

Utjecaj iona metala na aktivnost adenilosukcinat-sintetaze iz bakterije *Helicobacter pylori*; Priča o želatini i voću

Srnec, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:552993>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Karla Srnec

**UTJECAJ IONA METALA NA AKTIVNOST
ADENILOSUKCINAT-SINTETAZE IZ
BAKTERIJE *Helicobacter pylori***

PRIČA O ŽELATINI I VOĆU

Diplomski rad

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

Zagreb, 2021.

Eksperimentalni dio diplomskog rada izrađen je u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Ivane Leščić Ašler i neposrednim voditeljstvom Ante Bubića, mag. chem. Nastavnica imenovana od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec. Voditeljica metodičkog dijela diplomskog rada je izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš Sermek.

Eksperimentalni dio diplomskog rada izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Alosterički komunikacijski putevi u oligomernim enzimima (IP-2019-04-6764).

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Ivani Leščić Ašler na prilici za izradu eksperimentalnog dijela diplomskog rada, na podršci u pisanju i objašnjavanju, na ljubaznosti i strpljivosti u mojim propustima. Hvala i Anti Bubiću, mag. chem. na vodstvu kroz laboratorije i upoznavanju sa svijetom znanosti, kao i brznoj pomoći u pisanju ovog rada.

Zahvaljujem se i mentorici metodičkog dijela ovog rada, izv. prof. dr. sc. Draginji Mrvoš-Sermek, na svim sugestijama i ugodnoj suradnji.

Hvala svim mojim kolegama koji su studentske dane činili lijepima, posebno Ani, s kojom sam dijelila i znanje i život. Tri godine učenja bez tebe bile bi puno tužnije.

Hvala Korneliju na ekspresnoj tehničkoj pomoći, koja mi je skratila puna muka.

Veliko hvala mojoj obitelji, posebno mami i tati, na potpori, razumijevanju i strpljenju ovih godina. Zahvalna sam za svaki poziv, poruku, molitvu i mogućnostima koje su davale vrijednost studiranju.

Zahvalana sam i Teološkoj biblijskoj akademiji u Krapini na dobrodošlici proteklih semestara i podršku u studiranju na PMF-u. Posebno sam zahvalna profesorima (Stephen Coney, Walter Heaton, Todd Dick, Kristian Brackett...) na ljubaznosti, predavanjima, a najviše na primjerima života vjere kojima ste obogatili živote svih studenata i onih kojima služite. Hvala i Marku i Tanji Petek, koji također nesebično služe onima oko sebe. Hvala za prijateljstvo i dostupnost u svakom trenutku proteklih godina.

Hvala Alfonzu na požrtvovnosti i ustrajnosti koje su mi uzor u svakom trenutku, za vjeru u mene i za svijetlo koje donosiš svima oko sebe. Biti uz tebe je neprocijenjivo.

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Cilj rada	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. <i>Helicobacter pylori</i>	3
2.1.1. <i>Glavna obilježja H. pylori</i>	3
2.1.2. <i>Epidemiologija i patogeneza</i>	3
2.1.3. <i>Dijagnoza i liječenje</i>	5
2.1.4. <i>Metabolizam nukleotida</i>	6
2.2. Adenilosukcinat-sintetaza, AdSS	7
2.2.1 <i>Adenilosukcinat-sintetaza iz bakterije E. coli</i>	8
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. Materijali	10
3.1.1. <i>Standardne kemikalije</i>	10
3.1.2. <i>Enzimski supstrati</i>	10
3.1.3. <i>Proteinski markeri</i>	10
3.1.4. <i>Plazmidi i bakterijski sojevi za prekomjernu ekspresiju</i>	10
3.2. Prekomjerna ekspresija proteina	11
3.2.1. <i>Priprema hranjive podloge</i>	11
3.2.2. <i>Transformacija bakterijskih stanica</i>	11
3.2.3. <i>Priprema prekončne kulture</i>	12
3.2.4. <i>Ekspresija proteina</i>	12
3.3. Ekstrakcija proteina iz stanica	12
3.4. Pročišćavanje proteina	13
3.4.1. <i>Afinitetna kromatografija za pročišćavanje AdSS-His</i>	13
3.4.2. <i>Kromatografija ionske izmjene za pročišćavanje mutanata AdSS</i>	14
3.4.3. <i>Gel filtracijska kromatografija za pročišćavanje proteina AdSS-His i mutanata</i>	15
3.5. Koncentriranje proteina.....	16
3.6. Mjerenje koncentracije proteina	16
3.7. Mjerenje enzimske aktivnosti	16
3.8. Elektroforeza na gelu.....	18
3.8.1. <i>Priprema gelova za elektroforezu</i>	18

3.8.2. <i>Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)</i>	19
3.9. Određivanje kinetičkih parametara	20
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Pročišćavanje proteina	22
4.1.1. <i>Pročišćavanje AdSS-His</i>	22
4.1.2. <i>Pročišćavanje mutiranih inačica AdSS-D12A i AdSS-D12N</i>	24
4.2. Kinetički parametri	29
4.2.1. <i>Specifične aktivnosti pročišćenih uzoraka enzima</i>	29
4.2.2. <i>Kinetički parametri K_m i v_{max} u prisustvu iona Mg^{2+}</i>	30
4.2.3. <i>Ispitivanje utjecaja iona različitih metala na aktivnost AdSS</i>	32
§ 5. ZAKLJUČAK	34
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	35
§ 7. LITERATURNI IZVORI	36
§ 8. METODIČKI DIO	38
8.1. Uvod	38
8.2. Kemija kao nastavni predmet	39
8.2.1. <i>Cilj nastave kemije i organizacija predmetnog kurikuluma</i>	39
8.2.2. <i>Strategije poučavanja u nastavi kemije</i>	40
8.2.2.1. <i>Strategija poučavanja</i>	40
8.2.2.2. <i>Strategija učenja otkrivanjem</i>	40
8.2.2.3. <i>Sociološki oblici nastave kemije</i>	41
8.3. Priprema za nastavnike	42
8.3.1. <i>Teorijska podloga</i>	42
8.3.2. <i>Enzimi u nastavnom programu kemije</i>	46
8.3.3. <i>Kratki osvrt na udžbeničku literaturu</i>	48
8.3.4. <i>Učenička pogrešna shvaćanja u nastavnoj jedinici Enzimi</i>	50
8.3.5. <i>Učenička predznanja</i>	52
8.4. Priprema nastavnog sata	53
8.4.1. <i>Priprema pokusa</i>	54
8.4.2. <i>Nastavna priprema</i>	58
8.4.3. <i>Slike i sheme kojima nastavnik nadopunjuje sadržaj</i>	66
8.5. Zaključak	69
8.6. Literatura	70
§ 9. ŽIVOTOPIS	LXXII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

UTJECAJ IONA METALA NA AKTIVNOST ADENILOSUKCINAT-SINTETAZE IZ BAKTERIJE *Helicobacter pylori* PRIČA O ŽELATINI I VOĆU

Karla Srnec

Ovaj diplomski rad sastoji se od dva dijela: istraživačkog i metodičkog. U istraživačkom dijelu rada pročišćene su tri varijante enzima adenilosukcinat-sintetaze (AdSS) iz bakterije *Helicobacter pylori*: AdSS obilježen histidinskim privjeskom, AdSS kojem je aspartat 12 zamijenjen alaninom i AdSS kojem je aspartat 12 zamijenjen asparaginom. Za pročišćavanje su korištene kromatografija ionske izmjene, afinitetna kromatografija i gel filtracija. Proteinima su potom mjerene specifične aktivnosti, a za obilježen AdSS određeni su kinetički parametri uz promjenjivu koncentraciju iona Mg^{2+} koristeći *Michaelis-Menten* model enzimske kinetike. Konačno, ispitan je utjecaj različitih iona metala na aktivnost obilježenog AdSS.

U metodičkom dijelu rada pod naslovom „Priča o želatini i voću“ izrađena je metodičko-didaktička priprema za učenike četvrtog razreda gimnazije. Metodička priprema temeljena je na obrazovnim ishodima, najčešćim učeničkim krivim shvaćanjima i na uvodu u relevantnu literaturu. Pripremljeni materijal namijenjen je obrazovnoj strategiji učenja otkrivanjem.

(70 stranica, 34 slike, 10 tablica, 44 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: adenilosukcinat-sintetaza, enzimi, enzimska kinetika, *Helicobacter pylori*, pročišćavanje proteina, učenje otkrivanjem, želatina.

Mentor: dr. sc. Ivana Leščić Ašler, zn. sur., izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Neposredni voditelj: Ante Bubić, mag. chem.

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

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

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

3. izv. prof. dr. sc. Ivana Biljan

Zamjena: prof. dr. sc. Tajana Begović

Datum diplomskog ispita: 22. srpnja, 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

EFFECT OF METAL IONS ON ACTIVITY OF ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE FROM BACTERIUM *Helicobacter pylori* THE STORY OF GELATIN AND FRUIT

Karla Srnec

This Diploma thesis consists of two parts: the research and methodological part. In the experimental part of diploma work, three variants of enzyme adenylosuccinate synthetase (AdSS) from bacterium *Helicobacter pylori* were purified: AdSS with histidine tag, AdSS with aspartate 12 changed to alanine and AdSS with aspartate 12 changed to asparagine. Ion exchange, affinity and gel filtration chromatographies were used for purification. Specific activity was measured for each enzyme variant, and for tagged AdSS kinetic parameters were also determined, by changing Mg^{2+} ions concentration, and using *Michaelis-Menten* model of enzyme kinetics. Finally, the effect of different metal ions on tagged AdSS activity was investigated.

In the methodological part under the title “The story of gelatin and fruit” a didactic-methodological preparation was made for fourth grade high school students. The methodological preparation is based on the educational outcomes, common misconceptions held by students and with an insight in a relevant literature. The prepared material is intended for educational strategy of learning by discovery.

(70 pages, 34 figures, 10 tables, 44 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: adenylosuccinate synthetase, enzyme kinetics, enzymes, gelatin, *Helicobacter pylori*, learning by discovery.

Mentor: Dr. Ivana Lešćić Ašler ili Dr. Draginja Mrvoš-Sermek

Assistant mentor: Ante Bubić, mag. chem.

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Jasmina Rokov Plavec

Reviewers:

1. Dr. Jasmina Rokov Plavec
2. Dr. Draginja Mrvoš-Sermek
3. Dr. Ivana Biljan

Substitute: Dr. Tajana Begović

Date of exam: 22nd of July, 2021.

§ 1. UVOD

Helicobacter pylori je Gram-negativna bakterija koja kronično nastanjuje sluznicu želuca gotovo polovice svjetskog stanovništva. Obzirom da ima veliku ulogu u razvoju gastritisa, ulkusne bolesti (ranice na sluznici probavnog trakta) i raka želuca,¹ predmet je detaljnog istraživanja. Mikroaerofilna je bakterija, što znači da joj je za život potreban kisik, dok je previsoka koncentracija kisika pogubna za nju. Za razliku od većine patogenih bakterija, nema mogućnost opstanka izvan ljudskog domaćina, i zato je njen razvoj tijekom vremena postao usko povezan s promjenama koje se događaju u ljudskom tijelu. Uvjet života i replikacije bakterija (kao i svakog živog bića) je postojanje genetičke informacije, za koju su potrebne purinske i pirimidinske baze, koje izgrađuju nukleinske kiseline. Pojednostavljuvanjem genoma *H. pylori*, izgubljena je mogućnost sinteze purinskih nukleotida *de novo*, te se ova bakterija oslanja na sintezu purina reciklirajućim putem iz svoje okoline.² Obzirom na značaj sinteze purina i učinka koji ima na rast bakterijskih stanica, enzimi koji kataliziraju reakcije sinteze purina, bilo *de novo* ili spasonosnim putem, predmet su proučavanja, sa svrhom eradikacije infekcije.³

Jedan od ključnih enzima u sintezi purina je adenilosukcinat-sintetaza (AdSS), koja katalizira reakciju IMP i L-aspartata, sprežući ju s hidrolizom GTP za dobivanje energije, čiji je produkt adenilosukcinat, što čini prvi korak u sintezi nukleotida AMP. Zbog važne uloge u sintezi nukleinskih kiselina, ovaj enzim je prisutan u svim poznatim organizmima i tkivima, osim zrelih crvenim krvnim stanicama. U sisavcima su prisutna dva izozima AdSS, kiseli izozim (pI ~ 5,9) koji katalizira prvi korak *de novo* sinteze AMP, te bazični izozim (pI ~ 8,9) koji je komponenta spasonosnog puta sinteze nukleotida.⁴

AdSS je enzim iz skupine ligaza, koje u svojem aktivnom mjestu vežu dvije molekule, pri čemu se između njih formira nova kemijska veza. Tako, AdSS ima tri glavna vezna mjesta: jedno za GTP, jedno za IMP i treće je za aspartat. Vezanje IMP na AdSS uzrokuje konformacijske promjene koje su potrebne za organizaciju kompleksa Mg^{2+} -GTP.⁵ Ion Mg^{2+} smješta se u sredinu aktivnog mjesta i dolazi u interakciju s GTP (γ -fosfatnom skupinom), IMP i aspartatom.

1.1. Cilj rada

Za AdSS iz bakterije *Escherichia coli* pokazana je središnja uloga iona Mg^{2+} u vezanju svih supstrata u aktivno mjesto. Cilj ovog diplomskog rada je proučiti utjecaj iona metala na aktivnost AdSS iz *H. pylori*, određivanjem aktivnosti nativnog enzima i enzima s promijenjenom aminokiselinom u veznom mjestu za magnezij, te određivanjem aktivnosti u prisutnosti iona drugih metala, osim Mg^{2+} .

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. *Helicobacter pylori*

2.1.1. Glavna obilježja *H. pylori*

Godine 2005. dodijeljena je Nobelova nagrada za medicinu za izolaciju, identifikaciju i prepoznavanje patofizioloških posljedica bakterije koja ima mogućnost kroničnog inficiranja želučane sluznice. *Helicobacter pylori* je mikroaerofilna, Gram-negativna bakterija, spiralnog oblika, dužine oko 3,5 µm i širine oko 0,5 µm. Ima nekoliko flagela duljine oko 3 µm zbog kojih je dobro pokretna u viskoznom mediju, kao što je sluznica želuca. Bakterija ima mogućnost preživljavanja u kiselim uvjetima želuca (pH-vrijednost 1,5–3,5) zbog proizvodnje enzima ureaze, koji omogućuje pretvorbu uree u amonijak. Dobiveni amonijak služi kao bazna komponenta pufera, da bi se bakterija zaštitila od jako kiselog okruženja. Jednom kad se nastani u želučanoj sluznici, bakterija ima tendenciju dugotrajno kolonizirati domaćina ili uzrokovati kroničnu infekciju. *H. pylori* izaziva upalni i imunološki odgovor u tijelu čovjeka, što prati proizvodnja antitijela, međutim bakterija najčešće nije potpuno eliminirana takvim odgovorom organizma. Iduća pojava je kronična infekcija, najčešće kronični gastritis, a u nekim slučajevima i rak želuca.^{6,10}

2.1.2. Epidemiologija i patogeneza

Kako se bakterija najčešće nalazi u gustom sloju sluzi, u neposrednoj je blizini želučanih epitelnih stanica, koje proizvode želučanu sluz za zaštitu stijenke želuca. Oslabljenje sluzne barijere prisustvom *H. pylori*, u nekim slučajevima dovodi do njenog uništenja. Istraživanja *in vitro* predlažu da gubitak gelaste strukture sluznice može biti uzrokovan i visokom pH-vrijednosti pojedinih dijelova sluznice, zbog ureazne aktivnosti *H. pylori*, a ne njezinom razarajućom aktivnosti na sluznicu. Nadalje, *H. pylori* može i inhibirati odgovor stanica za izlučivanje sluzi, što uzrokuje smanjenje količine proizvedene sluzi, a čije izlučivanje je primarni obrambeni odgovor organizma.⁶ Svojstvo hidrofobnosti želučane sluzi povezuje se s njenom zaštitnom ulogom. Djelujući kao surfaktant, neizostavna je komponenta sluzne zaštite. Izlučena želučana sluz na svojoj površini ima adsorbiran jedan ili više slojeva površinski aktivnih fosfolipida. Istraživanje oštećenja sluzi kod čovjeka pokazuje kako *H.*

pylori agresivno uništava želučani surfaktant i smanjuje koncentraciju fosfolipida, te na taj način i svojstvo hidrofobnosti.⁷ Istraživanja *Helicobacter felis*, bakterijske vrste *Helicobacter* koja nastanjuje životinje (miševе, pse, mačke), pokazala su da infekcija bakterijom uzrokuje promjenu u želucu, mijenjajući sredinu iz hidrofobne u hidrofilnu i osjetljivu na kiselost, što može uzrokovati razvoj gastritisa.⁷ Prve promjene opažaju se već nakon 2 tjedna zaraze *H. felis*. Uništenje želučane sluzi postiže se enzimima koji hidroliziraju fosfolipide ili smanjuju broj adsorbiranih molekula surfaktanata. Općenito, prijanjanje uz sluzne površine je važno za virulentnost mnogih bakterijskih patogena u ljudskim domaćinima. Prijanjanje omogućuje infekciju bakterijskim toksinima, nakon čega najčešće slijedi probijanje epitelnih stanica domaćina. *H. pylori* prepoznaje specifične receptore epitelnih stanica, a prijanjanje je aktivni proces koji uključuje i transkripciju gena.⁷

Infekcija s *H. pylori* je najčešća bakterijska infekcija kod ljudi, a istraživanja pokazuju kako postoji značajna razlika u stopi zaraze između razvijenih i manje razvijenih dijelova svijeta. U razvijenijim dijelovima postotak zaraze iznosi: 20–40% populacije Europe, 25,4% populacije SAD-a i 20% populacije Australije. 90% populacije u Japanu rođenih prije 1950-ih također je zaraženo bakterijom, ali prisutan je značajni pad kod populacije rođene iza 2000-ih, do otprilike 2%. Ova niska stopa zaraze među japanskom populacijom povezuje se s niskom stopom raka želuca.⁶ Vjeruje se kako smanjenju zaraze doprinosi veće provođenje zdravstvenih mjera, pristup čistoj vodi i tretiranje infekcije antibioticima u razvijenim državama, posebice nakon 2. svjetskog rata. U manje razvijenim područjima poput Azije, Afrike, južne i središnje Amerike i istočne Europe, postotak zaraze iznosi 70–90%. Izvori zaraze su okolišni: životinje i voda. Kod ljudi, bakterija je pronađena u fekalijama, zubnom kamencu i želučanom soku, pa tako prijenos *H. pylori* može biti fekalno-oralni, oralno-oralni, želučano-oralni ili putem kontaminirane vode.⁷ Njena prisutnost u želučanoj sluzi povezana je s nižim socioekonomskim statusom, prenapučenosti, većim obiteljima, dijeljenjem kreveta s članovima obitelji i nedostatkom tekuće vode. Globalno, odrasle osobe imaju značajno veću stopu zaraze (48,6%), u usporedbi s djecom (32,6%). Bakterija se najčešće prenosi s čovjeka na čovjeka, što je vidljivo u tome da infekcija prevladava između bliskih članova obitelji. Nisu isključene genetske predispozicije za infekciju.^{6,8}

Kolonizacija želučane sluzi uzrokuje niz bolesti gornjeg dijela gastrointestinalnog trakta, ali bolesti pogađaju samo dio inficiranih osoba. *H. pylori* infekcija izaziva upalni odgovor i uzrokuje čir na želucu (oko 10% zaraženih), a povezana je s visokim rizikom

razvoja limfoma (uzrokovano promjenama u sluzi limfoidnog tkiva) i adenokarcinoma želuca (oko 1% zaraženih). Tako je 1994. godine Svjetska zdravstvena organizacija *H. pylori* klasificirala kao karcinogen 1. razreda.⁹

2.1.3. Dijagnoza i liječenje

Dijagnosticiranje *H. pylori* infekcije uključuje invazivne (endoskopija) i neinvazivne metode. Najčešće primjenjivan je serološki test koji koristi serum za detektiranje IgG antitijela proizvedenih kao odgovor tijela na *H. pylori*, koristeći analitičku tehniku ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Antitijela se u tijelu čovjeka zadržavaju i do 6–12 mjeseci nakon iskorjenjivanja zaraze, pa iako su serološki testovi jednostavni i pouzdani za dijagnostiku zaraženih pacijenata, nisu učinkoviti za dokazivanje prekida infekcije (prvih 6–12 mjeseci). Na serološki test ne utječe korištenje antibiotika, lijekova na bazi bizmuta ili inhibitora protonskih pumpa.⁶ Drugi načini testiranja na postojanje infekcije su: testiranje uzorka stolice ili testiranje daha ukoliko postoji značajna aktivnost enzima ureaze. Primjer invazivnog testa na *H. pylori* je biopsija sluzi gastroskopijom. Uzorak tkiva s biopsije dovodi se u kontakt s ureom i indikatorom pH-vrijednosti, te ukoliko je pacijent zaražen, ureaza oslobađa amonijak koji uzrokuje povećanje pH-vrijednosti i time se mijenja boja indikatora. Tkiva se također mogu ispitivati i histološki, pomoću svjetlosnog mikroskopa. Na široku rasprostranjenost seroloških testova utječe i njihova cijena koja je financijski najprihvatljivija, a najveći trošak predstavlja endoskopija.⁶

Infekcija *H. pylori* tretira se i antibioticima i drugim lijekovima. Najčešće korišteni antibiotici su amoksisilin, tetraciklini, metronizadol i klaritromicin. Od ostalih lijekova koriste se bizmut (bizmut subsalicilat u SAD-u) i inhibitori protonskih pumpa (omeprazol, esomeprazol, lanzoprazol i rabeprazol). Infekcija *H. pylori* je nažalost teško iskorijenjiva, a većina uspješnih terapija uključuje korištenje dvaju ili više antibiotika istovremeno sa jednim ili više ostalih lijekova, i to najčešće u relativno visokim dozama.⁹ Uspješno tretiranje pokazano je dugotrajnim terapijama. Nakon uspješnog tretiranja infekcije, pokazano je da među odraslim osobama postoji 0,44–2,3% vjerojatnosti ponovne infekcije.⁶ Bitno je napomenuti kako terapija nailazi na izazove zbog otpornosti bakterije, nepridržavanja terapije od strane pacijenata, nedostupnosti lijekova u nekim dijelovima svijeta, kao i same neučinkovitosti terapije u nekim slučajevima.⁹

Razvijeno je više novih metoda liječenja zaraze *H. pylori*. Antimikrobni peptidi su postali široko rasprostranjena zamjena za antibiotike. Nastaju iz stanica raznih organizama kao dio njihovog urođenog imuniteta, i omogućuju zaštitu od raznih patogena (bakterija, virusa, gljivica), a služe i kao posrednici odgovora imunosnog sustava gdje djeluju na anionske bakterijske membrane i povećavaju njihovu propusnost. Tako uzrokuju smrt bakterija, bez da oštećuju neutralne membrane eukariotskih organizama. Osim toga, mogu interferirati sa staničnim procesima bakterije, poput transkripcije, translacije ili izgradnje staničnog zida.⁹

Probiotici su čest dodatak prehrani kod ljudi, a u sebi sadrže žive mikroorganizme koji pozitivno utječu na crijevnu mikrofloru. Korišteni su kao dio prevencije, ali i liječenja gastrointestinalnih bolesti poput proljeva, sindroma iritabilnog crijeva i upalnih bolesti crijeva. Njihova upotreba temelji se na peptidnim i nepeptidnim tvarima koje proizvode, a koje inhibiraju rast patogena i njihovo prianjanje uz stjenku želuca. Probiotici se koriste u terapiji infekcije *H. pylori* u kombinaciji s antibioticima kako bi im se povećala učinkovitost.

U zadnje vrijeme se više pažnje posvećuje prirodnim pripravcima za tretiranje infekcije *H. pylori*, obzirom na malo nuspojava i nisku toksičnost lijekova. Primjer biljke koja se koristi, i čije djelovanje je dokazano u *in vivo* i *in vitro* istraživanjima, je *Bryophyllum pinnatum* (biljka autohtona Madagaskaru, a u narodu poznata kao vražji hrbat). Aktivnost proizlazi iz aktivnih spojeva prisutnih u metanolnim ekstraktima, poput fenola i flavonoida, koji reagiraju s hidroksilnim, anionskim superoksidnim i peroksi-lipidnim radikalima. Na taj način štite želučanu sluznicu protiv reaktivnih kisikovih vrsta tijekom infekcije *H. pylori*.⁹

2.1.4. Metabolizam nukleotida

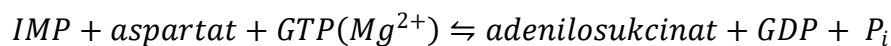
Važnu i raznoliku ulogu u životu stanice imaju nukleotidi. Prekursori su DNA i RNA, glavni su nositelji energije u obliku ATP-a i GTP-a, komponente su kofaktora NAD, FAD, koenzima A, imaju ulogu sekundarnog staničnog glasnika poput cAMP i cGMP i dr.¹¹ Postoje dva metabolička puta sinteze nukleotida: *de novo* i reciklirajući put. *De novo* sinteza nukleotida upotrebljava metaboličke prekursore (aminokiseline, riboza-5-fosfat, CO₂ i NH₃). Reciklirajući put koristi slobodne baze i nukleozide oslobođene tijekom razgradnje nukleinskih kiselina.¹¹ Kao rezultat koevolucije uz ljude, došlo je do pojednostavljivanja genoma *H. pylori*, pri čemu je nestala mogućnost biosinteze purinskih nukleotida. Bioinformatička analiza je pokazala kako ovoj bakteriji nedostaje skup enzima za *de novo*

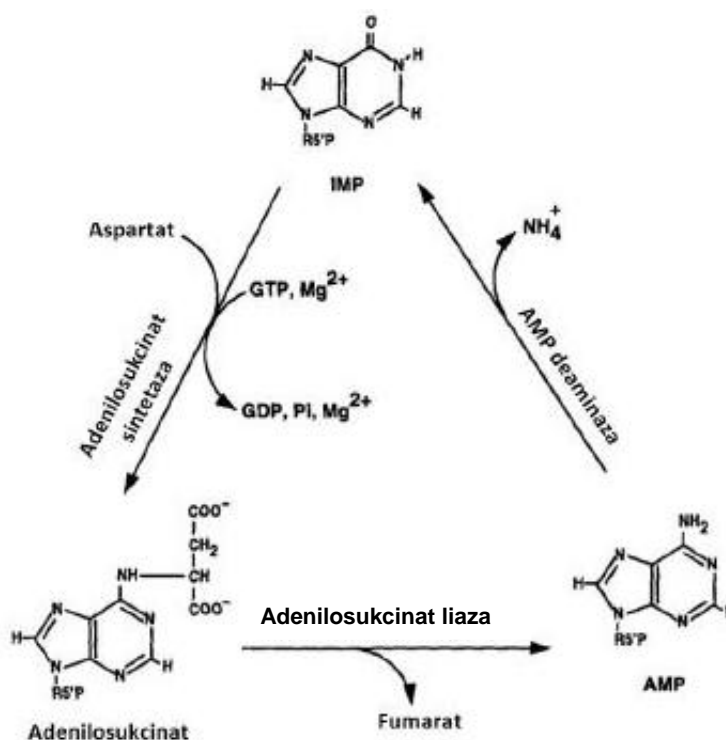
sintezu IMP-a, koji je prvi purinski nukleotid formiran pri sintezi GTP-a i ATP-a. To govori u prilog tome da se *H. pylori* značajno oslanja na sintezu nukleotida reciklirajućim putem.²

H. pylori je bila prva bakterija čija su dva različita soja sekvencirana, čime je omogućena bioinformatička analiza i usporedba genoma bakterijskih vrsta. Rezultati analize pokazali su relativno mali genom s raznim izmjenama metaboličkih putova.³ Kako se mikroorganizmi prilagođavaju novim okolinama, često prolaze kroz promjene genoma kroz koje gube gene koji im nisu potrebni u novoj okolini, a stječu nove gene koji su specifični za novi okoliš. Zbog stabilnog okruženja u ljudskom domaćinu, došlo je do gubitka gena za *de novo* sintezu purina, dok su se zadržali geni koji omogućuju sintezu purina reciklirajućim putem.³

2.2. Adenilosukcinat-sintetaza, AdSS

Adenilosukcinat-sintetaza je enzim koji se nalazi na poveznici *de novo* i reciklirajućeg puta sinteze purina. Ovaj enzim katalizira prvi korak sinteze AMP-a iz IMP-a, sprežući ju s hidrolizom GTP-a zadobivanje energije:





Slika 1. Enzimski katalizirana reakcija pretvorbe IMP-a i AMP-a.

R5'P na molekuli IMP-a označava ribozu-5-fosfat.

Adenylosukcinat-sintetaza katalizira pretvorbu IMP-a u adenylosukcinat, a potom ga adenylosukcinat-liaza cijepa do AMP-a (preuzeto i prilagođeno prema ¹²)

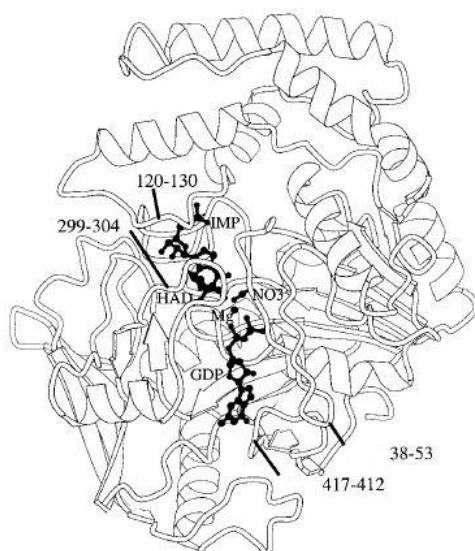
AdSS kod sisavaca postoji u dvije izoforme: kiseli i bazični izoenzim, a kod čovjeka je za sintezu purina *de novo* odgovoran kiseli izoenzim.⁴ Jednaku ulogu ima u organizmima koji koriste reciklirajući i *de novo* put biosinteze purina. U svrhu liječenja infekcije *H. pylori*, AdSS predstavlja potencijalnu metu inhibitora, zbog njezine ključne uloge u sintezi nukleotida, koji su neophodni za život bakterije.

2.2.1 Adenylosukcinat-sintetaza iz bakterije *E. coli*

Najviše istražen enzim AdSS je onaj iz bakterije *E. coli*. Taj protein u otopini postoji kao ravnotežna smjesa monomera (mase 47 kDa) i dimera (mase 2×47 kDa), s konstantom disocijacije dimera $K_d = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$. U prisutnosti liganada, većina proteina postoji u dimernoj formi. Procijenjena koncentracija monomera *in vivo* iznosi 1 mmol L^{-1} , što upućuje na to da je enzim aktiviran dimerizacijom, koju potiče vezanje supstrata.¹³

Smatra se da su mnogi aspekti katalitičkog mehanizma AdSS iz bakterije *E. coli* zajednički i enzimima AdSS iz drugih izvora.¹³ Enzim najprije stvara 6-fosforil-IMP iz Mg^{2+} -GTP i IMP u reakciji transfera fosforilne grupe. Za tu reakciju je potreban jedan ion Mg^{2+} koji intereagira s β - i γ -fosforilnim skupinama GTP-a. Drugi ion Mg^{2+} se može vezati za α -karboksilne skupine L-aspartata i bočnog lanca Asp13, time povećavajući afinitet enzima za Asp. Dakle, da bi se AdSS iz bakterije *E. coli* nalazio u aktiviranom obliku, potrebna su dva iona Mg^{2+} .

Usporedbom kristalnih struktura AdSS sa i bez liganada uočene su velike konformacijske promjene u petljama 38-50, 120-130, 299-304, 417-421 (slika 2.2.). Pomoću analoga L-aspartata, hadacidina, utvrđeno je da L-aspartat ne uspostavlja vodikove veze direktno s petljom 38-53, dok IMP formira jednu vodikovu vezu s Asn38, a Mg^{2+} -GDP formira šest vodikovih i metalokoordinirajućih veza s navedenom petljom. Prema tome se može zaključiti da kompleks Mg^{2+} -GDP inducira konformacijsku promjenu u petlji 38-53. Vodikove veze uspostavljene između Asn38 i 5'-fosforilne skupine IMP-a induciraju pomak za otprilike 1 Å, no krajnji dio petlje pomiče se za čak 9 Å. Konformacija je dodatno stabilizirana solnim mostom između Asp21 i Arg419.¹³ Pomak ove petlje utječe na pomak drugih navedenih petlji u aktivnu konformaciju AdSS, potvrđujući središnju ulogu iona Mg^{2+} u stvaranju katalitički produktivnog kompleksa.¹³



Slika 2. AdSS u konformaciji s ligandima – IMP, GTP, Mg^{2+} i analog L-aspartata (hadacidin, HAD) (preuzeto i prilagođeno prema ¹³)

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Amonijev persulfat, APS (*Carl Roth*), ampicilin (*Sigma-Aldrich*), barijev klorid (*Alkaloid Merck*), cinkov klorid (*Kemika*), dinatrijev hidrogen fosfat (*Carl Roth*), fenilmetilsulfonil fluorid, PMSF (*Sigma*), *N*-(2-hidroksietil) piperazin-*N'*-2-etansulfonska kiselina, HEPES (*Carl Roth*), imidazol (*Sigma*), izopropil- β -tiogalaktopiranozid, IPTG (*Ambion*), kobaltov(II) klorid (*Merck*), Luria-Bertani, LB medij (*Carl Roth*), magnezijev (II) klorid tetrahidrat (*Aldrich*), manganov(II) klorid (*Merck*), 2-merkaptoetanol (*Sigma*), metanol (*Kemika*), natrijev dodecilsulfat, SDS (*Merck*), natrijev dihidrogen fosfat (*Carl Roth*), natrijev klorid (*Kemika*), niklov(II) klorid (*Merck*), octena kiselina (*Kemika*), *N,N,N',N'*-tetrametiletan-1,2-diamin, TEMED (*Serva*)

3.1.2. Enzimski supstrati

L-asparaginska kiselina, Asp (*Alfa Aesar*), gvanozin 5'-trifosfat, GTP (*Sigma*), inozin 5'-monofosfat, IMP (*Sigma*)

3.1.3. Proteinski markeri

Marker molekulskih masa, PageRuler Unstained Protein Ladder (*Thermo Scientific*), marker molekulskih masa, Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards (*Bio-Rad*)

3.1.4. Plazmidi i bakterijski sojevi za prekomjernu ekspresiju

Na institutu Ruđer Bošković prethodno su pripremljena tri rekombinantna plazmida, pET21b(+)-AdSS-HisTag, te pET21b(+)-AdSS-D12A i pET21b(+)-AdSS-D12N. Za prekomjernu ekspresiju korišten je soj bakterije *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)RIL.

Rekombinantni plazmid pET21b(+)-AdSS-HisTag dobiven je ugradnjom gena *purA* za adenilosukcinat-sintetazu u ekspresijski plazmid pET21b(+), na način da protein na svojem C kraju ima dodanih šest histidina.

Rekombinantni plazmidi pET21b(+)-AdSS-D12A i pET21b(+)-AdSS-D12N su plazmidi koji također imaju ugrađen gen *purA* za enzim AdSS, s time da je u proteinu aspartat 12 zamijenjen alaninom, odnosno asparaginom. Ovi proteini se u ostatku ovog rada nazivaju AdSS-D12A, odnosno AdSS-D12N, ili pak zajedničkim imenom – mutanti.

3.2. Prekomjerna ekspresija proteina

3.2.1. Priprema hranjive podloge

Kruta hranjiva podloga pripremljena je otapanjem LB medija u destiliranoj vodi do koncentracije 5 g L^{-1} ekstrakta kvasca, 10 g L^{-1} triptona, 10 g L^{-1} NaCl uz dodatak agara, čiji je konačni udio iznosio 1,8%. Hranjiva podloga je sterilizirana u autoklavu 20 min na 120°C , a nakon hlađenja (na otprilike 50°C) dodan je ampicilin do konačne koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sterilne Petrijeve zdjelice se ispune podlogom (po 25 mL) i pospreme na 4°C .

Tekuća hranjiva podloga za uzgoj stanica je pripremljena na isti način, samo bez dodatka agara, te je dodan ampicilin do konačne koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2.2. Transformacija bakterijskih stanica

Transformacija bakterijskih stanica je proces u kojem strana molekula DNA, tj. rekombinantni plazmid, ulazi u stanicu. Transformacija je ovdje bila postignuta elektroporacijom, metodom u kojoj se otopina sa stanicama podvrgava jakom i kratkotrajnom električnom polju u trajanju od nekoliko milisekundi. Pore na membranama bakterijskih stanica se otvaraju i strana DNA ulazi u stanicu domaćina.¹⁴ Na ovaj način su u stanice *E. coli* uneseni rekombinantni plazmidi pET21b(+)-AdSS-HisTag, pET21b(+)-AdSS-D12A i pET21b(+)-AdSS-D12N.

U $40 \mu\text{L}$ elektrokompetentnih stanica *E. coli* soja BL21-CodonPlus(DE3)RIL dodan je $1 \mu\text{L}$ plazmidne DNA, koncentracije $80\text{--}110 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Suspenzija je potom prebačena u ohlađenu kivetu za elektroporaciju širine 2 mm i cijelo vrijeme držana na ledu. Izvršena je elektroporacija pri naponu od 2,5 kV na uređaju *Gene Pulser Xcell, Bio-Rad*. Nakon elektroporacije suspenzija stanica pomiješana je s 1 mL LB medija, bez antibiotika, i inkubirana 1 sat pri 37°C i 400 rpm. Po završetku inkubacije stanice su centrifugirane 1 min na $10000 \times \text{g}$. Nakon centrifugiranja, talog stanica bio je pomiješan sa $100 \mu\text{L}$ LB medija i

suspencija je bila nanosena na krutu hranjivu podlogu s ampicilinom konačne koncentracije $100 \mu\text{L mL}^{-1}$. Po završetku inkubacije (16 sati na 37°C) su transformacijske ploče spremljene na 4°C .

3.2.3. Priprema prekonoćne kulture

Za postavljanje prekonoćne kulture pripremljen je tekući LB medij. U alikvot od 5 mL doda se $5 \mu\text{L}$ ampicilina do konačne koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Potom se vrhom sterilnog nastavka za pipetu doda jedna bakterijska kolonija koja je narasla na krutoj hranjivoj podlozi u postupku transformacije. Stanice su inkubirane na 37°C uz rotaciju od 400 rpm preko noći.

3.2.4. Ekspresija proteina

Razmnožavanje bakterijskih stanica prati se očitavanjem vrijednosti optičke gustoće pri valnoj duljini od 600 nm, odnosno OD_{600} (engl. *optical density*). Pri vrijednosti OD_{600} u rasponu od 0,5 do 0,8 stanice se nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta i metabolički su najsposobnije. Tada je stanična kultura najpovoljnija za indukciju proteinske ekspresije.¹⁵

Pripremljeno je po 500 mL hranjivog medija za svaki rekombinantni plazmid, uz dodatak ampicilina do konačne koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. U svaku tikvicu dodano je po 5 mL prekonoćne kulture s određenim plazmidom i potom je slijedila inkubacija na 220 rpm pri 37°C dok vrijednost OD_{600} svakog uzorka nije iznosila oko 0,6. Potom su stanične suspenzije ohlađene, a da bi se inducirala ekspresija dodan im je IPTG, do konačne koncentracije $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Suspenzija induciranih bakterijskih stanica inkubirana je pri temperaturi od 16°C i brzini vrtnje od 180 rpm preko noći (oko 16 sati). Nakon ekspresije su stanice centrifugirane 20 min pri 4°C na $5000 \times g$.

3.3. Ekstrakcija proteina iz stanica

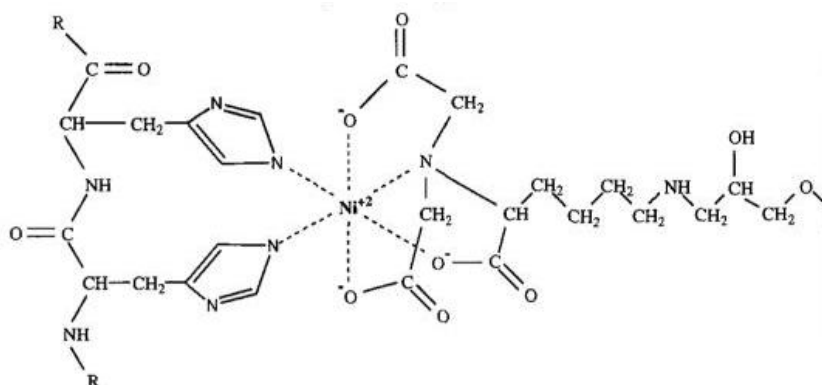
Kako bi ciljni proteini bili izolirani iz stanica bakterije *E. coli*, talog stanica bio je resuspendiran u puferu u omjeru 1:30 (1 g stanica u 30 mL pufera). Za resuspendiranje taloga stanica koje sadrže proteine AdSS-D12N i AdSS-D12A korišten je pufer sastava: 20 mmol L^{-1} , Tris-HCl, 0,05% β -merkaptetanol, pH-vrijednost 8,5. Za talog stanica koje sadrže protein AdSS-His korišten je pufer sastava: $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl, 10 mmol L^{-1} imidazol, $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ Na- PO_4 , pH-vrijednost 8,0. Potom je dodan inhibitor proteaza PMSF do konačne

koncentracije od $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, i suspenzija taloga stanica je podvrgnuta procesu razbijanja (lize) stanica. Stanice su lizirane na visokotlačnom protočnom homogenizatoru (*Avestin Emulsiflex C3*) koristeći pulsni tlak od 150 MPa. Nakon što je suspenzija stanica dva puta provučena kroz uređaj, ostatak razbijenih stanica je odvojen od ekstrakta proteina centrifugiranjem 40 min na $15\,000 \times g$, pri temperaturi od $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.4. Pročišćavanje proteina

3.4.1. Afinitetna kromatografija za pročišćavanje AdSS-His

Afinitetna kromatografija je rasprostranjena metoda izolacije proteina, koja je temeljena na velikom afinitetu proteina prema specifičnim malim molekulama. Za pročišćavanje proteina AdSS-His, korištena je afinitetna kromatografija na imobiliziranim ionima metala (eng. *immobilized metal affinity chromatography*; IMAC). Nikal-nitrilotriacetatna kiselina (Ni-NTA) je punilo kolone u kojem je nikal oktaedarski koordiniran, pri čemu četiri mjesta zauzimaju atomi trinitriloacetatne kiseline, a preostala dva mjesta ostvaruju interakciju sa atomima dušika iz imidazolnog prstena histidina. Metoda je temeljena na činjenici da protein AdSS-His na svojem kraju sadrži šest histidinskih ostataka (tzv. histidinski privjesak), koji ostvaruju koordinatnu vezu sa ionima nikla koji se nalaze u punilu kolone. Pri prolasku smjese različitih proteina oslobođenih iz bakterijskih stanica, protein AdSS-His, koji sadrži histidinski privjesak, se specifično veže na kolonu. Eluiranje proteina postiže se ispiranjem kolone s puferom koji sadrži imidazol, i koji zbog visokog afiniteta prema ionima nikla kompetira proteinu za vezno mjesto na koloni. Nespecifično vezani proteini ispiru se s nižom koncentracijom imidazola, a specifično vezani AdSS-His s višom.¹⁶



Slika 3. Model interakcije histidinskih afinitetnih privjesaka i nikal-nitrilotrioctene kiseline (slika preuzeto i prilagođeno prema ¹⁶)

Korišteno je 3 mL suspenzije Ni-NTA smole ($w = 50\%$), koja ima mogućnost vezanja 100 mg proteina. Smola je ekvilibrirana u puferu sastava: 500 mmol L⁻¹ NaCl, 50 mmol L⁻¹ Na-PO₄, 10 mmol L⁻¹ imidazol, pH-vrijednost 8,0. Nakon što je smola inkubirana s ekstraktom proteina 30 min na 4 °C, ulivena je u plastičnu kolonu. Kolona je isprana s 10 mL istog pufera i 10 mL pufera sastava: 500 mmol L⁻¹ NaCl, 50 mmol L⁻¹ Na-PO₄, 20 mmol L⁻¹ imidazol, pH-vrijednost 8,0 (da se isperu nespecifično vezani proteini). AdSS-His je eluiran s 10 mL pufera sastava: 500 mmol L⁻¹ NaCl, 50 mmol L⁻¹ Na-PO₄, 300 mmol L⁻¹ imidazol, pH-vrijednost 8,0. Protok kolone iznosio je 1 mL min⁻¹.

3.4.2. Kromatografija ionske izmjene za pročišćavanje mutanata AdSS

Kromatografija ionske izmjene je metoda pročišćavanja proteina koja koristi razliku u predznaku i iznosu ukupnog električnog naboja proteina pri zadanoj pH-vrijednosti. Kolona je ispunjena sintetskim polimerom koji sadrži vezane nabijene grupe. Zbog toga, pri prolasku nabijenih molekula koje se žele pročititi, dolazi do uspostavljanja elektrostatskih interakcija i privlačenja sa stacionarnom fazom. Afinitet svakog proteina prema nabijenoj grupi na koloni ovisi o pH-vrijednosti i koncentraciji soli u pokretnoj fazi. Protein koji se želi odvojiti iz smjese se veže za stacionarnu fazu, a s kolone se ispire povećanjem ionske jakosti (koncentracije natrijeva klorida) pufera. Razdvajanje proteina postiže se gradijentom soli u mobilnoj fazi.^{17,11}

Za kromatografiju ionske izmjene korišten je uređaj *ÄKTA FPLC* (*GE Healthcare Life Sciences*) i kolona *HiTrap Q FF* volumena 5 mL. Kolona je ekvilibrirana u puferu sastava: 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl i 0,05% β-merkaptetoanol, pH-vrijednost 8,5. Protok kolone iznosio je 1 mL min⁻¹. Nakon nanošenja uzorka kolona je isprana s 10 mL istog pufera, a elucija je postignuta linearnim povećanjem koncentracije NaCl do 0,5 mol L⁻¹ (50% pufera sastava: 1000 mmol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl i 0,05% β-merkaptetoanol, pH-vrijednost 8,5) u 50 mL, te sa 7 mL pufera sastava: 1000 mmol L⁻¹, 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl i 0,05% β-merkaptetoanol, pH-vrijednost 8,5. Prolazak proteina kroz kolonu praćen je promjenom apsorbanije UV zračenja pri valnoj duljini od 280 nm i skupljane su frakcije od po 1 mL.

3.4.3. Gel filtracijska kromatografija za pročišćavanje proteina AdSS-His i mutanata

Gel filtracija je kromatografska metoda pročišćavanja proteina koja odjeljuje molekule na temelju različitih molekulskih masa. Punilo kolone (stacionarna faza) je polimer koji se sastoji od malih sfernih čestica koje formiraju pore određene veličine. Mobilna faza je pufer koji prolazi između čestica kolone i na taj način ispiru molekule s nje. Molekule koje su manje od veličine pora mogu ući u njih i tako zaostaju na koloni, dok one molekule koje su veće od pora izlaze s kolone, ne zadržavajući se na njoj. U najmanjem volumenu mobilne faze s kolone izlaze najveće molekule, dok s povećanjem volumena mobilne faze izlaze sve manje molekule koje se zadržavaju u porama punila.¹¹

Za gel filtracijsku kromatografiju također je bio korišten uređaj *ÄKTA FPLC* (*GE Healthcare Life Sciences*) i kolona *Superdex 10/30 GL Increase*. Pri pročišćavanju proteina, kolona je ekvilibrirana u puferu sastava: 20 mmol L⁻¹ Hepes, 150 mmol L⁻¹ NaCl, pH-vrijednost 7,0. Na kolonu je nanoseno po 0,5 mL uzorka AdSS-His pročišćenog afinitetnom kromatografijom ili uzorka mutanata AdSS pročišćenih kromatografijom ionske izmjene. Protok je iznosio 0,5 mL min⁻¹ i skupljane su frakcije od po 0,75 mL. Prolazak proteina kroz kolonu praćen je promjenom apsorbanije UV zračenja pri 280 nm. Nakon gel filtracije su spojene frakcije uzoraka najveće koncentracije i centrifugirane 10 min na 20 000 × g, pri temperaturi od 4 °C.

3.5. Koncentriranje proteina

Uzorci prije pročišćavanja gel filtracijom i konačni uzorci proteina koncentrirani su do odgovarajućeg volumena za nanošenje na gel filtraciju ili do odgovarajuće koncentracije za pohranu uzorka. Koncentriranje proteina provedeno je koristeći metodu ultrafiltracije u kojoj se kroz celuloznu membranu odvajaju makromolekule od otapala. U ovom radu, za sve tri vrste proteina, korišten je koncentrat *Amicon Ultra* s veličinom pora od 30 kDa. Postupak je proveden u centrifugi *Universal 320 R (Hettich)*, u intervalima od po 3 min na $4500 \times g$ pri 4°C , sve dok nije bila postignuta željena konačna koncentracija proteina ili volumen uzorka.

3.6. Mjerenje koncentracije proteina

Po završetku pročišćavanja proteina, izmjerena je konačna koncentracija proteina na spektrofotometru *BioDrop DUO (BioDrop)*. Apsorbancija uzorka se mjeri pri 280 nm, a molarni apsorpcijski koeficijent za AdSS iznosi $38850 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$. Molarni apsorpcijski koeficijent određen je pomoću online alata *ProtParam*. Obzirom da se željeni uzorak proteina nalazi u puferu sastava: 150 mmol L^{-1} NaCl, 20 mmol L^{-1} Hepes, 0,05% β -merkaptotanol, pH-vrijednost 7,0, najprije je potrebno izmjeriti apsorbanciju samog pufera, a nakon tog početnog mjerenja, mjeri se apsorbancija proteina u puferu.

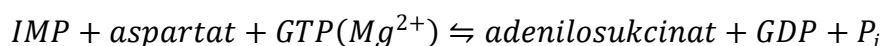
3.7. Mjerenje enzimske aktivnosti

Enzimi su biološki katalizatori, koji su uz izuzetak nekolicine katalitičkih RNA uglavnom proteini. Kao biološki katalizatori, oni osiguravaju da se reakcije u živim sustavima odvijaju odgovarajućom brzinom, obzirom da su uvjeti u stanici vrlo blagi (npr. pH-vrijednost, temperatura...). Kinetika enzima i njene osnovne jednadžbe omogućuju nam proučavanje i određivanje kinetičkih parametara enzimski kataliziranih reakcija, a to su Michaelisova konstanta (K_m) i maksimalna brzina reakcije (v_{max}). Također se određuje i specifična aktivnost enzima, koja je pokazatelj njegove čistoće. Jedna jedinica (U) enzimske aktivnosti definirana je kao količina nastalog produkta ili utrošenog supstrata enzimske reakcije (u μmol) u minuti, na 25°C , u danim uvjetima.

Specifična aktivnost izražena je u jedinicama enzimske aktivnosti po masi proteina (u mg) u uzorku – $U \text{ mg}^{-1}$.¹⁸ Korišten je Lambert Beerov zakon ($A=\epsilon \cdot c \cdot l$) da se izmjerena razlika

apsorbancije na 280 nm u 1 min prevede u koncentraciju nastalog adenilosukcinata. Množina nastalog produkta u reakcijskoj smjesi podijeljena je s masom proteina dodanog u reakcijsku smjesu kako bi se izračunala specifična aktivnost ($U\ mg^{-1}$).

Enzimska aktivnost AdSS-His i mutanata mjerena je na spektrofotometru *Camspec M509T* (*Camspec*) praćenjem promjene apsorbancije UV zračenja pri 280 nm (nastajanje adenilosukcinata), pri čemu je sastav standardne reakcijske smjese opisan u tablici 1. Reakcija koju katalizira enzim AdSS prikazana je jednadžbom:



Tablica 1. Sastav standardne reakcijske smjese korištene za mjerenje enzimske aktivnosti

Komponenta	c / mmol L ⁻¹	Volumen / μL
GTP	6	10
IMP	15	10
Asp	500	10
MgCl ₂	100	10
Pufer HEPES (pH=7,0)	200	100
Deionizirana voda	-	860

Da bi se izmjerila enzimska aktivnost, korištene su kvarcne kivete duljine puta 1 cm i ukupnog volumena od 1,4 mL. Najprije se mjeri apsorbancija slijepe probe (svih sudionika reakcije izuzev enzima), a zatim se u reakcijsku smjesu doda enzim i započne se mjerenje aktivnosti. Svako mjerenje je ponavljano dva puta i trajalo je po 180 s. Svi supstrati i enzim su držani na ledu za vrijeme mjerenja.

Za mjerenje aktivnosti AdSS-D12A, dodavano je 3 μL proteina, koncentracije 0,5 mg mL⁻¹ te 9,2 mg mL⁻¹. Za mjerenje aktivnosti AdSS-D12N, dodavano je 3 μL proteina, koncentracije 0,5 mg mL⁻¹ te 20 μL koncentracije 1,3 mg mL⁻¹. Za mjerenje aktivnosti AdSS-His, dodavano je 3 μL proteina koncentracije 0,5 mg mL⁻¹.

U svrhu određivanja utjecaja drugih dvovalentnih kationa na aktivnost AdSS-His, u reakcijsku smjesu su umjesto MgCl₂ dodavani kloridi drugih metala (Ba²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺), u istoj koncentraciji. U toj seriji mjerenja se u slučaju slabije enzimske aktivnosti povećavala koncentracija proteina dodavanog u reakcijsku smjesu, maksimalno 14,56 mg mL⁻¹, odnosno 43,7 μg proteina.

Promjena apsorbancije pri 280 nm prevedena je u enzimsku aktivnost pomoću ekstinkcijskog koeficijenta od $1,17 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ (nastajanje adenilosukcinata).¹⁹

3.8. Elektroforeza na gelu

3.8.1. Priprema gelova za elektroforezu

Da bi se nakon svakog provedenog koraka pročišćavanja uvjerali o čistoći proteinskih uzoraka, provodi se elektroforeza pri denaturirajućim uvjetima (engl. *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*). Elektroforeza se provodi na gelu koji se sastoji od dvije komponente: sabijajuće i razdvajajuće. Njihov sastav je prikazan u tablici 2.

Tablica 2. Sastav gelova za razdvajanje i sabijanje

Komponenta (koncentracija početne otopine)	Gel za razdvajanje (12,5%) Volumen komponente / mL	Gel za sabijanje (4%) Volumen komponente / mL
akrilamid / bisakrilamid (30%)	8	1,3
Pufer za razdvajanje: Tris-HCl ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 8,8) SDS (4 g dm^{-3})	5	-
Pufer za sabijanje: Tris-HCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,8) SDS (4 g dm^{-3})	-	2,5
APS (10%)	0,08	0,08
TEMED	0,01	0,01
glicerol (10%)	2	-
Deionizirana voda	5	6,2

Pri izradi gelova za elektroforezu, prvo se pomiješaju svi sastojci gela za razdvajanje, a važno je naglasiti da se amonijev persulfat (APS) i TEMED dodaju na kraju, neposredno prije izlivanja gelova. Kad su svi sastojci pomiješani, oni se odmah nanese između stakalca pomoću pipete do visine 1,5 cm ispod gornjeg ruba stakla. Obzirom da polimerizacija gela traje 30–45 minuta, na gel se dodaje destilirana voda kako bi se u međuvremenu zaštitio od

kontakta sa zrakom. Nakon što gel polimerizira, odlije se voda sa vrha i pomoću pipete doda gel za sabijanje (pripremljen na isti način kao gel za razdvajanje). Gel za sabijanje se nanese do gornjeg ruba stakla i u njega se uroni češalj koji služi formiranju jažica za nanošenje uzoraka na gel. Nakon 30–45 min, koliko je potrebno da gel polimerizira, češalj se pažljivo izvadi iz gela. Ako se, kao u našem slučaju, u gel za razdvajanje doda glicerol, nije potrebno čekati da se gel za razdvajanje polimerizira, nego se može oprezno na njega odmah naliti gel za sabijanje.

Nakon pripreve gela, uzorci koji se stavljaju na gel se pomiješaju sa puferom za obradu uzorka i inkubiraju 10 min na 98 °C. Pufer za obradu uzorka sadrži boju, bromfenol modrilo, koja služi vizualizaciji uzorka na gelu, a sastav pufera je prikazan u tablici 3.

Tablica 3. Sastav pufera za obradu uzorka prije elektroforeze.

125 mmol L ⁻¹ Tris-HCl, pH = 6,8
4% SDS
20% glicerol
2% β-merkaptetanol
bromfenol modrilo ($\gamma = 0,2 \text{ g L}^{-1}$)

3.8.2. Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)

Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu se koristi da bi pratili čistoću proteina nakon pojedinog koraka pri pročišćavanju, a kao što ime govori, potporni medij je poliakrilamid koji sadrži detergent natrijev-dodecilsulfat (SDS), koji uzrokuje da proteini zauzimaju oblik nasumičnog klupka. Gel sadrži i β-merkaptetanol koji osigurava da su disulfidni mostovi u proteinu reducirani. Većina proteina veže SDS tako da se na svake dvije aminokiseline veže jedna molekula SDS-a, pa tako svi proteini imaju jednak oblik i omjer mase i naboja, obzirom da je količina SDS-a vezanog po jedinici mase proteina konstantna. Naboj kompleksa protein-SDS je određen nabojem SDS-a, koji je negativan, i to omogućuje da se svi uzorci proteina na gelu kreću u električnom polju od negativne elektrode prema pozitivnoj. Ovisnost prevaljene udaljenosti uzorka o log M_r proteina daje pravac i na taj način možemo odrediti nepoznatu molekulska masu, ukoliko smo elektroforezi podvrgli i barem dva proteina poznate molekulske mase.¹¹

Gel elektroforeza je provedena na uređaju Mini-PROTEAN Tetra Cell (*Biorad*). Uzorci se nanese na gel u jažice koje su bile formirane prilikom polimerizacije gela i komore u uređaju se napune puferom za provođenje elektroforeze (25 mmol L⁻¹ Tris, 192 mmol L⁻¹ glicin, 0,1% SDS, pH-vrijednost 8,3). Uređaj za elektroforezu se potom priključi na izvor struje i prvih 15 min se elektroforeza provodi pri naponu od 120 V, a sljedećih 45 min pri naponu od 200 V. Nakon toga se gel oprezno izvadi iz stakalaca i stavi u Petrijevu zdjelicu u koju se doda otopina koja sadrži boju *Coomassie Brilliant Blue R-250* (tako da je sav gel uronjen) uz potresanje zdjelice 15 min na sobnoj temperaturi. Sastav boje za detekciju proteina nalazi se u tablici 4. Potom se gel prebaci u čašu s kipućom destiliranom vodom oko 10 min ili dok se ne ukloni višak boje sa gela. Na temelju proteinskih vrpca koje su vidljive na gelu ocjenjuje se uspješnost pročišćavanja proteina. Položaj AdSS na gelu možemo odrediti poznavanjem njegove molekulske mase, te molekulske mase markera molekulskih masa (koji se također nalaze na gelu).

Tablica 4. Sastav otopine *Coomassie Brilliant Blue R-250* za bojanje gelova nakon provedene SDS-PAGE elektroforeze.

Coomassie Brilliant Blue R-250 ($\gamma = 1 \text{ g L}^{-1}$)
octena kiselina ($\varphi = 0,10$)
metanol ($\varphi = 0,30$)

3.9. Određivanje kinetičkih parametara

Michaelisova konstanta (K_m) i maksimalna brzina reakcije (v_{max}) su parametri koji opisuju kinetiku enzimske katalizirane reakcije. Michaelisova konstanta (K_m) je definirana kao koncentracija supstrata pri kojoj brzina reakcije iznosi polovicu maksimalne vrijednosti, odnosno definira koncentraciju supstrata pri kojoj je zauzeta polovica aktivnih mjesta na enzimu. K_m govori o afinitetu enzima prema supstratu – što je niža, to je afinitet enzima prema supstratu veći, a ne ovisi o koncentraciji enzima. Maksimalna brzina reakcije (v_{max}) je brzina koja je postignuta kad su sva aktivna mjesta na enzimu zasićena supstratom. Ta brzina

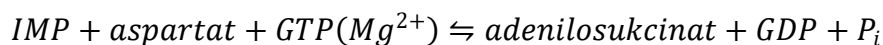
je postignuta kad je koncentracija supstrata puno veća od vrijednosti K_m . v_{max} ovisi o uvjetima pokusa poput pH-vrijednosti, temperaturi i ionskoj jakosti.²⁰

Kinetičke parametre računamo pomoću jednadžbe:

$$v_0 = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

gdje su v_0 početna brzina reakcije, v_{max} maksimalna brzina reakcije, K_m Michaelisova konstanta, a $[S]$ koncentracija supstrata.

Promatrana reakcija koju katalizira enzim AdSS je:



Pri provođenju eksperimenta kojim su određeni kinetički parametri reakcije, koncentracije IMP, aspartata i GTP su cijelo vrijeme bile iste (standardna reakcijska smjesa, vidi tablicu 1.). Koncentracija iona magnezija u reakcijskoj smjesi je mijenjana i iznosila je: 0,1 mmol L⁻¹, 0,2 mmol L⁻¹, 0,3 mmol L⁻¹, 0,4 mmol L⁻¹, 0,5 mmol L⁻¹, 0,7 mmol L⁻¹, 1 mmol L⁻¹, 2 mmol L⁻¹, 3 mmol L⁻¹. Dobiveni podaci su obrađeni u programu Excel (*Microsoft Office*) i *GraphPad Prism*.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

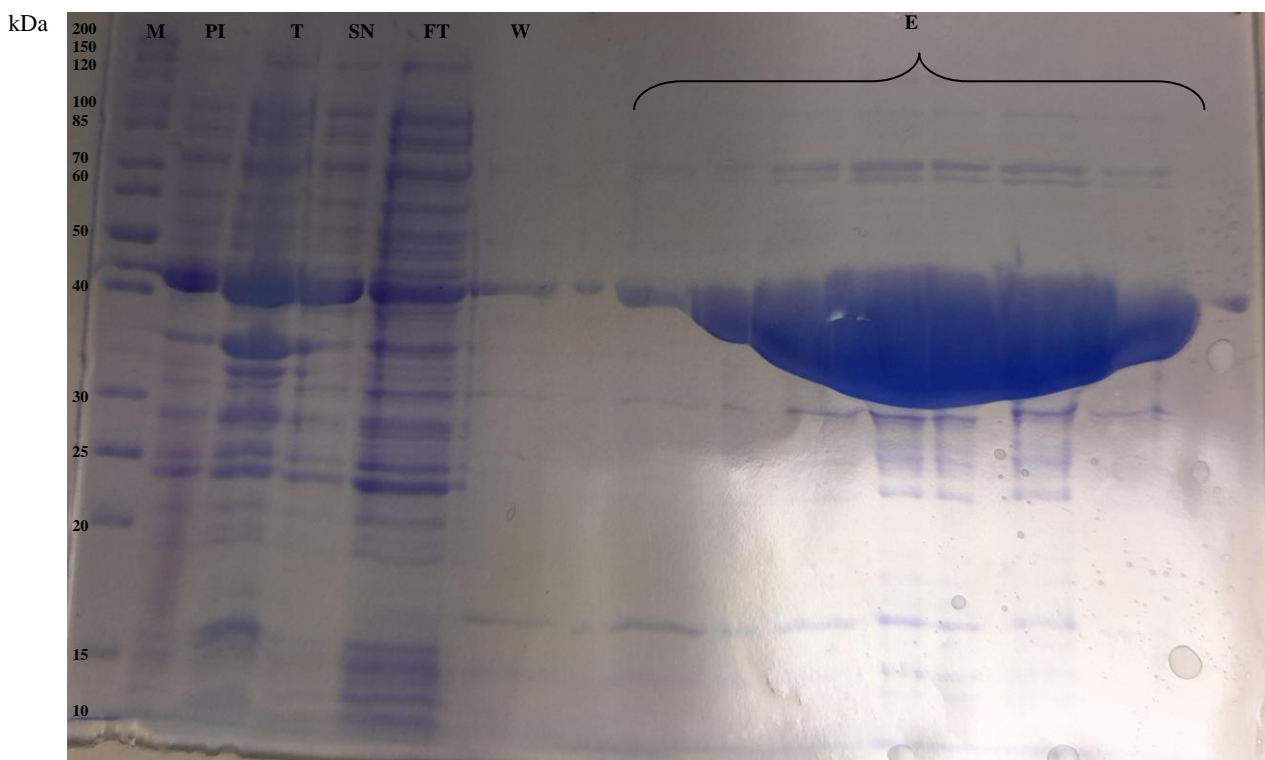
4.1. Pročišćavanje proteina

Kako bi se mogla provoditi kinetička mjerenja i uspoređivanje svojstava enzima, dotični enzimi moraju biti pročišćeni, bez drugih proteina koji bi mogli utjecati na rezultate mjerenja.

U ovom radu pročišćene su tri varijante enzima adenilosukcinat-sintetaze iz bakterije *Helicobacter pylori*: AdSS-His, AdSS-D12N i AdSS-D12A.

4.1.1. Pročišćavanje AdSS-His

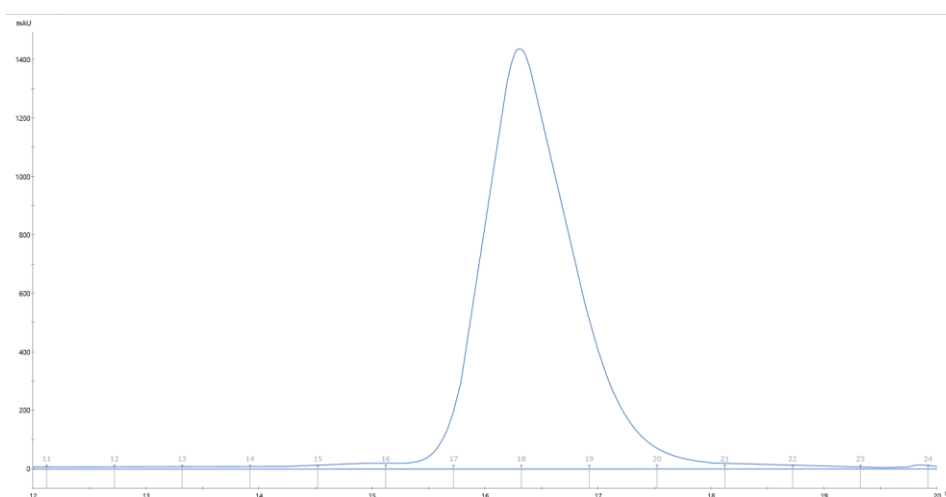
Nakon provedene ekspresije i lize bakterijskih stanica, AdSS-His je iz supernatanta pročišćen afinitetnom kromatografijom na koloni Ni-NTA, a učinkovitost pročišćavanja proteina je praćena SDS-PAGE elektroforezom. Rezultati gel elektroforeze pokazuju da je protein uspješno pročišćen već u prvom koraku (slika 4.)



Slika 4. SDS-PAGE elektroforeza na 12,5% poliakrilamidnom gelu provedena nakon pročišćavanja AdSS-His afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni. M- marker molekularskih masa, PI-stanice poslije indukcije, T-talog stanica nakon lize, SN-proteinski

ekstrakt (supernatant nakon lize), FT-nevezna frakcija, W-frakcije ispiranja, E-elucijske frakcije

Prema rezultatima elektroforeze, spojene su sve elucijske frakcije, jer su pokazivale veliki stupanj čistoće i količinu proteina. Te frakcije su spojene i koncentrirane pomoću filtera *Amicon Ultra*, s porama veličine 30 kDa. Idući korak u pročišćavanju proteina je gel filtracija, koja odvaja proteine prema njihovoj veličini. Kolona je prethodno ekvilibrirana u puferu sastava: 150 mmol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ HEPES, 0,05% β-merkaptotanol, pH-vrijednost 7,0. Praćena je apsorbancija UV zračenja pri 280 nm i time se prati prolazak proteina kroz kolonu. Kako je na korištenu kolonu moguće nanijeti najviše 0,5 mL uzorka (prema preporukama proizvođača), uzorak je pročišćen gel filtracijom u tri kromatografije. Kromatogram jedne od njih prikazan je na slici 5., a sve tri dale su veoma slične rezultate.

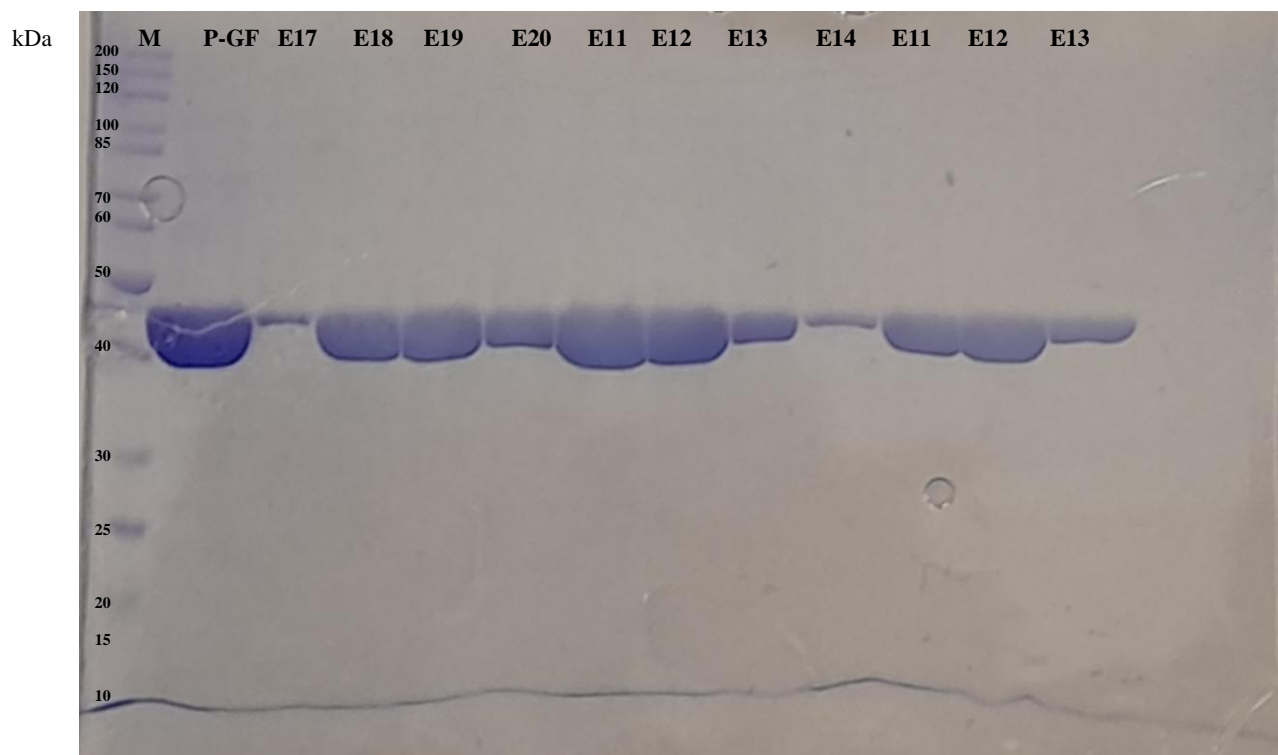


Slika 5. Kromatogram gel filtracije za uzorak proteina AdSS-His.

Plavom bojom na dnu označene su frakcije proteina.

AdSS-His se nalazi u frakcijama 17–20

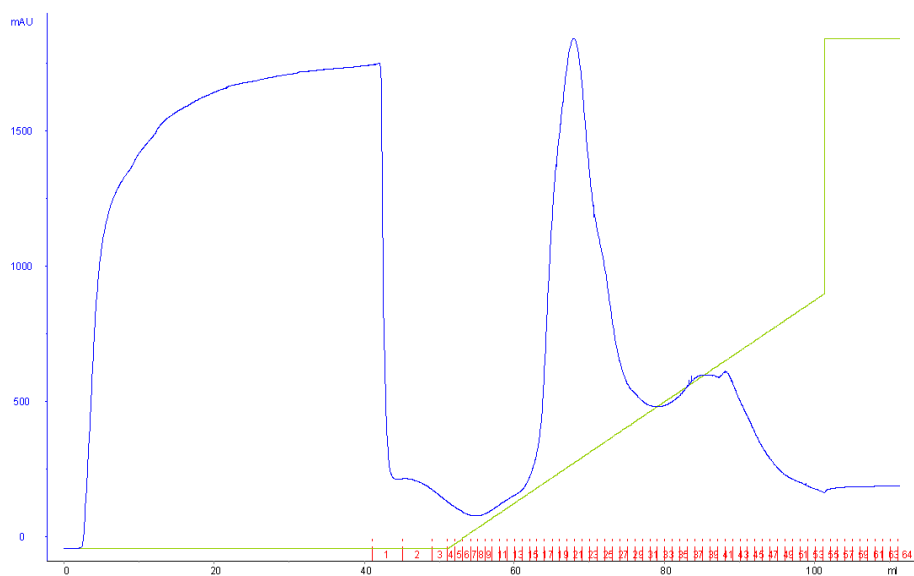
Uzorci dobiveni pročišćavanjem proteina gel filtracijom su analizirani SDS-PAGE elektroforezom. Na temelju rezultata elektroforeze (slika 6.), spojene su frakcije: E18–E20 (prva gel filtracija), E11–E13 (druga gel filtracija), te E11–E13 (treća gel filtracija). Za konačni uzorak proteina AdSS spojene su sve navedene frakcije, a konačna koncentracija AdSS iznosila je 26,12 mg mL⁻¹, volumena 840 μL. Uzorak proteina je razdijeljen u male epruvetice i pohranjen na –80 °C.



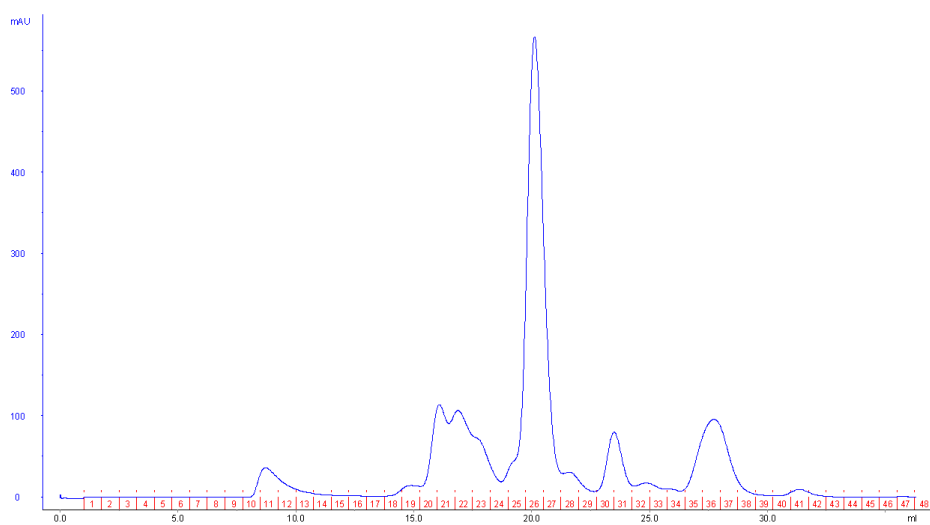
Slika 6. SDS-PAGE elektroforeza na 12,5% poliakrilamidnom gelu provedena nakon pročišćavanja AdSS-His gel filtracijom. M-marker molekularnih masa, P-GF-uzorak prije gel filtracije, E17–E20, E11–E14, E11–E13- frakcije dobivene prvom, drugom i trećom gel filtracijom

4.1.2. Pročišćavanje mutiranih inačica AdSS-D12A i AdSS-D12N

Nakon ekspresije i lize bakterijskih stanica, enzimi AdSS-D12A i AdSS-D12N su iz supernatanta pročišćeni kromatografijom ionske izmjene. Uzorci proteina AdSS-D12N i AdSS-D12A eluirani su sa kolone linearnim gradijentom NaCl u puferu sastava: 0,05% β -merkaptotanol, 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH-vrijednost 8,5. Na temelju kromatograma (slika 7.) odabrane su frakcije proteina AdSS-D12N 16, 17 i 18 koje su potom bile analizirane SDS-PAGE elektroforezom i dalje pročišćene gel filtracijom (slika 8.). Navedene frakcije su spojene i koncentrirane pomoću koncentratora *Amicon Ultra*, s veličinom pora od 30 kDa. Koncentracija uzorka proteina AdSS-D12N nakon ionske izmjene iznosila je 11,33 mg mL⁻¹, a volumen 500 μ L.



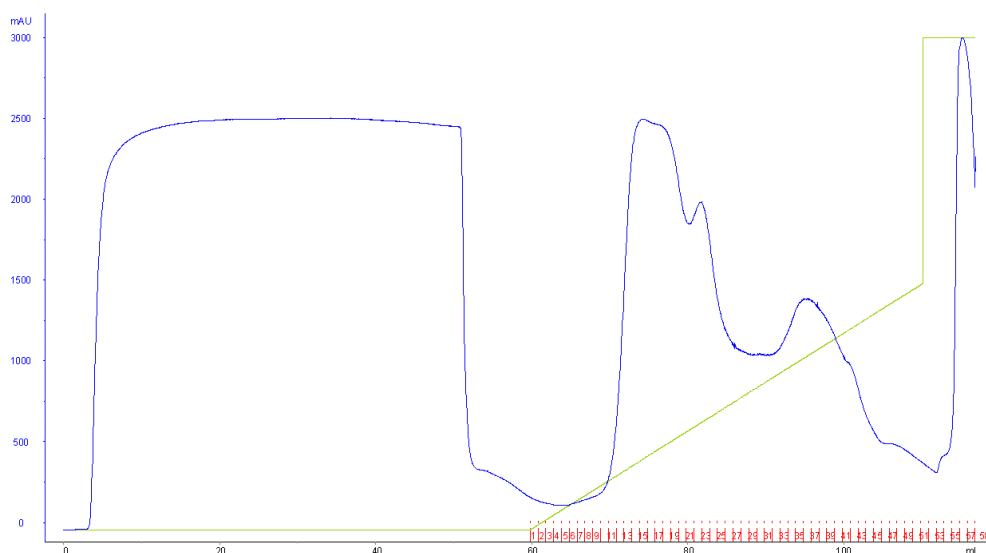
Slika 7. Kromatogram ionske izmjene za uzorak proteina AdSS-D12N.
Crvenom bojom označene su frakcije. AdSS-D12N se nalazi u frakcijama 16–18



Slike 8. Kromatogram gel filtracije za uzorak proteina AdSS-D12N.
Crvenom bojom označene su frakcije. AdSS-D12N se nalazi u frakcijama 21–22

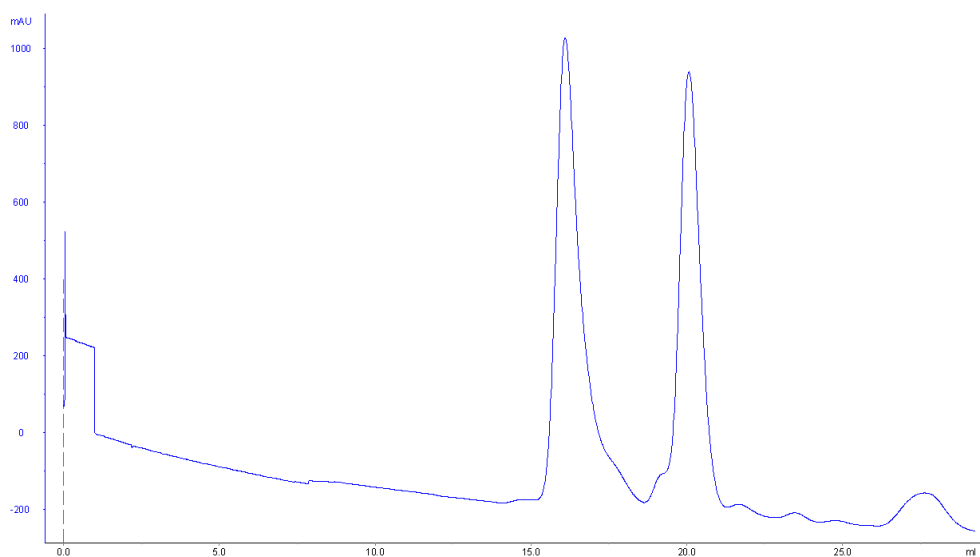
Frakcije 21–28 nakon pročišćavanja gel filtracijom su analizirane SDS-PAGE elektroforezom i na temelju rezultata, odabrana je frakcija 21 za pohranjivanje. Konačna koncentracija proteina AdSS-D12N iznosila je $1,29 \text{ mg mL}^{-1}$, a volumen je iznosio $50 \text{ }\mu\text{L}$. Uzorak proteina pohranjen je u malu eprueticu na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Na temelju kromatograma ionske izmjene (slika 9.) odabrane su frakcije proteina AdSS-D12A 12–16 koje su potom bile analizirane SDS-PAGE elektroforezom i dalje pročišćene gel filtracijom (slika 10.). Navedene frakcije su spojene i koncentrirane pomoću koncentratora *Amicon Ultra*, s veličinom pora od 30 kDa . Koncentracija uzorka proteina AdSS-D12A nakon ionske izmjene iznosila je 15 mg mL^{-1} , a volumen $1000 \text{ }\mu\text{L}$.



Slika 9. Kromatogram ionske izmjene za uzorak proteina AdSS-D12A.

Crvenom bojom označene su frakcije. AdSS-D12A se nalazi u frakcijama 12–16

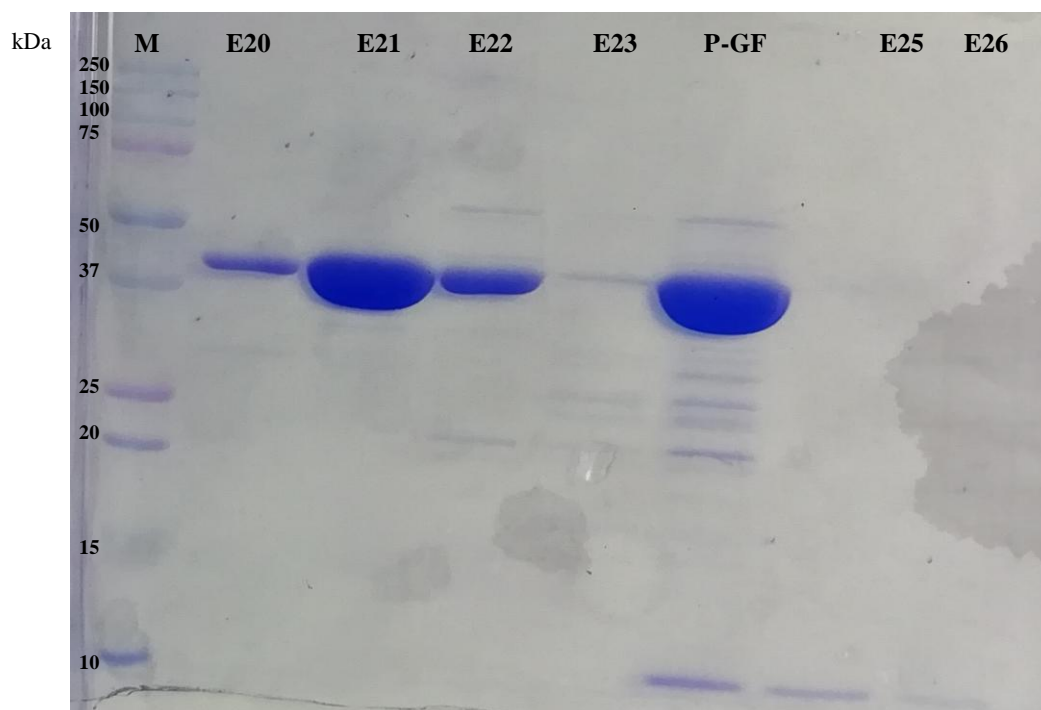


Slike 10. Kromatogram gel filtracije za uzorak proteina AdSS-D12A.

Na dnu kromatograma označene su frakcije.

AdSS-D12A nalazi se u frakcijama 20–21

Frakcije 20-26 nakon pročišćavanja gel filtracijom su analizirane SDS-PAGE elektroforezom i na temelju rezultata (slika 11.) odabrane su frakcije 20 i 21 za pohranjivanje. Konačna koncentracija proteina AdSS-D12A iznosila je $9,24 \text{ mg mL}^{-1}$, a volumen je iznosio $310 \text{ }\mu\text{L}$. Uzorak proteina pohranjen je u male epruvetice na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 11. SDS-PAGE elektroforeza na 12,5% poliakrilamidnom gelu provedena nakon pročišćavanja proteina AdSS-D12A gel filtracijom. M-marker molekulskih masa, E20–26-frakcije dobivene gel filtracijom, P-GF-uzorak prije gel filtracije

Usporedbom rezultata pročišćavanja sve tri vrste enzima AdSS možemo zaključiti da je za AdSS-His ekspresija bila najbolja, a i pročišćavanjem se dobilo najviše proteina (22 mg). U usporedbi s time, AdSS-D12A je dobiveno znatno manje (2,9 mg), a AdSS-D12N najmanje (0,065 mg), sve iz istog volumena bakterijske kulture (0,5 L). Već iz ovog rezultata možemo zaključiti o važnosti aminokiseline Asp12 za normalno smatanje i funkcioniranje AdSS, te o važnosti dotičnog enzima za diobu bakterijskih stanica.

4.2. Kinetički parametri

Enzimi su proteini koji kataliziraju (ubrzavaju) reakcije u živim organizmima. Značajka enzimski katalizirane reakcije je to da se ona događa na visoko specifičnom mjestu na enzimu koje se zove aktivno mjesto. U aktivnom mjestu enzima nalaze se aminokiselinski ostaci koji specifično vežu supstrate enzima i tako ih dovode u povoljan položaj za odvijanje reakcije, a također i sami pomažu odvijanje reakcije.

Za opisivanje kinetike enzimski kataliziranih reakcija možemo koristiti model reakcije *Michaelis-Menten*, koji opisuje brzinu reakcije pomoću izraza:

$$v_0 = \frac{v_m [S]}{K_m + [S]}$$

Može se vidjeti da se brzina reakcije (v) povećava s povećanjem koncentracije supstrata $[S]$. Ovaj izraz opisuje pravokutnu hiperbolu s asimptomom u $v = v_{max}$.¹¹

4.2.1. Specifične aktivnosti pročišćenih uzoraka enzima

Za sve tri pročišćene varijante enzima određivane su specifične aktivnosti uz standardne koncentracije supstrata (navedene u tablici 3.). U navedenim uvjetima AdSS-His je imao specifičnu aktivnost od $0,865 \text{ U mg}^{-1}$, što je u skladu s prethodno dobivenom vrijednosti za AdSS-His: $0,729 \text{ U mg}^{-1}$.¹²

Za razliku od AdSS-His, ni za AdSS-D12A ni za AdSS-D12N nije bilo moguće izmjeriti aktivnost u navedenim uvjetima. Niti uz 26, odnosno 27,6 μg proteina (u usporedbi s 1,5 μg za AdSS-His) nije zabilježena promjena apsorbancije 280 nm.

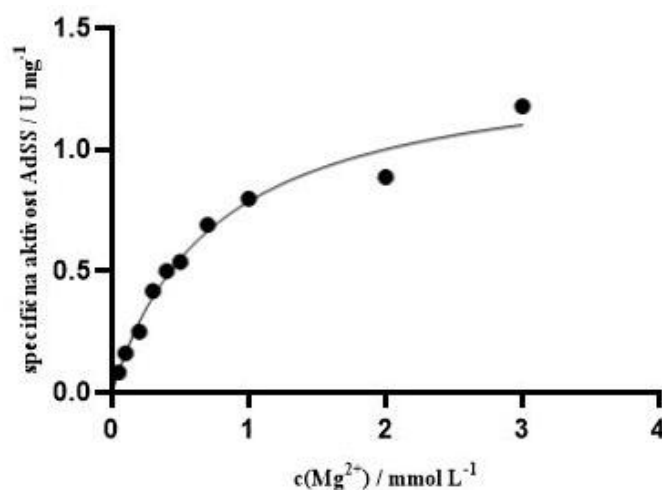
Nepostojanje aktivnosti u pripremljenim mutantima dokaz je ključne uloge Asp12 u mehanizmu djelovanja AdSS. Karboksilna skupina bočnog ogranka ove aminokiseline koordinira ion magnezija, za kojeg je pretpostavljeno da ima ključnu ulogu u stvaranju katalitički produktivnog kompleksa.⁴ Osim toga, pokazano je da mutant AdSS iz *E. coli* kojem je Asp13 (koji funkcionalno odgovara Asp12 u AdSS iz *H. pylori*) zamijenjen s Ala nema katalitičku aktivnost.²¹ Autori to objašnjavaju time da Asp13 ima ulogu katalitičke baze u mehanizmu djelovanja AdSS.²¹ U ovome je diplomskom radu pokazano i da bočni ogranak Asn ne može preuzeti ulogu Asp u aktivnom mjestu enzima, budući da niti enzim AdSS-D12N nije pokazao nikakvu enzimsku aktivnost.

4.2.2. Kinetički parametri K_m i v_{max} u prisustvu iona Mg^{2+}

Kinetički parametri za enzim AdSS-His određeni su metodom izolacije, gdje su koncentracije svih sudionika reakcije u velikom suvišku, osim jednog kojem se koncentracija mijenja. Koncentracije GTP, IMP, Asp i AdSS-His su uvijek bile jednake (navedene u tablici 1.), a mijenjana je koncentracija iona magnezija.

Program *GraphPad Prism 8* korišten je za određivanje kinetičkih parametara (v_{max} i K_m) nelinearnom regresijom. Dobivene su vrijednosti $K_m=0,752\pm 0,076$ mmol L⁻¹ i $v_{max}=1,377\pm 0,059$ U mg⁻¹.

U programu *GraphPad Prism 8* izrađen je graf koji prikazuje ovisnost specifične aktivnosti AdSS-His o koncentraciji iona magnezija. Iz priloženog grafa je vidljivo da enzimski katalizirana reakcija slijedi kinetiku *Michaelis-Menten* (slika 4.), te se ne opažaju indicije da bi ovaj enzim za katalizu trebao dva iona magnezija, kao AdSS iz *E. coli*.

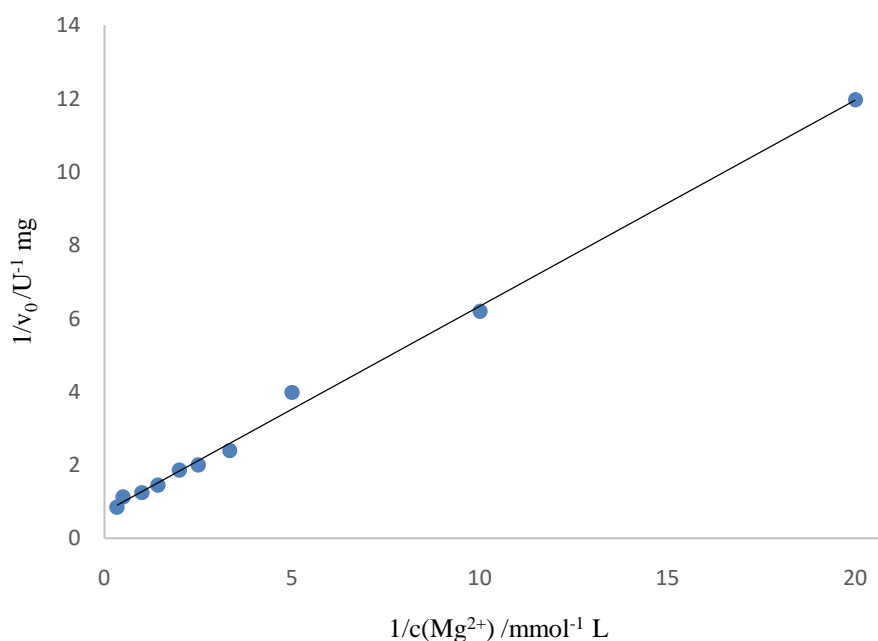


Slika 12. Graf ovisnosti specifične aktivnosti AdSS o koncentraciji iona magnezija dobiven nelinearnom regresijom prema modelu *Michaelis-Menten* u programu *GraphPad Prism 8*

Kinetički parametri (K_m i v_{max}) mogu se osim nelinearnom regresijom izračunati na način da se jednačina *Michaelis-Menten* linearizira i kinetički parametri izračunaju linearnom regresijom. Primjer lineariziranog oblika jednačine je *Lineweaver-Burkov* prikaz:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_m}$$

Koristeći program Excel (*Microsoft Office*) određeni su kinetički parametri za reakciju na ovaj način i oni iznose: $K_m = 0,784$ mM i $v_{max} = 1,395$ U mg⁻¹. Također je izrađen graf koji opisuje ovisnost recipročne vrijednosti početne brzine o recipročnoj vrijednosti koncentracije supstrata (slika 12.).



Slika 12. Grafičko određivanje K_m i v_{max} linearizacijom *Michaelis-Menten* jednačine u *Lineweaver-Burkovom* prikazu

Kinetički parametri dobiveni nelinearnom regresijom koristeći *Michaelis-Menten* model reakcije su točniji zbog obrade podataka koja primjenjuje manje matematičkih operacija na zadanom skupu podataka u odnosu na linearnu regresiju. Koeficijent korelacije za linearni prikaz *Lineweaver-Burkove* jednadžbe, koji govori o jačini povezanosti varijabla za zadani prikaz, iznosi $R^2 = 0,997$. Vrijednosti K_m i v_{max} dobivene na dva opisana načina u izvrsnom su slaganju, što ukazuje na veliku pouzdanost i točnost provedenih mjerenja.

4.2.3. Ispitivanje utjecaja iona različitih metala na aktivnost AdSS

Kako bismo vidjeli mogu li ioni drugih metala preuzeti ulogu magnezija u odvijanju reakcije koju katalizira enzim AdSS, izmjerena je specifična aktivnost AdSS-His prema standardnoj reakcijskoj smjesi (tablica 1.), ali u koju su umjesto $MgCl_2$ dodavani kloridi drugih dvovalentnih metala. Rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Specifične aktivnosti i postotak aktivnosti AdSS-His u prisustvu različitih metalnih iona

vrsta metalnog kationa	specifična aktivnost AdSS / U mg ⁻¹	% aktivnosti
Mn ²⁺	1,368	168,8
Mg ²⁺	0,810	100,0
Co ²⁺	0,137	16,9
Ca ²⁺	0,076	9,3
Ni ²⁺	0,027	3,3
Ba ²⁺	0,021	2,6
Zn ²⁺	0,000	0,0

Iz podataka prikazanih u tablici 5. vidljivo je kako AdSS-His u prisustvu iona mangana ima najvišu specifičnu aktivnost, s ionima magnezija također visoku, s ionima kobalta(II) i kalcija nisku, a s ionima nikla i barija gotovo zanemarivu. U prisustvu iona cinka AdSS-His u potpunosti gubi aktivnost.

Još je Lieberman 1956. ustanovio da AdSS iz *E. coli* ne pokazuje aktivnost bez iona metala u reakcijskoj smjesi, te da ioni Mn^{2+} i Ca^{2+} mogu donekle zamijeniti ione Mg^{2+} (aktivnost je bila 64, odnosno 40% od aktivnosti s Mg^{2+}), dok ioni Co^{2+} i Zn^{2+} ne mogu.²² U istom radu je određen K_m za ione Mg^{2+} od $\sim 0,8 \text{ mmol L}^{-1}$. Iako je za AdSS-His iz *H. pylori* u ovom radu određena približno ista K_m , vidimo da uzorak aktivnosti s različitim metalnim ionima nije isti za ova dva enzima.

Na temelju prikazanih podataka se zaključuje da je cink inhibitor enzima AdSS. Kang i Fromm su pokazali da je cink kompetitivni inhibitor AdSS iz *E. coli* obzirom na ion magnezija i aspartat, što upućuje na to da formira kompleks s aspartatom u aktivnom mjestu AdSS.²³ Da bismo to mogli ustvrditi za AdSS iz *H. pylori*, potrebna su dodatna mjerenja.

§ 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je proučiti utjecaj iona metala na aktivnost adenilosukcinat-sintetaze iz bakterije *Helicobacter pylori*, mjerenjem aktivnosti nativnog enzima i enzima s promijenjenom aminokiselinom u veznom mjestu za magnezij, te određivanjem aktivnosti AdSS u prisutnosti iona drugih metala.

Pročišćavanje enzima AdSS-His provedeno je u dva koraka, afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionima (IMAC) i gel filtracijom, čime je dobiven uzorak visoke čistoće. Inačice proteina AdSS, AdSS-D12A i AdSS-D12N, također su pročišćene u dva koraka. Prvi korak bio je kromatografija ionske izmjene, a drugi gel filtracija, čime su dobiveni uzorci visoke čistoće.

Za sve tri pročišćene varijante enzima određene su specifične aktivnosti enzima uz zasićujuće koncentracije supstrata. Specifična aktivnost AdSS-His iznosila je $0,865 \text{ U mg}^{-1}$. Za enzime AdSS-D12A i AdSS-D12N nije bilo moguće izmjeriti aktivnost u navedenim uvjetima, što ukazuje na važnost aminokiseline Asp12 u mehanizmu djelovanja ovog enzima.

Određivanjem kinetičkih parametara za enzim AdSS-His uz promjenjivu koncentraciju iona Mg^{2+} pokazano je da enzimska reakcija slijedi *Michaelis-Menten* model enzimske kinetike. Nelinearnom regresijom dobivene su vrijednosti $K_m=0,752\pm 0,076 \text{ mmol L}^{-1}$ i $v_{max}=1,377\pm 0,059 \text{ U mg}^{-1}$. Linearnom regresijom *Lineweaver-Burk* određeni su kinetički parametri $K_m=0,784 \text{ mmol L}^{-1}$ i $v_{max}=1,395 \text{ U mg}^{-1}$. Kinetički parametri dobiveni linearnom i nelinearnom regresijom su u izvrsnom slaganju.

Ispitivanjem utjecaja iona različitih metala na aktivnost AdSS-His pokazano je da je specifična aktivnost enzima najveća u prisustvu iona mangana, s ionima magnezija također visoka, s ionima kobalta(II) i kalcija niska, a s ionima nikla i barija gotovo zanemariva. Uz ione cinka enzim nije pokazao mjerljivu aktivnost, no inhibicijski utjecaj cinka potrebno je potvrditi dodatnim mjerenjima.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AdSS – adenilosukcinat sintetaza

AMP – adenzin monofosfat

APS – amonijev persulfat

Arg – arginin

Asn – asparagin

Asp –L-asparaginska kiselina

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

ELISA – engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

GDP – gvanozin 5'-difosfat

GTP – gvanozin 5'-trifosfat

HAD – hadacidin

HEPES – N-(2-hidroksietil) piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina

His – histidin

IMAC – kromatografija s imobiliziranim metalnim ionima

IMP – inozin 5'-monofosfat

IPTG – izopropil- β -tiogalaktopiranozid

LMW Marker – engl. *low molecular weight marker*

Ni-NTA – nikal-nitrilotriacetatna kiselina

OD₆₀₀ – optička gustoća kod 600 nm

PCR – engl. *polymerase chain reaction*,

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid

RNA – ribonukleinska kiselina

rpm – engl. *rounds per minute*

SDS – natrijev dodecilsulfat

SDS-PAGE – gel elektroforeza pri denaturirajućim uvjetima

TEMED – tetraetilmetildiamin

Tris – 2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol

U – jedna jedinica (U) enzimske aktivnosti definirana je kao količina enzima koji katalizira reakciju 1 μ mola supstrata u minuti, u danim uvjetima

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. R. K. Robinson, J. C. Atherton, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **16** (2021) 123–144.
2. G. L. Mendz, A. J. Shapley, *Arch. Microbiol.* **168** (1997) 448–456.
3. G. Liechti, J. B. Goldberg, *J. Bacteriol.* **194** (2012) 839–854.
4. R. B. Honzatko, *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* **73** (1999) 57–102.
5. Z. Hou, W. Wang, H. J. Fromm, R. B. Honzatko, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 5970–5976.
6. R. L. Gebhard, K. H. Gebhard, *Immigrant medicine*, W. B. Saunders, Philadelphia, 2007, str. 427–436.
7. H. L. T. Mobely, G. L. Mendz, S- L. Hazell, *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, ASM Press, Washington (DC), 2001.
8. M. Zamani, F. Ebrahimitabar, V. Zamani, W. H. Miller, R. Alizadeh-Navaei, J. Shokri-Shirvani, M. H. Derakhshan, *Aliment. Pharmacol. Ther.* **47** (2018) 868–876.
9. P. Roszczenko-Jasińska, M. I. Wojtyś, E. K. Jagusztyn Krynicka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104** (2020) 9891–9905.
10. H. Suzuki, H. Mori, *J. Gastroenterol.* **53** (2018) 354–361.
11. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, W.H. Freeman, New York, 2003.
12. A. Petek, *Utjecaj afinitetnog privjeska iz adenilosukcinat-sintetaze iz bakterije Helicobacter pylori*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020, str. 9.
13. R. B. Honzatko, H. J. Fromm, *Arc. Biochem. Biophys.* **370** (1999) 1–8.
14. H. Potter, R. Heller, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **62** (2003), 9.3.1. –9.3.6.
15. <https://www.bmglabtech.com/measure-microbial-growth-using-the-od600/> (datum pristupanja 23. ožujka 2021.)
16. J. A. Bornhorst, J. J. Falke, *Methods Enzymol.* **326** (2010) 245–254.
17. C.A. Pohl, E.L. Johnson, *J. Chromatogr. Sci.* **18** (1980) 442–452.
18. <https://www.biomol.com/resources/biomol-blog/guide-to-enzyme-unit-definitions-and-assay-design> (datum pristupanja 15. lipnja 2021.)
19. F.B. Rudolph, H.J. Fromm, *J. Biol. Chem.* **244** (1969) 3832–3839.

-
20. https://www.uniprot.org/help/biophysicochemical_properties (datum pristupanja 16. lipnja 2021.)
21. C. Kang, N. Sun, B. W. Poland, A. Gorrell, R. B. Honzatko, H. J. Fromm, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 11881–11885.
22. I. Lieberman, *J. Biol. Chem.* **18** (1980) 442–452.
23. C. Kang, H. J. Fromm, *J. Biol. Chem.* **270** (1995) 15539–15544.

§ 8. METODIČKI DIO

Priča o želatini i voću

8.1. Uvod

Kemijske promjene događaju se neprekidno kako bi održale sve oblike života na Zemlji: od jednostavnih bakterija do kompleksnih sustava poput čovjeka. Na putu razumijevanja procesa koji omogućuju život na našem planetu, veliku ulogu imale su spoznaje o prirodi kemijskih reakcija koje upravljaju životom svake stanice. Razumijevanje temeljnih principa biokemije daje mogućnost da razumijemo kako: (a) živi organizam funkcionira i održava se na životu, (b) pogreške u tim procesima uzrokuju nepovoljne ishode poput bolesti, (c) tretirati bolesti pomoću lijekova i sl. Učenici će spoznaje o kemijskim promjenama najlakše upamtiti na temelju vlastitog iskustva, a znanstvene koncepte o njima usvajati tijekom formalnog obrazovanja kroz koje ih vode nastavnici predmeta *Kemija*. Glavni cilj nastave kemije je da se na temelju manjeg broja odabranih pojava i problema razvije razumijevanje temeljnih kemijskih pojmova i teorija.¹ Odgovornost nastavnika je da u skladu s kurikulumom kroz svoju nastavu odabire pokus/pokuse koji će učenicima omogućiti vlastito iskustvo na putu izgradnje kemijskih koncepcija, temeljenih na prethodno usvojenim pojmovima i sadržajima. Kako bi nastavnik kemije bio uspješan i kompetentan, potrebno je da je stručan u poznavanju kemije, kao i metodičkim vještinama potrebnima da vodi učenike kroz procese usvajanja nastavnog sadržaja.

Cilj metodičkog dijela ovog diplomskog rada je potaknuti buduće nastavnike da u planiranju pokusa kojima učenike uvode u nove kemijske pojmove, koriste primjere iz svakodnevnog života, kako bi učenici vidjeli primjenu znanja, a učene sadržaje prenijeli u iskustveno i trajno konceptualno znanje. Materijalna sredstva u planiranju nastave ne bi trebala biti problem obzirom da se koriste 'kemikalije' iz svakodnevnog života. Predloženi metodičko-didaktički materijal za nastavnu jedinicu *Enzimi* temeljit će se na tri razine prikaza

pojma (makroskopskoj, čestičnoj i simboličkoj) i uključiti pokus osmišljen po uzoru na Lundqvista.²

8.2. Kemija kao nastavni predmet

8.2.1. Cilj nastave kemije i organizacija predmetnog kurikulumuma

Kemija se u Republici Hrvatskoj poučava kao zaseban nastavni predmet u sedmom i osmom razredu osnovne škole, gdje se nastavlja na temelje postavljene kroz ranije poučavane nastavne predmete Priroda i društvo i Priroda. Također je općeobrazovni predmet u srednjoškolskim gimnazijskim programima tijekom četiri godine. Cilj nastave kemije je steći znanje o osnovnim kemijskim teorijama koje se temelji na vještinama opažanja, znanstvene komunikacije prikazivanja opaženog te rasuđivanja, u kojem učenik raspravlja o opaženom i donosi zaključke.³ Ono što objedinjuje sve ove korake je kemijski pokus, koji je najvažnije 'sredstvo' pri učenju i poučavanju kemije. Osnovnoškolska nastava kemije teži: (a) razvijanju navika donošenja zaključaka o pojavama u prirodi temeljem pokusa, (b) stjecanju vještina planiranja i izvođenja jednostavnih pokusa, (c) shvaćanju osnovnih fizikalnih i kemijskih svojstava, (d) proučavanju kemijske građe živih tvari, (e) razumijevanju osnovnih kemijskih pojmova i drugog znanja koje objašnjava svakodnevni život i pojave. Srednjoškolska nastava kemije fokusirana je na: (a) razvijanje navika uočavanja promjena te njihova promatranja i mjerenja, (b) razvijanju znanstvenog pristupa objašnjavanja pojava, (c) uočavanju veze između pokusa i teorije, (d) razvijanju sposobnosti pisanog i usmenog izražavanja, itd.

Kao temeljna znanost koja proučava svojstva i građu tvari, pretvorbu jedne tvari u drugu te izmjenu energije do koje pritom dolazi, kemija se poučava u četiri organizacijska područja: *Tvari, Promjene i procesi, Energija i Prirodoznanstveni pristup*. Prva tri su veliki koncepti kemije kao znanosti, dok je prirodoznanstveni pristup uveden zbog potrebe da učenici razviju eksperimentalne i matematičke vještine. Učenike se time potiče na promišljanje o međudjelovanju različitih prirodnih sustava i usvaja se prirodoslovna pismenost. Predviđena satnica za predmet u osnovnoj i srednjoj školi je dva sata tjedno, odnosno 70 školskih sati godišnje.¹

8.2.2. *Strategije poučavanja u nastavi kemije*

Didaktičke strategije predstavljaju skup nastavnih metoda i postupaka za ostvarivanje odgojno-obrazovnih ciljeva u nastavi. Nastavne metode i načini su koraci koji potiču učenike u nastavnom procesu (primjerice razgovorom, usmenim izlaganjem). Kako cilj nastavnika i učenika ne bi trebao biti zapamćivanje velikog broja slučajnih podataka, nastavni proces treba biti usmjeren na učenje vlastitom aktivnošću prilikom kojeg se potiče misaoni proces, kojim dolazi do spoznaje koju odabrana aktivnost želi dokazati. U prirodnoznanstvenom području su, prema tome, dominantne strategije učenja otkrivanjem i poučavanjem.¹

8.2.2.1. *Strategija poučavanja*

Poučavanje u nastavi kemije služi uvođenju učenika u pojmove i koncepte koji su im nepoznati u tom trenutku i koji ne mogu biti naučeni samo izvodeći neku aktivnost (npr. pokus), već trebaju biti izloženi izravnom poučavanju od strane nastavnika. Postoje tri metode kojima se može implementirati strategija poučavanja:

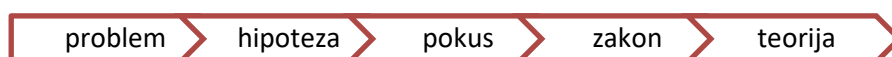
- 1) Problemsko poučavanje polazi od definiranja problema uz pomoć učenika, pregled dostupnih informacija (može uključivati rezultate pokusa, demonstraciju) te njihovo kombiniranje koje vodi do rješenja problema te evaluacija rješenja.
- 2) Heurističko poučavanje također polazi od problema, a nastavnik postupno vodi učenika do konačnog rješenja. Najčešće se to čini u dijalogu, a stavlja naglasak na usvajanje kemijske nomenklature, uvođenje pojmova i utvrđivanje stečenog znanja.
- 3) Programirano poučavanje nastoji umanjiti razliku brzine kojom pojedini učenici usvajaju gradivo, pa tako svaki učenik dobiva već isplaniran program koji slijedi, u kojem nakon svakog koraka dobiva povratnu informaciju.

8.2.2.2. *Strategija učenja otkrivanjem*

Učenje otkrivanjem ili iskustveno učenje polazi od toga da učenik uočava problem, definira ga pomoću vlastite aktivnosti u pronalasku rješenja, izvođenja zaključka i nalaženja rješenja. Cilj učenja otkrivanjem je da učenik do spoznaje dolazi vlastitim iskustvom pomoći tri metode: istraživanjem, projektom i simulacijom.

Istraživanje se provodi u nekoliko etapa: uočavanje i definiranje problema, postavljanje hipoteze, prikupljanje podataka, uočavanje zakonitosti u koju se prikupljeni

podaci uklapaju, objašnjavanje rezultata pokusa pomoću teorije i potom određivanje je li hipoteza točna ili netočna. Metoda istraživanja u nastavi ima centar u pokusu (eksperimentu) koji izvode učenici i time dolaze do spoznaja koje su za njih nove, a prije već utvrđene u znanstvenim istraživanjima. Razlika između znanstvenog i učeničkog istraživanja je u tome što znanstvenici postavljenu teoriju provjeravaju (novim) eksperimentima i prema rezultatima modificiraju teoriju, dok učenici na nastavi kemije dolaze do teorije i tu staju.¹



Slika M1. Etape istraživanja u nastavi kemije

8.2.2.3. Sociološki oblici nastave kemije

Škola je jedan od primarnih oblika socijalizacije i zbog toga je važan dio nastavnog procesa za učenike. Kao takva, može imati veliki utjecaj na kvalitetu usvajanja nastavnog sadržaja. Cilj nastavnika je aktivirati učenika u procesu nastave, čime bi se omogućio razvoj kreativnog intelektualnog rada. Oblik rada koji je dugo dominirao na nastavi kemije je *frontalni oblik* koji je usmjeren na nastavnika, a u kojem učenici samo slušaju objašnjenje ili demonstriranje sadržaja. Dominantna jednostrana komunikacija nije dovoljna da bi se dostatno ostvarili odgojno-obrazovno ciljevi i zato se ovakav oblik nastave ne smije stalno primjenjivati. Mjesto koje takav oblik rada ima u nastavi kemije je najčešće pri izvođenju demonstracijskih pokusa, korištenje grafoskopa ili računala, videozapisa, modela i slično.

Kako bi se omogućila dvosmjerna komunikacija u učenju, učenici se mogu organizirati u grupni oblik rada ili rad u parovima. Tako je omogućeno veće komuniciranje među učenicima i rad je usmjeren na učenika, gdje oni zajedno donose odluke o tijeku istraživanja, vode rasprave i zajedno dolaze do zaključaka analizirajući rezultate pokusa. U grupnom obliku rada razred je podijeljen u više grupa po pet ili šest učenika gdje svi zajedno slijede upute prema kojima najčešće izvode grupni učenički pokus, a nastavnik za to vrijeme obilazi grupe. Tako nastavnik više nema glavnu ulogu u učenju, već je ona predana učenicima. Ovakav način poučavanja je manje zastupljen zbog pomanjkanja sredstava ili vremena uvjetovanog organizacijom nastave u školama, a u današnje vrijeme epidemije Covida-19 i zbog toga što se nastava ne provodi uživo u školi već *online*.

8.3. Priprema za nastavnike

8.3.1. Teorijska podloga

Koloidni sustavi su disperzne heterogene smjese građene od disperzne faze i disperznog sredstva. Disperzna faza je tvar koje ima manje i koja je dispergirana, tj. raspršena u disperznom sredstvu, tvari koje ima više. Prema veličini čestica, disperzni sustavi dijele se na:

- fino disperzne sustave ili prave otopine (čestice < 1 nm),
- koloidne sustave (1- 100 nm) i
- grubo disperzne sustave (čestice > 100 nm).

Obzirom na agregacijska stanja disperzne faze i disperznog sredstva, neke od vrsta koloidnih sustava (s kojima se učenici u gimnaziji susreću) su: *gel/sol*, *emulzija*, *pjena*, *aerosol*.

U ovom radu promatrale su se vrste sustava koji opisuju želatinu, a to su: *sol* – koloidni sustav u kojem je disperzna faza čvrsta, a disperzno sredstvo tekuće, i *gel* – mrežasti sustav u kojem je uklopljeno tekuće disperzno sredstvo.

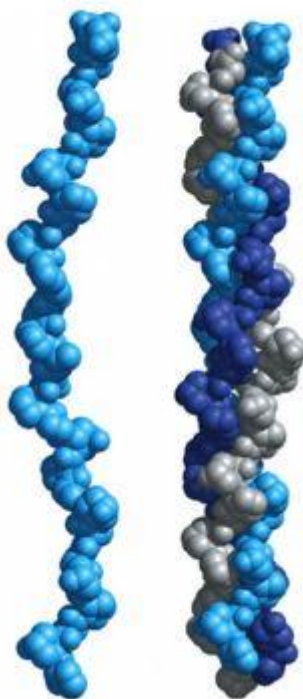
Sol je koloidni sustav u kojem se čvrste dispergirane čestice nalaze u tekućem disperznom sredstvu. Zbog male veličine disperzne faze, djelovanje gravitacijske sile na koloidne čestice je zanemarivo, a kretanje relativno slobodno. Liofilni koloidi, kakva je želatina u vodi, su koloidi koji pokazuju veliki afinitet prema otapalu koje ih obavija i stvara zaštitni sloj oko čestica dispergirane faze. Za slučaj kad je dispergirana faza voda, takav sustav se naziva hidrosol.

Gel je sustav mrežaste strukture u kojem je uklopljeno tekuće disperzno sredstvo, a nastaje hlađenjem viskoznog liofilnog sola. Gel se može opisati kao trodimenzionalna polučvrsta mrežasta struktura, gdje je tekuća faza u termodinamičkoj ravnoteži s čvrstom mrežom i zbog toga ne prelazi spontano iz mrežaste strukture natrag u sol. S druge pak strane, *sol* može spontano ili hlađenjem prijeći u gel stanje.

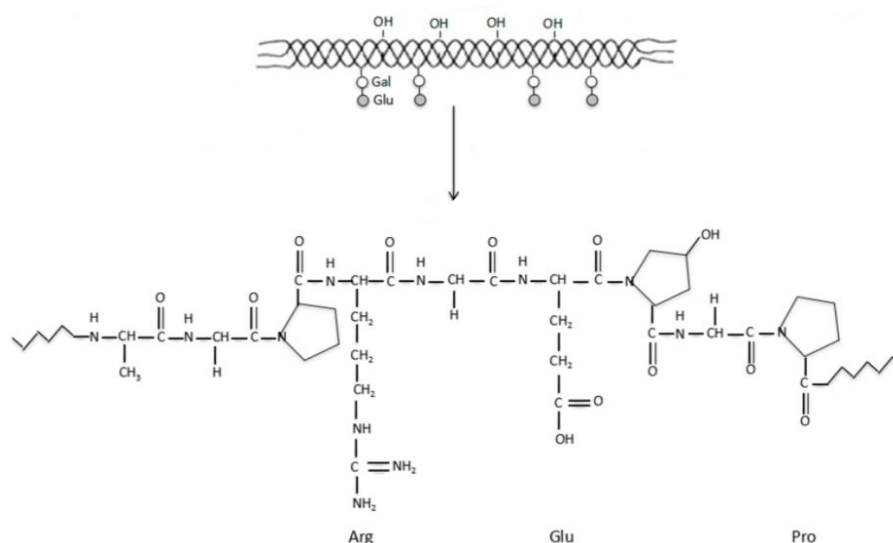
Želatina koja se koristi u pokusu opisanom za nastavni sat dolazi u obliku praha, a stajanjem u vodi počinje bubriti, što je pojava kada osušeni gel veže veliku količinu otapala. Nabubrena želatina je konzistencije sličnoj gelu. Zagrijavanjem prelazi u sol koji je viskozan, a hlađenjem prelazi u stanje gela. Opisani proces naziva se geliranje (ili sol-gel proces), a karakterizira ga nagli porast u viskoznosti sustava.⁴⁻⁶

Želatina je proteinski termoreverzibilni polimer. Proteini su velike organske molekule građene od niza aminokiselinskih ostataka povezanih peptidnom vezom, a razlikujemo četiri

stupnja strukture proteina. Prva je primarna struktura koja govori o slijedu aminokiselinskih ostataka u proteinskom lancu. Sekundarna struktura podrazumijeva visoko uređene strukture polipeptidnih lanaca poput α -zavojnica ili β -ploča. Prostorni raspored elemenata sekundarne strukture naziva se tercijarna struktura, a složenija struktura više polipeptidnih lanaca naziva se kvaterna struktura. Želatina se dobiva iz kolagena, najzastupljenijeg proteina u tijelu, koji je ključna strukturna komponenta mnogih tkiva poput tetiva i kostiju. Kolagen je građen od triju polipeptidnih lanaca koji se međusobno isprepliću i na taj način formiraju čvrstu i stabilnu trostruku zavojnicu. Trostruke zavojnice dalje su organizirane u snopove kolagenskih vlakana. Iznimna čvrstoća kolagena potiče od visokog stupnja organizacije. Hidrolizom (denaturacijom) kolagena, u uvjetima povišene temperature, gube se elementi sekundarne, tercijarne i kvaterne strukture i dolazi do odmotavanja triju lanaca.⁵

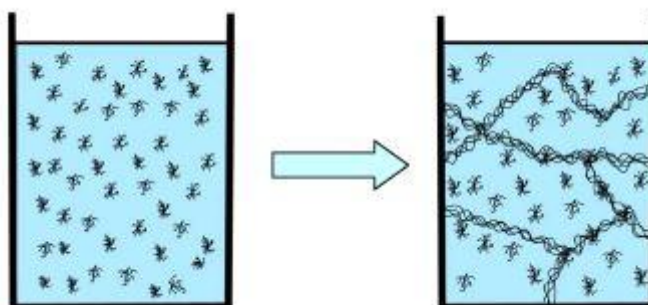


Slika M2. Model polipeptidnog lanca želatine (lijevo) i trostruke zavojnice kolagena (desno)
(preuzeto iz ⁵)



Slika M3. Hidroliza kolagena do želatine
(preuzeto i prilagođeno prema ⁷)

Želatina je specifična po tome što se sastoji od nabijenih lanaca što ju čini polielektrolitom. Hlađenjem otopine želatine ispod temperature tranzicije sola u gel (otprilike 35 °C), na nekim dijelovima dolazi do ponovnog ispreplitanja lanaca u čvorovima, odnosno dolazi do umrežavanja (engl. *cross-linking*). Dijelovi polipeptidnih lanaca najčešće se povezuju nekovalentnim (elektrostatskim) interakcijama. Glavni izvor pozitivnih i negativnih naboja želatine su bočni ogranci asparaginske i glutaminske kiseline, lizina i arginina. Amino- i karboksilna skupina na krajevima lanca su zanemarive ako uzmemo u obzir veliki broj monomera koji grade pojedini lanac.



Slika M4. Prijelaz iz sola u gel.
(preuzeto i prilagođeno prema ⁶)

Kao biološki katalizatori, enzimi ubrzavaju reakcije u stanicama i sudjeluju u izmjeni energije između stanice i njene okoline. Svaka molekula enzima ima aktivno mjesto koje ima sposobnost vezanja molekule supstrata. Enzimi usmjeravaju molekule supstrata tako da se skupina koja treba reagirati smjesti u najpovoljniji položaj. Između enzima i supstrata postoje privlačne sile zbog: a) polarnih ili ionskih skupina, b) van der Waalsovih sila i c) vodikovih veza. Specifično djelovanje enzima postignuto je selektivnošću enzima prema određenom enantiomeru supstrata i nekovalentnim interakcijama.

Proteini su manje, ali značajne komponente voća. Tako u ananasi nalazimo enzim *bromelain*, a u kiviju *aktinidin*.^{8,9} Ovi enzimi su proteaze, što znači da cijepaju peptidne veze u polipeptidnim lancima. U *Radnom listiću* predložen je pokus koji istražuje utjecaj ovih enzima na želatinu. Prema rezultatima pokusa, može se zaključiti kako proteaze iz ananasa i kivija cijepaju peptidne veze u gelu želatine, zbog čega dolazi do izdvajanja molekula vode koje su smještene unutar mreže gela. Također je pokazano kako banana, koja ne sadrži proteaze, ne utječe na strukturu želatine.

8.3.2. Enzimi u nastavnom programu kemije

Prije početka nastave, nastavnik treba biti upoznat s predmetnim kurikulumom kako bi zadani obrazovni ishodi bili ostvareni.³ U pripremi za nastavu potrebno je zadati nastavne ciljeve koji se nekim satom žele postići. U ovom diplomskom radu predložena je obrada nastavne jedinice *Enzimi*, koja je također usko povezana s već prethodno obrađenom nastavnom temom: *Koloidni sustavi*. *Kemija koloida* je cjelina koja je prema novom kurikulumu izborna u 4. razredu gimnazije, dok je prema starom nastavnom planu i programu bila sastavni dio gradiva 2. razreda gimnazije. Nastavna jedinica *Enzimi* je pripremljena s pretpostavkom da je tema *Koloidni sustavi* već obrađena.

Širi pogled na obradu nastavne cjeline o *biološki važnim spojevima* kroz obavezne nastavne teme i sadržaje, prema starom gimnazijskom planu i programu prikazan je u tablici M1. U tablici M2. nalazi se pregled nastavne cjeline *Kemija odabranih biomolekula* prema novom kurikulumu³ i *Ispitnom katalogu iz kemije*¹¹, koja je postala izborni sadržaj, iskazan preko ključnih pojmova i povezanih ishoda učenja. Ovoj cjelini će kroz tri gimnazijske godine poučavanja prethoditi sadržaji o građi, nazivlju, fizikalnim svojstvima i kemijskoj reaktivnosti sljedećih skupina organskih spojeva: ugljikovodika, alkohola, aldehida, ketona, estera i karboksilnih kiselina.³

Tablica M1. Obvezna nastavna cjelina o *biološki važnim spojevima* podijeljena na nastavne teme i sadržaje, prema starom planu i programu za gimnazije¹⁰

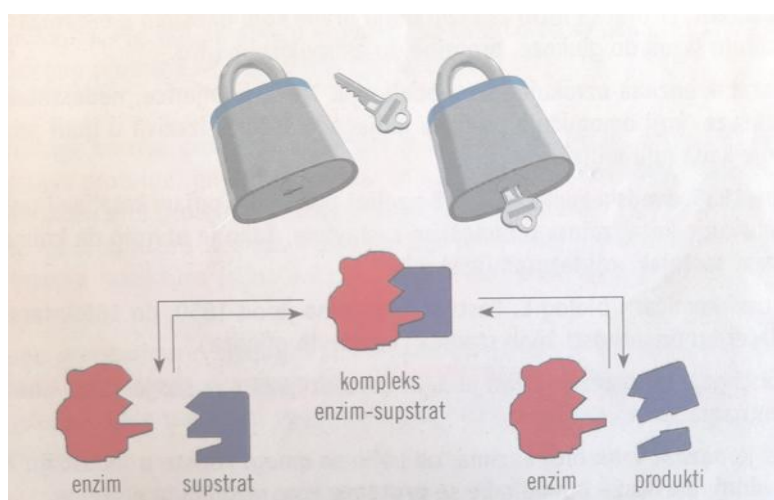
Kemija odabranih biomolekula		
Nastavne teme	<ul style="list-style-type: none"> • Kiralnost i optička aktivnost molekula • Amini, amidi, alkaloidi • Ugljikohidrati • Masti i ulja • Nukleinske kiseline • Vitamini 	Aminokiseline i proteini
Nastavni sadržaji	<ul style="list-style-type: none"> • Stereoizomeri u prirodi • Cikloalkani • Nomenklatura, fizikalna i kemijska svojstva biomolekula • Sintaza hemiacetala i acetala • Glikozidna veza • Esterifikacija • Dokazivanje ugljikohidrata, aminokiselina i proteina 	Podjela aminokiselina (amfoternost, ovisnost naboja aminokiselina o pH-vrijednosti otopine) Peptidi Peptidna veza Enzimi Proteini i metaloproteini

Tablica M2. Izborna nastavna cjelina *Kemija odabranih biomolekula*: ključni pojmovi i ishodi učenja prema novom kurikulumu i *Ispitnom katalogu iz Kemije*^{3,11}

Kemija odabranih biomolekula	
Ključni pojmovi	Ishodi učenja
Struktura molekula	<ul style="list-style-type: none"> prikazati Lewisove simbole te strukturne formule organskih molekula i iona predvidjeti prostornu građu molekule ili iona na temelju VSEPR metode prikazati molekule organskih spojeva strukturnim formulama na temelju naziva spoja ili obrnuto
Nomenklatura organskih spojeva prema IUPAC-u; trivijalna imena organskih spojeva	<ul style="list-style-type: none"> imenovati organske spojeve prema nomenklaturi IUPAC-a
<u>Funkcijske skupine organskih spojeva</u> : amini, amidi, ugljikohidrati, proteini, masti i ulja, nukleinske kiseline	<ul style="list-style-type: none"> prepoznati funkcijske skupine u molekulama organskih spojeva i obrnuto, prepoznati vrstu organskog spoja na temelju zadane funkcijske skupine povezati fizikalna i kemijska svojstva organskih spojeva sa strukturom njihovih molekula i vrstom funkcijske skupine
<u>Izomeri</u> : strukturni, stereoizomeri	<ul style="list-style-type: none"> razlikovati izomere organskih spojeva na temelju njihovih imena ili strukturnih formula
Asimetrično supstituiran ugljikov atom, optička aktivnost	<ul style="list-style-type: none"> prepoznati asimetrično supstituirani ugljikov atom
<u>Biološki važni spojevi</u> : masti i ulja, aminokiseline i proteini, nukleinske kiseline Površinski aktivne tvari, lipidne membrane, sapuni	<ul style="list-style-type: none"> prepoznati glikozidnu vezu u disaharidu ili polisaharidu prikazati nastajanje peptidne veze navesti ulogu biološki važnih molekula u organizmu i površinski aktivne tvari
<u>Reakcije organskih spojeva</u> : gorenje, piroliza	<ul style="list-style-type: none"> prikazati jednadžbama kemijskih reakcije navedene reakcije
Reaktivnost organskih spojeva Kemijska reaktivnost prema funkcijskim skupinama	<ul style="list-style-type: none"> prikazati jednadžbom kemijske reakcije tipične reakcije organskih spojeva i predvidjeti produkte
Enzimi	<ul style="list-style-type: none"> navesti ulogu enzima u organizmu
Tipične reakcije dokazivanja organskih spojeva: specifične reakcije šećera, aminokiselina i proteina	<ul style="list-style-type: none"> razlikovati karakteristične reakcije za dokazivanje organskih spojeva

8.3.3. Kratki osvrt na udžbeničku literaturu

Za pripremu metodičkog dijela diplomskog rada korišteno je nekoliko udžbenika i radna bilježnica.¹²⁻¹⁶ Udžbenici se međusobno razlikuju po: (a) redoslijedu nastavnih tema unutar nastavne cjeline, (b) izboru predloženih pokusa, (c) opsegu i zastupljenosti pojedinih kognitivnih razina nastavnih sadržaja, (d) primjerima iz svakodnevnog života i dr. U svim udžbenicima za osnovnu školu, i u većini udžbenika za srednju školu, prikazan je shematski prikaz djelovanja enzima prema modelu 'ključ-brava' (slika M5.).



Slika M5. Shema djelovanja enzima prema modelu 'ključ-brava' (preuzeto iz ¹²)

Ovakav shematski prikaz djelovanja enzima prikladan je kognitivnoj razini učenika u osnovnoj (pa i srednjoj) školi, zbog jednostavnosti prikaza međudjelovanja enzima i supstrata te tijekom reakcije. Međutim, modelu 'ključ-brava', kao i pripadnom energijskom dijagramu (slika M8.) nedostaje ključni detalj u objašnjenju djelovanja enzima. Prema gore prikazanom modelu, enzim ima vezno mjesto koje je potpuno komplementarno supstratu. Ukoliko bi bilo tako, enzim i supstrat bi tvorili kompleks koji je energijski najpovoljniji, te do reakcije ne bi ni došlo. Umjesto toga, bolji prikaz bio bi onaj u kojem postoji potpuna komplementarnost između enzima i prijelaznog stanja, dok manji stupanj komplementarnosti postoji pri početnom kontaktu enzima i supstrata (vidjeti *Slike i sheme kojima nastavnik nadopunjuje sadržaj*, slika M10.).¹⁷

U svim udžbenicima za osnovnu i srednju školu, nastavna jedinica *Enzimi* dolazi nakon objašnjenja strukture proteina i karakteristične reakcije denaturacije. Većina udžbenika

opisuje enzime kao biološke katalizatore i navodi najpoznatije primjere enzima (i njihove uloge) poput laktaze, pepsina i ureaze. Dalje, nabrojene su skupine enzima (proteaze, oksidoreduktaze, liaze, transferaze i izomeraze) te vrste kemijskih reakcija koju kataliziraju. Djelovanje enzima objašnjava se stvaranjem kompleksa enzim-supstrat, zbog sposobnosti enzima da za jedan svoj manji dio nekovalentnim interakcijama veže molekule supstrata. Aktivno mjesto enzima privlači supstrate zbog interakcija polarnih ili ionskih skupina, vodikovih veze ili van der Waalsove sile, a značajni doprinos ima i komplementarnost stereokemije enzima i supstrata. Specifično djelovanje enzima objašnjava se time što su enzimi kiralne molekule i uvijek djeluju na jedan enantiomer (imaju *stereospecifično djelovanje*). Obzirom da su proteini, enzimi su osjetljivi na uvjete sredine poput pH-vrijednosti, temperature, koncentracije enzima i supstrata i dr. Od predloženih pokusa, najčešći je raspad vodikova peroksida djelovanjem katalaze iz jetre^{12,14,16}, a također je predloženo i razlaganje uree pomoću ureaze.¹⁵ U jednom od pregledanih udžbenika, spomenuto je djelovanje inhibitora, tvari koje ometaju aktivnost enzima (reverzibilni i ireverzibilni), aktivatori koji aktiviraju enzime te koenzimi koji su neproteinski dijelovi enzima. Izgradnja koncepta enzima slijedi iza detaljnog upoznavanje proteina, te su njihova građa i svojstva kao proteina učenicima poznati, prije uvođenja mehanizma djelovanja. Ukoliko se na nastavi izvede jedan od predloženih pokusa uz teorijsko objašnjenje, poučavanje željenog koncepta može se ostvariti na dvije razine (makroskopska i čestična).¹⁵ Simbolička razina prikaza je ovdje zapostavljena, obzirom da se djelovanje enzima ne prikazuje jednadžbama kemijskih reakcija. U pregledu su korišteni udžbenici starijih izdanja koja su više puta obnavljana, a pri tom su promjene bile najčešće u oblikovnju grafičkih rješenja.

8.3.4. Učenička pogrešna shvaćanja u nastavnoj jedinici Enzimi

Prepreku učeničkom znanju nerijetko predstavljaju pogrešna shvaćanja. Ona mogu biti posljedica toga da učenici pojednostavljaju znanstvene teorije kako bi ih uklopili u već postojeća predznanja ili predrasude, neusvojenosti prethodnog znanja, nepovezivanju gradiva iz različitih znanstvenih područja i sl. Pogrešna shvaćanja bi se trebala razjasniti na način koji ne podcjenjuje učenikovo početno razumijevanje, već se ono ponovo oblikuje tako da objašnjava koncept i daje točni značaj.²¹

Poznavanje učeničkih pogrešnih shvaćanja je korak koji bi trebao prethoditi pripremi nastavnog sata jer omogućuje bolji fokus na izražavanje i objašnjavanje kemijskih pojmova ili procesa. Također, pojmovi koji su predmet pogrešnih shvaćanja mogu se ciljno koristiti u svrhu vrednovanja učeničkog znanja na kraju nastavne jedinice ili cjeline. Najčešća pogrešna shvaćanja učenika navedena su u tablici M3.

Tablica M3. Najčešća učenička pogrešna shvaćanja vezana uz pojam enzimi^{20,21}

Enzimi uzrokuju kemijske reakcije.

Enzimi koji se nalaze u dodacima prehrani ili lijekovima su učinkoviti čim se progutaju.

U tijelu postoji desetak enzima.

Enzimi se nalaze samo u životinjskim stanicama.

Svi enzimi su specifični i reagiraju samo s jednom vrstom supstrata.

Enzimi kataliziraju samo reakcije u kojima dolazi do cijepanja kemijske veze.

Enzimi su uključeni samo u probavu hrane.

Enzimi ubrzavaju samo polazne reakcije.

Zagrijavanjem se enzimi ubijaju.

Često su pogrešna učenicka shvaćanja proteina, njihovih struktura i uloga, uzrok krivom razumijevanju enzima. U istraživanju koje je uključivalo 36 učenika na nastavi biologije, pokazano je kako učenici ponekad ne izdvoje dovoljno truda i vremena da bi dobro proučili točno značenje nekog pojma. Izjave koje govore u prilog tome su npr.: „Polipeptidne veze isto su što i polipeptidni lanci.“, „ α -zavojnica isto je što i dvostruka zavojnica.“²⁰

Inhibitori enzimskih reakcija također mogu biti predmet mnogih pogrešnih shvaćanja. Neki od njih su: ireverzibilna inhibicija uvijek je povezana s nekovalentnim vezanjem; kompetitivni inhibitor je uvijek reverzibilan, dok je nekompetitivni uvijek ireverzibilan.²⁰

Primjer široko rasprostranjenog pogrešnog shvaćanja je djelovanje enzima po principu 'ključ-brava'. Takav opis daje naslutiti kako je interakcija između enzima i supstrata energijski najpovoljnija, međutim kad bi bilo tako, enzim ne bi katalizirao kemijsku reakciju. To pogrešno shvaćanje uzrokovano pojednostavljenjem prikaza djelovanja enzima u udžbenicima, opisano je u *Kratkom osvrtu na udžbeničku literaturu*.

8.3.5. Učenička predznanja

Učenici bi prije nastavne jedinice *Enzimi* trebali usvojiti pojmove: aminokiseline, proteini, primarna, sekundarna, tercijarna, kvaterna struktura proteina i denaturacija. Potrebni obrazovni ishodi za poučavanje nastavne jedinice *Enzimi* iz područja nastavnog predmeta Kemija su:

-
- povezuje strukturu proteina s njihovom funkcijom (u organizmu)
 - istražuje kemijske promjene proteina
 - objašnjava fizikalna i kemijska svojstva proteina
 - istražuje utjecaj katalizatora na brzinu kemijske reakcije
 - istražuje značaj stereoizomera u kemijskoj reakciji
-

Kemija biomolekula je usko povezana s temeljnim pojmovima iz biologije. Već u sedmom razredu osnovne škole učenici se susreću s organizacijom stanice i izmjenom energije u živim bićima. To uključuje sadržaje: (a) vezivanje energije i nastanak biološki važnih spojeva, (b) princip i uloga procesa fotosinteze i staničnog disanja i (c) izvori energije za živa bića. U trećem razredu gimnazije učenici proširuju svoje znanje o regulaciji životnih procesa na razini stanica, gdje detaljnije otkrivaju enzime.³ Potrebni usvojeni obrazovni ishodi za nastavnu jedinicu *Enzimi* iz područja nastavnog predmeta Biologija su:¹⁸

-
- osnovni metabolički procesi na razini stanice
 - uloge biomolekula u metaboličkim procesima
 - uloge proteina u organizmu
 - uloga enzima u staničnim procesima
 - utjecaj temperature na brzinu reakcije enzima
-

8.4. Priprema nastavnog sata

Priprema nastavnog sata sastoji se od metodičke i materijalne pripreme. U ovom dijelu metodičkog dijela diplomskog rada dan je prijedlog 90-minutnog nastavnog sata, s ciljem obrade nastavne jedinice *Enzimi* unutar nastavne cjeline *Kemija odabranih biomolekula*. Nastavna priprema temeljena je na obrazovnim ishodima (tablica M1. i M2.) i na najčešćim učeničkim pogrešnim shvaćanjima (tablica M3.).

Uvodni dio sata započinje demonstracijskim pokusom kojeg su učenici mogli vidjeti već i u osnovnoj školi, obzirom da je dio većine udžbeničke literature za 8. razred nastave kemije, ili pak na nastavnom satu *Proteini*. Pokus 1 (vidjeti *Radni listić*) odabran je zbog jednostavnosti izvedbe, jasno vidljive i uočljive promjene boje, koja je dokaz fizikalne i kemijske promjene. Pokus se, po želji, izvodi sa svim ili većinom sastojaka koji se koriste u pokusu. Taj pokus služi identifikaciji vrste tvari, i ne uvodi nove pojmove.

Odabir nastavnih pomagala za Pokus 2 (vidjeti *Radni listić*) načinjen je po uzoru na Lundqvista.² Uloga ovog pokusa je upoznati svojstva enzima koji su prisutni u svakodnevnim namirnicama, saznati kako vanjski faktori utječu na njihovu aktivnost te kako enzimi mogu utjecati na koloidni sustav (želatnu). Pojmovi koji se uvode ovim pokusom su: enzim (biokatalizatori), aktivno mjesto, supstrat, specifično djelovanje, energija aktivacije, inhibitor, aktivator.

Priprema je osmišljena kao završna jedinica u nastavnoj temi *Proteini*. Time se podrazumijeva poznavanje svih pojmova vezanih uz proteine, uključujući reakciju denaturiranja i dokazivanja proteina u uzorku. Podrazumijeva se da su učenici upoznati s koordinacijskim spojevima i uzrokom njihove moguće obojenosti. Također se podrazumijeva da su učenici upoznati s koloidnim sustavima (vrste i kako nastaju), njihovim karakterističnim svojstvima (Tyndallov efekt), razlikom između sola i gela i proteinskom strukturom želatine. Ovim pokusom obuhvaća se kemija proteina i koloidnih sustava, obzirom da je sama želatina proteinske građe, a primjer je koloidnog sustava, te je i sama podložna djelovanju enzima (proteaza).

S ciljem povezivanja submikroskopske razine s makroskopskim opažanjima i simboličkim zapisom, odabran je model čestičnog prikaza djelovanja enzima stvaranjem kompleksa enzim-supstrat koji se nalazi u većini udžbenika iz kemije za gimnazije. Taj model poznat je pod nazivom 'ključ-brava'. Uloga ovog modela je uvesti učenike u strukturu enzima, pokazati kako se enzimi razlikuju od ostalih proteina, kojim specifičnim interakcijama

usmjeruju supstrat u aktivnom mjestu i na koji način enzimi ubrzavaju kemijske reakcije. Model shematski prikazuje enzimski kataliziranu reakciju, a redom na slici se nalaze: enzim i supstrat, kompleks enzim-supstrat te enzim i produkti (vidjeti *Slike, sheme i tablice kojima nastavnik nadopunjuje sadržaj*, slika M7.). Modelni prikaz korišten je nakon učeničkog opažanja u samostalnom pokusu. Na temelju modela moguće je objasniti kako supstrat i enzim formiraju karakteristični kompleks, iz kojeg enzim izlazi nepromijenjen, a od supstrata dobivamo produkt(e). Na čestičnoj razini se također može vidjeti (vidjeti *Teorijska podloga*, slika M3.) kako denaturacijom kolagena nastaje želatina, koja pod utjecajem određenih enzima prelazi u manje polipeptide. Prednost modela je vizualizacija kemijske reakcije te promjene sastava i strukture.

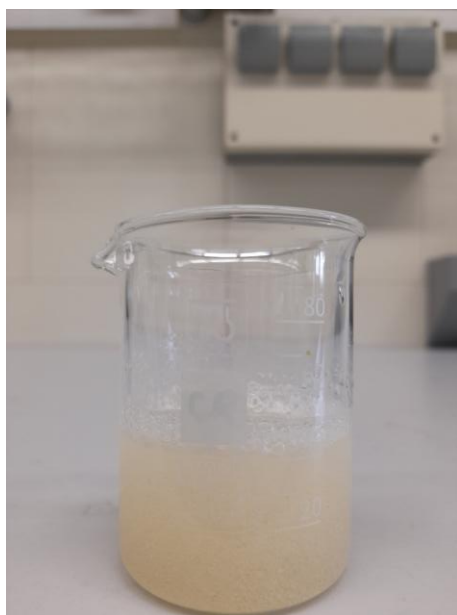
8.4.1. Priprema pokusa

Za izvedbu demonstracijskog i učeničkog pokusa korištene su kemikalije, uzorci voća i materijali, koji su navedeni u tablici M4.

Tablica M4. Kemikalije, uzorci voća i ostali materijali potrebni za pripremu nastavnog sata

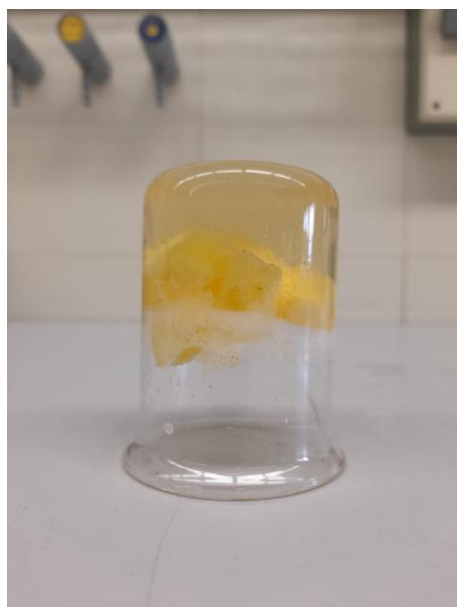
	Kemikalije	Uzorci voća	Ostali materijali
Demonstracijski pokus (Pokus 1 u <i>Radnom listiću</i>)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, $w = 1\%$, NaOH, $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$, destilirana voda	svjež ananas konzervirani ananas banana kivi	2 epruvete, stalak za epruvete, 2 kapalice, želatina
Učenički pokus (Pokus 2 u <i>Radnom listiću</i>)	destilirana voda	svjež ananas konzervirani ananas banana kivi	kuhalo za vodu ili plamenik i stalak za plamenik, 3 staklene čaše od 100 mL, staklena čaša od 200 mL, 4 Petrijeve zdjelice, žlica, pinceta, stakleni štapić, laser

Kako bi se nastavnik upoznao s tijekom i ishodima pokusa, prikazani su rezultati kroz slike M4.(a)–M4.(k). Kraj svakog koraka zapisano je pojašnjenje izvedbe.



Slika M4.(a)

U staklenu čašu od 100 mL doda se 10 g želatina ili sadržaj jedne vrećice, i pomiješa sa 6 žlice hladne vode te ostavi 10 minuta da nabubri. Nakon toga se čaša uroni u veću staklenu čašu s kipućom vodom i sadržaj se miješa sa staklenim štapićem do tekuće konzistencije. Isti postupak se ponovi još dva puta. U jednu čašu se potom dodaju komadići svježeg ananasa, a u drugu komadići ananasa iz konzerve. Čaša se ostavi na sobnoj temperaturi sve dok se više ne opažaju promjene (10–15 min).

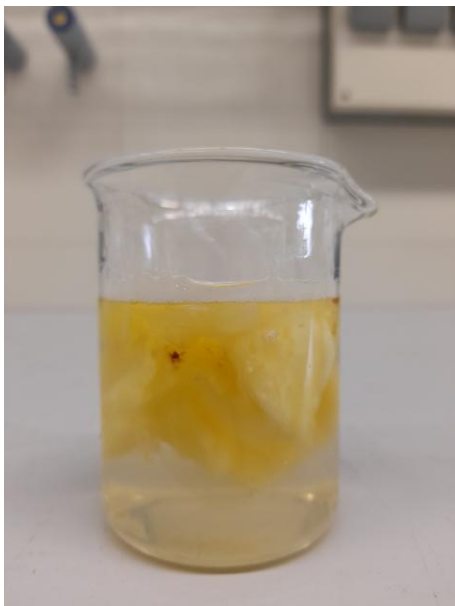


Slika M4.(b)

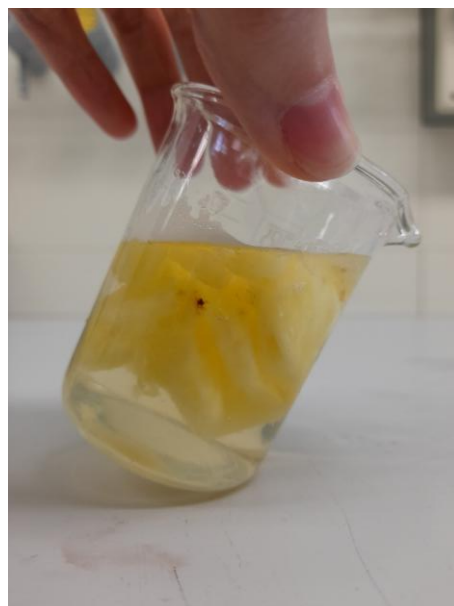


Slika M4.(c)

Čaše sa želatinom i konzerviranim ananasom nakon 15 min. Želatina je čvrste konzistencije, a komadići ananasa su nepomični.

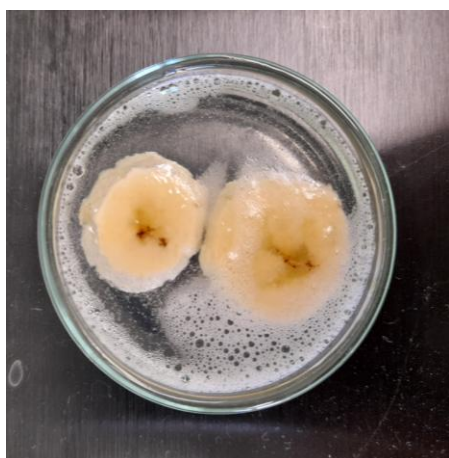


Slika M4.(d)



Slika M4.(e)

Čaše sa želatinom i svježim ananasom nakon 15 min. Želatina je tekuće konzistencije, a komadići ananasa se gibaju slobodno u želatini.



Slika M4.(f)



Slika M4.(g)

U zasebnoj čaši pripremi se želatina na isti način kao u prvom koraku i izlije se u Petrijevu zdjelicu u koju se doda nekoliko komadića banane. Nakon 15 min, konzistencija želatine testira se pomoću staklenog štapića, kojim se pritisne površina želatine. Vidljivo je kako štapić ne prodire kroz želatinu.



Slika M4.(h)



Slika M4.(i)

U Petrijevu zdjelicu doda se želatina i nekoliko komadića prethodno zagrijanog ananasa (ananas se ostavi u kipućoj vodi 5 min). Nakon 15 min vidljivo je kako štapić ne prodire kroz želatinu.



Slika M4.(j)



Slika M4.(k)

U Petrijevu zdjelicu doda se želatina i nekoliko komadića svježeg kivija. Nakon 15 min vidljivo je kako štapić prodire kroz želatinu do dna Petrijeve zdjelice.

Želatina je u svim koracima pripremljena na jednak način, kao što je opisano kraj slike M4.(a). Želatina se ne priprema prema uputama na vrećici, nego se dodaje malo veća količina vode kako bi rezultati pokusa bili lakše vidljivi. U suprotnom, bilo bi potrebno dodati značajno veću količinu voća. Alternativno, može se koristiti sok iz voća.

Nakon što se voće stavi u čašu ili Petrijevu zdjelicu zajedno sa želatinom, posuda se ostavlja na sobnoj temperaturi. Da bi rezultati pokusa bili što prije vidljivi, posuda se može staviti u zamrzivač 5–10 min ili na vrh posude ispunjene ledom.

Nakon što želatina nabubri, može se zagrijavati na plameniku, no postoji opasnost od zagorijevanja želatine na dnu čaše, pa se preporuča zagrijavanje u vodenoj kupelji.

Obzirom na različite rezultate pokusa, stakleni štapić ne smije se koristiti u različitim Petrijevim zdjelicama ili čašama ukoliko prije nije očišćen.

8.4.2. Nastavna priprema

Nastavna cjelina: Kemija odabranih biomolekula

Nastavna jedinica: Enzimi

Cilj: Objasniti mehanizam djelovanja enzima pomoću modela 'ključ-brava'. Izdvojiti vrste interakcija koje uzrokuju specifičnost enzima prema supstratima, te na temelju proteinske prirode enzima prepoznati koji uvjeti okoline su važni za njihovo djelovanje. Usporediti način djelovanja kompeticijskog i nekompeticijskog inhibitora.

Potrebna predznanja i vještine:

- nabrojati fizikalna i kemijska svojstva proteina
- objasniti utjecaj katalizatora na brzinu kemijske reakcije
- prepoznati strukturu peptidne veze

Obrazovni ishodi:

- definirati enzime kao biološke katalizatore
- usvojiti dogovoreni shematski prikaz djelovanja enzima na modelu 'ključ-brava'
- interpretirati pojmove: aktivno mjesto, specifično djelovanje enzima
- identificirati vrste nekovalentnih interakcija između enzima i supstrata
- nabrojati vrste inhibitora

Tablica M5. Tijek nastavnog sata prikazan preko etapa, aktivnosti nastavnika i učenika i socioloških oblika rada.

ETAPA NASTAVNOG SATA	Aktivnosti nastavnika	Aktivnosti učenika	Sociološki oblici rada
Uvodni dio 15 minuta	<p>Nastavnik počinje nastavni sat demonstracijskim pokusom s ciljem motivacije za upoznavanje nove nastavne jedinice – <i>Enzimi</i>. Nastavnik izvodi Pokus 1 (vidi <i>Radni listić</i>) i vodi diskusiju na temelju opažanja tijekom Pokusa 1.</p> <p>Po završetku Pokusa 1, učenici se upućuju da zapišu opažanja i riješe zadatke 1.-5. iz <i>Radnog listića</i>.</p> <p>Nastavnik provjerava rješenja i kroz raspravu pomaže učenicima povezati makroskopske promjene sa simboličkim prikazom. Promjena boje otopine ukazuje na prisutnost peptidne veze u molekuli biureta, a time i u uzorku želatine i ananasa. Opis na simboličkoj razini objašnjava pojavu ljubičastog obojenja u epruveti s ispitivanim uzorkom.</p> <p>Nakon demonstracijskog pokusa slijedi diskusija. Nastavnik postavlja pitanja učenicima s ciljem prepoznavanja proteinske strukture želatine, te s druge strane prisutnosti spojeva proteinske građe u voću (ananasu). Nastavnik to postiže ispitivanjem učenika iz kojih se izvora dobiva želatina (zbog čega i jest građena od proteina), na što očekuje odgovor da je životinjskog porijekla. Poznato je pak da su glavni sastojci voća voda i ugljikohidrati, te u manjoj mjeri proteini. Dakle, nastavnik navodi učenike da se struktura želatine može prikazati kao polipeptidni lanac, dok voće u svojem sastavu sadrži spojeve koji su proteinske strukture.</p>	<p>Učenici zapisuju opažanja i rješavaju zadatke iz <i>Radnog listića</i>.</p> <p>Nastavnik proziva učenika koji će strukturnim formulama napisati jednadžbu kemijske reakcije iz zadatka 2.</p> <p>Učenici sudjeluju u raspravi i nude rješenja.</p>	<p>Frontalni</p> <p>Individualni</p> <p>Frontalni</p>
Središnji dio 45 min	<p>Nastavnik traži od učenika da izvedu grupni pokus prema uputama na <i>Radnom listiću</i> (Pokus 2).</p> <p>Nastavnik za to vrijeme obilazi grupe i uvjerava se da učenici točno slijede opisane korake. Učenici samostalno izvedu pokus od početka do kraja.</p>	<p>Učenici slijede upute i izvedu Pokus 2.</p> <p>Učenici sudjeluju u diskusiji i popunjavaju <i>Radni listić</i> (Pokus 2).</p>	Grupni rad

Nastavak tablice M5.

<p>Završni dio 30 min</p>	<p>Kada su sve grupe izvele pokus i riješile <i>Radni listić</i> (ili veći dio), nastavnik pokreće diskusiju s cijelim razredom i provjerava učeničke odgovore na pitanja u <i>Radnom listiću</i>. Nastavnik najprije zapisuje tijekom opažanja pokusa na ploču (prikazano u Planu ploče).</p> <p>Nastavnik se uvjerava da su učenici prepoznali da je želatina primjer koloidnog sustava, čija je karakteristika raspršivanje zraka svjetlosti čija valna duljina je veća od veličine dispergiranih čestica (Tyndallov fenomen).</p> <p>Nastavnik bi trebao naglasiti da pojam želatina označava praškastu tvar koju učenici koriste u pokusu, ali u pravilu se odnosi na koloidni sustav koji nastaje dispergiranjem praškaste (čvrste) želatine u vodi.</p> <p>Potičući raspravu i objašnjenje opažanja, nastavnik vodi učenike do razumijevanja sol-gel procesa. Najprije dolazi do bubrenja želatine u vodi, u kojem ona upija veliku količinu vode. Potom se zagrijava, konzistencija postaje tekuća, a daljnjim hlađenjem nastaje gel.</p> <p>Učenici se dosjećaju pojmova sol i gel i međusobnog prijelaza tih dviju struktura. Nastavnik ponavlja definiciju sola i gela. Bitno je naglasiti kako je konačni oblik želatine primjer gela, mrežaste strukture u koju je uklopljena voda. Dodatkom voća u želatinu, dolazi do enzimski katalizirane reakcije u kojoj enzimi iz voća cijepaju peptidne veze u želatini. Na taj način objašnjena su opažanja u slučaju kada je nakon dužeg stajanja, želatina bila tekuće konzistencije u posudama sa svježim ananasom i kivijem.</p> <p>Potom nastavnik traži od učenika objašnjenje predviđanja ishoda pokusa u slučaju kad se voće zamrzne pa vrati na sobnu temperaturu. Učenici trebaju objasniti kako zamrzavanje ne utječe na aktivnost enzima, ukoliko oni postoje u voću. Također komentiraju svježe voće (banana ili voće po izboru) koje ne utječe na strukturu želatine jer ne sadrži proteolitičke enzime.</p>	<p>Učenici u bilježnicu zapisuju opažanja tijekom pokusa.</p> <p>Učenici aktivno sudjeluju u diskusiji čitajući vlastite odgovore i objašnjavajući ih.</p>	<p>Frontalni rad</p>
-------------------------------	--	--	----------------------

Nastavak tablice M5.

	<p>Nakon diskusije i provjere čitavog <i>Radni listića</i>, nastavnik uz pomoć učenika načini zaključak koji se zapiše na ploču (vidjeti <i>Plan ploče prema nastavnoj pripremi</i>, Slika M11.). Nastavnik definira enzime kao biokatalizatore, objašnjava nomenklaturu enzima, model enzimske reakcije 'ključ-brava' i energijski dijagram enzimske reakcije.</p> <p>Nastavnik može napomenuti da iz energijskog dijagrama proizlazi da enzim stabilizira prijelazno stanje kemijske reakcije. Model 'ključ-brava' je pojednostavljen prikaz djelovanja enzima. Naime, najveća komplementarnost ostvaruje se između enzima i prijelaznog stanja, a ne između enzima i supstrata.</p> <p>Na kraju spominje da postoje tvari koje zaustavljaju enzimsku djelatnost u stanici, a to su inhibitori i ukratko objašnjava koje vrste inhibitora postoje.</p>	Učenici aktivno sudjeluju u kreiranju plana ploče i zapisuju ga.	
--	--	--	--

Radni listić

POKUS 1. Biuret reakcija (demonstracijski pokus)

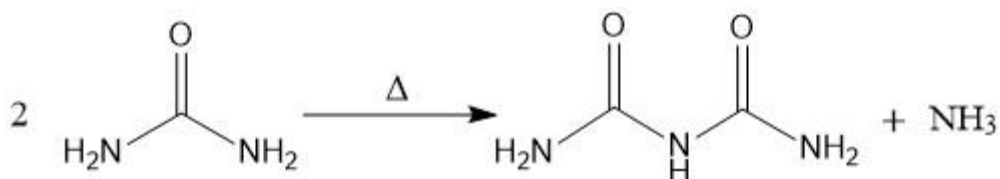
Vidjeti tablicu M4.

U epruvetu E1 se doda komadić fino usitnjenog ananasa, a epruveta E2 se do polovice ispuni tekućom želatinom. U obje epruvete se doda po nekoliko kapi otopine bakrova(II) sulfata i natrijeve lužine.

1. Promotrite demonstracijski pokus kojeg izvodi nastavnik i zabilježite opažanja.

Dodavanjem zalužene otopine bakrova(II) sulfata u uzorak želatine i ananasa, te mućkanjem sadržaja epruvete, modra boja otopine bakrova(II) sulfata prelazi u tamno ljubičastu.

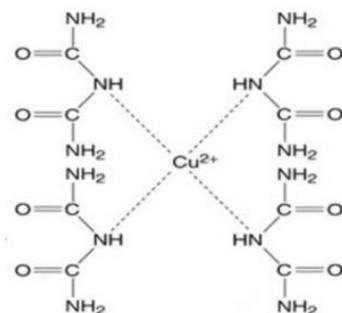
2. Promjena koju ste vidjeli naziva se *biuret reakcija*, a ime je dobila po kemijskom spoju, biuretu, koji također daje ljubičasto obojenje s reagensom korištenim u prethodno opisanoj kemijskoj reakciji. Biuret nastaje spajanjem dviju molekula uree, uz izdvajanje molekule amonijaka. Strukturnim formulama prikaži jednadžbu kemijske reakcije koja prikazuje nastajanje biureta.



3. Na temelju strukture molekule spoja poznatog pod imenom biuret, napišite koja vrsta biološki važnih spojeva se dokazuje *biuret reakcijom*.

Zbog prisutnosti peptidne veze, proteini daju pozitivan test na biuret reakciju.

4. Na slici je prikazana struktura molekule kompleksnog spoja koji nastaje u epruveti. Objasnite zašto dolazi do promjene boje u uzorcima želatine i ananasa.



Slika M6. Struktura kompleksnog spoja iona bakra(II) i biureta.¹⁹

U epruveti dolazi do stvaranja kompleksnog (koordinacijskog) spoja, u kojem su molekule birueta donori dušikovih atoma, koji ulaze u koordinacijsku sferu bakrova(II) iona. Interakcije je uspostavljena između iona bakra i elektronskog para dušikovih atoma peptidne veze.

Kada bijela svjetlost pada na sadržaj epruvete, dolazi do apsorpiranja određene valne duljine. Ostatak svjetlosti koja prolazi kroz sadržaj epruvete vidimo kao određenu boju (ovdje, ljubičastu). Mnogi koordinacijski spojevi i njihove otopine su obojeni, što se u ovom primjeru koristi kao brzi test za identifikaciju tvari koje sadrže i proteine.

5. Što zaključujete o kemijskoj strukturi voća (ananasa) i želatine na temelju opažanja?

Na temelju opažanja, zaključuje se da u uzorku želatine i ananasa postoje proteini (pozitivan test na peptidne veze).

POKUS 2:

Pribor i kemikalije: destilirana voda, svjež i konzervirani ananas, banana, kivi, 3 staklene čaše od 100 mL, staklena čaša od 200 mL, 4 Petrijeve zdjelice, žlica, pinceta, stakleni štapić, kuhalo za vodu, laser

KORAK 1 U staklenoj čaši od 100 mL pomiješajte sadržaj jedne vrećice želatine sa 6 žlica vode, promiješajte i ostavite 10 minuta. Isti postupak ponovite u još 2 staklene čaše od 100 mL. Čaše označite slovnim oznakama A, B, C. Zapišite opažanja neposredno nakon miješanja želatine s vodom te nakon 10 minuta.

Neposredno nakon miješanja, smjesa želatine i vode je tekuće konzistencije, a nakon 10 minuta je čvrste konzistencije.

KORAK 2 Čašu od 200 mL ispunite do pola kipućom vodom i u nju uronite čašu **A** te sadržaj miješajte staklenim štapićem, sve dok više nema promjene u konzistenciji. Potom u čašu **A** dodajte nekoliko komada svježeg ananasa. Ponovite isti postupak sa čašom **B**, ali u nju dodajte nekoliko komada ananasa iz konzerve. Čaše **A** i **B** ostavite po strani 15 minuta ili sve dok više nema vidljivih promjena. Potom u čašu s kipućom vodom stavite nekoliko komadića svježeg ananasa i ostavite 5 minuta pa izvadite pomoću pincete.

KORAK 3 U 3 Petrijeve zdjelice dodajte redom po nekoliko komadića: prokuhanog ananasa, svježe banane i svježeg kivija - tako da svaka Petrijeva zdjelica sadrži jednu vrstu voća. U čašu s kipućom vodom uronite čašu **C** te staklenim štapićem miješajte sadržaj čaše sve dok više nema promjene u konzistenciji. Potom u Petrijeve zdjelice dodajte sadržaj čaše **C** tako da je voće u potpunosti prekriveno. Petrijeve zdjelice također ostavite 15 minuta ili dok više nema vidljivih promjena.

KORAK 4 Uzmite čašu A ili B (neovisno o vremenu koje je prošlo) te usmjerite laserski snop tako da prolazi kroz sadržaj čaše. Zapišite opažanja i objasnite. Kako se naziva ta pojava?

Laserska zraka je vidljiva pri prolasku kroz želatinu jer dolazi do raspršenja svjetlosti na česticama koje su veće od valne duljine laserske svjetlosti. Ta pojava naziva se Tyndallov fenomen.

PITANJE 1 Kako se naziva vrsta disperznih sustava u kojima veličina disperzne faze iznosi 1 do 200 nm i daju pozitivan test na pojavu iz Koraka 4?

Koloidni sustavi.

PITANJE 2 Navedite ishodnu tvar za pripremanje disperznog sustava iz Pitanja 1. Napišite agregacijsko stanje disperzne faze, disperznog sredstva i dva imena sustava kojim opisujemo tvar iz pokusa.

Primjer koloidnog sustava korištenog u pokusu je želatina. Disperzna faza je čvrsta, a disperzno sredstvo tekuće. Želatinu opisujemo kao sol i gel.

PITANJE 3 U Koraku 1 ste pomiješali želatinu s vodom. Pročitajte vlastita opažanja i odgovorite na pitanje. Kako se naziva proces u kojem neka tvar upija veliku količinu otapala, pri čemu dolazi do povećanja volumena te tvari?

Bubrenje.

PITANJE 4 Želatina je organski spoj građen od aminokiselinskih ostataka, u obliku dugačkih lanaca. U vodi se ti lanci na nekim mjestima međusobno povezuju nekovalentnim vezama i tako čine mrežastu strukturu, unutar koje je uklopljena tekuća faza. Koji od dva sustava iz Pitanja 2 je time opisan?

Gel.

ZADATAK 1 U tablicu 1. unesite opažanja tijekom pokusa nakon što više nema vidljive promjene u čašama i u Petrijevim zdjelicama. Ispunite prva dva stupca tablice.

Tablica 1. Opažanja tijekom pokusa

VOĆE	OPAŽANJA	PROTEAZA
svjež ananas	želatina je tekuće konzistencije	+
konzervirani ananas	želatina je čvrste konzistencije	-
zagrijani ananas	želatina je čvrste konzistencije	-
svjež kivi	želatina je tekuće konzistencije	+
svježa banana	želatina je čvrste konzistencije	-

PITANJE 5 Promotrite postupak i opažanja tijekom pokusa. Koja dva čimbenika utječu na konzistenciju želatine?

Na konzistenciju želatine utječe vrsta voća, kao i metoda kojom je voće prethodno bilo tretirano.

ZADATAK 2 Enzimi su katalizatori reakcija u stanicama, a vrsta enzima koji razgrađuju proteine nazivaju se proteaze. Na koji stupanj strukture proteina utječu proteaze? Objasnite.

Proteaze utječu na primarnu strukturu proteina na način da cijepaju peptidnu vezu između aminokiselinskih ostataka u polipeptidnom lancu.

PITANJE 6 Pri zagrijavanju enzima na temperaturu iznad 42 °C dolazi do njihove denaturacije. Koji stupanj strukture proteina se pritom gubi? Što to znači za enzim?

Prilikom denaturacije gubi se sekundarna i tercijarna (i kvaterna, ukoliko postoji) struktura proteina. To znači da se gubi svojstvo enzima da katalizira reakcije u stanicama.

ZADATAK 3 Ispunite treći stupac tablice u Zadatku 1. Za uzorke voća u kojima se nalaze proteaze dodaj +, odnosno – ukoliko ih nema.

ZADATAK 4 Ukoliko bi se nekoliko komadića svježeg ananasa ohladilo na temperaturu ispod 0 °C, a potom ostavilo na sobnoj temperaturi sve dok se u potpunosti ne odmrzne i ponovio prethodno opisani pokus, pretpostavite što bi se dogodilo sa želatinom? Objasnite.

Želatina bi bila tekuće konzistencije. Hlađenjem proteini (enzimi) ne gube svojstva i funkciju.

ZADATAK 5 Ukoliko bi se nekoliko komadića svježe banane zagrijalo u kipućoj vodi 5 minuta, ohladilo na sobnu temperaturu i ponovio pokus, što bi se dogodilo sa želatinom? Pretpostavite što bi se dogodilo u slučaju zamrzavanja i ponovnog zagrijavanja na sobnu temperaturu? Objasni.

Obzirom da se konzistencija želatine nije promijenila koristeći svježu bananu, može se zaključiti da banana ne sadrži proteaze. Prema tome, zagrijavanje i hlađenje ne uzrokuje promjenu na želatini.

ZADATAK 6 Promotrite čašu u kojoj se nalazi želatina i svjež ananas. Objasnite opažanja.

Ananas sadrži enzim (proteazu) koja ima mogućnost cijepanja peptidnih veza u želatini. Uslijed narušavanja strukture gela, dolazi do oslobađanja vode koja je uklopljena u njegovu mrežastu strukturu.

PITANJE 7 Bromelain je kemijski spoj prisutan u ananasu koji uzrokuje ljubičasto obojenje uzorka pri izvođenju Biuret reakcije. Iako nema mnogo dokaza, ananas se preporučuje kao dodatak prehrani pri naticanju sinusa i desni, pa čak i za smanjivanje osjećaja boli. Što je,

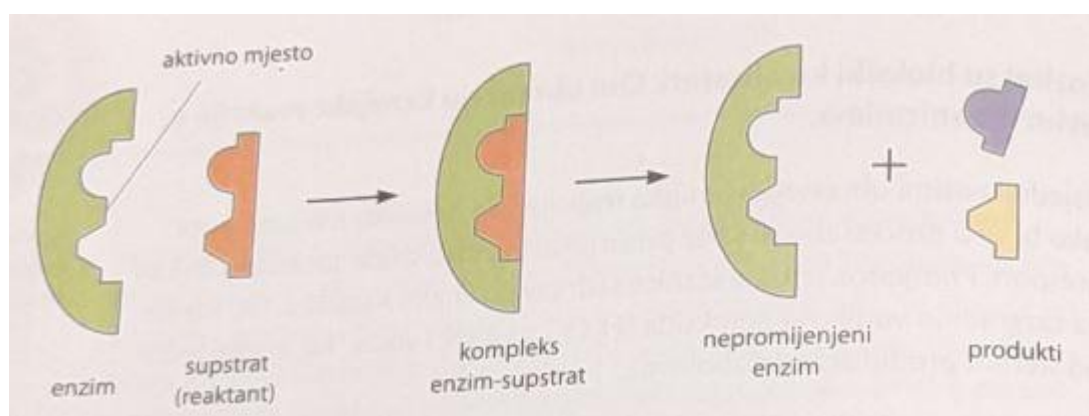
prema tome, važno znati pri odabiru i kupnji ananasa? Odgovor temeljite na opažanjima tijekom pokusa.

Obzirom da je bromelain protein (enzim), osjetljiv je na temperaturu pa je stoga važno da je ananas svjež. Konzervirani ananas je steriliziran (zagrijan na temperaturu iznad 100 °C) pri čemu dolazi do denaturacije proteina, čime se gubi njegova funkcija.

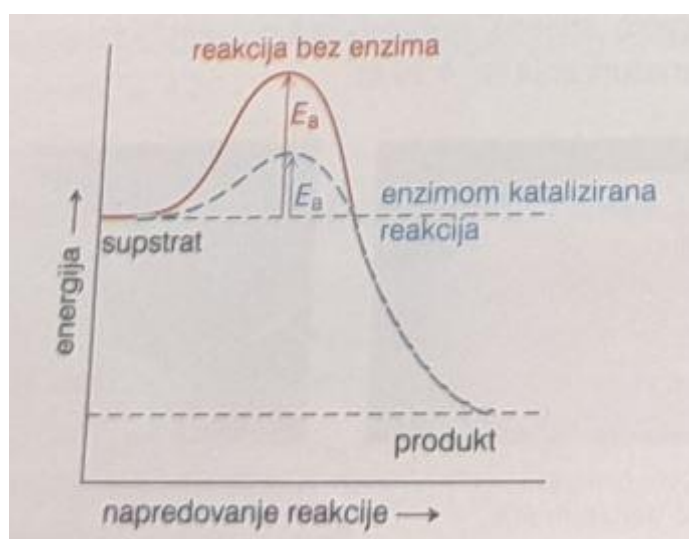
PITANJE 8 Na poleđini paketića želatine stoji uputstvo: *Želatina ne uspijeva sa svježim ananasom, kivijem, papajom i smokvom*. Što bi se moglo dodati ovom uputstvu, na temelju opažanja izvedenog pokusa, ukoliko kivi ili ananas ipak želiš staviti na tortu zajedno sa želatinom?

Ananas ili kivi se može prethodno zagrijati u kipućoj vodi ili pak koristiti konzervirano voće.

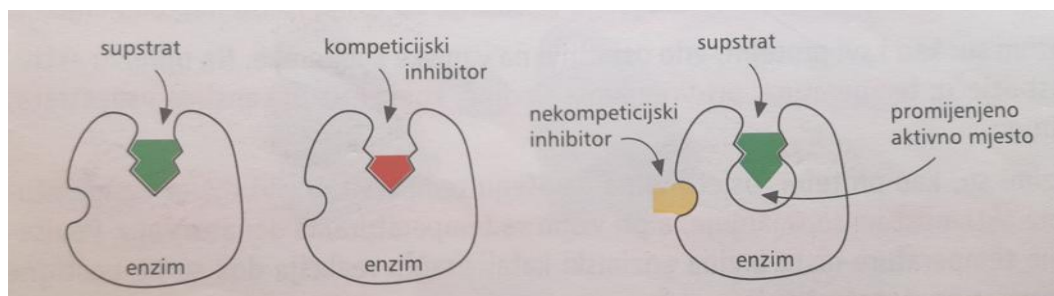
8.4.3. Slike i sheme kojima nastavnik nadopunjuje sadržaj



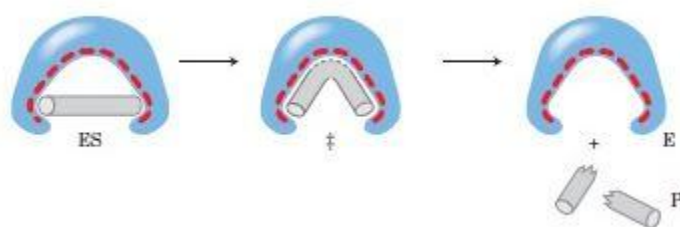
Slika M7. Shematski prikaz djelovanja enzima mehanizmom 'ključ-brava' (preuzeto iz ⁶)



Slika M8. Energijski dijagram kemijske reakcije sa i bez enzima (preuzeto iz ⁹)

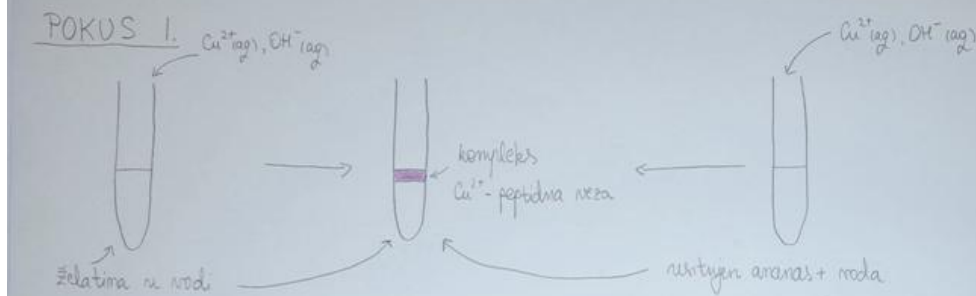


Slika M9. Razlika između kompeticijskog i nekompeticijskog inhibitora (preuzeto iz ⁵)



Slika M10. Model interakcije enzima i supstrata na početku, u prijelaznom stanju i na kraju kemijske reakcije – ES-kompleks enzim-supstrat, E-enzim, P-produkt (preuzeto i prilagođeno prema ¹⁷)

ENZIMI



POKUS 2.

- želatina + svježi ananas → tekuća konzistencija želatine
 želatina + konzervirani ananas / prokuhani ananas → čvrsta konzistencija želatine
 želatina + svjež kiwi → tekuća konzistencija želatine
 želatina + svjež banana → čvrsta konzistencija želatine
- enzimi su biokatalizatori koji djeluju na procese u stanicama
 - nomenklatura enzima: vrsta reakcije koju katalizira / supstrat na koji djeluje + nastavak -aza
 - aktivno mjesto - dio enzima koje veže molekulu supstrata
 - specifično djelovanje enzima određeno privlačenjem ionskih, polarnih skupina, vodikovih veza, van der Waalovih sile, stereokemija
- $$E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P$$
- enzim supstrat enzim-supstrat kompleks enzim + produkt
- inhibitori - ireverzibilni i reverzibilni
 - kompetitivni
 - nekompetitivni

Slika M11. Plan ploče prema nastavnoj pripremi

8.5. Zaključak

Strategija učenja otkrivanjem učenicima pruža mogućnost da na temelju vlastitog iskustva i opažanja rezultata pokusa donose zaključke o kemijskim zakonitostima. Ova strategija od nastavnika zahtjeva više pripreme i planiranje učeničkih aktivnosti na temelju već postojećih predznanja. Učenje i razumijevanje kemije je za učenike lakše i zanimljivije ukoliko je nastavnik onaj koji ih potiče i vodi u uočavanju promjena, i povezivanju makroskopske, čestične i simboličke razine upoznavanja pojma. Promjena koja se uvodi u nastavnoj cjelini, treba biti uočljiva na makroskopskoj razini u pokusu (učeničkom ili demonstracijskom).

Cilj metodičkog dijela ovog diplomskog rada bio je predložiti ideju enzima kao vrste proteina koji imaju mogućnost cijepanja kovalentnih veza, u ovom slučaju u koloidnom sustavu – želatini, otkriti kako temperatura utječe na aktivnost enzima iz voća, koristiti model 'ključ-brava' za opisivanje enzimske reakcije te energijskim dijagramom prikazati snižavanje energije aktivacije kao objašnjenje ubrzavanja reakcije u biološkim sustavima. Nastavna priprema za jedinicu *Enzimi* temeljena je na zadanim obrazovnim ishodima prema planu kurikulumu za četvrti razred gimnazije, najčešćim učeničkim pogrešnim shvaćanjima pojma i mehanizama enzimski kataliziranih reakcija i kritičkog osvrta na postojeću udžbeničku literaturu.

U materijalni dio metodičko-didaktičke pripreme uključena je priprema i upute za izvedbu učeničkog pokusa koja omogućuje relativno jeftino i široko dostupno učeničko istraživanje djelovanja enzima iz voća. Pokus ne zahtijeva korištenje kemikalija, već proizvode koji su dostupni u trgovinama hranom pa je prema tome pokus vrlo siguran za učenike osnovnoškolske i srednjoškolske dobi. *Radni listić* namijenjen je grupnom radu tijekom kojeg učenici uz minimalnu pomoć i usmjeravanje nastavnika otkrivaju zakonitosti, donose zaključke i predviđaju ishode sličnih koraka u pokusu koji se ne izvode. Pri izradi metodičke pripreme vođeno je računa o makroskopskoj, čestičnoj i, u manjoj mjeri, simboličkoj razini ciljanog kemijskog koncepta. Na makroskopskoj razini učenici usvajaju koncepte temeljem opažanja pri izvođenju pokusa, na čestičnoj razini koriste se modeli koji pomažu vizualizaciji apstraktnih međudjelovanja molekula, a na simboličkoj razini promjene i pojave opisuju nekim od simboličkih zapisa.

8.6. Literatura

1. M. Sikirica, *Metodika nastave kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 2003, str. 1–50.
2. M. Lundqvist, *J. Chem. Educ.* **91** (2014) 455–456.
3. Kurikulum nastavnog predmeta kemija za osnovne škole i gimnazije, Ministarstvo znanosti i obrazovanja, Zagreb, 2019.
4. S. Banerjee, S. Bhattacharya, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **52** (2011) 334–346.
5. D. Pelc, S. Marion, S. Petrović, *Dinamika sol-gel prijelaza želatine*, Istraživački rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2010, str. 9–12.
6. P. Innocenzi, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **94** (2020) 544–550.
7. https://www.researchgate.net/figure/Schematic-description-of-the-collagen-hydrolysis-to-gelatin_fig1_319385214 (pristupljeno 20. lipnja 2021.)
8. S. J. Taussig, S. Batkin, *J. Ethnopharmacol.* **22** (1988) 191–203.
9. M. Boland, *Adv. Food Nutr. Res.* **68** (2013) 59–80.
10. <https://www.ncvvo.hr/nastavni-planovi-i-programi-za-gimnazije-i-strukovne-skole/> (datum pristupa 21. svibnja 20121.)
11. Ispitni katalog iz Kemije, Nacionalni centar za vanjsko vrednovanje, Zagreb, 2021.
12. D. Stričević, B. Sever, *Temelji organske kemije udžbenik iz kemije za 4. razred gimnazije*, Profil, Zagreb, 2006, str. 145–149.
13. D. Mrvoš-Sermek, M. Kovačević, *Kemija 8 udžbenik za 8. razred osnovne škole*, Alfa, Zagreb, 2014, str. 112–116.
14. D. Mrvoš-Sermek, M. Kovačević, *Kemija 8 radna bilježnica za 8. razred osnovne škole*, Alfa, Zagreb, 2014, str. 56–58.
15. M. Sikirica, B. Korpar-Čolig, *Organska kemija udžbenik za 4. razred gimnazije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999, str. 162–164.
16. V. Petrović Peroković, D. Turčinović, I. Halasz, *Kemija ugljikovih spojeva udžbenik kemije u četvrtom razredu gimnazije*, Školska knjiga, Zagreb, 2009, str. 174–175.
17. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, W.H. Freeman, New York, 2003, str. 198.
18. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_01_7_149.html (pristupljeno 15. lipnja 2021.)
19. <https://chempinsta.com/biuret-test-principle-reagent-preparation-result-interpretation/> (pristupljeno 17. srpnja, 2021.)

-
20. A. S. Halim, S. A. Finkenstaedt-Quinn, A. Ruggles Gere, G. V. Shultz, *Life Sci. Educ.* **17** (2018) 1–12.
21. K. J. Linenberger, S. L. Bretz, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **43** (2015) 213–222.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Karla Srnec

Datum rođenja: 24. ožujka 1997.

Mjesto rođenja: Čakovec

Obrazovanje

2003–2011 Osnovna škola Petar Zrinski Šenkovec

2011–2015 Srednja škola Gimnazija Josipa Slavenskog Čakovec

2015–2019 Preddiplomski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu

Nagrade i priznanja

2021 Dekanova nagrada za izuzetan uspjeh u studiju