Identifikacija, kloniranje i ekspresija gena myc iz spužve Eunapius subterraneus. Nastava kemije i elektroforeza.

Zonjić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:203664

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Iva Zonjić

Identifikacija, kloniranje i ekspresija gena *myc* iz spužve *Eunapius subterraneus*

Nastava kemije i elektroforeza

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre edukacije biologije i kemije

Zagreb, 2019. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Helene Ćetković, znanstvene savjetnice.
Nastavnik Kemijskog odsjeka bila je doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec.
Mentor metodičkog dijela rada bio je izv. prof. dr. sc. Nenad Judaš.
Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom *Istraživanje razvoja, diferencijacije i evolucije životinja kroz genomiku bazalnih metazoa* BAMGEN IP-2014-09-6400.

ZAHVALE

Najveća zahvala mojoj mentorici dr. sc. Heleni Ćetković na pruženoj prilici i povjerenju da radim ono što volim. Hvala na vodstvu, strpljenju, trudu i vremenu uloženom u ovaj rad. Hvala na prijateljskom pristupu i nesebičnim savjetima.

Hvala svim članovima Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković na prijateljskoj atmosferi i svemu naučenom. Posebno hvala dr. sc. Andreji Mikoč na savjetima, potpori i odgovorima na sva moja pitanja. Hvala Petri i Silvestru na prijateljstvu, savjetima i svim zajedničkim trenutcima.

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

Hvala mentoru izv. prof. dr. sc. Nenadu Judašu.

Zahvaljujem svim prijateljima što su bili uz mene i učinili ovo najljepšim životnim razdobljem. Posebno hvala Maji i Ivani na svim uspomenama i posebnoj priči koja je tek u nastanku.

Hvala mojim bakama i sestrama na neizmjernoj ljubavi.
Hvala mojim roditeljima što su uvijek bili tu i pružili mi sve što mi je trebalo. Hvala za svu ljubav i potporu. Hvala na svemu…

.....

Sadržaj

SAŽETAK ..... **XI**

ABSTRACT ..... **XIII**

1. ISTRAŽIVAČKI DIO **1**

1.1. UVOD 3

1.2. LITERATURNI PREGLED 5

1.2.1. Spužve *5*

1.2.1.1. Opća obilježja 5

1.2.1.2. Osnovni plan građe 5

1.2.1.3. Razmnožavanje i embrionalni razvoj 8

1.2.1.4. Klasifikacija i filogenija 8

1.2.1.5. Spužve kao modelni organizmi 11

1.2.1.6. Eunapius subterraneus 12

1.2.2. Protoonkogeni *13*

1.2.2.1. Opće karakteristike protoonkogena 13

1.2.2.2. Myc 14

1.3. MATERIJALI I METODE 18

1.3.1. Materijali *18*

1.3.1.1. Osnovni materijal 18

1.3.1.2. Osnovne kemikalije 18

1.3.1.3. Korišteni puferi 18

1.3.1.4. Nukleotidi, oligonukleotidi i nukleinske kiseline 19

1.3.1.5. Plazmidi 19

1.3.1.6. Proteini, enzimi i koenzimi 19

1.3.1.7. Boje 20

1.3.1.8. Hranjive podloge za uzgoj bakterija 20

1.3.1.9. Bakterijski sojevi 20

1.3.1.10. Ostali materijali 20

1.3.2. Metode *21*

1.3.2.1. Izolacija genomske DNA 21

1.3.2.2. Izolacija RNA 22

1.3.2.3. Sinteza cDNA 22

1.3.2.4. Dizajniranje početnica 24

1.3.2.5. Lančana reakcija polimeraze 25

1.3.2.6. Elektroforeza DNA i RNA u agaroznom gelu 27

1.3.2.7. Izolacija DNA iz agaroznog gela 28

1.3.2.8. Priprema rekombinantne DNA 28

1.3.2.9. Razgradnja PCR produkta i plazmida pET28b restrikcijskim endonukleazama 30

1.3.2.10. Ligacija 30

1.3.2.11. Transformacija bakterijskih stanica 31

1.3.2.12. Transformacija bakterijskih stanica ... 32
1.3.2.13. Određivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA Sangerovom dideoksi metodom ... 32
1.3.2.14. Priprema kompetentnih stanica za transformaciju ... 33
1.3.2.15. Indukcija ekspresije ... 34
1.3.2.16. Sonikacija ... 35
1.3.2.17. Afinitetna kromatografija ... 35
1.3.2.18. Elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu ... 36
1.3.2.19. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu ... 38
1.3.2.20. Bojanje proteina u gelovima ... 38
1.3.2.21. Western analiza proteina ... 39
1.3.2.22. Bioinformatička obrada ... 40
1.4. REZULTATI ... 41
1.4.1. Izolacija genomske DNA molekule ... 41
1.4.2. Izolacija RNA ... 42
1.4.3. Sinteza cDNA ... 42
1.4.4. Dizajniranje početnica ... 43
1.4.5. Ugradnja cDNA koja kodira za protein Myc u ekspresijski vektor pET28b ... 45
1.4.5.1. Umnažanje kodirajućih sljedova pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR), pročišćavanje PCR produkta ... 45
1.4.5.2. Razgradnja PCR produkta i pET28b vektora, ligacija i transformacija ... 45
1.4.6. Sekvenciranje i analiza plazmida pET28b ... 47
1.4.7. Umnažanje gena myc i analiza introna ... 52
1.4.8. Ekspresija i pročišćavanje proteina, određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu i western analizom ... 54
1.5. RASPRAVA ... 60
1.6. ZAKLJUČAK ISTRAŽIVAČKOG DIJELA ... 64
2. METODIČKI DIO ... 65
2.1. ELEKTROFOREZA ... 67
2.1.1. Općenito o elektroforezi ... 67
2.1.2. Tipovi elektroforeze ... 68
2.1.3. Zonska elektroforeza ... 70
2.1.3.1. Elektroforeza na papiru ... 70
2.1.3.2. Elektroforeza na gelu ... 71
2.2. ELEKTROFOREZA I NASTAVA KEMIJE ... 77
2.2.1. Osnovnoškolski nastavni program ... 77
2.2.2. Srednjoškolski nastavni program ... 78
2.3. ELEKTROFOREZA U UDŽBENICIMA ... 80
2.3.1. Osnovnoškolski udžbenici ... 80
2.3.2. Srednjoškolski udžbenici ... 80
2.4. OBJAŠNJENJE NASTAVNOG SATA ... 82

2.4.1. Korisnost elektroforeze *82*
2.4.2. Nastavni sat *82*
2.4.2.1. Potrebni materijali i metode za izradu nastavnog sata 82
2.4.2.2. Tijek nastavnog sata 84
2.5. ZAKLJUČAK METODIČKOG DIJELA 86

3. LITERATURNI IZVORI 87

4. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA 99

5. DODATAK XV

POKUS 1 TAMO, IZA DUGE...  **..... 17**

6. ŽIVOTOPIS 23

SAŽETAK

Identifikacija, kloniranje i ekspresija gena *myc* iz spužve *Eunapius subterraneus*

Nastava kemije i elektroforeza

Iva Zonjić

Proučavanje gena povezanih s nastankom raka na nivou najjednostavnijih višestaničnih životinja (spužve) može dati bolji uvid u njihovu biokemijsku i biološku funkciju te pomoći u razjašnjavanju složenijih interakcija njihovih homologa kod ljudi i objasniti moguće razloge njihovog onkogenog potencijala. Od posebnog interesa su protoonkogeni koji su uključeni u regulaciju staničnog rasta i diferencijacije. U ovom je radu identificiran i analiziran protoonkogen *myc* iz spužve *Eunapius subterraneus,* koja je jedini poznati slatkovodni predstavnik spužvi (porodica Spongillidae) među stigobiontima na svijetu. Usporedbom spužvinog proteina Myc s homolozima iz drugih organizama uočeno je da su gotovo sve domene, osim MB IV, sačuvane kod svih uspoređenih organizama. Utvrđeno je postojanje jednog introna u sredini gena *myc* dužine 60 nukleotida. Usporedbom gena *myc* iz spužve s homolozima iz drugih analiziranih organizama zaključili smo da su pozicija i faza tog introna sačuvane od čovjeka do spužve. cDNA koja kodira za protein Myc je uspješno uklonirana u ekspresijski vektor pET28b te je napravljena prekomjerna ekspresija koja je i potvrđena *western* analizom.
U drugom dijelu diplomskog rada cilj je bio osmisliti 90-minutni nastavni sat u kojem će se obraditi tema elektroforeze s materijalima koji su svima dostupni i jeftini. Pregledom nastavnih programa za osnovnu i srednju školu iz kemije, fizike i biologije uočeno je da nema pokusa koji se bave elektroforezom, a učenici stječu potrebna znanja koja mogu primijeniti i utvrditi tumačeći elektroforetski pokus.

127 (98+29) stranica, 42 slike, 8 tablica, 134 literaturna 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: elektroforeza, gen, nastavni sat, protein, protoonkogen, spužve

Mentor: dr. sc. Helena Ćetković, zn. savj., IRB
Nastavnik: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, KO PMF SuZ
Mentor metodičkog dijela: izv. prof. dr. sc. Nenad Judaš, KO PMF SuZ

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, KO PMF SuZ
2. izv. prof. dr. sc. Nenad Judaš, KO PMF SuZ
3. prof. dr. sc. Mirjana Pavlica, BO PMF SuZ

Zamjena: doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić, BO PMF SuZ

Datum diplomskog ispita: 18. veljače 2019.

ABSTRACT

Identification, cloning and expression of sponge *Eunapius subterraneus myc* gene

Teaching chemistry and electrophoresis

Iva Zonjić

Studying genes, associated with the emergence of tumors at the level of simpler organisms like Sponges, provides a better insight into their biochemical and biological function. This approach to cancer research will help clarify the complex interactions of their homologues with humans and thus explain possible reasons for their oncogenic potential. Of particular interest are the protooncogenes involved in regulation of cell growth and differentiation. In this Diploma Thesis protooncogene *myc* from *Eunapius subterraneus* (Spongillidae), which is the only freshwater stygobitic sponge, has been indentified and analyzed. Comparison of sponge protein Myc with homologs from other organisms showed that almost all domains, except MB IV, were preserved in all comparing organisms. The existence of an intron in the middle of the *myc* gene (60 nucleotides) was established. By comparing the *myc* gene from the sponge with the homologs from other analyzed organisms, we concluded that the intron's position and phase were preserved from the human to the sponge. The cDNA coding for Myc protein was successfully cloned in the expression vector pET28b and excessive expression was made, which was confirmed by western analysis.
The second part of this diploma thesis deals with electrophoresis and its potential implications in chemistry teaching. Examining the curriculum for elementary and high school chemistry, physics and biology indicates that they lack electrophretic or similar experiments. Furthermore, students should easily understand this technique because they have acquired educational achievements needed to understand and explain electrophoretic experiment.A 90-minute lesson was devised that uses simple and cheap electrophoretic experiment available to everyone.

127 (98+29) pages, 42 figures, 8 tables, 134 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: chemistry teaching, electrophoresis, genes, proteins, protooncogene, Sponges

Mentor of research part: dr. sc. Helena Ćetković, Senior Scientist, IRB
Supervisor: dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor, FoS UniZg
Mentor of methodical: dr. sc. Nenad Judaš, Associate Professor, FoS UniZg

Reviewers 1. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor, FoS UniZg
2. dr. sc. Nenad Judaš, Associate Professor, FoS UniZg
3. dr. sc. Mirjana Pavlica, Professor, FoS UniZg
Substitute: dr. sc. Mirela Sertić Perić, Assistant Professor, FoS UniZg

Date of exam: February 18th 2019

1. ISTRAŽIVAČKI DIO

1.1. UVOD

Najjednostavnije višestanične životinje, koje ne posjeduju tkiva i organe, a vrlo malo su se mijenjale tijekom evolucije su spužve. Zbog tih karakteristika pružaju dobar uvid u strukturu genoma i proteoma zajedničkog pretka svih životinja. Spužve imaju važnu ulogu u istraživanju nastanka višestaničnosti kod životinja.[1] Nastanak višestaničnosti zahtijevao je koordiniranu diobu, rast, specijalizaciju i smrt stanica–procesa koji, ako su narušeni, vode do nastanka autoimunih bolesti i raka. Proučavanje gena povezanih s nastankom raka na nivou jednostavnijih organizama omogućuje bolji uvid u njihovu biokemijsku i biološku funkciju. Proteini iz spužvi pokazuju visoku sačuvanost ne samo u primarnoj strukturi već i u predviđenoj sekundarnoj i tercijarnoj strukturi s homolozima kod viših životinja što je još jedan dodatni razlog za njihovo proučavanje.[2] Nedavno objavljenim studijama spužvinih proteina povezanih s nastankom tumora doista je pokazano da ovi proteini pokazuju barem neke biokemijske i biološke karakteristike opisane kod ljudskih homologa.[3,4,5,6] Ovakav pristup istraživanju gena povezanih s nastankom raka može pomoći u razjašnjavanju složenijih interakcija njihovih homologa kod ljudi i time objasniti moguće razloge njihovog onkogenog potencijala.[2] Od posebnog interesa su protoonkogeni koji su uključeni u regulaciju staničnog rasta i diferencijacije. Njihovom mutacijom nastaju onkogeni koji potiču nekontrolirani stanični rast i time nastanak velikog broja tumora.[7] U sklopu diplomskog rada identificirati ćemo i analizirati protoonkogen *myc* iz spužve *Eunapius subterraneus*. Ogulinska špiljska spužvica, *E. subterraneus* Sket & Velikonja, 1984., jedini je poznati slatkovodni predstavnik spužvi (porodica Spongillidae) među stigobiontima na svijetu. Obitava isključivo u špiljama ogulinskog područja koje je značajno zbog endemičnosti, velike raznolikosti, ali i ugroženosti podzemne faune.[8] Kako bi se identificirao, analizirao i klonirao protoonkogen *myc* provedeno je nekoliko metoda: izolacija genomske DNA iz spužve, izolacija RNA, sinteza cDNA, osmišljavanje početnica, lančana reakcija polimerazom PCR, određivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA (sekvenciranje) te bioinformatička i filogenetska analiza. Potom je slijedilo kloniranje cDNA koja kodira protein Myc pomoću specifično dizajniranih početnica u ekspresijski vektor pET28b. Ovaj vektor omogućava ekspresiju željenog proteina s dodatkom šest histidina na njegovom N-kraju, koji omogućuju pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom pomoću Co-NTA agaroze, u bakteriji *E. coli* kao domaćinu.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- određivanje i analiza nukleotidnog slijeda i strukture gena *myc*
- analiza proteinske sekvence Myc
- kloniranje gena *myc* u ekspresijski vektor i ekspresija proteina Myc u *E. coli*

1.2. LITERATURNI PREGLED

1.2.1. Spužve

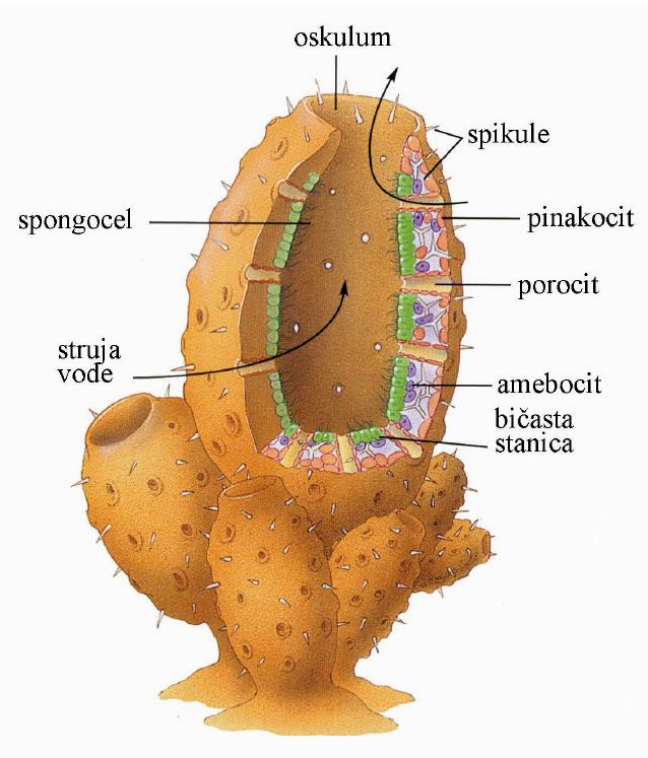
1.2.1.1. Opća obilježja

Spužve su najjednostavnije višestanične životinje koje su se prije više od 600 milijuna godina prve odvojile od zajedničkog pretka svih Metazoa.[9] Poznato je više od 9000 vrsta spužvi, od kojih većina živi u moru, a mali broj (~200) u slatkim vodama.[10] Spužve su sesilni organizmi koji ne posjeduju prava tkiva ni organe kao ni osjetilne strukture. Tijelo im je građeno kao sustav kanala kojim se filtrira voda. Dolaze u različitim oblicima, veličinama, a tijelo im može biti mekano ili izuzetno tvrdo. Manji broj spužvi je radijalno simetričan, uglavnom one manje, dok je većina nesimetrična i razgranjena. U površinskim, ali i u ostalim dijelovima tijela nalaze se različiti pigmenti pa postoje i narančasto, crveno, žuto, zeleno ili ljubičasto obojene spužve.[11] Mnoge životinje žive kao komenzali ili paraziti na ili u spužvama, jednostanične alge i bakterije nalaze se u velikim količinama u mezenhimu nekih spužava. S druge strane, spužve žive i na drugim životinjama: hidrama, školjkašima, koraljima i ramenonošcima. Mnogi rakovi, kolutićavci, ličinke kukaca i druge životinje služe se spužvama kao zaklonom.[12] Iako su vrlo jednostavne građe posjeduju nekoliko različitih vrsta stanica, a stanična varijabilnost ključ je nastanka mnogostaničnih organizama.[13]

1.2.1.2. Osnovni plan građe

Najznačajnija obilježja spužvi su akviferni sustav, bičaste stanice, filtriranje čestica, unutarnji skelet i totipotentna priroda svih stanica. Tijelo im je građeno od velikog broja šupljina i kanalića kroz koje struji voda (slika 1). Na tom principu strujanja vode odvija se cjelokupna funkcionalna organizacija spužava (prehrana, disanje, razmnožavanje i metabolizam). Tjelesna stijenka može se podijeliti na tri dijela: vanjska pinakoderma i unutarnja hoanoderma, a između ta dva sloja nalazi se mezohil koji se sastoji od želatinoznog proteinskog i ugljikohidratnog matriksa u kojem se nalaze skeletni elementi poput kolagena i spongina.[13] U želatinoznom mezohilu pronađeno je i nekoliko vrsta ameboidnih stanica, amebocita, koje se razlikuju oblikom i funkcijom. Skleroblasti su stanice koje izgrađuju skelet koji podupire mekano tijelo spužava. Spikule i iglice različitih oblika koje čine skelet spužve mogu biti izgrađene od silicijevog dioksida ili kalcijevog karbonata i/ili elastičnih proteinskih vlakana spongina. Ovisno o veličini, spikule su podijeljene na: manje, mikrosklere, i veće, megasklere. U mezohilu se nalaze i miociti koji imaju ulogu stezanja pojedinih dijelova spužve zatim

kromociti čiji pigmenti spužvama daju različitu obojenost, te desmociti koji predstavljaju žljezdane stanice. Još jedna vrsta amebocita nalazi se u mezohilu, a to su arheociti koji su totipotentne ameboidne stanice i imaju ulogu u: probavi hrane, transportu tvari kroz tijelo spužve te razvoju nespolnih pupova prilikom razmnožavanja.



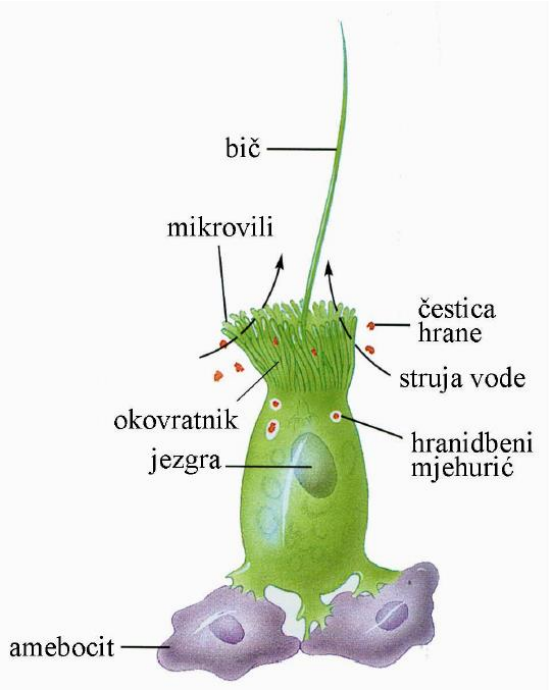
Slika 1. Prikaz funkcionalne građe spužvi. Strelicama je označen protok vode kroz tijelo spužve.[14]

Vanjska jednoslojna pinakoderma sastoji se od dva tipa stanica, a to su: pinakociti (epidermalne stanice) i porociti (cjevaste stanice). Po cijeloj pinakodermi nalaze se ostije kojima voda ulazi u ulazne kanaliće i dalje prolazi do bičastih kanalića i komorica. Unutarnji sloj, hoanodermu, čine bičaste stanice hoanociti (slika 2). Osnovna zadaća unutarnjeg sloja s hoanocitama jest prikupljanje hranjivih čestica filtriranjem iz vode koja cirkulira kroz bičaste kanaliće i komorice.[14]

Poznato je da spužve u okolišu u kojem ima manje hranjivih tvari mogu profiltrirati veće količine vode, dok u uvjetima u kojima ima više hranjivih tvari ili su u simbiozi s određenim mikrobima profiltriraju manju količinu vode.[15] Što je još jedan od dokaza da su se spužve prilagodile različitim okolišnim uvjetima. One su u hranidbenom lancu sakupljači filtratori koji za prehranu skupljaju različite žive i nežive organske čestice koje se nalaze u vodi.

Voda s hranjivim tvarima ulazi kroz mnogobrojne pore, ostije i dospijeva do unutrašnjeg sloja s bičastim stanicama koje neprestano trepere filtrirajući sav sadržaj. Sav sadržaj izlazi kroz

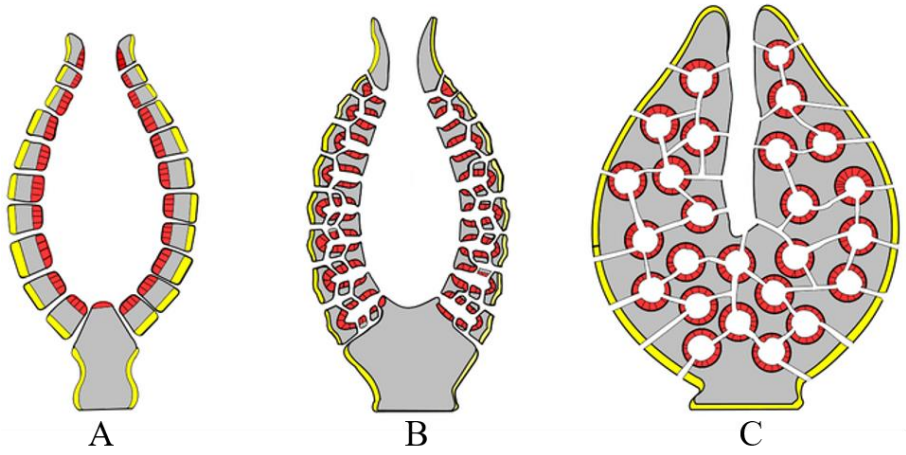
jedan veći otvor, oskulum. Prema unutrašnjoj građi i rasporedu unutarnjeg akvifernog sustava postoje tri različita morfološka oblika spužvi.



Slika 2. Prikaz građe bičaste stanice koja čini unutarnji sloj, hoanodermu.[14]

Najjednostavniji oblik je askon (slika 3, A). Spužve oblika askona su: jednostavne, manje veličinom i najčešće radijalno simetrične. Posjeduju tipični centralni spongocel koji je prekriven hoanocitima. Na površini askoidnih spužvi nalaze se porocite kroz koje voda s planktonskim organizmima i sitnim detritusom ulazi u spongocel te nakon filtracije izlaze van kroz jedan otvor koje ovaj tip spužvi ima, oskulum. Jedna od vrsti koju karakterizira ovaj morfološki oblik je *Leucosolenia sp.,* živući predstavnik vapnenjača.[10] Evolucijski razvoj spužava išao je u pravcu povećanja unutrašnjih površina koje su obložene hoanocitama kako bi došlo do poboljšanja efikasnosti filtriranja vode sa suspendiranim hranjivim česticama. To se postiglo nabiranjem stijenke tijela. Najprije je došlo do vodoravnog nabiranja kojim nastaju epidermalni džepovi koji su obloženi hoanocitima. Ovaj morfološki oblik ima i posebnu vrstu porocita, a to su prosopile koje povezuju bičaste kanaliće s ulaznim kanalićima koji se otvaraju putem dermalnih pora. Voda iz bičastih stanica struji apopilama te ide u spongocel pa izlazi oskulumom van.[14] Takav novi morfološki tip naziva se sikon (slika 3, B). Sikoidne spužve imaju radijalnu simetriju baš kao i prethodni morfološki oblik. Vrsta koju karakterizira sikonoidni morfološki tip je *Sycetta sagittifera* Haeckel. Najsloženiji tip morfološke građe je leukon (slika 3, C). Nastao je daljnjim vertikalnim nabiranjem iz kojeg nastaju bičaste komorice koje su obložene hoanocitama. Umjesto velikog spongocela, kakav je do ovog oblika prisutan,

razvio se sustav cijevi. Bičaste komorice su povezane s dermalnim porama i voda prolazi kroz sustav cijevi do oskuluma i strujanjem izlazi van.[11] Za razliku od prethodna dva morfološka oblika, spužve ovog morfološkog tipa nisu radijalno simetrične. Jedan od predstavnika s ovakvom morfološkom građom su vrste roda *Leuconia*. Na slici 3 prikazana su tri različita morfološka tipa spužvi.



Slika 3. Tri različita morfološka oblika spužvi prema unutrašnjoj građi i rasporedu unutarnjeg akvifernog sustava. A-askon, najjednostavniji oblik; B-sikon, složenije građe i C-leukon, koji ima najsloženiju građu.[16]

1.2.1.3. Razmnožavanje i embrionalni razvoj

Spužve se razmnožavaju nespolnim i spolnim putem. Djelomično su dvospolci, djelomično razdvojenog spola. Nespolno se razmnožavaju fragmentacijom i unutrašnjim pupanjem pri čemu stvaraju rasplodna tijela koja nazivamo gemule. Gemule su izrazito otporne na nepovoljne uvjete okoliša kao što su nedostatak kisika ili smrzavanje te se iz njih u povoljnim uvjetima razviju nove spužve. Oplodnja je unutrašnja, što je odvedena osobina za ovo koljeno koje se smatra jednostavnim, ili rjeđe vanjska. Spolne stanice nastaju iz amebocita i hoanocita. Jaja su ameboidna, jajna stanica ima veliku jezgru i vidljivu jezgricu. O razvoju spermija zna se vrlo malo. Unutartjelesnom oplodnjom nastaje bičasta ličinka parenhimula ili amfiblastula koja nekoliko dana pliva slobodno u vodi, a nakon pričvršćenja i jednostavne embriogeneze razvija se u novu jedinku.[17,18]

1.2.1.4. Klasifikacija i filogenija

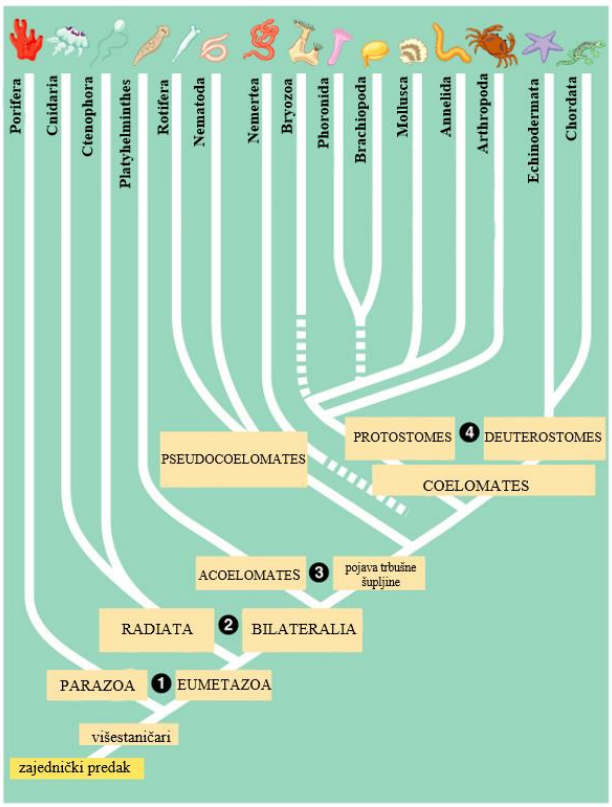
Spužve, koljeno Porifera, su najstarije živuće koljeno Metazoa. Zbog svog su bazalnog položaja (Slika 4) od velike važnosti za rekonstrukciju evolucije ranih Metazoa. Međutim njihovu sistematiku, klasifikaciju, filogeniju i evoluciju teško je rekonstruirati jer se ona temelji na

njihovim morfološkim obilježima, a nema dovoljno genomskih informacija. Klasificirale su se dugi niz godina pomoću svojih skeletnih elemenata, ali su ti elementi skloni mijenjanju zbog okolišnih čimbenika zbog čega se nailazi na nove metode karakterizacije. U znanstvenim krugovima postoji debata o tome jesu li spužve monofiletska ili parafiletska skupina. Molekularno biološke studije iz 90-tih godina prošlog stoljeća predlažu da su spužve parafilteskog podrijetla (što znači da su se ostali organizmi razvili iz pretka sličnog spužvi), te se takva istraživanja i dalje nastavljaju i većina ih i dalje predlaže isto, ali na žalost nema jakih dokaza koji bio potvrdili ovu teoriju.[19,20,21,22] Bazirano na posljednjim filogenetskim istraživanjima prema morfološkim karakteristikama postoji mogućnost da su ipak monofiletskog podrijetla.[23] Teoriju monofilteskog ili parafiletskog podrijetla je otežano dokazati zbog nedovoljno podataka (djelomično sekvencirani i anotirani genomi), ali i samih nedostataka u metodologiji prilikom slaganja filogenetskih odnosa. Istraživanja bazirana na mitohondrijskom genomu još nemaju značajnu ulogu u rješavanju odnosa između četiri razreda spužvi, ali pokazuju sestrinski odnos među dvije grupe spužvi Demospongiae i Homoscleromorpha.[24] Spužve su danas podijeljene u četiri razreda, 25 redova, 128 porodica i 680 različitih vrsti, ali je ovakva klasifikacija diskutabilna zbog novih molekularno bioloških sistematskih metoda koje otkrivaju različite odnose među spužvama.[25]

Četiri razreda spužvi dijele se na:

1) Calcarea (vapnenjače) – imaju skelet načinjen od kalcijevog karbonata te pripadaju viviparnim vrstama. Kod vapnenjača možemo pronaći sva tri morfološka oblika spužvi (askon, sikon i leukon). Njihovo je tijelo najčešće ima oblik malih tubi koje su srasle međusobno ili oblikom podsjećaju na urnu. To su male spužve čija se veličina kreće od nekoliko milimetara do nekoliko centimetara, uz određene iznimke koje pri posebnim uvjetima narastu i do 50 centimetara. Najčešće su bijele ili svjetlije, ali mogu se pronaći i vrste koje su žute ili crvene. Nastanjuju područje Sjevernog Atlantika, ali i Južnog oceana. Jako je malo opisanih vrsta, svega 8 %, ali se to pripisuje teškoj identifikaciji vapnenjača.
2) Hexactinellida (staklače) – su isključivo morske spužve koje obitavaju na dubinama od 200 do 600 metara. Najčešće su neupadljivih boja, ali različitih oblika. Njihovo se tijelo sastoji od sintetičkih vlakana, a spikule su im načinjene od silicijeva dioksida. Dijele se na dva podrazreda prema obliku mikrosklera: Amphidiscophora (one imaju spikule kojima se na svakom kraju nalaze diskovi u obliku zvijezda) i Hexasterophora (imaju

3) spikule koje izgledaju kao da se tri osi sijeku pod pravim kutovima i tvore šest zraka). Opisano je oko 600 vrsta staklača do danas i one su viviparne.
4) Demospongia (kremenorožnjače) – predstavljaju najveći i najraznolikiji razred spužvi. Ovom razredu pripadaju spužve kojima je skelet izgrađen od spikula od silicijeva dioksida koje su povezane spongioznim nitima. Predstavnici ovog razreda žive u toplijim i tropskim morima na većim dubinama. Veličinom su različiti i variraju od malih jedinki pa sve do onih koje imaju preko jedan metar. Predstavnici kremenorožnjača mogu se naći osim u morima i u slatkim vodama. Razred Demospongia obuhvaća ~75 % svih vrsta spužvi na svijetu.[25]
5) Homoscleromorpha – predstavljaju malu skupinu morskih spužvi koje žive u tami ili polutami i plitkim vodama. Ako je skelet prisutan, građen je od spikula od silicijeva dioksida. Tijelo im je nepravilna oblika, ali dolaze u različitim bojama, od plave preko zelene i smeđe do crvene. Teško je međusobno razlikovati vrste ovog razreda jer nemaju dovoljno morfoloških osobina, a posebno one bez skeleta. Za Homoscleromorpha se dugo smatralo da pripadaju podrazredu kremenorožnjača međutim molekularna istraživanja otkrila su da se ipak radi o novom, posebnom razredu među spužvama.[26] Homoscleromorpha su najmanji razred spužvi.



Slika 4. Filogenetski položaj koljena Porifera.[2]

Prema filogenetskom stablu razredi Calcarea i Homoscleromorpha se nalaze bliže ostalim predstavnicima Metazoa za razliku od razreda Demospongia i Hexactinellida. Toj činjenici ide u prilog što je jedino kod razreda Homoscleromorpha možemo pronaći bazalnu membranu s prisutnošću kolagena tipa IV koji se smatra pravim epitelom.[23]

1.2.1.5. Spužve kao modelni organizmi

Jedini u potpunosti sekvenciran genom spužve je genom morske spužve *Amphimedon queenslandica*. U njemu je pronađeno oko 40 000 protein-kodirajućih gena, a veličina genoma iznosi 93,5 Mb. Istraživanje genoma spužve *Amphimedon queenslandica* potvrdilo je značajnu sličnost strukture gena i organizacije genoma (sintenije) spužava s ostalim životinjama. Usporedba nekodirajućih regija ukazuje na izrazito kraće intergenske regije kod spužvi dok veće razlike kod regulatornih gena nisu uočene.[28] Komparativnom analizom genoma *A. queenslandica* pronađeni su kod spužava geni odgovorni za ključna obilježja višestaničnosti poput: razvoja, kontroliranog staničnog rasta te diferencijacije i urođene imunosti.[29] Prilikom sekvenciranja genoma spužvi dolazi do velikih problema zbog malo poznatih i dostupnih podataka, ali i života spužvi u simbiozi s različitim organizmima: najčešće bakterijama, algama kremenjašicama, gljivama i ostalim organizmima.[30,31] Prisustvo njihovih sekvenci uzrokuju teškoće prilikom sklapanja genoma spužvi.[32] Tkivo spužava je dom mnogim mikroorganizmima i ostalim simbiontima od kojih neki luče sekundarne metabolite koji su se pokazali kao zaštita od predatora, ali je utvrđeno da i pokazuju širok raspon farmakoloških svojstava.[33] Koristeći različite kriterije Conaco i suradnici su analizirali genom spužve *Amphimedon queenslandica* i utvrdili da se mnogi prokariotski geni nalaze u njezinom genomu čime su došli do zaključka da je to rezultat horizontalnog transfera. Sekvenciranje je koristan alat za identifikaciju vrsta. Od 2012. godine u tijeku je Sponge Barcoding Project kojem je krajnji cilj kreirati bazu podataka genetičkih markera svih poznatih vrsta spužvi.[32] Spužve, iako najstarije živuće koljeno Metazoa kod kojeg nije došlo do razvoja tkiva i organa, posjeduju brojne evolucijski sačuvane gene i proteine uključene u odvedene funkcije i predstavljaju zanimljiv modelni organizam za evolucijsko istraživanje.[34]

Dosadašnja istraživanja na spužvi pokazala su da u načelu geni/proteini spužava pokazuju veći stupanj konzerviranosti strukture s homolognim/ortolognim genima i proteinima kralježnjaka, nego s homolozima/ortolozima iz beskralježnjaka. Postavlja se pitanje imaju li ti geni drugačiju funkciju kod spužvi ili su u kasnijoj evoluciji Metazoa ti geni preuzeli funkciju u obliku koji je nama danas poznat.[31] Postoje teorije da je funkcija izgubljena kod spužvi pa se kasnije ponovno

pojavljuje,[35] ali i da spužve nose te određene gene koji imaju sličnu funkciju kao u drugih životinja, ali mi te funkcije ne prepoznajemo zbog njihove specifične morfologije. Još jedan od dokaza teorije da su mnogi geni prisutni od samih početaka, od zajedničkog pretka svih Metazoa, je publikacija genoma rebraša *Mnemiopsis leydi*, kojim je dokazano da je koljeno Ctenophora sestrinska grupa ostalim životinjama. Upravo u toj publikaciji iz 2013. Ryan i suradnici pokazuju kako su vjerojatno određene strukture, kao što su živci, prisutne već kod zajedničkog pretka svih Metazoa.[36] Sve ove karakteristike još jednom potvrđuju važnost istraživanja koljena Porifera. Ove najjednostavnije višestanične životinje, bez pravih tkiva i organa, vrlo su se malo mijenjale tijekom evolucije, te stoga pružaju dobar uvid u strukturu genoma i proteoma pretka svih Metazoa. Važne su ne samo za proučavanje karakteristika homologa kod pretka svih Metazoa prije odvajanja i specijalizacije gena u "višim" životinjama, već i za razumijevanje osnovne fiziološke funkcije gena u jednostavnijim životinjama.

1.2.1.6. Eunapius subterraneus

Sket i Velikonja su 1984. opisali vrstu *Eunapius subterraneus* poznatu kao ogulinska špiljska spužvica. Ona je do danas jedini poznati predstavnik slatkovodnih spužvi među stigobiontima u svijetu. Do sada je pronađena na šest lokaliteta, od kojih se jedan nalazi na Velikoj Kapeli, a ostalih pet u okolici grada Ogulina: Tounjčica špilja, Mikašinovića špilja, Rudnica špilja VI, Mandelaja, Crnačka špilja i Izvor špilja Gojak.[37] Spužvica obitava u podzemnim vodama krškog podzemlja na dubinama do 23 metra te živi pričvršćena za stijene. Na samo jednom lokalitetu do spužvice dopire danje svijetlo.[8] Cijelo je krško podzemlje izuzetno ugroženo djelovanjem raznih vanjskih čimbenika te je spužvica po kriterijima IUCN uvrštena na popis ugroženih vrsta. Tijelo ogulinske špiljske spužvice je rahlo, bez pigmenta (bijelo) i mekano. Pojavljuje se u dva morfološki različita oblika: jajolikom ili valjkastom s izbrazdanom površinom te široko krpastom ili končastom bez brazdi. Iako su jedinke morfološki različite one pripadaju istoj podvrsti (*E. s. subterraneus*). Na pojavu različitog morfološkog oblika utječu razni okolišni čimbenici te same faze životnog ciklusa spužve.[37] Jedinke končastog oblika svojom se širokom bazom pričvršćuju za podlogu te se iz centra osnove izdiže konusna izbočina na čijem je vrhu oskulum. U špilji Tounjčici, odakle je izvađen uzorak korišten u ovom radu, pronađen je jajolik tip habitusa (slika 1, str.12). Jedinke variraju veličinom od 1 do 8 centimetara i imaju nepravilno izbrazdanu površinu. Skelet se sastoji od mnoštva pojedinačnih spikula povezanih u obliku mreže s malo spongina.[8] Nespolna rasplodna tjelašca, gemule, su žuto-smeđe, okruglaste i nalaze se u malim grupama pričvršćene na stijenu blizu baze spužve.[37]



Slika 5. Ogulinska špiljska spužvica.[38]

Ogulinska špiljska spužvica (*E. subterraneus*) pripada razredu Demospongiae, podrazredu Heteroscleromorpha, redu Spongilida i porodici Spongilidae. Međutim filogenetskim istraživanjem Harcet i suradnici (2010.) dovode u pitanje taksonomsku pripadnost male ogulinske špiljske spužvice te istraživanje temelje na tri molekularna markera (18S rDNA, ITS2 i COI) i utvrđuju da je *Eunapius subterraneus* bliži srodnik slatkovodnim spužvama kao što su *Ephydatia muelleri* i *Lubomirska baikalenskiis* nego ostalim vrstama roda *Eunapius.* Niti pojedini marker niti povezani zajedno nisu dali podatke koji smještaju *E. subterraneus* u kategoriju roda *Eunapius* zbog čega je potrebno ponovno, detaljnije ispitivanje morfoloških karakteristika i reorganizacija taksonomskog poretka ove vrste.[39] Dovršenom sekvencom mitohondrijskog genoma potvrđuje se smještaj *E. subterraneus* u skupinu s *Ephydatia muelleri* i *Lubomirska baikalenskiis* zbog visokog stupnja homologije među ovom skupinom smatra se da je do odvajanja došlo relativno nedavno na evolucijskoj skali.[40]

1.2.2. Protoonkogeni

1.2.2.1. Opće karakteristike protoonkogena

Spoznaje o virusnim onkogenima dovele su do otkrića da kod svih životinja postoje homologne sekvence koje se, kako bi se naglasila njihova sposobnost transformacije, nazivaju protoonkogeni. Stoga su protoonkogeni najprije identificirani kao transducirani onkogeni akutnih transformiranih retrovirusa.[41] Protoonkogeni su geni koji su sastavni dio genoma svake stanice i fiziološki su regulatori stanične proliferacije i diferencijacije.[42] Protoonkogeni su izraženi tijekom staničnih procesa poput: embriogeneze, zacjeljivanja rana, regeneracije i

stimulacije mitoze. Mogu se pronaći u različitim organizmima od kvasca, preko vinske mušice pa do čovjeka. Ovi geni kodiraju faktore rasta, receptore faktora rasta s aktivnošću tirozin-kinaze, regulatorne proteine u prijenosu signala, nereceptorske tirozin-kinaze, serin/treonin-kinaze i transkripcijske faktore. Kodirani proteini igraju ključnu ulogu u regulaciji staničnog rasta i diferencijaciji[41,43,44,45] te u apoptozi ili programiranoj staničnoj smrti.[46] Kako protoonkogeni kodiraju proteine koji djeluju na način da stimuliraju staničnu diobu, inhibiraju diferencijaciju stanica i zaustavljaju staničnu smrt tako imaju značajnu ulogu u normalnom ljudskom razvoju i održavanju tkiva i organa. Brojni protoonkogeni kodiraju stanične površinske receptore na staničnoj membrani kako bi se održala komunikacija između izvanstaničnog okoliša i unutrašnjosti stanice. Ti transmembranski receptori sastoje se od tri dijela: izvanstaničnog koje je izloženo vanjskoj strani stanice i djeluje kao antena za prikupljanje vanjskih signala, transmembranskog koje obuhvaća staničnu membranu i unutarstaničnog koji često ima enzimsku aktivnost i može se povezati s drugim proteinima smještenim unutar stanice. Kako bi rasle i dijelile se, stanice reagiraju na vanjske signale preko vezanja izvanstaničnih liganda na izvanstaničnu regiju ovih transmembranskih receptora. Često ti ligandi stimuliraju staničnu diobu i rast, ili angiogene čimbenike koji stvaraju nove krvne žile. Kada se ligand veže na receptor, receptor će često promjeniti konformaciju, što dovodi do aktivacije unutarstanične domene i lanca unutarstaničnih događaja koji reguliraju rast stanica, proliferaciju, angiogenezu ili smrt.[47,48] Protoonkogene aktivnosti obično se isključuju nakon što se završe razvojni procesi koje reguliraju. Međutim, protoonkogeni se mogu mutacijama aktivirati u onkogene, koji izazivaju tumore kod životinja i ljudi, raznim mehanizmima poput: točkastih mutacija, translokacija i amplifikacije. Mutacijom protoonkogena i nastankom onkogena dolazi do povećane proizvodnje ovih proteina, što dovodi do povećane diobe stanica, smanjene diferencijacije stanica i inhibicije stanične smrti, a sve to dovodi do karcinogeneze.[49] Prema tome, onkogeni su jedni od glavnih molekularnih ciljeva za dizajn lijekova protiv raka.

1.2.2.2. Myc

Onkogeni su najprije opisani kao transformacijski dijelovi retrovirusa koji induciraju brzo stvaranje tumora kod inficiranih životinja i dovode do morfoloških promjena tkiva. Kasnijim pokusima otkriveno je da su nukleotidne sekvence staničnih i virusnih onkogena slične. Myc je najprije opisan kao onkogeni retroviralni alel (*v-myc*) koji je nastao transdukcijom od staničnog *c-myc* protoonkogena.[50] Protoonkogen *c-myc* kodira transkripcijski faktor (*myc*) koji ima onkogeni potencijal. Proteinski produkt (Myc) *c-myc* protonkogena predstavlja najvažniji dio

transkripcijske regulatorne mreže koji kontrolira ekspresiju oko 15 % svih ljudskih gena.[51,52] Kromosomske translokacije, preraspodjele i virusne insercije koje dereguliraju *c-myc* ekspresiju bez aktiviranja mutacija unutar Myc proteina ukazuju na to da, ako se ne ograniči njegova količina unutar fizioloških granica u stanici dolazi do nastanka tumora.[53] Mnogi geni koje aktivira protein Myc fundamentalni su za razne stanične procese poput: staničnog rasta, proliferacije, diferencijacije, metabolizma i apoptoze zbog čega Myc ima jednu od najvažnijih karika u proučavanju tumora.[53,54] C-myc proteini su fosfoproteini koji imaju životni vijek od 15 do 30 minuta, lokaliziraju se u jezgri i vežu s DNA *in vitro*.[54]

Myc je pronađen gotovo u svim razredima mnogostaničara, ali nije pronađen kod gljiva i biljaka. Vrlo zanimljivo je da homolog proteina Myc pronađen u genomu *Monosiga brevicollis* koja pripada skupini Choanoflagellatea. Što upućuje da se protein Myc najvjerojatnije pojavio prije nastanka životinja.[55] Hartl i suradnici su 2010. identificirali, klonirali i biokemijski okarakterizirali Myc iz žarnjaka *Hydra magnipapillata* te ga evolucijski analizirali. Koristeći jednostavan modelni organizam pokazali su da je protein Myc iz žarnjaka multifunkcionalni protein s karakteristikama i funkcijama sličnim ljudskom homologu.[7] Kod Metazoa protein Myc može se podijeliti u nekoliko evolucijski očuvanih domena. Na C-terminalnom kraju nalazi se bHLH-Zip domena, a na N-terminalnom kraju nalaze se četiri konzervirane domene, poznate kao MB I-IV (engl. "*Myc homology box*" *motifs*). Na slici 6 prikazane su sve očuvane domene proteina Myc.

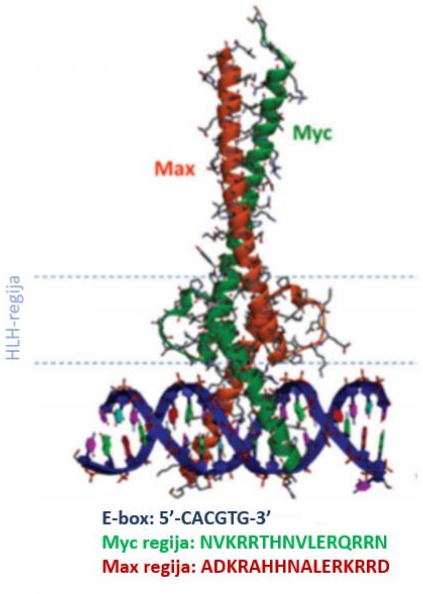


Slika 6. C-myc struktura i njegove konzervirane homologne regije MBI, MBII, MBIIIa, MBIIIb and MBIV na C-terminalnom kraju, te domena HLH-LZ na N-terminalnom kraju.[56]

Različite funkcije i učinci onkogena *myc* već desetljećima su goruće pitanje u polju istraživanja tumora posebno zbog njegove dvostruke uloge. U normalnim stanica sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa, a u tumorskim dolazi do njegove prekomjerne ekspresije i poticanja angiogeneze.[57] Domena MB I koja se nalazi prva na N-terminalnom kraju nužna je za staničnu transformaciju, međutim prilikom transkripcije nema nikakvu ulogu. Zajedno s domenom MB II važna je za indukciju apoptoze. U ljudskom *c-myc* između 128 i 143 aminokiseline nalazi se domena MB II koja je kratka, ali jako konzervirana među svim mnogostaničarima. Upravo zbog konzerviranosti od najnižih životinja pa sve do kralježnjaka ova se domena smatra esencijalnom

za mnoge funkcije, a njen gubitak dovodi do narušavanja aktivnosti kao što su: kontroliranje staničnog rasta, apoptoze, transformacije diferencijacije, te ulaska u G2 fazu, a djelomično gubi i mogućnost stanične proliferacije.[54,58] MB II motiv je važan za efikasnu interakciju s nekoliko kofaktora koji svojim mehanizmima poboljšavaju proces transkripcije: TRRAP, HAT i njegovu komponentu BAF53. Također za interakciju s kofaktorima Tip48 i Tip49 te Skp2.[59] Manje poznata je, također konzervirana, centralna regija proteina Myc, MB III. Njen gubitak ne utječe na poluživot proteina, a niti na transkripcijsku regulaciju. Do danas se pokazalo da je ta domena važna za transformaciju stanica, poput primarnih kokošjih hematopoetskih stanica, ali da njen gubitak uzrokuje *myc* induciranu apoptozu. Zbog svoje očuvanosti smatra se da MB III domena upotpunjuje esencijalne funkcije proteina Myc.[59] MB IV domena je važna za cijelu trasformaciju i apoptozu, a gubitak domene potencira *myc* inducirani ulazak u G_2 fazu staničnog ciklusa. Smatra se da je domena MB IV specifična za kralježnjake.[58,60]

Najbolje istražena domena proteina Myc je C-terminalna domena čiji su ključni dijelovi *leucine zipper* (LZ) i *helix-loop-helix* (HLH). Uz pomoć ovih domena protein Myc se može specifično vezati s proteinom Max i stvoriti heterodimer koji se može vezati s dvolančanom molekulom DNA na mjestu koje se zove E-box.[58,59] Heterodimer c-Myc-Max prepoznaje posebnu regiju 5'-CACGTG-3' (E-box) na molekuli DNA za koju se veže. Regija proteina Myc koja se sastoji od 16 aminokiselina, a prepoznaje E-Box glasi: NVKRRTHNVLERQRRN. Dok protein Max E-box prepoznaje regijom koja sadrži 16 aminokiselina: ADKRAHHNALERKRRD.[61] Kristalna struktura heterodimera vezanog s molekulom DNA prikazana je na slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz heterodimera Myc/Max i specifičnog vezanja za dvolančanu molekulu DNA na mjestu E-box.[61]

Protein Max je mali, sveprisutno izražen protein koji se može vezati sa svim proteinima koji imaju bHLH-Zip regiju. Ova se regija smatra esencijalnom za sve Myc aktivnosti. Velika je 143 aminokiselina i kao transkripcijska regulatorna domena reagira i s drugim različitim kofaktorima poput: TRRAP (TRansactivation/tRansformation Associated Protein), HAT kompleks, DNA helikaze Tip48 i Tip49, te elongacijski faktor P-TEFb.

Hetrodimerna mreža onkoproteina Myc/Max pripada skupini transkripcijskih faktora koji upravo zbog domene bHLH-Zip mogu regulirati gensku transkripciju. Brojnim istraživanjima pokazana je važnost ove regije. Mutacijom ove regije dolazi do inaktivacije proteina.[58,59] Transaktivacija je najvažniji segment proteina Myc zbog čega je zanimljiv kod proučavanja antitumorskih lijekova. Domena MB II jedina ima nepromijenjeni slijed koji je očuvan od kralježnjaka, preko člankonožaca do bazalnih Metazoa kao što su hidre i spužve. Domena je ključna za onkogenu transformaciju, ali ne i za normalnu staničnu proliferaciju, čime se smatra da bi možda anti-MB II lijek (onaj koji koči funkcije ove domene) mogao biti ključan za borbu protiv tumorskih stanica. Do sada takav lijek nije osmišljen, ali ova *myc* transaktivacijska domena ostaje atraktivna meta za istraživanje i razvoj protutumorskih lijekova.[58]

1.3. MATERIJALI I METODE

1.3.1. Materijali

1.3.1.1. Osnovni materijal

Eunapius subterraneus, Ogulinska špiljska spužvica, prikupljena je na lokalitetu špilja Tounjčica (Tounj, Ogulin). U ovom istraživanju je korišten svježi materijal, a dio je čuvan u otopini *RNAlater* (Sigma) pri −80 °C i u etilnom alkoholu pri 4 °C.

1.3.1.2. Osnovne kemikalije

Korištene kemikalije su: agar (Difico), agaroza (Sigma), Akrilamid/bisakrilamid (T = 40 %) (Sigma), APS (Serva), etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA) (Sigma), etanol (Kemika), izopropil-ß-D-tiogalaktopiranozid (IPTG) (Thermo Scientific), kanamicin (Sigma), gentamicin (Sigma), kloramfenikol, *N*,*N*'-metilbisakrilamid (Merck), 2-merkaptoetanol (β-ME) (BIO RAD), metanol, natrijev dodecilsulfat (SDS) (Sigma), *N*,*N*,*N*',*N*'-tetraetilendiamin (TEMED) (Sigma), glicerol (Merck), glicin (Merck), metanol (Kemika).

1.3.1.3. Korišteni puferi

Korišteni su sljedeći puferi:

- Q5 pufer za PCR-reakciju (NEB)
- 10x FastDigest pufer (Thermo Scientific)
- 10x FastDigest pufer, zeleni (Thermo Scientific)
- TAE (0,04 M Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH = 8,3)
- TBS (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH = 7,4)
- TBST (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH = 7,4, 0,1 % Tween 20)
- pufer za proteine (25 mM Tris-HCl pH = 7,5, 50 mM NaCl, 10 %-tni glicerol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA)
- pufer za lizu (25 mM Tris-HCl, pH = 8,0, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, 1 mg/mL lizozim)
- pufer za elektrotransfer (3,03 g Tris, 14,4 g glicin, 200 mL metanol)
- 10x pufer za elektroforezu na SDS-poliakrilamidnom gelu (30 g Tris, 144 g glicin, 10 g SDS te dopuniti do 1 L deH_2O)
  *prije upotrebe potrebno ga je razrijediti 10 puta

- pufer za ispiranje nespecifično vezanih proteina, 20 mM (25 mM Tris-HCl pH = 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol)
- pufer za ispiranje nespecifično vezanih proteina, 40 mM (25 mM Tris-HCl pH = 8,0, 500 mM NaCl, 40 mM imidazol)
- pufer za ispiranje specifično vezanih proteina, 200 mM (25 mM Tris-HCl pH = 8,0, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol)
- pufer za nanošenje uzoraka na poliakrilamidni gel 4x (1 M Tris-HCl pH = 6,8 0,5 mL, 1 mL glicerol, 5 mg bromfenol plavo-nadopuniti deH_2O do 10 mL)
  *na 1 mL pufera dodati 50 µL β-ME
- *electroligase reaction buffer* (NEB)

1.3.1.4. Nukleotidi, oligonukleotidi i nukleinske kiseline

- dNTP Mixture (TaKaRa)
- GeneRuler (Fermentas) i MassRuler (Thermo Fisher Scientific) DNA-biljeg
- početnice za PCR reakciju citokrom oksidaze:
  5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAT-3'
  5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTG-3'
- početnice osmišljene za PCR reakciju:
  5'-GGCATGGCGTCGTTGGTAGAG-3' (Gorea)
  5'-GATTTTTGAAACGTCTTTGAAG-3' (Gorea)
- dizajnirane i modificirane početnice s restrikcijskim mjestima:
  5'-GTCTAG**CATATG**GCGTCGTTGGTAGAGTTC-3' (Macrogen)
- 5'-CTAGAC**GGATCC**CTAAAAACTTTGCAGAAACTTC-3' (Macrogen)

1.3.1.5. Plazmidi

Vektor pET28b dio je ekspresijskog sustava vektora pET (Novagen) i korišten je za prekomjernu ekspresiju gena *myc* u *E. coli*. Kodirajuća regija klonirana je unutar restrikcijskih mjesta *Nde*I i *Bam*HI

1.3.1.6. Proteini, enzimi i koenzimi

Q5 DNA-polimeraza (NEB), *FastDigest Bam*HI (Thermo Scientific), *FastDigest Nde*I (Thermo Scientific), *Ex Taq* polimeraza (TaKaRa), proteinski biljeg *Precision Plus Protein Dual Color Standards*, 500 µl (BIO RAD), *Electroligase* (NEB)

1.3.1.7. Boje

Korištene su sljedeće boje: *Bromphenol Blue* (BPB) (Sigma), *Coomassie Briliant Blue* R-250 (Sigma), etidijev bromid (Rosche), RNA *loading dye* 2x (Thermo Scientific), DNA *loading dye* 6x (Thermo Scientific)

1.3.1.8. Hranjive podloge za uzgoj bakterija

Za uzgoj bakterije *E.coli* korištena je:
- LB tekuća podloga (5 g/L kvaščev ekstrakt, 10 g/L tripton, 5 g/L NaCl, 0,1 g/L $MgCl_2$)
- LB kruta podloga (12 g/L agara)
- selektivna podloga s 30 μg/mL kanamicina.

1.3.1.9. Bakterijski sojevi

Elektrokompetentne *OneShot* TOP 10 stanice *E. coli* (F- *mcrA* Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15Δ *lac*X74 *rec*A1 *ara*D139Δ(*araleu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (StrR) *end*A1 *nup*G) (Thermo Fisher Scientific) korištene za fizikalnu metodu transformacije rekombinantnim plazmidom. BL21(DE3) (*fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm]* Δ*hsdS λ DE3 = λ sBamHIo* Δ*EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21* Δ*nin5)* kompetentne stanice omogućuju kontroliranu ekspresiju željenih proteina ugrađenih u vektore kao što su pCAL i pET vektori.

1.3.1.10. Ostali materijali

Korišteni su sljedeći komercijalni paketi:

- Za izolaciju genomske DNA
  Blood & Cell Culture DNA *Mini Kit* (QIAGEN)
- Za izolaciju RNA
  RNeasy Mini Kit (QIAGEN)
- za izolaciju plazmidne DNA
  QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN)
- Za sintezu cDNA
  SuperScript IV VILO Master Mix (Invitrogen)
- za pročišćavanje fragmenata DNA iz agaroznog gela
  QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
- za pročišćavanje i koncentriranje proteina

Amicon Ultra-0,5 Centrifugal Filter Devices (Milipore)

- za sekvenciranje DNA
  ABI-PRISM Big Dye Terminator Version 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit
- za određivanje koncentracije proteina
  Quick Start Bradford Protein Assay Instruction Manual (BIO RAD)

Za *western* analizu proteina korišteni su:

- polivinilidenska fluoridna membrana (Amersham Biosciences)
- 5 % otopina *Blocking Agent* (250 mg Blocking Agent-a u 5 mL TBST-a)
- ECL mix (Amersham Biosciences)
- primarna antitijela Anti-His (Amersham Biosciences)
- sekundarna antitijela *Anti-rabbit* IgG, u kompleksu s peroksidazom (Amersham Biosciences)
- luminol (Amersham Biosciences)
- pojačivač (Amersham Biosciences)

1.3.2. Metode

1.3.2.1. Izolacija genomske DNA

Korišten je svježi uzorak spužve koji je prikupljen na lokalitetu špilja Tounjčica (Tounj, Ogulin). DNA je izolirana iz spužvinih stanica i vizualizirana agaroznom gel-elektroforezom. Uzorak spužve najprije je ispran četiri puta s 30 mL sterilne izvorske vode nakon čega je stavljen u 10 mL sterilne izvorske vode i usitnjen pomoću sterilne špatule. Zatim je uzorak filtriran filterima različitih veličina, sljedećim redoslijedom: 200 μm, 100 μm i 40 μm, u sterilnu epruvetu. Filtrat je inkubiran 30 minuta pri 8 °C. Nakon inkubacije u epruveti je bilo moguće uočiti želatinozni sloj između taloga i supernatanta. Supernatant je uklonjen bez dodirivanja želatinoznog sloja, uzorak je ponovo ispran sterilnom vodom i inkubiran 30 minuta pri 8 °C. Postupak je ponovljen dva puta, odnosno dok supernatant nije postao bistar. Pri posljednjem ispiranju dodana je sterilna voda s gentamicinom u koncentraciji 50 mg/L. Broj spužvinih stanica određen je Burker-Turkovom komoricom za brojanje i svjetlosnim mikroskopom. Ukupna genomska DNA izolirana je komercijalno dostupnim paketom *Blood & Cell Culture DNA Mini Kit* (QIAGEN) prema uputama proizvođača za izolaciju genomske DNA iz kulture stanica. Radi kontrole, zbog mogućeg gubitka genomske DNA tijekom postupka izolacije, uzimani su alikvoti. Uzeta su četiri alikvota tijekom različitih koraka izolacijskog postupka koji

su dodatno pročišćeni. Prvi alikvot uzet je nakon dodatka proteinaze K te je tijekom dva sata inkubiran pri 50 °C. Drugi alikvot uzet je nakon prvog puštanja uzorka kroz kolonu. Nakon ispiranja kolone QC puferom uzet je treći alikvot, a posljednji, četvrti, uzet je nakon ispiranja DNA s kolone QF puferom. Elektroforezom na agaroznom gelu utvrđeno je je li u frakcijama zaostalo genomske DNA, tj. je li DNA izgubljena tijekom postupka izolacije. Metoda se temelji na izolaciji DNA uz pomoć kolonica i gravitacijske sile, a postupak na optimiziranom sustavu pufera koji pri određenim pH-vrijednostima i niskoj koncentraciji soli omogućuju vezanje genomske DNA na kolonu. RNA, proteini, boje i ostale nečistoće uklonjeni su, nakon čega je genomska DNA eluirana puferom visoke slanosti i precipitirana izopropanolom. Uzorku koji je prikupljen određena je koncentracija aparatom Nanophotometer N60 (Implen).

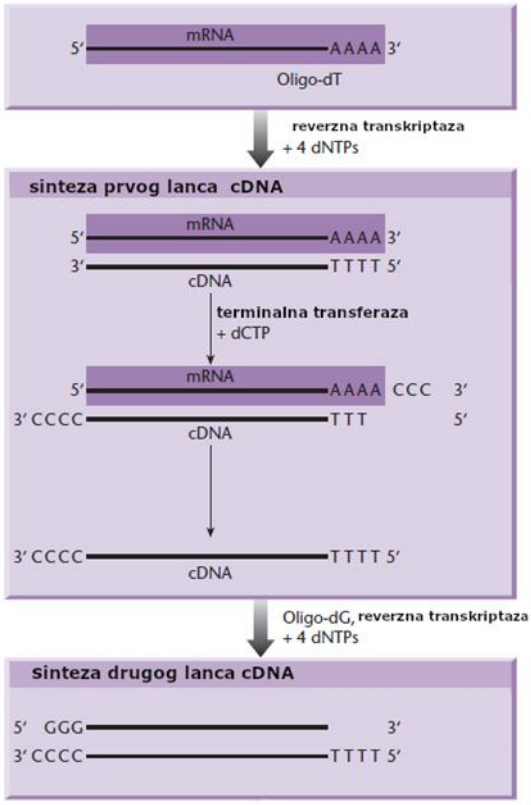
1.3.2.2. Izolacija RNA

RNA je izolirana komercijalno dostupnim paketom *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN) prema uputama proizvođača za izolaciju RNA iz kulture stanica. Korišten je svježi uzorak spužve koji je prikupljen na lokalitetu špilja Tounjčica (Tounj, Ogulin). RNA je izolirana iz spužvinih stanica i vizualizirana agaroznom gel-elektroforezom. Uzorak spužvinih stanica pripremljen je kao što je opisano u poglavlju 3.2.1. Izolacija genomske DNA. Kombinacijom centrifugiranja, selektivnog vezanja na silikagelnu membranu te uproabom specijaliziranih pufera visoke slanosti može se na *RNeasy* membranu vezati do 100 µg fragmenata RNA velikih i do 200 baza. Uzorak se prebacuje u *RNeasy Mini spin* kolonu na koju se veže cjelokupna RNA i ispire od onečišćenja. Na kraju je RNA eluirana u 50 µL vode bez RNaze.

1.3.2.3. Sinteza cDNA

Sinteza dvolančane cDNA prikladne za ugradnju u vektor za kloniranje sastoji se od tri velika koraka: sinteza jednolančane DNA pomoću kalupa mRNA uz pomoć reverzne transkriptaze, uklanjanje RNA kalupa, te sinteza drugog lanca DNA koristeći se prvim lancem kao kalupom.[59] Za sintezu cDNA korišten je komercijalno dostupan paket *SuperScript IV VILO Master Mix* (Invitrogen) prema zadanom protokolu proizvođača. Kao kalup korištena je RNA (1 pg – 2,5 µg) izolirana iz stanica (poglavlje 1.3.2.2.). Prema protokolu najprije se napravi reakcijska smjesa, volumena 10 µL, koja se sastoji od: kalupa (RNA), NFW, 10X ezDNase pufera i ezDNase enzima. Enzim ima ulogu brzog uklanjanja kontaminacija, poput genomske DNA zaostale prilikom izolacije RNA, on također i specifično cijepa fosfodiestersku vezu u dvolančanoj molekuli DNA i na taj način doprinosi stvaranju oligonukleotida, s 5'-fosfatnim i

3'-hidroksilnim krajem, velikih 2-8 pb. Visoka specifičnost ezDNaze za dvolančanu DNA omogućuje učinkovito i brzo uklanjanje genomske DNA bez smanjenja kvalitete i količine RNA ili jednolančane DNA prisutne u reakciji.



Slika 8. Shematski prikaz metode sinteze cDNA. Nakon sinteze prvog lanca uz pomoć oligo-dT primera lanac cDNA povezan je s cistidinskim krajem uz pomoć enzima reverzne transkriptaze. Zatim oligo-dC kraj služi kao mjesto sljepljivanja za oligo-dG primer koji omogućuje sintezu drugog lanca cDNA molekule.[62]

Ona je osjetljiva na toplinu pa se lako može deaktivirati pri temperaturi od 55 °C. Nakon što se reakcijska smjesa inkubira pri 37 °C i ohladi na ledu dodaju se reagensi za reverznu transkripciju direktno u istu tubicu kako bi se nastavilo sa sintezom prvog lanca cDNA. Nakon drugog koraka u protokolu napraviti PCR provjeru s univerzalnim početnicama za citokrom oksidazu (gen za podjedinicu I citokrom oksidaze COI) kako bi se vidjelo dolazi li do amplifikacije genomske DNA u uzorku RNA koji je korišten za reakciji. U tablici 1 prikazane su potrebne kemikalije i volumeni potrebni za PCR reakciju, a u tablici 2 program PCR reakcije u svrhu provjere zaostalosti genomske DNA u uzorku RNA.

Nakon napravljene provjere nastavljena je reakcija sinteze cDNA prema protokolu proizvođača.

Tablica 1. Potrebni reagensi i njihovi volumeni za PCR reakciju.

Reagens	Test (5 uzoraka)	Pozitivna kontrola	Negativna kontrola
Kalup	1 µL RNA	0,5 µL cDNA (83,27 ng/µL)	/
Ex Taq DNA polimeraza	5 µL	5 µL	5 µL
NFW	3 µL	4,3 µL	3,9 µL
početnica F COI	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL
početnica R COT	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL

Tablica 2. Program PCR reakcije u svrhu provjere zaostalosti genomske DNA u uzorku kalupa RNA.

Korak	Temperatura / °C	Vrijeme / s	Broj ponavljanja
početna denaturacija	98	60	1
denaturacija	94	30	30
sparivanje početnica	55	45	30
elongacija	72	60	30
završna elongacija	72	300	1

1.3.2.4. Dizajniranje početnica

Kako bi se određeni odsječak molekule DNA umnožio PCR metodom jedan od ključnih preduvjeta je odabrati početnice (engl. *primers*). Početnice su kraći oligonukleotidi koji omeđuju dio DNA kojeg želimo umnožiti. Jedna početnica je komplementarna 3' kraju odsječka jednog DNA lanca koji se umnaža, a druga je komplementarna 3' kraju drugog DNA lanca. Ključan korak u uspješnosti PCR metode upravo je dizajniranje početnica, može ih se dizajnirati pomoću računalnih programa za dizajn početnica ili prema određenim smjernicama na temelju odsječka DNA kojeg umnažamo. Prilikom dizajniranja početnica važno se držati određenih smjernica. Poželjno je da je duljina početnica između 18 i 24 pb, jer prekratke početnice dovode do umnažanja nespecifičnog produkta, dok preduge umanjuju djelotvornost sparivanja. Osim duljine početnica za njihov dizajn važan je i udio G i C nukleotida koji mora biti 45 – 55 %, a preporučuje se da i sami krajevi početnica počinju i završavaju G i C nukleotidom, jer se na taj

način omogućuje bolje i snažnije sparivanje početnica s DNA kalupom. Temperatura sljepljivanja početnica (T_a, engl. *annealing temperature*) treba biti između 50 i 65 °C, ali ujedno i barem 5 °C niža od temperature taljenja (T_m, engl. *melting temperature*) one početnice koja ima nižu T_m u paru. Temperatura taljenja može se približno izračunati prema jednadžbi:

$$T_m = 4 \cdot (\text{broj GC parova}) + 2 \cdot (\text{broj AT parova}).$$

Za uspješno dizajniranje početnica važno je izbjegavanje komplementarnih sljedova duljih od 3 pb unutar samih početnica, jer se time sprječava nastajanje sekundarnih struktura, ometanje sparivanja i nastajanje dimera početnica.[63] Trebaju se izbjegavati i purinski ili pirimidinski sljedovi nukleotida, jer se time izbjegava sparivanje nukleotida između para početnica ili unutar same početnice. Početnice korištene za umnožavanje i kloniranje gena *myc* dizajnirane su na temelju djelomično sekvenciranog transkriptoma spužve *Eunapius subterraneus* kao rezultat zajedničkog projekta bioinformatičke grupe prof. dr. sc. Kristiana Vlahovičeka (PMF Zagreb) i članova Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković.

1.3.2.5. Lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je metoda kojom se *in vitro* umnaža specifični odsječak DNA uz korištenje para početnica i DNA polimeraze. Sastoji se od pet koraka, od kojih se tri ponavljaju određeni broj puta. Koraci koji se ponavljaju su toplinska denaturacija DNA, sljepljivanje početnica na komplementarne dijelove DNA i sinteza komplementarnih lanaca pomoću DNA polimeraze. Sam ciklus započinje početnom denaturacijom, koja se zbiva prije ponavljajućih koraka (denaturacija, sparivanje početnica i elongacija) nakon čega ciklus završava završnom elongacijom. Za svaki PCR postupak potrebna je reakcijska smjesa koja sadrži: kalup (plazmid, genomska DNA ili DNA fragment), dNTP-ove, početnice (najčešće im je duljina 18 – 24 pb), termostabilnu DNA polimerazu (najčešće Taq polimeraza) i pripadajući pufer (ovisan o polimerazi). Za svaki korak PCR metode potrebne su druge postavke uređaja. Temperatura denaturacije ovisna je o duljini kalupa i njegovu sastavu. Sastoji li se kalup od više GC parova i ako je duži, onda je samim time potrebna i viša temperatura denaturacije. Najčešće temperature su 95 °C i 97 °C, a vrijeme trajanja denaturacije je 15 – 30 sekundi, jer previsoka temperatura ili pretjerano trajanje koraka vode do nepotrebnog gubitka aktivnosti enzima. Temperatura sljepljivanja, T_a (engl. *annealing temperature*) ovisi o početnicama koje se koriste u reakciji, a računa se kao:

$$T_a = T_m - 5\ °C.$$

Najbolji rezultati postižu se pri temperaturama od 55 °C do 72 °C. Elongacija se najčešće događa pri temperaturi od 72 °C, a vrijeme same sinteze DNA ovisi o duljini i koncentraciji ciljnog slijeda, te temperaturi elongacije. Svakim ciklusom udvostručuje se broj kalupa pa je amplifikacija eksponencijalna. Broj ciklusa je između 25 – 30, a nakon otprilike 30 ciklusa dolazi do *plato faze* zbog ograničene količine enzima i smanjene enzimske aktivnosti. Predviđeni prinos PCR produkta može se izračunati prema izrazu:

prinos PCR-produkta = (početna količina ciljnog slijeda) · (1 + % učinkovitosti) broj ciklusa.

Dobiveni fragmenti analiziraju se agaroznom gel-elektroforezom, te se uspoređuju s teorijskom veličinom željenog fragmenta DNA. Za PCR postupak umnažanja cDNA koja kodira za protein Myc korištena je Q5-polimeraza uz odgovarajući Q5 puferski sustav. U reakciji je korištena Q5-polimeraza zbog visoke stope amplifikacije (oko 280 puta viša od Taq polimeraze) što rezultira niskim stopama pogrešaka. Q5 DNA polimeraza se sastoji od nove polimeraze koja je fuzionirana na Sso7d DNA veznu domenu koja pojačava procesivnost, poboljšavajući brzinu, vjernost i pouzdanost izvedbe. U tablici 3 nalaze se reagensi korišteni u reakciji i njihova koncentracija te volumen, a u tablici 4 navedeni su uvjeti PCR reakcije.

Tablica 3. Volumeni i koncentracije potrebnih kemikalija za umnažanje gena *myc* PCR reakcijom.

Reagens	Koncentracija	Volumen / µL
5 · Q5 pufer	1x	5,00
2,5 mM dNTP	0,2 mM	2,00
Q5 polimeraza	0,02 U/ µL	0,50
početnica fp28MycNDE	10 µM	1,25
početnica rp28MycBAM	10 µM	1,25
kalup (cDNA)	< 1000 ng	3,00
NFW	–	12,00

Tablica 4. Program PCR reakcije za umnažanje gena *myc*.

Korak	Temperatura / °C	Vrijeme / s	Broj ponavljanja
početna denaturacija	98	30	1
denaturacija	98	10	30
sparivanje početnica	62	20	30
elongacija	72	30	30
završna elongacija	72	120	1

Ukupni volumen PCR reakcijske smjese 25 μL. Sekvence početnica navedene su u poglavlju *Materijali* (1.3.1.4.). Za DNA kalup korištena je cDNA spužve *Eunapius subterraneus* dobivena reverznom transkripcijom (opisano u poglavlju 1.3.2.3.).

1.3.2.6. Elektroforeza DNA i RNA u agaroznom gelu

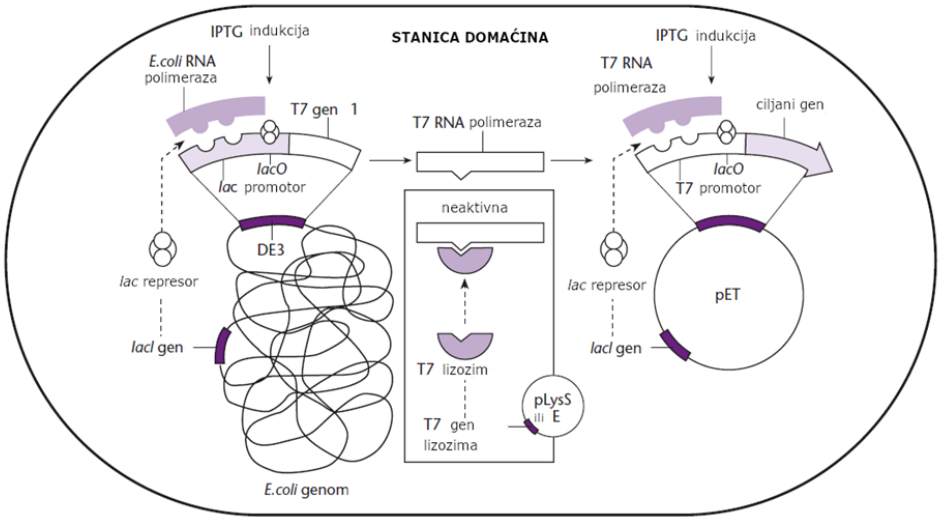
Po završetku PCR postupka, reakcijska smjesa nanosi se na agarozni gel kako bi se provjerila veličina fragmenta gel elektroforezom. Tehnika je korištena i prilikom izolacije genomske DNA i izolacije RNA kako bi se vizualizirali dobiveni rezultati izolacije. To je standardna metoda za brzu i jednostavnu analizu DNA, njezinu identifikaciju, razdvajanje, određivanje količine i pročišćavanje. Kako nukleinske kiseline imaju jednak naboj pod utjecajem električnog polja mogu se razdvojiti prema razlikama u masi. Pod utjecajem istosmjernog električnog polja negativno nabijene molekule DNA kreću se od katode, negativne elektrode, prema anodi, pozitivnoj elektrodi. Na pokretljivost DNA ne utječe samo molekularna masa već i njena konformacija, jakost i smjer električnog polja, koncentracija agaroze u gelu, prisutnost interkalirajućih boja (etidijevog bromida) te sam sastav pufera za elektroforezu. Za razdvajanje molekula DNA nužno je koristiti gel s većim porama pa se agaroznim gelom mogu razdvojiti fragmenti veličine 50 pb – 50 kb. Agaroza je linearni polimer u kojem se izmjenjuju ostaci D-galaktoze i 3,6-anhidro-L-galaktoze. Agarozni gel priređen je otapanjem agaroze u TAE puferu (sastav pufera se nalazi u poglavlju 1.3.1.3.) s etidijevim bromidom, zagrijavanjem do vrenja, te izlijevanjem u odgovarajući kalup s češljićem za oblikovanje jažica. Polimerne molekule hlađenjem tvore gel međusobno se povezujući vodikovim vezama. Veličina pora, a time i raspon molekulskih masa molekula koje se mogu uspješno odijeliti, kontrolira se mijenjanjem koncentracije agaroze u gelu. Uz produkte reakcija na gel se nanosi i marker (korišteni su *MassRuler DNA Ladder Mix* i *GeneRuler*) uz pomoć kojeg se određuje veličina fragmenata. Po završetku PCR postupka na 1 % agarozni gel nanesen je cijeli volumen reakcije (25 μL) te je provedena elektroforeza u trajanju od sat vremena pri 50 V. Prilikom izolacije genomske DNA napravljen je 0,7 % agarozni gel i naneseno je 5 μL izoliranog uzorka te je provedena elektroforeza u trajanju od sat vremena pri 50 V. Pri izolaciji RNA korišten je 1 % agarozni gel na koji je naneseno 5 μL izoliranog uzorka. Kako bi se uzorak RNA nanio na gel potrebna je priprema samog uzorka. Uzorak se napravi tako da se smjesa koja se sastoji od: uzorka RNA, boje za RNA (poglavlje 1.3.1.7.) i NFW u jednakim omjerima inkubira 10 minuta na 70 °C nakon čega se može nanijeti na agarozni gel. Elektroforeza je trajala sat vremena pri 50 V.

1.3.2.7. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Za pročišćavanje DNA iz agaroznog gela korišten je komercijalno dostupan paket *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) (pročišćava fragmente DNA veličine od 70 pb do 10 kb). Izolacija se zasniva na ionskoj izmjeni u koloni. Kako bi se DNA vezala na membranu kolone potrebna je visoka koncentracija soli i optimalna pH-vrijednost (pH ≤ 7,5), a neželjene nečistoće poput soli, enzima, agaroze, etidijevog bromida i detergenata ispiru se s kolone. Zadnji korak je elucija koja je, suprotno adsorpciji, najefikasnija u uvjetima niskih koncentracija soli i blago lužnatim uvjetima.

1.3.2.8. Priprema rekombinantne DNA

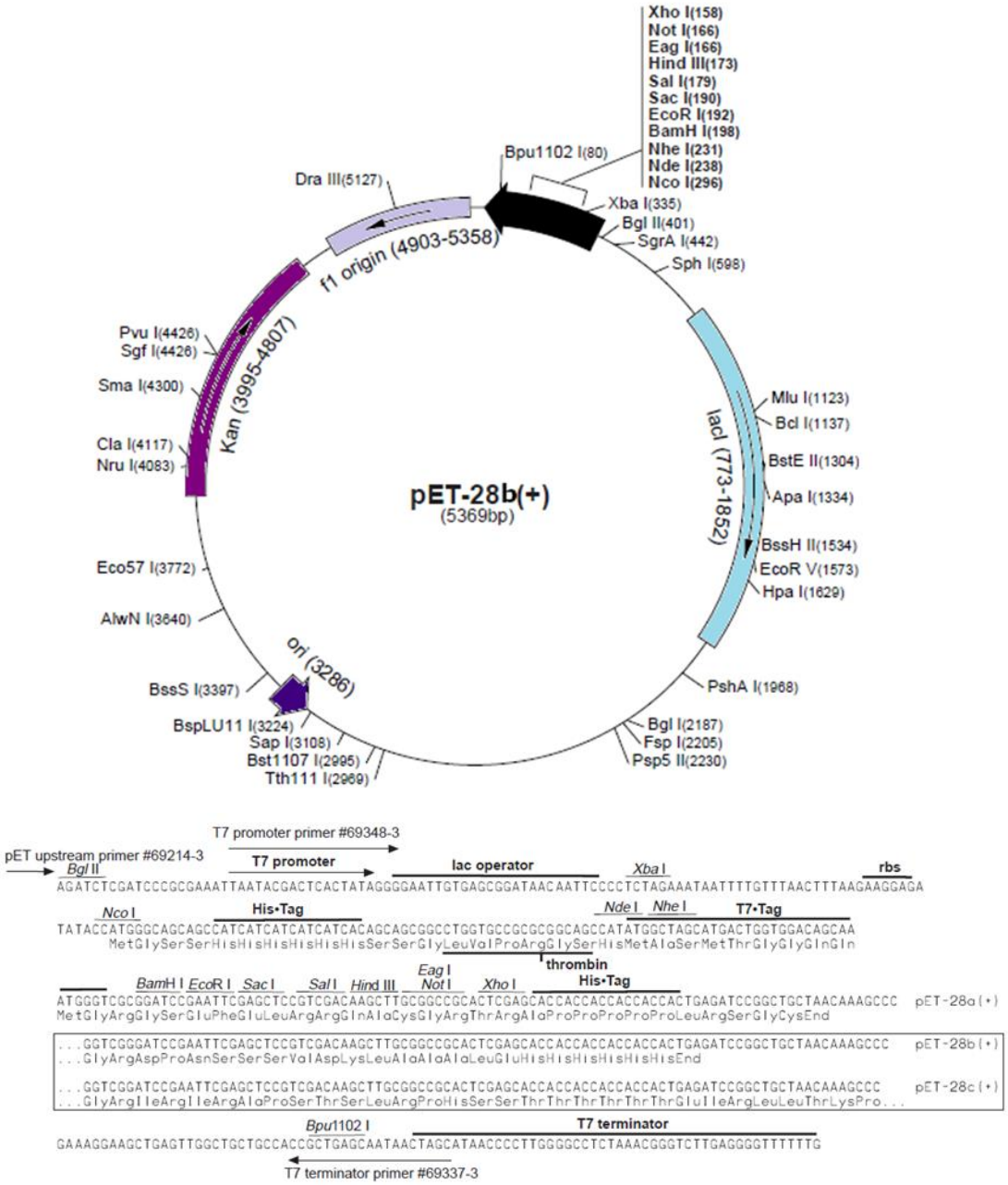
U stanicama eukariota većina je proteina prisutna u malim količinama zbog čega ih je standardnim biokemijskim metodama nemoguće dovoljno proizvesti. Taj se problem može riješiti, ako imamo klonirani gen, korištenjem posebno dizajniranih vektora koji omogućuju snažnu ekspresiju kloniranog gena u eukariotskim i bakterijskim stanicama.



Slika 9. Regulacija ekspresije gena ukloniranog u vektor pET. Gen za T7 RNA polimerazu je ugrađen u genom *E. coli* i bit će eksprimiran samo uz dodatak IPTG induktora. Ako je proteinski produkt ukloniranog gena toksičan, nužno je reducirati transkripciju ukloniranog gena prije indukcije. T7 lizozim kodiran je kompatibilnim plazmidom (pLysS) i vezat će se s ostatkom T7 RNA polimeraze u odsustvu indukcije i na taj je način inaktivirati. Prisutnost *lac* operona između T7 promotora i ukloniranog gena će reducirati transkripciju u odsustvu IPTG induktora.[64]

Za takvu ekspresiju često se koristi pET sustav, koji se sastoji od pET vektora u kojeg se ugrađuje željeni gen, te bakterije *E. coli* u čiji je genom genetičkim inženjerstvom ugrađen gen

za T7 RNA polimerazu. Željeni gen, cDNA koja kodira za protein Myc, ugrađuje se između restrikcijskih mjesta u višestrukom mjestu za kloniranje, MCS (engl. *multiple cloning site*), pET vektora. Višestruko mjesto za kloniranje smješteno je između T7 promotora i T7 terminatora transkripcije, a te sljedove specifično prepoznaje T7 RNA polimeraza faga T7. T7 RNA polimeraza specifično se veže samo za T7 promotor.



Slika 10. Shematski prikaz ekspresijskog sustava pET28b. Na mapi su prikazane specifične regije vektora, a u dnu slike prikazano je višestruko mjesto za kloniranje.[65]

Cijeli je sustav pod kontrolom *lac* represora (*lacI*) koji se veže na *lac* operon na vektoru kako bi spriječio ekspresiju prije indukcije. Osim *lac* represora ekspresija gena koji kodira za T7 RNA polimerazu pod kontrolom je još *lac* promotora i operatora čime se dodatno sprječava mogućnost ekspresije željenog gena prije indukcije. Bez indukcije pomoću IPTG-a, nerazgradivog analoga laktoze, nema prekomjerne ekspresije. IPTG potiče stvaranje kompleksa s *lac* represorom koji onda potiče njegovu disocijaciju s *lac* operatora, a ta reakcija omogućava početak transkripcije. U novonastalim uvjetima eksprimira se T7 RNA polimeraza koja potiče transkripciju željenog gena vezanjem na T7 promotorsku regiju. Na slici 10 prikazan je ekspresijski vektor pET28b korišten za prekomjernu ekspresiju proteina Myc.

1.3.2.9. Razgradnja PCR produkta i plazmida pET28b restrikcijskim endonukleazama

Restrikcijske endonukleaze su enzimi koji prepoznaju određenu nukleotidnu sekvencu (restrikcijsko mjesto) od 4 do 8 pb i na tom mjestu režu dvolančanu molekulu DNA. Postoje tri tipa restrikcijskih endonukleaza koje se razlikuju prema: vrsti sekvence koju prepoznaju, prirodi cijepanja DNA i strukturi enzima. U genetičkom inženjerstvu koriste se restrikcijske endonukleaze tipa II koje prepoznaju točno određena restrikcijska mjesta, tzv. palindrome. Nakon cijepanja endonukleaze tipa II ostavljaju tupe ili ljepljive krajeve. U ovom eksperimentu korištene su restrikcijske endonukleaze koje specifično prepoznaju *Nde*I i *Bam*HI mjesta, a nakon razgradnje ostavljaju ljepljive krajeve. Sljedovi prepoznavanja i mjesta cijepanja restrikcijskih endonukleaza prikazani na slici 11.



Slika 11. Prikaz restrikcijskog mjesta koje prepoznaje enzim *Nde*I (lijevo) i restrikcijskog mjesta koje prepoznaje enzim *Bam*HI (desno).[66]

Po završetku razgradnje fragmenti DNA pročišćeni su upotrebom komercijalnog paketa *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) prema protokolu za pročišćavanje DNA nakon enzimatske reakcije.

1.3.2.10. Ligacija

Ligacija je postupak nastajanja fosfodiesterskih veza između vektora i *inserta* pomoću enzima DNA ligaze iz bakteriofaga T4. Ovim postupkom povezuju se međusobno komplementarni krajevi DNA odsječaka uz utrošak ATP-a.

Volumen potrebnog *inserta* izračuna se prema sljedećem izrazu:

$$m(PCR\ insert, kb) = \frac{m(vektor, ng) \times duljina(PCR\ insert, kb)}{duljina(vektor, kb)} \times \frac{insert}{vektor}$$

U postupku ligacije korišten je *Electroligase* (NEB) te je prema uputama proizvođača ligacijska smjesa ostavljena 30 minuta pri sobnoj temperaturi i zatim 15 minuta pri 65 °C, kako bi se inaktivirala ligaza te je nakon toga ostavljena u ledenoj kupelji dok se ne započne s postupkom transformacije.

Tablica 5. Sastav ligacijske smjese.

Otopina	**Volumen / µL**
vektor pET28b Nde/Bam	3,0
Pročišćeni i razgrađeni PCR produkt (myc Nde/Bam)	1,5
pufer za elektroligazu	5,0
elektroligaza	1,0
NFW	0,5

1.3.2.11. Transformacija bakterijskih stanica

Transformacija je proces prilikom kojeg stanica prima molekulu strane DNA. Metode transformacije dijele se na kemijske i fizikalne. Korištenjem kemijske metode koriste se kompetentne stanice koje se inkubiraju 30 minuta u ledenoj kupelji i u puferskoj otopini ($CaCl_2$, $MgCl_2$ i Tris-HCl) pa se podvrgnu kratkotrajnom toplinskom šoku (30 sekundi na 37 – 42 °C) te se ponovno ostave na ledu dvije minute. Ne zna se točan mehanizam kako ova kombinacija kemijskih tvari i fizičkih tretmana inducira stanje kompetencije stanica i mehanizam ulaska strane DNA u kompetentnu stanicu, ali se smatra da kalcijev klorid djeluje na staničnu stijenku i tako možda utječe na vezanje DNA na staničnu površinu. Unos DNA u stanicu potiče se kratkotrajnim toplinskim šokom što vjerojatno utječe na destabiliziranje stanične membrane. Druga metoda transformacije je fizikalna, tj. elektroporacija prilikom koje se stanice podvrgavaju jakom, ali kratkotrajnom električnom polju pomoću elektroporatora. Tom se metodom otvaraju prolazne pore na membrani kako bi molekule DNA ušle u stanicu. Ova je metoda najlakša, najbrža, najučinkovitija i najpouzdanija za transformaciju bakterijskih stanica sa stranom DNA. U ovom radu korištena je fizikalna metoda transformacije. Kako bi se metoda uspješno izvela potrebna je, prethodno napravljena (poglavlje 1.3.2.10.) ligacijska smjesa, elektrokompetentne *OneShot* TOP 10 *E. coli* stanice i uređaj, tj. elektroporator (*GeneRuler Xcell*, BIO RAD). Cijeli postupak izveden je prema uputama proizvođača. Nakon

transformacije stanice su resuspendirane u 250 μL medija SOC i inkubirane sat vremena pri 37 °C, kako bi se oporavile. Stanice su nacijepljene na krutu LB podlogu s kanamicinom i inkubirane preko noći pri 37 ºC. Izolacijom plazmida iz nasumično odabranih kolonija te njihovom razgradnjom restrikcijskim endonukleazama *Nde*I i *Bam*HI i sekvenciranjem provjerena je uspješnost transformacije.

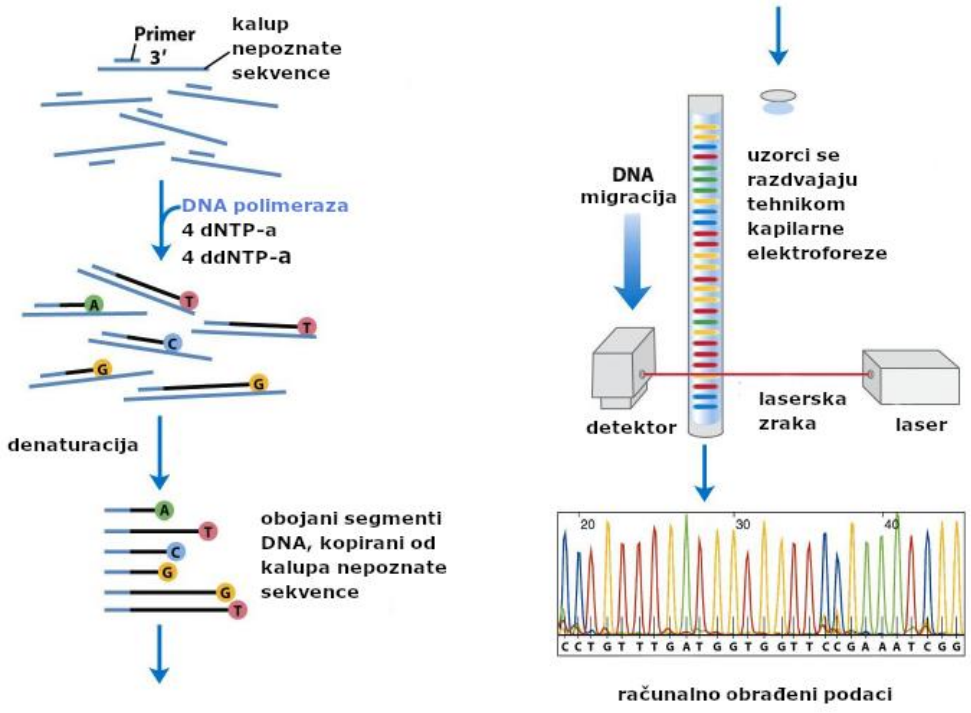
1.3.2.12. Transformacija bakterijskih stanica

Plazmidna DNA u radu izolirana je komercijalno dostupnim paketom *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN) prema uputama proizvođača. Postupak se temelji na alkalnoj lizi bakterijskih stanica nakon čega, u prisutnosti visoke koncentracije soli, dolazi do adsorpcije DNA na silikagel membranu. Nečistoće se ispiru, a zatim se plazmidna DNA eluira s kolone u malom volumenu pufera. Tako pročišćenu DNA može se odmah koristiti u razne svrhe, nema potrebe za taloženjem ili koncentriranjem. Temelj izolacije plazmidne DNA je alkalna liza u prisutnosti SDS-a, gdje lužina i SDS razaraju staničnu stijenku te denaturiraju proteine i DNA. Neutralizacijom dolazi samo do renaturacije plazmidne DNA koja je topološki isprepletena, a dodatkom NaOAc talože se kompleksi SDS-a i proteina te stanična DNA. Talog se odstranjuje centrifugiranjem, a plazmidna DNA se koncentrira dodatkom etanola.

1.3.2.13. Određivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA Sangerovom dideoksi metodom

Sangerova dideoksi metoda sekvenciranja molekule DNA zasniva se na zaustavljanju enzimatske sinteze lanca DNA ugradnjom dideoksiribonukleozid-trifosfata. Prirodni supstrati za sintezu DNA su deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP): dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Sinteza DNA ide u 5'-3' smjeru, a uvjet za sintezu je postojanje početnice koja pronalazi sebi homologan slijed i čijim produljivanjem nastaje novi DNA lanac. DNA polimeraze, enzimi koji sintetiziraju DNA, mogu ugraditi u rastući lanac i analoge dNTP-ova, dideoksiribonukleozid-trifosfate (ddNTP) koji nemaju 3'-OH skupinu potrebnu za uspostavljanje fosfodiesterske veze, stoga dolazi do zaustavljanja daljnje sinteze DNA. Enzimatska sinteza ide u četiri odvojena koraka, a u svakoj reakcijskoj smjesi nalaze se sva četiri dNTP i po jedan od ddNTP-ova. Omjer dNTP-a i ddNTP-a podešen je tako da se ddNTP ugrađuje u DNA s mnogo manjom učestalošću. Na taj način nastaje serija DNA molekula različitih duljina koje završavaju bazom koja odgovara ddNTP-u korištenom u reakciji. Fragmenti molekule DNA razdvajaju se prema razlici u duljini poliakrilamidnom gel elektroforezom, iz čega se mogu odrediti pozicije pojedinih nukleotida u izvornoj molekuli DNA. Za određivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA

korišten je potpuno automatizirani uređaj ABI-PRISM 3100-*Avant Genetic Analyzer* koji umjesto elektroforeze u tankim gelovima poliakrilamida koristi kapilarnu elektroforezu (uzorci se nakon završene reakcije razdvajaju putujući kroz vrlo dugu i tanku kapilaru ispunjenu polimerom i "četverobojnom biokemijom" (svaki ddNTP obilježen je drugom fluorescencijskom bojom) tako da se reakcija provodi u istoj mikroepruveti. CCD kamera pretvara informaciju o fluorescenciji u elektronički signal koji se onda prenosi na računalo i obrađuje programskim alatom ABI-PRISM-*Avant Genetic Analyzer Data Collection Software Version 2.0* i prikazuje u obliku elektroferograma. Na ordinati se prikazuje relativna koncentracija boje, a na apscisi vrijeme. Svaki maksimum u elektroferogramu predstavlja po jedan fragment DNA i koristi se za određivanje nukleotidne sekvence. Rezultati se korisniku prikazuju pomoću programa ABI PRISM DNA *Sequencing Analysis Software Version 5.11*. Kod priprave uzoraka za kapilarnu elektroforezu koristi se komplet ABI-PRISM *Big Dye Terminator Version 3.1 Ready Reaction Cycle Cycle Sequencing Kit*.



Slika 12. Određivanje primarne strukture DNA strategijom automatskog sekvenciranja uz pomoć uređaja ABI-PRISM 3100-*Avant Genetic Analyzer* koristeći „*četverobojnu biokemiju*“ i kapilarnu elektroforezu u istoj mikroepruveti.[67]

1.3.2.14. Priprema kompetentnih stanica za transformaciju

Priprema kompetentnih stanica započela je prekonoćnim uzgojem bakterijskih stanica BL21(DE3) u tekućoj hranjivoj podlozi LB-a i kloramfenikola. Bakterijske stanice BL21(DE3)

sadrže T7 RNA polimerazu faga T7 kako bi se mogle koristiti za upotrebu s ekspresijskim plazmidom koji sadrži T7 promotor. T7 RNA polimeraza specifično se veže za T7 promotor i dodatkom IPTG-a dolazi do indukcije i prekomjerne ekspresije. Prekonoćna kultura razrijeđena je 100 puta i uzgajana pri temperaturi od 37 °C uz miješanje od 250 okretaja po minuti. Tijekom uzgoja provedena su kontinuirana spektrofotometrijska mjerenja optičke gustoće pri valnoj duljini od 600 nm. Kada je iznos apsorbancije dosegao vrijednost 0,6 (stanice u ranoj eksponencijalnoj fazi rasta), uzgoj je prekinut. Sve potrebne kemikalije prethodno su ohlađene do 4 °C. Stanice su centrifugirane šest minuta uz 5000 okretaja i pri 4 °C. Dobiveni talog resuspendiran je prethodno ohlađenim i sterilnim kalcijevim kloridom u polovici volumena početne kulture i ostavljen u ledenoj kupelji 15 minuta. Nakon toga slijedilo je ponovno centrifugiranje pri istim uvjetima kao i u prethodnom koraku i resuspendiranje taloga u 1/10 početnog volumena ohlađene i sterilne otopine 50 mM $CaCl_2$ i 10 %-tnog glicerola. Dobivena kultura razdijeljena je u alikvote od 100 µL, naglo smrznuta u tekućem dušiku i pohranjena pri −80 °C.

1.3.2.15. Indukcija ekspresije

U bakterijskom ekspresijskom sustavu pET klonirani gen je pod kontrolom promotora T7 RNA polimeraze, čija je ekspresija u stanicama domaćina *E. coli* regulirana *lac* operonom. Vezanjem IPTG-a za represor inducira se ekspresija T7 RNA polimeraze u stanicama domaćina i omogućuje se transkripcija kloniranog gena. Izuzetno visoka aktivnost ove polimeraze rezultira visokom razinom ekspresije željenog proteina. Indukcija započinje transformacijom bakterijskih stanica *E. coli*, soja BL21(DE3), rekombinantnim plazmidom pET28b_myc. Bakterijske stanice inokuliraju se u tekućoj podlozi (LB) s odgovarajućim antibiotikom (kanamicin). Inkubacija se provodi preko noći pri 37 °C uz vrtnju od 650 okretaja po minuti. Nakon inkubacije dobivena kultura razrijedi se u, već spomenutoj, tekućoj podlozi LB i odgovarajućem antibiotiku. Nakon što se izmjeri optička gustoća, pomoću spektrofotometra, pri valnoj duljini 600 nm te dosegne vrijednost 0,6, inducira se ekspresija proteina dodatkom IPTG-a. Indukcija je provedena na dva načina. Pri 30 °C, ekspresija je potaknuta dodatkom IPTG-a do konačne množinske koncentracije 0,8 mM, uz vrtnju od 250 okretaja po minuti te je prekinuta nakon tri sata. Pri 16 °C, ekspresija je potaknuta dodatkom IPTG-a do konačne množinske koncentracije 0,1 mM, uz vrtnju od 250 okretaja po minuti te je ostavljena preko noći. Bakterijske stanice sakupljene su jednominutnim centrifugiranjem pri 13 000 okretaja i 4 °C, a talozi su pospremljeni pri −20 °C.

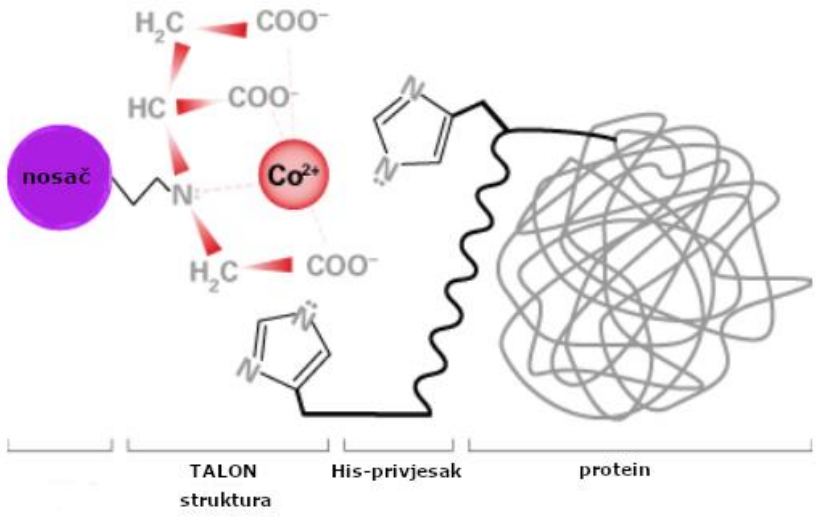
1.3.2.16. Sonikacija

Sonikacija je pouzdana i efikasna metoda kojom se pomoću ultrazvuka razbijaju stanice u suspenziji. Postupak se provodi u ledenoj kupelji kako ne bi došlo do oštećenja proteina, a razaranje se provodi izmjeničnim ponavljanjem ultrazvučnih pulseva. Lizat bakterijskih stanica pripravlja se resuspendiranjem bakterijske mase u puferu za lizu (sastav naveden u poglavlju 3.1.3.) i inkubira 10 minuta na ledu (dolazi do razaranja stanične stijenke). Nakon inkubacije na ledu bakterije se razbijaju ultrazvukom u 5 ciklusa s ponavljanjima (ciklus se sastoji od 30 sekundi titraja nakon čega slijedi 30 sekundi pauze). Zatim se bakterijski supstrat centrifugira 30 minuta pri maksimalnoj brzini i 4 °C, kako bi se netopljivi dijelovi stanica odvojili u obliku taloga od topljivih staničnih proteina koji ostaju u supernatantu. Na kraju se supernatant s topljivim staničnim proteinima još jednom centrifugira pri istim uvjetima.

1.3.2.17. Afinitetna kromatografija

Pročišćavanje proteina se zasniva na različitim fizikalno-kemijskim svojstvima proteina poput njegove veličine, topljivosti, polarnosti, naboja i vezanja za specifične ligande. Jedan od najboljih načina izolacije i pročišćavanja rekombinantnih proteina s afinitetnim privjeskom je afinitetna kromatografija. Afinitetni privjesak je egzogeni slijed aminokiselina koji se specifično veže na određeni ligand, poželjno je da se eksprimira na jednom od krajeva proteina kako ne bi utjecao na smatanje i funkciju pročišćenog proteina. Često se između kodirajućeg slijeda za željeni protein i kodirajućeg slijeda za afinitetni privjesak ugrađuje slijed koji specifično prepoznaje određena proteaza, kako bi se po završetku pročišćavanja željeni protein mogao odvojiti od privjeska. Najčešće korišten afinitetni privjesak je slijed od 5 do 6 histidinskih ostataka koji omogućuje da se fuzijski protein (s His-privjeskom) može lako, u jednom koraku, pročistiti afinitetnom kromatografijom na nosaču s imobiliziranim metalom (IMAC). IMAC tehnika zasniva se na koordinaciji između imobiliziranog metalnog iona i elektron donorske skupine s površine proteina. Uglavnom se za vezanje koriste ioni bakra, nikla, ali i cinka, aluminija i kobalta. U ovom je radu korišten sustav TALON (Co-NTA) koji daje visoku čistoću pročišćenog rekombinantnog proteina s His-privjeskom. IMAC se temelji na vezanju histidinskih ostataka na kobaltov ion imobiliziran na NTA-agarozi kao nosaču. NTA (nitrilo-trioctena kiselina) zauzima 4 – 6 koordinacijskih veznih mjesta kobalta dok se na preostala dva vežu ostaci fuzijskog proteina (slika 13, str. 35). Co-NTA bolji je izbor od Ni-NTA za proteine s His-privjeskom, jer se kobaltni ioni bolje vežu s His-privjeskom što

omogućuje veću čistoću željenog proteina. Također korištenjem Co-NTA smanjuje se onečišćenje frakcijskih otopina koje sadrže ciljani protein, jer se ioni kobalta čvrsto vežu za agarozu u koloni, dok su kolone s niklom manje homogene, jer ioni nikla tvore dva koordinacijska kompleksa zbog čega nisu čvrsto vezani za agarozu pa mogu onečistiti frakcije. Onečšćenje frakcija ionima metala je loše, jer se smanjuje broj aktivnih mjesta za koja se može vezati protein čime se smanjuje prinos pročišćenog proteina, također imaju utjecaja na aktivnost samog proteina. Pročišćeni protein povezan s His-privjeskom eluira se imidazolom, zbog kompeticije za ione kobalta između imidazola iz pufera i imidazolnog prstena His- ostataka na proteinu.



Slika 13. Shematski prikaz afinitetne kromatografije. Na shemi je vidljivo kako nitrilo-trioctena kiselina zauzima koordinacijska mjesta kobalta ostavljajući praznim dva mjesta na koja se veže His-privjesak proteina.[68]

Ovom metodom lako je i u jednom koraku pročistiti His-privjeskom obogaćeni protein. Kolona za pročišćavanje napuni se s Co-NTA agarozom i aktivira s 5 mL pufera za lizu (10 mM imidazola). Na kolonu se potom nanosi supernatant. Slijede ispiranja s 10 mL pufera u kojima su rastuće koncentracije imidazola (prvo ispiranje – 10 mM imidazol, drugo ispiranje – 20 mM imidazol, treće ispiranje – 40 mM imidazol). Vezani proteini ispiru se s kolone pomoću pufera za ispiranje specifično vezanih proteina (200 mM imidazol). Sastavi pufera korištenih za pročišćavanje proteina IMAC metodom navedeni su u poglavlju 1.3.1.3.

1.3.2.18. Elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu

Poliakrilamidni gelovi priređuju se polimerizacijom akrilamida s *N*,*N*-metilenbisakrilamidom, a da bi došlo do polimerizacije gela najčešće se koristi APS kao induktor i TEMED kao

katalizator. Molekulska masa većine proteina može se odrediti mjerenjem pokretljivosti u poliakrilamidnom gelu koji sadrži detergent natrijev dodecilsulfat (SDS). Pri neutralnoj pH-vrijednosti uz 10 g dm^{-3} SDS i 0,01 mol dm^{-3} 2-merkaptoetanola većina višejediničnih proteina disocira, 2-merkaptoetanol reducira disulfidne mostove, sekundarna struktura se gubi, te kompleksi koji se sastoje od polipeptidnog lanca i molekula SDS-a zauzimaju konformaciju nasumičnog klupka. Proteini obrađeni na ovaj način ponašaju se kao da svi imaju isti oblik i jednak omjer naboja i mase. To je zbog toga što je količina SDS-a vezana po jedinici mase proteina konstantna. Naboj kompleksa protein-SDS određen je isključivo nabojem SDS-a koji prekriva naboj bočnih lanaca proteina. Poliakrilamidni gel za razdvajanje proteina sastoji se od dva dijela, a to su 12 %-tni gel za razdvajanje (sastav i način pripreme navedeni u tablici 6) i 5 %-tni gel za sabijanje (sastav i način pripreme također navedeni u tablici 6). Nakon pripreme gela za razdvajanje potrebno ga je ostaviti jedan sat da polimerizira. Na njega se nanese tanki sloj izopropanola koji se nakon polimerizacije uklanja i gornja se površina gela ispire s deH_2O te se odstrani višak tekućine filter-papirom. Zatim se pripremi 5 %-tni gel za sabijanje, umetne se češalj za formiranje jažica i sve ostavi da polimerizira. Za to vrijeme proteinski uzorci se pripreme za nanošenje. Supernatantu se nakon centrifugiranja doda pufer za nanošenje uzoraka na poliakrilamidni gel (4x) čiji je sastav naveden u poglavlju 1.3.1.6., a talozi se resuspendiraju u tom istom razrijeđenom puferu (1x). Uzorci se prije nanošenja zagrijavaju tri do četiri minute pri 95 °C kako bi se proteini denaturirali. Gel treba smjestiti u aparaturu za elektroforezu (korišten uređaj *Mini-Protean* II (Biorad)) i nanijeti uzorke, a u jednu od jažica nanijeti biljeg (korišten je proteinski biljeg naveden u poglavlju 1.3.1.6.).

Tablica 6. Recept za izradu gela za razdvajanje i gela za sabijanje.

Gel za razdvajanje (12 %)		**Gel za sabijanje (5 %)**	
Sastojak	**Volumen**	**Sastojak**	**Volumen**
mqH_2O	1,50 mL	mqH_2O	1,03 mL
1,5 M Tris, pH = 8,8	0,88 mL	0,5 M Tris, pH = 6,8	0,42 mL
SDS (10 %)	33,33 µL	SDS (10 %)	16,70 µL
Akrilamid/bisakrilamid (T = 40 %)	1 mL	Akrilamid/bisakrilamid (T = 40 %)	0,20 mL
APS (10 %)	16,70 µL	APS (10 %)	8,33 µL
TEMED	3,33 µL	TEMED	1,67 µL

Sastav pufera za nanošenje uzoraka i pufera za elektroforezu na SDS-poliakrilamidnom gelu navedeni su u poglavlju 1.3.1.6. SDS-gel elektroforezom analizirani su uzorci nakon velike i

male indukcije. Odabrane frakcije velike indukcije, su nakon provedene elektroforeze na poliakrilamidnom gelu, spojene, ukoncentrirane i izmijenjen im je pufer pomoću *Amicon Ultra-0,5 Centrifugal Filter Devices* (Milipore). Na kolonu, koja propušta sve proteine manje od 30 kDa, naneseno je ukupno 15 mL frakcija i centrifugirano po 500 μL uzorka pet minuta pri 4 °C i maksimalnoj brzini. Nakon čega se u novu, čistu i sterilnu tubicu, kolona ispere puferom za proteine (naveden sastav u poglavlju 1.3.1.3.) pa se okrene i centrifugira minutu na 9000 g kako bi se preostali protein od interesa sakupio.

1.3.2.19. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Kolorimetrijska metoda određivanja proteina u kojoj se boja *Coomassie brilliant blue* G-250 veže na proteine pri kiseloj pH-vrijednosti. Molekule boje vežu se na proteine hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama što stabilizira njihov anionski oblik i dovodi do promjene boje iz smeđe u plavu. Pri tome se apsorpcijski maksimum pomiče sa 465 nm na 595 nm što se prati spektrofotometrijski. Zbog svoje jednostavnosti, metoda se često koristi, ali i zbog visoke osjetljivosti na većinu proteina i brzine dobivanja rezultata. Da bi došlo do reakcije pomiješano je 20 μL i 5 μL pročišćenog proteina i po 20 μL otopina BSA (*Bovine Serum Albumin Standard Set*) masenih koncentracija 0 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL i 1,5 mg/mL s 1 mL Bradfordove otopine te je mjerenjem apsorpcije (OD_{595}) pripravljenih otopina određena masena koncentracija proteina Myc. Sve je rađeno prema protokolu *Quick Start Bradford Protein Assay Instruction Manual* (BIO RAD).

Sastav Bradfordove otopine je:

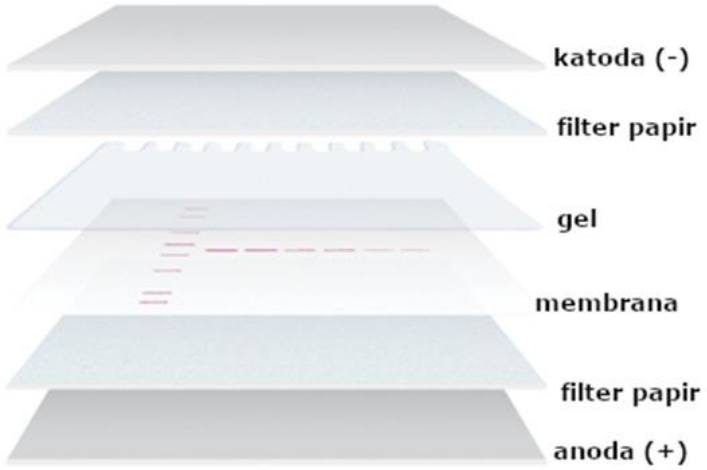
2,375 % etanol 4,4 % H_3PO_4 0,07 % *Coomassie Brilliant Blue*

1.3.2.20. Bojanje proteina u gelovima

Bojanje je postupak koji se koristi kako bi se mogle detektirati proteinske pruge u gelu. *Coomassie brilliant blue* R-250 i G-250 dvije su najčešće boje koje se u kiselim uvjetima vežu za amino skupine proteina (najprije arginin, lizin i histidin) elektrostatskim silama. Boja *Coomassie briliant blue* R-250 se otopi u smjesi metanola, deH_2O i octene kiseline u volumenom omjeru 5 : 4 : 1 do masene koncentracije 0,1 %. Gel se prelije bojom i bôja se oko pola sata uz polagano miješanje. Potom slijedi odbojavanje u puferu sastava: metanol, deH_2O i octena kiselina u volumenom omjeru 5 : 8 : 1. Odbojavanje je završeno kada je pozadina gela gotovo prozirna, a intenzivno su obojene samo proteinske pruge.

1.3.2.21. Western analiza proteina

Ova tehnika je važna u molekularnoj genetici, jer pomoću ove tehnike moguće je identificirati specifične proteine iz kompleksa proteina izoliranih iz stanice. Tehnika se sastoji od tri koraka. Prvi korak je odvajanje proteina prema veličini elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (1.3.2.18). Drugi korak je prijenos s gela na membranu koji se provodi u uređaju *Mini Trans-Blot* (BIO RAD), a struktura za elektrotransfer slaže se prema slici 14. Sastav pufera za prijenos naveden u poglavlju 1.3.1.3. Prijenos se provodi sat vremena pri naponu od 100 V uz hlađenje.



Slika 14. Prikaz slaganja strukture za elektrotransfer koja omogućuje prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na membranu kako bi se ona mogla izložiti rendgenskom zračenju.[69]

Treći korak je obilježavanje i vizualizacija traženog proteina koristeći se primarnim i sekundarnim antitijelima. Najvažniji korak u *western* analizi je sprječavanje nespecifičnih vezanja protutijela i ostvarivanje specifičnog vezanja antigen-protutijelo. Položaj proteina na membrani određuje se uz pomoć obilježenih sekundarnih antitijela. Kao biljezi mogu se koristiti radioaktivni spojevi, fluorokromi ili enzimi. Blokiranje nespecifičnog vezanja postiže se izlaganjem membrane razrijeđenoj otopini proteina. Za to se koriste BSA (*Bovine serum albumin*) ili nemasno mlijeko uz dodatak male količine detergenta. Blokiranje nespecifičnog vezanja započinje inkubacijom membrane 60 minuta pri sobnoj temperaturi u puferu za blokiranje (TBST i 5 % BSA). Proteini iz otopine vežu se na membranu na svim mjestima gdje se nisu vezali proteini preneseni s membrane. Zatim se membrana inkubira s primarnim antitijelima (Anti-His) u TBST puferu preko noći pri 4 °C i nakon toga se nevezana antitijela ispiru s TBST puferom. Slijedi inkubacija sa sekundarnim antitijelima u TBST puferu sat

vremena pri sobnoj temperaturi te ponovno ispiranje membrane u TBST puferu. Na taj način antitijela se ne mogu vezati nespecifično. Membrana se inkubira u otopini luminola i pojačivača u volumnom omjeru 1 : 1, kako bi se na rendgenskom filmu moglo razviti sliku. Nakon izlaganja trebala bi biti vidljiva samo jedna linija, a to je ona koja odgovara ciljanom proteinu.

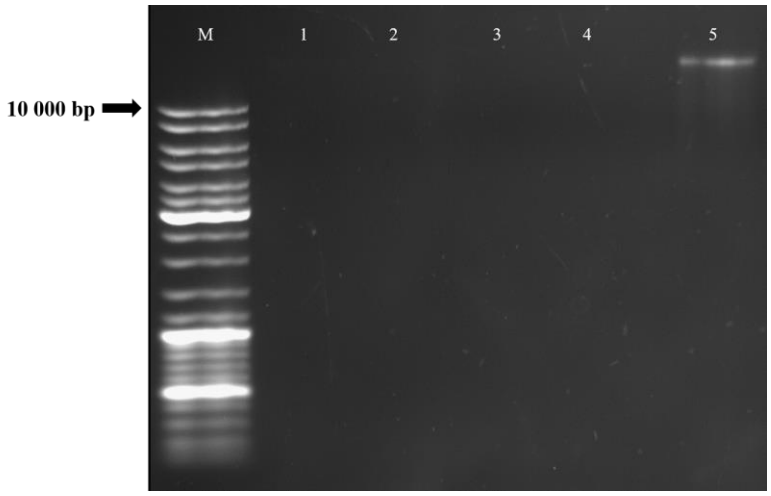
1.3.2.22. Bioinformatička obrada

Brojne računalne metode u biologiji pomažu pri donošenju zaključaka u raznim područjima istraživanja od podrijetla organizma do funkcije proteina zbog čega su od iznimne važnosti. BLAST (***B**asic **L**ocal **A**lignement **S**earch **T**ool*) je program koji se temelji na algoritmu koji omogućuje različite usporedbe aminokiselinskih sekvenci proteina ili nukleotidnih sekvenci sa sekvencama koje su pohranjene u bazi podataka te identifikacija sekvenci koja sliči traženoj sekvenci. Program je dostupan na internetu (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), a korišten je za prikupljanje Myc proteinskih sekvenci kod različitih organizama i za određivanje položaja introna. Za usporedbu Myc proteinske sekvence iz vrste *Eunapius subterraneus* sa sekvencama proteina Myc kod drugih vrsta korišten je program *Clustal X*. *Clustal X* koristi se u bioinfomatici za "poravnavanje" nukleotidnih i proteinskih sekvenci te za izradu filogenetskih stabala.[70] Sekvence poravnate u *Clustal X* programu obrađene su u programu GeneDoc.[71] Pomoću ovog programa utvrđena je i sličnost, odnosno broj identičnih baza u proučavanim sekvencama. Također, u radu je korišten i server Švicarskog instituta za bioinformatiku (SIB) ExPASy (***Ex**pert **P**rotein **A**nalysis **Sy**stem*).[72] Server je specijaliziran za analizu proteinskih sekvenci i struktura, a dostupan je na internetu (https://www.expasy.org/). U ovom radu korišten je za prevođenje nukleotidnih sekvenci u proteinske i analizu proteina. Evolucijski odnosi unutar napravljenog stabla izvedeni su uz pomoć *neighbor-joining* metode.[73] Duljine grana na filogenetskom stablu odgovaraju izvedenim evolucijskim distancama koje su određene uz pomoć *p-distance* metode.[74] Analizom je obuhvaćeno 16 proteinskih sekvenci, a evolucijska analiza provedena je u program MEGA6.[75]

1.4. REZULTATI

1.4.1. Izolacija genomske DNA molekule

Uspješno je izolirana visokomolekularna genomska DNA iz kulture stanica spužve *Eunapius subterraneus*, pomoću paketa *Blood & Cell Culture DNA Kit* (QIAGEN) kako je opisano u poglavlju 1.3.2.1. Dobivena DNA otopljena je u 50 µL vode bez nukleaza. Koncentracija DNA je 29,02 ng/ µL, omjer apsorbancije pri valnim duljinama 260 nm i 280 nm je 1,94, a pri valnim duljinama od 230 nm i 260 nm je 2,06. Vrijednosti su izmjerene na uređaju *Nanophotometer* N60 (Implen). Nakon postupka izolacije napravljen je 0,7 % agarozni gel na koji su naneseni: uzorak izolirane genomske DNA, alikvoti uzimani tijekom postupka izolacije i DNA-biljeg što je vidljivo na slici 15.

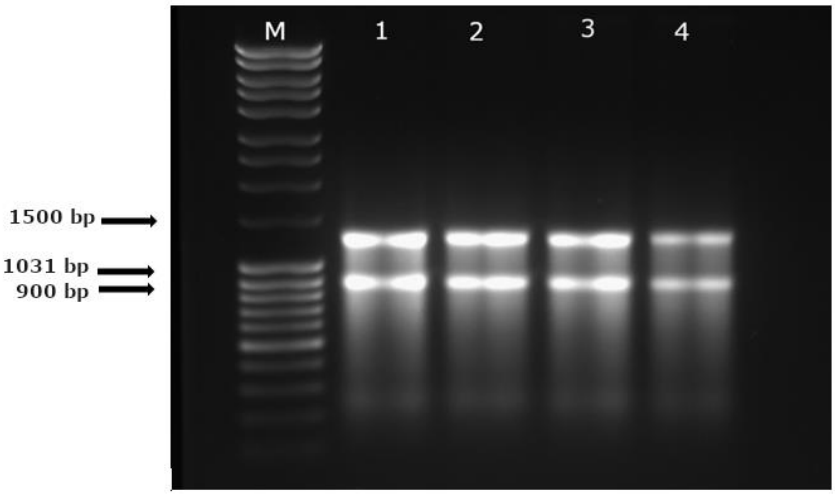


Slika 15. Prikaz 0,7 %-tnog agaroznog gela na kojem su naneseni uzorci i MassRuler marker (M) prema kojem se određuje veličina izoliranih fragmenata. U jažicama 1 – 5 redom su: 1 – alikvot 1, uzet nakon što je u uzorak dodana proteinaza K i inkubiran dva sata pri 50 °C i centrifugiran, 2 – alikvot 2, uzet nakon prvog puštanja uzorka kroz kolonu, 3 – alikvot 3, uzet nakon što je kolona isprana QC puferom, 4 – alikvot 4, uzet nakon eluiranja s ugrijanim QF puferom, 5 – uzorak izolirane genomske DNA.

Sa slike 15 vidljivo je da u jažicama 1 – 4 nema nikakvog signala, u tim jažicama su alikvoti koji su uzimani tijekom postupka izolacije genomske DNA prema uputstvima proizvođača. Alikvoti su uzimani tijekom različitih dijelova postupka izolacije baš kao što je opisano u poglavlju 1.3.2.1. Alikvote treba uzimati kako bi se vidjelo ima li izgubljene genomske DNA, tj. je li dio DNA tijekom postupka izolacije u njima zaostao. Baš kao što se može vidjeti na slici 15 nema zaostataka, jer uzorak iz jažice 5 sadrži samo izoliranu genomska DNA te je njezina veličina veća od 10 000 bp.

1.4.2. Izolacija RNA

RNA je uspješno izolirana iz spužvinih stanica komercijalno dostupnim paketom *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN) postupkom opisanim u poglavlju 1.3.2.2. Spužvine stanice su podijeljene u dva uzorka iz kojih je izolirana RNA i otopljena u 50 μL NFW. Prema protokolu zadnji je korak ponovljen te su dobivena po dva eluata svakog uzorka. Na slici 16 je rezultat elektroforetskog pokusa na 1 %-tnom agaroznom gelu na koji su naneseni uzorci izolirane RNA i markera kako bi se provjerila veličina dobivenih fragmenata.



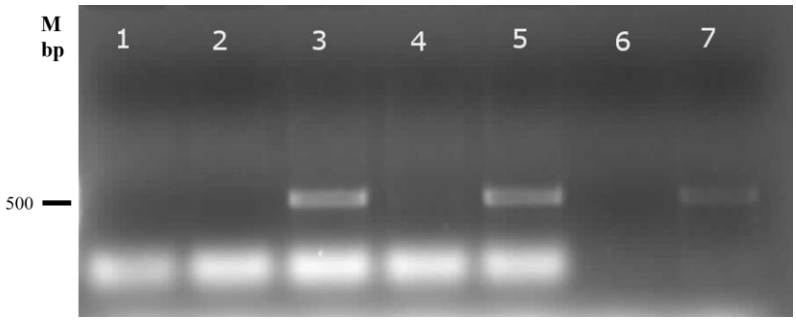
Slika 16. Rezultat elektroforetskog pokusa s uzorcima izolirane RNA i MassRuler markera (M) prema kojem je određivana veličina izoliranih fragmenata. Brojevima 1 – 4 označeni su uzorci RNA izolirane komercijalno dostupnim paketom *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN).

Koncentracija RNA iznosi 476 ng/μL, omjer apsorbancije pri valnim duljinama 260 nm i 280 nm je 2,36, a pri valnim duljinama od 230 nm i 260 nm je 1,65. Vrijednosti su izmjerene uređajem *Nanophotometer* N60 (Implen). Na slici 16 oznakama 1 – 4 označeni su uzorci izolirane RNA te je vidljivo da u njima nema genomske DNA. Koncentracija koja je izmjerena uređajem *Nanophotometer* N60 (Implen) pokazuje da je uzorak RNA kvalitetan za daljnje korištenje.

1.4.3. Sinteza cDNA

Komercijalno dostupnim paketom za sintezu *cDNA SuperScript IV VILO Master Mix* (Invitrogen) sintetizirana je cDNA, a kao kalup u reakciji korišten je uzorak RNA (poglavlje 1.4.2). Metoda sinteze opisana je u poglavlju 1.3.2.3., a nakon drugog koraka u protokolu

napravljena je PCR provjera sa citokrom oksidazom kako bi se vidjelo ima li zaostale genomske DNA u uzorku RNA koji je korišten za reakciju. Rezultati PCR postupka prikazani su na slici 17.

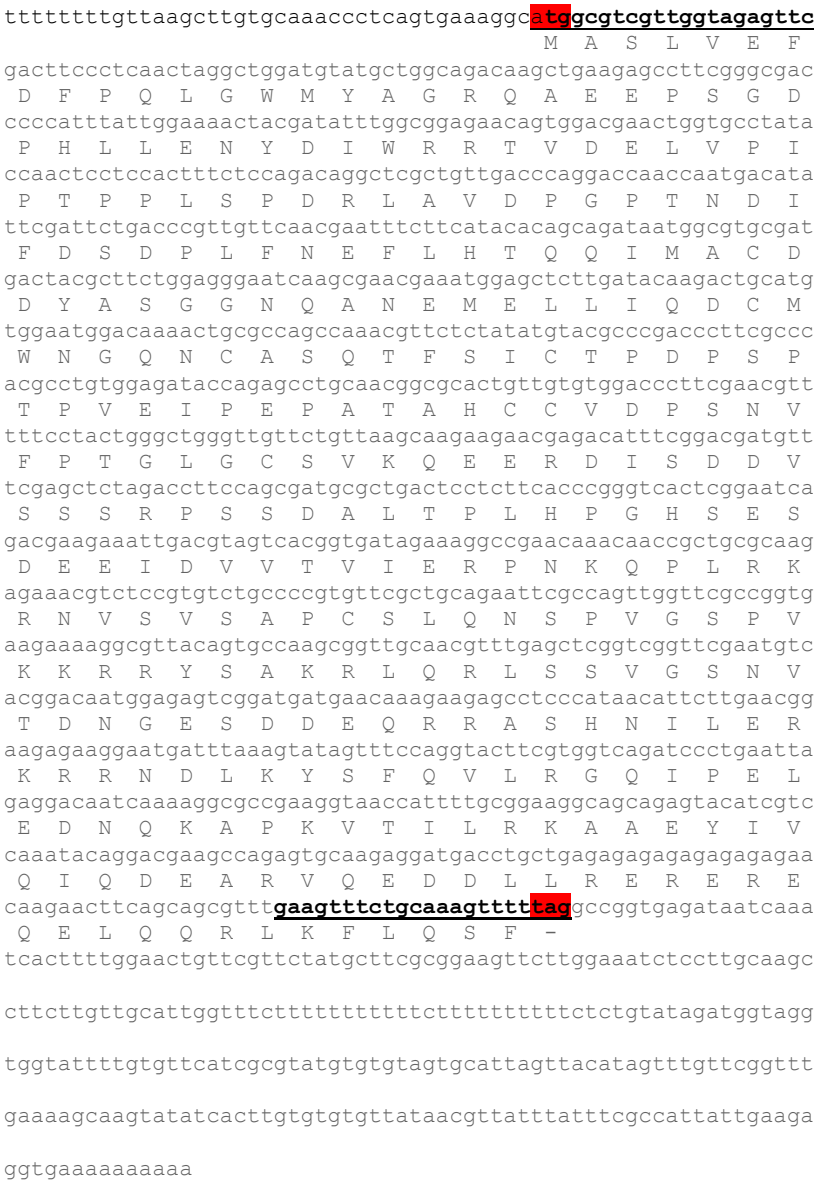


Slika 17. Umnoženi fragmenti PCR postupka i MassRuler DNA biljeg koji je korišten (M). Redom od 1 do 5 su uzorci RNA koja je testirana, 6 je negativna kontrola što znači da u tom uzorku nema kalupa, a uzorak 7 je pozitivna kontrola u kojem je kao kalup korištena cDNA.

U uzorcima 3 i 5 jasno je vidljiva amplifikacija genomske DNA, a u uzorku 4 također postoje naznake zbog čega su ti uzorci odbačeni te je reakcija sinteze cDNA nastavljena samo s uzorcima 1 i 2, prema uputama proizvođača. Korištene su pozitivna i negativna kontrola kojima je sastav naveden u tablici 1 poglavlja 1.3.2.3.

1.4.4. Dizajniranje početnica

Na temelju djelomično sekvenciranog transkriptoma spužve *Eunapius subterraneus* kao rezultat zajedničkog projekta bioinformatičke grupe prof. dr. sc. Kristiana Vlahovičeka (PMF Zagreb) i članova Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković dizajnirane su početnice korištene za umnožavanje i kloniranje gena *myc*. U svrhu ugradnje cDNA koja kodira za protein Myc dizajnirane su početnice na temelju dobivenog transkriptoma i modificirane tako da su napravljena restrikcijska mjesta kako bi ih mogli ugraditi u vektor pET28b. Dobivena nukleotidna sekvenca je u programu ExPASy prevedena u proteinsku. Protein Myc ima 340 aminokiselina, počinje aminokiselinom metionin čiji kodon je AUG, a završava stop kodonom koji je kodiran tripletom UAG. Na slici 18 (str. 43) je prikazana usporedno nukleotidna i proteinska sekvenca proteina s označenim start i stop kodonima te podvučenom regijom za dizajniranje početnica.



Slika 18. Usporedan prikaz nukleotidne i proteinske sekvence proteina Myc. Crveno obojano su označeni kodoni za početak i kraj proteina, a crno podcrtano su označeni dijelovi za dizajniranje početnica. Crveno podvučeni sljedovi su restrikcijska mjesta endonukleaza, a plavo obojani sljedovi su nasumično dodani nukleotidi prilikom dizajna.

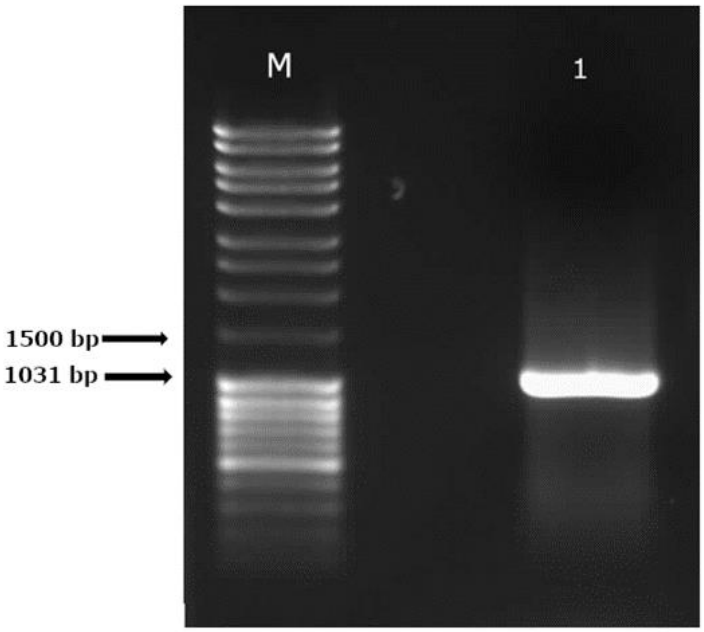
Dizajnirane i modificirane početnice s restrikcijskim mjestima za *Bam*HI i *Nde*I.

- *Nde*I: 5'-GTCTAGCATATGGCGTCGTTGGTAGAGTTC-3'
- *Bam*HI: 5'-GAAGTTTCTGCAAAGTTTTTAGGGATCCGTCTAG-3'

1.4.5. Ugradnja cDNA koja kodira za protein Myc u ekspresijski vektor pET28b

1.4.5.1. Umnažanje kodirajućih sljedova pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR), pročišćavanje PCR produkta

Kodirajući slijed nukleotida za protein Myc umnožen je PCR postupkom koristeći kao kalup cDNA koja je sintetizirana pomoću *SuperScript IV VILO Master Mix* (poglavlje 1.3.2.3.) i početnice opisane u poglavlju 1.3.1.4. (početnice osmišljene za PCR postupak). Cijeli PCR produkt nanesen je na agarozni gel (25 µL), kao marker za provjeru veličine dobivenog fragmenta agaroznom gel elektroforezom korišten je *MassRuler* DNA biljeg. Rezultati PCR postupka prikazani su na slici 19.

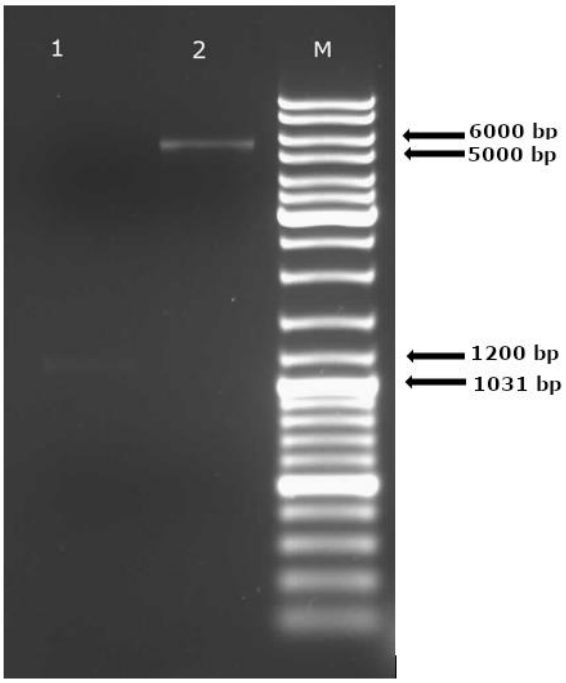


Slika 19. Prikaz *myc* fragmenta umnoženog PCR postupkom na 1 %-tnom agaroznom gelu (1), kao DNA biljeg korišten je *MassRuler* (M). Vidljivo je da pruga koja je na agaroznom gelu dobivena umnažanjem fragmenta PCR postupkom veličinom odgovara genu *myc* koji je velik 1031 bp.

Dobiveni fragment izrezan je i pročišćen iz agaroznog gela pomoću *QIAquick Gel Extraction Kit* (poglavlje 1.3.2.7.).

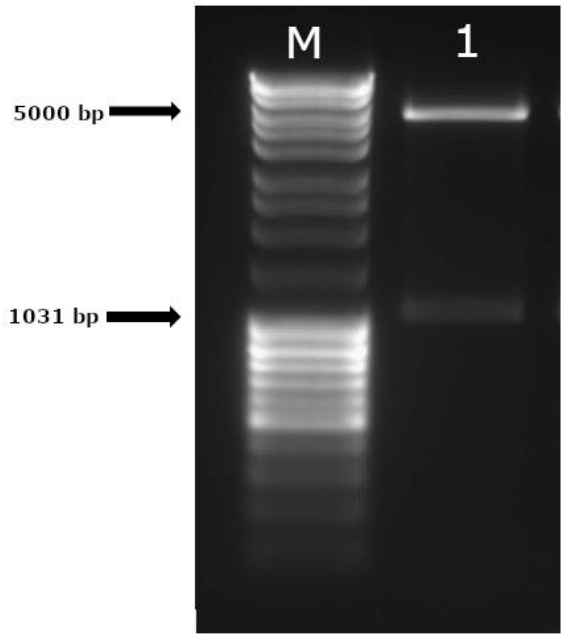
1.4.5.2. Razgradnja PCR produkta i pET28b vektora, ligacija i transformacija

Fragment *myc* pročišćen je i razgrađen restrikcijskim endonukleazama *Bam*HI i *Nde*I (opisano u poglavlju 1.3.2.9). Osim fragmenta, istim endonukleazama razgrađen je i vektor pET28b. Na slici 20 8str. 45) prikazana je razgradnja fragmenta.



Slika 20. Prikaz razgrađenog myc fragmenta (1) i vektora pET28b (2) na agaroznom gelu, kao DNA biljeg korišten je *GeneRuler* (M). U jažici 1 vidljiva je pruga pri veličini od 1031 bp što odgovara fragmentu *myc*, a u jažici 2 vidljiva je intenzivnija pruga pri veličinama između 5000 i 6000 bp, što bi odgovaralo veličini vektora pET28b (5369 bp).

Izmjerena je koncentracija fragmenta i *inserta* te je na temelju toga napravljena ligacijska smjesa, s elektroligazom i puferom za elektroligazu (poglavlje 1.3.2.11.), kako bi se cDNA koja kodira za protein Myc ugradila u ekspresijski vektor pET28b. Koncentracija fragmenta iznosi 43,88 ng/µL, a vektora 6,51 ng/µL. Volumeni otopina vektora i *inserta* stavljeni u ligacijsku smjesu određeni su prema izrazu opisanom u poglavlju 1.3.2.10. *OneShot* TOP 10 bakterijske stanice transformirane su ligacijskom smjesom te ostavljene preko noći pri 37 °C na hranjivoj podlozi s kanamicinom. Na hranjivoj podlozi narasle su samo one bakterijske kolonije koje su uspješno transformirane plazmidom pET28b_myc i koje su rezistentne na antibiotik. Kompletom *QIAprep Spin Miniprep* izoliran je plazmid iz jedne kolonije uzgojene u tekućoj LB podlozi s kanamicinom (poglavlje 1.3.2.12.). Radi provjere konstrukta plazmid je razgrađen restrikcijskim endonukleazama *Nde*I i *Bam*HI te je analiziran elektroforezom na agaroznom gelu. Na slici 21 (str. 46) prikazan je rezultat agarozne gel elektroforeze nakon razgradnje restrikcijskim endonukleazama.



Slika 21. Prikaz razgradnje rekombinantnog vektora pET28b_myc restrikcijskim endonukleazama *Bam*HI i *Nde*I (1) na agaroznom gelu, kao DNA biljeg korišten je *GeneRuler* (M). Na slici je vidljiva jedna intenzivnija pruga (gore) koja odgovara razgrađenom linearizirano vektoru pET28b (5369 bp) i jedna manje intenzivna pruga (dolje) koja odgovara veličini cDNA koja kodira za protein Myc (1031 bp).

S obzirom na to da su pri razgradnji rekombinantnog plazmida korištene restrikcijske endonukleaze *Nde*I i *Bam*HI zaključuje se da je insert uspješno ugrađen između restrikcijskih mjesta koje prepoznaju već spomenute restrikcijske endonukleaze u vektoru pET28b.

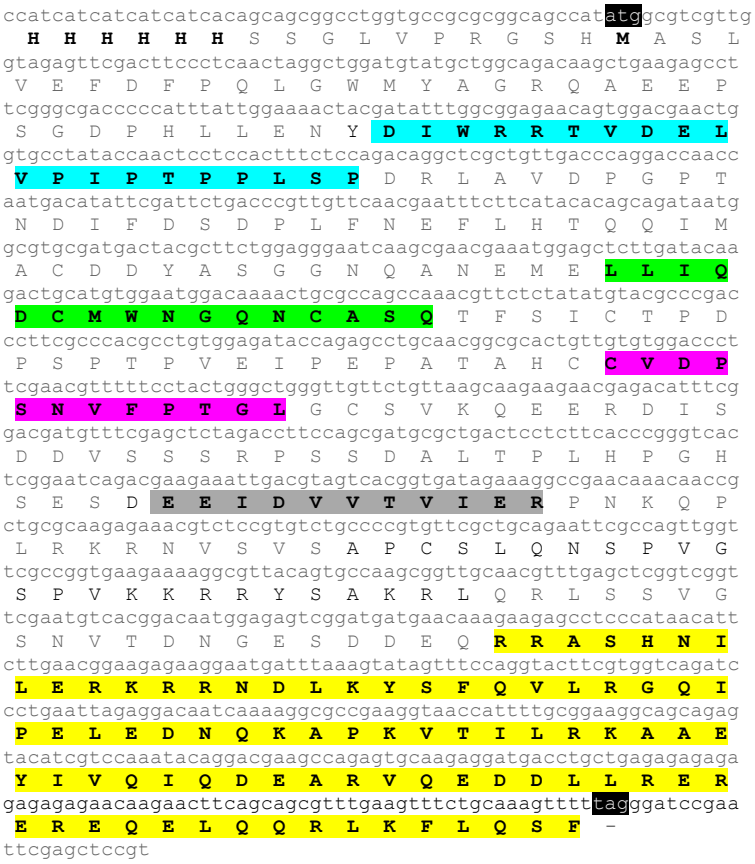
1.4.6. Sekvenciranje i analiza plazmida pET28b

Nakon uspješne ugradnje *inserta* u vektor pET28b konstrukt je ponovno sekvenciran i analiziran. Nukleotidna sekvenca je programom ExPASy prevedena u proteinsku. Protein Myc ima 340 aminokiselina, počinje aminokiselinom metionin čiji kodon je AUG, a završava stop kodonom koji je kodiran tripletom UAG. Pomoću algoritma BLAST, na temelju dobivene aminokiselinske sekvence utvrđene su regije očuvane u proteinu Myc, njihov položaj i primarna struktura što je prikazano na slici 22. Na N-kraju nalaze se evolucijski važne i sačuvane domene koje se nazivaju MB-box. Regije MB I, II, IIIa i IIIb važne su za staničnu transformaciju i transkripcijsku regulaciju. Regija MB IV ima neočekivanu ulogu u vezanju s DNA te je važna za ulazak stanica u G_2 fazu, a bHLH-Zip regija (*helix-loop-helix, leucine zipper*) važna je za dimerizaciju i spajanje s DNA. Kod proteina Myc iz spužve *Eunapius subterraneus* regija

MB I započinje aminokiselinom aspartat (D) koja se nalazi na 35. mjestu proteinske sekvence, a završava aminokiselinom prolin (P) na 54. mjestu.

Cjelokupna sekvenca glasi: Asp-Ile-Trp-Arg-Arg-Thr-Val-Asp-Glu-Leu-Val-Pro-Ile-Pro-Thr-Pro-Pro-Leu-Ser-Pro.

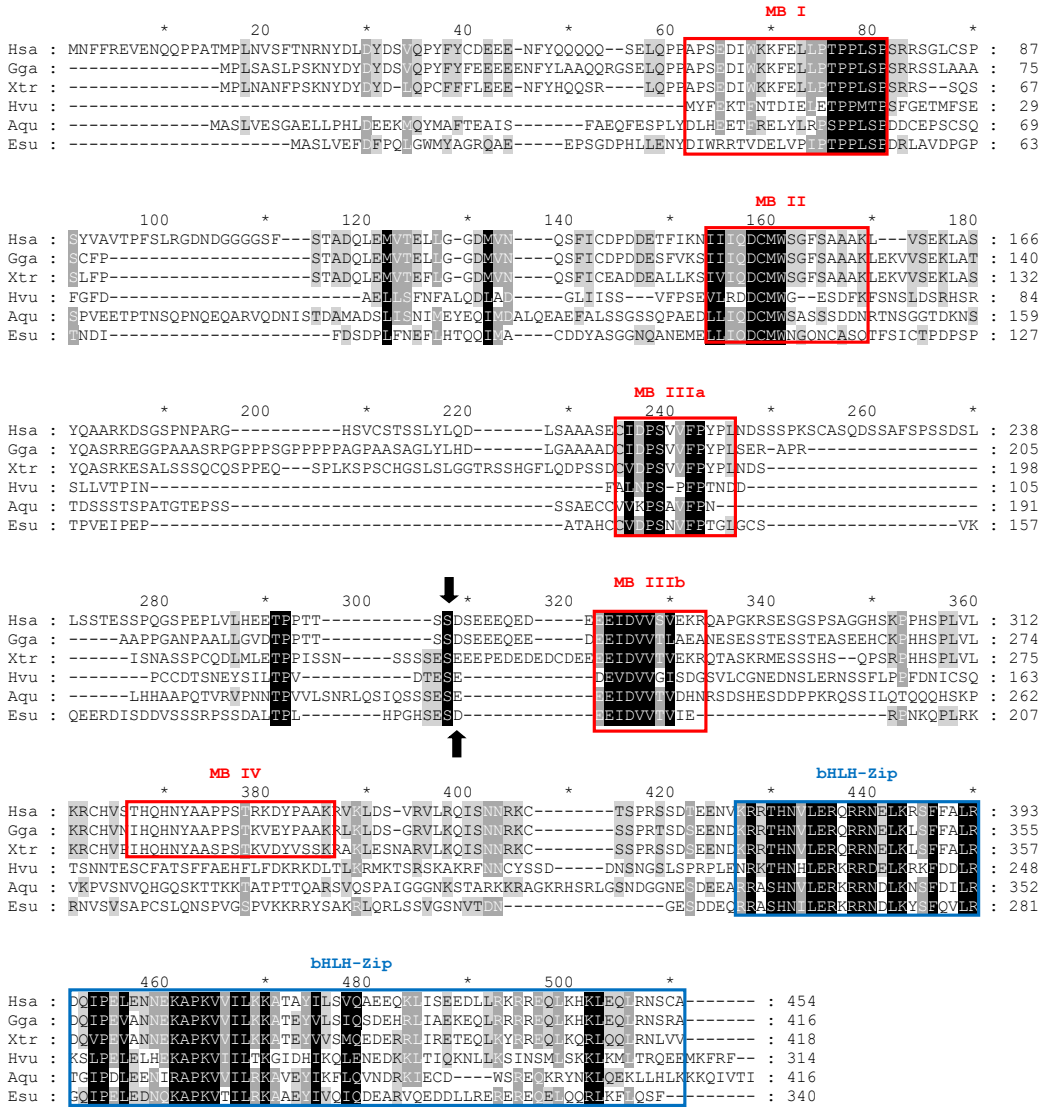
Regija MB II započinje aminokiselinom leucin (L) na 100. mjestu i završava s aminokiselinom glutamin (Q) na 116. mjestu. Cjelokupna sekvenca glasi: Leu-Leu-Ile-Gln-Asp-Cys-Met-Trp-Asn-Gly-Gln-Asn-Cys-Ala-Ser-Gln.



Slika 22. Usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence proteina Myc iz spužve *Eunapius subterraneus* s označenim karakterističnim regijama za protein. Na sekvenci su crno označeni stop i start kodon. Regije karakteristične za protein Myc su redom označene različitim bojama: MB I je označena plavo, MB II regija zeleno, MB IIIa regija purpuno, MB IIIb je sivo, a bHLH-Zip regija, koja se proteže sve do stop kodona, žuto.

MB IIIa regija započinje na 141. mjestu, aminokiselinom cistein (C) i završava na 152. mjestu s aminokiselinom leucin (L). Cjelokupna sekvenca MB IIIa regije glasi: Cys-Val-Asp-Pro-Ser-Asn-Val-Phe-Pro-Thr-Gly-Leu. Aminokiselinom glutamat (E) na 189. mjestu započinje regija MB IIIb i završava na 198. mjestu aminokiselinom glutamat (E). Cjelokupna sekvenca ove regije glasi: Glu-Glu-Ile-Asp-Val-Val-Thr-Val-Ile-Glu.

Regija MB IV kod spužvi nije očuvana, a regija bHLH-Zip započinje na 258. mjestu aminokiselinom arginin (R) te ide do 340. mjesta, tj. do kraja sekvence gdje je stop kodon. Na sekvenci (slika 22, str. 47) su označeni kodoni za početak i kraj proteina, te restrikcijska mjesta koja prepoznaju endonukleaze *Nde*I i *Bam*HI.



Slika 23. Usporedba primarne strukture proteina Myc iz vrste *Eunapius subterraneus* sa strukturom pet različitih organizama. Crno su označene aminokiseline sačuvane kod svih organizama, tamno sivo aminokiseline očuvane kod većine odabranih vrsta, a svijetlo sivo aminokiseline očuvane kod manjeg broja vrsti. Crveno uokvirene su očuvane regije MB I, II, IIIa, IIIb i IV, a plavo bHLH-Zip regija kod svih organizama. Crnim strelicama označeno je mjesto na koje se ubacuje intron karakterističan za sve organizme.

Sekvenca za protein Myc spužve *Eunapius subterraneus* i sekvence pet različitih organizama, koje su preuzete s interneta pomoću algoritma BLAST, poravnate su pomoću programa

Clustal X i obrađene programom *GeneDoc*. Organizmi su birani tako da obuhvate više razina u razvoju Metazoa. Odabrane su sljedeće vrste: *Homo sapiens* (Hsa), *Gallus gallus* (Gga), *Xenopus tropicalis* (Xtr), *Hydra vulgaris* (Hvu), *Amphimedon queenslandica* (Aqu). Na slici 23, str. 48, prikazane su uspoređene sekvence svih navedenih organizama i označene karakteristične regije proteina Myc.

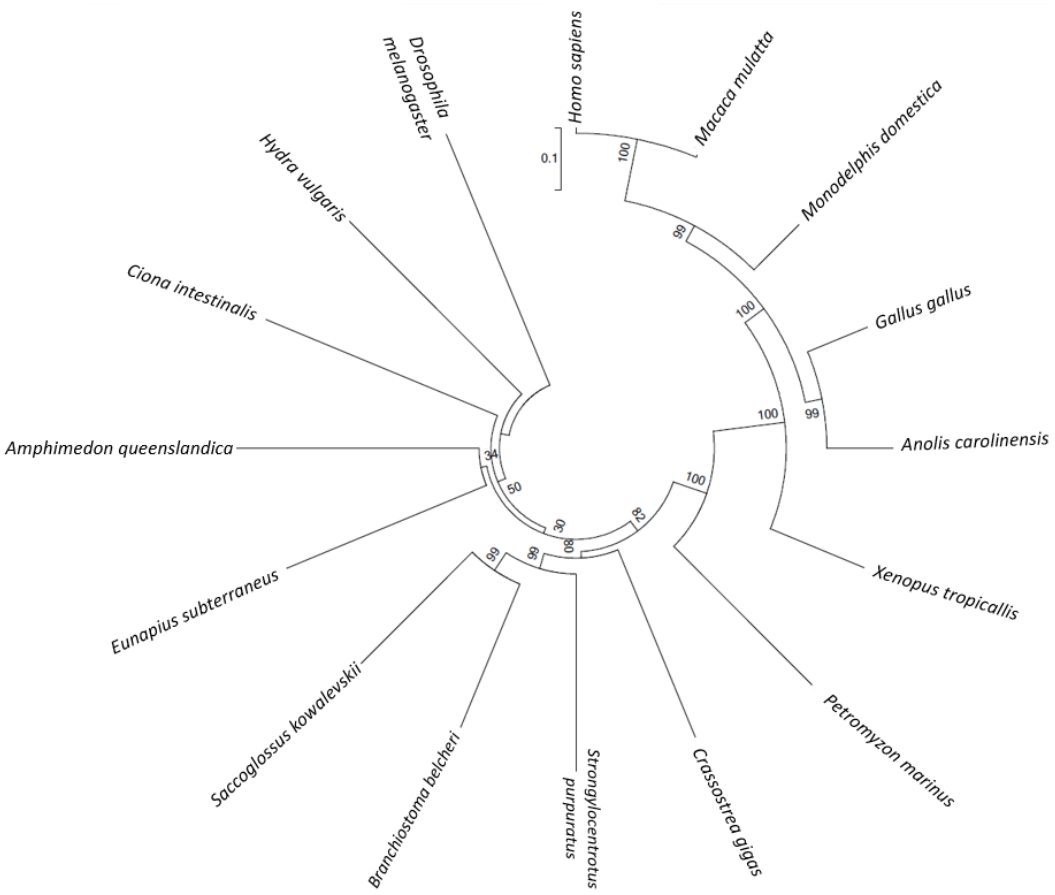
Kod usporedbe sekvenci sa slike 23 vidljivo je da su MB I, MB II, MB IIIa, MB IIIb i bHLH-Zip regije karakteristične za protein Myc očuvane kod svih organizama. Regija MB IV jedina nije očuvana što je vidljivo na slici jer u toj regiji nema sačuvanih aminokiselinskih slijedova. Smatra se da je MB IV regija proteina Myc nije sačuvana i da je specifična samo među kralježnjacima. Statističkom analizom u programu *GeneDoc* određena je sličnost sekvenci u postotcima što je prikazano tablicom 7.

Tablica 7. Udio identičnih (bez oznake) i sličnih (označene sivo) aminokiselinskih ostataka u proteinu Myc iz spužvice *Eunapius subterraneus* usporedbom s 10 različitih eukariotskih organizama. Plavo je označen udio sličnih aminokiselinskih ostataka kod vrste *Eunapius subterraneus* i ostalim navedenim organizmima.

	Esu	**Hsa**	**Gga**	**Xtr**	**Bbe**	**Spu**	**Dme**	**Cgi**	**Cte**	**Hvu**	**Aqu**
Esu		18 % 32 %	19 % 35 %	20 % 35 %	22 % 37 %	17 % 29 %	8 % 17 %	14 % 27 %	19 % 30 %	19 % 30 %	20 % 33 %
Hsa			60 % 72 %	55 % 64 %	32 % 47 %	19 % 29 %	10 % 19 %	14 % 28 %	17 % 26 %	14 % 23 %	19 % 32 %
Gga				64 % 76 %	35 % 49 %	20 % 32 %	9 % 19 %	16 % 29 %	20 % 30 %	13 % 24 %	17 % 31 %
Xtr					36 % 50 %	22 % 34 %	9 % 19 %	17 % 31 %	21 % 31 %	13 % 25 %	19 % 33 %
Bbe						22 % 35 %	9 % 17 %	19 % 32 %	21 % 30 %	17 % 27 %	20 % 33 %
Spu							9 % 18 %	21 % 33 %	24 % 36 %	12 % 24 %	16 % 31 %
Dme								8 % 19 %	7 % 14 %	8 % 15 %	8 % 18 %
Cgi									19 % 29 %	12 % 25 %	16 % 30 %
Cte										12 % 21 %	17 % 30 %
Hvu											14 % 29 %

Iz tablice 7 vidljivo je da udio identičnih aminokiselina najveći između spužve *Eunapius subterraneus* i *Branchiostoma belcheri*, jednog od živućih primjerka svitkoglavaca (Cephalohordata) i iznosi 22 %, zatim slijede vodozemac *Xenopus tropicallis* i još jedan predstavnik spužvi (Porifera), a to je *Amphimedon queenslandica* i iznosi 20 % aminokiselina.

Dok je najveći udio sličnih aminokiselina kod *Branchiostoma belcheri* 37 %, a kod *Xenopus tropicallis* i ptice *Gallus gallus* iznosi 35 %. Najmanja sličnost vidljiva je kod *Drosophila melanogaster*. Kod vinske mušice u usporedbi s ogulinskom špiljskom spužvicom udio identičnih aminokiselina iznosi 8 %, a sličnih 17 %.



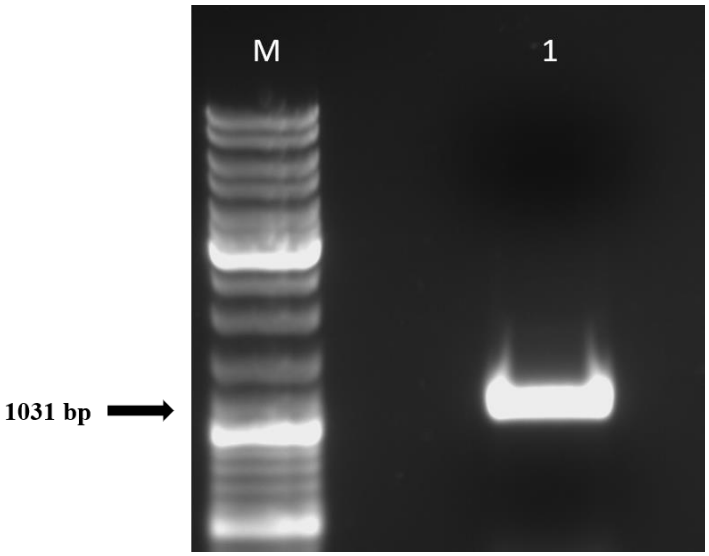
Slika 24. Prikaz filogenetskih odnosa proteina Myc između *E. subterraneus* i petnaest odabranih organizama.

U svrhu analize filogenetskih odnosa proteina Myc napravljeno je neukorjenjeno filogenetsko stablo (slika 24) uz pomoć programa *Clustal X* i MEGA6 (opisani u poglavlju 1.3.2.22.). Uspoređeni su homolozi proteina Myc iz različitih organizama od onih najjednostavnijih, nižih beskralježnjaka zatim nešto viših, svih pripadnika kralježnjaka i na kraju čovjeka: spužva *Amphimedon queenslandica* (XP_003390966.1), *Hydra magnipapillata* (NP_001267863.1), mekušac *Crassostrea gigas* (EKC31212.1), člankonožac *Drosophila melanogaster* (NP_525062.2), bodljikaš *Strongylocentrotus purpuratus* (NP_999744.1), žiroglavac *Saccoglossus kowalevskii* (NP_001158444.1), *Ciona intestinalis* (NP_001071767.1), *Branchiostoma belcheri* (BAD93381.1), paklara *Petromyzon marinus* (ABW76122.1),

vodozemac *Xenopus tropicallis* (NP_989390.1), gmaz *Anolis carolinensis* (XP_003219450.1), ptica *Gallus gallus* (NP_001026123.1) i tri predstavnika sisavaca: *Monodelphis domestica* (XP_001381378.2), *Macaca mulatta* (NP_001136345.1) i *Homo sapiens* (BAA01374.2). Na stablu je vidljivo da se protein Myc iz spužve *Eunapius subterraneus* grupira u zajedničku granu s homologom iz druge spužve *Amphimedon queenslandica*.

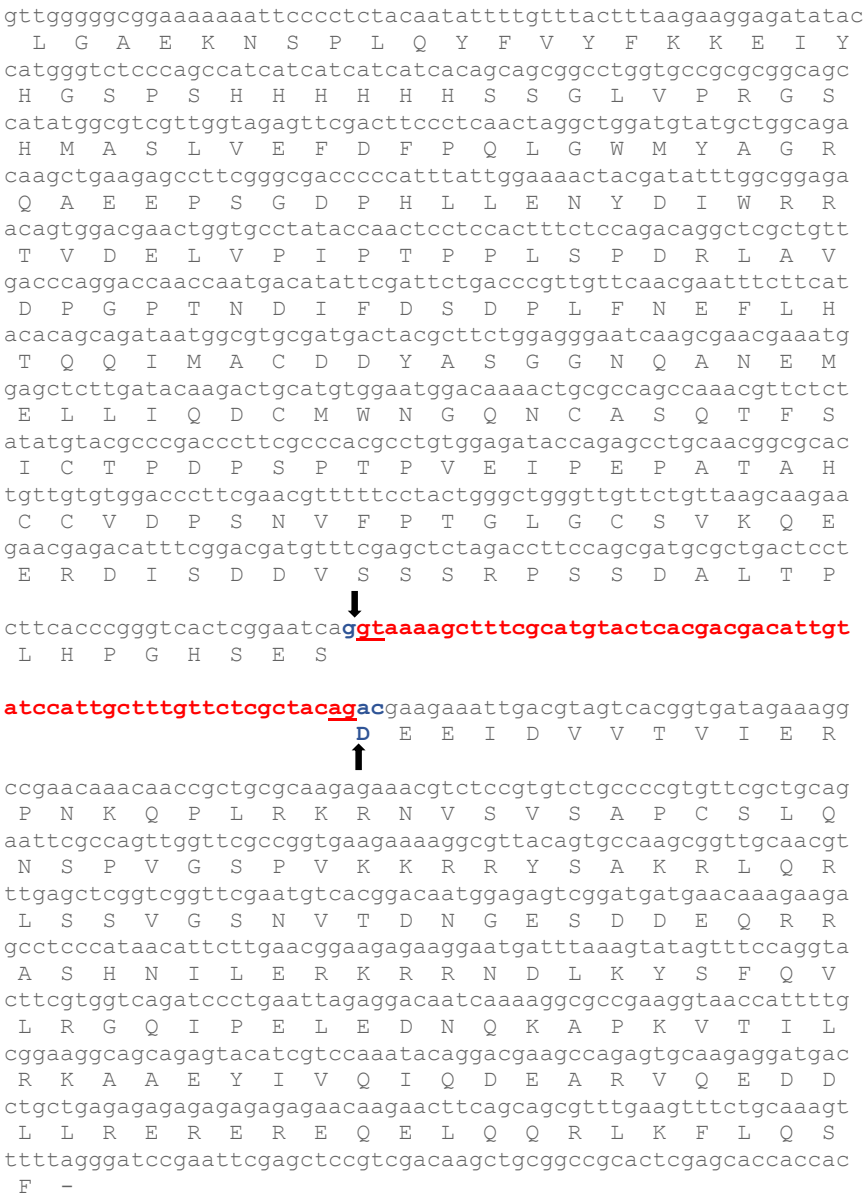
1.4.7. Umnažanje gena *myc* i analiza introna

U svrhu analize introna u genu *myc* proveden je PCR postupak na genomskoj DNA s osmišljenim početnicama koje su navedene u poglavlju 1.3.1.4., svi uvjeti PCR postupka navedeni su u poglavlju 1.3.2.5. Slikom 25 prikazani su rezultati PCR postupka na genomskoj DNA nakon čega je fragment sekvenciran i analiziran.



Slika 25. Prikaz rezultata elektroforeze na 1 %-tnom agaroznom gelu na koji je nanesen produkt PCR postupka s genomskom DNA. Korišten je marker *MassRuler* (M), a brojem 1 označen je PCR postupkom dobiveni fragment *myc*.

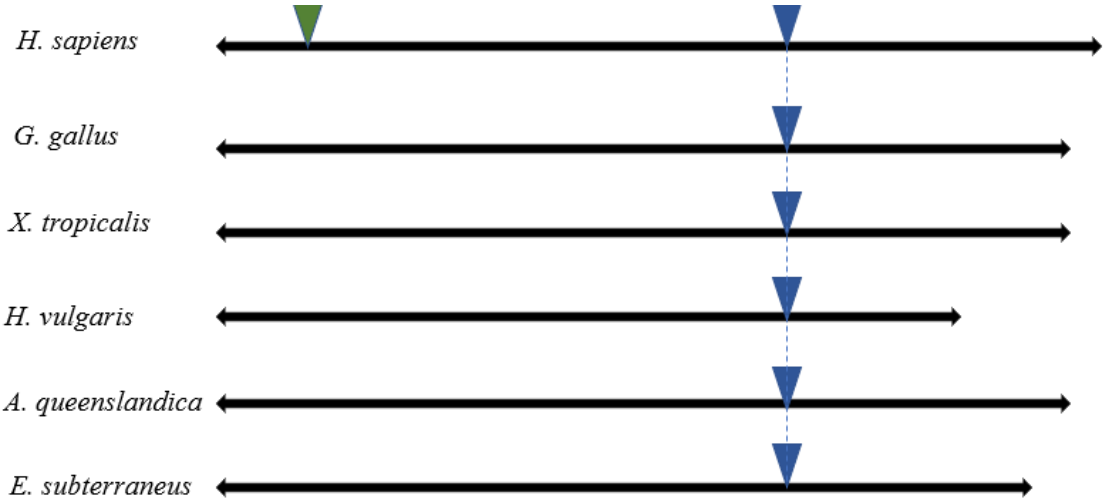
Eukariotski geni razlikuju se od prokariotskih između ostalog, postojanjem introna. Introni su dijelovi genomske DNA koji se ne translatiraju u protein. Otkriće ovih dijelova DNA dovelo je do karakterizacije njihovih uloga u organizmima i evoluciji. Introni nisu nasumično raspoređeni s obzirom na kodon, a pojavljuju se u tri faze koje se definiraju s obzirom na njihov položaj u odnosu na kodon. Introni faze 0 nalaze se između dva kodona, introni faze 1 nakon prve pozicije u kodonu, a faze 2 nakon druge pozicije.



Slika 26. Usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence proteina Myc iz spužve *Eunapius subterraneus* koja u sebi sadrži intron. Crveno je obojan nukleotidni slijed introna, a njegovi karakteristični početni i završni nukleotidi GT i AG su potcrtani. Početak i kraj introna dodatno je označen strelicama. Plavo obojan je triplet GAC koji kodira za aminokiselinu aspartat (Asp, D) koji nije dio introna. Vidljivo je da se intron nalazi u fazi +1 aminokiseline aspartat, koja je 188. aminokiselina u proteinskoj sekvenci proteina Myc. Crnim strelicama dodatno je označeno mjesto mjesto ubacivanja introna.

Sa slike 26 vidljivo je da je intron upao u triplet GAC, koja kodira za aminokiselinu aspartat (Asp, D), koja je na 188. mjestu u sekvenci, u fazu +1 i da je dugačak 60 nukleotida.

Uspoređeni su geni za protein Myc kod nekoliko organizama i označene su pozicije njihovih introna. Sve je prikazano shematskim prikazom na slici 27.



Slika 27. Usporedba pozicije i faze introna gena *myc*. Položaj introna označen je trokutima. Boja označava fazu. Zeleno – faza 0, a plavo – faza 1. Točkasta linija označava identičan položaj introna.

Određene su faze introna, odnosno njihov položaj u odnosu na kodon. U genu *myc* iz vrste *Eunapius subterraneus* prisutan je samo jedan intron koji se nalazi u fazi jedan. Osim *Eunapius subterraneus* i svi ostali uspoređeni organizmi: *Gallus gallus*, *Xenopus tropicalis*, *Hydra vulgaris*, *Amphimedon queenslandica* također imaju samo jedan intron koji se nalazi u fazi jedan i na istom mjestu kao i kod ogulinske špiljske spužvice. Kod *Homo sapiensa* gen *myc* ima dva introna od kojih se jedan nalazi u fazi nula, a drugi u fazi jedan i na istom mjestu kao i kod svih uspoređenih organizama. Na temelju usporedbe pozicije i faze introna gena *myc* iz spužve s homolozima iz drugih analiziranih organizama možemo zaključiti da su pozicija i faza introna (plava strelica) sačuvane od čovjeka do spužve.

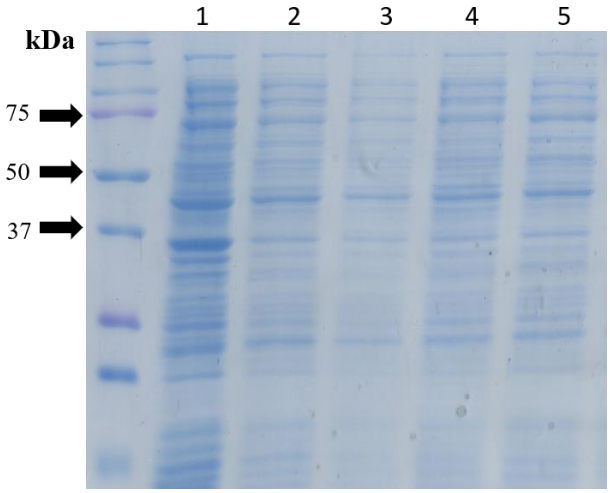
1.4.8. Ekspresija i pročišćavanje proteina, određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu i *western* analizom

Ligacijskom smjesom kemijski su transformirane BL21(DE3) stanice pogodne za ekspresiju željenog proteina (poglavlje 1.3.2.14.). Iz dvije kolonije narasle na podlozi s kanamicinom uzgojene su prekonoćne kulture. Iz prekonoćnih kultura napravljeni su glicerolski štokovi koji su pohranjeni na −80 °C. Zatim je inokuliran medij s pripadajućim antibiotikom (kanamicin) i prekonoćna zasićena kultura bakterija soja BL21(DE3) koje su transformirane rekombinantnim plazmidom. Rast bakterija praćen je na spektrofotometru dok optička gustoća, mjerena na 600

nm, nije dosegla vrijednost 0,6 – 0,8 (3 sata). Indukcija je započeta u dva različita uvjeta: u prvom uzorku započela je dodatkom IPTG-a do konačne koncentracije od 0,8 mM, pri temperaturi od 30 °C i prekinuta je za tri sata, a u drugom uzorku indukcija je započela dodavanjem IPTG-a konačne koncentracije 0,1 mM i ostavljena preko noći pri 16 °C. Suspenzije su centrifugirane, a dobiveni talozi lizirani sonikacijom. Nakon centrifugiranja lizati su analizirani elektroforezom na poliakrilamidnom gelu kako bismo provjerili je li došlo do ekspresije proteina Myc. Pomoću alata *ExPASyTranslateTool* određena je teorijska masa *in silico* proteina Myc s His-privjeskom i ona iznosi 40,15 kDa. Sekvenca dobivenog proteina prikazana je na slici 28.

HHHHHHSSGLVPRGSH**Met**ASLVEFDFPQLGW**Met**YAGRQAEEPSGDPHLLENYDIWRRTVDELVP
IPTPPLSPDRLAVDPGPTNDIFDSDPLFNEFLHTQQI**Met**ACDDYASGGNQANE**Met**ELLIQDC**Met**W
NGQNCASQTFSICTPDPSPTPVEIPEPATAHCCVDPSNVFPTGLGCSVKQEERDISDDVSSSRPS
SDALTPLHPGHSESDEEIDVVTVIERPNKQPLRKRNVSVSAPCSLQNSPVGSPVKKRRYSAKRLQ
RLSSVGSNVTDNGESDDEQRRASHNILERKRRNDLKYSFQVLRGQIPELEDNQKAPKVTILRKAA
EYIVQIQDEARVQEDDLLRERERERQELQQRLKFLQSF**Stop**GSEFELR

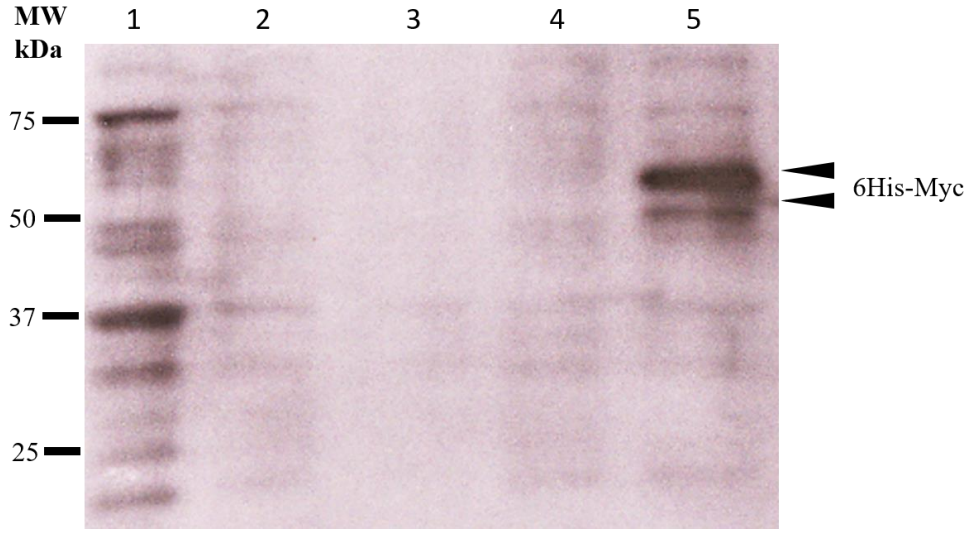
Slika 28. Sekvenca dobivenog proteina Myc s His-privjeskom veličine 40,15 kDa dobivena je pomoću *ExPASyTranslateTool*-a. Crveno je označen prikaz ORF-a.



Slika 29. Indukcija proteina Myc s uzorcima malog volumena. Na gel su naneseni uzorci jedne i druge kolonije pri različitim uvjetima indukcije, a naneseni proteinski biljeg naveden je u poglavlju 1.3.1.6. **1** – proteinski ekstrakt prije indukcije, **2** – proteinski ekstrakt poslije indukcije pri 16 °C (kolonija 1), **3** – proteinski ekstrakt poslije indukcije pri 30 °C (kolonija 1). **4** – proteinski ekstrakt poslije indukcije pri 16 °C (kolonija 2), **5** – proteinski ekstrakt poslije indukcije pri 30 °C (kolonija 2).

Na poliakrilamidnom gelu (slika 29) ne vidi se jasna pruga koja bi odgovarala proteinu Myc veličine od oko 40 kDa. Da bi se utvrdilo odgovara li ijedna od dobivenih pruga na poliakrilamidnom gelu proteinu Myc, provedena je *western* analiza. Na gel za *western* analizu,

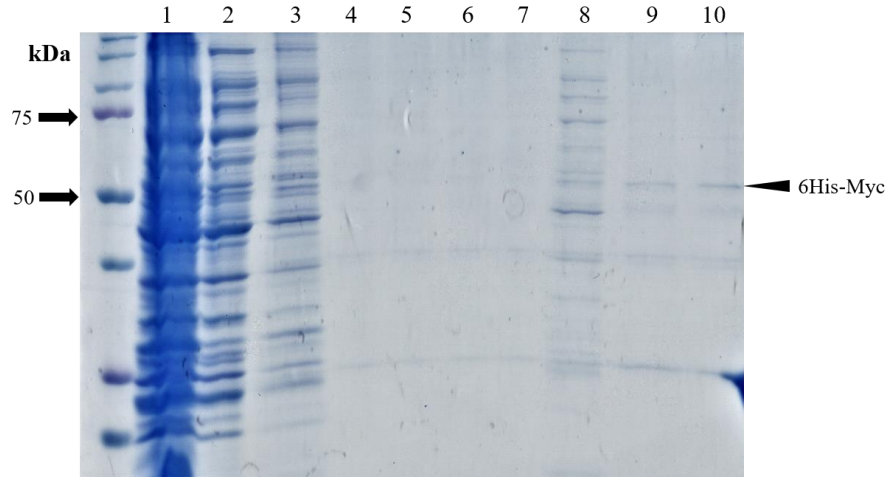
stavljeni su jednaki uzorci, jednakim redoslijedom kao i na poliakrilamidni gel (slika 29). Nakon elektroforeze proteini iz gela preneseni su na membranu, a rekombinantni protein Myc dokazan je pomoću anti-His protutijela. Rezultati analize prikazani su na slici 30.



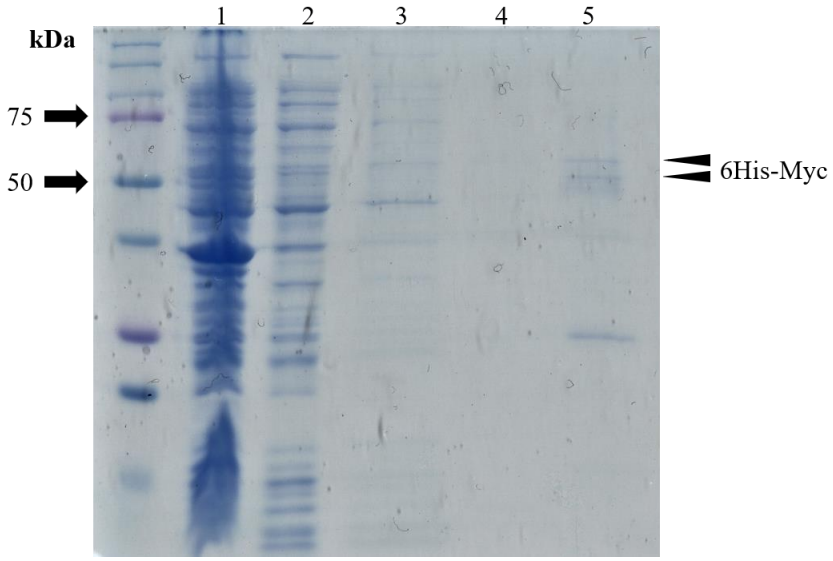
Slika 30. *Western* analiza proteina Myc. Na rendgenskom filmu izloženom membrani na 15 sekundi jednak je redoslijed uzoraka kao i na gelu sa slike 29. Korišten je proteinski biljeg naveden u poglavlju 1.3.1.6. **1** – proteinski ekstrakt prije indukcije, **2** – proteinski ekstrakt poslije indukcije pri 16 °C (kolonija 1), **3** – proteinski ekstrakt poslije indukcije pri 30 °C (kolonija 1). **4** – proteinski ekstrakt poslije indukcije pri 16 °C (kolonija 2), **5** – proteinski ekstrakt poslije indukcije pri 30 °C (kolonija 2). Strelicama su označene pruge dobivene *western* analizom koje odgovaraju proteinu Myc.

Na slici 30 u uzorku 5 u uvjetima indukcije (30 °C, konačna koncentracija IPTG-a 0,8 mM) vidljiv je signal proteina Myc. Signal je pri veličini nešto većoj od očekivane (malo više od 50 kDa). Ispod ove pruge uočava se još jedna pruga slabijeg intenziteta jer vjerojatno dolazi do razgradnje proteina. Nakon što je utvrđeno da dolazi do ekspresije proteina Myc, napravljena je indukcija u većem volumenu (1,0 L) LB medija i istim uvjetima (30 °C, konačna koncentracija IPTG-a 0,8 mM) da bi se priredila što veća količina proteina. Supernatant u kojem su se nalazili stanični proteini je nakon centrifugiranja pročišćen na afinitetnoj koloni agaroze Co-NTA na kojoj se zadržavaju rekombinantni proteini koji imaju His-privjesak. Nakon pročišćavanja provedena je elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (slika 31, str. 56).

Na slici 31, str. 56, je vidljivo da frakcije nakon drugog i trećeg ispiranja kolone jedine sadrže pruge koje veličinom odgovaraju proteinu Myc pa su te dvije frakcije spojene, ukoncentrirane i pročišćene izmjenom pufera na *Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices* (BIO RAD) (metoda je opisana u poglavlju 1.3.2.18).

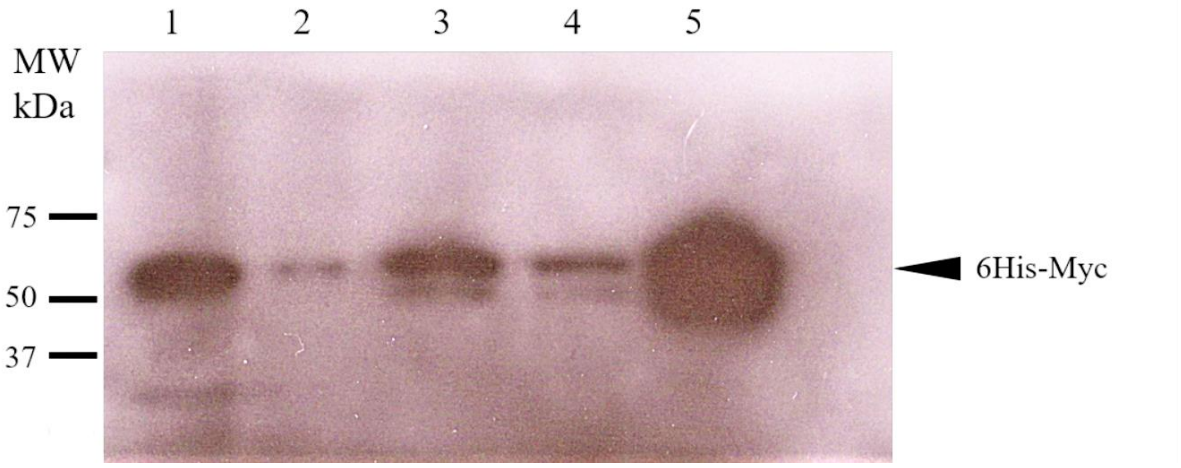


Slika 31. Rezultat elektroforeze na poliakrilamidnom gelu nakon pročišćavanja proteina Myc. Korišteni proteinski biljeg naveden je u poglavlju 1.3.1.6. **1** – proteinski ekstrakt prije pročišćavanja na koloni, **2** – proteinski ekstrakt koji se nije vezao na kolonu, **3**, **4**, **5**, **6** i **7** – specifično vezani proteini koji su potom eluirani s kolone, **8** – proteini nakon prvog ispiranja kolone, **9** – proteini nakon drugog ispiranja kolone, **10** – proteini nakon trećeg ispiranja kolone. Na uzorcima **9** i **10** vidljive su pruge koje bi odgovarale proteinu Myc.



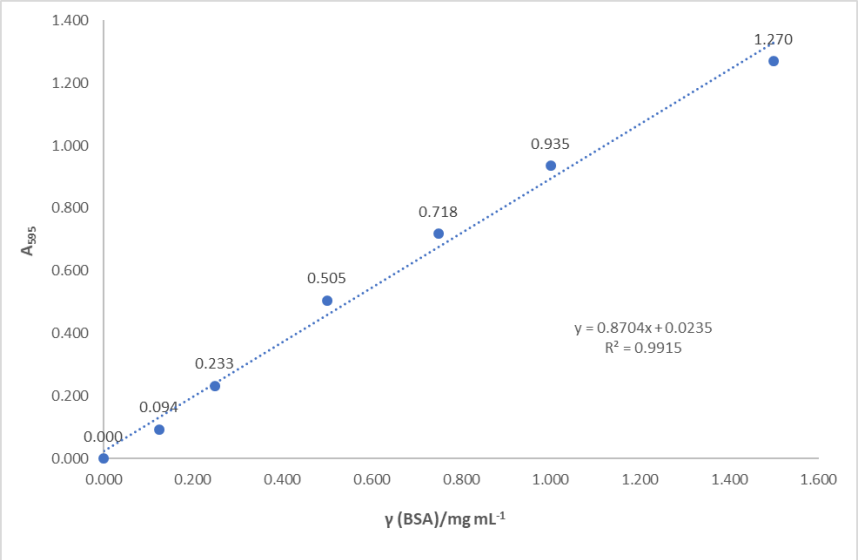
Slika 32. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu nakon ukoncentriravanja uzoraka koji sadrže protein Myc. Korišten je proteinski biljeg naveden je u poglavlju 3.1.6, 1-proteinski ekstrakt prije pročišćavanja na koloni, 2-proteinski ekstrakt koji se nije vezao na kolonu, 3-proteini nakon prvog ispiranja kolone, 4- specifično vezan protein koji je eluiran s kolone, 5-ukoncentrirani uzorak proteina nakon drugog i trećeg ispiranja kolone. U uzorku 5 su vidljive dvije pruge koje bi veličinom trebale odgovarati proteinu Myc.

Nakon koncentriranja provedena je elektroforeza na poliakrilamidnom gelu čiji su rezultati prikazani na slici 32, str. 56, na kojoj je vidljivo da se ukoncentrirani protein vjerojatno raspada (vidljive su dvije pruge koje su veličinom slične i koje prema rezultatima *western* analize odgovaraju proteinu Myc). *Western* analiza ponovljena je kako bi se sa sigurnošću moglo tvrditi da je ukoncentrirani protein zaista protein Myc.



Slika 33. *Western* analiza pročišćenog proteina Myc. Rendgenski film izložen je membrani deset sekundi. **1** – proteinski ekstrakt prije pročišćavanja na koloni, **2 –** proteinski ekstrakt koji se nije vezao na kolonu, **3** – proteini nakon prvog ispiranja kolone, **4** – specifično vezan protein, **5** – ukoncentrirani uzorak proteina nakon drugog i trećeg ispiranja kolone. Strelicom je označena pruga koja odgovara proteinu Myc. Korišten je proteinski biljeg naveden u poglavlju 1.3.1.6.

Na slici 33 prikazani su rezultati *western* analize. Vidljive su dvije pruge u uzorcima **3** (proteini nakon prvog ispiranja kolone) i **4** (specifično vezan pa eluiran protein) pa se pretpostavlja da dolazi do razgradnje proteina. Masa proteina Myc u uzorku **5** je 2,1 μg što je određeno metodom po Bradfordu. Metodom po Bradfordu određena je masena koncentracija proteina (poglavlje 1.3.2.19.). Baždarna krivulja dobivena je mjerenjem apsorbancije otopina BSA različitih koncentracija. Dobiveni pravac prikazan je slikom 34 (str. 58).



Slika 34. Baždarni dijagram za određivanje masene koncentracije proteina metodom po Bradfordu. Dijagram prikazuje ovisnost apsorbancije pri 595 nm i koncentracije otopina BSA.

Metodom po Bradfordu određena je masena koncentracija proteina na temelju jednadžbe pravca: $y = ax + b$

U tablici 8 navedeni su rezultati mjerenja na spektrofotometru.

Tablica 8. Prikaz rezultata izmjerenih metodom po Bradfordu.

Koncentracija / (mg/mL)		5 µL (1/4 razrijeđenje)	20 µL
OD_{595}	1. mjerenje	0,047	0,064
	2. mjerenje	0,089	0,107
srednja vrijednost		0,068	0,090

x_1 – srednja vrijednost izmjerenih masenih koncentracija metodom po Bradfordu (5 µL)

x_2 – srednja vrijednost izmjerenih masenih koncentracija metodom po Bradfordu (20 µL)

$$x_1 = \frac{0{,}0680 - 0{,}0235}{0{,}8704} = 0{,}051 \times 4 = 0{,}204$$

$$x_2 = \frac{0{,}090 - 0{,}0235}{0{,}8704} = 0{,}076$$

$$\mathrm{x} = \frac{x_1 + x_2}{2} \sim 0{,}14$$

Masena koncentracija proteina je ~ 0,14 mg/mL.

1.5. RASPRAVA

Spužve (Porifera) predstavljaju odlične modelne organizme za proučavanje molekularne evolucije Metazoa. Spužve su se odvojile od zajedničkog pretka svih Metazoa prije 600 i više milijuna godina, prije kambrijske eksplozije te se stoga smatraju živim fosilima.[10] Na prvi pogled spužve djeluju kao jednostavni organizmi, no brojna istraživanja pokazala su da spužve imaju ogroman repertoar gena te su visoko organizirani i kompleksni organizmi.[9,13] Filogenetski očuvani proteini spužava mogu se koristiti i za određivanje razlika u stopi evolucije kod različitih organizama te su spužve dobri modelni organizmi za proučavanje evolucijskih odnosa među životinjama.[76] Izolacijom genomske DNA iz slatkovodne špiljske spužve *Eunapius subterraneus* dobivena je visokomolekularna genomska DNA. Izolacija je napravljena iz stanica spužve u kulturi kako bi se što više umanjilo zagađenje različitim mikroorganizmima i bakterijama[30,31] koji žive u zajednici sa spužvama. Kako bi se dobile spužvine stanice u kulturi i uklonile sve nečistoće iz postojećeg uzorka spužve (poglavlje 1.3.2.1.) spužva je usitnjena i propuštena kroz filtre s porama različitih veličina uz dodatak antibiotika. Iz tako pripremljene kulture spužvinih stanica uspješno je izolirana visokomolekularna genomska DNA. Također je uspješno izolirana i RNA iz kulture spužvinih stanica bez kontaminacije s genomskom DNA (slika 16, str. 41). Izolirana RNA poslužila je kao kalup za sintezu cDNA kako bi, lančanom reakcijom polimeraze pomoću specifično osmišljenih početnica, umnožili cDNA koja kodira za protein Myc iz spužve te je klonirali u ekspresijski vektor s ciljem produkcije proteina. Početnice korištene za umnožavanje i kloniranje cDNA koja kodira za protein Myc dizajnirane su na temelju, djelomično sekvenciranog genoma i transkriptoma spužve *Eunapius subterraneus* kao rezultat zajedničkog projekta bioinformatičke grupe prof. dr. sc. Kristiana Vlahovičeka (PMF Zagreb) i članova Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković. Dizajnirane početnice modificirane su kako bi imale restrikcijska mjesta koja će omogućiti ugradnju u odgovarajući vektor. Zbog nekoliko svojih karakteristika (posjedovanje T7 promotora, koji je najjači promotor i može potaknuti proizvodnju velike količine proteina, ima veliki broj restrikcijskih mjesta posebno potrebna *Nde*I i *Bam*HI, koja se nalaze upravo ispred T7 promotora, T7 promotor mu je reguliran *lac* operonom i *lac* represorom što sprječava ekspresiju prije indukcije) za ugradnju i za proizvodnju velike količine proteina odabran je vektor pET28b. Fragment *myc* uspješno je umnožen PCR postupkom što je vidljivo na slici 19 (str. 44), jer je dobivenom uzorku veličina oko 1031 bp. Transformacija je napravljena metodom

elektroporacije zbog njezine pouzdanosti i učinkovitosti, a kao domaćin korištene su *OneShot* TOP 10 stanice *E. coli*. Stanice su odabrane zbog visoke učinkovitosti kloniranja. Dokaz uspješnosti transformacije je rast bakterijskih kolonija na LB ploči s antibiotikom. Kao antibiotik korišten je kanamicin i samo kolonije u kojima je transformacija uspješno provedena mogu narasti na pločama. Uspješnost transformacije sa sigurnošću je dokazana razgradnjom rekombinantnog plazmida pET28b_myc restrikcijskim endonukleazama *Nde*I i *Bam*HI (slika 21, str. 46) te su na agaroznom gelu uočene dvije pruge, jedna je pruga intenzivnija i odgovara razgrađenom lineariziranom vektoru pET28b (5369 bp), a druga je manje intenzivna i odgovara veličini cDNA koja kodira za protein Myc (1031 bp). Nakon uspješne ugradnje inserta u vektor pET28b konstrukt je sekvenciran i analiziran. Protein Myc iz ogulinske špiljske spužvice dug je 340 aminokiselina. Protein Myc kod čovjeka se sastoji od nekoliko važnih regija koje utječu na njegovu aktivnost. Regije MB I, II, IIIa i IIIb važne su za staničnu transformaciju i transkripcijsku regulaciju. Regija MB IV ima neočekivanu ulogu u vezanju s DNA te je važna za ulazak stanica u G2 fazu, a bHLH-Zip regija (*helix-loop-helix, leucine zipper*) važna je za dimerizaciju i spajanje s DNA. Usporedba proteina Myc iz spužvee *Eunapius subterraneus* s homolozima iz drugih organizama, *Homo sapiens, Gallus gallus, Xenopus tropicalis, Hydra vulgaris, Amphimedon queenslandica*, pokazala je da spužvin protein Myc ima očuvane sve domene i ključne aminokiseline opisane kod ljudskog homologa osim domene MB IV. Dosadašnja istraživanja[58,60] pokazala su da je ova domena specifična za kralježnjake. Statistička analiza uspoređenih sljedova aminokiselina proteina Myc iz spužve *Eunapius subterraneus* sa sljedovima aminokiselina odabranih homologa iz drugih organizama pokazuje slabu očuvanost ovog proteina. Protein Myc iz spužve *Eunapius subterraneus* pokazuje najveću sličnost s homolozima iz kopljače *Branchiostoma belcheri* (37 %) žabe *Xenopus tropicallis* i kokoši *Gallus gallus* (35 %). Filogenetska stablo konstruirano na temelju usporedbe proteina Myc iz odabranih organizama pokazalo je da se protein Myc iz spužve *Eunapius subterraneus* grupira u zajedničku granu s homologom iz druge spužve, *Amphimedon queenslandica*. Dodatna analiza gena *myc* iz spužve *Eunapius subterraneus* pokazala je da se u sredini gena nalazi jedan intron dugačak 60 nukleotida. Intron se nalazi unutar tripleta GAC, koji kodira za aminokiselinu aspartat (Asp, D) u fazi +1 (slika 26, str. 52). Usporedba gena *myc Eunapius subterraneus* s homolozima iz drugih organizama, *Gallus gallus*, *Xenopus tropicalis*, *Hydra vulgaris*, *Amphimedon queenslandica*, pokazala je da svi geni *myc* posjeduju jedan intron na istom mjestu i istoj fazi +1 kao i spužva. Jedino kod vrste *Homo sapiens* gen *myc* ima još jedan

intron na početku gena koji se nalazi u fazi nula (slika 27, str. 53). Ligacijskom smjesom kemijski su transformirane BL21(DE3) stanice pogodne za ekspresiju željenog proteina, jer sadrže gen za RNA polimerazu faga T7 i koriste se u kombinaciji s ekspresijskim plazmidom koji sadrži T7 promotor. T7 RNA polimeraza se specifično veže za T7 promotor i dodatkom IPTG-a dolazi do indukcije i prekomjerne ekspresije. *In silico* je određena masa proteina Myc od oko 40 kDa. Testirali smo dva uvjeta indukcije (prvi uvjet: dodatak IPTG-a do konačne koncentracije od 0,8 mM, pri temperaturi od 30 °C i prekinuta je za tri sata; drugi uvjet: dodatak IPTG-a konačne koncentracije 0,1 mM i ostavljena preko noći na 16 °C). Budući da nakon analize na poliakrilamidnom gelu nije bila vidljiva jasna pruga koja bi odgovarala prekomjerno eksprimiranom proteinu Myc (slika 29, str. 54), odlučeno je *western* tehnikom provjeriti eksprimira li se protein Myc u nekom od testiranih uvjeta. *Western* analiza dala je samo jedan pozitivan rezultat u uzorku koji je induciran s 0,8 mM IPTG-om pri 30 °C (slika 30, str. 55). Uočeno je i da protein putuje nešto sporije (oko 50 kDa) no što smo očekivali i da je vjerojatno nestabilan, jer je osim osnovne pruge uočena još jedna ispod nje (što se može protumačiti raspadom proteina). Nakon što su utvrđeni uvjeti u kojima dolazi do ekspresije proteina Myc, napravljena je indukcija u većem volumenu kako bi se dobilo veću količinu proteina. Nakon provedene indukcije supernatant u kojem se nalaze stanični proteini je pročišćen na afinitetnoj koloni agaroze Co-NTA na kojoj se zadržavaju rekombinantni proteini koji na imaju His-privjesak, a dobivene frakcije su analizirane na poliakrilamidnom gelu. Na gelu je uočeno da u dva uzorka, u frakcijama nakon drugog i trećeg ispiranja kolone, postoje pruge koje odgovaraju proteinu Myc (slika 31, str. 56). Te su frakcije ukoncentrirane i ponovno analizirane na poliakrilamidnom gelu. Ukoncentrirani uzorak ponovno je dao dvije pruge, jednu na visini nešto većoj od 50 kDa, a drugu odmah ispod nje (slika 32, str. 56). Odlučeno je ponoviti i *western* analizu kako bi se sa sigurnošću utvrdilo da se radi o proteinu Myc. *Western* analizom potvrđeno je da se radi o proteinu Myc, a dvije pruge na pojedinim uzorcima potvrđuju teoriju da protein nije stabilan i da dolazi do raspadanja. U literaturi je pronađeno da *c-myc* proteini pripadaju skupini fosfoproteina koji imaju životni vijek od 15 do 30 minuta čime se mogu potvrditi ovakvi rezultati.[54] Metodom po Bradfordu određena je masena koncentracija proteina koja iznosi ~0,14 mg/mL. S obzirom na dobivenu malu količinu proteina prilikom obje indukcije potrebno je modificirati pokuse. Vjerojatno je da se protein raspada u kratkom vremenu i upravo zbog toga potrebno je napraviti sve pokuse u što kraćem roku da ne dođe do nepotrebnog gubitka proteina. Međutim, razlozi dobivene male koncentracije rekombinantnog

proteina nakon pročišćavanja na koloni punjenoj Co-NTA agarozom mogu biti, osim njegovog kratkog životnog vijeka, i brojna druga ograničenja. Naime bakterijski se sustavi u velikoj mjeri koriste za ekspresiju proteina, jer predstavljaju jednostavan i jeftin način dobivanja visoke koncentracije proteina. Međutim, u bakterijskom sustavu prilikom istraživanja eukariotskih proteina dolazi do ograničenja, jer u njima ne dolazi do modifikacije proteina nakon translacije, što ujteče na strukturu, funkciju, topljivost i stabilnost samog proteina. Rekombinantni proteini koji se u visokoj koncentraciji sintetiziraju u bakterijskim stanicama, često precipitiraju i daju netopljive agregate koji se naziva inkluzijskim tijelima.[77] U radu s proteinom Myc, nisu se nastajali netopljivi agregati što se može protumačiti narušenom stabilnošću proteina nakon translacije.

1.6. ZAKLJUČAK ISTRAŽIVAČKOG DIJELA

Ovim diplomskim radom doneseni su sljedeći zaključci.

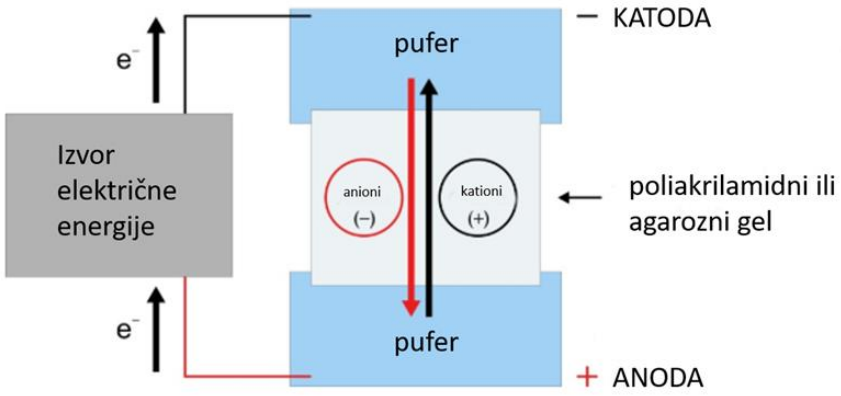
1. Visokomolekularna genomska DNA dobivena je izolacijom iz kulture stanica spužve *E. subterraneus* uz dodatak antibiotika, kako bi se uklonile sve nečistoće i razne bakterije i mikroorganizmi koji žive u zajednici sa spužvom.
2. Uspješno je izolirana ukupna RNA i sintetizirana cDNA te klonirana cDNA koja kodira za protein Myc iz spužve *E. subterraneus*.
3. Usporedbom spužvinog proteina Myc s homolozima iz drugih organizama uočeno je da su gotovo sve domene, osim MB IV, sačuvane kod svih uspoređenih organizama.
4. Protein Myc iz spužve *Eunapius subterraneus* pokazuje najveću sličnost s homolozima iz kopljače *Branchiostoma belcheri* (37 %), žabe *Xenopus tropicallis* i kokoši *Gallus gallus* (35 %).
5. Utvrđena je pozicija i faza introna gena koji kodira za protein Myc. Samo jedan intron nalazi se u sredini gena i dug je 60 nukleotida. Pozicija introna je u tripletu GAC (562 nt) koji kodira za aminokiselinu aspartat u fazi +1.
6. Usporedba gena *myc Eunapius subterraneus* s homolozima iz drugih organizama pokazala je da svi geni *myc* posjeduju jedan intron na istom mjestu i istoj fazi kao i spužva. Jedino kod čovjeka gen *myc* ima još jedan intron na početku gena u fazi 0.
7. Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) pomoću početnica dizajniranih sa specifičnim restrikcijskim mjestima (*Nde*I i *Bam*HI) umnožena je cDNA koja kodira za spužvin protein Myc te je uspješno je uklonirana u ekspresijski vektor pET28b. Napravljena je prekomjerna ekspresija gena koja je i potvrđena *western* analizom.

2. METODIČKI DIO

2.1. ELEKTROFOREZA

2.1.1. Općenito o elektroforezi

Među najpoznatijim i najčešće korištenim tehnikama u molekularnoj biologiji i medicini smatra se elektroforeza. To je kretanje (premještanje) električki nabijenih kemijskih vrsta kroz otopinu pod utjecajem električnog polja. Za elektroforezu su potrebne dvije elektrode između kojih će se uspostaviti električno polje. Te elektrode nalaze se u posebnim odjeljcima, koji nisu u potpunosti odvojeni, kako bi se nabijene jedinke mogle kretati smjerom električnog polja. Osim što im je zadaća uspostavljanje električnog polja, na anodi i katodi zbiva se i elektroliza vode, zbog razlike električnog potencijala između površine kovinskih elektroda i otopine.[78,79] Međutim, taj proces može se zanemariti zbog napona, koji u cjelokupnom sustavu iznosi samo nekoliko volta (slika 35).



Slika 35. Shematski prikaz elektroforeze. Dvije elektrode odvojene su na dva različita kraja, ali ih veže pufer unutar kojeg se nabijene jedinke mogu kretati u smjeru od jedne prema drugoj elektrodi, ali samo ako je aktivan izvor električne struje.[80]

U otopini pod utjecajem električnog polja jedinke istog radijusa, a većeg naboja, prevaljuju u određenom vremenu dulji put u odnosu na jedinke manjeg naboja. Jedinke manjeg radijusa, a istog naboja, putuju brže. Oblik jedinke, također utječe na brzinu njezinog kretanja. Između dviju elektroda, koje su uronjene u otopinu elektrolita, uspostavlja se razlika potencijala s pomoću vanjskog električnog izvora.

Zbog svega navedenog, elektroforeza omogućuje odvajanje električki nabijenih jedinki temeljem razlike u brzini njihova putovanja kroz otopinu. Silu koja djeluje na pojedinu jedinku može se opisati jednostavnom matematičkim zapisom:

$$F_e = q \times E$$

Električna sila (F_e) jednaka je umnošku naboja jedinke (q) i električnog polja između dvije elektrode (E).

Električnoj sili suprotstavlja se sila trenja jedinki u otopini koja ovisi o: viskoznosti otopine, veličini i brzini putovanja jedinke. Putovanje takvih nabijenih jedinki, koje putuju kroz otopinu može se opisati prema Stokesovu zakonu: $6\pi\eta r v$, gdje je η - viskoznost otopine, r - radijus i v - brzina jedinke. Kada se električna sila i sila trenja jedinke izjednače, jedinka će se početi kretati stalnom brzinom. Omjer konačne brzine kretanja i jakosti električnog polja naziva se električna pokretljivost jedinke (u_{ef}):

$$\frac{v}{\mathrm{E}} = \frac{q}{6\pi\eta r} = u_{\mathrm{ef}}$$

Većina bioloških makromolekula električki je nabijena te će se zbog te svoje karakteristike gibati u električnom polju pa ih se na temelju brzine kretanja u električnom polju može karakterizirati. Elektroforezom se može odrediti molekulska masa proteina i oblik molekule te se različite makromolekule mogu kvantitativno odrediti.[79] Zbog svoje jednostavnosti, metode elektroforeze imaju široku primjenu u kemijskoj analizi. Naročito je važna primjena elektroforeze u biokemiji i molekularnoj biologiji, u analizi, razdvajanju i odjeljivanju velikih molekula, poput molekula proteina i nukleinskih kiselina, ali i u odvajanju jednostavnih molekulskih vrsta, tj. električki nabijenih molekula šećera, aminokiselina, peptida i nukleotida.

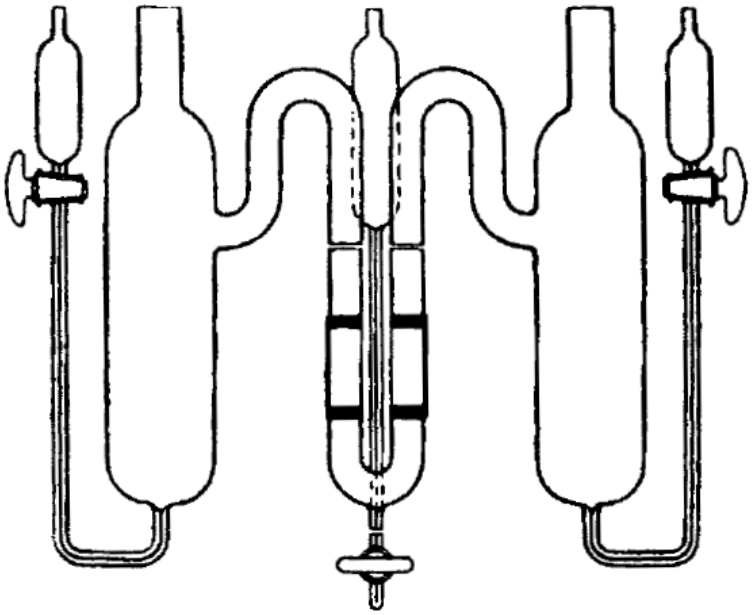
2.1.2. Tipovi elektroforeze

Postoje tri različita tipa elektroforeze: elektroforeza s pokretnom granicom, zonska i kontinuirana. Elektroforeza s pokretnom granicom je analitička metoda u kojoj se makromolekule nalaze u cijeloj otopini i njihov se položaj određuje optički. Ionske vrste iz analita razdvajaju se putujući različitim brzinama kroz otopinu. Takvu je metodu razdvajanja proteina koristio Tiselius i nazvao je elektroforeza s pokretnom granicom (engl. *moving boundary electrophoresis*).[81] Tiseliusova aparatura sastojala se od različitih spremnika u obliku U-cijevi kao što je prikazano na slici 36. Metoda je opisana jednostavnim zapisom:

$$P + n\mathrm{H}A \leftrightarrow P(\mathrm{H}A)n$$

P – predstavlja molekulu proteina ili neku drugu makromolekulu u otopini, $P(\mathrm{H}A)_n$ – je kompleks formiran kada se veže n nenabijenih malih jedinki na molekulu proteina ili neku drugu makromolekulu, a HA – predstavlja vodeni medij, tj. pufer.[82] Razvojem ove metode,

Tiselius je ispitivao bjelančevine i znatno doprinio razvoju biokemije zbog čega je 1948. dobio i Nobelovu nagradu. Međutim, postoji niz problema prilikom korištenja ove metode. Jedan od problema je termička konvekcija, zbog koje dolazi do zagrijavanja i električnog otpora te se dio energije pretvara u toplinu.



Slika 36. Tiseliusova aparatura koju je koristio 1930. u svojim istraživanjima. Aparatura se sastoji od tri spremnika u obliku U-cijevi.[81]

Zagrijavanjem otopine dolazi do nastanka temperaturnog gradijenta i gradijenta gustoće. Tijekom godina njegova se aparatura mijenjala i unaprjeđivala, ali i dalje se veliki, asimetrični proteini ne mogu analizirati ovom metodom, zbog svih tehničkih problema prilikom izvođenja.[83] Zbog složenosti ove izvedbe, teško je detektirati granicu otopina pojedine vrste jedinki u stupcu otopine te se ova metoda rijetko danas primjenjuje.

U zonskoj elektroforezi uzorak se nanosi u obliku vrpce ili točke, a jedinke putuju kroz otapalo u homogenom ili inertnom mediju, najčešće papir ili gel. Ovaj tip elektroforeze danas je najrašireniji. Tehnika je ime dobila prema tome, što je svaka nabijena jedinka nakon odvajanja izolirana u pojedinačnu zonu na elektroforetskom nosaču. Za razliku od elektroforeze s pokretnom granicom, kojoj je jedan od najvažnijih nedostataka pri izvođenju bilo miješanje otopina, ovom metodom se takvo što ne može dogoditi.[84] Uzorak se nanosi u maloj količini na potporni medij te se primijeni električno polje pa molekule putuju kroz medij ili po njegovoj površini. Na elektroforetsku pokretljivost čestice i oštrinu odvajanja djeluju različiti činitelji, ovisno i o vrsti elektroforetskog nosača. To su: adsorpcija, nehomogenost, kapacitet

elektroforetskog nosača i drugi. Papir, kao nosač otopine, danas se u elektroforezi više ne primjenjuje često, jer nema jednoliku veličinu pora te tijekom odvajanja proteina, ali i nekih drugih makromolekula, dolazi do njihove adsorpcije na površini papira. Papir se danas koristi još samo za odvajanje malih makromolekula kao što su nukleinske kiseline i peptidi.

U upotrebi je kao nosač češće gel. Gel može biti poliakrilamidni, agarozni ili gel od škroba. Gelovi su se svojim svojstvima pokazali kao bolje rješenje za razdvajanje makromolekula elektroforezom. Zonska elektroforeza primjenjuje se za analizu smjesa, određivanje čistoće i ispitivanje promjena konformacije i pokretljivosti molekule.[85]

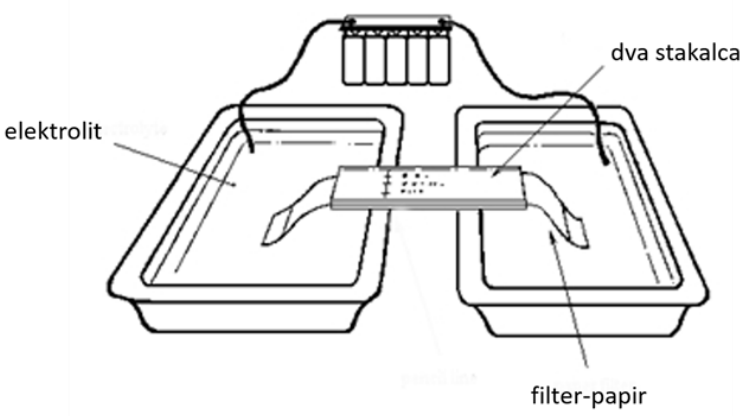
Kod kontinuirane elektroforeze uzorak se također nanosi u obliku točke ili vrpce kao i kod zonske, tj. kontinuirana elektroforeza i pripada zonskoj, jedina razlika je da se uzorak dodaje prilikom izvođenja tehnike po čemu je dobila i ime. Pripada skupini tehnika za elektroforezu u nativnim uvjetima. Takva se tehnika primjenjuje kada je potrebno sačuvati određene interakcije među proteinskim podjedinicama i kada je važno sačuvati izvornu konformaciju proteina. Ova metoda pogodna je samo za topljive proteine, uz uvjet da ne talože prilikom elektroforeze.

2.1.3. Zonska elektroforeza

Kao najčešća tehnika elektroforeze koja se danas koristi, podijeljena je prema nosaču koji može biti čvrst ili polučvrst, tj. želatinozan.

2.1.3.1. Elektroforeza na papiru

Uzorak se nanosi na jednu točku filter-papira ili celuloza acetata navlaženu puferom te se krajevi odvoje u posebne spremnike u kojima su i elektrode. Istosmjernom strujom nabijene molekule gibaju se od jedne elektrode prema drugoj, kao što je prikazano na slici 37.



Slika 37. Shematski prikaz aparature potrebne za izvođenje elektroforeze na papiru.[86]

Danas se papir rijetko rabi zbog nejednoličnosti pora, a i mnoge makromolekule, kao što je već rečeno, se adsorbiraju na celulozu interakcijom s njenim hidroksilnim skupinama. Rješenje za taj problem je upotreba nosača od celuloza-acetata. Korištenjem celuloza-acetata većina je hidroksilnih skupina acetilirana i ne dolazi do adsorpcije. Također, imaju homogenije pore, čime se razdvajanje makromolekula temelji isključivo na gustoći naboja iona. Prednosti celuloza-acetata još su: prozirnost, što olakšava spektrofotometrijsko određivanje materijala, te topljivost u nizu otapala, što omogućuje jednostavnu odvajanje molekule od njega. Po završetku elektroforeze papirna traka se osuši, te se odijeljeni sastojci detektiraju na različite načine: radiometrijskim metodama, UV-svjetlom ili prskanjem trake otopinama različitih reagensa s kojima određene molekule daju obojeni produkt.[85]

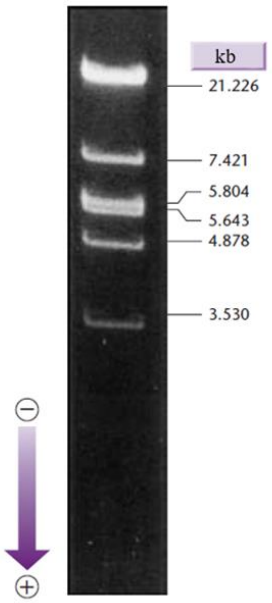
2.1.3.2. Elektroforeza na gelu

Kretanje molekula DNA kroz pore gela ključno je za odvajanje molekula prema njihovoj molekulskoj masi. Aaij and Borst (1972) utvrdili su da je brzina kretanja DNA molekula u gelu obrnuto proporcionalna logaritmu njihove molekulske mase.[87] Elektroforeza na gelu danas se smatra najboljim načinom provođenja ove tehnike, upravo zbog mogućnosti kontroliranja veličine pora, čime se izravno može kontrolirati razdvajanje makromolekula. Zbog mogućnosti kontroliranja veličine pora u gelu, mogu se bolje razdvojiti makromolekule pa se danas najčešće koriste poliakrilamidni i agarozni gel, a rijetko škrobni gel. Korištenjem bilo kojeg od gelova uz uzorke koriste se i markeri. Pomoću markera može se odrediti veličina fragmenata od interesa, ali također svaki uzorak mora imati i interkalirajuću boju, pomoću koje će se fragmenti lakše detektirati i odrediti njihovu veličinu.[88]

Škrobni gel bio je prvi gel u upotrebi i radi se, kao što mu ime i kaže, od hidrolizata škroba krumpira. Škrobna zrnca nabubre u ugrijanom puferu i hlađenjem stvaraju gel. Škrob je polisaharid opće formule $(C_6H_{10}O_5)_n$, koji se sastoji od amiloze (25 %) i amilopektina (75 %). Kako je škrob prirodni spoj, onda omjeri amiloze i amilopektina variraju, zbog čega gel ima slabija mehanička svojstva i danas je rijetko u uporabi.

Kao nosač u elektroforezi koristi se i agaroza. Agaroza je visoko pročišćeni prirodni polisaharid dobiven iz agara. Agarozni gel predstavlja mrežu polimernih molekula, čija veličina pora ovisi o puferu unutar kojeg se agar otapa i samoj količini agara koja se doda. Gel nastaje hlađenjem vodene otopine agaroze, dobivene otapanjem praha agaroze u puferu i zagrijavanjem otopine do vrenja. Hlađenjem dolazi do polimerizacije te nastaje gel. Najčešće se agarozni gel koristi za fragmente DNA, koji su veličine od nekoliko stotina baznih parova pa sve do 20 kb. Najprije

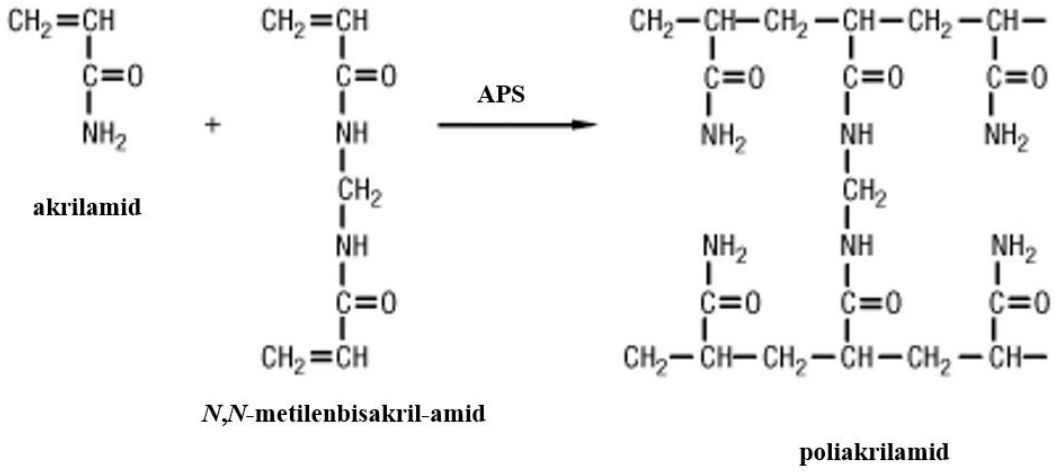
se smatralo da DNA fragmenti unutar gela putuju kao kretanje zmije (engl. *reputation*), međutim, razvojem i proučavanjem fluorescencijske mikroskopije, uočeno je da je putovanje fragmenata ipak mnogo složenije. Molekule fragmenata DNA rastežu se u smjeru djelovanja električnog polja te se ponovo skupljaju u klupko (slika 38).



Slika 38. Prikaz fragmenata molekule DNA kako putuju u električnom polju. Molekula DNA je negativnog naboja i u električnom polju uvijek putuje od negativne elektrode prema pozitivnoj, kako na slici prikazuje shematski prikaz. Prema molekulskoj masi razdvajaju se fragmenti molekule te se prema markeru može odrediti njihova veličina.[88]

Međutim, fragmenti koji su veći od 20 kb kreću se vijugavo (zmijoliko) pa se njih mora odvajati posebnom metodom (gel-eketroforeza u pulsirajućem polju). Zbog takvog kretanja, mora se podesiti željena veličina pora u gelu, jer što je pora veća, veće će se klupko moći kroz nju kretati. Kako bi se fragmenti molekule DNA mogli vidjeti na gelu, najčešće se koristi etidijev bromid kao interkalirajući agens, koji se veže za molekule DNA. Dovoljna je mala količina etidijevog bromida, kako bi fragmenti bili vidljivi pod UV-svjetlom. Međutim, najveći nedostatak etidijevog bromida je njegov mutageni potencijal,[88] stoga je u upotrebi nova fluorescentna boja SYBR, koja je ima manje mutagen potencijal od etidijevog bromida, ali je njezin nedostatak lakši ulazak u ljudske stanice. Iako pokazuje mutagena svojstva, etidijev bromid i dalje je najčešća korištena boja za detekciju DNA. Iako je agarozni gel unio revoluciju u nosačima, u zonskoj elektroforezi on i nije najbolji za detekciju proteina, ali je najbolji nosač za detekciju fragmenata DNA.[78,85,89]

Poliakrilamid trenutno je najučinkovitiji potporni medij za elektroforezu proteina. Polimerna mreža poliakrilamida nastaje miješanjem akrilamida s *N*,*N*-metilenbisakril-amidom uz dodatak amonij persulfata (APS), što je prikazano na slici 39. Poliakrilamidni gel prvi put je ušao u upotrebu 1960. godine. Iako se smatra najučinkovitijim potpornim medijem danas, za molekule poput DNA i RNA bolji je agarozni gel. Poliakrilamidni gel posjeduje potpuno drugačiju kemijsku i fizikalnu strukturu od dosadašnjih korištenih gelova (škrobni i agarozni). Zbog svojih jedinstvenih karakteristika, korištenjem poliakrilamidnog gela mogu se razdvajati različiti spojevi.[90] Koncentracija akrilamida određuje duljinu polimernih lanaca, a koncentracija *N*,*N*-metilenbisakril-amida stupanj kovalentne umreženosti. Fizička svojstva gela poput: gustoće, elastičnosti, veličine pora ovise o oba čimbenika.[89]

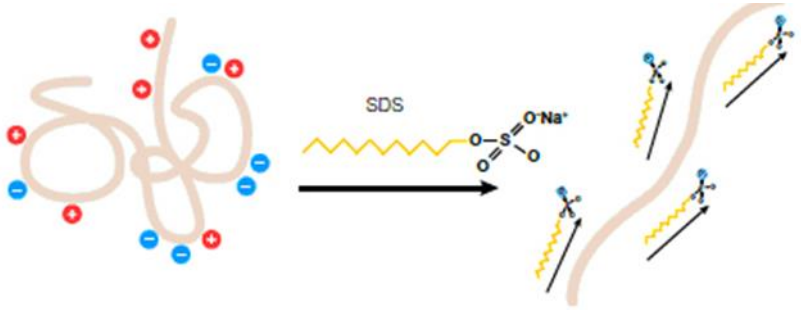


Slika 39. Polimerizacija akrilamida. Prikazane su strukturne formule spojeva te način na koji dodatkom APS-a akrilamidu i *N*,*N*-metilenbisakril-amida nastaje poliakrilamid.[91]

Poliakrilamidni gel nastaje polimerizacijom navedenih monomera mehanizmom radikala uz odgovarajući katalizator. Takvoj reakciji potrebna je kemijska ili fotokemijska pobuda, tj. inicijacija. U kemijskoj inicijaciji amonijev persulfat homolitičkim cijepanjem oslobađa radikale kisika, koji započinju reakciju polimerizacije. Reakcija se može ubrzati dodatkom katalizatora. Kao katalizator se koristi *N*,*N*,*N*',*N*'-tetrametiletilendiamin (TEMED). Pri fotokemijskoj polimerizaciji u otopini moraju biti prisutni tragovi otopljenog kisika iz zraka. Otopljeni atmosferski kisik čistač je radikala i njegova prevelika prisutnost u otopinama inhibira reakciju polimerizacije. Ovakav oblik polimerizacije koristi se pri ispitivanju proteina osjetljivih na amonijeve persulfate.[1] Polimerizacija monomera može se inicirati i svjetlom, zato otopinu monomera treba držati u tamnim bocama podalje od izvora svjetla. Osim toga otopine monomera su neurotoksične, zbog čega se ne preporučuje pretjerano i nepotrebno izlaganje te

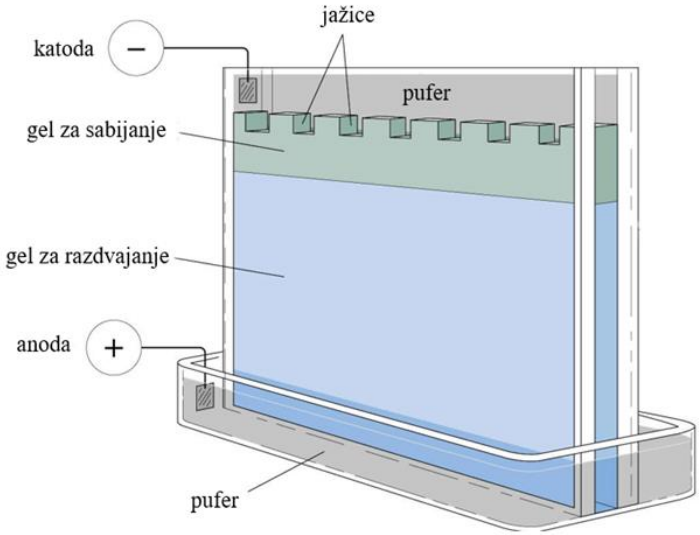
obavezno korištenje rukavica, jer otopine prodiru kroz kožu. Dvije najpoznatije i najčešće korištene tehnike elektroforeze na poliakrilamidnom gelu su elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu i diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu.

Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu je najpopularnija metoda analize proteina. Prilikom SDS-elektroforeze proteini, uz dodatak SDS-a i 2-merkaptoetanola, u pH-neutralnom mediju disociraju te im se gubi sekundarna struktura. Takve disocirane jedinice, zajedno s SDS-om, poprimaju konformaciju nasumičnog klupka, a količina SDS-a vezana po jedinici mase proteina konstantna (slika 40). Zbog toga se svaki protein ponaša kao da ima isti oblik i jednak omjer naboja i mase. Pokretljivost proteina ovisi o njihovoj molekulskoj masi zbog učinka molekulskog sita. Glavni nedostatak elektroforeze na SDS-poliakrilamidnom gelu je razdvajanje proteina slične molekulske mase ili različite varijante istog proteina.[92]



Slika 40. Shematski prikaz stvaranja kompleksa SDS i polipeptidnog lanca.[93]

Diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu najpopularnija je tehnika za odvajanje polipeptida, upravo zbog velike moći razlučivanja korištenjem gela za sabijanje (engl. *stacking*) i gela za odjeljivanje (engl. *running*). Sama metoda temelji se na koncentriranju uzorka u gornjem gelu te kasnije odvajanje. Gelovi se razlikuju, pa tako gel za sabijanje ima nižu koncentraciju te se priprema u puferu niže pH-vrijednosti (pH = 6,8). Kako su pore gela veće, a ionska jakost i pH-vrijednost niža, dolazi do većeg električnog otpora unutar djelovanja električnog polja pa nabijene jedinke putuju brže kroz gornji gel. Molekule se koncentriraju na granici gelova te ulaze u donji gel, za odjeljivanje koji ima višu pH-vrijednost (pH = 8,8). Nabijene jedinke nastavljaju putovanje metodom molekulskog sita.[94] Na slici 41 prikazana je aparatura za diskontinuiranu elektroforezu u poliakrilamidnom gelu.



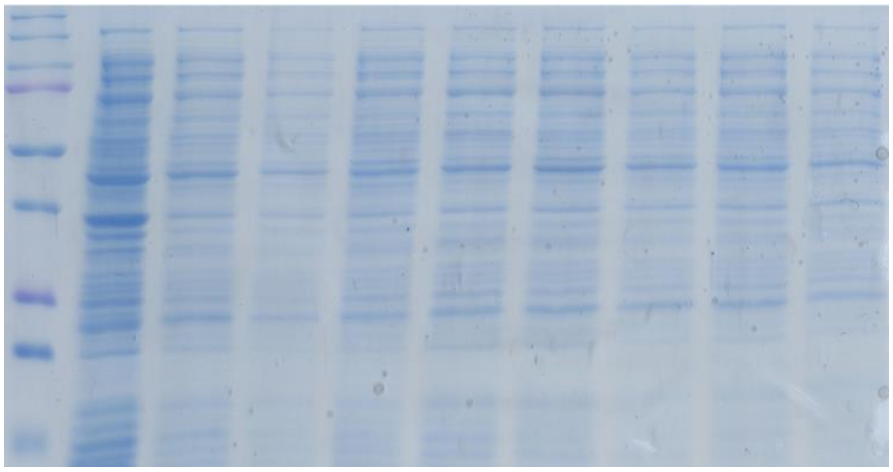
Slika 41. Shema uređaja za diskontinuiranu elektroforezu. Dva gela se odvojeno polimeriziraju između staklenih ploča i potom smještaju između dvaju puferskih spremnika. Uzorak se nanosi na gel za sabijanje, u kojem brže putuje i ulaskom na gel za odjeljivanje putuje na temelju molekulskog sita. Nakon završetka elektroforeze uzorci se detektiraju.[95]

SDS-PAGE koristi se u mnoge svrhe poput:

- određivanje veličine proteina
- određivanje čistoće proteina
- usporedbe polipeptidne građe različitih uzoraka
- analize veličine i broja polipeptidnih jedinica
- kvantifikacije proteina
- za *western* analizu*

Kako bi se uzorci na gelu mogli detektirati, najčešće se koriste boje Coomassie Brilliant Blue R-250. Gel se boja inkubacijom u kiseloj otopini boje, nakon čega se suvišak boje ispere (slika 42). Druga metoda detekcije uzoraka, koja se rijeđe koristi, je bojanje srebrom.[93]

**Western* analizom identificiraju se proteini ekstrahirani iz stanica. Metoda se sastoji od tri postupka:
1. elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (engl. *polyacrylamide gel electrophoresis*; PAGE), 2. prijenos proteina na membranu, 3. imunodetekcija proteina na membrani.



Slika 42. Uzorci čistih proteina (njihovih supernatanta i taloga) odijeljenih diskontinuiranom elektroforezom u SDS-poliakrilamidnom gelu. Proteini su obojeni bojom Coomassie Brillant Blue R-250.

2.2. ELEKTROFOREZA I NASTAVA KEMIJE

2.2.1. Osnovnoškolski nastavni program

Nastava kemije uvodi se u osnovnoškolski program u sedmom razredu, zajedno s biologijom i fizikom kao temeljima prirodoslovlja. U osnovnoškolskom programu u nastavi kemije se ne spominje pojam elektroforeza. U sedmom razredu obrađuje se nastavna cjelina *Ioni i ionske strukture*, gdje se učenici upoznaju s pojmovima poput iona, naboja, kationa i aniona, što je samo jedan od preduvjeta za razumijevanje elektroforeze. Osim te cjeline, učenici osnovnih škola ne susreću se više s nastavnim sadržajima bitnim za razumijevanje elektroforeze u nastavi kemije. Međutim, dolazi do problema, jer se učenici u nastavi kemije ne susreću ni s pojmom nukleinskih kiselina pa čak niti u programu osmog razreda, gdje se obrađuju samo aminokiseline i bjelančevine i to na samom kraju školske godine. Međutim, učenici osmih razreda u nastavi biologije obrađuju nastavnu cjelinu *DNA molekula* na samom početku školske godine, čime stječu još jedan preduvjet za razumijevanje elektroforeze, ali se to ne može kvalitetno iskoristiti, jer u to vrijeme na nastavi kemije obrađuju nastavnu cjelinu *Soli*, što se nikako ne može potkrijepiti sa znanjima stečenim na nastavi biologije o molekuli DNA.

Osnovnoškolski program iz fizike predlaže učenje niza nastavnih cjelina, koje bi pomogle u razumijevanju elektroforeze. Već u sedmom razredu, učenici se upoznaju s cjelinama *Sila* i *Trenje*, s tim se temama upoznaju polovicom školske godine. Ostala potrebna znanja za razumijevanje elektroforeze će upoznati u osmom razredu, kada uče o temama *Električna struja*, o gibanju i brzini te na kraju i o cjelini *Jednoliko gibanje*.

Stjecanjem svih tih znanja, učenici bi mogli razumjeti metode elektroforeze i njezin značaj za znanost, ali i život. Nažalost, osnovnoškolski programi iz kemije, biologije i fizike loše se nadopunjuju, pogotovo u izvedbenom smislu, pa se znanja koja bi učenici trebali steći za razumijevanje, u ovom slučaju elektroforeze, ali i mnogih drugih pojmova i metoda, vremenski razilaze te učenici gube smisao u učenju prirodoslovlja. Umjesto da se znanjima iz ova tri predmeta nadopunjuju, učenici stvari uče u različito vrijeme i ne mogu povezati sve nastavne sadržaje na pravilan način, što je još jedan od razloga zbog kojeg najčešće nemaju interesa za ove predmete već od najranijih dana. Kako bi se obradila elektroforeza na kvalitetan način, potrebna su znanja iz kemije, biologije i fizike, a iz nastavnih planova i programa jasno se vidi da učenici dobiju dosta teorijskih znanja potrebnih za osnovno razumijevanje metode, koja se nažalost nigdje ne spominje.[96] Za razumijevanje dobivanja čistih bioloških makromolekula ovo

je jedna od ključnih metoda pa je teško shvatiti zašto se nigdje ne spominje tijekom osnovnoškolskog školovanja. U ovakvom nastavnom planu i programu, kakav je sada u školama, ova bi se tema mogla provesti jedino uz suradnju sva tri predmetna nastavnika na kraju osmog razreda, kada su djeca u teoriji naučila sve što je potrebno. Takav pristup nadopunjavanja znanja iz ova tri predmeta, zainteresirao bi učenike za ovakve teme, a ponajprije razumijevanje prirodoslovlja. Učenici, nažalost, ne vide povezanost između kemije, fizike i biologije i smatraju da ta tri predmeta nemaju mnogo toga zajedničkog. Iako o ovoj temi nema spomena u nastavnom planu i programu, korisno bi bilo spomenuti je barem na dodatnoj nastavi, ako se već ne može iznaći vremena i načina tijekom redovne nastave. Djecu se, barem na dodatnoj nastavi, može zainteresirati i pokazati im se korelacija znanja iz kemije, biologije i fizike.

2.2.2. Srednjoškolski nastavni program

Prema osnovnoškolskom nastavnom planu i programu iz sva tri predmeta (kemija, biologija i fizika), vidljivo je da su učenici stekli dovoljno znanja za osnovno razumijevanje metode elektroforeze (poglavlje 2.1.). Sukladno tome, u nastavnom planu i programu za gimnazije bilo bi logično očekivati da će se ta metoda, ne samo spomenuti tijekom nastave nego i biti saržaj dijela nastavnog sata *za one koji žele znati više*, već da će se elektroforezi posvetiti barem jedan 90-minutni nastavni sat – gimnazijalci bi osnovna znanja stečena u osnovnoj školi trebali produbljivati daljnjim učenjem.

Na žalost, dolazi do istog problema kao i u osnovnoj školi – korelacija nastavnih programa prirodoslovnih predmeta loša je i srednjoškolskoj nastavi. Međutim, učenici već imaju neka osnovna znanja iz sva tri predmeta kojima mogu razumjeti princip elektroforeze, ali ona se u nastavnom planu i programu za gimnazije iz kemije nigdje ne spominje. U prvom razredu učenici se susreću s cjelinom *Čestice - gibanja čestica*, u kojoj nema riječi o elektroforezi, također se elektroforeza ne spominje niti kao metoda odvajanja smjesa. Učenici u drugom razredu produbljuju svoja znanja o elektrokemiji. Ono kada bi se najviše očekivalo i trebalo spomenuti elektroforezu, je obradom nukleinskih kiselina i bjelančevina na samom kraju četvrtog razreda gimnazije, međutim, ni tada u nastavnom planu i programu ne stoji ništa o elektroforezi. Unutar cjeline *Nukleinske kiseline*, obrađuje se molekula DNA, njezine karakteristike, izgled te način nasljeđivanja. Iako je elektroforeza jedna od važnijih metoda u

molekularnoj biologiji, ni tada se, kada učenici imaju sve potrebno za znanje i razumijevanje ove temeljne metode u molekularnoj biologiji i biokemiji, ona ne spominje.

U strukovnim školama, u kojima je nastavni plan i program kemije skraćen, također nema spomena o elektroforezi.[97]

U nastavnom planu i programu za biologiju, također se ne spominje elektroforeza niti u prvom razredu kada se obrađuje ustrojstvo stanice, ali ni u četvrtom razredu, kada se svi nastavni sadržaji odnose na građu nukleinskih kiselina. U nastavnom programu stoji, da se obrađuje molekula DNA i njezina građa te RNA, kao temelji razumijevanja genetike, koju učenici uče cijelo polugodište četvrtog razreda.[98]

Nastavnim planom i program za fiziku, produbljuju se znanja potrebna za razumijevanje fizike pa tako učenici u prvom razredu, osim znanja o električnom polju, proširuju svoje znanje o gibanju nabijenih čestica u električnom polju, što je temelj razumijevanja elektroforeze. Svim gimnazijskim programima, za prirodoslovno matematičke gimnazije, opće i jezične, prošireno je znanje fizike potrebno za elektroforezu.[99]

Gledajući nastavni plan i program ponajprije iz kemije, a onda i biologije i fizike, elektroforeza bi se mogla obrađivati u nastavi kemije na kraju četvrtog razreda u nastavnoj cjelini *Nukleinske kiseline*, čime bi se primijenila sva dosadašnja znanja svih prirodoslovnih predmeta i zaokružila priča o važnosti i proučavanju nukleinskih kiselina. Gimnazijalci su, nakon četiri godine školovanja, stekli sva potrebna znanja i mogu razumjeti i samostalno riješiti zadaće iz elektroforeze. Tema elektroforeze ključna je za razumijevanje nukleinskih kiselina. Ono što nastavni program obuhvaća je građa molekula DNA i RNA te metode nasljeđivanja i sparivanja parova baza i ponešto o transkripciji. Baš onako, kao što je obuhvaćeno u nastavnom planu i programu za nastavu biologije. Jedini mogući način obrađivanja ove teme je opet suradnjom sva tri predmetna nastavnika na dodatnoj nastavi ili organiziranjem zajedničkih sati na kojima bi mogli predstaviti temu elektroforeze i ukomponirati sva potrebna znanja. U katalogu državne mature za kemiju, godina 2018./2019. također spomena o temi elektroforeze,[100] kao ni u katalozima za prethodne godine državne mature.[101]

2.3. ELEKTROFOREZA U UDŽBENICIMA

2.3.1. Osnovnoškolski udžbenici

Baš kao što se u planu i programu osnovnih škola za kemiju nigdje ne spominje elektroforeza (poglavlje 2.1.), takav je slučaj i u udžbenicima. Pregledani su odobreni udžbenici, poput: Alfinih udžbenika *Kemija 7*[102] i *Kemija 8*[103]; Profilovih udžbenika *Kemija 7*[104], zatim U svijetu kemije 7[105], *Kemija 8*[106] i *U svijetu kemije 8*[107]. Također su pregledani i udžbenici Školske knjige *Kemija 7*[108] i *Kemija 8*[109]. Osim odobrenih, novijih udžbenika, pregledani su i oni nešto stariji iz 1980-ih, međutim ni u jednom nije pronađeno ništa o ovoj metodi. Nažalost, u udžbenicima se ne spominju ni nukleinske kiseline, kao biološki važni spojevi pa sukladno tome nema ni teme elektroforeze, koja bi se obrađivala u udžbenicima. O proteinima se uči na kraju osmog razreda, ali samo o njihovoj ulozi i građi. Metoda nije opisana ni u dijelu *za one koji žele znati više*.

Zato je u udžbenicima iz biologije prisutna cjelina o molekuli DNA, međutim, ona obuhvaća samo izgled molekule i osnovne informacije, ali se također ne spominje metoda elektroforeze niti u jednom udžbeniku.[110,111,112,113,114,115,116]

2.3.2. Srednjoškolski udžbenici

U nastavnom planu i programu za srednje škole također nema obrađene teme elektroforeze (poglavlje 2.2.), sukladno tome niti u jednom udžbeniku iz kemije nema obrađena tema elektroforeze.

U odobrenim udžbenicima nema ni spomena na temu elektroforeze, pa čak niti u dodatnim poglavljima. U četverogodišnjem obrazovanju prema nastavnom planu i programu, tema elektroforeze mogla bi se naći u udžbenicima za prvi razred u cjelini *Čestice - gibanja čestica* ili *Razdvajanje smjesa*, ali u pregledanim udžbenicima koji su odobreni, tehnika elektroforeze nije opisana.[117,118,119] U udžbenicima za drugi i treći razred nema opisane elektroforeze, ali te dvije godine učenici otkrivaju svijet anorganske kemije i elektrokemije.[120,121,122,123,124,125] U četvrtom razredu obrađuju se na kraju godine biološki važni spojevi, ali ni tada niti u jednom udžbeniku nema napisano ništa o elektroforezi.[126,127,128] U udžbenicima o nukleinskim kiselinama i proteinima spomenuta je samo njihova građa, gdje se nalaze i koja je njihova važnost.

U udžbenicima nema obrađene teme elektroforeze, ali niti pokusa koji bi mogli biti vezani uz samu temu. U popratnoj literaturi može se naći nešto malo, ali to nisu pokusi izravno vezani za

elektroforezu, nego su više orijentirani na putovanje električki nabijenih jedinki, razdvajanje smjesa i ostale cjeline koje pomažu u razumijevanju metode elektroforeze.[129,130]

Međutim, u stranoj literaturi vidljiva je razlika, velika pažnja pridaje se aktivnom učenju kao najboljoj metodi usvajanja različitih metoda. Smatra se da pasivno učenje nema velikih rezultata i pravilnog shvaćanja teme o kojoj se uči, a posebno se to odnosi na elektroforezu. U stranoj literaturi može se naći nekoliko jeftinih i jednostavnih pokusa namijenjenih nastavi kemije, prvenstveno u srednjim školama, ali i na drugim razinama, kako bi se učenje elektroforeze upotpunilo i učinilo zanimljivijim.[131,132,133]

2.4. OBJAŠNJENJE NASTAVNOG SATA

2.4.1. Korisnost elektroforeze

Metode elektroforeze primjenjuju se u analizi proteina, nukleinskih kiselina, peptida, aminokiselina, organskih kiselina i baza. Primjenjuju se u farmaceutskoj industriji prilikom analize lijekova, ali i za analizu anorganskih aniona i kationa, tj. svih molekulskih vrsta koje imaju električni naboj.

U nastavi kemije, metoda elektroforeze je dobra, jer omogućuje primjenu i zahtijeva razumijevanje različitih koncepata. Ako o njoj govore, nastavnici ovu metodu najčešće tumače, kako bi učenicima približili samu tehniku ili kako bi im pojasnili građu i svojstva molekule DNA. Međutim, metodom elektroforeze mogu se dotaknuti učenicima zanimljive i danas aktualne teme poput: forenzike, zaraznih bolesti, genetike ili zaštite okoliša.[134] Ovakvim temama učenici se zainteresiraju pa će, tak omotivirani, metodu i lakše shvatiti. Naravno, osim aktualnih tema, elektroforeza je korisna, jer se u njoj prožimaju znanja prirodoslovlja pa tako, kao što je već i rečeno, bez osnovnih znanja o molekuli DNA, električnom polju, putovanju nabijenih čestica i njihovom izgledu, nema smisla govoriti ni o elektroforezi. Učenje ove metode moglo bi se uvesti na kraju četvrtog razreda, kao ponavljanje i povezivanje ranije obrađenih nastavnih sadržaja s novima.

Nastavnici, često kao izliku za neprovođenje ove metode, koriste činjenicu da nemaju materijala i resursa pa je cilj ovog rada bio osmisliti jeftin i jednostavan elektroforetski pokus koji ne zahtijeva posebne materijale. Materijali potrebni za pokus dostupni su svima, jeftini su, lako se naprave i mogu se koristiti više puta

2.4.2. Nastavni sat

2.4.2.1. Potrebni materijali i metode za izradu nastavnog sata

Pokus: Ispod duge

Pribor: mala plastična kutija (12 x 8 cm), 2 bakrene žice (elektrode), 12 krokodil-hvataljki, 2 tikvice od 250 mL, pet baterija od 9 V, vaga, kapaljke, češljić za jažice, nožić, satno stakalce, 3 tubice, ravnalo

Kemikalije: prehrambene boje (zelena, plava i crvena), agaroza u prahu, destilirana voda, glicerol i soda bikarbona

Ključna opažanja tijekom pokusa:

Pojava mjehurića u području elektroda.

Razdvajanje boja na dvije različite komponente koje se nalaze na različitim mjestima na gelu.

Glavni nastavni cilj:

Upoznati se s tehnikom elektroforeze i njezinom važnošću.

Razred: 4. razred, gimnazija

Oblik rada: grupni rad (4 po grupi)

Nastavna cjelina: Biološki važni spojevi

Nastavna tema: Elektroforeza

Prethodno potrebne vještine, znanja i sposobnosti:

rukovati kemijskim posuđem

objasniti pojavu električnog polja

opisati građu molekule DNA

objasniti pojmove katoda i anoda

objasniti utjecaj naboja i veličine jedinke na brzinu njezina kretanja

opisati putovanje nabijenih čestica u električnom polju

objasniti kada u sustavu dolazi do jednolikog gibanja

razlikovati građu različitih prehrambenih boja (na atomsko-molekulskoj razini)

Procjena opasnosti i rizika:

Opasnost od nespretnog rukovanja nožem, prolijevanja pufera i izazivanja "kratkog" spoja.

Povezane nastavne jedinice (pokusi):

Fizika:

- električno polje
- električni naboj
- putovanje nabijenih jedinki u električnom polju
- sila
- trenje
- jednoliko gibanje

Biologija:

- biomolekule
- nukleinske kiselina
- građa molekule DNA

Kemija:

- električki neutralne i nabijene atomske i molekulske vrste
- kationi i anioni
- nabijene kemijske vrste i njihova gibanja
- razdvajanje smjesa

Elektroforeza u svakodnevnoj primjeni:

Istražiti gdje se sve primjenjuje elektroforeza, kakav je značaj za forenziku i medicinu

2.4.2.2. Tijek nastavnog sata

Nastavnik uvodi učenike u sat slikom duge. Potiče ih na razgovor o dugi, bojama od kojih se sastoji kako bi ih uveo u pokus.

Učenici su podijeljeni u skupine (po četvero u skupini) i svatko ima svoj radni listić. Predstavnik svake skupine uzima pribor i započinju s pokusom.

Najprije se pročita sav pribor i svi koraci na glas kako bi se osiguralo pravilno i sigurno izvođenje pokusa.

Nakon što su pročitani i raspravljeni KORACI 1-4, učenici u skupinama samostalno izvode pokus. Za KORAKE 1-4 potrebno im je znanje rukovanja kemijskim posuđem i spajanja elektroda na izvor električne struje, tj. spajanje pet baterija u seriju kao bi razlika potencijala u sustavu bila 45 V. Nastavnik mora obići skupine, kako bi utvrdio njihovo napredovanje u radu i po potredbi pomogao. Ako primjeti da učenici imaju problema pri spajanju baterija u serijski spoj, na prezentaciji ima sliku koja prikazuje na koji način to treba napraviti.

Opažanja za KORAK 4 postupno se nadopunjavaju tijekom pokusa. Opažanje o pojavi smeđeg obojenja pa zatim plavog, koje se može uočiti u području anode, potrebno je usmeno raspraviti s učenicima. Učenici su ranije učili o kemijskim svojstvima bakra pa ih se lako može navesti na odgovor, tj. potaknuti ih da objasne što se događa.

Pokus, kada ga se postavi traje 30 minuta pa u tom vremenu učenici rješavaju daljnja pitanja s radnog listića.

Za pitanje 1 i 2 potrebno im je prethodno znanje:

- objasniti pojmove katoda i anoda,
- objasniti pojavu električnog polja.

Za pitanja 3 i 4 potrebno je znanje o građi prehrambenih boja i njihovoj razlici pri čemu je za pitanje 4 potrebno znati i kako naboj i veličina čestice utječu na brzinu kretanja.

Za pitanje 5 potrebno je znati kako naboj i veličina čestice utječu na brzinu kretanja i kako nabijene čestice putuju u električnom polju.

Za pitanje 6 i 7 potrebno je moći opisati građu molekule DNA.

Pitanjem 8 obuhvaćeni su ishodi:

- opisati građu molekule DNA,
- opisati putovanje nabijenih čestica u električnom polju.

Nakon što većina učenika riješi ova pitanja, odgovore valja pročitati na glas kako bi se provjerila točnost odgovora pri čemu nastavnik bira učenike koji će pročitati svoje odgovore. Kada se dođe do pitanja 6 u prezentaciji se otvori slika molekule DNA te se u raspravi s učenicima prokomentira njena građa. Učenici iz nastave biologije znaju dovoljno o građi molekule DNA tako da ih se raznim pitanjima može potaknuti na razmišljanja i od njih dobiti sve potrebne odgovore.

Zatim se nastavlja s ostatkom pitanja na radnom listiću. Za rješenje pitanja 9 potrebno je razlikovati anodu od katode, utjecaj naboja i veličine čestice na brzinu kretanja i smjer kretanja čestice u električnom polju.

Pitanje 10 s učenicima rješava nastavnik, jer je ovo uvođenje novog pojma čiji termin učenici ne znaju i ne mogu ga samostalno riješiti. Nakon završetka pokusa mogu se do kraja zabilježiti sva opažanja tijekom pokusa.

Nastavnik pitanjima usmjerava skupine, ako je to potrebno da bi se listić uradio za 40-45 minuta dok pokus traje kako bi se u preostalom vremenu diskutirala rješenja i ispunio radni listić.

Na kraju nastavnog sata nastavnik pokazuje i objašnjava primjere gdje se u kemiji i biologiji koristi elektroforeza, koji se tipovi najčešće koriste te kako izgledaju različite aparatura za provođenje elektroforeze.

2.5. ZAKLJUČAK METODIČKOG DIJELA

Ovim je radom pokazana korisnot obrađivanja teme elektroforeze u nastavi kemije, ali i biologije i fizike. Ovom temom učenici produbljuju znanja stečena u sva tri nastavna predmeta. Na žalost, nastavna praksa ne bavi se metodom elektroforeze, jer nije navedena ni u osnovnoškolskom ni u srednjoškolskom nastavnom programu. Kako učenici imaju dovoljno znanja da savladaju ovaj mogući nastavni sadržaj, ovu nastavnu temu može se obraditi u četvrtom razredu srednje škole. Hoće li ovaj predloženi nastavni sadržaj biti uporabljen u nastavi i kada, uglavnom ovisi nastavniku i njegovoj procjeni mogućnosti njegovih učenika. U tom smislu to može biti nastavni sadržaj za redovnu nastavu ili za dodatnu. No, to može biti i nastavni sadržaj kojim će se korelirati nastavne sadržaje iz tri nastavna predmeta (kemija, fizika i biologija) pa će svaki nastavnik moći približiti ovu temu sa svoje strane. Osmišljeni pokus u ovom radu ne zahtijeva mnogo novca, svi su materijali dostupni, svaki ih nastavnik može lako nabaviti, a pokus se može ponoviti desetke puta. Predviđeno trajanje osmišljenog nastavnog sata je 90 minuta.

3. LITERATURNI IZVORI

1. W. E. G. Müller, M. Wiens, T. Adell, V. Gamulin, H. C. Schröder and I. M. Müller, Bauplan of urmetazoa: basis for genetic complexity of metazoa. *Int. Rev. Cytol*., **235** (2004) 53–92.
2. H. Ćetković, M. Halasz, M. Herak Bosnar, Sponges: A Reservoir of Genes Implicated in Human Cancer, *Mar Drugs*, (2018) 10:16.
3. D. Perina, M. Herak Bosnar, R. Bago, A. Mikoč, M. Harcet, M. Deželjin, H. Ćetković; Sponge non-metastatic Group I Nme gene/protein - structure and function is conserved from sponges to humans, *BMC Evol Biol*, (2011) 11:87.
4. D. Perina, M. Korolija, M. P. Hadžija, I. Grbeša, R. Belužić, M. Imešek, C. Morrow, M. P. Marjanović, T. Bakran-Petricioli, A. Mikoč, et al., Functional and structural characterization of *fau* gene/protein from marine sponge *Suberites domuncula*, *Mar. Drugs*, **13** (2015) 4179-4196.
5. D. Perina, A. Mikoč, M. Harcet, M. Imešek, D. Sladojević, A. Brcko, H. Ćetković, Characterization of bruton's tyrosine kinase gene and protein from marine sponge *Suberites domuncula*, *Croat Chem Acta*, **85** (2012) 223-229.
6. D. Perina, M. H. Bosnar, A. Mikoč, W.E.G. Muller, H. Ćetković, Characterization of nme6-like gene/protein from marine sponge *Suberites domuncula*, *N-S Arch Pharmacol*, **384** (2011) 451-460.
7. M. Hartl, A. W. Mitterstiller, T. Valovka, K. Breuker, B. Hobmayer, K. Bister, Stem cell-specific activation of an ancestral *myc* protooncogene with conserved basic functions in the early metazoan Hydra, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107** (2010) 4051-4056.
8. J. Bedek, H. Bilandžija, B. Jalžić; Ogulinska špiljska spužvica Eunapius subterraneus Sket et Velikonja, 1984, rasprostranjenost i ekologija vrste i staništa, *Modruški zbornik*, **2** (2008) 103-130.
9. M. Srivastava, O. Simakov, D. S. Rokhsar i sur., The Amphimedon queenslandica genome and the evolution of animal complexity, *Nature*, **466** (2010) 720–726.
10. W. E. G. Müller, *Sponges (Porifera)*, Springer, Berlin, 2003, str. 7-29.
11. I. Matoničkin, I. Habdija, B. Primc-Habdija, *Beskralježnjaci: biologija viših avertebrata*, Školska knjiga, Zagreb, 1999, str. 190-211.
12. J. A. Pechenik, *Biology of the Invertebrates*, McGraw-Hill Education, New York, 2000, str. 73-88.
13. H. Pilcher, Back to our roots, *Nature*, **435** (2005) 1022–1023.

14. I. Habdija, B. Primc-Habdija, I. Radanović, M. Špoljar, R. Matoničkin Kepčija i sur., *Protista-Protozoa i Metazoa-Invertebrata: Strukture i funkcije*, Alfa d.d., Zagreb, 2011, str. 87-98.
15. S. P. Leys, A. Hill, The Physiology and Molecular Biology of Sponge Tissues *Advances in Marine Biology*, **62** (2012) 1-56.
16. http://www.auxbulles.com/img/eponge-type-ascon-sycon-leucon-01.jpg (1.12.2018.)
17. I. Habdija, B. Primc Habdija, I. Radanović, J. Vidaković, M. Kučinić, M. Špoljar, R. Matoničkin, M. Miliša, *Protista-Protozoa i Metazoa- Invertebrata. Funkcionalna građa i praktikum*, Meridijani, Samobor, 2004, str. 105-115.
18. N. Funayama, Stem Cell System of Sponge, *Stem Cells*: *From Hydra to Man*, Springer, 2008, str. 17-35.
19. H. Philippe, R. Derelle, P. Lopez, K. Pick, C. Borchiellini, N. Boury-Esnault, J. Vacelet, E. Deniel, E. Houliston, E. Quéinnec, C. Da Silva, P. Wincker, H. Le Guyader, S. Leys, D. J. Jackson, F. Schreiber, D. Erpenbeck, B. Morgenstern, G. Wörheide, M. Manuel, Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships, *Current Biology*, **19** (2009) 706–712.
20. M. Dohrmann, D. Janussen, J. Reitner, A. G. Collins, G. Wörheide, Phylogeny and evolution of glass sponges (Porifera, Hexactinellida), *Systematic Biology*, **57** (2008) 388–405.
21. M. Dohrmann, A. G. Collins, G. Wörheide, New insights into the phylogeny of glass - sponges (Porifera, Hexactinellida): Monophyly of Lyssacinosida and Euplectellinae, and the phylogenetic position of Euretidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52** (2009) 257–262.
22. E. A. Sperling, K. J. Peterson, D. Pisani, Phylogenetic signal dissection of nuclear housekeeping genes supports the paraphyly of sponges and the monophyly of Eumetazoa. *Molecular Biology and Evolution*, **26** (2009) 2261–2274.
23. G. Wörheide, M. Dohrmann, D. Erpenbeck, C. Larroux, M. Maldonado, O. Voigt, C. Borchiellini, D. V. Lavrov, Deep Phylogeny and Evolution of Sponges (Phylum Porifera) *Advances in Marine Biology*, **61** (2012) 1-78.
24. D. Lavrov, X. Wang, M. Kelly, Reconstructing ordinal relationships in the Demospongiae using mitochondrial genomic dana, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49** (2008) 111–124.

25. R. W. M. Van Soest, N. Boury-Esnault, J. Vacelet, M. Dohrmann, D. Erpenbeck, N. J. De Voogd, N. Santodomingo, B. Vanhoorne, M. Kelly, J. N. A. Hooper, Global Diversity of Sponges (Porifera), *PLoS One*, (2012) 7(4):e35105.
26. E. Gazave, P. Lapébie, A. V. Ereskovsky, J. Vacelet, E. Renard, P. Cárdenas, C. Borchiellini, No longer Demospongiae: Homoscleromorpha formal nomination as a fourth class of Porifera, *Hydrobiologia*, **687** (2012) 3-10.
27. https://www.mun.ca/biology/scarr/Phylogeny_of_Animalia.html (03. 12. 2018.)
28. S. L. Fernandez-Valverde, A. D. Calcino, B. M Degnan, Deep developmental transcriptome sequencing uncovers numerous new genes and enhances gene annotation in the sponge Amphimedon queenslandica, *BMC Genomics*, **16** (2015) 387.
29. G. S. Richards, E. Simionato, M. Peron, M. Adamska, M. Vervoort, B. M. Degnan, Sponge genes provide new insight into the evolutionary origin of the neurogenic circuit, Curr Biol., 18 (2008) 1156–1161.
30. M. W. Taylor, R. Radax, D. Steger, M. Wagner, Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology and Biotechnological Potential, *Microbiology and molecular biology reviews*, **71** (2007) 295-347.
31. A. Riesgo, N. Farrary, P. J. Windsory, G. Giribet, S. P. Leys, The Analysis of Eight Transcriptomes from All Poriferan Classes Reveals Surprising Genetic Complexity in Sponges, *Mol. Biol. Evol.*, **31** (2014) 1102-1120.
32. S. Vargas, A. Schuster, K. Sacher, G. Büttner, S. Schätzle, B. Läuchli, K. Hall, J. N. A. Hooper, D. Erpenbeck, G. Wörheide, Barcoding Sponges: An Overview Based on Comprehensive Sampling, *PLoS One*, (2012) 7(7): e39345.
33. C. Conaco, P. Tsoulfas, O. Sakarya, A. Dolan, J. Werren, K. S. Kosik, Detection of Prokaryotic Genes in the *Amphimedon queenslandica* Genome, *PLoS One*, (2016) 11(3): e0151092.
34. M. Adamska, S. M. Degnan, K. M. Green, M. Adamski, A. Craigie, C. Larroux, B. M. Degnan, Wnt and TGF-b expression in the sponge *Amphimedon queenslandica* and the origin of metazoan embryonic patterning, *PLoS One*, (2007a) 2, e1031.
35. A. Sebe´-Pedro´s, A. J. Roger, F. B. Lang, N. King , I. Ruiz-Trillo, Ancient origin of the integrin-mediated adhesion and signaling machinery, *Proc Natl Acad Sci USA*, **107** (2010) 10142–10147.

36. J. F. Ryan, K. Pang, C. E. Schnitzler, A. D. Nguyen, R. T. Moreland, D. K. Simmons, B. J. Koch, W. R. Francis, P. Havlak, Comparative Sequencing Program NISC, i sur., The genome of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* and its implications for cell type evolution, *Science*, (2013) 342:1242592.
37. H. Bilandžija, J. Bedek, B. Jalžić, S. Gottstein, The morphological variability, distribution patterns and endangerment in the Ogulin cave sponge *Eunapius subterraneus* Sket & Velikonja, 1984 (Demospongiae, Spongillidae), *Natura Croatica*, **16** (2007) 1-17.
38. http://hbsd.hr/Spuzva/index.html (01. 12. 2018.)
39. M. Harcet, H. Bilandžija, B Bruvo-Mađarić, H. Ćetković, Taxonomic position of *Eunapius subterraneus* (Porifera, Spongillidae) inferred from molecular data—A revised classification needed?, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **54** (2010a) 1021–1027.
40. B. Pleše, L. Lukić-Bilela, B. Bruvo-Mađarić, M. Harcet, M. Imešek, H. Bilandžija, H. Ćetković, The mitochondrial genome of stygobitic sponge *Eunapius subterraneus*: mtDNA is highly conserved in freshwater sponges, *Hydrobiologia*, **687** (2012) 49-59.
41. M. W. Anderson, S. H. Reynolds, M. You, R. M. Maronpot, Role of Proto-oncogene Activation in Carcinogenesis, *Environmental Health Perspectives*, **98** (1992) 13-24.
42. V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, U. Neoplasia, *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease*, Elsevier Saunders, 7th edition, Philadelphia, 2005.
43. J. M. Bishop, Molecular themes in oncogenesis, *Cell*, **64** (1991) 235-248.
44. T. Hunter, Cooperation between oncogenes, *Cell*, **64** (1991) 249-270.
45. J. M. Bishop, The molecular genetics of cancer, *Science*, **235** (1987) 303-311.
46. D. Hockenbery, G. Nunez, C. Milliman, R. D. Schreiber, S. J. Korsmeyer, Preventing cell suicide: a new role for oncogenes, *Nature*, **348** (1990) 334–336.
47. L. Chin, J. W. Gray, Translating insights from the cancer genome into clinical practice, *Nature*, **452** (2008) 553-563.
48. M. Cross, T. M. Dexter, Growth Factors in Development, Transformation, and Tumorigenesis, *Cell*, **64** (1991) 271-280.
49. I. B. Weinstein, A. K. Joe, Mechanisms of Disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy, *Nat Clin Pract Oncol*., **3** (2006) 448-457.
50. K. Bister, H.W. Jansen, Oncogenes in retroviruses and cells: biochemistry and molecular genetics, *Advances in Cancer Research*, **47** (1986) 99-188.

51. R. N. Eisenman, Deconstructing Myc, *Genes Dev*., **15** (2001) 2023-2030.
52. M. Eilers, R. N. Eisenman, Myc's broad reach., *Genes Dev*., **22** (2008) 2755-2766.
53. J. Liu, D. Levens, Making myc, *Curr Top Microbiol Immunol*., **302** (2006) 1-32.
54. J. Stone, T. De Lange, G. Ramsay, E. Jakobovits, J. M. Bishop, H. Varmus, W. Lee, Definition of Regions in Human c-myc That Are Involved in Transformation and Nuclear Localization, *Molecular and Cellular Biology*, **7** (1987) 1697-1709.
55. S. L. Young, D. Diolaiti, M. Conacci-Sorrell, I. Ruiz-Trillo, R. N. Eisenman, N. King, Premetazoan ancestry of the Myc-Max network, *Mol Biol Evol*., **28** (2011) 2961-2971.
56. C. Andresen, S. Helander, A. Lemak, C. Farès,V. Csizmok, J. Carlsson, L. Z. Penn, J. D. Forman-Kay, C. H. Arrowsmith, P. Lundström, M. Sunnerhagen, Transient structure and dynamics in the disordered c-Myc transactivation domain affect Bin1 binding, *Nucleic Acids Research*, **40** (2012) 6353–6366.
57. J. A. Nilsson, J. L. Cleveland, Myc pathways provoking cell suicide and cancer, *Oncogene*, **22** (2003) 9007-9021.
58. V. H. Cowling, M. D. Cole, Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins, *Semin Cancer Biol*., 16 (2006) 242-252.
59. D. Schwinkendorf, P. Gallant, The conserved Myc box 2 and Myc box 3 regions are important, but not essential, for Myc function in vivo, *Gene*, **436** (2009) 90-100.
60. V. H. Cowling, S. Chandriani, M. L. Whitfield, M. D. Cole, A Conserved Myc Protein Domain, MBIV, Regulates DNA Binding, Apoptosis, Transformation, and G2 Arrest, *Mol Cell Biol*., **26** (2006) 4226–4239.
61. Y. R. García, Y. V. Pabon-Martinez, C. I. E. Smith, A. Madder, Specific dsDNA recognition by a mimic of the DNA binding domain of the c-Myc/Max transcription factor, *Chem. Commun*., **53** (2017) 6653-6656.
62. S. B. Primrose, R. M. Twyman, *Principles of Gene Manipulation and Genomics*, Blackwell Publishing, Oxford UK, 2006, str. 100-115.
63. A. Abramović Ristov, A. Brozović, B. Bruvo Mađarić, H. Ćetković, D. Hranilović, M. Herak Bosnar, S. Katušić Hećimović, N. Meštrović Radan, S. Mihaljević, N. Slade, D. Vujaklija, *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2007, str. 361-366.
64. S. B. Primrose, R. M. Twyman, *Principles of Gene Manipulation and Genomics*, Blackwell Publishing, Oxford UK, 2006, str. 86.

65. http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/pET-28b+-DNANovagen,EMD_BIO69865?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.hr%2F&bd=1#anchor_VMAP (10. 11. 2018.)
66. https://international.neb.com/products/restriction-endonucleases (10. 11. 2018.)
67. M. M. Cox, D. L. Nelson, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman & Co Ltd, New York, str. 298.
68. https://www.takarabio.com/learning-centers/protein-research/his-tag-purification/tech-note-cobalt-resin (12. 11. 2018.)
69. http://www.bio-rad.com/en-uk/applications-technologies/protein-blotting methods?ID=LUSPPSESH (12. 11. 2018.)
70. M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, D. G. Higgins, Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics*, **23** (2007) 2947-2948.
71. K. B. Nicholas, H. B. Jr. Nicholas, D. W. Deerfield, GeneDoc: analysis and visualisation of genetic variation, *Embnew. News*, (1997) 4:14.
72. E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel, A. Bairoch A., ExPASy:the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.*, **31** (2003) 3784-3788.
73. N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution*, **4** (1987) 406-425.
74. M. Nei, S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, New York, 2000.
75. K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar, MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, **30** (2013) 2725-2729.
76. V. Gamulin, I. M. Muller, W. E. G. Muller, Sponge proteins are more similar to those of Homo sapiens than to Caenorhabditis elegans, *Biological Journal of the Linnean Society*, 71 (2000), 821–828.
77. G. L. Rosano, E.A. Ceccarelli, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges, *Front Microbiol*., (2014) 5:172.
78. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 134-164.

79. I. Piljac, *Elektroforeza*, Media Print, Zagreb, 2006, str. 1-20.
80. http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch07.html#d0e5389 (10. prosinca 2018.)
81. A. Tiselius, A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures, *Trans. Faraday Soc.*, **33** (1937) 524.
82. J. R. Cann, W. B. Goad, Theory of Moving Boundary Electrophoresis of Reversibly Interacting Systems, *The Journal of Biological Chem*., **240** (1965).
83. M. B. Smith, S. J. Rose, A Modified Cell for Moving-Boundary Electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, **17** (1966) 236-243.
84. O. Smithies, Zone Electrophoresis in Starch Gels: Group Variations-in the Serum Proteins of Normal Human Adults, *Advances in Protein Chem*., **14** (1959) 65-113.
85. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za biokemiju, Interna skripta za praktikum iz biokemije, 15. radno izdanje, Zagreb, 2016.
86. http://www.namrata.co/electrophoresis-a-brief-review/ (15. prosinca 2018.)
87. C. Aaij, P. Borst, The gel electrophoresis of DNA *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, **269** (1972) 192-200.
88. S. B. Primrose, R. M. Twyman, *Principles of Gene Manipulation and Genomics*, Blackwell Publishing, SAD, 2006, str. 15-36.
89. D. Lane, P. Prentki, M. Chandler, Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions, *Microbiol Rev*.. 1992 509–528.
90. S. Raymond, Y.-J. Wang, Preparation and Properties of Acrylamide Gel for Use in Electrophoresis *Analytical Biochemistry*, **1** (1960) 391-396.
91. https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-electrophoresis.htm (20. prosinca 2018.)
92. J. R. Cann, Phenomenological theory of gel electrophoresis of protein-nucleic acid complexes, *The Journal of Biological Chem.* **29** (1989) 264.
93. http://www.bio-rad.com/en-uk/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods?ID=LUSOW4GRI (27. prosinca 2018.)
94. E. D. Hames, Gel Electrophoresis of Protein, Oxford University Press, 1998, str. 1-100.
95. http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter6/F06-21.jpg (28. prosinca 2018.)
96. Nastavni plan i program za osnovnu školu, MZOS, 2006, 266-284.

97. http://dokumenti.ncvvo.hr/Nastavni_plan/gimnazije/obvezni/kemija.pdf (26.12.2018.)
98. http://dokumenti.ncvvo.hr/Nastavni_plan/gimnazije/obvezni/biologija.pdf (26.12.2018.)
99. http://dokumenti.ncvvo.hr/Nastavni_plan/gimnazije/obvezni/fizika.pdf -26.12.18 (26.12.2018.)
100. https://mk0ncvvow8xj1dauw2r.kinstacdn.com/wp-content/uploads/2018/10/KEMIJA-2019b.pdf (26.12.2018.)
101. https://www.ncvvo.hr/ (26.12.2018.)
102. D. Mrvoš-Sermek, M. Kovačević, D. Barić, *Kemija 7*, Alfa, 2014.
103. D. Mrvoš Sermek, N. Ribarić, *Kemija 8*, Alfa, 2014.
104. E. Kovač-Andrić, N. Štiglić, A. Lopac Groš, *Kemija 7*, Profil, 2014.
105. A. Battistutti-Pecha, Ž. Mrklić, M. Petković, N. Štiglić, *U svijetu kemije 7*, Profil, 2014.
106. R. Vladušić, M. Pernar, S. Šimičić, *Kemija 8*, Profil, 2014.
107. Đ. Kocijan, M. Petković, R. Vladušić, *U svijetu kemije 8*, Profil, 2014.
108. S. Lukić, M. Varga, I. Dujmović, N. Trenčevska, D. Volarević, *Kemija 7*, Školska Knjiga, 2014.
109. S. Lukić, M. Varga, S. Krmpotić - Gržančić, I. Marić Zerdun, D. Maričević, *Kemija 8*, Školska knjiga, 2014.
110. V. Begić, J. Madaj Prpić, D. Novoselić, *Biologija 7*, Alfa, 2014.
111. J. Džapo, J. Tonšetić, L. Zadražil, *Biologija 7*, Profil, 2014.
112. B. Agić, A. Dragobratović, A. Lopac Groš, N. Kletečki, O. Meštrović, *Živi svijet 7*, Profil, 2014.
113. D. Bendelja, I. Benović, Đ. Culjak, E. Operta, M. Pavić, R. Roščak, H. Valečić, *Biologija 7*, Školska knjiga, 2015.
114. M. Bastić, V. Begić, D. Novoselić, M. Popović, *Biologija 8*, Alfa, 2014.
115. A. Banović, A. Lopac Groš, T. Petrač, T. Čačev, *Živi svijet 8*, Profil, 2014.
116. D. Bendelja, Đ. Culjak, Ž. Lukša, E. Operta, E. Orešković, R. Roščak, *Biologija 8*, Školska knjiga, 2015.
117. Z. Popović, Lj. Kovačević, *Kemija 1*, Alfa, 2014.
118. A. Habuš, V. Tomašić, S. Liber, *Opća kemija 1*, Profil, 2014.
119. D. Turčinović, I. Halasz, *Opća kemija 1*, Školska knjiga, 2012.
120. G. Pavlović, Lj. Kovačević, *Kemija 2*, Alfa, 2014.
121. A. Habuš, D. Stričević, S. Liber, *Opća kemija 2*, Profil, 2014.

122. D. Nöthig Hus, M. Herak, F. Novosel, *Opća kemija 2*, Školska knjiga, 2009.
123. A. Habuš, D. Stričević, V. Tomašić, *Anorganska kemija*, Profil, 2014.
124. Z. Popović, Lj. Kovačević, M. Bulić, *Kemija 3*, Alfa, 2014.
125. B. Tkalčec, A. Petreski, *Kemijski elementi i njihovi spojevi*, Školska knjiga, 2009.
126. B. Sever, D. Stričević, *Temelji organske kemije*, Profil, 2014.
127. N. Ribarić, I. Futivić, N. Sakač, *Kemija 4*, Alfa, 2014.
128. V. Petrović Peroković, I. Halasz, D. Turčinović, *Kemija ugljikovih spojeva*, Školska knjiga, 2015.
129. M. Sikirica, *Zbirka kemijskih pokusa*, Školska knjiga, 2011.
130. M. Sikirica, *Metodika nastave kemije*, Školska knjiga, 2003.
131. R.N. Trigiano, B.H. Ownley, A.N. Trigiano, J. Coley, K.D. Gwinn, J.K. Moulton, Two Simple and Inexpensive Laboratory Exercises for Teaching Agarose Gel Electrophoresis and DNA Fingerprinting, *HortTechnology*, **18** (2008) 177-188.
132. S. C. Cunningham, B. McNear, R. S. Pearlman, S. E. Kern, Beverage-Agarose Gel Electrophoresis: An Inquiry-based Laboratory Exercise with Virtual Adaptation, *CBE Life Sci Educ*. **3** (2006) 281–286.
133. https://www.exploratorium.edu/snacks/gel-electrophoresis (28. 12. 2018.).
134. https://www.carolina.com/teacher-resources/Interactive/fitting-an-electrophoresis-lab-into-your-classroom/tr10723.tr (28. 12. 2018.).

4. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

APS	amonijev persulfat
BLAST	engl. ***B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool*
BSA	engl. *Bovine serum albumin*
bp	bazni par
cDNA	engl. *complementary DNA*
ddNTP	Dideoksi nukleotid
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	Nukleozid trifosfat
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksicitozin trifosfat
dGTP	Deoksigvanozin trifosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
EDTA	Etilendiamintrioctena kiselina
ExPASy	engl. ***Ex**pert **P**rotein **A**nalysis **Sy**stem*
HLH	engl. Helix-Loop-Helix
IMAC	afinitetna kromatografija na nosaču s imobiliziranim metalom (engl. ***I**mmobilized **M**etal **A**ffinity **C**hromatography*)
IPTG	izopropil-ß-D-tiogalaktopiranozid
ITS2	engl. *internal transcribed spacer 2*
IUCN	International Union for Conservation of Nature
kb	Kilobase
LB	lysogeny broth
LZ	Leucine Zipper
MB	engl. *"**M**yc homology **b**ox" motifs*
Mb	Megabase
NFW	voda bez nukleaze (engl. ***n**uclease **f**ree **w**ater*)
NTA	nitrilo-trioctena kiselina
PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu
PCR	Lančana reakcija polimerazom
rDNA	engl. *ribosomal DNA*
RNA	Ribonukleinska kiselina
SDS	natrijev dodecilsulfat

TAE	Tris-acetatni EDTA pufer
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline + Polysorbate 20 (Tween 20)
TEMED	*N*,*N*,*N*',*N*'-tetraetilendiamin
TRRAP	**TR**ansactivation/t**R**ansformation **A**ssociated **P**rotein
β-ME	2-merkaptoetanol

5. DODATAK

POKUS 1 Tamo, iza duge... 

Pribor: mala plastična kutija (12 x 8 cm), 2 žice (elektrode), 12 krokodil-hvataljki, 2 tikvice od 250 mL, pet baterija od 9 V, vaga, kapalice, češljić za jažice, nožić, satno stakalce, 3 tubice, ravnalo

Kemikalije: prehrambene boje* (zelena, plava i crvena), agar-agar (u prahu), glicerol, destilirana voda i soda bikarbona

***uzorci prehrambenih boja pripravljeni su tako da je u tubicu dodan 1 mL glicerola, 1 mL destilirane vode i 5 kapi prehrambene boje

KORAK 1 Nastavnik je priredio agarozni gel tako da je u 150 mL pufera (0,2 %) otopio 1,5 g agara uz lagano zagrijavanje. U plastičnu kutijicu stavljen je češljić za jažice i ulivena sva vruća otopina te je sve ostavljeno neko vrijeme (30-45 minuta) kako bi se polimeriziralo.

KORAK 2 Napravi pufer tako da sodu bikarbonu sa satnog stakalca (0,3 g) otopiš u 150 mL destilirane vode. Nožićem lagano 1 cm od gornjeg i donjeg ruba kutije razreži gel i stavi elektrode.

KORAK 3 Nakon stavljanja elektroda, u posudu s gelom ulij priređeni pufer. Uz pomoć kapalica redom (zelena-plava-crvena) u jažice dodaj prehrambene boje (u svaku jažicu jedna prehrambena boja).

KORAK 4 Pet baterija spoji u seriju pomoću krokodil-hvataljki s elektrodama u kutijici. Ostavi 30 minuta. **Bilježi opažanja povremeno tijekom pokusa.**

_____

_____

_____

_____

_____

U području katode pojavljuju se mjehurići. Boje počinju putovati kroz gel. Nakon nekog vremena zelena se razdvoji na plavu i žutu. Na području anode javlja se smeđe obojenje. Nakon nekog vremena na katodi se pojavljuje plavo obojenje. Na kraju pokusa zelena je razdvojena na plavu i žutu, ali je njezina plava komponenta manje putovala u odnosu na žutu. Plava prehrambena boja nije se razdvojila, ali je putovala koliko i plava komponenta iz zelene prehrambene boje. Crvena prehrambena boja najdalje je otputovala kroz gel i nije se razdvojila na komponente.

PITANJE 1 Koja je uloga spajanja elektroda na izvor električne struje?

_____

Spajanjem elektroda na vanjski izvor struje kroz gel se uspostavlja električno polje.

PITANJE 2 Kako se naziva negativna, a kako pozitivna elektroda u sustavu?

_____

Negativna elektroda je katoda, a pozitivna je anoda.

PITANJE 3 Gdje se u sustavu nalazi katoda, ako znamo da se prehrambene boje sastoje od negativno nabijenih makromolekula?

_____

Negativno nabijene jedinke putuju prema pozitivnom polu pa je elektroda gdje su jažice katoda.

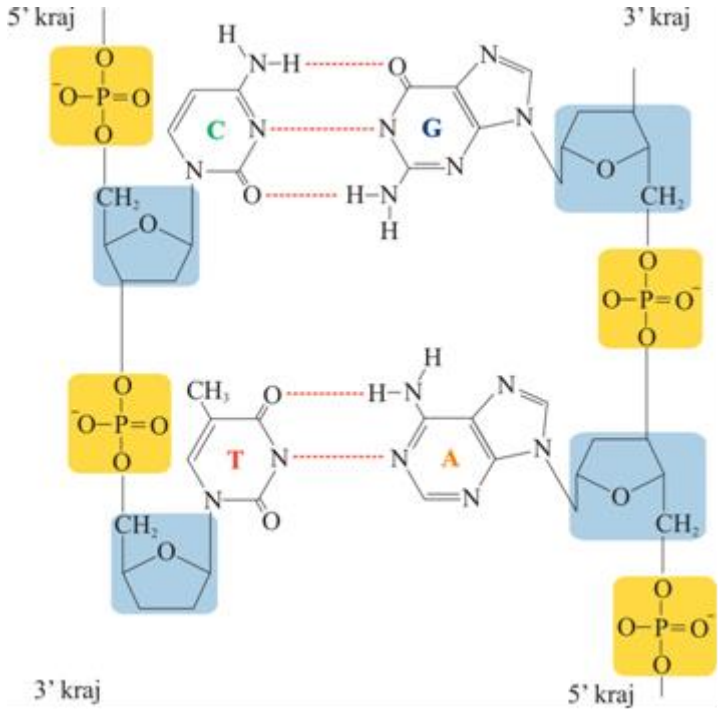
PITANJE 4 Putuju li sve molekule prehrambenih boja istom brzinom? Objasni.

Ne putuju, jer se ne sastoje od jednakih makromolekula.

PITANJE 5 Kako naboj i veličina molekule utječu na brzinu migracije?

Pod utjecajem električnog polja jedinke istog radijusa, a većeg naboja prevaljuju u određenom vremenu dulji put dok čestice manjeg radijusa, a istog naboja putuju brže.

PITANJE 6 Koja je molekula prikazana na slici?



(preuzeto: http://perpetuum-lab.com.hr/wiki/plab_wiki/biokemija/deoksiribonukleinska-kiselina-dna-r143/)

Molekula DNA.

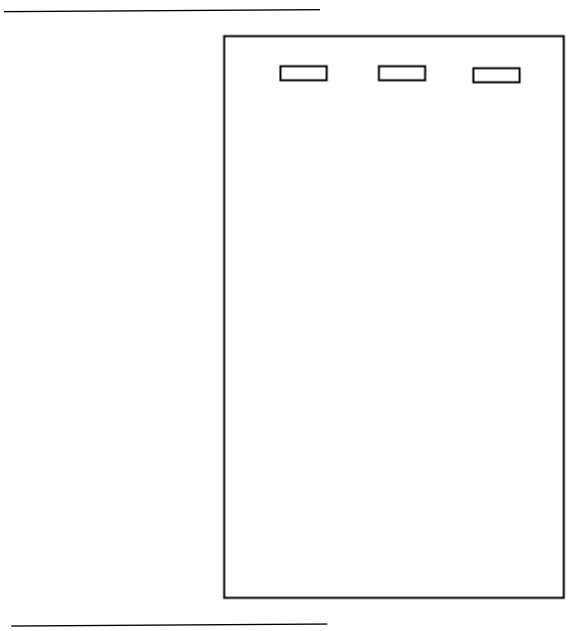
PITANJE 7 Kakav naboj ima molekula prikazana u zadatku 6? Objasni.

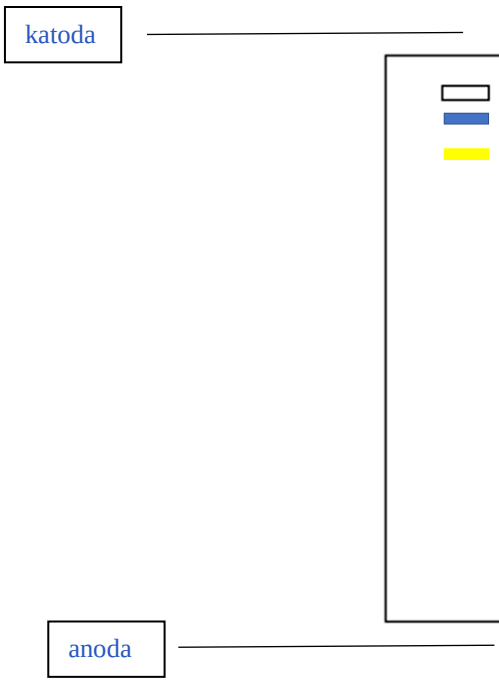
Molekula DNA ima negativan naboj. DNA je kiselina koja se sastoji od deoksiriboza između kojih se nalaze fosfatne skupine koje su odgovorne za negativan naboj.

PITANJE 8 U sustav, kakav je uporabljen u ovom pokusu stavljen je uzorak izolirane DNA, ali je zamijenjen položaj katode i anode. Što se dogodilo? Objasni.

Molekula DNA su negativno nabijene pa je cijeli uzorak iz gela prešao u pufer.

PITANJE 9 Na označene crte upiši odgovarajuće pojmove (katoda/anoda) i ucrtaj kako gel izgleda nakon sat vremena.





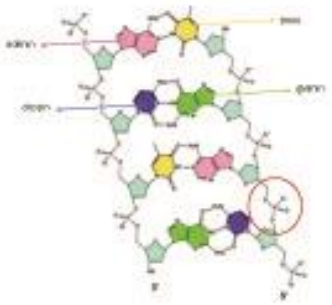
Redoslijed nanošenja prehrambenih boja (s lijeva na desno): zelena, plava i crvena.

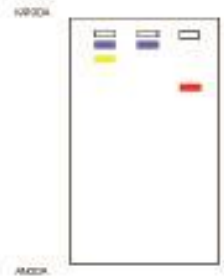
PITANJE 10 Zbog svoje jednostavnosti ova metoda nalazi široku primjenu u kemijskoj analizi, ali i u preparativnim tehnikama. Naročito je važna njezina primjena u biokemiji i molekularnoj biologiji u analizi, razdvajanju i pročišćavanju velikih molekula, kao što su molekule proteina i nukleinskih kiselina, te u separaciji jednostavnih molekulskih vrsta. Ova se tehnika naziva _____ (elektroforeza).





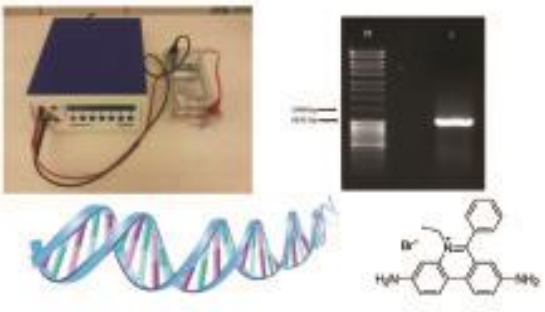








- kretanje električki nabijenih čestica kroz otopinu pod utjecajem električnog polja
- brzina kretanja ovisi o električnoj sili, električnom naboju, obliku i veličini čestice
- najvažnija metoda koja se koristi u molekularnoj biologiji









6. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Iva Zonjić

Datum rođenja: 1. lipnja 1994.

Mjesto rođenja: Metković

Obrazovanje

2001–2009 Osnovna škola Opuzen

2009–2013 Gimnazija Metković

2013–danas Integrirani prediplomski i diplomski sveučilišni studij biologije i kemije

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2015. Smotra Sveučilišta u Zagrebu (za Kemijski odsjek PMF-a SuZ)

2016. Otvoreni dan kemije (Dan i noć PMF-a)

2017. Otvoreni dan kemije (Dan i noć PMF-a)

2018. Otvoreni dan kemije (Dan i noć PMF-a)