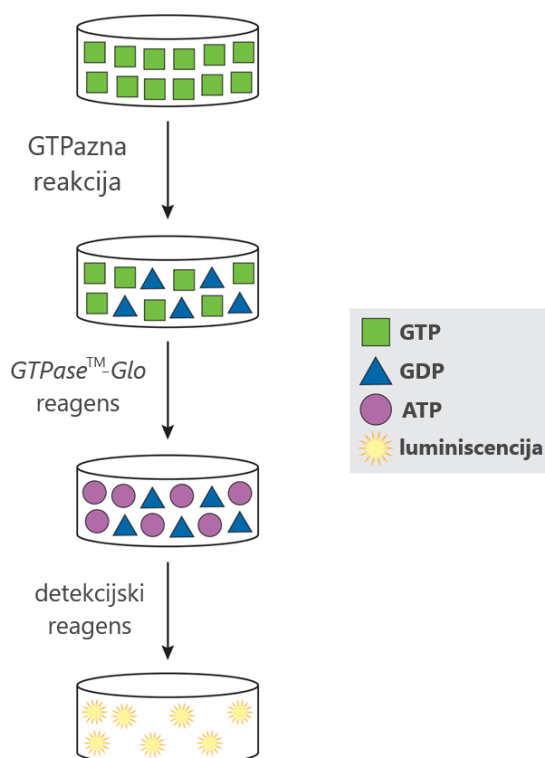
Centrikon se prvo ekvilibrira MQ vodom kroz 10-15 minuta. Voda se nakon toga izlije i dodaju se frakcije u kojima se nalazi izolirani protein uz resuspendiranje svaki puta kada se dodaje novi uzorak kako bi se spriječilo lijepljenje proteina za membranu. Uzorak se centrifugira u centrifugi s pokretljivom glavom (engl. *bucket swing*) na 4 °C pri 4000 x g dok se razina ne spusti na 500 µL nakon čega se dodaje pufer za pohranu proteina (25 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10 % glicerol). Postupak ispiranja proteina u puferu za pohranu ponavlja se tri puta te se svaki put centrifugira pri navedenim uvjetima. Kada se protein ukoncentrira do koncentracije od nekoliko mg/mL, alikvotira se i čuva na temperaturi -80 °C.

3.2.18. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorku određuje se mjerenjem apsorpcije pri valnoj duljini od 280 nm na spektrofotometru DeNovix DS-11 (DeNovix). Kako bi se izmjerila koncentracija spužvinog proteina RRAS2, potrebni podaci o molekularnoj masi proteina (23939,42 Da) i ekstincijski koeficijent ($13535 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) određeni su pomoću programskog paketa Expasy ProtParam (ref. 60).

3.2.19. Test određivanja GTPazne aktivnosti proteina

Određivanje intrinzične GTPaze aktivnosti ljudskog i spužvinog proteina RRAS2 provedeno je pomoću komercijalno dostupnog kompleta *GTPase-GloTM Assay* (Promega) prema uputama proizvođača. Protein za kojeg se pretpostavlja da ima intrinzičnu GTPaznu aktivnost inkubira se s GTP-om. Nakon završene GTPazne reakcije, preostali nehidrolizirani GTP prevodi se u ATP pomoću *GTPase-GloTM* reagensa. Nastali ATP se onda detektira dodatkom termostabilne luciferaze (*Ultra-GloTM Recombinant Luciferase*) i supstrata luciferina, budući da je potreban za aktivnost luciferaze i reakciju oksidacije luciferina uz emisiju svjetlosti. Emitirana svjetlost detektira se luminometrom te je obrnuto proporcionalna količini hidroliziranog GTP-a u GTPaznoj reakciji (slika 16).



Slika 16. Princip GTPaza-GloTM Assay-a. Preuzeto i prilagođeno sa ref. 26.

Preporučeni volumni omjer komponenata reakcije je 1:1:2, a korišteni volumeni otopina dani su u tablici 12.

Tablica 12. Volumeni otopina komponenata reakcije za analizu GTPazne aktivnosti.

Komponentne	Volumen / μL
GTPazna reakcija	10
GTP-Glo reagens	10
Detekcijski reagens	20

Kako bi se odredila optimalna količina enzima za mjerenje intrinzične GTPazne aktivnosti, najprije se provodi enzimski titracija. Prvo se pripremi 2X GTP otopina (2 μM GTP, 1 mM DTT u GTPaza/GAP puferu). U konačnoj reakciji molarna koncentracija GTP-a iznositi će 1 μM , kao što je predloženo u protokolu za određivanje intrinzične GTPazne aktivnosti. Također se pripreme otopine ljudskog proteina RRAS2 različitih masenih koncentracija, te se po 5 μL svakog razrjeđenja doda u triplikatima u jažice polistirenske mikrotitarske pločice. Molarna koncentracija enzima određuje se na temelju molekulske mase proteina uzimajući u obzir i prisutnost afinitetnog privjeska (His₆), koja za ljudski protein RRAS2 iznosi 25,332 kDa. Za optimizaciju su uzete sljedeće mase enzima: 6335 ng, 3165 ng, 1582,5 ng, 791,25 ng, 395,625 ng, 197,81 ng, 98,905 ng, 49,45 ng, 24,725 ng, 12,36 ng i 6,18 ng. Kao kontrole korištene su 1 μM GTP otopina bez dodatka enzima i otopina najveće koncentracije enzima, bez dodatka GTP-a. Reakcija se inicira dodavanjem 5 μL prethodno pripremljene 2X GTP otopine u svaku jažicu s enzimom. Nakon toga slijedi inkubacija na sobnoj temperaturi (22-25 °C) u trajanju od 120 minuta.

Neposredno prije dodavanja pripremi se i otopina GTPase-GloTM reagensa prema tablici 13.

Tablica 13. Priprema GTP-Glo reagensa.

Komponenta reakcije	Volumen/ μL
GTPase-Glo TM reagens, 500X	2
ADP, 10 mM	0,5
GTPase-Glo TM pufer	998

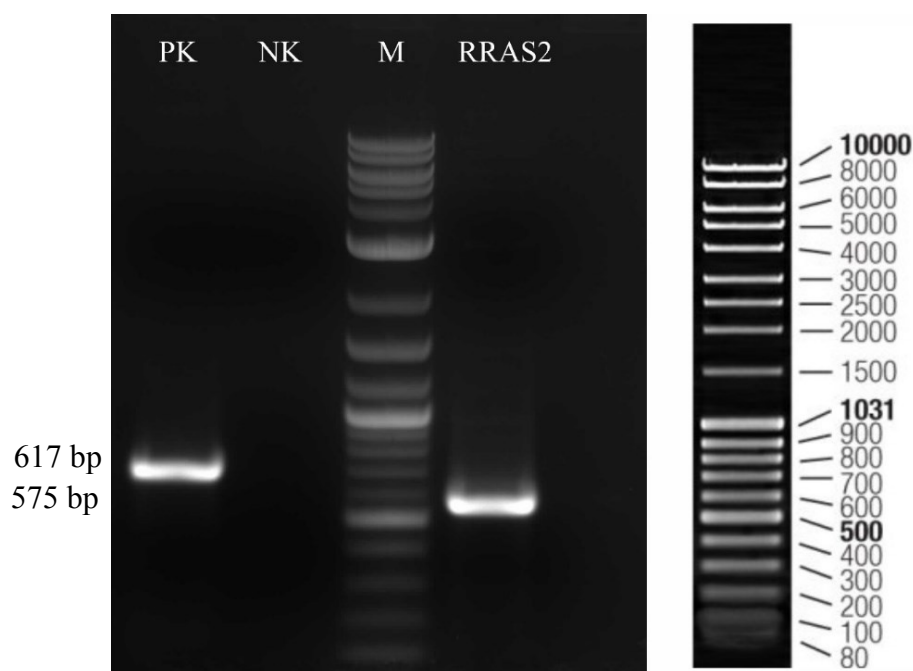
Nakon 2 h doda se po 10 μL pripremljenog GTPase-GloTM reagensa svakoj GTPaznoj reakciji, kratko izmiješa mikropipetom i inkubira na sobnoj temperaturi kroz 30 minuta. Nakon toga se doda 20 μL detekcijskog reagensa, reakcija inkubira 5-10 minuta na sobnoj temperaturi i izmjeri luminiscencija na uređaju Infinite M200 plate reader (Tecan).

Kako bi se testirala intrinzična GTPazna aktivnost spužvinog i ljudskog proteina RRAS2, za svaki protein napravljena je reakcijska smjesa koja sadrži 791,25 ng enzima. Reakcija je provedena u istim uvjetima kao što je prethodno opisano.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1.1. Umnažanje cDNA koja kodira protein RRAS2 iz spužve *Eunapius subterraneus* lančanom reakcijom polimeraze

S ciljem biokemijske karakterizacije proteina RRAS2 iz spužve bilo je potrebno umnožiti fragment cDNA koji kodira protein RRAS2, ugraditi ga u odgovarajući ekspresijski vektor te eksprimirati i pročistiti protein. Prethodno sintetizirana cDNA špiljske spužvice *E. subterraneus* poslužila je kao kalup za umnažanje slijeda nukleotida koji kodira za protein RRAS2 metodom PCR (slika 17). Pri tome su korištene početnice (vidi poglavlje 3.1.6. *Oligonukleotidi i nukleinske kiseline* i 3.2.1. *Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze*) dizajnirane na temelju sekvenciranog genoma i transkriptoma spužve *E. subterraneus* (neobjavljena baza genoma i transkriptoma spužve *E. subterraneus*). Uspješnost umnažanja fragmenata provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu.



Slika 17. Umnoženi fragment cDNA spužve za RRAS2 na agaroznom gelu. Umnoženi slijed dobiven je lančanom reakcijom polimeraze i analiziran elektroforezom na agaroznom gelu. PK – pozitivna kontrola, gen za citokrom-oksidadzu, NK – negativna kontrola, NFW umjesto DNA kalupa; M – marker *MassRuler DNA Ladder Mix* RRAS2 – fragment cDNA za RRAS2

Za pozitivnu kontrolu (PK) umjesto početnica za RRAS2 stavljene su početnice za podjedinicu I citokrom c oksidaze, fragment za koji znamo da bi se trebao umnožiti s obzirom

da ga sadrži spužvina cDNA. Fragment pozitivne kontrole odgovara genu za podjedinicu I citokrom c oksidaze (CO1) od 617 bp.⁶¹ Kao negativna kontrola (NK) služila je reakcijska smjesa koja umjesto DNA kalupa sadrži vodu bez nukleaza (engl. *Nuclease Free Water* - NFW). Prisutnost fragmenta kod pozitivne kontrole, i odsutnost kod negativne potvrđuju da je reakcija umnažanja pravilno provedena i bez zagađenja reakcijske smjese. Fragment dobiven pomoću početnica za RRAS2 nalazi se na poziciji koja odgovara veličini gena za spužvin RRAS2 od 575 bp.

4.1.2. Kloniranje cDNA koja kodira protein RRAS2 iz spužve Eunapius subterraneus u ekspresijski vektor pET28b pomoću specifično osmišljenih početnica

Fragment za EsuRRAS2 uspješno je izoliran i pročišćen iz agaroznog gela, te je napravljena reamplifikacija pomoću početnica kojima su u svrhu ugradnje u ekspresijski vektor pET28b dodana mjesta za djelovanje restrikcijskih enzima *NdeI* i *BamHI*. Odabrane su navedene restrikcijske endonukleaze jer se nalaze unutar MCS (engl. *multiple cloning site*) plazmida pET28b, a ne postoji nukleotidni slijed koji prepoznaju unutar sekvence EsuRRAS2. Dizajnirane su početnice dodavanjem slijeda koji odgovara restrikcijskim mjestima za odabrane endonukleaze na 5'-kraju olinukleotidnog lanca. Nakon PCR reakcije provedena je agarozna gel elektroforeza kako bismo provjerili uspješnost reakcije umnažanja. Na gel su naneseni marker *MassRuler™ Ladder Mix* i fragmenti reamplificiranog RRAS2 u dvije zasebne jažice.

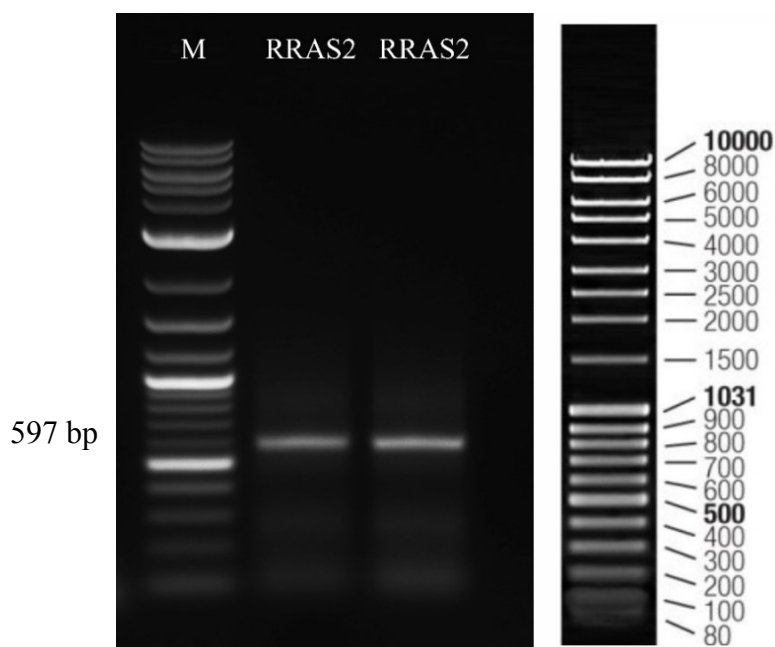
Dizajn početnica za EsuRRAS2 u pET28b (*NdeI/BamHI*):

F_ERRAS2_pET28b_*NdeI*: 5' GTCTAGcatATGGCGGCCAACAAGACCTAACCG 3'

R_ERRAS2_pET28b_*BamHI*: 5' CTAGACggatccTCACAGAATTACACATTTCTTC 3'

5'-GTCTAGcatATGGCGGCCAACAAAGACCTAACCGAATATAAGTTGGT
 TGTGGTTGGTGGAGGTGGAGTTGGCAAATCGGCGCTTACTATTTCAGTT
 CATTTCAGAGTCAATTCGTCGAAGAGTATGACCCACGATAGAAGACTC
 TTATCGGAAGCAGTGC GTGATTGATGATGAAGTGGCAGTCTTGGACAT
 CCTGGACACAGCTGGGCAGGAGGAGTTTAGCGCGATGAGGGAGCAAT
 ACATGCACACGGGAGAGGGATTTCTGCTGGTCTATTTCGATTATCGACC
 GGAACAGCTTTGATGAGATCCACAAGTTTTACAGACAAATTCTAAGGG
 TAAAGGACAGATCCGAGTTTCCGATGATTTTGGTTGCCAACAAAGGCCG
 ATTTGGAGAGCGAAAGAGTGGTACATTATCCTGAGGGTGAAGAGCTTG
 CTGCACA ACTGAAGATCAAGTACATTGAGACAAGTGCCAAACACAAGG
 TGCATGTCGACAAGGCATTTTCATGACCTAGTGAGGGTGCATAAGAAAGT
 ATCAGAAACCTGGTCCAGACAAGAAGGAGAAGAAGAAGAAGAAATGT
GTAATTCTGTGAggatccGTCTAG-3'

Sivom bojom i malim slovima (osim start kodona) označena su restrikcijska mjesta za endonukleaze *NdeI* i *BamHI*, a sivim strelicama mjesta cijepanja za navedene enzime. Podvučena sekvenca označava mjesta sparivanja početnica s restrikcijskim mjestima. Početnice su dizajnirane dodatkom kratkog slijeda nakon mjesta za restrikcijske enzime, kako bismo bili sigurni da će se i restrikcijska mjesta umnožiti PCR reakcijom. Duljina umnoženog fragmenta iznosi 597 bp.

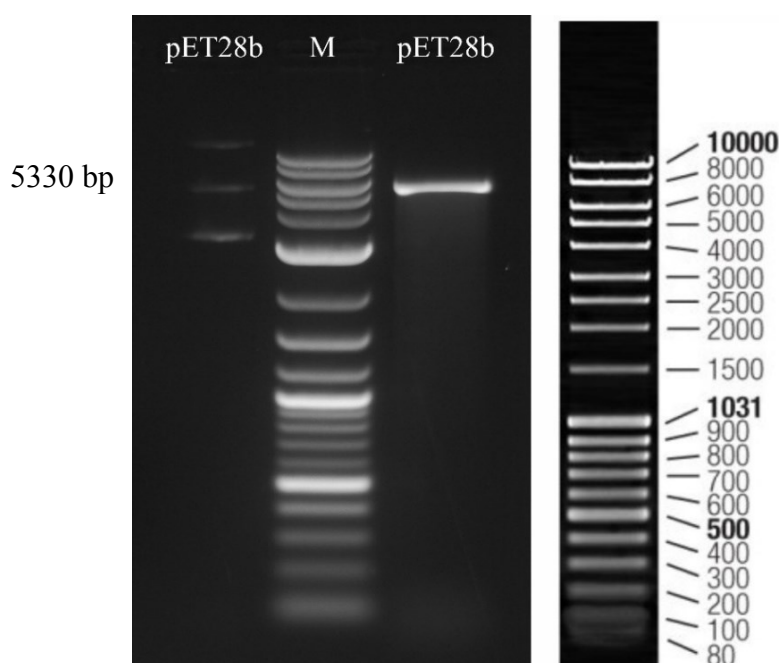


Slika 18. Umnoženi RRAS2 fragmenti na agaroznom gelu. Umnoženi fragmenti RRAS2 reamplificirani su početnicama s restrikcijskim mjestima za endonukleaze *BamHI* i *NdeI* te analizirani agaroznom gel elektroferezom. M – marker *MassRuler™ Ladder Mix*, RRAS2 – fragmenti RRAS2 reamplificirani početnicama za *NdeI/BamHI* restrikcijske endonukleaze.

Reamplificirani fragmenti RRAS2 razdvojeni agaroznom elektroforezom veličinom odgovaraju području oko 600 bp što odgovara veličini očekivanog umnoženog fragmenta (597 bp) (slika 18).

4.1.3. Razgradnja plazmida pET28b restriksijskim endonukleazama (*NdeI/BamHI*)

Cirkularni plazmid pET28b i umnoženi fragment RRAS2 s mjestima za restriksijske endonukleaze *BamHI* i *NdeI* porezani su istim restriksijskim enzimima kako bi se mogli spojiti tijekom ligacije. Nakon inkubacije provedena je provjera uspješnosti razgradnje plazmida agaroznom elektroforezom. Na agarozni gel je osim pocijepanog (linearnog) plazmida nanesen i cirkularni plazmid radi provjere.



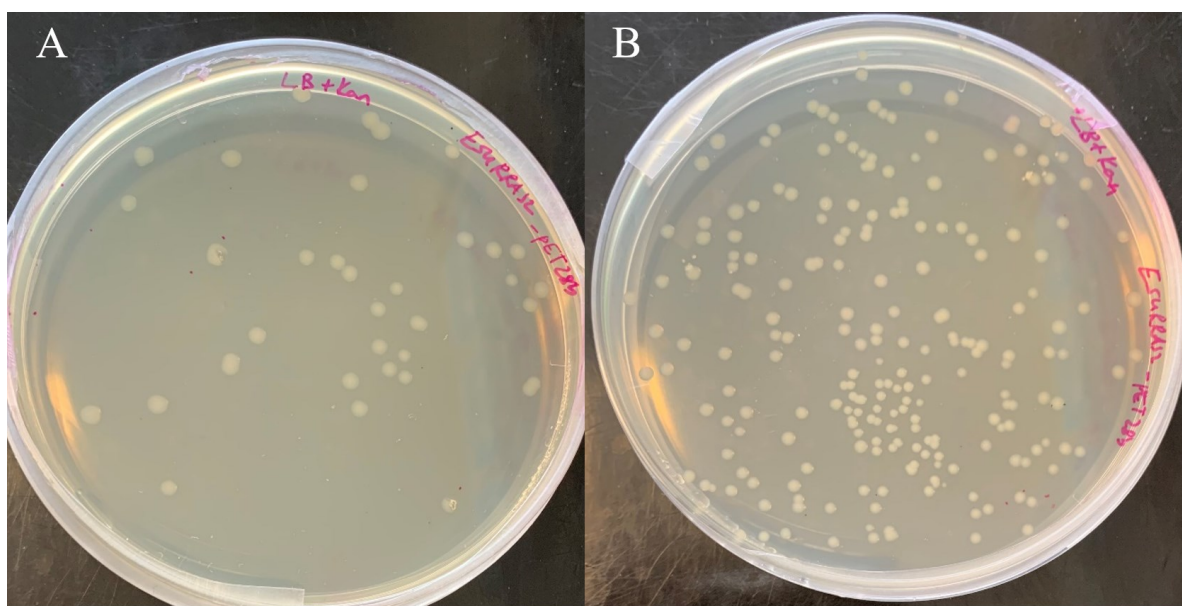
Slika 19. Plazmid pET28b pocijepan restriksijskim endonukleazama *BamHI/NdeI*. pET28b (lijevo) – cirkularni/nepocijepani plazmid, M – marker, pET28b (desno) – pocijepani (linearni) plazmid.

Kod kružne, odnosno nepocijepane plazmidne DNA zamjećuju se tri zasebne linije. Razlog tomu je što cirkularna plazmidna DNA postoji u tri konformacije: superzavijenoj, razmotanoj (relaksiranoj) i linearnoj. Središnji fragment veličinom odgovara linearnoj konformaciji plazmida, superzavijeni (engl. *supercoiled*) odgovara fragmentu koji najbrže putuje, jer se zbog svoje konformacije i najlakše probija kroz gel. Treći fragment odgovara relaksiranoj (engl. *nicked*) DNA, kod koje je samo jedan lanac pocijepan, zbog čega pruža najveći otpor i najsporije putuje. Veličina plazmida pocijepanog restriksijskim endonukleazama odgovara očekivanoj veličini od 5330 bp (slika 19), dobivenih prema *SnapGene Viewer* programu (ref.

53), dok preostali vrlo krati fragment od 38 bp nije vidljiv na gelu jer gel niti nema takvu sposobnost rezolucije.

4.1.4. Transformacija soja BL21+ bakterije *Escherichia coli* rekombinantnim plazmidom pET28b_EsuRRAS2

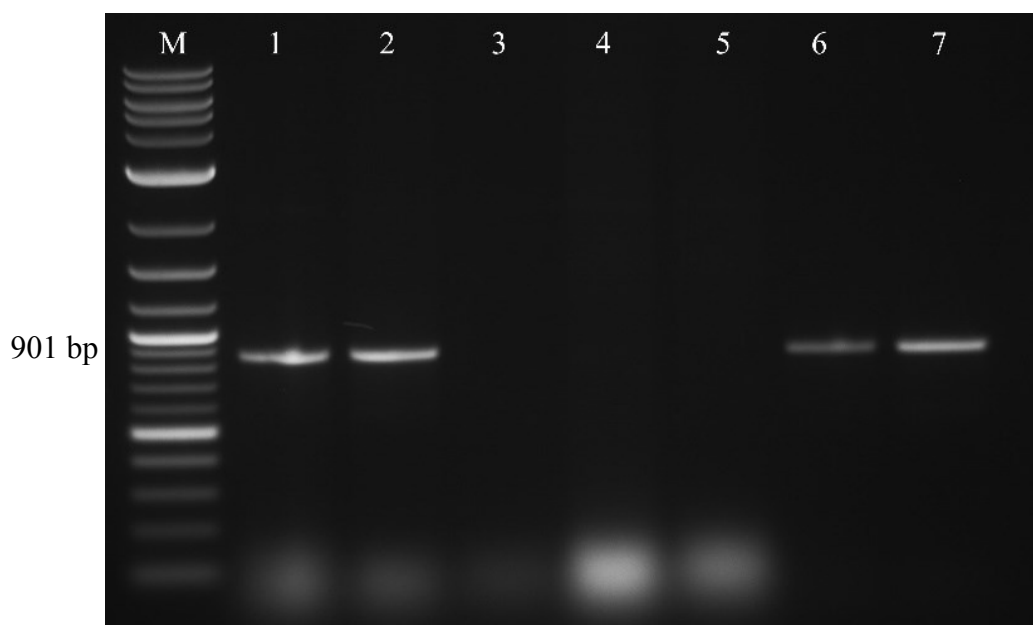
Nakon što smo restriksijskim endonukleazama *Bam*HI i *Nde*I porezali fragment RRAS2 i vektor pET28b i uspješno ih slijepili reakcijom ligacije, rekombinantni plazmid pET28b_EsuRRAS2 smo unijeli u stanice *E. coli* bakterijskog soja BL21+ kemijskom transformacijom. Sljedeće smo stanice nakon oporavka nacijepili na krute LB ploče s kanamicinom. Kanamicin nam je omogućio selekciju uspješno transformiranih kolonija, s obzirom da su na pločama narasle samo kolonije stanica koje su zaprimile plazmid, odnosno koje sadrže gen za rezistenciju na kanamicin (slika 20).



Slika 20. Transformirane kolonije *E. coli* bakterijskog soja BL21+ s unesenim rekombinantnim plazmidom pET28b_RRAS2, nakon prekoćnog uzgoja na 37 °C. A – bakterijske stanice nanesene u nižoj koncentraciji, B – bakterijske stanice nanesene u višoj koncentraciji.

4.1.5. PCR reakcija na kolonijama

U svrhu dodatne provjere ugradnje plazmida pET28b u bakterijske stanice BL21+ provedena je PCR reakcija sa početnicama za T7-promotor i T7-terminator na sedam nasumično odabranih kolonija. T7-terminator i promotor sastavni su dio pET28b plazmida i nalaze se neposredno ispred i iza ugrađene spužvine cDNA za RRAS2.

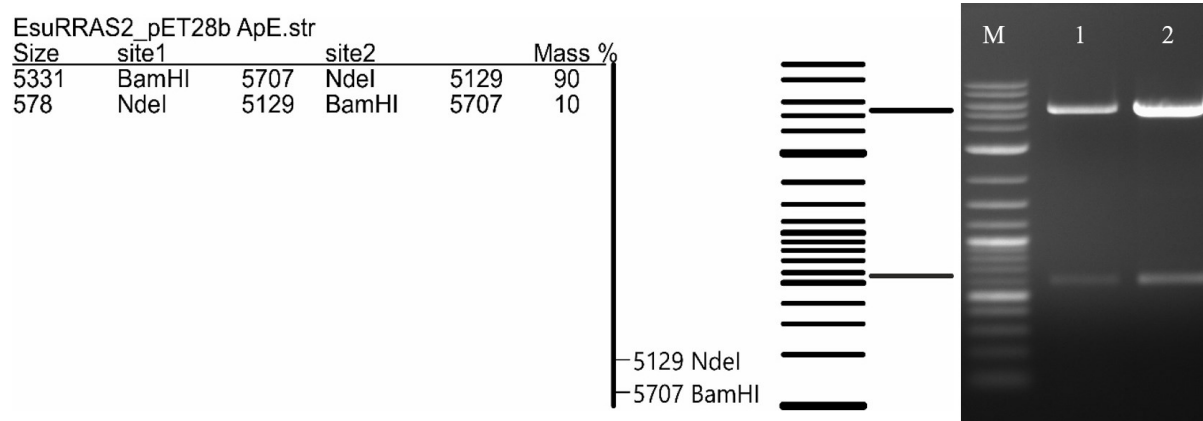


Slika 21. Lančana reakcija polimerizacije na nasumično odabranim kolonijama nakon kemijske transformacije stanica *E. coli* bakterijskog soja BL21+ i prekonoćnog uzgoja, u svrhu provjere uspješnosti transformacije. **M** – marker *GeneRuler DNA Ladder Mix*, **1** – kolonija RRAS2_1, **2** – kolonija RRAS2_2, **3** – kolonija RRAS2_3, **4** – kolonija RRAS2_4, **5** – kolonija RRAS2_5, **6** – kolonija RRAS2_6, **7** – kolonija RRAS2_7.

Prisutnost fragmenta odgovarajuće veličine kod kolonija RRAS2_1, RRAS2_2, RRAS2_6 i RRAS2_7 ukazuje na uspješnost transformacije tih kolonija plazmidom pET28b koji sadrži cDNA od interesa. Fragmenti uspješno transformiranih kolonija se nalaze između 900 i 1031 bp što odgovara veličini fragmenta umnoženog početnicama za T7-promotor i T7-terminator, a uključuje i sekvencu gena za *rras2* (901 bp) (slika 21). Donja pruga u području oko 80 bp, primjetna kod uzorka 1-5, vjerojatno se može pripisati neutrošenim početnicama odnosno nastajanju primer-dimera.

4.1.6. Provjera rekombinantnog plazmida pET28b_EsuRRAS2 restrikcijским enzimima (digestijom) i sekvenciranjem

Kako bismo dodatno provjerili uspješnost transformacije bakterija, provedena je izolacija plazmida iz odabranih bakterijskih kolonija te je izolirani rekombinantni plazmid pET28b_EsuRRAS2 porezan s restrikcijским enzimima *NdeI* i *BamHI*. Razgrađeni plazmid je nakon toga analiziran agaroznom gel elektroforezom. Predviđeni izgled razdvojenih fragmenata RRAS2 i plazmida nakon elektroforeze, zajedno sa dobivenim rezultatom prikazan je na slici 22. Prema *ApE* programu predviđena pozicija unesenog gena za RRAS2 iznosi 578 pb, a veličina porezanog plazmida 5331 pb, što smo i uspješno dobili.



Slika 22. Očekivana i dobivena veličina fragmenata RRAS2 i lineariziranog plazmida pET28b nakon digestije restriktivnim endonukleazama *Bam*HI i *Nde*I. Predviđena pozicija fragmenata dobivena je pomoću *ApE* software-a, ref. 62.

Plazmidi izolirani iz kolonija 1 i 2 poslani su na sekvenciranje, te su dobivene sekvence analizirane programima MEGA7⁵⁴, Clustal X2⁵⁵ i GeneDoc⁵⁶. Nukleotidna sekvenca cDNA za RRAS2 provedena je u proteinsku sekvencu pomoću alata *Expassy Translate*⁵⁷ (slika 23). Sekvenciranjem rekombinantnog plazmida početnicama za T7p i T7t potvrdili smo da se sekvenca za RRAS2 pravilno ugradila u ekspresijski vektor, odnosno da nije došlo do pomaka okvira čitanja i slično.

```

cat cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg cgc ggc agc cat atg gcg gcc aac
H H H H H H S S G L V P R G S H M A A N
aaa gac cta acc gaa tat aag ttg gtt gtg gtt ggt gga ggt gga gtt ggc aaa tcg gcg
K D L T E Y K L V V V G G G G V G K S A
ctt act att cag ttc att cag agt cat ttc gtc gaa gag tat gac ccc acg ata gaa gac
L T I Q F I Q S H F V E E Y D P T I E D
tct tat cgg aag cag tgc gtg att gat gat gaa gtg gca gtc ttg gac atc ctg gac aca
S Y R K Q C V I D D E V A V L D I L D T
gct ggg cag gag gag ttt agc gcg atg agg gag caa tac atg cac acg gga gag gga ttt
A G Q E E F S A M R E Q Y M H T G E G F
ctg ctg gtc tat tcg att atc gac cgg aac agc ttt gat gag atc cac aag ttt tac aga
L L V Y S I I D R N S F D E I H K F Y R
caa att cta agg gta aag gac aga tcc gag ttt ccg atg att ttg gtt gcc aac aag gcc
Q I L R V K D R S E F P M I L V A N K A
gat ttg gag agc gaa aga gtg gta cat tat cct gag ggt gaa gag ctt gct gca caa ctg
D L E S E R V V H Y P E G E E L A A Q L
aag atc aag tac att gag aca agt gcc aaa cac aag gtg cat gtc gac aag gca ttt cat
K I K Y I E T S A K H K V H V D K A F H
gac cta gtg agg gtc ata aga aag tat cag aaa cct ggt cca gac aag gag aag aag
D L V R V I R K Y Q K P G P D K K E K K
aag aag aaa tgt gta att ctg tga
K K K C V I L -

```

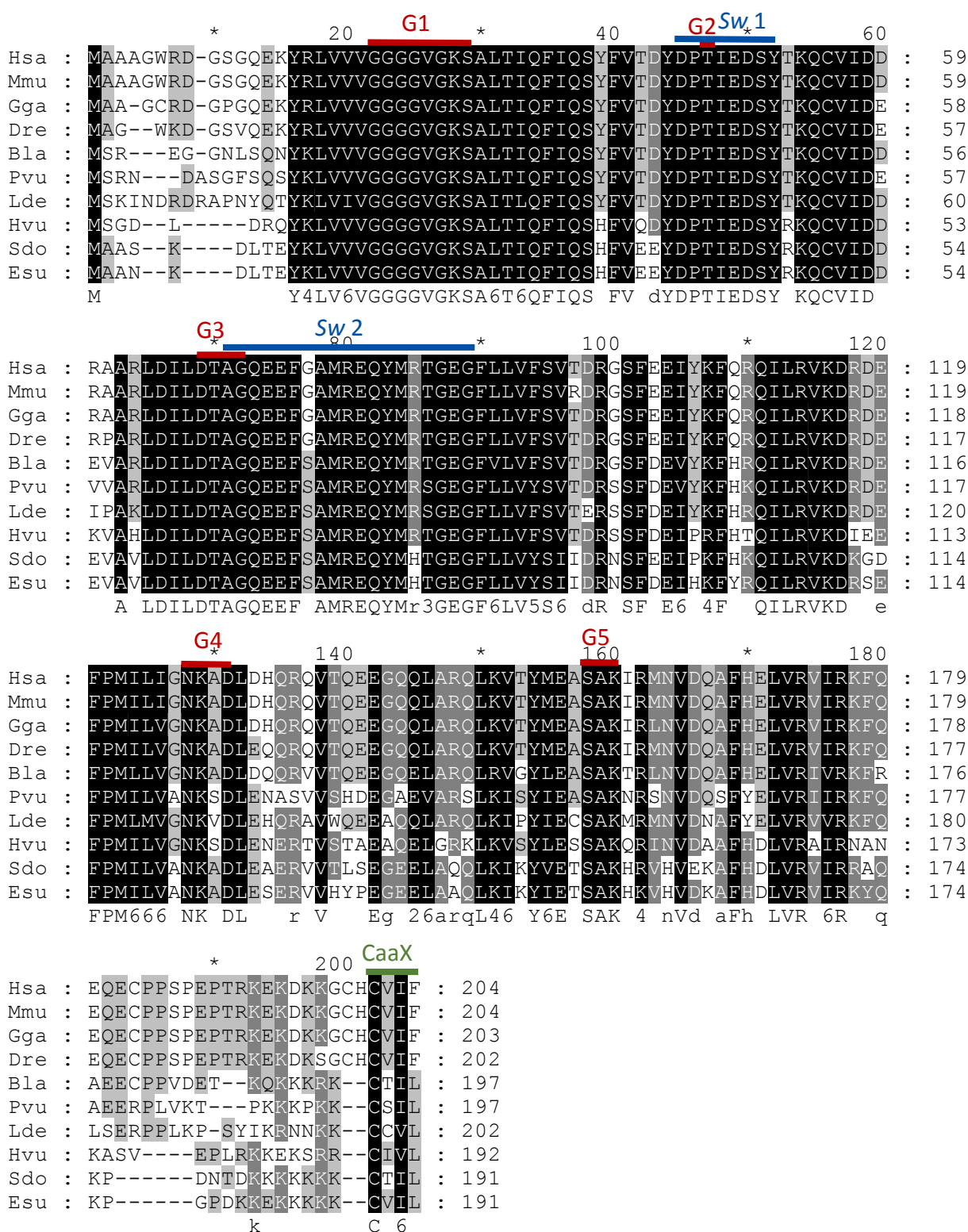
Slika 23. Nukleotidna sekvenca gena *rras2* dobivena sekvenciranjem i sekvenca proteina RRAS2 iz spužve *Eunapius subterraneus* prevedena pomoću alata *Expassy Translate* (ref. 57).

Zelenom bojom označeni su početni i završni kodon, žutom je označen heksahistidinski privjesak, sivom bojom su označeni G1-5 motivi G domene, ljubičastom regije *Switch* I i II te plavom CaaX motiv.

Kako bi se analizirala očuvanost proteinske sekvence između različitih predstavnika životinja, napravljena je pretraga u BLAST⁶³ bazi podataka te su identificirani homolozi proteina iz odabranih predstavnika Metazoa, uključujući i drugog predstavnika Demospongia. Odabrani organizmi su: koljeno Porifera: *Eunapius subterraneus* (ogulinska špiljska spužvica), *Suberites domuncula* (narančasta plutača), Cnidaria: *Hydra vulgaris*, Mollusca: *Patella vulgata* (obični priljepak), Annelida: *Leptinotarsa decemlineata* (krumpirova zlatica), Chordata – Leptocardii – *Branchiostoma lanceolatum*, Chordata – Osteichthyes – *Danio rerio* (zebrica), Chordata – Aves – *Gallus gallus* (divlja kokoš), Chordata – Mammalia – *Mus musculus* (kućni miš), Chordata – Mammalia – *Homo sapiens* (čovjek). Sekvence su poravnate koristeći T-COFFEE⁶⁴ i vizualizirane u programu GeneDoc⁵⁶ (slika 24).

Usporedbom primarne strukture proteina RRAS2 iz *Eunapius subterraneus* te homologa iz različitih organizama uočena je visoka razina očuvanosti sekvence kroz različite stupnjeve evolucijskog razvoja Metazoa.

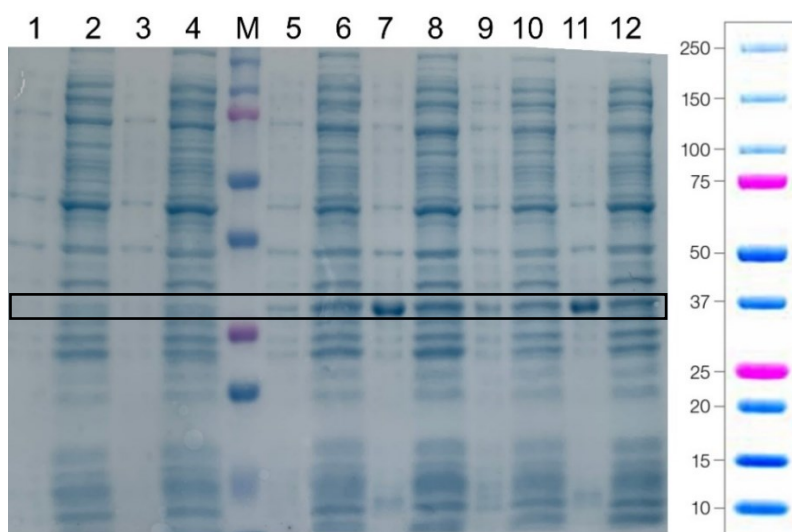
Motivi G1, G2, G3 i G5 u potpunosti su očuvani između svih predstavnika, a iako je G4 motiv očuvan između spužvi i čovjeka, kod organizama *Hydra vulgaris* i *Patella vulgata* alanin je zamijenjen sa serinom, odnosno valinom kod *Leptinotarsa decemlineata*. Switch I regija također je u potpunosti očuvana kod svih odabranih organizama, ali kod Switch II regije primjećuju su razlike na poziciji 76 i 84 (prema HsaRRAS2). Glicin na poziciji 76 kod čovjeka te kralježnjaka *Danio rerio*, *Gallus gallus* i *Mus musculus* zamijenjen je sa serinom kod spužvi i ostalih beskralježnjaka, a arginin na poziciji 84 zamijenjen je histidinom kod spužvi. Očekivano, najveće razlike u duljini i aminokiselinskom slijedu sekvenci uočene su u hipervariabilnoj regiji na C-terminalnom kraju, kao i na N-terminalnom kraju proteina. CaaX motiv, zaslužan za posttranslacijske modifikacije proteina također donekle varira između organizama. Između *E. subterraneus* i čovjeka razlikuje se samo terminalni aminokiselinski ostatak u CaaX motivu.



Slika 24. Višestruko poravnanje aminokiselinske sekvence proteina RAS2 iz spužve *Eunapius subterraneus* s homolozima iz devet odabranih organizama. Crnom bojom su označeni aminokiselinski ostaci očuvani kod svih organizama, tamnosivom očuvani kod skoro svih organizama, a svjetlo sivom ostaci očuvani kod većine organizama. Crvenom bojom su označeni G1-5 motivi G domene, plavom regije *Switch* I i II, a zelenom bojom CaaX motiv.

4.1.7. Probna indukcija prekomjerne ekspresije proteina

Nakon što smo PCR reakcijom, digestijom plazmida i konačno sekvenciranjem potvrdili da se gen od interesa ugradio u plazmidni vektor, odabrali smo jednu od uspješno transformiranih kolonija i započeli probnu indukciju prekomjerne ekspresije proteina. Probna indukcija je provedena kako bismo ustanovili možemo li uopće naš protein uspješno eksprimirati u BL21+ stanicama, odnosno možemo li ga dobiti dovoljno za daljnju analizu. Da bismo odredili optimalne uvjete za ekspresiju proteina, bakterijske kolonije smo uzgajali u dva različita medija s kanamicinom (tekući TB ili LB medij) i uz dodatak različitih koncentracija IPTG induktora (0,8 mM IPTG, uzgoj na 30 °C kroz 2-3 h ili 0,1 mM IPTG, uzgoj na 16 °C preko noći). Kako bismo usporedili količinu ekspresije prije i nakon indukcije uzeta je neinducirana kontrola svakog uzorka. Nakon uzgoja induciranih i neinduciranih kolonija, uzorci su centrifugirani i sonicirani kako bi se odvojio netopljivi talog od supernatanta u kojem bi se trebali nalaziti proteini, pa tako i protein od interesa. Protein His-EsuRRAS2 očekujemo na veličini od 23,939 kDa. Odvojeni talozi i supernatanti induciranih i neinduciranih stanica nanaseni su na poliakrilamidni gel te razdvojeni SDS-elektroforezom (slika 25).

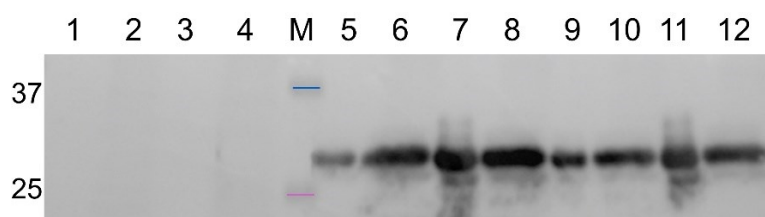


Slika 25. Prekomjerna ekspresije proteina EsuRRAS2 u malom volumenu. Bakterije su uzgajane 3 sata na 30 °C s konačnom koncentracijom IPTG-a 0,8 mM i 19 sati na 16 °C s konačnom koncentracijom IPTG-a 0,1 mM. 1 – talog bakterija prije indukcije u LB mediju, 2 – supernatant prije indukcije u LB mediju, 3 – talog bakterija prije indukcije u TB mediju, 4 – supernatant prije indukcije u TB mediju, M – biljeg *Precision Plus Protein Dual Color Standards*, 5 – talog nakon indukcije na 16 °C u LB mediju, 6 – supernatant nakon indukcije 16 °C u LB mediju, 7 – talog nakon indukcije na 30 °C u LB mediju, 8 – supernatant nakon indukcije na 30 °C u LB mediju, 9 – talog nakon indukcije na 16 °C u TB mediju, 10 – supernatant nakon indukcije 16 °C u TB mediju, 11 – talog nakon indukcije na 30 °C u TB mediju, 12 – supernatant nakon indukcije na 30 °C u TB mediju. Na slici desno su naznačene molekulske mase [kD] pruga na biljegu *Precision Plus Protein Standards*.

Na SDS-poliakrilamidnom gelu vidljiva je prisutnost proteina od interesa malo iznad očekivane veličine (očekivana veličina je 23,939 kDa), odnosno iznad 25 kDa, te smo *western blot* metodom dodatno provjerili odgovaraju li pruge proteinu His-EsuRRAS2 (slika 25). Jasno se primjećuje ekspresija proteina RRAS2 kod induciranih uzoraka u odnosu na neinduciranu kontrolu (uzorci 1-4). Također, usporedbom induciranih uzoraka vidljivo je kako se većina proteina RRAS2 istaložila uz dodatak 0,8 mM IPTG-a, odnosno kod kraćeg uzgoja na višoj temperaturi (uzorci 7 i 11), dok je kod uzgoja pri nižoj temperaturi i dulje vrijeme (0,1 mM IPTG) više proteina ostalo u supernatantu (uzorci 6 i 10). Između ekspresije u TB i LB mediju nije primjetna značajna razlika.

4.1.8. Western analiza

Kako bismo detektirali specifični protein, prethodno razdvojen elektroforezom na poliakrilamidnom gelu, napravljena je *western* analiza. Proteini se transferiraju s gela na čvršću podlogu (nitroceluloznu membranu), kako bismo ih kasnije mogli detektirati specifičnim antitijelima. Membrana s prenesenim proteinima se „blokira“ kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela za membranu. Nakon toga se dodaje otopina primarnog antitijela koja se vežu specifično za protein od interesa (u ovom slučaju primarno antitijelo anti-His (Mouse) budući da detektiramo proteine obilježene histidinskim privjeskom) i, nakon ispiranja, otopina sekundarnih antitijela (sekundarno antitijelo anti-Mouse obilježeno peroksidazom iz hrena (HRP) za detekciju) koja se vežu za primarna antitijela te tako amplificiraju signal koji kasnije detektiramo.

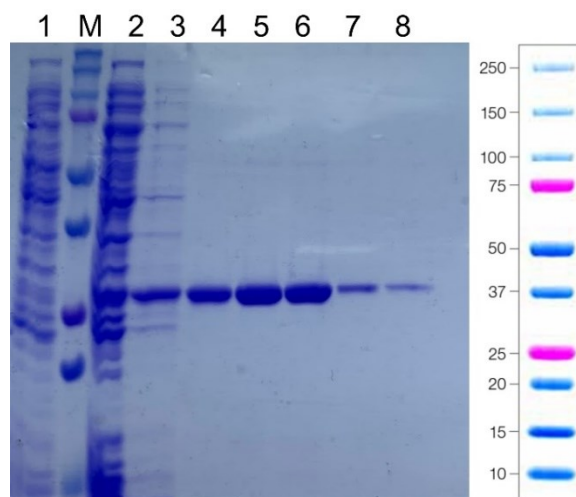


Slika 26. *Western blot* metodom provjerena je uspješnost prekomjerne ekspresije proteina RRAS2. Ekspozicija je trajala 2 sekunde. 1 – talog bakterija prije indukcije u LB mediju, 2 – supernatant prije indukcije u LB mediju, 3 – talog bakterija prije indukcije u TB mediju, 4 – supernatant prije indukcije u TB mediju, M – biljeg *Precision Plus Protein Dual Color Standards*, 5 – talog nakon indukcije na 16 °C u LB mediju, 6 – supernatant nakon indukcije 16 °C u LB mediju, 7 – talog nakon indukcije na 30 °C u LB mediju, 8 – supernatant nakon indukcije na 30 °C u LB mediju, 9 – talog nakon indukcije na 16 °C u TB mediju, 10 – supernatant nakon indukcije 16 °C u TB mediju, 11 – talog nakon indukcije na 30 °C u TB mediju, 12 – supernatant nakon indukcije na 30 °C u TB mediju.

Usporedbom rezultata *western blot*-a (slika 26) vidljivo je da kod neinduciranih uzoraka nema proteina od interesa, odnosno proteina EsuRRAS2 s histidinskim privjeskom. Također se može uočiti signal kod svih induciranih uzoraka (uzorci 5-12) što potvrđuje uspješnost ekspresije proteina EsuRRAS2 pomoću bakterijskih stanica *E. coli* BL21+. Vidljiva je i malo bolja ekspresija proteina u LB mediju u odnosu na TB medij. S obzirom da se kod uzoraka u LB mediju na 30 °C dosta proteina istaložilo u usporedbi sa supernatantom, uzgoj pri 16 °C u LB mediju pokazao se kao optimalan radi najboljeg omjera količine proteina od interesa između taloga i supernatanta, stoga su ti uvjeti odabrani za veliku indukciju.

4.1.9. Izolacija proteina

Probnom indukcijom smo pokazali da možemo RRAS2 protein uspješno eksprimirati u stanicama *E. coli* soja BL21+ i utvrdili optimalne uvjete ekspresije (uzgoj pri 16 °C preko noći uz indukciju 0,1 mM IPTG-om). Nakon toga smo inducirali prekomjernu ekspresiju većih količina proteina. Zahvaljujući histidinskom privjesku, nadodanom na N-terminalnom kraju sekvence, protein smo uspješno mogli izolirati iz supernatanta metodom afinitetne kromatografije s imobiliziranim ionima. U frakcijama prikupljenim propuštanjem supernatanta kroz kromatografsku kolonu, prvo je detektirana prisutnost proteina Bradford reagensom, a zatim su dobivene frakcije provjerene SDS-PAGE elektroforezom.

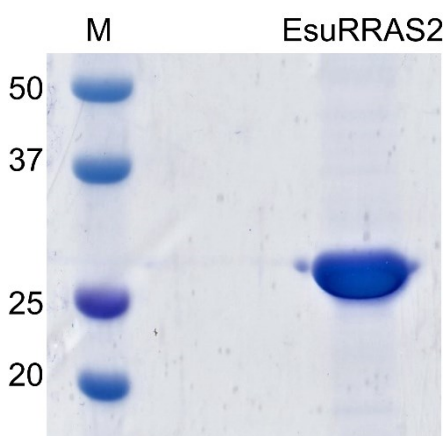


Slika 27. Izolacija proteina RRAS2 afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionima dobivenog prekomjernom ekspresijom na 16 °C preko noći uz indukciju 0,1 mM IPTG-om. 1 – flow trough (FT), M – biljeg *Precision Plus Protein Dual Color Standards*, 2 – proteinska frakcija nakon prvog ispiranja (10 mM IMI), 3 – proteinska frakcija nakon drugog ispiranja (10 mM IMI), 4 – proteinska frakcija nakon trećeg ispiranja (20 mM IMI), 5 – proteinska frakcija nakon četvrtog ispiranja (40 mM IMI), 6 – prvi eluat (300 mM IMI), 7 – drugi eluat (300 mM IMI), 8 – treći eluat (300 mM IMI)

Fragmenti na poziciji oko 25,3 kDa odgovaraju veličini našeg proteina (slika 27). Frakcija 1 (FT) rezultat je prvotnog nanošenja supernatanta zajedno sa kromatografskom smolom na kolonu. Frakcije 2-5 ispirane su puferom sa nižom koncentracijom imidazola (10 mM, 20 mM i 40 mM imidazol) kako bismo uklonili nespecifično vezane proteine i ostale nečistoće. Već kod frakcija 4 i 5 vidljivo je da se s kolonice započeo eluirati protein od interesa i pri nižim koncentracijama imidazola. Pri najvećoj koncentraciji imidazola (300 mM) dolazi do kompetitivnog istiskivanja histidinskog privjeska s kolone čime smo sakupili više željenog proteina.

4.1.10. Ultrafiltracija i mjerenje koncentracije proteina

Kako bismo kasnije mogli pohraniti izolirani protein, dodatno smo ga ukoncentrirali ultrafiltracijom, a zatim i odredili dobivenu koncentraciju proteina mjerenjem apsorbancije pri određenoj valnoj duljini. Nakon ultrafiltracije uzorak je analiziran elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu.



Slika 28. Frakcija proteina RRAS2 nakon ultrafiltracije analizirana elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu. M – biljeg *Precision Plus Protein Dual Color Standards*, EsuRRAS2 – RRAS2 protein iz spužve *Eunapius subterraneus*.

Debela pruga na poziciji oko 25,3 kDa ukazuje na uspješno ukoncentriravanje proteina RRAS2 (slika 28).

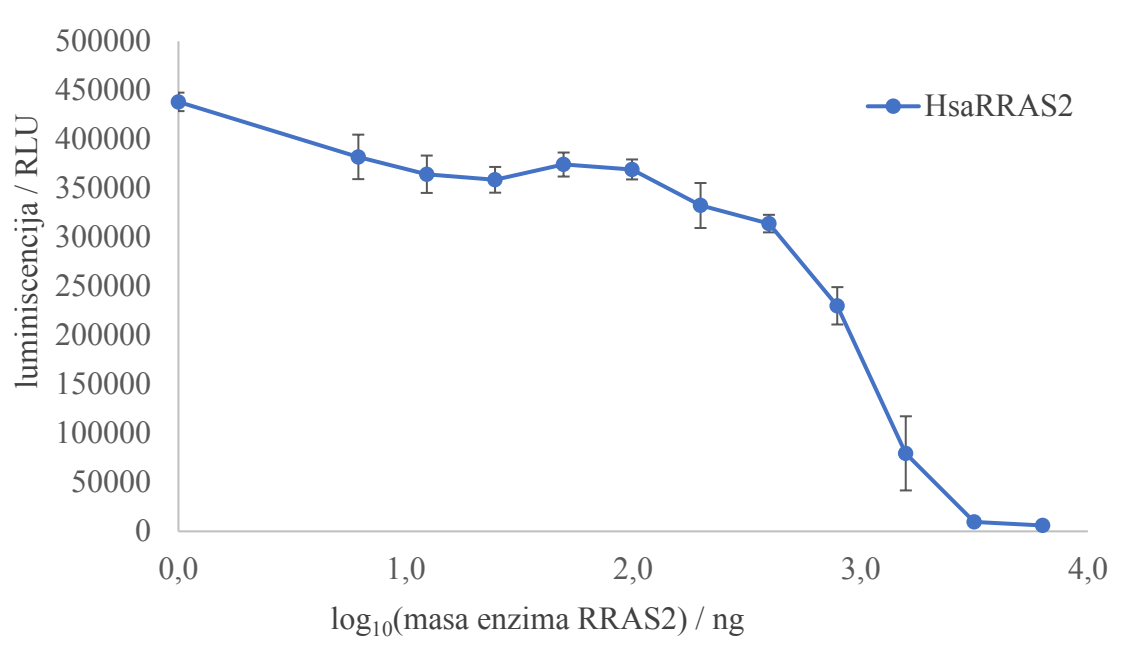
Nakon ultrafiltracije konačna izmjerena koncentracija proteina EsuRRAS2 s heksahistidinskim privjeskom iznosila je 1,598 mg mL⁻¹, uz molekulska masa proteina $M_r=23939,42$ Da i ekstincijski koeficijent $\epsilon=13535$ M⁻¹ cm⁻¹.

4.1.11. Test određivanja GTPazne aktivnosti proteina

Za određivanje intrinzične GTPazne aktivnosti proteina RRAS2 iz spužve *Eunapius subterraneus* (EsuRRAS2) i usporedbu sa intrinzičnom GTPaznom aktivnosti ljudskog proteina RRAS2 (HsaRRAS2) korišten je *GTPase-GloTM Assay* (Promega). Nakon provođenja GTPazne reakcije, preostali GTP nakon reakcije hidrolize preveden je u ATP *GTPase-GloTM* reagensom te je luminiscencija detektirana dodatkom termostabilne luciferaze (*Ultra-GloTM Recombinant Luciferase*) i supstrata luciferina pomoću luminometra *Infinite M200 plate reader* (Tecan). Reakcija je prvotno optimizirana enzimskom titracijom, odnosno mjerenjem luminiscencije GTPaznih aktivnosti različitih masenih koncentracija enzima HsaRRAS2. Kao kontrola za minimalnu vrijednost luminiscencije uzeta je otopina najveće masene koncentracije enzima (6335,0 ng/μL) bez dodanog GTP-a, a kao kontrola maksimalne vrijednosti luminiscencije je uzeta 1 μM GTP otopina bez dodatka enzima. Rezultati enzimske titracije prikazani su u tablici 14 i na slici 29.

Tablica 14. Određivanje optimalne količine enzima HsaRRAS2 za test mjerenja intrinzične GTPaze aktivnosti. Broj ponavljajućih uzoraka n=3.

Masa HsaRRAS2 / ng	Srednja vrijednost Luminiscencije / RLU	Standardna devijacija, σ	t-test
6335,0	5982,3	3024,8	$5,473 \cdot 10^{-5}$
3165,0	9466,0	2845,0	$8,009 \cdot 10^{-4}$
1582,5	79588,5	37827,5	$3,657 \cdot 10^{-3}$
791,3	230109,0	19061,0	$1,048 \cdot 10^{-2}$
395,6	313989,0	8944,2	$1,201 \cdot 10^{-2}$
197,8	332440,0	22952,5	$3,929 \cdot 10^{-2}$
98,9	369244,3	10186,2	$1,180 \cdot 10^{-1}$
49,5	374240,3	12246,6	$1,569 \cdot 10^{-1}$
24,7	358654,7	13135,9	$7,750 \cdot 10^{-2}$
12,4	364338,0	19065,8	$1,193 \cdot 10^{-1}$
6,2	382041,0	22686,4	$2,838 \cdot 10^{-1}$
0,0 (kontrola)	438176,5	9434,5	-



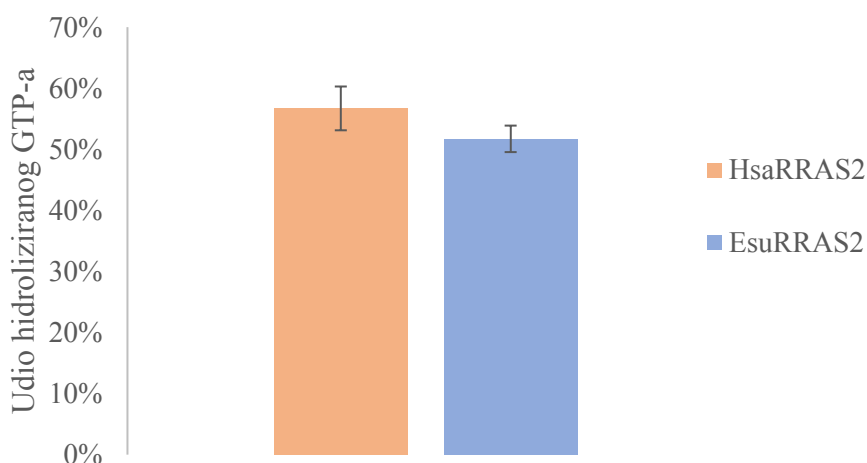
Slika 29. Reakcija enzimske titracije za određivanje optimalne količine enzima za test GTPazne aktivnosti. Pripravljene su otopine enzima HsaRRAS2 različitih masenih koncentracija. Maksimalnu luminiscenciju određuje 1 μM GTP otopina bez dodatka enzima, a minimalnu otopina enzima (masa HsaRRAS2 6335 ng) bez dodatka GTP-a. Reakcija je inicirana dodatkom otopine GTP-a konačne koncentracije 1 μM . Nakon 2 h inkubacije na sobnoj temperaturi, reakciji je dodan GTPase-Glo™ reagens te je reakcija inkubirana 30 min. Nakon dodatka detekcijskog reagensa i inkubacije od 10 minuta, izmjerena je luminiscencija. Naznačena je aritmetička sredina \pm standardnih devijacija. Broj ponavljajućih uzoraka $n=3$.

Srednja vrijednost minimalne luminiscencije (bez GTP-a) u RLU (engl. *relative luminescence unit*) oduzeta je od dobivenih vrijednosti luminiscencije pri različitim masama enzima kako bismo ih mogli uspoređivati. Studentovim t-testom ($p < 0,05$) potvrdili smo da su dobivene srednje vrijednosti luminiscencije pri različitim količinama enzima statistički značajne u odnosu na kontrolnu otopinu bez enzima (tablica 14). Iz slike 29 određena je točka infleksije, odnosno maksimalno smanjenje luminiscencije pri masi enzima od 791,3 ng. Za daljnji test intrinzične GTPaze aktivnost spužvinog RRAS2 i usporedbu s intrinzičnom GTPaznom aktivnosti ljudskog homologa uzeli smo upravo tu masu enzima (tablica 15 i slika 30).

Tablica 15. Usporedba intrinzične GTPazne aktivnosti RRAS2 iz spužve *Eunapius subterraneus* (EsuRRAS2) i čovjeka *Homo sapiens* (HsaRRAS2). Broj ponavljajućih uzoraka n=3.

	<i>m</i> (RRAS2) / ng	luminiscencija / RLU	udio hidroliziranog GTP / %	t-test*
čovjek <i>Homo sapiens</i>	791,3	230109,0 ± 19061,0	56,70 ± 0,036	1,029 · 10 ⁻²
spužva <i>Eunapius subterraneus</i>	791,3	256606,0 ± 11534,2	51,71 ± 0,022	2,49 · 10 ⁻⁴
kontrola	0	531384	0	-

*u odnosu na kontrolu (bez dodatka enzima)



Slika 30. Usporedba intrinzične GTPazne aktivnosti ljudskog i spužvinog proteina RRAS2, pri dodatku 791,3 ng enzima kao što je prethodno određeno enzimskom titracijom. Kontrola je 1 μM otopina GTP-a, bez dodatka enzima. Reakcija je inicirana dodatkom otopine GTP-a konačne koncentracije 1 μM. Nakon 2 h inkubacije na sobnoj temperaturi reakciji je dodan *GTPase-Glo*TM reagens te je reakcija inkubirana 30 min. Nakon dodatka detekcijskog reagensa i inkubacije od 10 minuta, izmjerena je luminiscencija. Naznačena je aritmetička sredina ± standardnih devijacija. Broj ponavljajućih uzoraka n=3.

Vrijednost luminiscencije direktno je proporcionalna količini preostalog GTP-a, a obrnuto proporcionalna količini hidroliziranog GTP-a, odnosno GTPazne aktivnosti. Od dobivenih vrijednosti luminiscencije za 791,3 ng GTPaze oduzeta je minimalna vrijednost luminiscencije (bez GTP-a). Udio hidroliziranog GTP-a nakon GTPazne reakcije dobiven je

tako da je od vrijednosti maksimalne luminiscencije oduzeta vrijednost luminiscencije nakon GTPazne reakcije te je ta vrijednost podijeljena maksimalnom vrijednosti luminiscencije.

Studentovim t-testom ($p < 0,05$) uočena je statistički značajna razlika između intrinzične GTPazne aktivnosti EsuRRAS2 i kontrole bez dodatka enzima te GTPazne aktivnosti HsaRRAS2 u odnosu na kontrolu. Razlika između GTPazne aktivnosti spužvinog i ljudskog homologa RRAS2 nije statistički značajna.

Potvrdili smo da protein EsuRRAS2 posjeduje intrinzičnu GTPaznu aktivnost, odnosno spužvina RRAS2 GTPaza posjeduje sposobnost hidrolize GTP-a bez prisutnosti GAP proteina. Nedavno je utvrđena sposobnost hidrolize GTP-a i kod jedne druge male GTPaze, DRG1, čiji je homolog također identificiran i kloniran iz spužve *E. subterraneus*. Intrinzična GTPazna aktivnost spužvinog proteina DRG1 također je bila vrlo slična ljudskom proteinu DRG1 te je uočena očuvanost i drugih biokemijskih karakteristika. Za DRG1 pokazana je i visoka očuvanost primarne strukture tijekom evolucije Metazoa.⁵

§ 5. ZAKLJUČAK

Zaključci eksperimentalnog dijela diplomskog rada su sljedeći:

- lančanom reakcijom polimeraze pomoću specifično dizajniranih početnica umnožena je cDNA koja kodira za protein RRAS2 iz spužve *Eunapius subterraneus* te je uspješno uklonirana u ekspresijski vektor pET28b
- protein RRAS2 iz spužve *E. subterraneus* uspješno je eksprimiran indukcijom na 16 °C i izoliran iz *E. coli* BL21+ stanica što je potvrđeno metodom *western-blot*
- usporedbom primarne strukture proteina RRAS2 iz spužve *E. subterraneus* s homolognim proteinima odabranih organizama uočena je visoka očuvanost motiva i domena
- potvrđeno je da protein RRAS2 iz spužve *E. subterraneus* posjeduje intrinzičnu GTPaznu aktivnost sličnu ljudskom proteinu RRAS2

§ 6. ISTRAŽIVAČKA NASTAVA KEMIJE (METODIČKI DIO)

6.1. UVOD

Istraživačka nastava je pristup nastavi u kojem su učenici aktivno uključeni u proces učenja te do novog znanja dolaze istraživanjem, time postepeno gradeći razumijevanje principa znanstvene metode i znanosti. Ovaj interaktivni pristup učenju potiče učeničku znatiželju i preispitivanje svijeta oko njih, a uloga učitelja u nastavnom procesu je vođenje i pomaganje učenicima u osmišljavanju i provođenju zamišljenih eksperimenata. Cilj istraživačke nastave je razvoj sposobnosti kritičkog mišljenja, analize podataka, donošenja zaključaka i povezivanja različitih koncepata. Također, istraživačka nastava omogućuje razvoj učeničkih sposobnosti rješavanja problema jer njenom primjenom učenici identificiraju problem, postavljaju hipotezu, odabiru postupke kojima će potvrditi odnosno opovrgnuti postavljenu hipotezu te donose zaključke na temelju prikupljenih podataka.

Prema novom kurikulumu iz 2019. istraživačka nastava općenito ima ulogu u razvoju prirodoznanstvene pismenosti. Ona uključuje razumijevanje metoda znanstvenoga istraživanja te usvajanje vještina znanstvene komunikacije i interpretacije podataka.⁶⁵ Istraživačka nastava može se primjenjivati u širokom spektru nastavnih predmeta, pa tako i u kemiji.

Cilj metodičkog dijela diplomskog rada je potaknuti budućeg nastavnika na primjenu istraživačke nastave u svojoj nastavnoj praksi te oblikovati metodičko-didaktične materijale u okviru nastavne teme *Kemija odabranih biomolekula* (nastavna jedinica: *Enzimi*), primjerene za izvedbu u četvrtom razredu gimnazije.

6.2. LITERATURNI PREGLED

6.2.1. Definicija i ciljevi istraživačke nastave

Za razliku od tradicionalnih metoda gdje nastavnik obično iznosi nove informacije učenicima te je uloga učenika pasivna odnosno od njih se očekuje da mogu te iste informacije zapamtiti i ponoviti, istraživačka nastava potiče učenike na postavljanje pitanja te pronalaženje odgovora na ta pitanja kroz vlastito istraživanje. Time se učenike više angažira i motivira za rad te učenici imaju više kontrole nad vlastitim procesom učenja. Ovakvim oblikom nastave od učenika se traži kritičko promišljanje o onome što uče te povezivanje različitih koncepta. U

tradicionalnoj nastavi kemije, najčešće se izvode tzv. pokusi „prema receptu“ gdje se postiže uspješno izvođenja pokusa, ali bez stvarnog razumijevanja koncepata koji se pokušavaju poučiti.⁶⁶

Kod hrvatskih i stranih autora postoje nesuglasnosti oko interpretacije pojma *istraživačke nastave* te se u literaturi mogu pronaći nazivi poput: poučavanje temeljeno na istraživanju, istraživački usmjerena nastava, istraživački pristup, istraživački rad učenika, istraživačko učenje itd. Ipak, ono na što sve definicije ukazuju je aktivno sudjelovanje učenika u nastavnom procesu u kojem istražujući dolaze do novih spoznaja. Ovo je proces u kojem učenici uz pomoć nastavnika postavljaju pitanja/problem, prikupljaju potrebne podatke, analiziraju prikupljene podatke i na temelju njih daju odgovore odnosno donose zaključke istraživanja.⁶⁷

Među prvim zagovarateljima istraživačke nastave smatra se američki filozof i pedagog John Dewey koji je modelirao istraživačko učenje prema znanstvenoj metodi te je smatrao da bi učenje trebalo biti aktivan proces u kojem se do novog znanja dolazi kroz iskustvo i interakciju s okolinom. Prema njemu istraživačka nastava je oblik nastave u kojem učenici dolaze do novih sadržaja istraživanjem i kritički promišljaju o svijetu. Osim samostalnog stjecanja znanja učenici shvaćaju i razumiju metode, procese i prirodu znanosti te razvijaju različite sposobnosti i vještine.⁶⁷

Temeljni teorijski okvir istraživačke nastave je konstruktivizam, teorija učenja koja se razvila početkom prošlog stoljeća i prema kojoj ljudi, na temelju iskustva, konstruiraju vlastito razumijevanje svijeta oko njih. Znanje se ne može pasivno prenositi s osobe na osobu nego je aktivno konstruirano u umu učenika. Prema konstruktivističkoj teoriji:

- učenje je aktivan proces gdje učenik konstruira vlastito znanje na temelju prijašnjih iskustava i prijašnjeg znanja
- učenje je društveni proces jer ljudi uče jedni od drugih i kroz međusobnu suradnju
- učenje se odvija u određenom kontekstu jer je razumijevanje svijeta oko nas pod utjecajem okoliša te konteksta u kojem se uči
- učenje je dinamičan proces jer se znanje konstanto mijenja i evoluira.^{67,68}

Konstruktivizam je imao značajan utjecaj na obrazovanje te je doveo do razvoja metoda poput istraživačke i problemske nastave koje u fokus stavljaju učenika i potiču ga da sam konstruira vlastito znanje. Iz konstruktivizma proizlazi da bi uloga nastavnika u nastavnom procesu trebala biti samo u olakšavanju procesa učenja, a ne direktan prijenos informacija.⁶⁸ S

obzirom da tradicionalna, predavačka nastava nije u skladu s načinom na koji ljudi konstruiraju znanje, ona se ne smatra optimalnom za poučavanje.

U didaktičko-metodičkoj literaturi spominje se više verzija ciklusa učenja u kojima se istraživačko učenje dijeli na nekoliko faza. Na primjer, 5E model se sastoji od pet faza: uključivanje (engl. *engagement*), istraživanje (engl. *exploration*), objašnjenje (*explanation*), prikaz (*elaboration*) i vrednovanje (*evaluation*).⁶⁹ U sustavnom pregledu literature iz 2015. također je izdvojeno pet faza ciklusa istraživačkog učenja.⁷⁰ Na slici 31 prikazane su faze istraživačke nastave i njihova obilježja prema ref. 70. Tijek ciklusa može ovisiti i o samom kontekstu poučavanja, te npr. samorefleksija može biti prisutna u bilo kojoj od faza.

ORIJENTACIJA	<ul style="list-style-type: none"> • poticanje znatiželje učenika, motivacija za daljnji rad • definiranje problema
KONCEPTUALIZACIJA	<ul style="list-style-type: none"> • postavljanje hipoteze i/ili pitanja koja se mogu ispitati • razumijevanje koncepata vezanih uz problem
ISTRAGA	<ul style="list-style-type: none"> • planiranje istraživanja • provođenje eksperimenta • sakupljanje i analiza prikupljenih podataka
ZAKLJUČAK	<ul style="list-style-type: none"> • donošenje zaključaka na temelju prikupljenih podataka • usporedba s polaznom hipotezom/pitanjem
RASPRAVA	<ul style="list-style-type: none"> • izlaganje rezultata i zaključaka • dobivanje povratnih informacija • samorefleksija

Slika 31. Faze ciklusa istraživačkog učenja. Kreirano prema ref. 70.

Prema stupnju uključenosti nastavnika, odnosno prema stupnju autonomije učenika istraživačka nastava može biti organizirana na tri razine: *strukturirano otkrivanje*, *vođeno otkrivanje* i *otvoreno otkrivanje* (tablica 16).^{71,72} Stupanj autonomije, odnosno slobode učenika raste od strukturiranog, preko vođenog do otvorenog istraživačkog učenja. Porast stupnjeva slobode učenika zahtjeva dugotrajnije pripremanje i planiranje nastavnog sata te je prikladnije za razvoj viših kognitivnih procesa učenika. Odabir stupnjeva slobode ovisi i o samim nastavnim sadržajima.⁷³

Tablica 16. Oblici istraživačke nastave prema stupnju autonomije učenika u izvođenju istraživanja.

Oblik istraživanja	Opis
Strukturirano istraživanje	Nastavnik zadaje problem, materijale i metode za rješavanje problema, a učenicima je nepoznat samo rezultat. Učenici donose zaključke na temelju prikupljenih podataka. (1 stupanj slobode)
Vođeno istraživanje	Nastavnik zadaje problem i osigurava materijale. Učenici sami biraju metode koje će koristiti za rješavanje problema. (2 stupnja slobode)
Otvoreno istraživanje	Nastavnik samo daje potporu kada je potrebna, poticajnim pitanjima vodi učenike. Učenici sami formuliraju problem te metodologiju istraživanja za rješavanje tog problema (3 stupnja slobode)

6.2.2. Prednosti i nedostaci istraživačke nastave

Eksperimentalna istraživanja ukazuju na pozitivan učinak primjene istraživačke nastave u usporedbi s tradicionalnim predavačkim pristupom u kojemu je u središtu nastavnik.⁷⁰ Istraživačka nastava prvenstveno unaprjeđuje učeničke sposobnosti definiranja problema, formuliranja pitanja odnosno hipoteza, planiranja i izvođenja eksperimenata, prikupljanja i analiziranja podataka, donošenja zaključaka te izvještavanja i prezentiranja rezultata.^{74,75} Ova nastavna strategija, omogućuje dublje konceptualno razumijevanje te razvoj viših kognitivnih razina kod učenika.⁷⁵ Pokazano je i kako ovakav oblik nastave doprinosi razvoju kritičkog mišljenja te sposobnosti samorefleksije, povećava intrinzičnu motivaciju te potiče suradnju među učenicima. Osim navedenih učinaka na razvoj prirodosnanstvenih kompetencija istraživačka nastava povećava i interes učenika za znanost te promovira pozitivan stav prema znanosti.^{67,74,76}

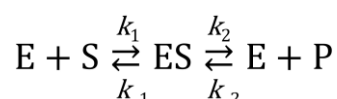
S druge strane, istraživačka nastava zahtjeva dodatan angažman odnosno vrijeme za pripremu te stalno usavršavanje nastavnika. Olakotne okolnosti sigurno nisu propisano tjedno zaduženje nastavnika koje ove obveze ne vrednuje u dovoljnoj mjeri, raspored rada škole, manjak vremena za provedbu 'propisanog' godišnjeg plana, preveliki broj učenika po razrednim odijeljenima i dr. Szalay i Tóth ukazuju na to kako nepravilnom primjenom ovakvog pristupa, na primjer, davanjem prevelike slobode učenicima, može dovesti do neorganiziranog razumijevanja te razvoja miskoncepcija.⁷⁵

6.2.3. Enzimi

Enzimi su katalizatori koji ubrzavaju kemijske reakcije u biološkim sustavima koje bi pri blagim fiziološkim uvjetima (pH=7 i atmosferski tlak) bile prespore. Prema kemijskoj strukturi najčešće su proteini, ali mogu biti i RNA molekule. Enzimi djeluju kroz smanjenje energije aktivacije, formiranjem slabih interakcija između supstrata i enzima odnosno stabilizacijom prijelaznog stanja. Prijelazno stanje je stanje najveće potencijalne energije na reakcijskoj koordinati. Imaju sposobnost ubrzavanja reakcija i preko milijun puta, ali su i vrlo specifični u svom djelovanju. To mogu postići približavanjem reaktanata jednih drugima, omogućavanjem pravilne orijentacije reaktanata i/ili kroz promjenu mehanizma kemijske reakcije. Pri tome jednako ubrzavaju naprednu i povratnu reakciju, odnosno ne utječu na stanje kemijske ravnoteže.⁷⁷

Neki enzimi za svoje djelovanje zahtijevaju prisutnost kofaktora. Kofaktori mogu biti ioni metala ili male organske molekule koje se nazivaju koenzimi. Koenzimi su obično derivati vitamina te se nazivaju prostetičke skupine ako su većim afinitetom vezani za enzim.

Kinetika monosupstratnih enzimski kataliziranih reakcija može se opisati Michaelis-Menteničin modelom. Model vrijedi samo u slučaju kada je početna koncentracija supstrata puno veća od početne koncentracije enzima te opisuje reakciju u kojoj supstrat, S prelazi u produkt P, formiranjem enzim-supstrat kompleksa, ES.⁷⁷



U uvjetima ustaljenog stanja kada je koncentracija produkta vrlo niska te se koncentracija enzim-supstrat kompleksa ne mijenja može se odrediti početna brzina reakcije v_0 :

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

gdje je K_M koncentracija supstrata pri kojoj je početna brzina reakcije jednaka polovini maksimalne brzine reakcije V_{max} , a $[S]$ koncentracija slobodnog supstrata.¹³

Na temelju tog modela mogu se izraziti i drugi kinetički parametri, kao što su obrtni broj, k_{cat} ili k_2 . On predstavlja broj molekula supstrata prevedenih u molekule produkta po jedinici vremena, kada je enzim potpuno zasićen supstratom. Još jedan važan kinetički parametar je i konstanta specifičnosti k_{cat}/K_M koja označava katalitičku učinkovitost enzima i za kinetički efikasne enzime, kod kojih brzina kemijske reakcije ovisi samo o brzini difuzije molekula, iznosi 10^8 – 10^9 s⁻¹ mol⁻¹ dm⁻³.⁷⁷

Aktivnost enzima može biti inhibirana reverzibilno ili ireverzibilno. Reverzibilni inhibitori disociraju vrlo brzo s enzima. Reverzibilna inhibicija može biti kompetitivna, gdje su inhibitori strukturno slični molekulama supstrata te se mogu umjesto njih vezati za aktivno mjesto i akompetitivna, gdje se enzim veže samo za enzim-supstrat kompleks te nekompetitivna, kod koje se inhibitor može vezati i za slobodni enzim i za enzim-supstrat kompleks.⁷⁷

Kao i ostali proteini, enzimi imaju nativnu tercijarnu strukturu, na koju mogu utjecati promjena temperature ili pH-vrijednosti otopine. Raspon vrijednosti temperature odnosno pH, pri kojoj će neki enzim biti stabilan, specifičan je za svaki pojedini enzim. Većina enzima je stabilna oko fiziološke vrijednosti pH (~ 7,4), a pri vrlo niskim i vrlo visokim pH-vrijednosti većina denaturira, nakon čega mogu i agregirati odnosno taložiti. Uslijed promjene pH-vrijednosti dolazi do promjene naboja bočnih ogranaka aminokiselina, što utječe na strukturu enzima, a time i na njegovu funkciju. Iznimka su npr. probavni enzimi poput pepsina, koji optimalno djeluje pri pH-vrijednosti puno nižoj od 7. Stoga je kod ispitivanja enzimske aktivnosti nužno pH-vrijednost otopine držati u optimalnom rasponu, koristeći pri tome odgovarajuće pufere.^{78,79}

Povećanje temperature pozitivno djeluje na brzinu kemijskih reakcija. Općenito vrijedi kako se za svakih 10 °C brzina kemijske reakcije udvostruči. Ipak, enzimi, kao i ostali proteini pri previsokoj temperaturi mogu biti ireverzibilno inaktivirani, tako da i za ovaj parametar većina enzima pokazuje optimalni raspon vrijednosti pri kojima je katalitička aktivnost maksimalna.^{78,79}

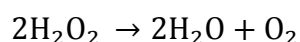
Prema Međunarodnoj uniji za biokemiju i molekularnu biologiju enzimi se klasificiraju prema vrsti katalitičke reakcije u 6 skupina. Unutar pojedinih klasa, enzimi se imenuju prema vrsti supstrata na koje imaju specifično djelovanje.⁸⁰ (tablica 17)

Tablica 17. Podjela enzima prema vrsti reakcija koje kataliziraju. Kreirano prema ref. 80.

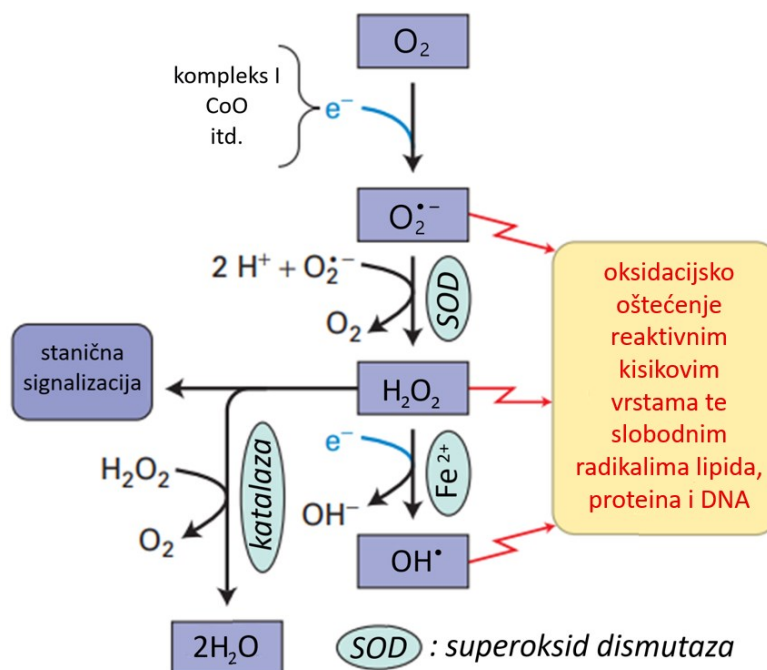
Skupina	Reakcije koje kataliziraju
Oksidoreduktaze	Reakcije oksidacije i redukcije
Transferaze	Prijenos funkcijskih skupina s jedne na drugu molekulu
Hidrolaze	Reakcije hidrolize odnosno cijepanja C–O, C–N, C–C i drugih veza
Liaze	Reakcije eliminacije uz stvaranje dvostruke veze ili adicije na dvostruku vezu.
Izomeraze	Reakcije intramolekulskog prijenosa funkcijskih skupina
Ligaze	Reakcije formiranja novih spojeva uz utrošak energije

6.2.4. Katalaza

Katalaze pripadaju skupini oksidoreduktaza, specifičnije hidroperoksidaza te su jedna od najviše proučavanih skupina enzima. Primarna im je uloga kataliza raspada vodikovog peroksida na vodu i kisik. Ukupna reakcija katalize je sljedeća:^{81,82}



Katalaze sprječavaju akumulaciju toksičnog vodikovog peroksida u stanicama te štite stanice od oksidacijskog stresa odnosno od reaktivnih vrsta kisika, ROS (engl. *reactive oxygen species*), koje nastaju kao produkti metaboličkih procesa. Neke od njih su radikali poput superoksidnog aniona ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroksilnog radikala (HO^{\cdot}), peroksilnog radikala (RO_2^{\cdot}) ili vrste koje mogu lako prijeći u radikale poput vodikovog peroksida (H_2O_2) i jednostavnog singletnog kisika ($^1\text{O}_2$).^{82,83} Takve reaktivne kisikove vrste mogu reagirati s drugim molekulama čime ponovno mogu nastati radikali dovodeći do lančane reakcije te mogućeg oštećenja DNA molekula, lipida ili proteina. Na slici 2. prikazan je put nastanka i inaktivacije toksičnih kisikovih vrsta djelovanjem superoksid-dismutaze i katalaze.⁸⁴



Slika 32. Formiranje i inaktivacija toksičnih kisikovih vrsta. Elektroni iz lanca prijenosa elektrona u npr. mitohondrijima mogu reducirati molekularni kisik do visokoreaktivnog radikala superoksida. Nakon toga superoksid-dismutaze parcijalno oksidiraju superoksidni radikal do vodikovog peroksida, koji može biti dalje reduciran do hidroksilnog radikala ili inhibiran katalazama. Inaktivacija ovakvih visokoreaktivnih kisikovih vrsta je bitna za normalno funkcioniranje organizma jer inače može doći do oštećenja brojnih biomolekula. Prevedeno i prilagođeno prema ref. 84.

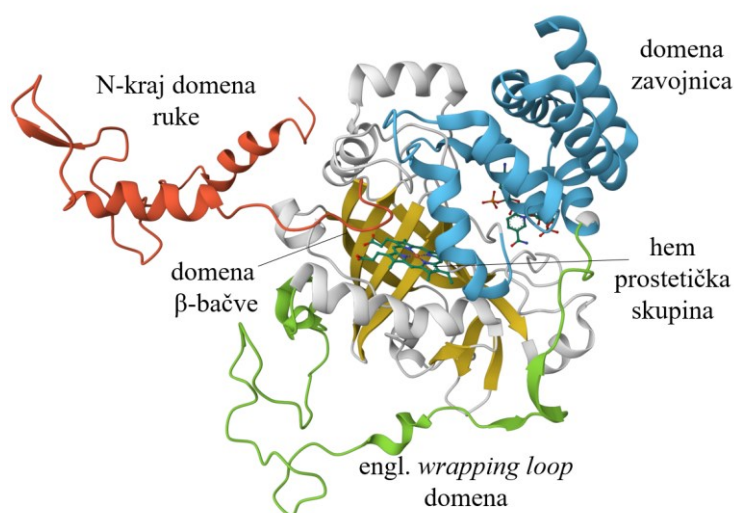
Katalaze su pronađene kod svih aerobnih organizama te nekih anaerobnih mikroorganizama, a u tkivima sisavaca su najzastupljenije u jetri te eritrocitima. Na staničnoj razini najviše su prisutne unutar organela peroksisoma, ali ih se može pronaći u citosolu, drugim staničnim organelima poput mitohondrija te izvanstanično.⁸³

Obično se klasificiraju u tri skupine: monofunkcionalne katalaze, katalaze-peroksidaze i pseudokatalaze. Monofunkcionalne katalaze su najveća i najviše proučavana skupina katalaza. One se dalje mogu podijeliti na katalaze malih podjedinica (55-69 kDa) s prostetičkom skupinom hem b (protoporfirin IX nekovalentno vezan na željezni ion) i katalaze velikih podjedinica (75-84 kDa) s prostetičkom skupinom hem d (oksidirana forma protoporfirina IX).^{81-83,85} Katalaze malih podjedinica imaju sposobnost vezanja NADP(H) kofaktora koji nije esencijalan za njihovu aktivnost, ali se pretpostavlja da ima ulogu u zaštiti enzima od formiranja katalitički inaktivnog intermedijera. S druge strane katalaze velikih podjedinica pokazuju povećanu stabilnost pri visokim temperaturama i otpornost na proteolizu.^{81,83,86}

Druga skupina, katalaza-peroksidaza posjeduje i značajnu peroksidnu aktivnost, gdje koriste razne organske spojeve kao donore protona. Nađene su kod bakterija, arheobakterija te gljiva, a

u svom aktivnom mjestu sadrže hem b. Treća skupina tzv. pseudokatalaza nema prostetičku skupinu hem nego aktivno mjesto sadrži dva iona mangana. Do sad su samo okarakterizirane kod mliječnih i termofilnih bakterija.^{85,86}

Katalaza kod čovjeka je homotetramerni protein veličine 62 kDa po podjedinici te sadrži nekovalentno vezanu prostetičku skupinu hem.⁸⁶ Hem je prostetička skupina i drugih proteina poput hemoglobina, mioglobina te citokroma c, a čini ju konjugirani heterociklički dio (protoporfirin IX) koordinacijski vezan na atom željeza preko četiri dušikova atoma. Svaka podjedinica (A, B, C i D) katalaze sastoji se od četiri domene (slika 33).^{81,83}



Slika 33. Shematski prikaz strukture katalaze ljudskih eritrocita s označenim funkcionalnim domenama i prostetičkom skupinom hem. PDB: 1DGF. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 87.

Rigidna i stabilna struktura katalaza čini ih otpornijima od drugih proteina na promjene pH-vrijednosti, denaturaciju pri visokim temperaturama te proteolizu. Optimalni raspon pH-vrijednosti za monofunkcionalne katalaze je između 5 i 10.^{82,83} Na primjer, optimalna pH-vrijednost za aktivnost katalaze kokošje jetre je 7,5, a optimalna temperatura oko 30 °C.⁸⁸

6.3. PRIPREMA ZA NASTAVU

6.3.1. Pregled kurikuluma i školskih udžbenika

Nacionalni kurikulum Republike Hrvatske kao jedan od odgojno obrazovnih ciljeva učenja *Kemije* navodi i „razumijevanje principa znanstvenog i etičkog pristupa istraživanju te rješavanje kemijskih problema“. Također, kurikulum naglašava važnost razvoja prirodoslovne pismenosti kroz istraživačku nastavu koja uključuje „usvajanje općenitoga prirodoslovnog pogleda, razumijevanje metoda znanstvenoga istraživanja te usvajanje vještina znanstvene komunikacije i interpretacije podataka“ kao i sadržaje vezane uz kemijsko nazivlje te kemijske simbole. To se može postići kroz nastavu temeljenu na iskustvu odnosno istraživačku nastavu, izvođenje pokusa te proučavanje prirodnih pojava. Prema kurikulumu istraživačko učenje, kao jedan od oblika učenja otkrivanjem sastoji se od uočavanja i postavljanja problema, oblikovanja hipoteza o rješavanju problema, prikupljanja informacija izvođenjem pokusa, radu na tekstu te izvođenja zaključaka o ispravnosti postavljenih hipoteza odnosno rješavanja problema i sl. S obzirom da se ne mogu svi nastavni sadržaji obraditi samo kroz iskustveno učenje, kurikulum predlaže primjenu i drugih nastavnih metoda i postupaka (razgovor, demonstracijski pokus, nastavni listići itd.).⁶⁵

Koncept *Enzima* se u nacionalnom kurikulumu prvi puta spominje u osmom razredu osnovne škole, unutar koncepta B (*Promjene i procesi*). Učenici spoznaju ulogu katalizatora u drugom razredu gimnazije. Prema definiranim odgojno-obrazovnim ishodima za drugi razred gimnazije od učenika se također očekuje da mogu analizirati brzinu kemijske reakcije i djelovanje različitih čimbenika na brzinu kemijske reakcije (površina reaktanata, agregacijsko stanje, koncentracija i temperatura). Nakon toga enzimi se spominju tek u 4. razredu srednje škole unutar izborne teme *Kemija odabranih biomolekula*.⁶⁵ Odgojno-obrazovni ishodi vezani uz odabranu nastavnu jedinicu navedeni su u tablici 18 (poglavlje 6.4.2.).

6.3.2. Pregled školskih udžbenika

Za odabranu nastavnu jedinicu pregledani su udžbenici drugog i četvrtog razreda gimnazije sljedećih izdavača: Alfa^{89,90}, Školska knjiga^{91,92} i Profil Klett^{93,94}.

U drugom razredu gimnazije učenici se upoznaju s kemijskom termodinamikom i kinetikom. U navedenim udžbenicima istaknuto je kako se kemijske reakcije u prirodi ne odvijaju jednakom brzinom te je naglašena razlika između brzina kemijske reakcije te brzine trošenja reaktanata, odnosno brzine nastajanja produkata. Također, kao preduvjeti kemijske reakcije

navedeni su i broj uspješnih sudara čestica reaktanata kao i prelazak energetske barijere (energije aktivacije). Od učenika drugog razreda gimnazije se također očekuje da mogu konstruirati entalpijski dijagram endotermnih i egzotermnih reakcija, kao i reakcijski dijagram odnosno promjenu potencijalne energije čestica tijekom reakcije. Navedeni su i objašnjeni čimbenici koji utječu na brzinu kemijske reakcije: koncentracija reaktanata, dostupna površina reaktanata (kod čvrstih reaktanata) i temperatura. Pojedini izdavači navode još i parcijalni tlak reaktanata (kod plinovitih reaktanata), agregacijsko stanje reaktanata te utjecaj katalizatora odnosno inhibitora na brzinu kemijske reakcije. U udžbenicima izdavača Školska knjiga i Profil Klett opisan je pokus katalitičke razgradnje vodikovog peroksida, navedeni su svježi kvasac ili krumpir kao izvor katalaze te i anorganski katalizatori ove reakcije KI (aq) i MnO₂ (s).^{89,91,93}

U četvrtom razredu, učenici se upoznaju s kemijskom strukturom aminokiselina, njihovih polimera (peptida, proteina) kao i s fizikalno-kemijskim svojstvima koja im osiguravaju njihove strukture. Spoznaju kako struktura odnosno naboj aminokiselinskih ostataka ovisi o pH-vrijednosti okruženja u kojem se nalaze. Navedena je i značajnost redosljeda aminokiselina u njihovoj primarnoj strukturi te su opisane i sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura proteina. Također, učenici spoznaju kako je nativna struktura proteina podložna djelovanju vanjskih čimbenika poput pH-vrijednosti otopine, temperature, prisutnosti soli teških metala i sl. te su upoznati s pojmovima poput denaturacije odnosno koagulacije proteina. Osim toga, u udžbenicima su opisana tri pokusa odnosno testa dokazivanja aminokiselina/proteina (biuret, ksantoproteinska i ninhidrinska reakcija).^{90,92,94}

Obrazloženo je i kako enzimi mogu biti manje ili više složene građe te sadržavati i neproteinski dio (prostetičku skupinu, koenzim). Također, u udžbenicima je više ili manje detaljno obrazloženo kako aktivnost enzima ovisi o čimbenicima poput temperature, pH-vrijednosti, prisutnosti inhibitora te koncentraciji enzima odnosno supstrata. Opisan je i način djelovanja enzima, preko formiranja kompleksa enzim-supstrat te je naglašena specifičnost enzima u njihovom djelovanju. Udžbenici navode i ulogu aktivnog mjesta kao strukture nužne za enzimski katalizirane reakcije, a samo kod jednog od izdavača je spomenuto kako je i ostatak proteina nužan za katalitičku funkciju.^{90,92,94} U udžbeniku izdavača Profil Klett dana je uputa za jednu od mogućih izvedba pokusa opisanog u ovom radu – raspad vodikovog peroksida kataliziran katalazom. U opisanom pokusu uspoređena je aktivnost katalaze za

kuhani i svježi krumpir te pileću jetricu te je također prisutnost kisika ispitana tinjajućom trješćicom.⁹⁴

6.4. PRIJEDLOG NASTAVNOG SATA

6.4.1. Objašnjenje nastavnog sata

Nastavni sat osmišljen je za četvrti razred gimnazije s obzirom da se prema kurikulumu koncept *Enzima* obrađuje upravo u četvrtom razredu te je ovakvo, otvoreno istraživanje prikladnije za zadanu temu pri višim stupnjevima kognitivnog razvoja učenika. Nastavna jedinica je zamišljena kao 90-minutni nastavni sat u kojem se učenici prvo upoznaju s konceptom enzima, spoznaju da su enzimi po kemijskoj strukturi proteini te se prisjećaju glavnih obilježja strukture i funkcije proteina. Kako bi se potakla radoznalost i motivacija za provođenje eksperimenta te za kasniju interpretaciju rezultata važno je s učenicima raspraviti važnost enzima za naš svakodnevni život te općenito funkcioniranje bioloških sustava. Za ispitivanje aktivnosti enzima odabran je enzim katalaza. Izvori katalaze lako su dostupni i relativno jeftini te je reakcija raspada vodikovog peroksida katalizirana ovim enzimom vrlo efikasna, a time i prikladna za promatranje unutar nastavnog sata. Kao izvor enzima može se odabrati niz lako dostupnih namirnica poput pileće ili goveđe jetrice, pekarskog kvasaca, banane ili krumpira. Ipak, kiselo voće poput rajčice ili citrusa nije preporučljivo, s obzirom da je optimalna aktivnost katalaze zabilježena pri neutralnom pH.^{95,96} Također, učenici mogu lako ispitivati niz čimbenika koji utječu na katalitičku aktivnost ovog enzima, poput temperature, pH, količine supstrata ili enzima, inhibitora itd.

U glavnom dijelu nastavnog sata učenici u manjim skupinama, do četiri učenika, planiraju i provode svoje pokuse odnosno mala istraživanja kroz koja ispituju utjecaj različitih čimbenika na aktivnost enzima. Sat je osmišljen na način da potiče učenike na razmišljanje, razvija sposobnosti definiranja i rješavanja problema te planiranja načina rješavanja istih uz ograničene resurse. Na temelju dostupnog pribora učenici definiraju vlastite hipoteze i prijedloge postupaka testiranja definiranih hipoteza. Tijekom provođenja učeničkih pokusa nastavnik obilazi razred, promatra što učenici rade te prema potrebi pomaže i vodi učenike. Učenici međusobno komentiraju svoje rezultate te ih uspoređuju s početnom hipotezom. Nakon što sve grupe završe s eksperimentalnim radom te zapišu svoje zaključke, predstavnici svake skupine iznose hipotezu, način rada te rezultate i zaključke svoje grupe. Na posljetku se provodi sistematizacija nastavnih sadržaja ove nastavne jedinice.

6.4.2. Priprema materijala i metoda za nastavni sat

Razred: 4. razred gimnazije

Nastavna tema: Kemija odabranih biomolekula

Nastavna jedinica: Enzimi

Trajanje: 90 min

Cilj: Upoznati enzime kao katalizatore biokemijskih reakcija na primjeru katalaze te istražiti ovisnost enzimske aktivnosti o pH-vrijednosti otopine, temperaturi, količini supstrata i količini enzima.

Prethodno potrebne vještine, znanja i sposobnosti:

- objasniti utjecaj promjene temperature, koncentracije reaktanata i dostupne površine reaktanata na brzinu kemijske reakcije
- razlikovati skupine aminokiselina prema fizikalno-kemijskim svojstvima
- prepoznati načine dokazivanja aminokiselina/proteina u otopini (biuret reakcija)
- razlikovati primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternu strukturu proteina
- objasniti ovisnost naboja aminokiselina o pH-vrijednosti otopine
- objasniti utjecaj temperature na strukturu i funkciju proteina
- primijeniti osnovna matematička znanja i vještine
- donositi zaključke na temelju pokusa

Procjena opasnosti i rizika:

Vodena otopina vodikovog peroksida, klorovodična kiselina i natrijeva lužina mogu djelovati nagrizajuće i nadražujuće za kožu. Potrebno je oprezno rukovanje.

Tablica 18. Razrada odgojno-obrazovnih ishoda i zadaci/aktivnosti za provjeru njihove usvojenosti

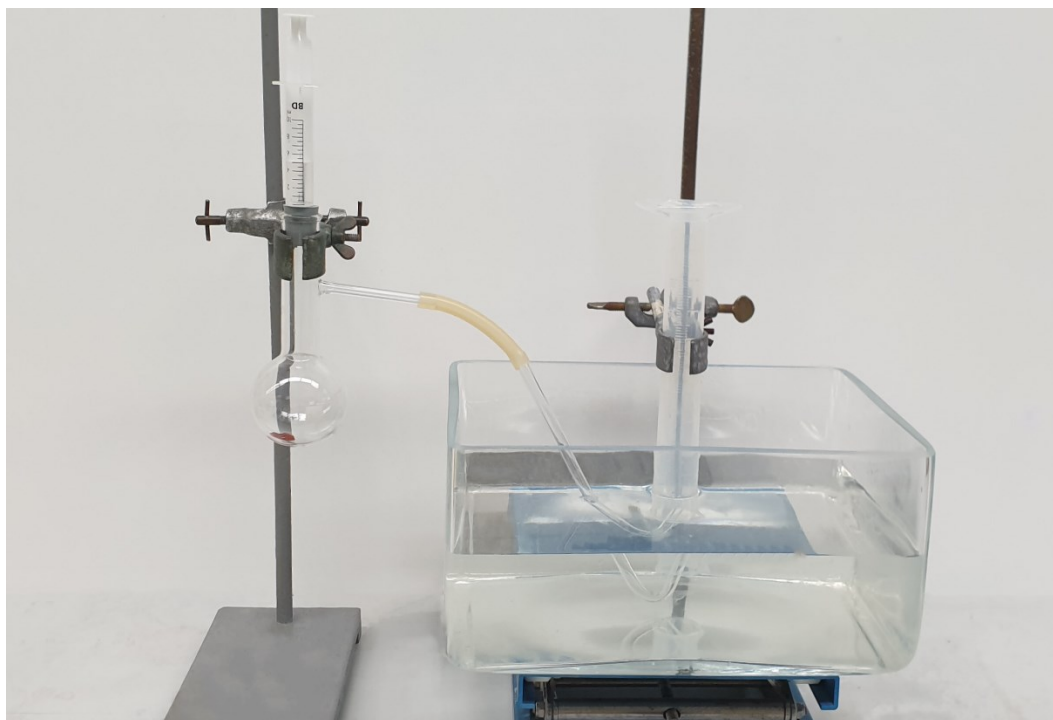
Odgojno-obrazovni ishodi	Razrada ishoda	Kognitivna razina	Zadatak/ primjer ključnih pitanja za provjeru ostvarenosti ishoda
KEM SŠ A.4.12. Istražuje svojstva, sastav i vrstu odabranih biomolekula primjenjujući kemijsko nazivlje i simboliku u okviru koncepta.	Opisuje svojstva, sastav i vrstu odabranih spojeva.	2.	Kako se mijenja aktivnost katalaze pri različitim pH-vrijednostima? Obrazloži odgovor.
	Povezuje strukturu odabranih biomolekula s njihovom funkcijom u organizmu.	2.	Katalaza je enzim prisutan kod skoro svih aerobnih organizama i kod nekih anaerobnih. Grade je četiri podjedinice od kojih svaka sadrži hem prostetičku skupinu u svom aktivom mjestu. Kojoj skupini biološki važnih molekula pripada katalaza? Na temelju rezultata izvedenog pokusa pretpostavi koja je uloga katalaze u našem tijelu.
	Istražuje ulogu odabranih spojeva.	2.	Ubaci komadić sirove pileće jetrice u jednu od epruveta u koje je prije ulivena otopina vodikovog peroksida. Nakon toga pažljivo uroni tinjajuću trješčicu u epruvetu, bez da dotakneš reakcijsku smjesu. Zabilježi opažanja.
	Primjenjuje kemijsko nazivlje i simboliku u okviru koncepta.	2.	Jednadžbom kemijske reakcije prikaži reakciju koju katalizira dodatak pileće jetrice otopini vodikovog peroksida.
	Objašnjava djelovanje enzima u organizmu (energija aktivacije).	1.	Na prikazanom grafičkom prikazu označi koja krivulja se odnosi na katalitički ubrzanu reakciju, a koja na reakciju bez prisutnosti katalizatora.
KEM SŠ B.4.13. Istražuje kemijske promjene odabranih biomolekula.	Istražuje kemijske promjene odabranih biomolekula. Objašnjava fizikalna i kemijska svojstva odabranih biomolekula.	2.	Ubaci komadić pileće jetrice u otopinu vodikovog peroksida i zabilježi opažanja.
KEM SŠ D.4.15. Povezuje rezultate pokusa s konceptualnim spoznajama.	Izvodi pokuse u okviru konceptata: Tvari, Promjene i procesi, Energija	3.	U epruvetama 1-3 uliveno je 3 mL vodene otopine vodikov peroksida ($w=6\%$). U prvu epruvetu dodaj 3 kapi klorovodične kiseline, u drugu 3 kapi natrijeve lužine, a u treću 3 kapi destilirane vode. Indikator papirom ispitaj pH-vrijednost sve tri otopine i zabilježi opažanja.

KEM SŠ D.4.16. Primjenjuje matematička znanja i vještine.	Primjenjuje stehiometrijske odnose množine tvari na temelju jednadžbe kemijskih reakcija u okviru tema. Primjenjuje kemijsko nazivlje i simboliku te se koristi matematičkim znanjima i vještinama u okviru koncepta.	2.	Brzina kemijske reakcije raspada vodikovog peroksida opisana je jednadžbom $v=k[\text{reaktant}]$, gdje je k konstanta brzine reakcije koja ovisi o temperaturi i energiji aktivacije. Ako omjer k_1/k_2 iznosi $3,6 \cdot 10^{11}$ pri $20\text{ }^\circ\text{C}$, a k_1 odnosi se na konstantu brzine reakcije u prisutnosti jetrice, a k_2 bez njene prisutnosti, koja je uloga jetrice u navedenoj reakciji?
KEM SŠ D.4.17. Uočava zakonitosti uopćavanjem podataka prikazanih tekstom, crtežom, modelima, tablicama i grafovima.	Grafički prikazuje i analizira podatke dobivene fizikalno-kemijskim mjerenjima (kiselinsko-bazne titracije, kinetička mjerenja, kalorimetrija mjerenja...).	1.	Grafički prikaži ovisnost volumena kisika razvijenog reakcijom katalitičkog raspada vodikovog peroksida u vremenu, pri $0\text{ }^\circ\text{C}$, $20\text{ }^\circ\text{C}$ i $40\text{ }^\circ\text{C}$. Pretpostavi kakav bismo rezultat dobili ponavljanjem pokusa s kuhanim krumpirom.

6.4.3. Tijek nastavnog sata

U uvodnom dijelu sata nastavnik motivira učenike za daljnji rad kroz iznošenje neke zanimljivosti vezane uz temu. Na primjer, nastavnik može spomenuti kako je protein leghemoglobin iz korijena soje, molekula slična mioglobinu te kako se to njegovo svojstvo koristi u prehrambenoj industriji kao dodatak imitacijama mesnih proizvoda jer hem skupina osigurava karakterističnu crvenu boju i okus. Učenici potom izvode prvi pokus (razvijanje kisika reakcijom raspada vodikovog peroksida kataliziranog katalazom) gdje im sastav otopine X (H_2O_2 , aq) nije poznat. Pokus se može izvesti jednostavno u epruveti kako je opisano na radnom listiću (vidi 9. DODATAK) ili kao demonstracijski pokus pomoću aparature prikazane na slici 34. Sakupljanjem plinovitog produkta u menzuri može se lako pratiti napredovanje reakcije te učenici rezultate mogu grafički prikazati kao ovisnost volumena razvijenog plina u vremenu. Prema grafičkom prikazu učenici se mogu prisjetiti

nastavnih sadržaja drugog razreda, specifično ovisnosti brzine kemijske reakcije o koncentraciji reaktanata.



Slika 34. Aparatura za sakupljanje kisika dobivenog raspadom vodikovog peroksida kataliziranim katalazom. Vodena otopina vodikovog peroksida ($w=6\%$) ispusti se injekcijskom štrcaljkom u tikvicu za destilaciju u kojoj se nalazi komadić pileće jetre kao izvor enzima. Razvijeni plin kisik se sakuplja u menzuri od 200 mL pod vodom.

Na temelju opažanja i provedbe testa održavanja gorenja učenici zaključuju da je nepoznata otopina ustvari vodena otopina vodikovog peroksida te da se reakcijom razvija plin kisik. Dalje učenici zaključuju uz pomoć radnog listića i razgovora s nastavnikom da ubačeni komadić pileće jetrice ima ulogu biološkog katalizatora. Nastavnik objašnjava kako je za katalitičku ulogu razgradnje vodikovog peroksida odgovoran enzim katalaza te ih upoznaje s pojmom enzima, a učenici rješavanjem zadatka iz radnog listića zaključuju kako su enzimi prema kemijskoj strukturi ustvari proteini. Uz pomoć radnog listića i nastavnika učenici spoznaju kako katalaza također sadrži skupinu hem u svom aktivnom mjestu te kako je upravo ona odgovorna za katalitičku aktivnost ovog enzima. Nastavnik navodi učenike da povežu funkciju jetre s razgradnjom vodikovog peroksida i njezinim značajem za pravilno funkcioniranje organizma. Učenici se prisjećaju kako funkcija proteina ovisi o temperaturi te o pH-vrijednosti otopine.

U središnjem dijelu nastavnog sata učenici dobivaju uputu povezati svoja prethodna znanja o proteinima sa zadanom nastavnim jedinicom odnosno dobivaju zadatak samostalno osmisлити i provesti pokus (istraživanje) u kojem će ispitati aktivnost katalaze pri različitim uvjetima. Svaka grupa učenika dobiva zaseban pribor i kemikalije (4 različita pokusa). Nastavnik upućuje učenike na dostupan pribor i kemikalije koje učenici mogu koristiti za osmišljavanje svojih pokusa. Svaka grupa dobiva stalak s epruvetama, različite izvore katalaze (pileća jetrica, krumpir, banana, pekarski kvasac) i ostali pribor naveden u tablici 19. Valja napomenuti i da se smjesa enzima može pripremiti i usitnjavanjem izvora katalaze te miješanjem s deioniziranom vodom u omjeru 1:1 ili s fosfatnim ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$) puferom ($\text{pH}=7$).^{95,96}

Tablica 19. Predviđene kemikalije i osnovni pribor za svaku skupinu učenika od kojih će svaka testirati drugu hipotezu odnosno utjecaj drugog čimbenika na aktivnost katalaze.

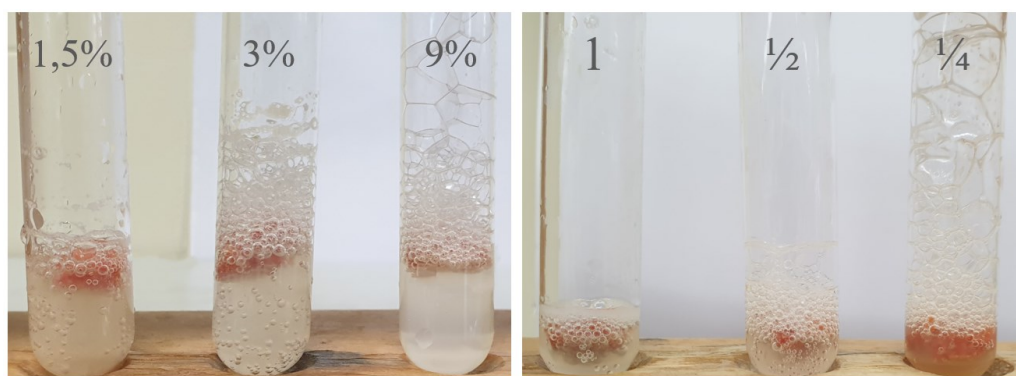
grupa 1: temperatura	grupa 2: pH-vrijednost	grupa 3: maseni udio supstrata	grupa 4: dostupna površina enzima
<ul style="list-style-type: none"> • H_2O_2 (aq), $w=6\%$ • vruća voda (kuhalo za vodu) • led • tri termometra • pinceta 	<ul style="list-style-type: none"> • H_2O_2 (aq), $w=6\%$ • HCl (aq) • NaOH (aq) • destilirana voda • univerzalni indikatorski papir • pinceta 	<ul style="list-style-type: none"> • H_2O_2 (aq), $w=9\%$ • destilirana voda • pinceta 	<ul style="list-style-type: none"> • H_2O_2 (aq), $w=6\%$ • nožić • daska za rezanje • pinceta

Svaka skupina definira svoju hipotezu ili pitanje na koje žele odgovoriti, smišlja pokus/postupak kako će tu hipotezu testirati te na kraju i analizira dobivene rezultate. Zaključke o aktivnosti katalaze pri različitim uvjetima učenici donose povezujući aktivnost katalaze s visinom stupca razvijenog plina u epruveti. U slučaju većeg broja učenika u razredu mogu dvije skupine učenika dobiti iste materijale, nakon čega rezultate mogu usporediti. Time se ujedno ukazuje i na važnost reproduciranja rezultata kako bi bili valjani.

Ako je potrebno nastavnik daje dodatne upute, na primjer, ispituje učenike što očekuju kako će na količinu razvijenog kisika utjecati promjena količine reaktanata/enzima i sl. te prije početka eksperimentalnog rada pregledava hipoteze i postupke koje su predložili učenici te po potrebi sugerira ispravke. Tijekom rada nastavnik nadzire rad grupa i po potrebi pomaže i daje dodatne smjernice. Na primjer, naglašava kako je nužno enzim dodati istovremeno u sve epruvete ili svaku reakciju izvesti zasebno mjereći pritom vrijeme zapornim satom, kako bi se rezultati mogli uspoređivati.

Jedan od čimbenika koje učenici mogu testirati je utjecaj dodatka supstrata u različitim masenim udjelima na količinu razvijenog kisika (slika 25, lijevo) razrjeđujući početnu otopinu 9 %-tnog vodikovog peroksida destiliranom vodom. Također, učenici mogu ispitivati i utjecaj dodatka supstrata u različitim volumenima. U oba slučaja potrebno je s učenicima raspraviti kako povećanjem koncentracije ili volumena supstrata količina razvijenog kisika neće beskonačno rasti, odnosno da u jednom trenutku dolazi do zasićenja enzima supstratom odnosno reakcija ne može napredovati većom brzinom od maksimalne.

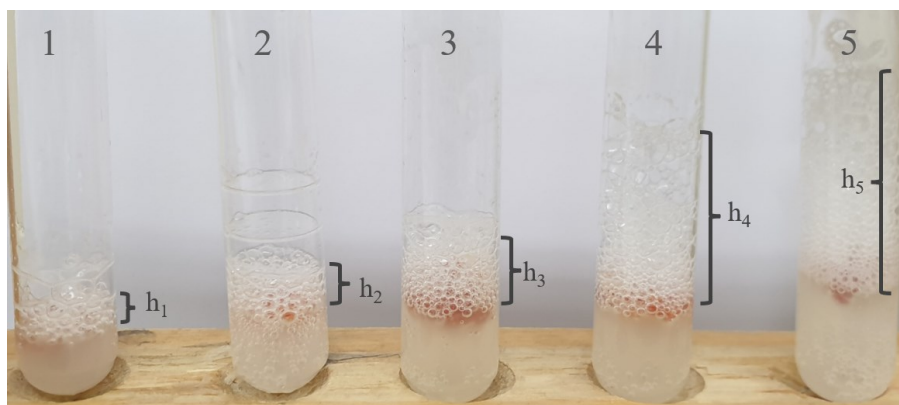
Sljedeći mogući čimbenik je dostupna površina izvora enzima gdje se komadići npr. jetrice enzima mogu razrezati na manje dijelove. Povećanjem dostupne površine izvora enzima vidljivo dolazi do burnije reakcije i razvijanja više mjehurića plina (slika 35, desno).



Slika 35. Razvijanje kisika reakcijom raspada vodikovog peroksida pri različitim koncentracijama odnosno masenim udjelima vodikovog peroksida ($w=1,5\%$, $w=3\%$, $w=9\%$, slika lijevo) i pri različitim dodirnim površinama izvora katalizatora (jedan cijeli komadić jetrice, komadić razrezan na pola, komadić razrezan na četvrtine, slika desno).

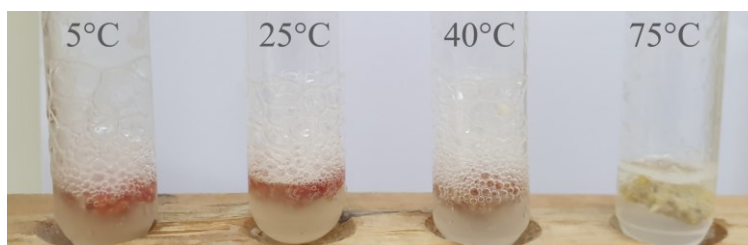
Učenici mogu mijenjati i masu enzima dodavanjem različitog broja komadića jetrice ili drugog izvora katalaze u epruvete. Na slici 36. vidljivo je povećanje visine stupca mjehurića uslijed povećanja mase enzima, iako treba uzeti u obzir i da dodavanjem više komadića raste i sam volumen smjese. I ovdje je preporučljivo s učenicima prodiskutirati kako se povećanjem

mase dodanog enzima povećava i brzina reakcije, dok god u reakciji ima dovoljno dostupnog supstrata.



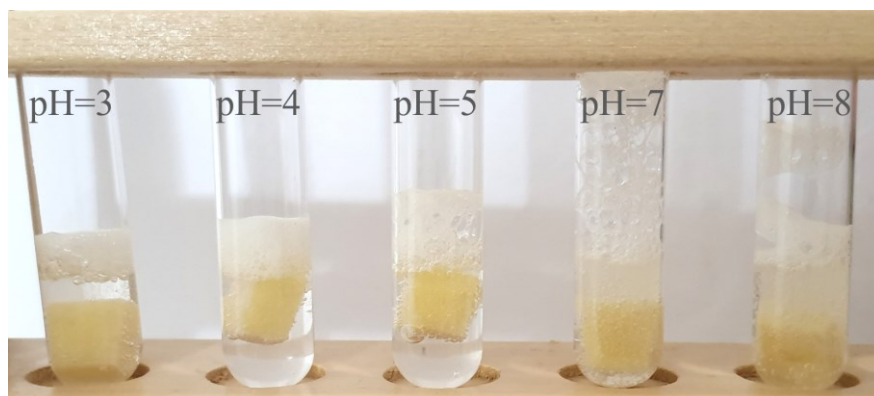
Slika 36. Razvijanje kisika reakcijom raspada vodikovog peroksida uz različite količine dodanog enzima. Reakcija uz dodatak pileće jetrice (dodatak 1, 2, 3, 4 ili 5 komadića jednake veličine, m (jedan komadić) $\approx 0,5$ g). Volumen dodanog vodikovog peroksida ($w=3$ %) u svim mjerenjima je konstantan (1 mL).

Učenici također mogu mjeriti i utjecaj temperature, inkubirajući reakcijsku smjesu u vodi pomiješanoj s ledom, na sobnoj temperaturi i u vrućoj vodi (slika 37). Ispitivanjem utjecaja temperature vidljiva je najslabija aktivnost katalaze pri temperaturi od 75 °C te je sama jetrica pobijelila uslijed denaturacije. S druge strane učenike može iznenaditi relativno velika aktivnost katalaze u epruveti u kojoj je izmjereno 5 °C. Razlog tomu može biti što je sama reakcija raspada vodikovog peroksida egzotermna⁹⁷ odnosno napredovanjem reakcije dolazi do oslobađanja topline, a time i porasta temperature reakcijske smjese. Ako se reakcijska smjesa zagrijava na temperaturu iznad 85 °C treba imati na umu kako je moguć i povećani spontani raspad vodikovog peroksida, što također može dovesti do neočekivanog rezultata tj. primjetnog porasta razine razvijenog plina i nakon što se enzim denaturira. Ali ovime se ujedno i demonstrira važna uloga enzima u kataliziranju reakcija pri relativno blagim fiziološkim uvjetima.⁹⁵



Slika 37. Razvijanje kisika reakcijom raspada vodikovog peroksida pri različitim temperaturama reakcijske smjese (5 °C, 25 °C, 40 °C, 75 °C).

Utjecaj pH-vrijednosti otopine na količinu razvijenog plina još je jedan čimbenik kojeg učenici mogu testirati. Pri tome treba učenike još jednom podsjetiti na utjecaj promjene pH-vrijednosti na strukturu proteina povezanu s ionizacijskim stanjem aminokiselinskih ogranaka. Na slici 38. vidljiva je najveća aktivnost katalaze pri pH=7, a slijedi ju reakcija pri pH=8 što odgovara podacima zabilježenim u literaturi (pH=7,5).⁸⁸ Prilikom testiranja utjecaja pH-vrijednosti otopine treba uzeti u obzir nepouzdanost određivanja pH-vrijednosti indikatorskim listićima.



Slika 38. Razvijanje kisika reakcijom raspada vodikovog peroksida pri različitim pH-vrijednostima otopine. Volumen dodanog vodikovog peroksida je konstantan (1 mL), $w(\text{H}_2\text{O}_2)=6\%$. Reakcija je katalizirana dodatkom svježeg krumpira kao izvora katalaze.

Može se uspoređivati i aktivnost katalaze iz različitih izvora, npr. između katalaze biljnog i životinjskog podrijetla. Kod ovog pokusa nastavnik usmjerava učenike da odrede i pH-vrijednost otopine kako bi mogli raspraviti i o utjecaju tog čimbenika na aktivnost enzima.

Nakon što sve grupe završe s radom, učenici izlažu svoje rezultate pred drugima, navode od koje hipoteze su krenuli, jesu li je uspjeli potvrditi te kako su došli do svojih zaključaka. Također, učenici iznose i potencijalne probleme s kojima su se susreli u bilo kojem dijelu procesa. Tijekom prezentiranja nastavnik ukazuje na to kako je tijekom testiranja utjecaja jedne varijable (npr. temperatura) nužno ostale varijable (npr. količine supstrata i enzima) držati konstantnima. U završnom dijelu učenici kroz razgovor s nastavnikom sistematiziraju gradivo ove nastavne jedinice.

6.5. ZAKLJUČAK METODIČKOG DIJELA

U metodičkom dijelu ovog diplomskog rada pregledana je dostupna didaktičko-metodička literatura vezana uz istraživačko učenje te je predložen nastavni sat kemije temeljen na ovakvom obliku učenja otkrivanjem. Istraživačka nastava je definirana, navedena su njezina obilježja te su istaknuti mnogobrojni pozitivni učinci primjene ove metode na razvoj učeničkih sposobnosti i vještina, kao i mogući problemi koji se mogu pojaviti prilikom njezinog provođenja. Nastavni sat je osmišljen na temu *Enzima*. Prema Nacionalnom kurikulumu za predmet *Kemije* iz 2019., ova nastavna tema pripada izbornim sadržajima u četvrtom razredu gimnazije, iako su enzimi nužni za normalno funkcioniranje svih živih bića te kao takvi ne bi trebali biti izostavljeni iz nastavnog programa. Unatoč složenijoj i dugotrajnijoj pripremi i provedbi nastavnog sata istraživačkog učenja, zbog brojnih prednosti nad tradicionalnijim oblicima nastave, istraživačka nastava trebala bi biti češće uvrštavana u nastavnu praksu formalnog poučavanja kemije.

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

<i>ApE</i>	<i>engl. A plasmid Editor</i>
BLAST	<i>engl. Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	baznih parova
CAAX	C=cistein, aa=alifatska aminokiselina, X=terminalna aminokiselina
cDNA	komplementarna DNA
CO1	podjedinica I citokrom c oksidaze
DRG1	<i>engl. Developmentally Regulated GTP Binding Protein 1</i>
Expasy	<i>engl. the Expert Protein Analysis System</i>
FT	<i>engl. flow-trough</i>
GAP	<i>engl. GTPase activating proteins</i>
GDP	gvanozin-5'-difosfat
GEF	<i>engl. guanin nucleotide exchange factors</i>
GTP	gvanozin-5'-trifosfat
HRP	<i>engl. horseradish peroxidase</i>
HVR	hipervarijabilna regija
IMAC	<i>engl. Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
kDa	kilodalton
LB	<i>engl. Lysogeny Broth</i>
MAPK	mitogen-aktivirajuće protein-kinaze
MCS	<i>engl. multiple cloning site</i>
mTOR	<i>engl. mammalian target of rapamycin</i>
NFW	<i>engl. Nuclease Free Water</i>
PAT	palmitoil-aciltransferaza
PBS	<i>engl. phosphate-buffered saline</i>
PCR	lančana reakcija polimeraze
pET	<i>engl. plasmid Expression vector under T7 control</i>
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza
PKB	protein-kinaza B

RCW1	Ras-konvertirajući enzim 1
RLU	engl. <i>relative luminescence unit</i>
RRAS2	engl. <i>Ras-related protein R-Ras2</i>
RTK	receptori iz skupine tirozinskih protein-kinaza
Sirt6	engl. <i>Sirtuin 3</i>
TAK1	protein-serin-kinaza 1
TB	engl. <i>Terrific Broth</i>
TC21	engl. <i>teratocarcinoma clone 21</i>
TGF- β	engl. <i>transforming growth factor beta</i>

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. H. Četković, M. Halasz, M. Herak Bosnar, *Mar. Drugs* **16** (2018)
2. *Cancer*, WHO, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (datum pristupa 31. siječnja 2023.)
3. *What Is Cancer?*, <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (datum pristupa 31. siječnja 2023.)
4. Y. Capri, E. Flex, O. H. F. Krumbach, G. Carpentieri, S. Cecchetti, C. Liβewski, S. Rezaei Adariani, D. Schanze, J. Brinkmann, J. Piard, F. Pantaleoni, F. R. Lepri, E. S. Goh, K. Chong, E. Stieglitz, J. Meyer, A. Kuechler, N. C. Bramswig, S. Sacharow, M. Strullu, Y. Vial, C. Vignal, G. Kensah, G. Cuturilo, N. S. Kazemein Jasemi, R. Dvorsky, K. G. Monaghan, L. M. Vincent, H. Cavé, A. Verloes, M. R. Ahmadian, M. Tartaglia, M. Zenker, *Am. J. Hum. Genet.* **104** (2019) 1223–1232.
5. S. Beljan, K. Dominko, A. Talajić, A. Hloušek-Kasun, N. Škrobot Vidaček, M. Herak Bosnar, K. Vlahoviček, H. Četković, *Sci. Rep.* **12** (2022) 11379.
6. I. Habdija, B. Primc Habdija, I. Radanović, M. Špoljar, R. Matoničkin Kepčija, K. Vujčić, M. Miliša, A. Ostojić, M. Sertić Perić, *Protista-Protozoa i Metazoa-Invertebrata: Strukture i funkcije*, Alfa d.d., Zagreb, 2011, str. 91–98.
7. M. Srivastava, O. Simakov, J. Chapman, B. Fahey, M. E. A. Gauthier, T. Mitros, G. S. Richards, C. Conaco, M. Dacre, U. Hellsten, C. Larroux, N. H. Putnam, M. Stanke, M. Adamska, A. Darling, S. M. Degnan, T. H. Oakley, D. C. Plachetzki, Y. Zhai, M. Adamski, A. Calcino, S. F. Cummins, D. M. Goodstein, C. Harris, D. J. Jackson, S. P. Leys, S. Shu, B. J. Woodcroft, M. Vervoort, K. S. Kosik, G. Manning, B. M. Degnan, D. S. Rokhsar, *Nature* **466** (2010) 720–726.
8. M. Adamska, *Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology*, 2021, str. 67–77.
9. D. Perina, M. H. Bosnar, R. Bago, A. Mikoč, M. Harcet, M. Deželjin, H. Četković, *BMC Evol. Biol.* **11** (2011) 87.

10. D. Perina, M. Korolija, M. P. Hadžija, I. Grbeša, R. Belužić, M. Imešek, C. Morrow, M. P. Marjanović, T. Bakran-Petricioli, A. Mikoč, H. Četković, *Mar. Drugs* **13** (2015) 4179–4196.
11. *Characteristics and life cycle of sponges* | *Britannica*, <https://www.britannica.com/summary/sponge-animal> (datum pristupa 10. prosinca 2022.)
12. E. Renard, E. Gazave, L. Fierro-Constain, Q. Schenkelaars, A. Ereskovsky, J. Vacelet, C. Borchellini, *John Wiley & Sons, Ltd.* (2013) 1–8.
13. *Spužve (Porifera)*, <https://www.hbsd.hr/spuzve/> (datum pristupa 6. prosinca 2022.)
14. *World Porifera Database*, <https://www.marinespecies.org/porifera/> (datum pristupa 8. prosinca 2022.)
15. J. Bedek, H. Bilandžija, B. Jalžić, *Modruški zbornik* **2** (2008) 103–130.
16. J. Bedek, *Subterranea Croatica* **2** (2004) 46–49.
17. D. Perina, H. Četković, M. Harcet, M. Premzl, L. Lukic-Bilela, W. E. Müller, V. Gamulin, *Gene* **366** (2006) 275–284.
18. H. Četković, A. Mikoc, W. E. G. Müller, V. Gamulin, *J. Mol. Evol.* **64** (2007) 332–341.
19. H. Četković, V. A. Grebenjuk, W. E. Müller, V. Gamulin, *Gene* **342** (2004) 251–261.
20. D. Perina, M. Korolija, A. Mikoč, M. Roller, B. Pleše, M. Imešek, C. Morrow, R. Batel, H. Četković, *PLoS One* **7** (2012) e42523.
21. D. Perina, A. Mikoč, M. Harcet, M. Imešek, D. Sladojević, A. Smolko, H. Četković, *Croat. Chem. Acta* **85** (2012) 223–229.
22. H. Četković, M. H. Bosnar, D. Perina, A. Mikoč, M. Deželjin, R. Belužić, H. Bilandžija, I. Ruiz-Trillo, M. Harcet, *Lab. Invest.* **98** (2018) 304–314.
23. R. Rong, Q. He, Y. Liu, M. S. Sheikh, Y. Huang, *Oncogene* **21** (2002) 1062–1070.
24. M. Tartaglia, Y. Aoki, B. D. Gelb, *Am. J. Med. Genet., Part C n/a* (2022) 1–15.
25. I. R. Vetter, A. Wittinghofer, *Science* **294** (2001) 1299–1304.
26. S. Mondal, K. Hsiao, S. A. Goueli, *Assay Drug Dev. Technol.* **13** (2015) 444–455.
27. A. K. Mishra, D. G. Lambright, *Biopolymers* **105** (2016) 431–448.
28. S. Nakhaei-Rad, F. Haghighi, P. Nouri, S. Rezaei Adariani, J. Lissy, N. S. Kazeminein Jasemi, R. Dvorsky, M. R. Ahmadian, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **53** (2018) 130–156.

29. A. Wittinghofer, I. R. Vetter, *Annu. Rev. Biochem.* **80** (2011) 943–971.
30. M. G. Khrenova, B. L. Grigorenko, A. B. Kolomeisky, A. V. Nemukhin, *J. Phys. Chem. B* **119** (2015) 12838–12845.
31. I. Ahearn, M. Zhou, M. R. Philips, *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **8** (2018)
32. J. V. Michael, L. E. Goldfinger, *Semin. Cancer Biol.* **54** (2019) 121–130.
33. X. Zhang, N. A. Spiegelman, O. D. Nelson, H. Jing, H. Lin, *eLife* **6** (2017) e25158
34. C. Frémin, J. P. Guégan, C. Plutoni, J. Mahaffey, M. R. Philips, G. Emery, S. Meloche, *Oncogene* **35** (2016) 5692–5698.
35. Y. Ohba, N. Mochizuki, S. Yamashita, A. M. Chan, J. W. Schrader, S. Hattori, K. Nagashima, M. Matsuda, *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 20020–20026.
36. S. M. Graham, A. B. Vojtek, S. Y. Huff, A. D. Cox, G. J. Clark, J. A. Cooper, C. J. Der, *Mol. Cell. Biol.* **16** (1996) 6132–6140.
37. A. Ehrhardt, G. R. Ehrhardt, X. Guo, J. W. Schrader, *Exp. Hematol.* **30** (2002) 1089–1106.
38. R. M. Larive, G. Moriggi, M. Menacho-Márquez, M. Cañamero, E. de Álava, B. Alarcón, M. Dosil, X. R. Bustelo, *Nat. Commun.* **5** (2014) 3881.
39. A. M. Hortal, C. L. Oeste, C. Cifuentes, M. Alcoceba, I. Fernández-Pisonero, L. Clavaín, R. Tercero, P. Mendoza, V. Domínguez, M. García-Flores, B. Pintado, D. Abia, C. García-Macías, A. Navarro-Bailón, X. R. Bustelo, M. González, B. Alarcón, *Mol. Cancer* **21** (2022) 35.
40. M. Erdogan, A. Pozzi, N. Bhowmick, H. L. Moses, R. Zent, *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 27713–27720.
41. *Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signaling Pathway* | *Encyclopedia MDPI*, <https://encyclopedia.pub/item/revision/91872a8a5a2d48e39cd7cd236d377d9c> (datum pristupa 8. prosinca 2022.)
42. S. M. Weber, S. L. Carroll, *Am. J. Pathol.* **191** (2021) 1499–1510.
43. I. Fernández-Pisonero, L. Clavaín, J. Robles-Valero, L. F. Lorenzo-Martín, R. Caloto, B. Nieto, C. García-Macías, C. L. Oeste, M. Sánchez-Martín, A. Abad, A. Hortal, D. Caballero, M. González, M. Dosil, B. Alarcón, X. R. Bustelo, *Cell Rep.* **38** (2022) 110522.
44. L. Clavaín, I. Fernández-Pisonero, N. Movilla, L. F. Lorenzo-Martín, B. Nieto, A. Abad, R. García-Navas, C. Llorente-González, M. Sánchez-Martín, M. Vicente-

- Manzanares, E. Santos, B. Alarcón, J. M. García-Aznar, M. Dosil, X. R. Bustelo, *Oncogene* **42** (2023) 389–405.
45. T. Niihori, K. Nagai, A. Fujita, H. Ohashi, N. Okamoto, S. Okada, A. Harada, H. Kihara, T. Arbogast, R. Funayama, M. Shirota, K. Nakayama, T. Abe, S. I. Inoue, I. C. Tsai, N. Matsumoto, E. E. Davis, N. Katsanis, Y. Aoki, *Am. J. Hum. Genet.* **104** (2019) 1233–1240.
46. E. Cerami, J. Gao, U. Dogrusoz, B. E. Gross, S. O. Sumer, B. A. Aksoy, A. Jacobsen, C. J. Byrne, M. L. Heuer, E. Larsson, Y. Antipin, B. Reva, A. P. Goldberg, C. Sander, N. Schultz, *Cancer Discovery* **2** (2012) 401–404.
47. S. Beljan, *Evolucijska, biokemijska i biološka karakterizacija proteina DRG1 iz spužve Eunapius subterraneus*, Doktorski rad, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2022.
48. N. Pećina-Šlaus, T. Nikuševa-Martić, J. Perić, *Odabrane metode molekularne biologije*, Medicinska naklada, Zagreb, 2009, str. 51.
49. *Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2018, str. 110–113, 185, 194, 198, 219–229, 238–243
50. D. W. R. Joseph Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual* Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001, str. 42–44.
51. *Biolabs, New England*, <https://international.neb.com/> (datum pristupa 8. prosinca 2022.)
52. *NEB Tm Calculator*, <https://tmcalculator.neb.com/#!/main> (datum pristupa 9.12.2022.)
53. *SnapGene | Software for everyday molecular biology*, <https://www.snapgene.com/> (datum pristupa 8. prosinca 2022.)
54. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0*, <https://www.megasoftware.net/> (datum pristupa 13. veljače 2023.)
55. *Clustal Omega, ClustalW and ClustalX Multiple Sequence Alignment*, <http://www.clustal.org/> (datum pristupa 13. veljače 2023.)
56. *GeneDoc HomePage*, <https://nrbsc.org/gfx/genedoc> (datum pristupa 4. veljače 2023.)
57. *ExPASy - Translate tool*, <https://web.expasy.org/translate/> (datum pristupa 8. prosinca 2022.)
58. *pET System Manual*, Madison, SAD, 2005.

59. *TaKaRa - TALON resin*, <https://www.takarabio.com/learning-centers/protein-research/his-tag-purification/tech-note-cobalt-resin> (datum pristupa 10. prosinca 2022.)
60. *ExPASy - ProtParam tool*, <https://web.expasy.org/protparam/> (datum pristupa 8. prosinca 2022.)
61. M. Harcet, H. Bilandzija, B. Bruvo-Madarić, H. Četković, *Mol Phylogenet Evol* **54** (2010) 1021–1027.
62. *ApE - A plasmid Editor*, <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/> (datum pristupa 8. prosinca 2022.)
63. *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (datum pristupa 4. veljače 2023.)
64. *T-Coffee Multiple Sequence Alignment Program Using Lalign and Dialign | EBI*, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/> (datum pristupa 4. veljače 2023.)
65. *Odluka o donošenju kurikuluma za nastavni predmet Kemije za osnovne škole i gimnazije u Republici Hrvatskoj*, https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_01_10_208.html (datum pristupa 3. siječnja 2023.)
66. G. V. Madhuri, V. S. S. N. Kantamreddi, L. N. S. Prakash Goteti, *Eur. J. Eng. Educ.* **37** (2012) 117–123.
67. I. Perkočić Krijan, *Uloga zadovoljstva i zaokupljenosti poslom učitelja u istraživačkoj nastavi prirode i društva*, Doktorski rad, Učiteljski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2016, str. 4–25.
68. Č. Serafin, J. Dostál, M. Havelka, *Procedia Soc. Behav. Sci.* **186** (2015) 592–599.
69. R. W. Bybee, J. Taylor, A. Gardner, P. Scotter, J. Carlson, A. Westbrook, N. Landes, *The BSCS 5E instructional model: Origins and effectiveness*, Colorado Springs, 2006.
70. M. Pedaste, M. Mäeots, L. A. Siiman, T. de Jong, S. A. N. van Riesen, E. T. Kamp, C. C. Manoli, Z. C. Zacharia, E. Tsourlidaki, *Educ. Res. Rev.* **14** (2015) 47–61.
71. K. Vaino, J. Holbrook, M. Rannikmäe, *Chem. Educ. Res. Pract.* **13** (2012) 410–419.
72. A. Abdi, *Univers. J. Educ. Res.* **2** (2014) 37–41.
73. P. Nedungadi, P. Malini, R. Raman, *Inquiry Based Learning Pedagogy for Chemistry Practical Experiments Using OLabs*, Advances in Intelligent Informatics, Cham, 2015, Zbornik radova str. 633–642.
74. A. Letina, *Croat. J. Educ.* **18** (2016)

75. L. Szalay, Z. Tóth, *Chem. Educ. Res. Pract.* **17** (2016) 923–961.
76. R. Spronken- Smith, R. Walker, *Stud. High. Educ.* **35** (2010) 723–740.
77. L. Stryer, J. Berg, J. Tymoczko, G. Gatto, *Biochemistry*, W.H. Freeman/Mcmillan Learning, New York, 2019, (online verzija).
78. N. S. Punekar, *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*, Springer Singapore, 2018, str. 167–141.
79. R. A. Copeland, *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, Wiley-VCH, Inc., 2015, str. 241–273.
80. *Classification and Nomenclature of Enzymes by the Reactions they Catalyse*, <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/rules.html> (datum pristupa 15. siječnja 2023.)
81. Y. Y. Karakus, *Typical Catalases: Function and Structure*, IntechOpen, London, UK, 2020, (objavljeno online).
82. P. Chelikani, I. Fita, P. C. Loewen, *Cell. Mol. Life Sci.* **61** (2004) 192–208.
83. M. M. Goyal, A. Basak, *Protein Cell* **1** (2010) 888–897.
84. H. F. Lodish, *Molecular Cell Biology*, 8. izdanje, W.H. Freeman-Macmillan Learning, 2016, str. 547–549.
85. A. Nandi, L. J. Yan, C. K. Jana, N. Das, *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2019** (2019) 1–19.
86. C. Glorieux, P. B. Calderon, *Biol. Chem.* **398** (2017) 1095–1108.
87. *1DGF: HUMAN ERYTHROCYTE CATALASE*, <https://www.rcsb.org/structure/1DGF> (datum pristupa 2. veljače 2023.)
88. T. Coban, M. Ciftci, H. Ozdemir, S. Altika, *Asian J. Chem.* **19** (2007) 3941–3953.
89. Z. Popović, L. Kovačević, *Kemija 2*, Alfa d.d., Zagreb, 2020, str. 130–151.
90. Z. Popović, L. Kovačević, I. Futivić, *Kemija 4*, Alfa d.d., Zagreb, 2021, str. 122–147.
91. T. Begović, M. Luetić, V. Petrović Peroković, R. Ruić Funčić, S. Rupčić Petelinc, L. Šarić, D. Turčinović, *Kemija 2*, Školska knjiga, d.d., Zagreb, 2021., str. 176–195.
92. T. Begović, M. Luetić, F. Novosel, V. Petrović Peroković, S. Rupčić Petelinc, *Kemija 4*, Školska knjiga, d.d., Zagreb, 2021, str. 112–131.
93. A. Habuš, M. Barić Tominac, S. Liber, D. Bajić, *Kemija 2*, Profil Klett d.o.o., Zagreb, 2020, str. 194–215.
94. A. Habuš, M. Barić Tominac, A. Dragobratović, S. Liber, A. Kučak, D. Bajić, *Kemija 4*, Profil Klett d.o.o., Zagreb, 2021, str. 179–197.
95. D. R. Kimbrough, M. A. Magoun, M. Langfur, *J. Chem. Educ.* **74** (1997) 210.

96. S. M. Latourelle, N. L. Elwess, A. B. Ryan, *J. Biol. Educ.* **54** (2020) 540–547.
97. P. Pędziwiatr, F. Mikołajczyk, D. Zawadzki, K. Mikołajczyk, A. Bedka, *Acta Innov.* (2018) 45–52.

§ 9. DODATAK

9.1. Radni listić – enzimi

POKUS 1

Pribor: stalak s dvjema epruvetama

Kemikalije: otopina **X**, sirova pileća jetrica

MJERE OPREZA: Otopina **X** djeluje nagrizajuće, potrebno je oprezno rukovanje!

KORAK 1 U dvije epruvete ulij oko 1 mL otopine **X**. **Zabilježi opažanja.**

Otopina **X** je bezbojna bistra otopina.

KORAK 2 U epruvetu označenu brojem 1 ubaci komadić sirove pileće jetrice. Promotri sadržaj epruvete i brzo izvedi **KORAK 3**.

Dodatkom pileće jetrice u epruvetu s otopinom **X** dolazi do burne reakcije i razvoja mjehurića plina.

KORAK 3 U epruvetama 1 i 2 ispitaj goriva svojstva plinovitog sadržaja, na način da tinjajuću trješčicu brzo uroniš u epruvetu 2 a potom u epruvetu 1, bez dodirivanja otopine. **Zabilježi opažanja** za KORAKE 2 i 3.

U epruveti s dodanom jetricom trješčica se ponovo zapalila. Razvijeni plin podržava gorenje.

ZADATAK 1 Otopina **X** je vodena otopina kemijskog spoja vodika i kisika. U manjim koncentracijama ova otopina se koristi za dezinfekciju rana i ogrebotina, a u većim za izbjeljivanje kose i čišćenje. Također, navedena otopljeni tvar nastaje i kao štetan produkt metabolizma u organizmu. Na temelju zapažanja iz **KORAKA 1** i navedenih podataka imenuj otopinu **X**.

vodena otopina vodikovog peroksida ili H_2O_2 (aq)

ZADATAK 2 Na temelju opažanja iz **KORAKA 2** i **3** te odgovora u **ZADATKU 1** zapiši jednadžbu kemijske reakcije.



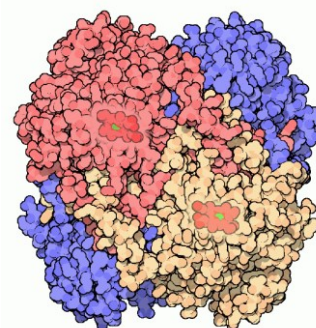
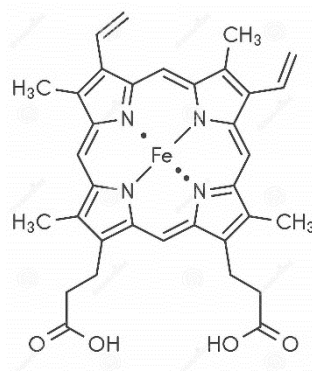
ZADATAK 3 Brzina kemijske reakcije iz **ZADATKA 2** opisana je jednadžbom $v=k[\text{reaktant}]$, gdje je k konstanta brzine reakcije koja ovisi o temperaturi. Ako omjer k_1/k_2 iznosi $3,6 \times 10^{11}$ pri $20\text{ }^\circ\text{C}$, gdje se k_1 odnosi na konstantu brzine reakcije koja se odvija u epruveti 1, a k_2 na brzinu kemijske reakcije koja se odvija u epruveti 2, koja je uloga pileće jetrice u navedenoj reakciji?

Pileća jetrica u ovoj reakciji djeluje kao katalizator kemijske reakcije.

ZADATAK 4 Katalaza (slika 1.) je enzim prisutan kod skoro svih aerobnih organizama te kod nekih anaerobnih. Grade je četiri podjedinice od kojih svaka sadrži neproteinski dio (prostetičku skupinu) hem u svom aktivnom mjestu (slika 2.). Kojoj skupini biološki važnih molekula pripada katalaza, ako dodatkom $\text{CuSO}_4(\text{aq})$ u lužnatu otopinu ovog enzima, smjesa poprima svjetlo ljubičasto obojenje (pozitivna biuret reakcija)?

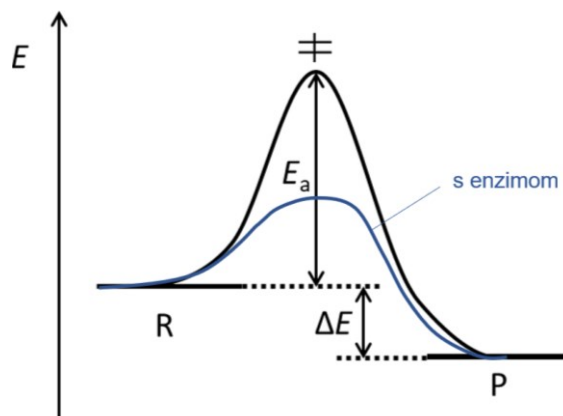
Katalaza po svojoj kemijskoj građi pripada proteinima.

Slika 2. Prostetička skupina katalaze (izvor: dreamstime.com)



Slika 1. Katalaza (izvor: rcsb.org/structure/1DGF)

ZADATAK 5 Na slici 3. prikazana je promjena potencijalne energije molekula napredovanjem kemijske reakcije. Enzimi zahvaljujući interakcijama sa supstratom smanjuju energetska barijeru (energiju aktivacije, E_a) koju je potrebno prijeći prilikom prijelaza reaktanata u produkte. Na grafičkom prikazu **ucrtaj** promjenu potencijalne energije za istu reakciju kataliziranu enzimom.



Slika 3. Reakcijski dijagram. (izvor: <http://eskola.chem.pmf.hr/>)

POKUS 2. _____

Primjer 1. Test aktivnosti katalaze pri različitim pH-vrijednostima otopina

Primjer 2. Ispitivanje aktivnosti katalaze pri različitim temperaturama

ZADATAK 6 Osmislite vlastito malo istraživanje u kojem ćete **testirati aktivnost ovog enzima pri različitim uvjetima** uz pomoć dobivenog pribora i kemikalija. Zapišite prvo **hipotezu** svojeg istraživanja, npr. pri različitim koncentracijama reaktanata razvija se različita količina kisika.

HIPOTEZA: _____

Primjer 1. Aktivnost katalaze iz krumpira najveća je pri pH=7.

Primjer 2. Aktivnost katalaze iz pileće jetrice najveća je pri temperaturi od 40 °C.

ZADATAK 7 Predložite postupak kojim ćete svoju hipotezu testirati te zapišite potreban pribor i kemikalije za ispitivanje odabrane hipoteze. Prije provođenja pokusa tražite provjeru nastavnika.

Pribor: _____

Primjer 1. pet epruveta, stalak za epruvete, pinceta, univerzalni indikatorski papir, ravnalo

Kemikalije: _____Primjer 1. komadići sirove pileće jetrice, H₂O₂ (aq), NaOH (aq), HCl (aq)**Postupak:**

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Primjer 1.

1. U svaku epruvetu se ulije 1 mL vodene otopine vodikovog peroksida.
2. U prvu epruvetu se doda 3 kapi HCl(aq), u drugu 2 kapi HCl(aq) i jedna kap destilirane vode, u treću 3 kapi vode, u četvrtu 2 kapi NaOH(aq) i 1 kap vode i u petu 3 kapi NaOH(aq)
3. Odredi se točna pH-vrijednost otopina univerzalnim indikatorskim papirićima te zapiše.
4. Pincetom se u svaku epruvetu doda po jedan komadić pileće jetrice.
5. Nakon jedne minute izmjeri se visina stupca razvijenih mjehurića za svaku epruvetu.

ZADATAK 8 Provedite predloženi pokus te zapišite svoje rezultate. Jeste li potvrdili ili opovrgnuli svoju hipotezu? **Obrazložite svoj odgovor.**

Primjer 1. Potvrdili smo svoju hipotezu, katalaza je najaktivnija pri pH=7 jer je kod te pH-vrijednosti zamijećen razvoj najveće količine mjehurića plina.

ZADATAK 9 Popuni tablicu 1. čimbenicima koji utječu na katalitičku aktivnost enzima katalaze te za svaki objasni kako se mijenja aktivnost enzima odnosno visina stupca mjehurića plina promjenom određenog čimbenika.

Tablica 1. Utjecaj različitih čimbenika na aktivnost katalaze.

čimbenik koji utječe na enzimsku aktivnost	obrazloženje
pH-vrijednost	Aktivnost katalaze najveća je pri pH=7, nakon čega pada sniženjem/povišenjem pH-vrijednosti otopine. Promjenom pH-vrijednosti otopine mijenja se naboj aminokiselinskih ostataka u polipeptidnom lancu, čime se narušava struktura proteina, a time i njegova funkcija.
temperatura	Najveća količina razvijenog kisika primjetna je pri temperaturi oko 40 °C, a povišenjem i sniženjem temperature, količina razvijenog kisika pada. Povišenjem temperature dolazi do ubrzavanja kemijske reakcije, ali pri previsokoj temperaturi proteini denaturiraju čime postaju neaktivni.
maseni udio dodanog supstrata	Količina razvijenog plina raste povećanjem masenog udjela dodanog supstrata odnosno reakcija brže napreduje pa se razvija i više pjene u istom vremenskom periodu. Brzina ne raste beskonačno nego je maksimalna u trenutku kada su sve molekule enzima zasićene supstratom.
dostupna površina izvora enzima (komadića krumpira)	Količina razvijenog plina raste povećanjem površine dostupnog izvora enzima. Povećanjem dostupnosti enzima također se povećava brzina kemijske reakcije.

§ 10. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Leonarda Lazarin

Datum rođenja: 19. srpnja 1998.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2005–2013	Osnovna škola Dragutina Domjanića, Sveti Ivan Zelina
2013–2017	XV. gimnazija, Zagreb
2017–danas	Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu