

Određivanje metalotioneina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu

Andabak, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:380089>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Marija Andabak

**ODREĐIVANJE METALOTIONEINA
ELEKTROFOREZOM U POLIAKRILAMIDNOM
GELU**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Marija Andabak

**ODREĐIVANJE METALOTIONEINA
ELEKTROFOREZOM U POLIAKRILAMIDNOM
GELU**

Diplomski rad

Mentorica: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Neposredna voditeljica: Marija Paurević, mag. chem.

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Određivanje metalotioneina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu

Marija Andabak

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Mentorica: doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik

Neposredna voditeljica: Marija Paurević, mag. chem.

Sažetak

Metalotioneini (MT) su mali peptidi prisutni u stanicama mnogih organizama. Zbog male molekulske mase i specifične strukture, koju čini jedan polipeptidni lanac bogat cisteinom i metalni ioni vezani u njegovom središtu, njihova detekcija i kvantifikacija predstavljaju izazov. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu je jednostavna i dostupna metoda za određivanje proteina kompleksnih bioloških uzoraka. Pruža mogućnost optimizacije uvjeta u kojima se izvodi, čime se omogućuje razdvajanje i vrlo malih proteina. Cilj ovog rada je pronaći najbolje uvjete za određivanje metalotioneina u uzorcima tkiva gujavica (*Lumbricus terrestris*) elektroforezom u poliakrilamidnom gelu.

Eksperimentalno je provjeren utjecaj različitih čimbenika na uspješnost elektroforetskog razdvajanja metalotioneina, kao što su: različita priprema uzoraka, koncentracija poliakrilamidnog gela, derivatizacija uzoraka monobromobimanom (mBBR) te puferski sustavi u kojima se elektroforeza izvodi. Iako je elektroforezom u poliakrilamidnom gelu moguće detektirati MT, prethodno pročišćavanje i frakcioniranje uzoraka nužno je za uspješnu analizu.

Diplomski rad obuhvaća: 51 stranicu, 19 slika, 5 tablica, 44 literaturna navoda i 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: elektroforeza / metalotioneini / poliakrilamidni gel / proteini

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc. dr. sc. Ana Amić, predsjednica
2. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, mentorica i članica
3. doc. dr. sc. Olivera Galović, članica
4. doc. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić, zamjena člana

Rad prihvaćen: 6. 9. 2019.

Rad je pohranjen : Knjižnica Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Chemistry

Graduate Study of Chemistry

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Chemistry

Metallothionein detection in polyacrylamide gel by electrophoresis

Marija Andabak

Thesis completed at: Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD

Assistant supervisor: Marija Paurević

Abstract

Metallothioneins (MTs) are small peptides found in cells of wide range of living organisms. Their detection and quantification present challenge owing to their small molecular mass and specific structure. MTs structure is simple, consisted of one polypeptide chain rich in cysteine, and metal ions bound in the center of that chain. Electrophoresis in polyacrylamide gel is simple and available method for protein detection in complex biological samples. Since its conditions can be altered and optimized, even very small proteins can be detected by this method. The aim of this paper is to find best conditions for MTs detection in earthworm (*Lumbricus terrestris*) tissue by electrophoresis in polyacrylamide gel.

Many different factors that can affect efficacy of electrophoresis were experimentally verified: different sample preparation, concentration of polyacrylamide gel, samples derivatization with monobromobimane (mBBR) and buffers in electrophoretic system. Although MTs can be detected by electrophoresis in polyacrylamide gel, purification and fractionating of samples are necessary for successful analysis and better results.

Thesis includes: 51 pages, 19 figures, 5 tables, 44 references, 2 appendices

Original in: croatian

Key words: electrophoresis / metallothioneins / polyacrylamide gel / proteins

Reviewers:

1. Assoc. Prof. Ana Amić, PhD; chair
2. Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD; supervisor and member
3. Assist. Prof. Olivera Galović, PhD; member
4. Assist. Prof. Elvira Kovač-Andrić, PhD; substitute member

Thesis accepted: 6. 9. 2019.

Thesis deposited in: Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

*Ovaj rad je izrađen u okviru projekta „Različiti učinci okolišno relevantnih mješavina metal
temeljenih nanočestica i pesticida na faunu tla: Nove smjernice za procjenu rizika
(DEFENSoil) “financiranog sredstvima Hrvatske naklade za znanost (IP-09-2014-4459);
voditelj projekta prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger.*

SADRŽAJ

1. UVOD	8
2. LITERATURNI PREGLED	9
2.1. METALOTIONEINI.....	9
2.1.1. Otkriće i povijest.....	9
2.1.2. Struktura.....	9
2.1.3. Klasifikacija i ekspresija.....	12
2.1.4. Glavne uloge i lokalizacija	14
2.1.5. Analitičke metode za određivanje metalotioneina	17
2.2. ELEKTROFOREZA.....	19
2.2.1. Elektroforeza u gelu.....	20
2.2.2. Uvjeti elektroforetskog razdvajanja u poliakrilamidnom gelu	23
3. MATERIJALI I METODE.....	26
3.1. Ispitivani materijal	26
3.2. Kemikalije.....	26
3.3. Metode	27
3.3.1. Priprema uzoraka tkiva gujavica	27
3.3.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Lowryju	27
3.3.3. Priprema i obrada uzoraka za elektroforezu	28
3.3.4. Priprema poliakrilamidnih gelova	29
3.3.5. Provođenje elektroforeze	32
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	36
4.1. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Lowryju	36
4.2. Određivanje optimalne količine uzorka	38
4.3. Određivanje optimalne količine standarda metalotioneina.....	39
4.4. Derivatizacija uzoraka monobromobimonom	40
4.5. Utjecaj različite obrade uzoraka	42
4.6. Tricin-SDS-PAGE	43
4.6.1. Određivanje optimalne koncentracije gela	45
4.6.2. Usporedba tricin-SDS-PAGE i glicin-SDS-PAGE	46
5. ZAKLJUČAK	47
6. LITERATurna VRELA	48

7. DODACI.....	50
7.1. Popis kratica	50
7.2. Životopis	51

1. UVOD

Metalotioneini su peptidi male molekulske mase koje pronalazimo unutar stanica različitih organizama. Struktura im je bioanorganska, a čini ju jedan polipeptidni lanac bogat cisteinom te metalni ioni vezani u njegovom središtu. Tiolne skupine cisteina zadužene su za vezanje metala putem tiolatnih klastera koji su najbitnije strukturno obilježje ovih peptida. Zbog male molekulske mase i specifičnih strukturnih obilježja, razdvajanje metalotioneina iz složenih bioloških uzoraka predstavlja izazov [1].

Elektroforeza je metoda razdvajanja proteina na osnovi naboja u električnom polju. Ovo je jednostavna i lako dostupna metoda kojom se uz optimizaciju uvjeta mogu razdvojiti i vrlo mali proteini. Uglavnom se provodi u gelovima koji zbog učinka molekularnog sita najbolje razdvajaju kompleksne uzorke. Nekoliko je vrsta gelova za elektroforezu, no poliakrilamidni gel je, zbog brojnih prednosti pred ostalim vrstama gelova, najzastupljeniji u današnje vrijeme. Brzo i jednostavno se može prirediti iz lako dostupnih kemikalija: akrilamida i *N,N'*-metilenbisakrilamida (Bis), dajući gel jednolične strukture i homogenih svojstava [2].

Cilj ovog diplomskog rada bio je pronaći optimalne uvjete za elektroforetsko razdvajanje metalotioneina iz tkiva gujavica (*Lumbricus terrestris*), a kao glavna metoda razdvajanja korištena je elektroforeza u poliakrilamidnom gelu.

U ovom diplomskom radu opisać će se metalotioneini, gdje će biti više riječi o njihovoj strukturi, klasifikaciji i ulogama u organizmu. Predstaviti će se glavne analitičke metode za njihovo određivanje, a u zasebnom poglavlju će detaljnije biti opisana metoda elektroforeze s naglaskom na elektroforezu u poliakrilamidnom gelu. U eksperimentalnom dijelu rada navest će se materijali i metode korišteni za elektroforetsko razdvajanje metalotioneina iz uzoraka tkiva gujavica, nakon čega će se dobiveni rezultati raspraviti te će se usporediti uspješnost elektroforeze pri različitim uvjetima. Na kraju rada će se zaključiti koji uvjeti elektroforeze su dali najbolje rezultate te se smatraju optimalnima za određivanje metalotioneina u kompleksnim biološkim uzorcima.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. METALOTIONEINI

2.1.1. Otkriće i povijest

Povijest znanstvenih istraživanja metalotioneina započinje u pedesetim godinama prošloga stoljeća kada su prvi puta otkriveni. Od tada su postali područje interesa znanstvenika upravo zbog svoje jedinstvene strukture i rasprostranjenosti u raznim organizmima [3]. Metalotioneine su 1957. godine otkrili znanstvenici Margoshes i Valee kao novoidentificirane proteine sa sposobnošću vezanja kadmija, a izolirali su ih iz tkiva bubrežne kore konja [3, 4]. Ime metalotioneini dobili su zbog velikog udjela sumpora¹, 4,1 % po gramu suhe mase te zbog udjela metala, od kojih je 2,9 % kadmija i 0,6 % cinka [4]. Od samog otkrića do danas, metalotioneini su izolirani i proučavani iz širokog spektra različitih organizama kao što su prokarioti, biljke, beskralješnjaci i kralješnjaci [1].

2.1.2. Struktura

Metalotioneini (MT) su unutarstanični proteini male molekulske mase (od 2 kDa do 16 kDa) s jedinstvenom strukturom koja obiluje cisteinskim ostacima - u pravilu ima više od 30 % cisteina (Cys) u odnosu na ostale aminokiseline. Također, zanimljivo strukturno obilježje je da ne sadrže aromatske aminokiseline [5].

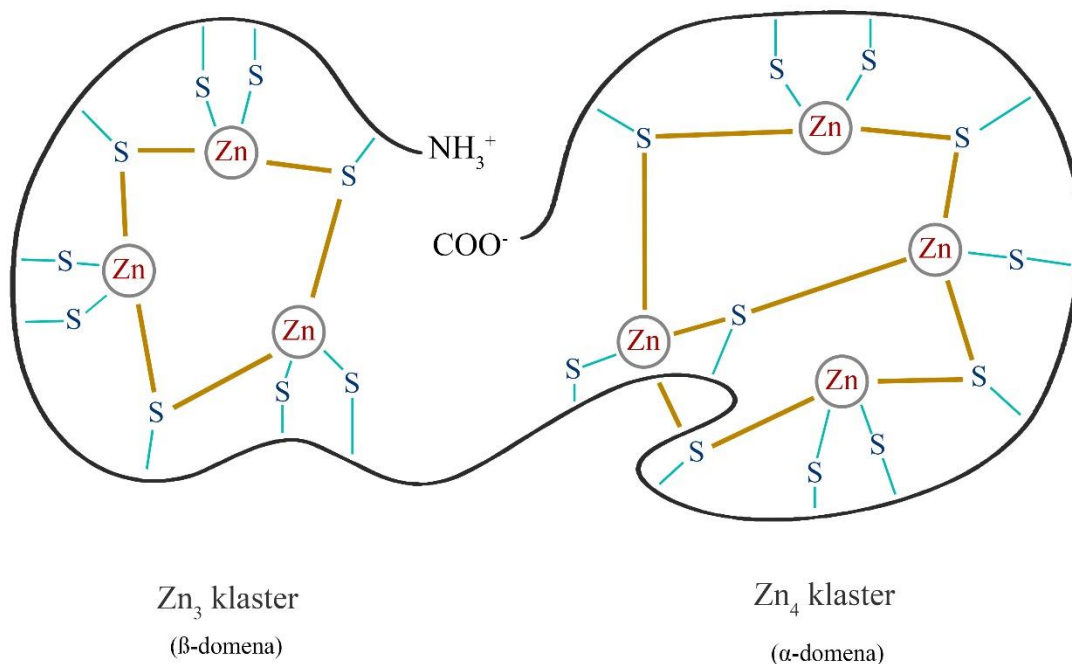
Svi metalotioneini posjeduju izuzetno konzerviran slijed aminokiselina te pokazuju vrlo male razlike u strukturi čak i kada su izolirani iz različitih životinjskih vrsta [6]. Čini ih jedan lanac od oko 20 do 100 aminokiselina, ovisno o organizmu u kojem se nalaze. Kod MT sisavaca, to je 61 - 68 aminokiselina, ovisno o izoformi. Proteinsko sekvenciranje pokazalo je kako su cisteinski ostatci metalotioneina složeni u obliku sekvenci Cys-X-Cys, Cys-X-X-Cys i

¹ Od grč. *θειον* (*theion*) što znači sumpor.

Cys-Cys gdje X predstavlja aminokiseline koje nisu cistein [7]. Cisteinski ostaci su zaduženi za vezanje metala, a nalaze se do bazičnih aminokiselina kao što su lizin (Lys) i arginin (Arg) te su kao takvi raspoređeni u dvije domene, α i β [8]. Ove domene odvojene su necisteinskom sekvencom. Stabilnija se α -domena sastoji od aminokiselina 31 - 68 te se nalazi na C-terminalnom kraju, dok N-terminalna β -domena sadrži aminokiseline 1 - 30 i reaktivnija je od α -domene [9]. Pokazano je kako α -domena može vezati do četiri, a β -domena do tri divovalentna metalna iona kao što su ioni cinka, kadmija, žive ili olova. MT također vežu i do 12 jednovalentnih metalnih iona, kao što su ioni srebra i bakra [10].

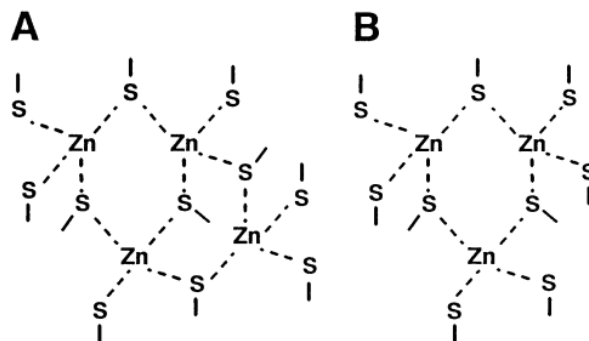
Ako MT u strukturi nema vezani metal naziva se apo-metalotionein (apo-MT) ili tionein [6]. Ioni cinka (Zn^{2+}), koji su prirodno prisutni u organizmu, smatraju se osnovnim metalnim ionima vezanima za apo-MT te su vrlo važni zbog sudjelovanja u regulaciji transkripcijskih faktora. Zn^{2+} i drugi esencijalni metalni ioni imaju raznolike uloge u brojnim biološkim procesima. Mogu imati funkciju strukturnih komponenti proteina ili esencijalnih kofaktora enzima, no svi metalni ioni su citotoksični ukoliko su im unutarstanične koncentracije previsoke [12].

Drugi neesencijalni metalni ioni koji se patološki javljaju u organizmu, kao što su ioni olova, bakra, kadmija, žive, platine, kroma, bizmuta i srebra, često imaju veći afinitet prema veznim mjestima apo-MT od iona cinka [6]. Afinitet za vezanje na MT razlikuje se ovisno o metalu. Kompleks MT s bakrovim ionima, Cu^+ , ima najveću konstantu stabilnosti (10^{19} - 10^{17}), slijede ih ioni kadmija, Cd^{2+} (10^{17} - 10^{15}) i cinka, Zn^{2+} (10^{14} - 10^{11}). Uz najčešće vezane ione cinka, MT u isto vrijeme mogu imati vezane različite metalne ione [12]. Protein bez vezanog metala ima nesređenu, nasumičnu strukturu, no nakon vezanja metalnih iona, MT zauzima specifičnu strukturnu formaciju. Monomerni protein ima strukturu oblika bučice s podjednakim i gotovo sferičnim α - i β -domenama (Slika 1.).



Slika 1. Strukturni prikaz veznih mjesta metala kod metalotioneina, preuzeto i prilagođeno prema [11].

Svaka od ovih domena ima promjer 15 - 20 Å te u svojim središtima sadrži četiri, odnosno tri tiolatna klastera: $M^{II}_4Cys_{11}$ i $M^{II}_3Cys_9$. Metalni ioni su u klasteru koordinirani tetraedralno, a domene su povezane fleksibilnim predjelom koji se sastoji od konzerviranih Lys-Lys segmenata na sredini polipeptidnog lanca [13]. Svojstva zajednička svim MT su upravo metal-tiolatni klasteri. Klaster koji u strukturi ima tri metalna iona nalazi se u N-terminalnoj β-domeni i čine ga 6 terminalnih i 3 premosna liganda cisteina, dok klaster s četiri metalna iona u C-terminalnoj α-domeni ima 11 cisteina, od toga 6 terminalnih i 5 premosnih (Slika 2.). Kao posljedica toga, svih je 20 cisteina metalotioneina uključeno u vezanje sedam iona divovalentnih metala [14].



Slika 2. Cinkovi klasteri metalotioneina: A) klaster s 4 cinkova iona u α -domeni, B) klaster s 3 cinkova iona u β -domeni [14].

Budući da je reaktivnost klastera određena brojem premosnih liganda te brzine reakcija opadaju porastom povezanosti unutar klastera, α -domena je stabilnija jer u strukturi ima dodatni ligand te više terminalnih, a manje premosnih ligandskih veza [14]. Osim metal-tiolatnih klastera i izostanka aromatskih aminokiselina, metalotioneini nemaju drugih posebnih strukturnih karakteristika [1].

2.1.3. Klasifikacija i ekspresija

Metalotioneini su klasificirani u 3 skupine [15]. Skupina I obuhvaća sve proteinske metalotioneine kod kojih je cistein raspoređen slično kao kod metalotioneina sisavaca. U ovu skupinu pripadaju i metalotioneini nekih mekušaca te rakova [16]. Unutar genoma jedne vrste skupine I razlikujemo i četiri glavne izoforme metalotioneina od MT-1 do MT-4. Razlike među izoformama su posljedica post-translacijskih modifikacija, promjena u primarnoj strukturi, vrste vezanog metala te brzine degradacije [12]. Skupina II obuhvaća proteinske metalotioneine koji nemaju sličnosti sa metalotioneinima sisavaca, dok skupinu III čine metalotioneini zaduženi za vezanje teških metala kod biljaka, kao što su fitokelatini. Skupina I je najproučavanija skupina metalotioneina, unutar koje su najpoznatije izoforme MT-1 i MT-2 [5].

Unatoč fizikalno-kemijskoj sličnosti izoformi, njihove uloge i pojavljivanje u tkivu znatno se razlikuju. MT-1 i MT-2 su prisutni u gotovo svim mekim tkivima, MT-3 se nalazi uglavnom u tkivu mozga, no može biti prisutan i u srcu, bubrezima i reproduktivnim organima dok se MT-4 izoforma može naći u epitelnim stanicama [5].

Metali, glukokortikoidi, citokini i različiti kemijski i fizikalni utjecaji induciraju MT-1 i MT-2, dok kod druge dvije izoforme ovi čimbenici ne izazivaju indukciju [13]. Najjači utjecaj na indukciju MT-1/2 imaju metalni ioni, osobito cinkovi ioni prirodno prisutni u organizmu. Upravo iz tog razloga kažemo da su metalotioneini jedni od biomarkera izloženosti utjecaju metala [17]. Vezanjem na transkripcijski faktor odgovoran za regulaciju metala u organizmu - MTF-1, (engl. *metal-regulatory transcription factor-1*), cinkovi ioni potiču transkripciju gena metalotioneina [12]. Povećane količine MT-1/2 su pronađene u jetri te bubrezima eksperimentalnih životinja izloženih kadmiju, živi ili cinku [6]. Toksikološka istraživanja su pokazala kako i drugi metalni ioni, osim cinka, mogu inducirati ekspresiju MT-1/2 gena, no taj mehanizam je drugačiji od mehanizma indukcije cinkovim ionima, budući da se oni ne vežu direktno na MTF-1. Neesencijalni metalni ioni ne mogu aktivirati MTF-1, no zbog njihova većeg afiniteta prema MT-1/2, lako dolaze na mjesto cinkovih iona što rezultira njihovim otpuštanjem te povećanjem razina slobodnog unutarstaničnog cinka. Kao posljedica toga, slobodni ioni cinka vežu se na MTF-1, što vodi do aktivacije transkripcije gena MT-1/2 [6].

Oksidativni stres induciran raznim faktorima i stanjima, također povećava razinu ekspresije MT. Reaktivne kisikove vrste, ROS (engl. *reactive oxygen species*) kao što je vodikov peroksid, H_2O_2 mogu oksidirati molekulu MT, što kao posljedicu ima otpuštanje cinkovih iona koji aktiviraju MTF-1 [6].

Uz MT-1/2, u organizmu su prisutne i MT-3 te MT-4 izoforme. Struktura MT-3 pokazuje visok stupanj sličnosti sekvence s ostalim MT (oko 70 %). Ipak, postoje razlike u sekvenci koje mogu biti odraz razlike u ulozi ako ih usporedimo s MT-1 i MT-2 izoformama. Kod MT-3 izoforme pronađen je heksapeptid bogat glutamatom u blizini C - terminalnoga kraja koji sadrži Cys-Pro-Cys-Pro motiv (6 - 9 aminokiselina), kojeg ne nalazimo kod drugih MT [5]. Budući da se MT-3 izoforma eksprimira u stanicama mozga, jedna od uloga joj je održivost normalne funkcije živčanih stanica [6].

MT-4 izoforma je do sada najmanje proučena izoforma metalotioneina. Istraživanjima na *Escherichii coli*, pokazano je kako MT-4 ima veći afinitet prema jednovalentnim ionima bakra, nego prema dvovalentnim cinkovim ionima te ima manji afinitet za vezanje dvovalentnog kadmijevog iona, za razliku od MT-1. Prema tome, MT-4 molekule se smatraju bakar „tioneinima“ za razliku od ostatka metalotioneina koje smatramo „cink tioneinima“. Molekularna istraživanja upućuju na važnost ekspresije MT-4 izoforme u koži, jer bakrovi i cinkovi ioni imaju važnu ulogu u razvoju kože i zacjeljivanju rana [6].

2.1.4. Glavne uloge i lokalizacija

Metalotioneine pronalazimo u različitim normalnim i patološkim stanicama, kao i u krvnom serumu gdje reguliraju nekoliko bitnih staničnih procesa [6]. Zahvaljujući velikom afinitetu prema metalnim ionima, najvažnije biološke funkcije metalotioneina su održavanje homeostaze esencijalnih metalnih iona te detoksifikacija teških metala u organizmu kao i očuvanje redoks stabilnosti stanice [1].

Funkcionalne MT-1/2 izoforme se uglavnom mogu naći u staničnoj citoplazmi te nekim organelima, dok su za ekspresiju MT najčešće zaduženi mitohondriji. Koncentracija MT najviše ovisi o oksidacijskom stanju organela u kojima se nalaze. Zbog male molekularne veličine, MT se mogu prenositi kroz vanjsku membranu mitohondrija te regulirati propusnost unutarnje membrane. Pod uvjetima oksidativnoga stresa, MT-1/2 izoforme brzo prelaze u jezgru stanice putem kompleksa staničnih pora. Mnoga istraživanja ukazuju kako, jednom kada su MT locirani u jezgri, imaju vrlo važnu ulogu u staničnoj proliferaciji i diferencijaciji, kao i u genotoksičnosti i apoptozi stanice [6].

Sposobnost vezanja metala te raznolika i široka rasprostranjenost MT zbog njihove male molekularne veličine, omogućuje im sudjelovanje u različitim staničnim procesima. Osim regulacijske i zaštitne uloge u brojnim normalnim stanicama, pod nekim okolnostima, mogu doprinijeti razvoju tumora. Iz toga razloga, MT se spominju u kontekstu višenamjenskih proteina s dva lica [18]. Zbog uključenosti u razne stanične procese i mnoge vitalne funkcije, metalotioneini se smatraju osnovnim proteinima u živim organizmima [5].

2.1.4.1. Detoksifikacija metalnih iona

Pokazano je kako MT-1 i MT-2 vežu različite metalne ione, kako jednovalentne, tako i dvovalentne. Zbog toga je sposobnost detoksifikacije takvih spojeva pripisana upravo ovim proteinima. Molekule apo-MT mogu vezati od 7 do 9 dvovalentnih iona (kao što su cink ili kadmij). Također, mogu vezati i do 12 bakrovih ili čak 18 živinih iona što je dokazano u eksperimentalnim uvjetima [6]. Sposobnost vezanja većeg broja metalnih iona, od onog predviđenog strukturom jednog polipeptidnog lanca, povezana je sa spontanom oligomerizacijom α -domena MT putem disulfidnih mostova [6, 9].

Najtoksičniji metalni ioni, kao što su kadmij, olovo i živa, pokazali su veći afinitet prema molekulama MT u većini istraživanja. Ovi metalni ioni mogu zamijeniti cink ili druge metale s manjim afinitetom za vezanje na MT, što može voditi do izmjena u glavnim staničnim procesima, kao što su transkripcija ili translacija [6, 12]. Zaštitni učinci MT-1/2 u većini okolnosti povezani su s otpuštanjem cinkovih iona iz MT molekula što kao posljedicu ima aktivaciju MTF-1 i povećanu sintezu novih molekula MT [13].

Metalni ioni imaju sposobnost induciranja ekspresije MT u mnogim tkivima sisavaca uključujući jetru, bubrege, testise i crijeva. Uz djelovanje MT protiv intoksikacije teškim metalima, njihovu zaštitnu ulogu dodatno potvrđuje i sposobnost vezanja slobodnih radikala reaktivnih kisikovih vrsta, ROS [6].

2.1.4.2. Uloga MT u zaštiti od štetnih učinaka kadmija

Do sada je najbolje proučavana veza MT i kadmija, kao široko rasprostranjenog metalnog zagađivača okoliša. Kadmijevi ioni se u organizam ljudi i životinja unose kontaminiranom hranom ili preko peludi udisanjem, pri čemu ioni odlaze u pluća. Ukoliko je kadmij unesen hranom, njegovi se kationi dalje šire iz gastrointestinalnog trakta do jetre, bubrega i testisa. Kod trovanja organa, kadmijevi ioni svoj citotoksični učinak vrše aktivacijom nastajanja ROS, što za posljedicu ima peroksidaciju lipida, oštećenje DNA te denaturaciju proteina [6].

Akutni učinci trovanja kadmijem mogu biti plućni edemi, krvarenja, fulminantni hepatitis te lezije testisa, dok su neki od kroničnih učinaka nefrotoksičnost, osteotoksičnost te imunotoksičnost [19].

Izlaganje malim dozama kadmija inducira MT, što kao posljedicu ima povećanu toleranciju na visoke doze ovog metalnoga iona [20]. Eksperimentalni podaci pokazuju kako se otpornost životinja na kadmij povećala ukoliko su tretirane malim količinama kadmija prije izlaganja letalnim dozama ovog metala. Izolacijom substancijskih frakcija jetre tih životinja 2h nakon izlaganja letalnoj dozi kadmija, pokazane su smanjene količine kadmijevih iona u jezgri, mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu te povećane količine kadmijevih iona u citosolu. Kadmijevi ioni u citoplazmi vezani su za MT inducirane malom dozom kadmija prije izlaganja letalnoj dozi [6, 20].

2.1.4.3. Uloga MT u uvjetima oksidativnog stresa

MT imaju važnu ulogu u smanjenju učinaka oksidativnog stresa, nastalog kao posljedica djelovanja slobodnih radikala kao što su ROS i reaktivne dušikove vrste, RNS (engl. *reactive nitrogen species*). Ove molekule kratkog životnog vijeka karakterizira prisustvo barem jednog nesparenog elektrona, a mogu nastati pod utjecajem različitih fizikalnih faktora: UV (engl. *ultra violet*), gama zračenja, radijacije X-zrakama, kemijskim reakcijama kataliziranim metalima ili tijekom raznih bioloških procesa kao što su upalne reakcije, mitohondrijska respiracija i slično. Slobodni radikali mogu imati koristan učinak pri upalnim procesima te imunoreakcijama, no ukoliko nastaju u suvišku, mogu dovesti do oštećenja raznih staničnih struktura što vodi do smrti stanice ili neoplastičnih transformacija. Pokazano je kako se njihovi štetni utjecaji mogu ublažiti molekulama antioksidansa u koje ubrajamo i MT-1/2 izoforme. Metalotioneini reguliraju razine slobodnih radikala indirektno vezanjem metalnih iona koji su potencijalni stvaratelji radikala [21].

Antioksidativna svojstva MT potvrđena su brojnim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima. Tioladni klaster MT-1/2 proteina je odgovoran za redoks potencijal ovih molekula, budući da ovisi o stabilnosti vezanja cinka za tiolnu skupinu. Promatrana indukcija ekspresije MT-1/2

slobodnim radikalima vodi do pretpostavke kako ovi proteini imaju ulogu u zaštiti stanica od oksidativnog stresa [6].

Sposobnost MT molekula da prelaze iz citoplazme u jezgru uvelike ovisi o redoks stanju jezgre. Budući da redoks stanje može utjecati na stanični ciklus, pretpostavlja se kako MT štite jezgru stanice od suviška slobodnih radikala te na taj način reguliraju i omogućuju održavanje staničnog ciklusa [22].

2.1.5. Analitičke metode za određivanje metalotioneina

Izolacija, razdvajanje i detekcija metalotioneina kao i njihova kvantifikacija nisu jednostavni zadaci za modernu bioanalitičku kemiju. Upravo zbog njihove male molekularne mase i jedinstvene primarne strukture, na metalotioneine su teško primjenjive uobičajene metode za detekciju proteina jer nisu dovoljno specifične i osjetljive [1].

2.1.5.1. Imunokemijske metode

Imunokemijske metode zasnivaju se na interakciji antigena i antitijela. Razlikujemo test enzimi povezane imunosorpcije, ELISA, (engl. *enzyme-linked immunoadsorbant assay*), radioimunološki test, RIA (engl. *radioimmunoassay*), fluorescirajući imunološki test, FIA (engl. *fluorescence immunoassay*) te Western blot analizu (engl. *Western blotting*) [5].

ELISA je rutinska metoda za određivanje ciljanih proteina, a zasniva se na reakciji proteina koji se određuje (antigen) sa specifičnim antitijelom imobiliziranim na čvrstoj podlozi. Zatim se dodaje kompleks antitijela sa specifičnim enzimom koji u reakciji sa supstratom daje obojenje otopini te prema intenzitetu obojenja omogućuje određivanje željenog proteina [23]. ELISA je korištena za određivanje MT u mnogim uzorcima, uključujući stanice jetre, stanice štakora izložene kadmiju i urin djece koja žive u onečišćenom okolišu [5].

RIA je imunokemijska metoda u kojoj se koriste antigeni označeni izotopima. Takvi antigeni se kompetitivno vežu na antitijela. Količina antigena prisutna u uzorku računa se s

obzirom na radioaktivnost preostalu nakon razdvajanja nevezanih molekula. Unatoč nedostacima metode zbog korištenja radioaktivnih materijala, ova metoda je korištena za određivanje MT u raznim istraživanjima [5].

FIA se zasniva na korištenju fluorescentno označenih antitijela. Prednost pred RIA metodom očituje se u izostanku radioaktivnog obilježavanja. FIA omogućava određivanje MT vrlo niskih razina pa je u tom pogledu ova metoda osjetljivija od RIA i ELISA metoda [24].

Western blot analiza je često korištena imunološka metoda. Proteini se razdvajaju gel elektroforezom te se prenose na nitroceluloznu membranu i detektiraju uporabom antitijela specifičnih za ciljni protein [5]. Kompleks antitijelo-antigen detektira se dodatkom drugog antitijela koje je specifično za ono prvo. Radioaktivna oznaka na drugom antitijelu stvara tamnu vrpču na rendgenskom filmu. Western blot analiza omogućuje detekciju željenog proteina u kompleksnim smjesama [25].

Imunokemijske metode su osnovne metode u određivanju MT. Glavne prepreke pri korištenju ELISA i drugih imuno-metoda su razaranje ciljne molekule, moguće interferencije zbog visokog udjela metala te unakrsna reaktivnost antitijela. Iz tog razloga, nužna je optimizacija uzorka i vrste antitijela [5].

2.1.5.2. Bioanalitičke metode

Složenost stvarnih bioloških uzoraka uz samu pripremu uzorka, koja uključuje pročišćavanje i ekstrakciju, zahtjeva i separacijske tehnike prije detekcije. Često su korištene kromatografske i elektromigracijske metode jer omogućuju eliminaciju potencijalnih interferirajućih spojeva te time omogućuju bolju detekciju željenog analita [5].

Gel elektroforeza je rutinska metoda za identifikaciju bioanalita kao što su proteini i/ili nukleinske kiseline [5]. Budući da je za određivanje MT u ovom radu korištena upravo gel elektroforeza, ova će metoda detaljnije biti opisana u zasebnom poglavlju.

Kapilarna elektroforeza je vrlo efikasna separacijska metoda za analizu složenih bioloških uzoraka. Glavne prednosti ove analitičke metode su izuzetna separacijska moć

spojena s kratkim vremenom analize te malom količinom potrebnog uzorka. Usporedi li se s klasičnom elektroforezom, korištenjem tanke kapilare (25-100 μm) uklanja se temperaturni gradijent, nastao kao posljedica toka struje, te se time eliminira difuzija molekula i širenje vrpce [26]. Međutim, kod klasične gel elektroforeze ne dolazi do sorpcije proteina na stijenke kapilare, što je slučaj kod kapilarne elektroforeze. Kapilarna elektroforeza je odgovarajuća za separaciju spojeva male molekulske mase pa je samim time optimalna za analizu MT [5].

Kromatografske metode su nezamjenjive tehnike korištene za analizu složenih bioloških uzoraka uključujući krvni serum, uzorke jetre i bubrega. Glavna prednost kromatografskih metoda je njihova raznolikost što olakšava odabir prikladne metode optimalne za određeni analit [5]. Najčešće korištena metoda za izolaciju metalotioneina iz životinjskih tkiva, kao i za njihovu pripremu i pročišćavanje, je gel filtracija [17].

Gel filtracija je kromatografska metoda odjeljivanja na temelju veličine i mase molekule, poznata i pod nazivom kromatografija molekularnog isključivanja. Svrstava se u metode tekućinske kromatografije kojima je mobilna faza tekućina, a stacionarna faza je porozni materijal. Uzorak se nanosi na kolonu ispunjenu poroznim česticama netopljivog, ali jako hidratiziranog polimera poput ugljikohidrata (dekstran ili agaroz) ili poliakrilamida. Sephadex je često upotrebljavan komercijalni pripravak kuglica s različitim promjerima u rasponu 40-120 μm . Male molekule mogu ući u pore čestica, dok velike ne mogu. Kao rezultat, male molekule su raspodijeljene u unutrašnjosti čestica i između njih, dok su velike molekule smještene samo u mobilnoj tekućoj fazi između čestica. Prema tome, velike molekule se kreću znatno brže kroz stupac od malih te iz njega izlaze prve. Molekule čija je veličina takva da povremeno ulaze u kuglice, putovati će srednjom brzinom, dok će male molekule putovati najsporije upravo zbog ulazaka u kuglice te dužeg i težeg puta [25].

2.2. ELEKTROFOREZA

Fenomen kretanja molekule s neto-nabojem u električnom polju naziva se elektroforeza. Elektroforeza pruža izvrstan način odjeljivanja proteina i drugih makromolekula kao što su

DNA i RNA [25]. Brzina kretanja proteina (v) u električnom polju ovisi o jakosti električnog polja (E), o neto-naboju proteina (z) i o koeficijentu trenja (f) prema relaciji (1):

$$v = Ez / f \quad (1)$$

Električnoj sili Ez koja privlači nabijenu molekulu prema suprotno nabijenoj elektrodi suprotstavlja se trenje viskoziteta $f v$ koje potječe od trenja između pokretnih molekula i medija. Koeficijent trenja f ovisi i o masi i obliku putujuće molekule kao i o viskoznosti (η) medija. Za kuglu polumjera r , vrijedi relacija (2):

$$f = 6\pi\eta r \quad (2)$$

Elektroforetsko odjeljivanje se gotovo uvijek provodi u gelovima, a može se provoditi i na čvrstoj podlozi kao što je papir. Gel služi kao molekularno sito koje pojačava odjeljivanje. Molekule koje su znatno manje od pora u gelu lako se kreću kroz gel, dok se molekule veće od pora gotovo ne kreću [25].

2.2.1. Elektroforeza u gelu

Gel elektroforeza je rutinska metoda koja se koristi u biokemijskim laboratorijima za identifikaciju bioanalita kao što su proteini i/ili nukleinske kiseline [5].

Ukoliko se kao nosač elektrolitne otopine koristi gel, omogućuje se kontrola veličine pora kroz koje migriraju molekulski ioni te se na taj način upravlja učinkom molekularnog sita u razdvajanju makromolekula u elektroforezi. Gel zapravo čini prostorno umrežene molekule u kojem su šupljine, odnosno pore, ispunjene elektrolitnom otopinom, najčešće otopinom pufera [2].

Prednosti gel elektroforeze su jednostavnost korištenja, jednostavna instrumentacija, visoka rezolucija i mali trošak u odnosu na druge metode. Godine 1930., Arne Tiselius je prvi puta opisao elektroforetsku metodu razdvajanja proteina. Metodu je nazvao elektroforezom pomičnih granica [27].

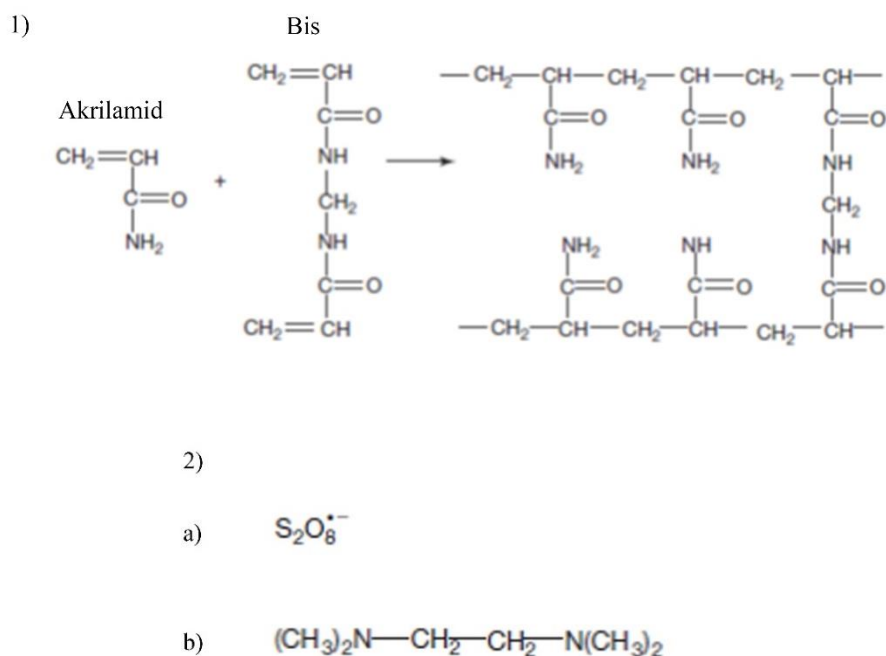
Razlikujemo škrobni, agarozni i poliakrilamidni gel. Uporabom škrobnog gela učinjen je veliki napredak u rezoluciji razdvajanja makromolekula u odnosu na elektroforezu na papiru,

koja je bila zastupljena do razvoja elektroforeze u gelu. Međutim, danas se škrobni gel praktično malo rabi zbog neusporedivih prednosti koje pruža poliakrilamidni gel. Agarozni gel se koristi u imunoelektroforezi te za elektroforezu nukleinskih kiselina. Zbog brojnih prednosti u usporedbi sa škrobnim i agaroznim gelom, poliakrilamidni gel je postao najčešće korišten medij za elektroforezu proteina [28].

2.2.1.1. Poliakrilamidni gel

U elektroforezi se danas najčešće koriste gelovi od poliakrilamida. Ovakav gel je prvi puta primijenjen 1960. godine. Kemijski je inertan jer ne smije reagirati s analitom, kemikalijama za bojenje ili bilo kojom kemijskom vrstom korištenom u elektroforetskom puferu. Ima jednoličnu strukturu i homogena svojstva te se može brzo i jednostavno prirediti iz lako dostupnih kemikalija [2, 29]. Prostorna struktura poliakrilamidnog gela, može se kontrolirano modificirati i tako prilagoditi željenoj primjeni [2]. Glavne karakteristike poliakrilamidnih gelova su i velika električna provodljivost te providnost koja omogućava uspješno bojanje. Ključno svojstvo gela za elektroforezu je i niska toksičnost. Poliakrilamidni gelovi su relativno netoksični, no monomer akrilamid korišten za njihovu pripremu je vrlo toksičan. Apsorpcijom kroz kožu iritira kožu, a udisanje čestica akrilamidne prašine uzrokuje poremećaje centralnog živčanog sustava [2, 29]. Poliakrilamidni gelovi svoju popularnost duguju nekoliko osnovnih svojstava. Imaju veliku optičku čistoću, uključujući i ultraljubičastu, UV transparentnost pri 280 nm. Uz to su električno neutralni, jer nemaju nabijene grupe te su dostupni u širokom rasponu veličine pora [29].

Struktura nastala umrežavanjem akrilamida i N,N' -metilenbisakrilamida (Bis), koji služi kao sredstvo za križno povezivanje (engl. *crosslinker*), prikazana je na slici 3., zajedno s dva najčešće korištena katalizatora peroksidisulfatom (amonijev ili natrijev) i N,N,N',N' -tetrametiletilen diaminom (TEMED).



Slika 3. 1) Reakcija polimerizacije akrilamida. Prikazane su strukture akrilamida i *N,N'*-metilenbisakrilamida (Bis) i 2) formule najčešćih katalizatora reakcije a) radikal peroksidsulfata i b) *N,N,N',N'*-tetrametiletilen diamin (TEMED) [29].

Veličina pora u gelu ovisi o ukupnoj koncentraciji mješavine akrilamida i bisakrilamida, ali i o samoj koncentraciji sredstva za unakrsno povezivanje (tj. bisakrilamida). Sastav gela definiran je s dva parametra, %T i %C. %T predstavlja ukupnu koncentraciju monomera na 100 mL otopine, dok %C predstavlja maseni udio sredstva za križno povezivanje na 100 g ukupne mase monomera [29, 30]. Veličina pora poliakrilamidnog gela može se progresivno povećavati smanjenjem %T pri konstantnom %C, no vrlo razrijeđeni gelovi (< 2,5 %T) mehanički su nestabilni, pa je maksimalna veličina pora oko 80 nm, što omogućava razdvajanje proteina vrlo velikih molekularnih masa [30]. Približan odnos koncentracije gela i veličine proteina koji se optimalno razdvajaju dan je u tablici 1.

Tablica 1. Odnos koncentracija poliakrilamidnog gela i optimalne veličine proteina [30].

%T	Molekularna masa (kDa)
3-5	100
5-12	20-150
10-15	10-80
>15	>15

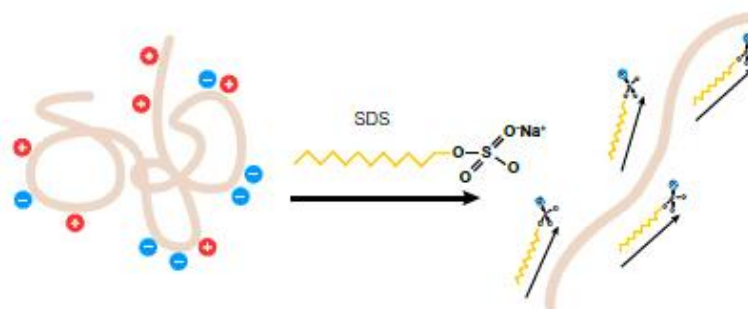
2.2.2. Uvjeti elektroforetskog razdvajanja u poliakrilamidnom gelu

2.2.2.1. Nativna elektroforeza

U nativnoj elektroforezi na poliakrilamidnom gelu (engl. *native PAGE*), proteini se razdvajaju prema naboju, veličini i obliku njihove native strukture. Elektroforetsko kretanje nastaje jer većina proteina nosi negativan naboj u alkalnim puferima. Što je veća gustoća negativnog naboja (više naboja po molekulskoj masi), protein se kreće brže. Budući da se u nativnoj PAGE ne koriste nikakva denaturirajuća sredstva, kvaterna struktura proteina ostaje očuvana [31]. Elektroforeza u nativnim uvjetima primjenjuje se kada je potrebno sačuvati interakcije među proteinskim podjedinicama i njihovu nativnu konformaciju, što omogućava analizu biološke aktivnosti proteina (npr. aktivnost enzima, vezanje antitijela, aktivnost receptora). Nažalost, pogodna je samo za one proteine koji su topljivi i koji se neće istaložiti ili agregirati tijekom elektroforeze [30].

2.2.2.2. SDS-PAGE

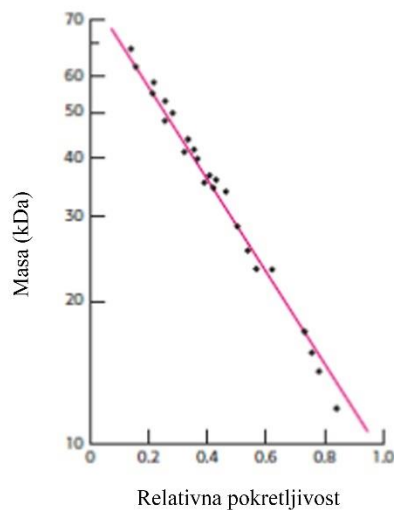
Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu uz prisutnost natrijevog dodecil-sulfata, SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) frakcionira polipeptidne lance na osnovi njihove veličine [29]. Natrijev dodecil-sulfat, SDS (engl. *sodium dodecyl sulfate*) je anionski tenzid koji razara gotovo sve nekovalentne veze nativnog proteina [24]. SDS-PAGE je najšire korištena elektroforetska tehnika za analizu proteina, prvenstveno zahvaljujući sposobnosti SDS da, u prisutnosti reagensa za razaranje disulfidnih veza, solubilizira, denaturira i disocira većinu proteina u pojedinačne polipeptidne lance. Naboj polipeptidnih lanaca maskira se vezanim SDS, tako da neto naboj po jedinici mase bude približno konstantan [30]. Iznenadujuće se velika količina SDS veže na protein, u prosjeku 1,4 g SDS po gramu proteina [29]. Stoga, elektroforetsko razdvajanje ovisi samo o efektivnom promjeru molekule, koji odgovara relativnoj molekularnoj masi, a rezultat je isključivo efekta sita u gelu [30]. Ako je migracija proteina u SDS proporcionalna jedino masi molekule, tada osim što isključuje razlike u naboju, SDS također izjednačuje i razlike u oblicima molekula. (npr. globularne i štapičaste molekule) [29]. Struktura i način vezanja SDS na protein prikazani su slikom 4. gdje je vidljiv način interakcije SDS s proteinom te utjecaj na kvaternu, terciarnu i sekundarnu strukturu proteina.



Slika 4. Shematski prikaz interakcije SDS s proteinom [32].

Pri denaturirajućim uvjetima elektroforeze, uz SDS se koriste i reducirajući agenti 2-merkaptetanol i ditioneitol (DTT), koji reduciraju disulfidne veze i time omogućavaju

razmotavanje proteina [29]. Mobilnost većine polipeptidnih lanaca u denaturirajućim uvjetima je linearno proporcionalna logaritmu njihove mase što je prikazano slikom 5. [25].



Slika 5. Odnos elektroforetske mobilnosti molekule i logaritma njezine molekulske mase u denaturirajućim uvjetima elektroforeze [25].

Elektroforeza malih proteina u PAGE (engl. *Polyacrylamide gel electrophoresis*) sustavu je izazov. Smanjenje veličine pora povećanjem ukupne koncentracije gela i/ili sadržaja sredstva za unakrsno povezivanje kao takvo funkcionira samo do određene granice. Kada se prijeđe kritična granica, dobivaju se mutni gelovi s većim porama [29].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitivani materijal

Metalotioneini su određivani iz uzoraka homogeniziranog tkiva gujavica (*Lumbricus terrestris*). Dio uzoraka dobiven je iz gujavica tretiranih cinkom, dok je drugi dio uzoraka služio kao kontrola i dobiven je iz netretiranih gujavica.

3.2. Kemikalije

Sve kemikalije korištene u ovom radu su analitičke čistoće, a voda korištena za pripremu pufera i otopina je demineralizirana i deionizirana. Popis korištenih kemikalija:

Aceton, C_3H_6O (M = 58,08 g/mol, Sigma - Aldrich)

Acetonitril, C_2H_3N (M = 41,05 g/mol, Sigma - Aldrich)

Akrilamid, C_3H_5NO (M = 71,08 g/mol, Sigma - Aldrich)

Amonijev persulfat, APS, $(NH_4)_2S_2O_8$ (M = 228,18 g/mol, Acros Organics)

Bakrov(II) sulfat pentahidrat, $CuSO_4 \times 5H_2O$ (M = 249, 68 g/mol, T.T.T.)

Bisakrilamid, *N,N'*-metilenbisakrilamid (M = 154,17 g/mol, Sigma - Aldrich)

Coomassie brilliant plavo (M = 825,97 g/mol, JT Baker)

Ditiotreitol, DTT, $C_4H_{10}O_2S_2$ (M = 154,25 g/mol, BDH Prolabo)

Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), $C_{10}H_{16}N_2O_8$ (M = 292,24 g/mol, BDH Prolabo)

Folin - Ciocalteu reagens (Sigma - Aldrich)

Glicerol, $C_3H_8O_3$ (M = 92,094 g/mol, Sigma - Aldrich)

Govedi serumski albumin, BSA (Amresco)

Kalijev dihidrogen fosfat, KH_2PO_4 (M = 136,086 g/mol, Kemika)

Kalijev hidrogen fosfat, K_2HPO_4 (M = 174,2 g/mol, Kemika)

Kalijev natrijev tartarat, $KNaC_4H_4O_6 \times 4H_2O$ (M = 282,1 g/mol, Kemika)

Klorovodična kiselina, HCl (M = 36,46 g/mol, Carlo Erba)

Monobromobiman, mBBr, $C_{10}H_{11}BrN_2O_2$ 90mM (M = 271,11 g/mol, Cayman Chemical)

Natrijev dodecil sulfat, SDS, $NaC_{12}H_{25}SO_4$ (M = 288,37 g/mol, Acros Organics)

Natrijev hidroksid, NaOH (M = 39,99 g/mol, Kemika)

Natrijev karbonat, Na₂CO₃ (M = 105,99 g/mol, GRAM –MOL)

Metanol, CH₃OH (M = 32,04 g/mol, Sigma - Aldrich)

Octena kiselina, CH₃COOH (M = 60,05 g/mol, Sigma - Aldrich)

TEMED, *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin, C₆H₁₆N₂, (M = 116,21 g/mol, AppliChem)

Tricin, C₆H₁₃NO₅ (M = 330,29 g/mol, Fisher Scientific)

Tris(hidroksimetil)aminometan, TRIS, C₄H₁₁NO₃ (M = 121,14 g/mol, BDH Prolabo)

3.3. Metode

3.3.1. Priprema uzoraka tkiva gujavica

Uzorci gujavica dobiveni su s Odjela za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Gujovice su izlagane cinku u umjetnom tlu u sklopu reproduksijskog testa toksičnosti koji se izvodi prema OECD 222 protokolu [33]. Izlaganje je trajalo 28 dana nakon čega je pripremljena postmitohondrijska ili S30 frakcija. Gujovice su izvagane i homogenizirane u fosfatnom puferu (pH = 7,2) u omjeru mase tkiva i volumena pufera 1 : 5. Nakon homogeniziranja, homogenat je centrifugiran 20 minuta na 30 000 x g na temperaturi 4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant je odvojen u mikroeprovete, pri čemu je dobivena tzv. S30 frakcija skladištena na temperaturi -80 °C do analize.

3.3.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Lowryju

Uzorcima homogenata gujavica određena je koncentracija ukupnih proteina metodom po Lowryju [34]. Za ovu je metodu bilo potrebno pripremiti baždarnu krivulju koristeći albumin goveđeg seruma, BSA (engl. *bovine serume albumine*) kao standard. Iz temeljne otopine BSA, koncentracije 1 µg/µL, u mikroeprovetaima je pripremljeno po 100 µL uzoraka različitih koncentracija: 0,1 µg/µL; 0,2 µg/µL; 0,4 µg/µL; 0,8 µg/µL i 1 µg/µL. Tim je uzorcima potom dodano 1 mL alkalnog bakrenog reagensa pripremljenog tako da je u staklenoj čaši pomiješano

50 mL otopine 2 % Na_2CO_3 u 0,1M NaOH s 0,5 mL otopine 1 % $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ i 0,5 mL otopine 2 % K, Na-tartarata. Nakon inkubacije 10 minuta na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodano 100 μL *Folin – Ciocalteu*² reagensa, razrijeđenog s vodom u omjeru 1 : 1, te su uzorci inkubirani u suhoj kupelji 10 minuta na 37 °C. U slijepu je probu umjesto standarda dodana samo voda. Na isti su način pripremljeni i uzorci za određivanje koncentracije proteina u uzorcima homogenata gujavica, pri čemu je u epruvetu otpipetirano 100 μL uzorka razrijeđenog s vodom u omjeru 1 : 20. Tako pripremljenim uzorcima je spektrofotometrom (*Shimadzu UV-1900*) mjerena apsorbancija na valnoj duljini $\lambda = 660 \text{ nm}$.

3.3.3. Priprema i obrada uzoraka za elektroforezu

Nakon što im je određena koncentracija ukupnih proteina, svi uzorci homogenata gujavica su razrijeđeni s fosfatnim puferom ($\text{pH} = 7,2$) kako bi se dobila ista koncentracija proteina od 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, te se time olakšala daljnja obrada uzoraka.

Priprema uzoraka za elektroforezu provedena je dvjema različitim metodama. Prva metoda je tretiranje uzoraka toplinom. Odvojeno je 50 μL uzorka homogenata (250 μg ukupnih proteina) te je zagrijavano u suhoj kupelji 10 minuta na 95 °C. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 15 minuta na 14 000 x g pri temperaturi od 4 °C (*Centric 200R, Tehnica*). Supernatanti su odvojeni u nove mikroeprovete te su korišteni za daljnju analizu.

Druga metoda je precipitacija uzoraka s acetonom. Odvojeno je 50 μL uzorka homogenata (250 μg ukupnih proteina) te mu je dodano 100 μL 80 %-tnog ledeno hladnog acetona. Uzorci su ostavljeni preko noći na temperaturi -20 °C, nakon čega su centrifugirani 15 minuta na 14 000 x g. Uklonjen je gornji sloj acetona, a uzorci su resuspendirani u 50 μL fosfatnog pufera ($\text{pH} = 7,2$).

Prethodno elektroforezi, uzorci su derivatizirani monobromobimonom, mBBR. Pripremljena je 90 mM otopina mBBR dodatkom 2,44 g mBBR u 100 μL acetonitrila. Dodano

² Komercijalni reagens koji sadrži fosfovolfram i fosfomolibden kiselinu koje s bakrenim ionom daju kompleks plavoljubičastog obojenja, ime dobio po znanstvenicima Otto Folinu i Vintilă Ciocâlțuu.

je po 3 μL ove otopine u 50 μL uzoraka (5,4mM). Uzorci s dodanim mBBr-om su inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, a dio uzoraka nije derivatiziran s mBBr-om.

3.3.4. Priprema poliakrilamidnih gelova

Pripremljeni su poliakrilamidni gelovi za elektroforezu prema dvjema metodama. Metode se razlikuju u sastavima gelova i pufera u elektroforetskom sustavu.

Za poliakrilamidne gelove pripremljena je otopina akrilamida s bisakrilamidom (40 %T, 3 %C). Ova otopina je korištena za pripremu svih poliakrilamidnih gelova u eksperimentalnom dijelu rada.

3.3.4.1. Priprema poliakrilamidnih gelova za elektroforezu u tricin-Tris puferskom sustavu

Tablicama 2. i 3. prikazani su reagensi potrebni za pripravu poliakrilamidnih gelova koncentracija 12 % i 16 % za elektroforezu u tricin-Tris puferskom sustavu prema Schaggeru [35].

Tablica 2. Prikaz volumena reagensa potrebnih za pripremu razdvajajućih poliakrilamidnih gelova koncentracija 12 % i 16 %.

	12 % gel	16 % gel
AB* (40 %T,3 %C)	4,5 mL	6 mL
gel pufer (3M Tris-HCl, pH 8,45, 0,3 % SDS)	5 mL	5 mL
glicerol	1,5 mL	1,5 mL
voda	4 mL	2,5 mL
APS (10 %)	75 μL	50 μL
TEMED	7,5 μL	5 μL

*otopina akrilamida s bisakrilamidom

Tablica 3. Prikaz potrebnih volumena reagensa za pripremu sabijajućeg poliakrilamidnog gela koncentracija 4 %.

AB* (40 %T,3 %C)	0,5 mL
gel pufer (3M Tris-HCl, pH 8,45, 0,3 % SDS)	1,25 mL
voda	3,25 mL
APS (10 %)	50 μ L
TEMED	5 μ L

*otopina akrilamida s bisakrilamidom

Pripremljen je razdvajajući poliakrilamidni gel prema podacima iz tablice 2. Svi reagensi su pomiješani u staklenoj čaši na magnetnoj miješalici. APS i TEMED su dodani u otopinu neposredno prije nanošenja među stakla, jer njihovim dodatkom započinje polimerizacija. Nakon što su svi reagensi pomiješani, 4,5 mL otopine je mikropipetom pažljivo naneseno među stakla, pazeći da pritom ne nastanu mjehurići. Na vrh otopine dodan je 1 mL destilirane vode, nakon čega je gel ostavljen 45 minuta kako bi polimerizirao. Nakon polimerizacije je uklonjen gornji sloj vode te je, prema tablici 3., pripremljen sabijajući gel. Nakon nanošenja otopine među stakla, na vrh su umetnuti češljici zaduženi za formiranje jažica u koje će se unositi uzorci. Gel je polimerizirao 45 minuta nakon čega su izvađeni češljici i gel je bio spreman za elektroforezu.

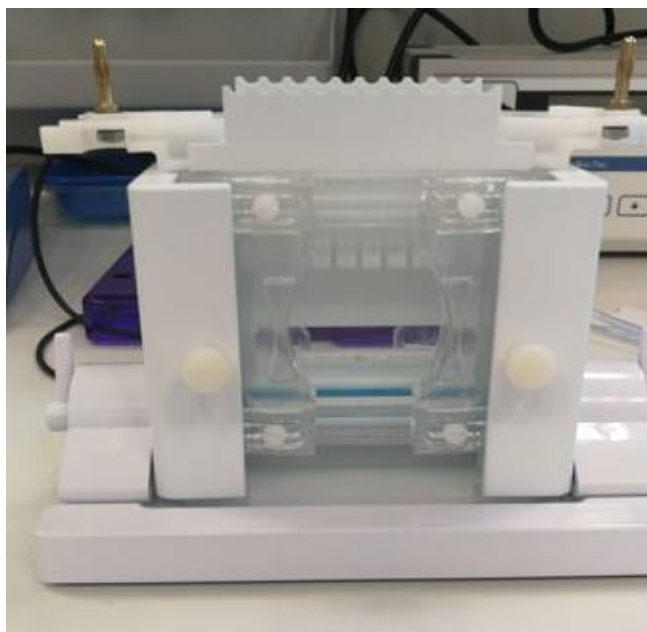
3.3.4.2. Priprema poliakrilamidnih gelova za elektroforezu u glicin-Tris puferskom sustavu

Tablicom 4. prikazani su reagensi potrebni za pripravu poliakrilamidnog gela koncentracije 12 % za elektroforezu u glicin-Tris puferskom sustavu prema Laemmliju [36]. Gel je pripremljen na isti način kao i gelovi za elektroforezu u tricin-Tris puferskom sustavu. Aparatura za polimerizaciju gelova prikazana je slikom 6.

Tablica 4. Prikaz potrebnih volumena reagensa za pripremu razdvajajućeg i sabijajućeg poliakrilamidnog gela koncentracija 12 % i 4 %.

	12% razdvajajući gel	4% sabijajući gel
AB* (40 %T,3 %C)	4 mL	665 μ L
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL
voda	3,35 mL	3,35 mL
SDS (10%)	100 μ L	50 μ L
APS (10%)	50 μ L	35 μ L
TEMED	5 μ L	8 μ L

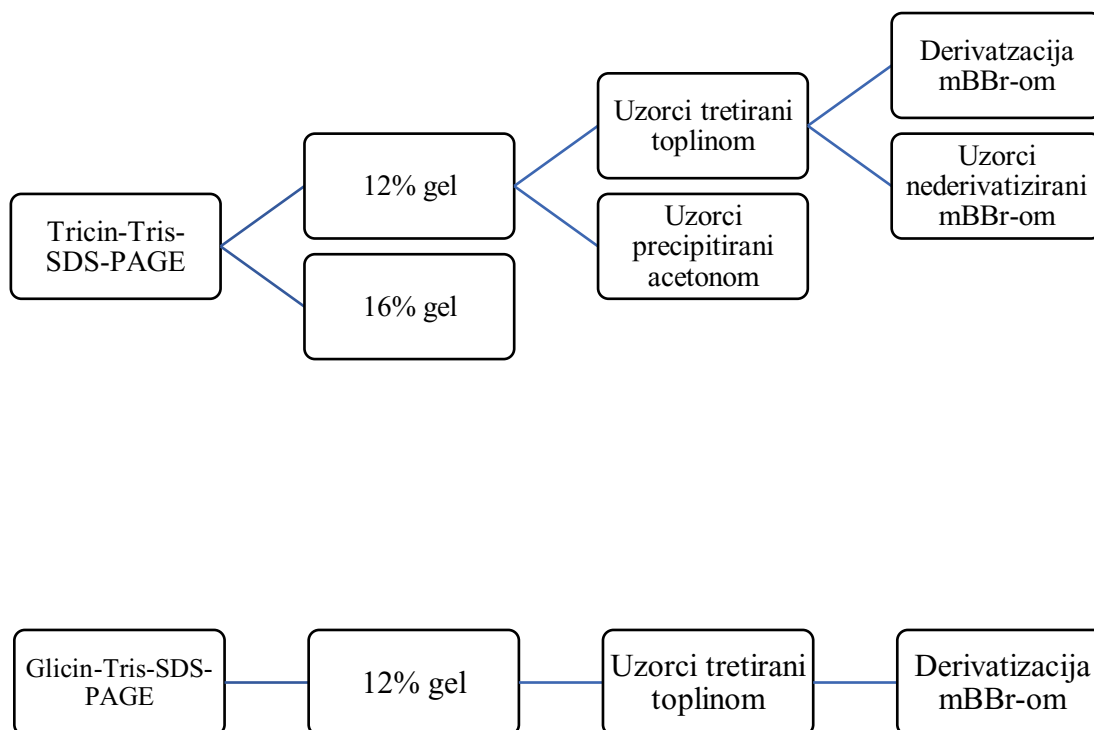
*otopina akrilamida s bisakrilamidom



Slika 6. Aparatura za polimerizaciju poliakrilamidnih gelova.

3.3.5. Provođenje elektroforeze

Različiti uvjeti u kojima se provodila elektroforeza u eksperimentalnom dijelu rada prikazani su slikom 7.



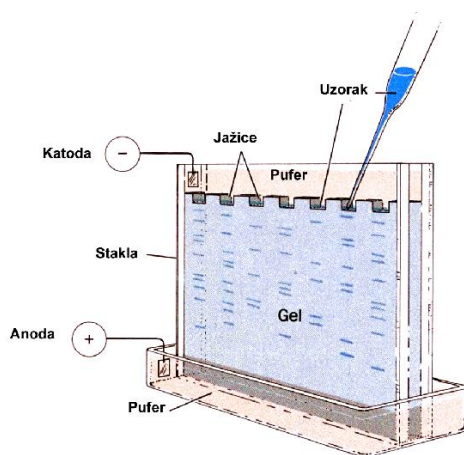
Slika 7. Shematski prikaz različitih uvjeta i metoda primijenjenih za elektroforetsko određivanje metalotioneina u ovom radu.

3.3.5.1. Elektroforeza u tricin-Tris puferskom sustavu

Za provođenje elektroforeze u tricin-Tris puferskom sustavu su pripremljene dvije vrste pufera sastava: 0,1M Tris, 0,1M tricin, 0,1 % SDS i pH 8,25 (katodni) i 0,2M Tris i pH 8,9 (anodni). Prije eksperimenta, pufere je potrebno razrijediti s destiliranom vodom u omjeru 1 : 9 (pufer : voda). Uzorci su pripremljeni za nanošenje na gel dodatkom pufera za nanošenje uzoraka (40 % glicerol, 2 % SDS, 0,04 % *Coomassie brilliant* plavo, 0,5M Tris i pH 6,8) pri čemu je u mikroepruveti pomiješano 6 μL prethodno obrađenog uzorka s 10 μL destilirane vode i 4 μL pufera za nanošenje uzorka. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani 5 minuta na 70 °C u suhoj kupelji.

Uz uzorke, pripremljen je i standard metalotioneina MT-1 (*Enzo Life Sciences*, SAD). Odvojeno je 2 μL standarda koncentracije 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ te mu je dodano 5 μL Tris-HCl pH 7,0. Standard je derivatiziran dodatkom 1 μL mBBR te je inkubiran 15 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. Nakon inkubacije dodano je 2 μL pufera za nanošenje uzoraka te je standard inkubiran 5 minuta na 70 °C u suhoj kupelji.

Gelovi su s postoljem postavljeni u kadicu za elektroforezu. Cijeli sustav je ispunjen puferima za elektroforezu. Pripremljeni uzorci su zatim nanесeni na poliakrilamidni gel u za to predviđene jažice (Slika 8.). U prvu jažicu je nanесen molekularni markeri raspona mase 3,5 - 40 kDa (*Carl Roth*, Njemačka).



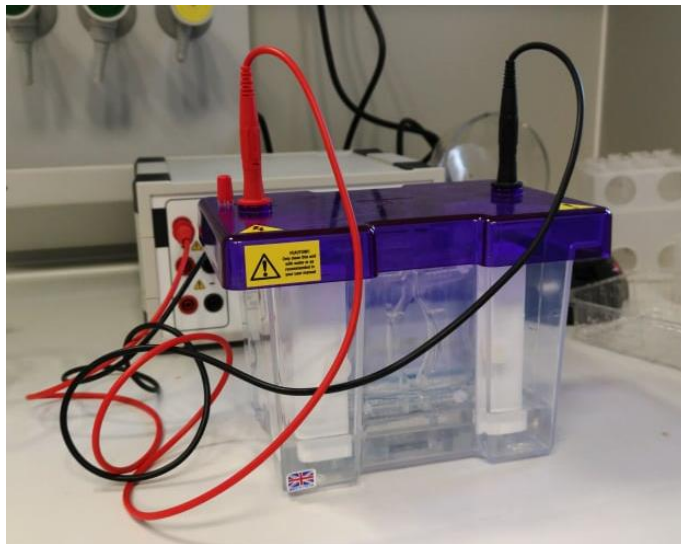
Slika 8. Shematski prikaz poliakrilamidnog gela između stakala prilikom nanošenja uzorka na gel [25].

Kada su nanoseni svi uzorci, uređaj za elektroforezu (*omniPAGE Mini Vertical Protein Electrophoresis System, Clever Scientific*) je zatvoren te spojen na protok struje. Provedena je elektroforeza na 50 V i 80 mA prvih 30 minuta, nakon čega je napon povećan na 120 V. Otprilike 1,5 h kasnije, nakon što su se uzorci približili donjem rubu stakala, elektroforeza je zaustavljena. Isključen je uređaj za elektroforezu te su iz njega izvađena stakla s gelom. Stakla su oprezno razdvojena i gelovi su premješteni u fiksirajuću otopinu (40 % metanol, 10 % octena kiselina). Gelovi su fotografirani pod UV svjetlom ($\lambda = 365 \text{ nm}$) te su nakon toga bojani otopinom *Coomassie brilliant* plavo (50 % metanol, 10 % octena kiselina, 0,25 % *Coomassie brilliant* plavo) 30 minuta. Nakon bojanja, gelovi su odbojani 2 x po 15 min u fiksirajućoj otopini u kojoj su potom ostavljeni i preko noći.

3.3.5.2. Elektroforeza u glicin-Tris puferskom sustavu

Za elektroforezu u glicin-Tris puferskom sustavu pripremljena je samo jedna vrsta pufera sastava: 0,25M Tris, 1,92M glicin, 1 % SDS i pH 6,8. Ovako pripremljena otopina pufera je razrijeđena s destiliranom vodom u omjeru 1 : 9 (pufer : voda). Uzorci i standard metalotioneina su pripremljeni za nanošenje na gel na isti način kao i kod elektroforeze u tricin-Tris puferskom sustavu. Gelovi su s postoljem postavljeni u kadicu za elektroforezu te je cijeli sustav ispunjen puferom za elektroforezu. Pripremljeni uzorci su zatim nanoseni na poliakrilamidni gel u za to predviđene jažice. U prvu jažicu je nanosen molekularni marker raspona mase 3,5 - 40 kDa (*Carl Roth*, Njemačka).

Nakon nanošenja svih uzoraka, uređaj za elektroforezu je zatvoren te spojen na protok struje (Slika 9.). Provedena je elektroforeza na 50 V i 80 mA prvih 30 minuta, nakon čega je napon povećan na 120 V. Otprilike 1,5 h kasnije, nakon što su se uzorci približili donjem rubu stakala, elektroforeza je zaustavljena. Isključen je uređaj za elektroforezu te su iz njega izvađena stakla s gelom. Stakla su oprezno razdvojena i gelovi su premješteni u fiksirajuću otopinu. Gelovi su fotografirani pod UV svjetlom ($\lambda = 365 \text{ nm}$) te su nakon toga bojani otopinom *Coomassie brilliant* plavo 30 minuta. Nakon bojanja, gelovi su odbojani 2 x po 15 min u fiksirajućoj otopini u kojoj su potom ostavljeni i preko noći.



Slika 9. Uređaj za elektroforezu spojen na protok struje.

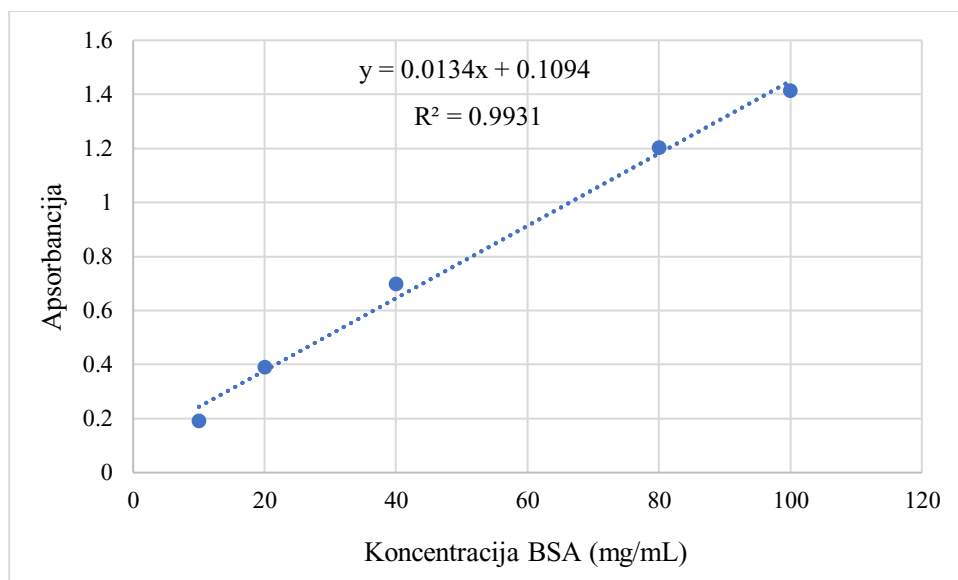
4. REZULTATI I RASPRAVA

Najznačajnija funkcija metalotioneina u živim organizmima je održavanje homeostaze esencijalnih metalnih iona. Također, metalotioneini u velikoj mjeri reguliraju odgovore organizama na stres uzrokovan teškim metalima. Mnoga su istraživanja pokazala povišenje ekspresije ovih proteina u gujavicama nakon njihova izlaganja povećanim koncentracijama različitih metala [13]. Zbog toga su kao testni organizam izabrane upravo gujave koje su izložene umjetnom tlu s povećanom koncentracijom cinka u svrhu indukcije (povećanja) metalotioneina.

Uslijed male molekulske mase i specifične primarne strukture, izolacija, detekcija i kvantifikacija metalotioneina često je vrlo zahtjevan i dugotrajan proces. Zbog toga se u ovome radu nastojalo ispitati može li se relativno jednostavna metoda, poput elektroforeze u poliakrilamidnom gelu, koristiti za dobivanje barem početne informacije o mogućim promjenama u sadržaju metalotioneina u homogenatima gujavica.

4.1. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Lowryju

Kako bi se mogle pratiti razlike u sastavu proteina između uzoraka te procijeniti uspješnost razdvajanja proteina u gelu, važno je osigurati da je u svaku jažicu gela nanjena ista količina ukupnih proteina. Za određivanje koncentracije ukupnih proteina u uzorcima, korištena je metoda po Lowryju. To je indirektna metoda za određivanje koncentracije proteina koja se zasniva na mjerenju apsorbancije otopine proteina pomoću spektrofotometra, nakon čega se vrijednosti apsorbancije preračunavaju u količinu proteina pomoću baždarnog dijagrama. Temelj metode je reakcija bakrenih iona koordinativno vezanih za amino skupine peptidnih veza u proteinu i fenolne skupine bočnih ogranaka aminokiseline tirozina (Tyr) u proteinu s *Folin-Ciocalteu* reagensom. *Folin-Ciocalteu* reagens sadrži fosfomolibden i fosfomolibden kiselinu koje se u reakciji s bakrovim ionima i tirozinom reduciraju u volfram i molibden plavilo, dajući cijeloj otopini plavoljubičasto obojenje s maksimumom apsorpcije pri 660 nm [34]. Što je veća koncentracija proteina, plavoljubičasto obojenje je intenzivnije te je samim time i apsorbancija veća.



Slika 10. Krivulja ovisnosti intenziteta apsorbancije o koncentraciji proteina BSA u otopini.

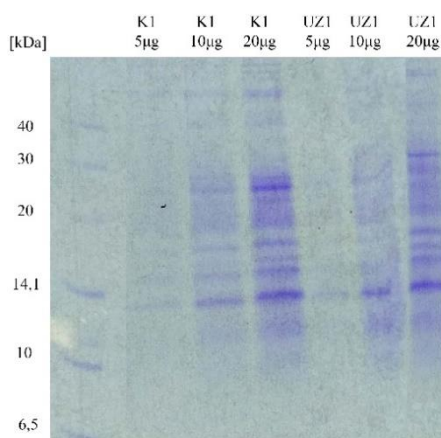
Na slici 10. je prikazana baždarna krivulja dobivena mjerenjem apsorbancija različitih koncentracija standarda BSA. Iz dobivene jednadžbe pravca izračunate su koncentracije ukupnih proteina u uzorcima prema očitanim apsorbancijama (Tablica 5.). Koncentracije uzoraka iznosile su od 5,87 do 7,41 mg/mL. Ovakvi rezultati upućuju na uzorke bogate proteinima što je i očekivano s obzirom da se radi o cjelokupnom homogenatu gujavica koji nije podvrgnut dodatnom frakcioniranju.

Tablica 5. Izmjerene apsorbancije i preračunate koncentracije ukupnih proteina uzoraka homogenata gujavice.

Oznaka uzorka	$\Delta A_{660\text{nm}}$	c (mg/mL)
K1	0,606	7,41
K2	0,513	6,02
UZ1	0,595	7,25
UZ2	0,570	6,87
UZ3	0,503	5,87
UZ4	0,511	5,99

4.2. Određivanje optimalne količine uzorka

Ukupna količina proteina nanesenih u jažice gela znatno utječe na uspješnost njihove detekcije. Na gelove, koji će se bojati *Coomassie brilliant* plavim, preporučeno je nanijeti ≤ 20 μg proteina ovisno o složenosti uzorka i zahtjevima analize. Ukoliko se uzme premala količina, intenzitet vrpce nakon obojenja bit će preslab te se proteini zastupljeni u manjim koncentracijama mogu previdjeti. Kod previše proteina, dobiju se najčešće razmazane i mutne vrpce koje je teško razlučiti.

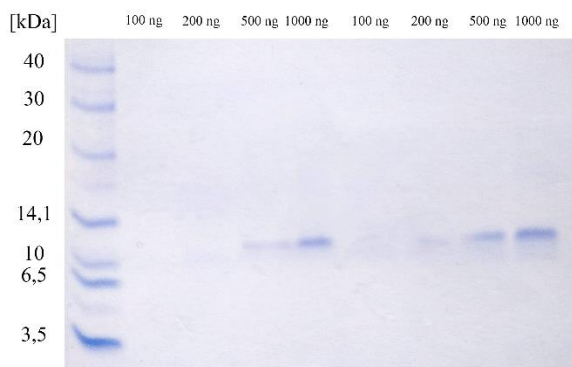


Slika 11. Određivanje optimalne količine proteina za elektroforezu.

Kako bismo odredili optimalnu količinu proteina za naše uzorke, u gelove jažica je nanoseno po 5, 10 i 20 μg proteina za uzorke K1 i UZ1. Na slici 11. se može vidjeti da je količina od 20 μg dala najbolji rezultat. Nakon bojanja s *Coomassie brilliant* plavim stupci s 20 μg daju vrpce jasno izraženih granica. Također, mogu se uočiti pojedine vrpce koje u stupcima s manjom količinom proteina nisu vidljive.

4.3. Određivanje optimalne količine standarda metalotioneina

Kako su ciljni proteini ovoga rada metalotioneini i njihovo određivanje elektroforezom u gelu u smjesi kompleksnih uzoraka, kao što je nepročišćeni homogenat tkiva gujavica, bilo je potrebno odrediti kako se MT ponaša u elektroforetskom sustavu. U tu je svrhu nabavljen komercijalno dostupan standard metalotioneina, MT-1. Količina MT standarda potrebna da bi se dobila jasno vidljiva vrpca na gelu određena je na način da su u jažice gela nanese rastuće količine MT standarda, 100, 200, 500 i 1000 ng. Niz je ponovljen na istom gelu. Prema slici 12. može se zaključiti da je potrebna količina MT standarda od 1000 ng kako bi se dobila jasno izražena vrpca.

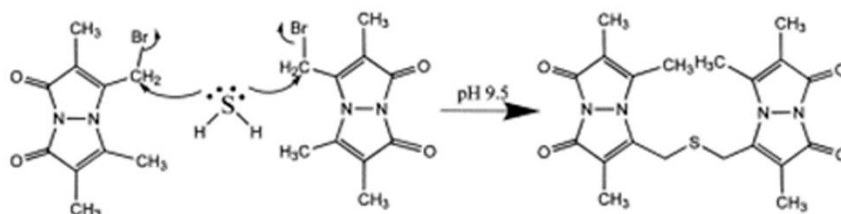


Slika 12. Određivanje optimalne količine standarda metalotioneina MT-1.

Osim optimalne količine MT standarda, ovim je eksperimentom pokazan i put koji ovi proteini prolaze u elektroforetskom sustavu, odnosno gdje se nalaze u odnosu na marker molekularnih masa. Prema literaturi, MT-1 standard u poliakrilamidnom gelu pokazuje vrpcu na molekularnoj masi ≈ 12 kDa [40], što odgovara i rezultatima dobivenim u radu (Slika 12.). Zanimljivo je da je molekularna masa MT, koji je ovdje korišten kao standard, svega 6,145 kDa, međutim, smatra se da je vrpca pri gotovo duplo većoj molekulskoj masi rezultat oksidacijske polimerizacije MT molekula pri čemu, uslijed stvaranja metalnih mostova, nastaju dimeri [8].

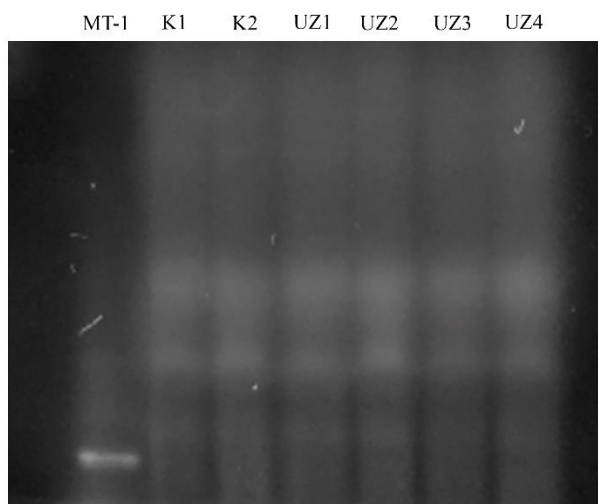
4.4. Derivatizacija uzoraka monobromobimanim

Monobromobiman (mBBBr) fluorescentno obilježava male i velike molekule u biološkim sustavima reagirajući specifično i brzo s tiolnim (-SH) skupinama pri čemu nastaju fluorescentni derivati. Budući da metalotioneini u strukturi imaju oko 30 % cisteina i bogati su tiolnim skupinama, mBBBr je idealan izbor za njihovo obilježavanje. Također, vezanjem mBBBr na tiolne skupine sprječava se nasumična polimerizacija do koje može doći tijekom SDS-PAGE. Reakcijom nukleofilne supstitucije dva ekvivalenta mBBBr i tiolna skupina daju fluorescentni dibiman sulfid (Slika 13.) s maksimumom ekscitacije pri $\lambda = 390$ nm i maksimumom emisije pri $\lambda = 475$ nm [41].



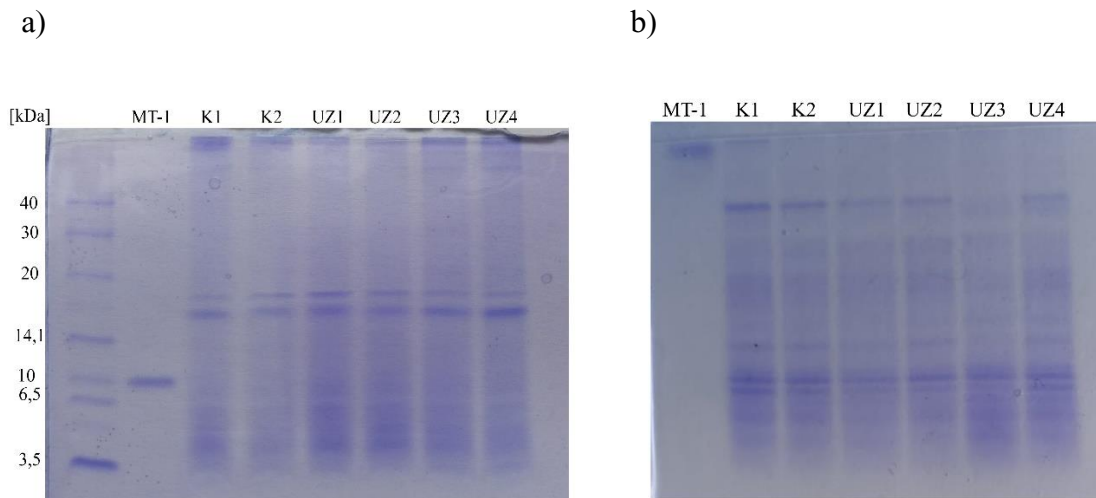
Slika 13. Reakcijom mBBBr s tiolnom skupinom nastaje fluorescentni dibiman sulfid [42].

Na slici 14. prikazan je gel s uzorcima deriviranim mBBBr-om vizualiziran pod UV lampom ($\lambda = 365$ nm) prije bojanja *Coomassie brilliant* plavim. Elektroforeza je provedena u trecin-Tris-SDS-PAGE sustavu s 12 % gelom. Može se uočiti da je MT-1 standard reagirao s mBBBr-om i dao jasni fluorescentni signal, što potvrđuje ovaj spoj kao dobar odabir za detekciju MT. Međutim, u uzorcima se na tom položaju ne vide jasne fluorescentne linije. Izostanak signala najvjerojatnije je posljedica premalene količine MT u uzorcima nefrakcioniranih homogenata u odnosu na druge proteine. Također, mBBBr obilježava sve -SH skupine, tj. nije selektivan isključivo za MT, što je rezultiralo jakim signalima na većim molekulskim masama gdje se vjerojatno nalaze proteini prisutni u znatno većem udjelu u cjelokupnom homogenatu u odnosu na MT.



Slika 14. Poliakrilamidni gel vizualiziran pod UV lampom ($\lambda = 365 \text{ nm}$) nakon tricin-Tris-SDS-PAGE.

Bojanje metalotioneina *Coomassie brilliant* plavim predstavlja problem jer nemaju aromatske aminokiseline u strukturi, budući da se upravo na njih nekovalentno veže ova boja. Upravo zato je fluorescentno obilježavanje metalotioneina vrlo prikladno za njihovu detekciju i kvantifikaciju u biološkim uzorcima te se također, derivatizacijom mBBBr-om, zbog njegove heterocikličke strukture, doprinosi uspješnijem bojanju *Coomassie brilliant* plavim [43].

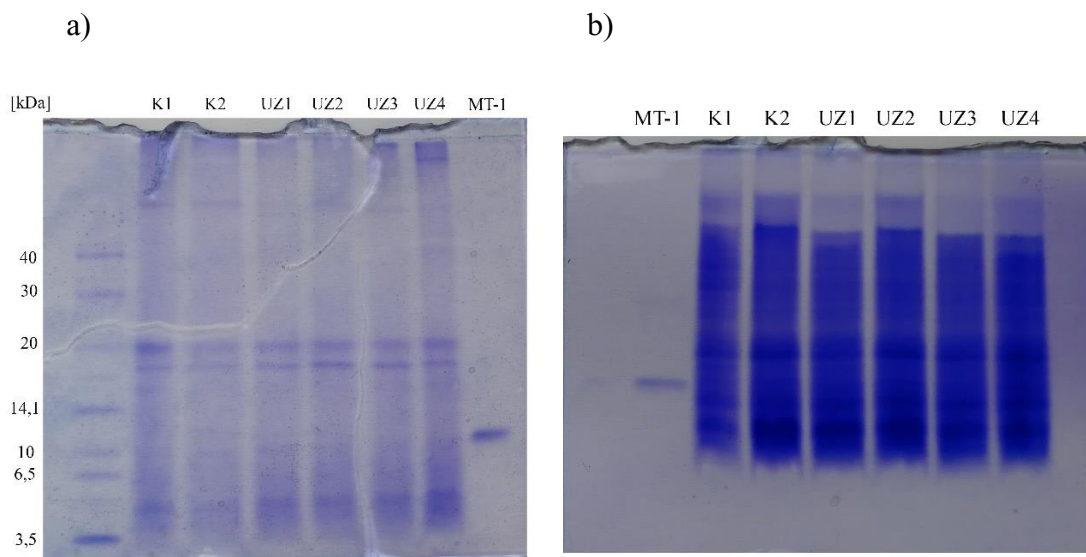


Slika 15. Usporedba uspješnosti elektroforeze a) uzoraka derivatiziranih mBBr-om i b) nederivatiziranih uzoraka.

Na slici 15. su prikazani rezultati nakon tricin-SDS-PAGE u 12 % gelu. Uzorci su pripremljeni na isti način (tretirani topline), no uzorci pod b) nisu derivatizirani mBBr-om. Nakon bojanja *Coomassie brilliant* plavim, uočava se kako nema vidljive vrpce na položaju MT standarda kod nederivatiziranih uzoraka, dok je kod uzoraka derivatiziranih mBBr-om ta vrpca jasno vidljiva. Također se može uočiti znatno drugačiji profil cjelokupnog gela što može biti posljedica vezanja mBBr na -SH skupine drugih proteina u uzorku, koji onda također dolaze jače do izražaja nakon bojanja s *Coomassie brilliant* plavim.

4.5. Utjecaj različite obrade uzoraka

Poznato je da obrada i priprema uzoraka može imati znatan utjecaj na ishod provedene analize. Priprema ili obrada uzoraka se obično radi u svrhu koncentriranja željenog proteina ili pročišćavanja samog uzorka [38]. U nastojanju da se, na jednostavan i brz način, pokuša smanjiti kompleksnost uzoraka radi detekcije MT, isti su pripremljeni na dva načina. U prvome su uzorci podvrgnuti denaturaciji topline pri čemu su zagrijavani 10 min na 95 °C [37], dok su u drugome precipitirani ledeno hladnim acetonom [39]. Nakon toga su, u oba slučaja, uzorci derivatizirani s mBBr-om te je provedena elektroforeza.



Slika 16. Usporedba gelova nakon tricin-SDS-PAGE u 12 % gelu za uzorke a) denaturirane toplinom (95 °C) i b) precipitirane ledeno hladnim acetonom.

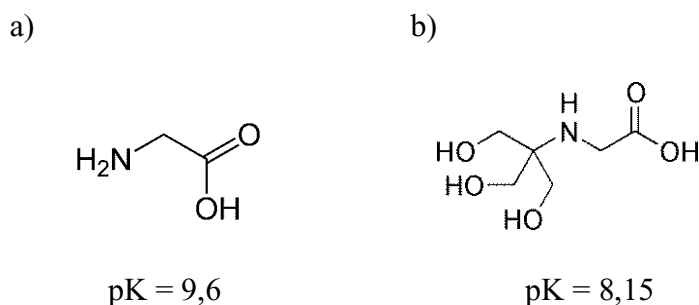
Na slici 16. su prikazani rezultati dobiveni nakon tricin-SDS-PAGE u 12 % gelu. Vidljivo je da je obrada uzoraka samo s toplinom rezultirala boljim razdvajanjem i oštrijim vrpčama. Kod uzoraka precipitiranih acetonom dobivene su znatno obojanije vrpce čije je granice teško razlučiti. Ovakav rezultat može biti posljedica nedovoljne solubilizacije proteinskog peleta dobivenog centrifugiranjem nakon precipitacije acetonom [39].

Tretiranje uzoraka toplinom dalo je i znatno bolje rezultate detekcije MT, iako su i u ovom slučaju vrlo slabo vidljivi na gelu. Vrpce, koje odgovaraju položaju MT standarda, se mogu uočiti u svim uzorcima, a najizraženije su u uzorcima UZ3 i UZ4. U uzorcima tretiranim s acetonom nije moguće izdvojiti zasebne vrpce koje bi odgovarale MT standardu.

4.6. Tricin-SDS-PAGE

Najčešće korištena elektroforetska metoda za razdvajanje proteina u prisutnosti SDS je glicin-SDS-PAGE, poznatija kao i Laemmli-SDS-PAGE [36]. Ova se metoda zasniva na glicin-Tris sustavu pufera i optimalna je, ovisno o koncentracijama akrilamida i bisakrilamida u

gelovima, za razdvajanje proteina raspona molekulske mase 20 - 100 kDa. Međutim, razdvajanje proteina <20 kDa u Laemmli sustavu je gotovo nemoguće i zahtjeva korištenje poliakrilamidnih gelova visoke gustoće ili onih s gradijentom [30]. Zbog toga je preferirana elektroforetska metoda za analizu ovakvih proteina tzv. tricin-SDS-PAGE, koja koristi tricin-Tris puferski sustav [28, 35, 40]. Ova je metoda posebno pogodna za proteine raspona 1 - 20 kDa te se može provoditi i pri nižim koncentracijama poliakrāmida što olakšava kasnije bojanje gelova ili proces blotanja³. Različite karakteristike razdvajanja ove dvije metode direktno su povezane sa značajnim razlikama u pK vrijednostima funkcionalnih skupina glicina i tricina (Slika 17.), koje pak određuju elektroforetsku pokretljivost nosivih iona (glicina i tricina) u odnosu na elektroforetsku pokretljivost proteina [40].



Slika 17. Strukture a) glicina i b) tricina i njihove pK vrijednosti.

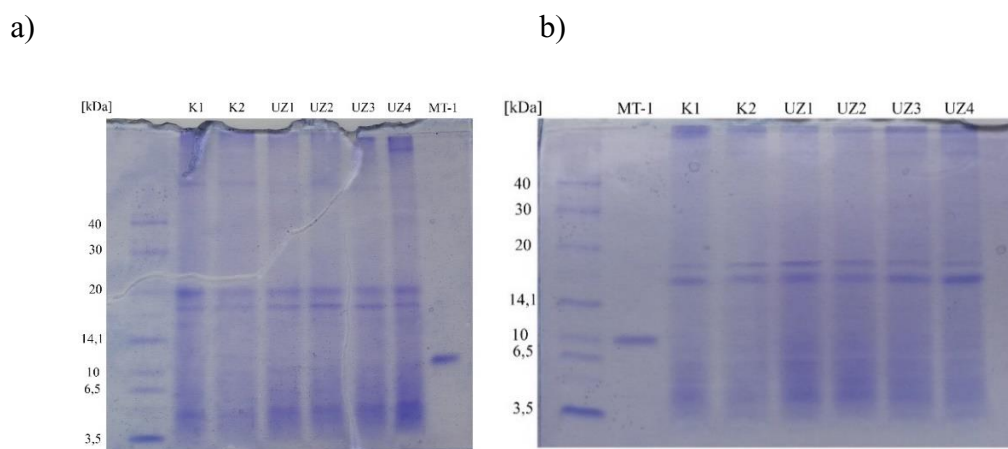
Budući da su MT proteini male molekulska mase, za njihovo elektroforetsko razdvajanje odabran je tricin-SDS-PAGE sustav.

³ Western blot je imunološka metoda, a zasniva se na razdvajanju proteina gel elektroforezom nakon čega se prenose na nitroceluloznu membranu i detektiraju antitijelima specifičnim za ciljni protein [4].

4.6.1. Određivanje optimalne koncentracije gela

Koncentracija mješavine akrilamida i bisakrilamida utječe na veličinu pora u gelu. Što je veća koncentracija gela, manje su njegove pore te je pogodniji za razdvajanje manjih proteina. Kako bi se osiguralo uspješno elektroforetsko razdvajanje metalotioneina, potrebno je odrediti optimalnu koncentraciju gela koja omogućava dobivanje oštarih vrpca bez zamućenja. Tricin-Tris puferski sustav je pogodan za razdvajanje proteina raspona 1 - 100 kDa pri niskim koncentracijama gela, što nije moguće u glicin-Tris puferskom sustavu. Povećanjem koncentracije gela u tricin-Tris puferskom sustavu, moguće je razdvajanje proteina raspona 1 - 20 kDa [35], no kod kompleksnih uzoraka se mogu javiti široke i zamućene vrpce kao posljedica velikog udjela proteina veće molekulske mase [44].

Na slici 18. prikazani su 12 % (a) i 16 % (b) gelovi dobiveni u tricin-Tris puferskom sustavu prema Schäggeru [35]. Iako su oba dala dobre rezultate, 12 % gel je dao nešto izraženiji signal u području manjih molekulskih masa u kojem se nalaze metalotioneini. Kao što je već spomenuto, prednost ove elektroforetske metode upravo je mogućnost razdvajanja proteina male molekulske mase u poliakrilamidnim gelovima nižih koncentracija što je ovdje i potvrđeno. Korištenjem poliakrilamidnoga gela nižih postotaka može se znatno smanjiti i vrijeme provođenja same elektroforeze.



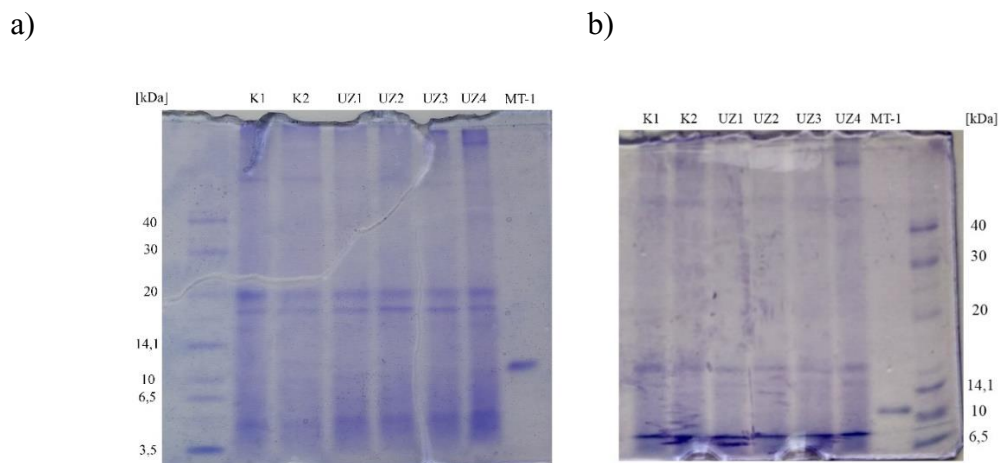
Slika 18. Poliakrilamidni gelovi različitih koncentracija; a) 12 % i b) 16 % nakon tricin-Tris-SDS-PAGE.

Upravo zbog kompleksnosti uzoraka homogenata gujavica, poliakrilamidni gel manje koncentracije (12 %) je dao bolje rezultate, što odgovara i literaturnim podacima [44].

4.6.2. Usporedba tricin-SDS-PAGE i glicin-SDS-PAGE

Unatoč tomu što se tricin-SDS-PAGE nameće kao najbolji izbor za detekciju MT elektroforezom, napravljena je i usporedba sa glicin-SDS-PAGE koja je još uvijek najzastupljenija i najdostupnija elektroforetska metoda. Uzorci su pripremljeni na isti način (tretirani toplinom), u oba su eksperimenta korišteni 12 % poliakrilamidni gelovi s jedinom razlikom što je u prvom korišten tricin-Tris puferski sustav prema Schäggeru, a u dugom glicin-Tris puferski sustav prema Laemmliju (Slika 19.).

Iz slike 19. je vidljivo da je tricin-Tris sustav, prema očekivanom, dao bolje rezultate razdvajanja u području proteina manjih molekulskih masa. To je područje u tricin-Tris gelu i razvučenije što omogućuje učinkovitije razdvajanje malih proteina. U glicin-Tris gelu, proteini najmanje molekulske mase (3,5 kDa) nisu niti detektirani. Također u glicin-Tris gelu ne mogu se razlučiti vrpce u uzorcima u području molekulske mase MT-1 markera, dok su u tricin-Tris gelu, iako vrlo slabo izražene, ipak vidljive. Ovi rezultati potvrđuju tricin-SDS-PAGE kao dobru metodu za elektroforetsko razdvajanje metalotioneina.



Slika 19. Usporedba elektroforeze na 12 % poliakrilamidnim gelovima u a) tricin-Tris puferskom sustavu i b) glicin-Tris puferskom sustavu.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog diplomskog rada provedeno je eksperimentalno određivanje najboljih uvjeta za elektroforetsko razdvajanje metalotioneina iz kompleksnog biološkog uzorka. Elektroforetsko razdvajanje je provedeno na poliakrilamidnom gelu pri različitim uvjetima, uključujući različite obrade uzoraka za elektroforezu, puferske sustave i koncentracije poliakrilamidnog gela. Određeni su i parametri koji osiguravaju najbolje rezultate elektroforeze, poput optimalne ukupne koncentracije proteina nanese na gel, optimalne količine uzorka te optimalne količine standarda MT-1 pomoću kojega je praćeno kretanje metalotioneina u gelu. Također je provjeren i utjecaj derivatizacije uzoraka monobromobimonom na ishod elektroforetskog razdvajanja.

Nakon provedenih eksperimenata, dobiveni su rezultati koju upućuju na najbolje elektroforetsko razdvajanje metalotioneina iz uzoraka homogenata gujavica tretiranih toplinom (95 °C), na poliakrilamidnim gelovima koncentracije 12 % s tricin-Tris-SDS-PAGE. Količina uzorka nanese na gel od 20 µg pokazala se kao optimalna jer daje vrpce jasno izraženih granica. Također, količina standarda metalotioneina potrebna da bi se dobile izražene vrpce na gelu je 1000 ng. Uzorci derivatizirani mBBBr-om su pokazali bolje ponašanje u poliakrilamidnim gelovima u odnosu na nederivatizirane uzorke, posebice prilikom bojanja gelova nakon elektroforeze *Coomassie brilliant* plavim.

Metoda elektroforetskog razdvajanja metalotioneina tricin-Tris-SDS-PAGE (prema Schäggeru) se pokazala kao bolja metoda u odnosu na klasičnu glicin-Tris-SDS-PAGE (prema Laemliju). Međutim, zbog kompleksnosti uzoraka u kojima je, uz metalotioneine, prisutno mnogo drugih proteina, za detekciju metalotioneina u svrhu usporedbe različite količine u pojedinim uzorcima, potrebno ih je dodatno izdvojiti i pročistiti iz homogenate tkiva gujavica.

6. LITERATurna VRELA

- [1] V. Adam, I. Fabrik, *Trends Anal. Chem.* **29** (2010), 409-418.
- [2] I. Piljac, *Elektroforeza*, Media print, Tiskara Hrastić, Zagreb, 2006.
- [3] M. Nordberg, *Talanta* **46** (1998), 243-254.
- [4] M. Margoshes, B.L. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.* **17** (1957), 4813-4814.
- [5] M. Ryvolova, S. Krizkova, V. Adam, *Curr. Anal. Chem.* **7** (2011), 243-261.
- [6] P. Dziegiel, B. Pula, C. Kobierzycki, *Metallothioneins in Normal and Cancer Cells*, Springer International Publishing, Švicarska, 2016.
- [7] Y. Kojima, C. Berger, B. L. Vallee, J. H. Kägi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**(10) (1976), 3413-3417.
- [8] R. Nath, R. Kambadur, S. Gulati, V. K. Paliwal, M. Sharma, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **27** (1988), 41-85.
- [9] K. Zangger, I. M. Armitage, *J. Inorg. Biochem.* **88** (2002), 135-143.
- [10] P. Coyle, G. Niezing, T. L. Shelton, J. C. Philcox, A. M. Rofo, *Toxicology* **150** (2000), 53-67.
- [11] C.D. Klaassen, J. Liu, S. Choudhuri, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39** (1999), 267-94.
- [12] G. Dong, H. Chen, M. Qi, Y. Dou, *Mol. Med. Rep.* **11** (2015), 1582-1586.
- [13] M. Vašak, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **19** (2005) 13-17.
- [14] W. Maret, K. L. Vallee, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** (1997), 2233-2237.
- [15] J.C. Amiard, C. Amiard-Triquet, S. Barka, J. Pellerin, P.S. Rainbow, *Aquat. Toxicol.* **76** (2006), 160.
- [16] A.T. Miles, G.M. Hawksworth, J.H. Beattie, V. Rodilla, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **35** (2000) 35.
- [17] M. Erk, D. Ivanković, B. Raspor, J. Pavičić, *Talanta* **57** (2002), 1211-1218.
- [18] P. Coyle, J. C. Philcox, L. C. Carey, *Cell Mol. Life Sci.* **59** (2002), 627-47.
- [19] A. Rani, A. Kumar, A. Lal, M. Pant, *Int. J. Environ. Health. Res.* **24** (2014), 378-399.
- [20] P. L. Goering, C. D. Klaassen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **70** (1983), 195-203.
- [21] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Ižaković, M. Mazur, *Chem. Biol. Interact.* **160** (2006), 1-40.
- [22] Y. Takahashi, Y. Ogra, K. T. Suzuki, *J Cell Physiol* **202** (2005), 563-569.
- [23] E. Gottschalg, N. E. Moore, A. K. Ryan, L. C. Travis, *Chem. Biol. Interact.* **161** (2006), 251-261.
- [24] H. Butcher, W. Kennette, O. Collins, J. Demoor, J. Koropatnick, *J. Immunol. Methods* **272** (2003), 247-256.
- [25] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
- [26] J. W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Clin. Chem.* **27** (1981), 1551-1553.
- [27] A. Tiselius, *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis* **7** (1930), 1-107.
- [28] S. Haider, B. Sharp, H. Reid, *J. Sep. Sci.* **34** (2011), 2463-2467.

- [29] M. N. Gupta, *Gel electrophoresis: Polyacrylamide gels*, *Encyclopedia of Analytical Science* (P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole, M. Miró), Elsevier, Oxford, 2005., 447-457.
- [30] M. Krsnik-Rasol, B. Balen, B. Maček, D. Pavoković, Skripta za internu uporabu: Elektroforetske tehnike istraživanja proteina, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2004.
- [31] <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-electrophoresis.html> (19. 7. 2019.)
- [32] <https://nfsc4500101groupa.weebly.com/sds-page-for-protein-resolution.html> (20. 7. 2019.)
- [33] Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*), OECD, 2004.
- [34] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr i R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193** (1951), 265-75.
- [35] H. Schägger, G. von Jagow, *Anal. Biochem.* **166** (1987) 368-379.
- [36] U. K. Laemmli, *Nature* **227** (1970), 680-685.
- [37] J. Alhama, A. Romero-Ruiz, J. López-Barea, *J. Chromatogr. A* **1107** (2006) 52-58.
- [38] L. Jiang, M. Fountoulakis, *J. Chromatogr. A* **1023** (2004), 317-320.
- [39] D. Barritault, M. Guérin, D. Hayes, *Eur J Biochem.* **63** (1976), 131-5.
- [40] H. Schägger, *Nat Protoc.* **1** (2006), 16-22.
- [41] N. S. Kosower, E.M. Kosower, *Methods Enzymol.* **143** (1987) 76.
- [42] E. A. Wintner, T. L. Deckwerth, W. Langston, A. Bengtsson, D. Leviten, P. Hill, M. A. Insko, R. Dumpit, E. Vanden-Ekard, C. F. Toombs, C. Szabo, *Br. J. Pharmacol.* **160** (2010), 941-957.
- [43] C. D. Georgiou, K. Grintzalis, G. Zervoudakis, I. Papapostolou, *Anal. Bioanal. Chem.* **391** (2008), 391-403.
- [44] T. W-M. Fan, A. N. Lane, *Phytochem. Anal.* **15** (2004), 175-183.

7. DODACI

7.1. Popis kratica

APS	amonijev persulfat
Arg	arginin
BSA	goveđi serumski albumin (engl. <i>bovine serum albumine</i>)
Cys	cistein
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	ditiotreitol
ELISA	test enzimski povezane imunosorpcije (engl. <i>enzyme-linked immunosorbant assay</i>)
FIA	fluorescirajući imunološki test (engl. <i>fluorescence immunoassay</i>)
Lys	lizin
M^{II}	divalentni metalni ion
mBBr	monobromobiman
MT	metalotioneini
MTF-1	transkripcijski faktor odgovoran za regulaciju metala (engl. <i>metal-regulatory transcription factor-1</i>)
Pro	prolin
PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (engl. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
RIA	radioimunološki test (engl. <i>radioimmunoassay</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNS	reaktivne dušikove vrste (engl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
SDS	natrijev dodecil-sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SDS-PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu uz prisutnost natrijevog dodecil-sulfata
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletlen diamin
Tyr	tirozin
UV	ultraljubičaste zrake (engl. <i>ultra violete</i>)

7.2. Životopis

Osobni podaci	
Ime i prezime	Marija Andabak
Datum i mjesto rođenja	29. 9. 1994., Osijek
Adresa	Fiskulturna 32, 31223 Habjanovci
e-mail	marija-andabak@hotmail.com
Obrazovanje	
2016. - 2019.	Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek
2013. - 2016.	Preddiplomski sveučilišni studij kemije Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek Završni rad: Sinteza kvaternih amonijevih soli triazola s poencijalnim citotoksičnim djelovanjem mentor: izv.prof.dr.sc. Dean Marković, neposredna voditeljica: doc.dr.sc. Marija Jozanović
2009. - 2013.	II. gimnazija, Osijek (Jezična gimnazija)
Radno iskustvo	
travanj 2019. - danas	Studentski posao prodavača, Tekstil d.d., Tom Tailor Trg Milana Šufflaya 1, 47000 Karlovac
ožujak 2018. - lipanj 2018.	Demonstrator na Praktikum biokemije, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek

rujan 2015. - lipanj 2018.	Studentski posao prodavača, Lisca d.o.o., Vincenta iz Kastva 14, 10000 Zagreb
Aktivnosti i sudjelovanja	
lipanj 2018. - rujan 2018.	<i>Work and travel</i> program za studente, sezonski rad u restoranu, Block Island, 02807 Rhode Island, Sjedinjene Američke Države
2018.	1. međunarodna studentska GREEN konferencija, Osijek The role of metallothioneins in detoxification and oxidative stress, postersko izlaganje (autori: Marija Andabak , Ivana Živković, Marija Paurević, Martina Šrajer Gajdošik)
2016.	20. Smotra Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, predstavljanje Odjela za kemiju
2011.	<i>Comenius</i> projekt, “ <i>Game of proteins</i> ” Sudjelovanje u organizaciji i mentorstvo ostalih sudionika za vrijeme trajanja projekta Pforzheim, Njemačka Hamburg, Njemačka
Osobne vještine	
Materinski jezik	hrvatski
Strani jezici	engleski - aktivno u govoru i pismu njemački - pasivno u govoru i pismu
Računalne vještine	MS Office sustav, sluzenje internetom i mailom
Vozačka dozvola	B kategorija