

# Analiza aktivnosti ukupne esteraze i ugljične anhidraze tijekom embrionalnog razvoja morskog zekana *Aplysia punctata*

---

Damijanjević, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:603627>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI  
PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

Ivana Damijanjević

**Analiza aktivnosti ukupne esteraze i ugljične  
anhidraze tijekom embrionalnog razvoja morskog  
zekana *Aplysia punctata* (Cuvier, 1803)**

ZAVRŠNI RAD

Rovinj, 2018. godine

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI  
PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

IVANA DAMIJANJEVIĆ

**Analiza aktivnosti ukupne esteraze i ugljične  
anhidraze tijekom embrionalnog razvoja morskog  
zekana *Aplysia punctata* (Cuvier, 1803)**

ZAVRŠNI RAD

**JMBAG:** 0303046479, redovna studentica

**Studijski smjer:** Znanost o moru

**Predmet:** Biotestovi i biološki monitoring zagađivala

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Bojan Hamer

**Komentor:** Doc. dr. sc. Andrej Jaklin

Rovinj, 2018. godine

## IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana Ivana Damijanjević, kandidatkinja za prvostupnika (baccalaureus) Znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student

---

U Rovinju, 11. listopada 2018.

IZJAVA  
o korištenju autorskog djela

Ja, Ivana Damijanjević, dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom Analiza aktivnosti ukupne esteraze i ugljične anhidraze tijekom embrionalnog razvoja morskog zekana *Aplysia punctata* (Cuvier, 1803) koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Rovinju, 11. listopada 2018.

Potpis

---

Ovaj rad, izrađen u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Bojana Hamera i komentora doc. dr. sc. Andreja Jaklina, predan je na ocjenu preddiplomskom studiju Znanost o moru Sveučilišta u Puli radi stjecanja zvanja prvostupnik (Baccalaureus) Znanosti o moru.

Voditelj Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanost o moru je za mentora završnog rada imenovao dr.sc. Bojana Hamera.

**Mentor: izv. prof. dr. sc. Bojan Hamer**

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:

Predsjednik: doc. dr. sc. Dijana Pavičić-Hamer

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Mentor: izv. prof. dr. sc. Bojan Hamer

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Komentor: doc. dr. sc. Andraj Jaklin

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Član: doc. dr. sc. Ines Kovačić,

Fakultet za odgojne i obrazovne znanosti Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Datum i mjesto obrane završnog rada: 11. listopad 2018., Rovinj

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

Ivana Damijanjević \_\_\_\_\_

## ZAHVALA

Završni rad sam izradila u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju. Ovim putem se zahvaljujem svojem mentoru izv. prof. dr. sc. Bojanu Hameru i komentoru doc. dr. sc. Andreju Jaklinu na pružanju svoje stručne pomoći i savjetima tijekom izrade i pisanja završnog rada te na iznimnoj pristupačnosti u svakom trenutku tijekom pisanja završnog rada. Ujedno se zahvaljujem doc. dr. sc. Dijani Pavičić-Hamer na pomoći i strpljivosti pri izvođenju praktičnog dijela rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na pružanju potpore i strpljenju tokom godina studiranja.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	8
1.1. Morski zekan <i>Aplysia punctata</i> (Cuvier, 1803).....	8
1.1.1. Građa morskog zekana .....	8
1.1.2. Stanište i rasprostranjenost morskog zekana .....	9
1.1.3. Reprodukcija i razvoj morskog zekana .....	10
1.2. Esteraze .....	11
1.3. Ugljična anhidraza .....	11
1.4. Biomineralizacija.....	13
<b>2. CILJ RADA</b> .....	15
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	16
3.1. Materijali.....	16
3.1.1. Kemikalije .....	16
3.2. Metoda .....	16
3.2.1. Držanje, oplodnja i razvoj jajčanih vrpca <i>A. punctata</i> .....	16
3.2.2. Homogenizacija i ekstrakcija proteina .....	16
3.2.3. Određivanje količine ukupnih proteina.....	17
3.2.4. Određivanje aktivnosti ukupnih esteraza .....	17
3.2.5. Određivanje aktivnosti ukupnih ugljičnih anhidraza .....	19
3.2.6. Analiza rezultata i statistička obrada .....	19
<b>4. REZULTATI</b> .....	20
4.1. Inhibitorski učinak acetazolamida .....	20
4.2. Analiza ukupne aktivnosti esteraze i ugljičnih anhidraza tijekom embrijskog razvoja .....	21
<b>5. RASPRAVA</b> .....	24
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	26
<b>7. LITERATURA</b> .....	27
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA</b> .....	30
<b>9. BASIC DOCUMENTATION CARD</b> .....	31



## 1. UVOD

### 1.1. Morski zekan *Aplysia punctata* (Cuvier, 1803)

Morski zekan *Aplysia punctata* (Cuvier, 1803) pripada koljenu mekušaca, porodici *Aplysiidae* i rodu *Aplysia* (Tablica 1). *Aplysiidae* je porodica manjih, bilateralno simetričnih puževa s unutrašnjom ljuštrom koja obično nije vidljiva (Garms, 1981). Morski zekan dobio je ime po rinoforama na glavi koji nalikuju na zečje uši, a služe za kemorecepciju i navigaciju prilikom kretanja. Herbivor je, hrani se algama blizu kojih pretežito i obitava. Morski zekan ne pliva, a kada je uznemiren ispušta ljubičasti sekret kako bi se obranio. Zbog svog jednostavnog živčanog sustava i velikih neurona, cijeli rod *Aplysia* široko je proučavan te se koristi kao „modelni organizam“ u raznim fiziološkim, biološkim i razvojnim studijama (Fish, 1996).

**Tablica 1.** Taksonomska pripadnost morskog zekana *Aplysia punctata* (Cuvier, 1803).

Koljeno	Mollusca
Razred	Gastropoda
Podrazred	Heterobranchia
Red	Anaspidea
Porodica	Aplysiidae
Rod	<i>Aplysia</i>
Vrsta	<i>Aplysia punctata</i>

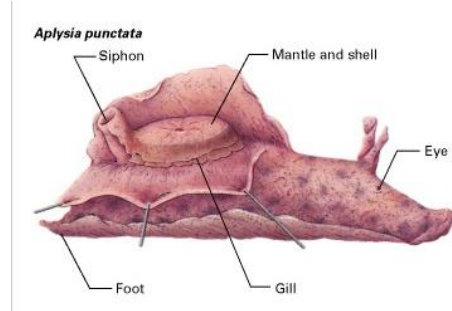
#### 1.1.1. Građa morskog zekana

Morski zekan ima uzak i izdužen oblik tijela. Karakterističan je po simetričnim, prema gore svijenim parapodijima (kožni nabori stopala). Parapodiji su obrubljeni bijelom crtom, a na stražnjem su dijelu tijela srasli (Turk, 2011). Ljuštura je duga oko 4 cm, vrlo je lomljiva i kalcificirana je, te se nalazi iznutra na stražnjem dijelu tijela tj. prekrivena je plaštom. Ispod ljušture se nalaze škrge i srce. Ticala tj. rinofori se nalaze na glavi te su smotani u obliku svitka. Za hranjenje se u usnoj šupljini nalazi

radula kojom usitnjava hranu. Boja tijela razlikuje se ovisno o staništima i algama koje obitavaju na tom području. Morski zekani na sjevernom Jadranu najčešće su smeđe ili žućkasto-zelenkaste boje s bijelim mrljama te obično narastu do 10 cm (Slika 1, Slika 2), dok su juvenilni primjerci su obično ružičasto-crvene boje.



**Slika 1.** Vanjski izgled *Aplysia punctata*.

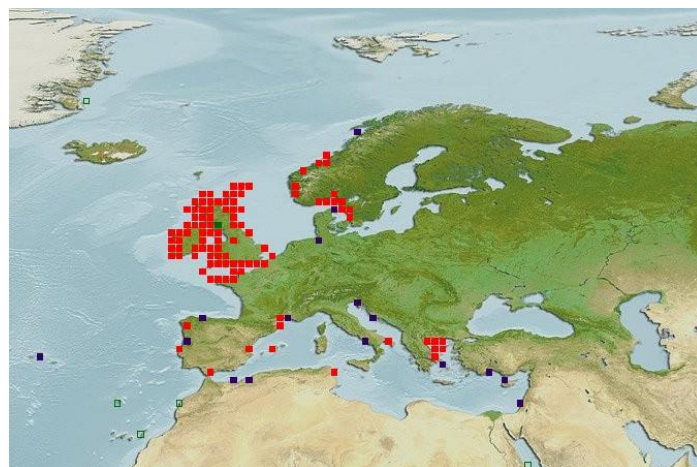


**Slika 2.** Građa tijela *A. punctata*.

### 1.1.2. Stanište i rasprostranjenost morskog zekana

Morski zekan je bentoski organizam koji se najčešće nalazi u obalnom pojasu uz mjesta koja su obrasla algama. Najčešće obitava na dubinama od 3 do 15 m u umjerenim i toplim morima.

Prostor na kojemu morski zekan prebiva prostire se od Jadranskog i Sredozemnog mora sve do sjevernog Atlantika te do obala Grenlanda i Norveške (Slika 3). U proljeće se intenzivnije pojavljuje uz obalu zbog parenja, no nakon parenja se rjeđe viđa.



**Slika 3.** Rasprostranjenost, odnosno područja gdje je zabilježena prisutnost morskog zekana *A. punctata* u Europi (Sredozemno more, Atlantik) (sealifebase.ca).

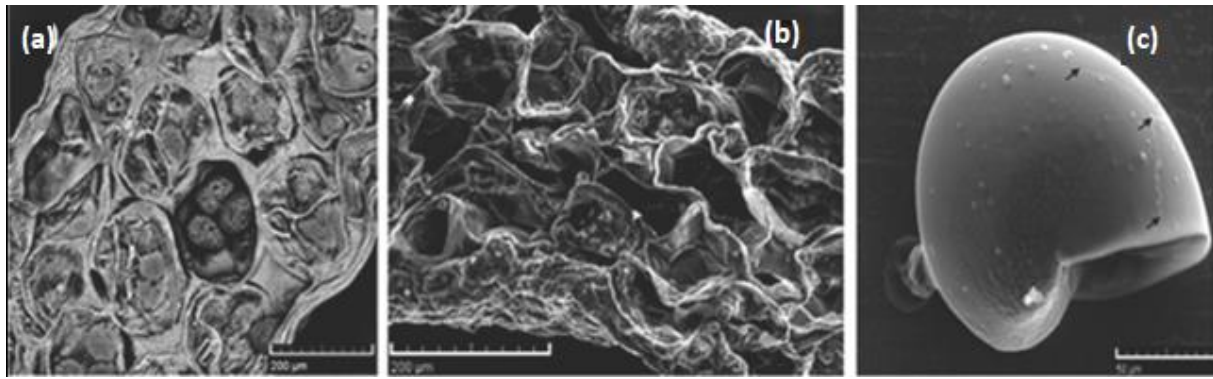
Stražnjoškržnjaci srodnih vrsta *Aplysia depilans* i *A. fasciata* (Gastropoda, Opisthobranchia, Anaspidea) pojavljuju se istovremeno na opsežnim infralitoralnim dnima obalnih područja Sredozemlja i Jadrana.

### 1.1.2. Reprodukcijska i razvoj morskog zekana

Morski zekan je dvospolac, ali zbog građe tijela nije moguća samooplodnja, već oblikuju lance jedinki dok se pare. U vrijeme mrijesta odlaze u plića područja, a nakon oplodnje odlažu narančasto-roze jajčane vrpce s velikim brojem čahura (kokona) i polažu ih na alge (Slika 4). U svakom kokonu su prosječno 4 oplođene jajne stanice, odnosno kasnije embrija. Embrij se razvija unutar čahure te njegov razvoj završava izlaskom u obliku veliger ličinke (Slika 5). Veliger ličinka ima ljušturu sačinjenu od kalcijevog karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ), koji je u obliku kristala aragonita i kalcita, te od male količine dolomita ( $\text{CaCO}_3 \times \text{MgCO}_3$ ). Na kraju planktonske faze ličinka se spusti na dno među alge i započinje preobrazbu. Tijekom preobrazbe plašt prekrije ljušturu i razvijaju se sifon, škrge, parapodiji i ticala (Tonejc i sur., 2014). Životni vijek morskog zekana je oko godinu dana.



**Slika 4.** Jajčane vrpce morskog zekana *Aplysia punctata*.



**Slika 5.** Prelazak iz embrionalnog u larvalni stadij morskog zekana *A. punctata*: a) 10 dana stari embriji vidljivi unutar kokona; b) prazni kokoni; c) veliger ličinka (Tonejc i sur., 2014).

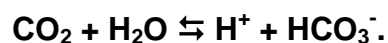
## 1.2. Esteraze

Esteraze su enzimi koji razgrađuju estere u kiseline i alkohole. Postoji više različitih esteraza, a one se razlikuju po biološkoj funkciji, strukturi proteina te po specifičnosti prema supstratu. Esteraze su enzimi koji kataliziraju hidrolizu esterske veze, važni su za hidrolizu endogenih supstrata, obično supstrata lipidnih estera, također ugljična anhidraza ima esteraznu aktivnost (Pavičić-Hamer i sur., 2015).

## 1.3. Ugljična anhidraza (UA)

Ugljična anhidraza (UA) je enzim koji katalizira reverzibilnu reakciju između hidratiziranog ugljičnog dioksida ( $\text{CO}_2$ ) i dehidratiziranog bikarbonata ( $\text{HCO}_3^-$ ) (Slika 6).

UA enzim

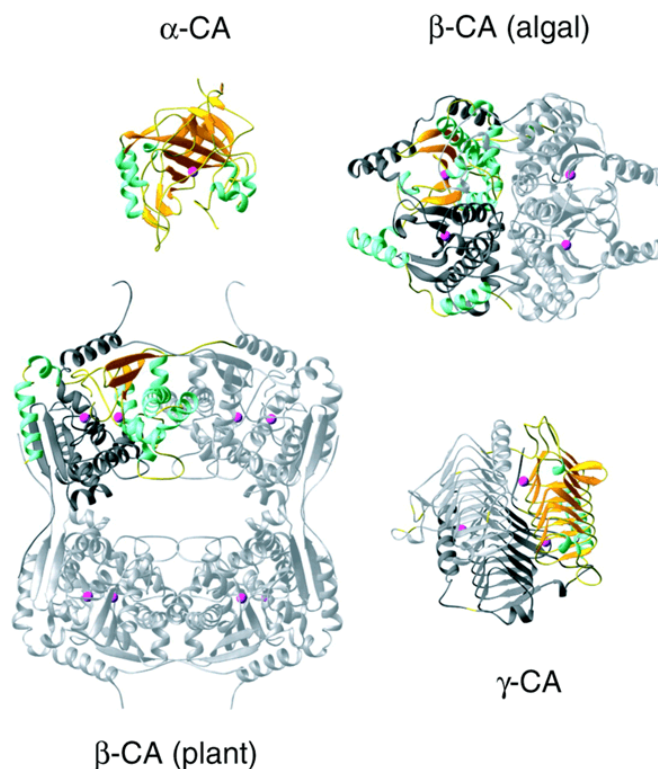


**Slika 6.** Reakcija mehanizma djelovanja ugljične anhidraze (Henry, 2001).

Gore prikazana reakcija je jedna od najbržih enzimskih reakcija, reakcija je  $10^7$  puta brža nego kada nije katalizirana ( $k_{\text{cat}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$ ) UA enzimom. UA ima važnu

ulogu u fiziološkim procesima disanja te prijenosu i izlučivanju  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$ . Lipidne membrane stanica i organela nepropusne su za hidrofilne molekule i ione. Plin  $\text{CO}_2$  lako prolazi difuzijom kroz staničnu membranu,  $\text{HCO}_3^-$  teže, a  $\text{H}^+$  ne može proći kroz membranu bez posrednika. Fiziološka uloga ugljične anhidraze je olakšani prijenos reaktanata kroz lipidne membrane (Henry, 1996).

Evolucijski gledano postoje tri odvojene porodice UA: porodica  $\alpha$  UA je monomer i nalazi se u svim životinjama; porodica  $\beta$  UA je polimer prisutan u biljkama i algama; a porodica  $\gamma$  UA je trimer prisutan u prokariotima (Slika 7). U porodici  $\alpha$  UA otkriveno je 15 izoenzima u sisavaca koji su heterogeno rasprostranjeni u tkivima i intracelularno. Izoenzimi su slični u sastavu aminokiselina, ali su različiti u katalitičkoj aktivnosti te osjetljivosti na inhibitore i specifičnim smještajem u stanicama i tkivima. Izoenzimi UA I, II, III, VII se nalaze u citoplazmi stanica (29 kDa), izoenzimi UA IV, IX, XII, XIV su membranski vezani u stanicama (35-52 kDa), UA V se nalazi u mitohondrijima (29 kDa), a UA VI u sekretijskom tkivu (42 kDa) (Hewett-Emmett, 2000; Pavičić-Hamer i sur., 2015 ).



**Slika 7.**  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  porodice ugljične anhidraze (Hewett-Emmett, 2000).

Ugljična anhidraza je prisutna u svim živim bićima i ima esencijalnu ulogu u olakšanom transportu ugljičnog dioksida (CO<sub>2</sub>) i iona u unutarstanični prostor (Le Roy i sur., 2014; Pavičić-Hamer i sur., 2003). Također, ugljična anhidraza je uključena u mnoge važne procese kao što su fotosinteza i disanje kod eukariota i prokariota. Također ključan je faktor procesu kalcifikacije i biomineralizacije, transportu iona, kiselo-baznim reakcijama i u velikom broju metaboličkih procesa (Lionetto i sur., 2006; Lionetto i sur., 2012).

#### **1.4. Biomineralizacija**

Biomineralizacija je složen skup biokemijskih i fizioloških procesa tijekom kojih živi organizmi stvaraju čvrste strukture (biominerale). Oblik, građa i svojstva biominerala ovise o vanjskim (egzogenim) uvjetima u kojima živi organizam (temperatura, salinitet, pH vrijednost i zagađenje) i genetskim (endogenim) osobitostima organizma/vrste.

Biomineralizacija je proces koji kod većine morskih organizama nije detaljno objašnjen, osobito dijelovi vezani uz formiranje minerala u ranijem embrionalnom i larvalnom stadiju. Prilikom formacije biominerala kod morskih beskrležnjaka, možemo prepoznati nekoliko koraka, a to su formacija amornog kalcijevog karbonata (ACC) kod ranih embrija, produkcija jezgara mineralizacije (nanosfera) iz ACC-a te daljnju formaciju karbonata uz pomoć tih jezgri. Svi dijelovi ovog procesa uključuju blisku interakciju sa organskim makromolekulama (biomineralizacija).

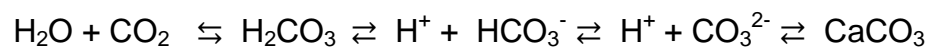
Proces biomineralizacije kod morskih beskrležnjaka bazira se na činjenici da tijekom embrionalnog razvoja ACC gradi prvu kristalnu formaciju, a upravo taj ACC je ključan u daljnjoj mineralizaciji skeleta. ACC je karbonatni oblik koji se pojavljuje u vezikulama puževa i ima važnu ulogu u početnom stvaranju minerala, daljnjoj biomineralizaciji i kalcifikaciji tkiva imaju stanična aktivnost i kemijska svojstva minerala. Proces biomineralizacije kod *Aplysia sp.*, od samog početka formiranja ljuštura u stadiju embrija pa do fiziološkog razvoja u odrasle jedinke, nije do kraja objašnjen (Tonejc i sur., 2014).

Prema istraživanju Tonejc i sur. (2014), u specifičnim uvjetima određeni morski beskrležnjaci imaju mogućnost ponašanja u skladu s drevnim karakteristikama i modelima biomineralne formacije kod ranih predaka. Njihovi eksperimentalni rezultati razjašnjavaju i objašnjavaju dobro poznatu biomineralnu hipotezu da su ioni

kalcijevog karbonata (i fosfata) obilno prisutni u oceanima i zbog toga će biti favorizirani prilikom biomineralizacije u odnosu na mnogo rjeđe materijale. Također, potvrđuju da porijeklo vapnenačkih kostura objašnjava višestruko neovisnu suradnju između molekularnih i fizioloških procesa koji su široko rasprostranjeni kroz eukariotske organizme.

Enzim UA sudjeluje u procesima dekalifikacije i kalcifikacije kutikule rakova i u izgradnji ljuštore školjkaša, katalizira hidraciju CO<sub>2</sub> uslijed čega se karbonat veže s Ca u CaCO<sub>3</sub> (Giraud, 1981):

UA enzim



UA ↓

↑

CO<sub>2</sub> + OH<sup>-</sup>

Ca<sup>2+</sup>

## 2. CILJ RADA

Cilj ovog završnog rada je: A) prilagodba metode određivanja aktivnosti enzima ugljične anhidraze (UA) mjerenjem aktivnosti ukupnih esteraza (UE) uz inhibiciju UA pomoću specifičnog inhibitora acetazolamida (AZM) u homogenatima jajčanih vrci morskog zekana *Aplysia punctata*; i B) analiza vremenske aktivnosti ukupnih esteraza (UE) i specifične aktivnosti ugljične anhidraze (UA) vezane za stvaranje prvih biominerala tijekom embrionalnog razvoja 0-26 dana.



### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Kemikalije**

U radu su korištene kemikalije isključivo analitičke čistoće i podrijetla kako slijedi: SIGMA – fenil-metil-sulfonil-fluorid (PMSF), albumin goveđeg seruma (BSA), Tris HCl, 4-nitrofenil acetat (4-NPA), acetazolamid (AZM), dimetilsulfoksid (DMSO); KEMIKA – natrijev klorid (NaCl), Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA); etilni alkohol 95% (EtOH); PIERCE - GelCode blue reagens; Bradford reagens.

#### **3.2. Metode**

##### **3.2.1. Držanje, oplodnja i razvoj jajčanih vrpca *A. punctata***

Morski zekani držani su u vanjskim eksperimentalnim kamenim bazenima (3 m<sup>3</sup>) s protočnom morskom vodom na temperaturi okoliša (10°C). Nakon oplodnje i mrijesta jajčane vrpce su odvojene u posebne mrežaste posude te je u određenim vremenskim razmacima (0, 1, 4, 10, 13, 14, 15, 16,17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 i 26 dan) embrionalnog razvoja škaricama odvajan dio vrpce cca 5 cm. Izdvojeni dio je odmah po uzorkovanju pohranjen na -20°C u eppendorf tubici do analize.

##### **3.2.2. Homogenizacija i ekstrakcija proteina**

Vremenski uzorci jajčanih vrpca dužine cca 2 cm homogenizirani su ručno homogenizatorom u eppendorf tubici kako slijedi: u tubice s uzorcima je dodano 0,1 ml EDTA pufera za homogenizaciju pH 7,5 (0,5 M NaCl; 0,1 M Tris; 0,01 M EDTA) i 10 µl 40 mM otopine inhibitora proteinaza fenil-metil-sulfonil-fluorida (PMSF), uz ručnu homogenizaciju s pastilom; ponovljen je proces gnječenja pomoću pastila uz dodatak još 0,3 ml EDTA pufera. Nakon centrifugiranja (10 min/12000 g/4°C), izdvojen je supernatant cca 100 µl koji služi za određivanje proteina, a ostatak se sprema na -20°C do analize enzimskih aktivnosti.

### 3.2.3. Određivanje količine ukupnih proteina

Koncentracije proteina određene su modificiranom metodom po Bradfordu (1976). Postupak se temelji na pomaku maksimuma apsorbancije (465 nm na 595 nm), taj pomak javlja se u trenutku kada se boja Coomassie Brilliant u kiselj otropini veže na proteine i pritom nastaje zeleno-smeđe do plavo obojenje (Bradford, 1976). Za vezanje boje na proteine zaslužne su elektrostatske sile između sulfatnih grupa same boje i bazičnih aminokiselinskih ostataka u proteinima te hidrofobne interakcije s ostacima aromatskih aminokiselina. Zbog utvrđivanja koncentracija proteina u uzorcima, potrebno je napraviti i standardnu krivulju s poznatim koncentracijama proteina.

Prvo se pripremi serijski niz razrjeđenja albumina iz goveđeg seruma (BSA) neophodnih za izradu standardne krivulje te slijepo probe (100  $\mu$ l deH<sub>2</sub>O/pufera u kome su homogenizirani uzorci). Za izradu standardne krivulje koristila se otopina 1 mg/ml BSA različitih razrjeđenja (1,00; 0,500; 0,25; 0,125; 0,0625 i 0,03125 mg/ml).

Prije mjerenja količine proteina uzorke je potrebno razrijediti da bi bili u linearnom dijelu krivulje (Apsorbancija 595 nm / koncentracija BSA). Proteinski uzorci razrijede se 100 puta te se u mikroploču pipetira 50  $\mu$ l tako razrijeđenog uzorka. Zatim se u jažice u mikroploči doda 250  $\mu$ l Bradford reagensa (1+3 deH<sub>2</sub>O) i izmiješa pipetom. Nakon inkubacije 5 min pri sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija pri 595 nm prema slijepoj probi. Standardna krivulja crta se na temelju vrijednosti apsorbancije poznatih koncentracija BSA. Količina proteina u uzorku preračunata je prema proteinskom standardu BSA uz uzimanja u obzir faktora razrjeđenja ishodišnog uzorka.

### 3.2.4. Određivanje aktivnosti ukupnih esteraza

U ovom istraživanju koristili smo metodu hidrolize 4-nitrofenilacetata (4-NPA metoda). 4-NPA je bezbojni supstrat, a uslijed enzimske aktivnosti hidrolizira se u 4-nitrofenol i acetat. Nakon čega slijedi mjerenje stvaranja 4-nitrofenola, žutog obojenog spoja (Pocker i Stone, 1967; Polat i Nalbantoglu, 2002). Reakcija je provedena na sobnoj temperaturi (21-25°C). Tijekom mjerenja Tris je korišten za pufiranje reakcijskog medija u ukupnoj koncentraciji od 50 mM i pH 7,3 (Pavičić-Hamer i sur., 2015).

**Tablica 2.** Ovisno o uzorku reakcijska tubica je sadržavala:

Uzorak Otopine	UA standard		Uzorak UE	Uzorak UA	Slijepa proba
	AZM (-)	AZM (+)	AZM (-)	AZM (+)	AZM (+)
Homogenat uzorka (10 µg proteina)	-	-	10 µl	10 µl	10 µl EDTA pufera
UA standard (0.1-4.0 µg)	10 µl	10 µl	-	-	-
50 mM Tris pufer	125 µl	125 µl	125 µl	125 µl	125 µl
10 mM 4-NPA supstrat u 95% EtOH	55 µl	55 µl	55 µl	55 µl	55 µl
1 mM AZM u 50% DMSO	-	10 µl	-	10 µl	10 µl
50% DMSO	10 µl	-	10 µl	10 µl	-
<b>Ukupno µl</b>	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Reakcija je započeta dodatkom otopine supstrata 4-NPA. Određivanje aktivnosti ukupnih esteraza UE i UA aktivnosti napravljeno je na dva uzorka u triplikatu mjerenja. Reakcija je izvedena u mikropločama s 96 jažica. Neposredno nakon početka reakcije, ploča se stavi u čitač mikroploča Multiscan i količina nastalog reakcijskog produkta se očitava se svake minute tijekom 10 minuta (Labsystems, Multiscan Ascent® čitač mikroploča) na 405 nm (A). Reakcija je zaustavljena dodavanjem 500 µl 2% SDS.

#### **Reagensi i otopine:**

*UA pročišćena iz ljudskih eritrocita CAII*

- 1 mg / ml u deH<sub>2</sub>O
- Standardna krivulja 0,25-4,0 µg

*4-nitrofenil acetat (4-NPA)*

- 10 mM 4-NPA otopljeno u 95%-tnom etanolu, ili
- 2 M 4-NPA otopljenog u DMSO , zatim razrijeđeno 200-puta u 95% etanolu.

*Acetazolamid (AZM) inhibitor UA*

- 1 mM AZM u 50% DMSO

### 3.2.5. Određivanje aktivnosti ukupnih ugljičnih anhidraza

#### *Određivanje inhibitornog učinka acetazolamida (AZT) na standarde razrjeđenja UA*

Mjerenje referentne inhibicije dobiveno je istom reakcijom raspona razrjeđenja UA standarda s rasponom razrjeđenja inhibitora AZT uz korištenje kontrola odnosno engl. *blank*-ova tj. slijepih proba. Raspon koncentracija AZM testiran je u triplicatu i pokazano je da je 0,5 mM AZT potpuno inhibira aktivnost ugljične anhidraze.

Specifična aktivnost može se izraziti u nanomolima hidroliziranog p-NPA po min po mg proteina (nmol/min/mg); molarni koeficijenti ekstinkcije na 405 nm (18,5 mM/cm). Jedna jedinica aktivnosti predstavlja količinu enzima koji katalizira 1 nmol reakcije po minuti u uvjetima ispitivanja. U našem slučaju nismo poznavali sadržaj proteina esteraze odnosno ugljične anhidraze u našim ekstraktima uzoraka, pa je samo aktivnost hidrolize mjerena pri istoj količini ukupnog sadržaja proteina (10 ug).

Za našu potrebu preliminarnog istraživanja i samo za usporedbu ukupnih aktivnosti esteraze (UE) s UA inhibiranim aktivnostima tijekom embrionalnog razvoja morskog zekana nije bilo potrebno utvrditi specifičnu aktivnost.

### 3.2.6. Analiza rezultata i statistička obrada

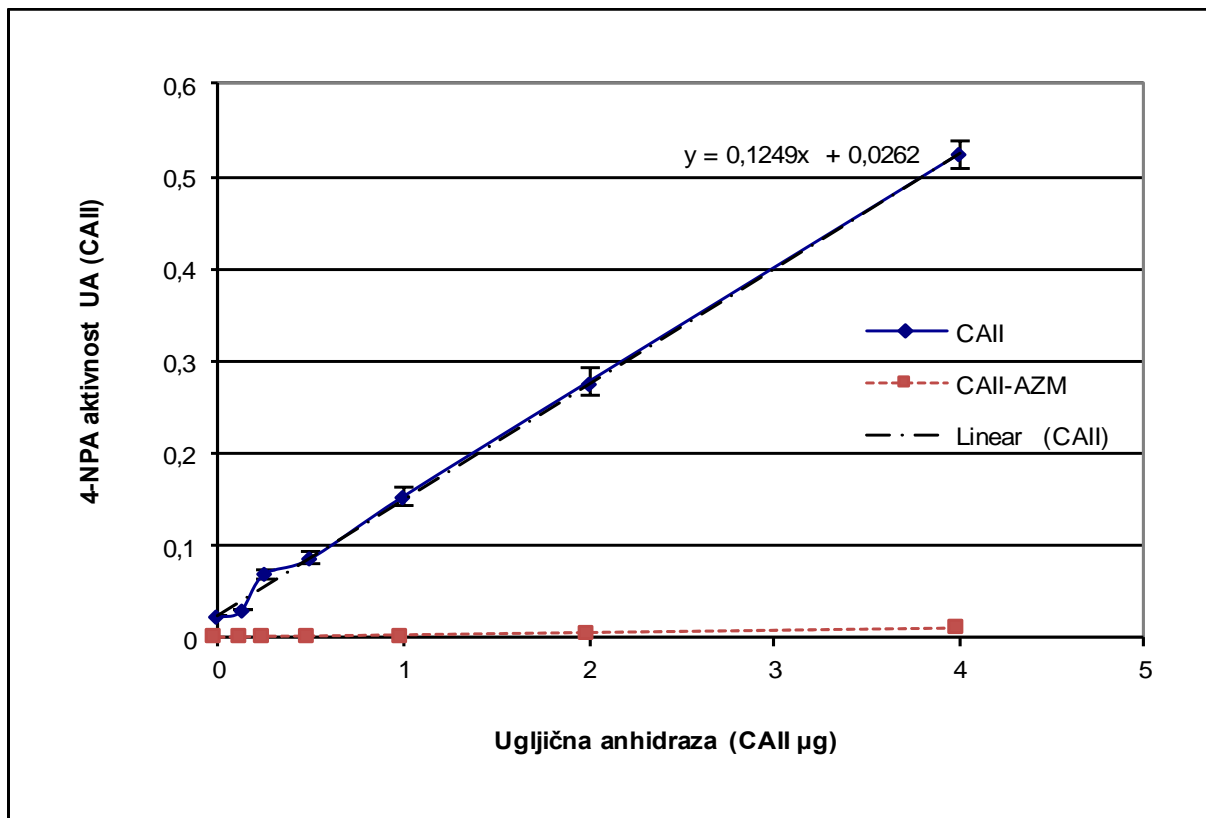
Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom dva uzorka i triplicata mjerenja enzimskih aktivnosti (UE i UA) 10 ug ukupnih proteina jajčane vrpce zekana *A. punctata*, osim ako nije drukčije navedeno. Korelacija ukupnih esteraza (UE), specifične aktivnosti ugljične anhidraze (UA) te postotnog udjela UA u UE aktivnosti (UA/UE%) dobivena je korištenjem Excel tabličnog kalkulatora (Microsoft Office 365).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Inhibitorski učinak acetazolamida (AZM)

Ispitivana je aktivnost UA i inhibitorski učinak acetazolamida na UA CAII ljudsku izoformu izoliranu iz eritrocita. Raspon koncentracija AZM je testiran u triplikatu i dokazano je da je 0,5 mM AZM potpuno inhibira aktivnost CA esteraze (Slika 8).

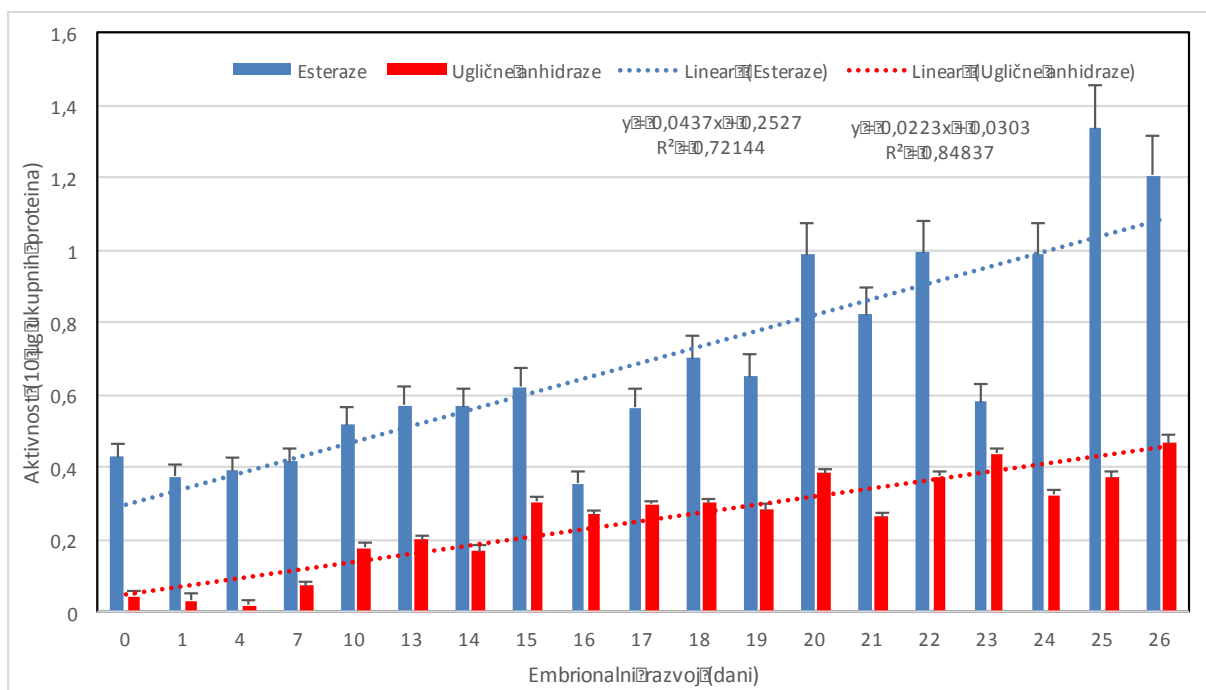
Dodatno, vremenski tijek UA enzimske reakcije CAII određen u prisutnosti 0,5 mM AZM bio je statistički nerazlučiv od vremenskog tijeka dobivenog u odsutnosti enzima što upućuje na visoku osjetljivost UA na inhibicije sulfonamidima.



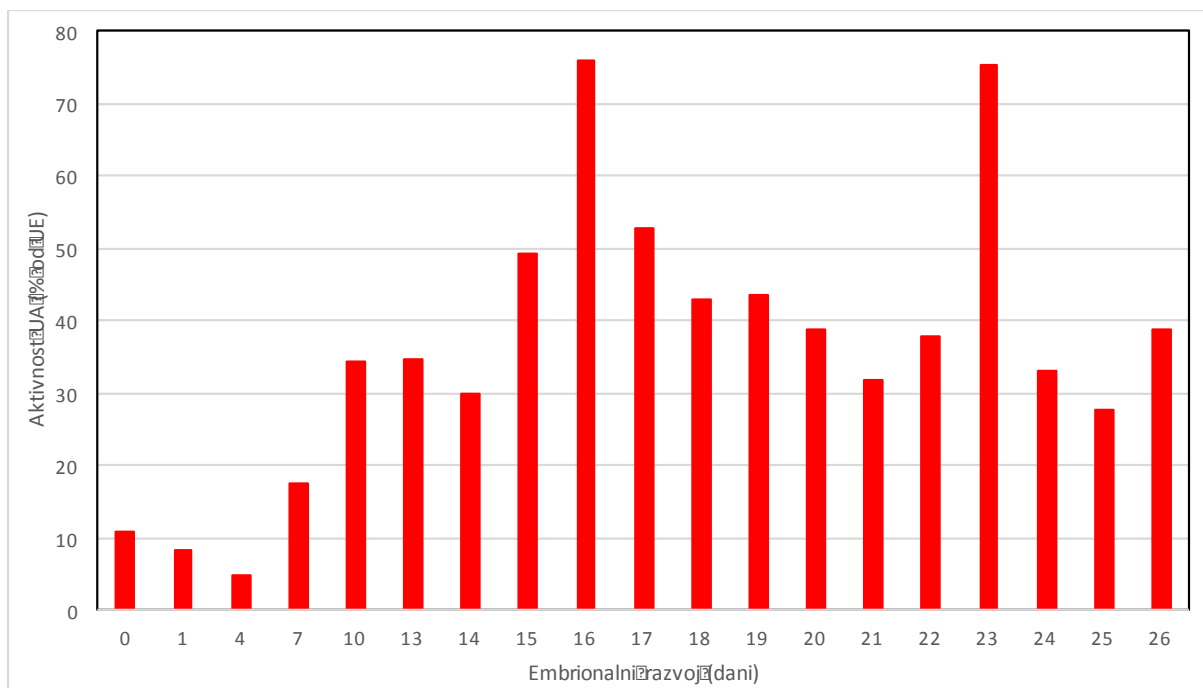
**Slika 8.** Mjerenje aktivnosti serijskih razrjeđenja enzimskog standarda ugljične anhidraze (CAII).

#### 4.2. Analiza ukupne aktivnosti esteraze i ugljičnih anhidraza tijekom embrionalnog razvoja

Analiza ukupne aktivnosti esteraze i ugljičnih anhidraza tijekom embrionalnog razvoja morskog zekana *Aplysia punctata* općenito je pokazala povećanje obje aktivnosti tijekom razvoja embrija / larve (0-26 dana). UA aktivnost se značajno povećava u 7. i 15. danu (Slika 9).



**Slika 9.** Ukupna esterazna (UE) aktivnost te specifična aktivnost ugljične anhidraze (UA) u homogenatima jajčane vrpce morskog zekana *A. punctata* tijekom embrionalnog razvoja (0-26 dana).

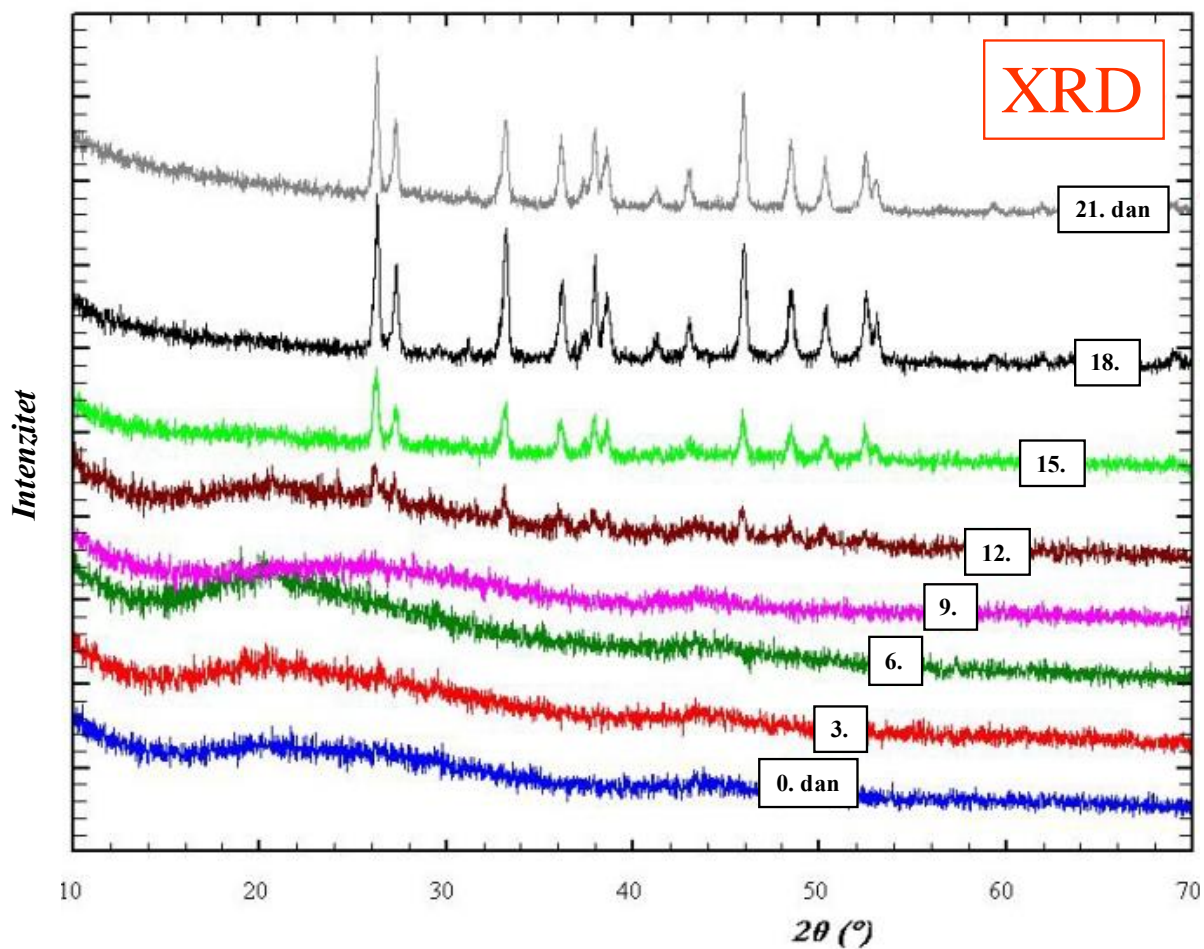


**Slika 10.** Aktivnosti ugljične anhidraze u odnosu na ukupnu esteraznu aktivnost (%) u homogenatima jajčane vrpce morskog zekana *A. punctata* tijekom embrionalnog razvoja (0-26 dana).

Postotak UA aktivnosti u usporedbi s ukupnom aktivnošću esteraze bio je najviši u 16. i 23. danu embrionalnog razvoja. Općenito, tijekom vremena razvoja, postotak UA aktivnosti smanjen je u usporedbi s ukupnim aktivnostima esteraze (Slika 10), te je korelacija UE i UA aktivnosti visoka  $r=0,736$  (Tablica 3).

**Tablica 3.** Korelacija ukupnih esteraza (UE), specifične aktivnosti ugljične anhidraze (UA) te postotnog udjela UA u UE aktivnosti (UA/UE%).

	<i>Dani</i>	<i>UE</i>	<i>UA</i>	<i>UA/UE%</i>
Dani	1			
UE	0,790	1		
UA	0,944	0,736	1	
UA/UE%	0,596	0,059	0,695	1



**Slika 11.** XRD analiza mineralnog sastava ličinačke faze razvoja morskog zekana *A. punctata* 0-21. dan (A. Jaklin, neobjavljeni podaci).

XRD analiza mineralnog sastava ličinačke faze razvoja morskog zekana *A. punctata* pokazala je da se prvi biominerali počinju pojavljivati 9. dan razvoja embrija unutar kokona u jajčanoj vrpci.



## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju određivanja ukupne esterazne aktivnosti (UE) i specifične aktivnosti ugljične anhidraze (UA) korišten je 4-NPA bezbojni supstrat koji se hidrolizira u 4-nitrofenol i acetat. Enzimska aktivnost esteraza se određuje mjerenjem brzine/količine nastalog 4-nitrofenola, žutog obojenog spoja. Aktivnosti ugljične anhidraze su određene istom reakcijom, ali uz specifični inhibitor UA acetazolamid (AZM). Govorimo o aktivnostima UA u množini, pretpostavka je da i morski zekan ima više UA kao i svi eukarioti (Tripp i sur., 2001; Pavičić-Hamer i sur., 2015). Raspon koncentracije AZM je testiran u triplikatu i dokazano je da je 0,05 mM 4-NPA potpuno inhibirala aktivnost CA esteraze, što je u skladu s acetazolamidom IC50 za ljudsku izoformu CAII (0,0263 mM) prethodno utvrđen upotrebom 4-nitrofenil fosfata kao supstrata, pri pH 7,4 i 25°C (Supuran, 2010). Dodatno, vremenski tijek UA enzimske reakcije određen u prisutnosti 0,5 mM AZM bio je statistički nerazlučiv od vremenskog tijeka dobivenog u odsutnosti enzima što upućuje na visoku osjetljivost UA na inhibiciju sulfonamidima (Supuran, 2010).

Analiza ukupne aktivnosti esteraze (UE) i ugljičnih anhidraza (UA) tijekom embrionalnog razvoja morskog zekana *Aplysia punctata* općenito je pokazala povećanje obje aktivnosti tijekom razvoja embrija / larve (0-26 dana). UA aktivnost se značajno povećava u 7. i 15. danu. Postotak UA aktivnosti u usporedbi s ukupnom aktivnošću esteraze bio je najviši u 16. (76,0%) i 23. (75,4%) danu razvoja. Općenito, tijekom vremena razvoja, postotak UA aktivnosti smanjen je u usporedbi s ukupnim aktivnostima esteraze (7-50%). Korelacija izmjerenih enzimskih aktivnosti UE i UA tijekom embrionalnog razvoja morskog zekana je također značajna ( $r=0,736$ ).

Nakon oplodnje i polaganja jajčane vrpce, embrij se razvija unutar čahure te njegov razvoj završava izlaskom iz čahure u obliku veliger ličinke. Veliger ličinka ima ljušturu sačinjenu od kalcijevog karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ), koji je u svom kristalnom obliku aragonit ili kalцит, i od male količine dolomita ( $\text{CaCO}_3 \times \text{MgCO}_3$ ). Tijekom rasta i razvoja veliger ličinke spiralna kućica potpuno obuhvaća i štiti meko tijelo. Nakon preobrazbe veligera vanjska kućica postaje unutarnja i reducira se do jednostavnog konkavnog štita iznad meke utrobe.

Odrasla kućica vrste *A. punctata* ima dva organska sloja, između kojih se nalazi kalcificirani sloj sa dominantnim aragonitom (71 M%) i feldšparom (19 M%), dok se kućica srodne vrste *A. fasciata* sastoji gotovo isključivo od kristala aragonita (oko 90 M%). Kristali halita su prisutni vanjskoj i unutarnjoj strani kućice kod obje vrste, ali se razlikuju po obliku, orijentaciji i pravcu rasta kristala (Tonejc i sur., 2014).

Nastanak prvih biominerala utvrđen je analizom mineralnog sastava (XRD analiza) u 9. danu razvoja embrija morskog zekana *A. punctata*, a ovim radom pokazano je da pojavi biominerala prethodi povećanje UA aktivnosti u 7. danu razvoja. Tako npr. tijekom embrionalnog razvoja dagnje *Mytilus galloprovincialis* aktivnost ugljične anhidraze je najviša neposredno prije stvaranja kristala aragonita i kvarca. Prvi kristali kalcita prisutni su u uzorku 3 sata nakon oplodnje, a prvi kristali aragonita pojavljuju se 22 sata nakon oplodnje (Medaković, 2000).

## 6. ZAKLJUČCI

- Mjerenjem aktivnosti raspona standarda UA (0,25 – 4,0 mg CAII izoforme) i inhibitorskog učinka acetazolamida (AZM) je utvrđeno da koncentracija od 0,5 mM AZM u potpunosti inhibira specifičnu aktivnost UA;
- Analiza ukupne aktivnosti esteraza (UE) i ugljičnih anhidraza (UA) tijekom embrijskog razvoja morskog zekana *Aplysia punctata* općenito je pokazala povećanje obje aktivnosti tijekom razvoja embrija (0-26 dana);
- Aktivnost UA se značajno povećava u 7. i 15. danu embrionalnog razvoja;
- Postotak UA aktivnosti u usporedbi s ukupnom aktivnošću esteraza (UE) bio je najviši u 16. i 23. danu embrionalnog razvoja;
- Općenito, tijekom vremena razvoja, postotak UA aktivnosti smanjen je u usporedbi s ukupnim aktivnostima esteraza;
- Nastanak prvih biominerala utvrđen je u 9. danu razvoja embrija, a ovim radom pokazano je da pojavi prvih biominerala prethodi povećanje UA aktivnosti.

## 7. LITERATURA

### Publikacije:

- Andres D. (2013) Puževi stražnjoškržnjaci, Hrvatska vodoprivreda, 203: 103-104.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Giraud M.M. (1981) Carbonic anhydrase activity in the integument of the crab *Carcinus maenas* during the intermolt cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 69A: 381-387.
- Henry R.P. (1996) Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 523-538.
- Henry R.P. (2001) Environmentally mediated carbonic anhydrase induction in the gills of euryhaline crustaceans, *J. Exp. Biol.* 204: 991-1002.
- Hewett-Emmett D., Tashian R.E. (1996) Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families, *Mol. Phylogenet. Evol.* 5: 50-77.
- Le Roy N., Jackson D.J., Marie B., Ramos-Silva P., Marin F. (2014) The evolution of metazoan  $\alpha$ -carbonic anhydrases and their roles in calcium carbonate biomineralization, *Front. Zool.* 11: 75.
- Lionetto M.G., Caricato R., Giordano M.E., Erroi E., Schettino T. (2012) Carbonic Anhydrase as Pollution Biomarker: An Ancient Enzyme with a New Use, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9: 3965-3977.
- Lionetto M.G., Caricato R., Erroi E., Giordano M.E., Schettino T. (2006) Potential application of carbonic anhydrase activity in bioassay and biomarker studies, *Chem. Ecol.* 22: 119-125.
- Medaković D., Popović S., Gržeta B., Plazonić M., Hrs-Brenko M. (1997) X-ray diffraction study of calcification processes in embryos and larvae of the brooding oyster *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.* 129, 4: 615-623.
- Medaković D. (2000) Carbonic anhydrase activity and biomineralization process in embryos, larvae and adult blue mussels *Mytilus edulis* L. *Helgol. Mar. Res.* 54: 1-6.
- Moroz. L.L (2011) *Aplysia*, *Current Biology* 21(2): R60.
- Pavičić-Hamer D., Devescovi M., Lucu C. (2003) Activation of carbonic anhydrase in brachial cavity tissues of lobsters (*H. gammarus*) by dilute seawater exposure, *JEMBE* 287: 79-92.

- Pavičić-Hamer D., Baričević A., Gerdol M., Hamer B. (2015) *Mytilus galloprovincialis* carbonic anhydrase II: activity and cDNA sequence analysis, *Key Engineering Materials* 672: 137-150.
- Pocker Y. i Stone J.T. (1967) The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase II. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate, *Biochemistry* 6(3) 668-678.
- Polat M.F., Nalbantoglu B. (2002) In Vitro Esterase Activity of Carbonic Anhydrase on Total Esterase Activity Level in Serum, *Turk. J. Med. Sci.* 32: 299-302.
- Supuran C.T. (2010) Carbonic anhydrase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20: 3467-3474.
- Tonejc A.M., Medakovic D., Popovic S., Jaklin A., Bijelic M., Loncarek I. (2014) Biomineralization in the sea hare *Aplysia punctata* initiated by Nano-Dolomite, *Croatia Chemica Acta* 87(2):143–152.
- Tripp B.C., Smith K., Ferry J.G. (2001) Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme, *J. Biol. Chem.* 276: 48615-48618.

### **Knjige:**

- Fish, J.D., Fish S. (1996) *A student's guide to the seashore* (second edition), Cambridge University Press, New York (268-269).
- Hewett-Emmett D. (2000) Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families. *Carbonic Anhydrases: New Horizons*, ed. W.R. Chegwidden, N.D. Carter and Y.H. Edwards, 29-76.
- Garms H., Borm L. (1981): *Fauna Evrope*. Mladinska knjiga, Ljubljana (str. 488).
- Turk T. (2011): *Pod površinom Mediterana*; Školska knjiga, Zagreb (str. 240).

### Internet stranice:

- World Register of Marine Species (WoRMS) taxon details *Aplysia punctata* (Cuvier, 1801) <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=138758> (25.09.2018.)
- Marine species, mollusca of the North sea [http://speciesidentification.org/species.php?species\\_group=mollusca&menuentry=soorten&id=550&tab=beschrijving](http://speciesidentification.org/species.php?species_group=mollusca&menuentry=soorten&id=550&tab=beschrijving) (05.09.2018.)
- Institut Ruđer Bošković, procesi biomineralizacije morskih organizama <https://www.irb.hr/Istrazivanja/Zavodi/Centar-za-istrazivanje-mora/Laboratorij-za-morsku-nanotehnologiju-i-biotehnologiju/Procesi-biomineralizacije-morskih-organizama> (18.09.2018.)
- OPK Opisthobranchia, *Aplysia punctata* <https://opisthobranchia.info/en/guia/aplysiida/aplysia-punctata/> (06.09.2018.)

### Poveznice slika:

Slika 1. [http://www.voda.hr/sites/default/files/casopis/hr\\_vodoprivreda\\_203\\_web.pdf](http://www.voda.hr/sites/default/files/casopis/hr_vodoprivreda_203_web.pdf)

Slika 2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21648/figure/A6285/>

Slika 3. <https://www.sealifebase.ca/summary/Aplysia-punctata.html>

Slika 4. [http://www.aphotomarine.com/sea\\_slug\\_aplysia\\_punctata\\_sea\\_hare.html](http://www.aphotomarine.com/sea_slug_aplysia_punctata_sea_hare.html)

Slika 5. Tonejc A.M., Medakovic D., Popovic S., Jaklin A., Bijelic M., Loncarek I. (2014) Biomineralization in the sea hare *Aplysia punctata* initiated by Nano-Dolomite, Croatia Chemica Acta 87(2):143–152.

Slika 6. Henry R.P. (2001) Environmentally mediated carbonic anhydrase induction in the gills of euryhaline crustaceans, J. Exp. Biol. 204: 991-1002.

Slika 7. Hewett-Emmett D., Tashian R.E. (1996) Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families, Mol. Phylogenet. Evol. 5: 50-77.

Slika 10. A. Jaklin, neobjavljeni podaci.

## 8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ – ZNANOST O MORU

Analiza aktivnosti ukupne esteraze i ugljične anhidraze tijekom embrionalnog razvoja  
morskog zekana *Aplysia punctata* (Cuvier, 1803)

### SAŽETAK

Enzimska aktivnost ukupnih esteraza (UE) i ugljične anhidraze (UA) mjerena je modifikacijom metode po Pocker i Stone-u u ukopnom homogenatu tkiva jajne vrpce morskog zekana *Aplysia punctata* (Cuvier, 1803). Navedenom metodom prvo se određuje enzimska aktivnost ukupnih esteraza, te se od tih aktivnosti oduzme aktivnost UA dobivena primjenom specifičnog inhibitora UA acetazolamida (AZM). Početno određena je aktivnost UA standarda izoforme CAII iz ljudskih eritrocita i inhibitori učinak acetazolamida na CAII. Raspon koncentracija AZM testiran je u triplikatu i dokazano je da je 0,5 mM AZM potpuno inhibirala aktivnost UA CAII, te je u daljnjim mjerenjima UE i UA korištena upravo ta koncentracija. Analiza ukupne aktivnosti esteraze i ugljičnih anhidraza tijekom embrijskog razvoja morskog zekana *A. punctata* općenito je pokazala povećanje obje aktivnosti tijekom razvoja embrija / larve (0-26 dana). UA aktivnost se značajno povećava u 7. i 15. danu. Postotak UA aktivnosti u usporedbi s ukupnom aktivnošću esteraze bio je najviši u 16. i 23. danu razvoja. Općenito, tijekom vremena razvoja, postotak UA aktivnosti smanjen je u usporedbi s ukupnim aktivnostima esteraze. Nastanak prvih biominerala utvrđen je analizom mineralnog sastava (XRD analiza) u 9. danu razvoja embrija morskog zekana *A. punctata*, a ovim radom pokazano je da pojavi biominerala prethodi povećanje UA aktivnosti u 7. danu razvoja.

Rad je pohranjen u knjižnici Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli

Izvornik je na hrvatskom jeziku (31 stranica, 10 slika, 26 literaturnih navoda)

**Ključne riječi:** Morski zekan *Aplysia punctata*, embrionalni razvoj, ukupna aktivnost esteraza, aktivnost ugljične anhidraze, biomineralizacija.

## 9. BASIC DOCUMENTATION CARD

JURAJ DOBRILA UNIVERSITY OF PULA

UNIVERSITY UNDERGRADUATE STUDY PROGRAMME - MARINE SCIENCES

Analysis of total esterase and carbonic anhydrase activities during embryonal development of sea hare *Aplysia punctata* (Cuvier, 1803)

### ABSTRACT

Enzymatic activity of total esterase (TE) and carbonic anhydrase (CA) activities was measured by a modification of the method early described by Pocker and Stone on whole tissue homogenate of sea hare *A. punctata* (Cuvier, 1803). This method first determines the enzymatic activity of total esterases, and from these activities the CA activity obtained using a specific inhibitor of CA, Acetazolamide (AZM) are subtracted to calculate specific CA activities. Initially, the CA activity of standard CAII isoform and the acetazolamide inhibitory effect on CAII was determined. Range of AZM used concentration was tested in triplicate and it was proved that 0.5 mM AZM inhibited CAII activity completely. In following measurements of TE and CA activities, 0.5 mM AZM concentration was used. Analysis of TE and CA activities during embryonal development of sea hare in general indicated increase of both activities during larval development (0-26 days). The CA activities significant increased at 7th and 15th day. The percentage of CA activities in comparison to total esterase activity was the highest at 16th and 23th day of development. In general, during development time the percentage of CA activity was reduced comparing to total esterase activities. The emergence of the first biominerals was determined by the analysis of mineral composition (XRD analysis) on the 9th day of development of sea hare embryos, and this work demonstrated that the appearance of biominerals preceded the increase of UA activity on the 7th day.

The thesis is stored in the Library of Juraj Dobrila University of Pula

Original in Croatian (31 pages, 10 figures, 26 references)

**Keywords:** Sea hare *Aplysia punctata*, embrional development, total esterase activity, carbonic anhydrase activity, biomineralisation