

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Molekularne bioznanosti

Vida Čadež

**Biomineralne strukture aragonita morskih beskralješnjaka:  
morfološke, strukturne i biokemijske značajke**

Doktorska disertacija

Zagreb, 2015.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Molekularne bioznanosti

Vida Čadež

**Biomineralne strukture aragonita morskih beskralješnjaka:  
morfološke, strukturne i biokemijske značajke**

Doktorska disertacija

Zagreb, 2015.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni  
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacije

Znanstveno područje: područje prirodnih znanosti  
Znanstveno polje: polje biologija i polje kemija

### BIOMINERALNE STRUKTURE ARAGONITA MORSKIH BESKRALJEŠNJAKA: MORFOLOŠKE, STRUKTURNE I BIOKEMIJSKE ZNAČAJKE

Vida Čadež

Disertacija je izrađena u: Institutu Ruđer Bošković, Zagreb

Mentor/i: dr. sc. Ivan Sondi, redoviti profesor  
dr. sc. Branka Salopek - Sondi

#### Kratki sažetak doktorske disertacije:

Istraživanje detaljno karakterizira morfološke, strukturne, i biokemijske značajke složenih aragonitnih biomineralnih struktura kamenog koralja (*Cladocora caespitosa*), kunjke (*Arca noae*), periske (*Pinna nobilis*) i obične sipe (*Sepia officinalis*). U istraživanju su uporabljene suvremene metode i tehnike: elektronska mikroskopija (FESEM), mikroskopija atomskih sila (AFM), rendgenska difrakcija (XRD), masena spektrometrija visoke razlučivosti (HR ICP-MS), termogravimetrijska analiza (TGA) i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC), uz biokemijske metode karakterizacije proteina kao gel elektroforeza (SDS-PAGE i 2D-PAGE), masena spektrometrija (Nano LC-MS) te Edmanova degradacija. Rezultati istraživanja omogućuju bolje razumijevanje mehanizama formiranja složenih biomineralnih struktura aragonita kod morskih beskralješnjaka na nanorazini te doprinose proširenju osnovnog znanja koje definira metode biomimetičke pripreme aragonitnih materijala željenih morfoloških i strukturnih značajki.

Broj stranica: 129

Broj slika: 44

Broj tablica: 10

Broj literaturnih navoda: 150

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: aragonit, biomineralizacija, nanoagregacija, morski beskralješnjaci

Datum obrane: 15.05.2015.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

- 1.dr.sc. Srečo S. Škapin, znanstveni savjetnik Instituta Jožef Stefan u Ljubljani, predsjednik komisije
- 2.prof.dr.sc. Ivan Sondi, redoviti profesor Rudarsko-geološko naftnog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, mentor 1
- 3.dr.sc. Branka Salopek – Sondi, znanstvena savjetnica Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, mentor 2
- 4.dr.sc. Suzana Šegota, znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, član
- 5.prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član
6. dr.sc. Nadica Ivošević DeNardis, viša znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, zamjena.

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**University of Dubrovnik**  
**Ruđer Bošković Institute**  
**University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of**  
**Molecular biosciences**

**PhD thesis**

**Scientific Area:** natural sciences  
**Scientific Fields:** biology, chemistry

### **BIOMINERAL STRUCTURES OF THE ARAGONITE IN MARINE INVERTEBRATES: MORPHOLOGY, STRUCTURE AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS**

Vida Čadež

**Thesis performed at: Ruđer Bošković Institute, Zagreb**

**Supervisor/s: Ivan Sondi, PhD, professor**  
**Branka Salopek – Sondi, PhD**

#### **Short abstract:**

Morphological, structural and biochemical characteristics of complex aragonitic biomineral structures from scleractinian coral (*Cladocora caespitosa*), noble pen mussel (*Pinna nobilis*), Noah's ark (*Arca noae*) and common cuttlefish (*Sepia officinalis*) are investigated. Advanced methods and techniques such as electron microscopy (FESEM), atomic force microscopy (AFM), X-ray diffraction (XRD), high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR ICP-MS), thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC), with protein biochemical analysis like gel electrophoresis (SDS-PAGE and 2-DE PAGE), mass spectrometry (Nano LC-MS) and Edmans degradation are used in this research. Research results provide a better understanding of complex aragonitic biomineral formation mechanisms at the nanoscale and contribute to the knowledge base that defines biomimetic preparation of aragonitic materials with desired morphological and structural features.

**Number of pages: 129**

**Number of figures: 44**

**Number of tables: 10**

**Number of references: 150**

**Original in: croatian**

**Key words:** aragonite, biomineralization, nanoaggregation, marine invertebrates

**Date of the thesis defense: 15.05.2015.**

#### **Reviewers:**

1. Srečo S. Škapin, PhD Senior Scientist, Institut Jožef Stefan in Ljubljana, president of commission
2. Ivan Sondi, PhD, full prof, Faculty of Mining, Geology and petroleum engineering, University of Zagreb, mentor 1
3. Branka Salopek – Sondi, PhD, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute in Zagreb, mentor 2
4. Suzana Šegota, PhD Scientist, Ruđer Bošković Institute in Zagreb, member
5. Vera Cesar, PhD, full prof., Department of Biology, J.J. Strossmayer University of Osijek, member
6. Nadica Ivošević DeNardis Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute in Zagreb, substitute

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za geokemiju koloida Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Ivana Sondija i dr. sc. Branke Salopek - Sondi u sklopu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske „Nanočestice u biogeokemijskim procesima u okolišu“ kojega je voditelj prof. dr. sc. Ivan Sondi.

## Zahvale

Ovim putem se prvenstveno želim zahvaliti mojim mentorima, prof. dr. sc. Ivanu Sondiju i dr. sc. Branki Salopek – Sondi, koji su mi omogućili izradu ovako zanimljivog interdisciplinarnog doktorata. Vaša pomoć, kolegijalnost, savjeti i sugestije su mi neizmjereno značili tijekom proteklih godina, a posebice pri izradi ove disertacije. Zahvaljujem se i svim članovima povjerenstva za obranu teme, ocjenu i javnu obranu doktorata na komentarima i savjetima za poboljšanje rada. Također puno hvala članovima laboratorija LBOP-a, posebice prof.dr.sc. Vesni Svetličić za pruženu potporu pri istraživanju, te za uključivanje u rad laboratorija. Posebno hvala Galji i Suzani na čvrstim živcima i dobroj volji tijekom moje obuke na AFM-u, te brojnim savjetima i pomoći. Veliko hvala dr. sc. Sreči Škapinu velikoj srdačnosti i strpljenju pri mjerenju uzoraka te izradi naših radova, a time i ove disertacije. Uz moju mentoricu, osoba koja je me naučila tehnike i trikove „zanata“ molekularne biologije, nimalo ne štedeći svoje vrijeme i ekspertizu je i dr.sc. Bojana Vukelić koja mi je bila velika inspiracija, pomoć i potpora. Veliko hvala i osoblju LAGO-a na izradi HR ICP-MS podataka, te dr.sc Nevenki Mikac na svesrdnoj potpori pri radu. Jednako tako svim članovima LGK laboratorija posebno hvala prije svega za izrazitu kolegijalnost, prijateljstvo i „domaću“ atmosferu, te za razumijevanje i podršku kroz sve ove godine. Naravno, ovdje moram posebno istaknuti Maju i Irenu, s kojima ću posebno ostati povezana zahvaljujući istovremenom pisanju doktorata u podrumu III. krila, našu Nedu punu razumijevanja i utješnih riječi, te Niku i Mavru koji su me i u najstresnijem danu uspješno nasmijali. Zahvaljujem se i dr.sc. Saši Kazaziću koji mi je pokazao metodologiju masene spektrometrije te se istinski strudio postići kvalitetne rezultate proteinske identifikacije. Također veliku pomoć u sekvencioniraju su mi pružili i kolege s IJS, na čelu s dr.sc. Igorom Križajem te se nadam i veselim našoj uspješnoj suradnji i u budućnosti. Zahvaljujem i dr.sc. Eminu Teskeredžiću te dr.sc. Davorinu Medakoviću koji su me još kao studenticu primili na IRB i upoznali me sa znanstvenim istraživanjem, zbog čega sam u konačnici i odlučila karijeru posvetiti znanosti. Moram istaknuti i dvije osobe iz privatnog života koji su mi bili svakodnevna potpora. Mama, hvala ti što si bila bezuvjetno tu uz mene u svim prilikama i još uvijek ostala najveći obožavatelj mog rada (iskreno sumnjam da postoji puno roditelja koji umjesto obiteljskih slika imaju ovješene znanstvene postere svoje djece). Vladimire, sve znaš... hvala ti što si dio moje svakodnevne. Da imam više prostora, napisala bi zahvalu za još mnoge ljude; Nadica, Tea, Marija, Adrijana, Marino i ostali dragi suradnici IRB-a, hvala vam na divnoj radnoj atmosferi, vašoj pomoći i prijateljstvu, izrazito mi je drago što sam Vas imala prilike upoznati i učiti od Vas te se nadam da ćemo još dugo godina uspješno surađivati.

# SADRŽAJ

<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1. Osnovne značajke procesa biomineralizacije .....	1
1.1.1. Uloga biominerala u biomimeticima.....	5
1.1.2. Kalcij karbonat u sastavu biominerala .....	7
1.1.3. Organski sastav biominerala .....	9
1.2. Biomineralne strukture aragonita morskih beskralješnjaka .....	11
1.2.1. Biominerali žarnjaka.....	11
Skelet kamenog koralja, <i>Cladocora caespitosa</i> .....	12
1.2.2. Biominerali mekušaca .....	13
Ljuštura kunjke, <i>Arca noae</i> .....	14
Ljuštura periske, <i>Pinna nobilis</i> .....	16
Sipovina obične sipe, <i>Sepia officinalis</i> .....	17
1.3. Koncept istraživanja uz pregled dosadašnjih saznanja .....	20
<b>2. Ciljevi istraživanja</b> .....	23
<b>3. Materijali i metode istraživanja</b> .....	24
3.1. Materijali .....	24
3.1.1. Popis kemikalija.....	24
3.1.2. Komercijalni standardi .....	25
3.1.3. Materijal za pročišćavanje i analizu proteina .....	25
3.1.4. Uzorci .....	26
3.2. Metode određivanja mineraloških, strukturnih i morfoloških značajki biomineralnih struktura .....	28

3.2.1. Rendgenska difrakcija na prahu i nativnim (orijentiranim) uzorcima biomineralnih struktura .....	28
3.2.2. Termogravimetrijska analiza i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija .....	28
3.2.3. Pretražna elektronska mikroskopija s emisijom polja i energijski razlučujuća/disperzivna rendgenska analiza .....	29
3.2.4. AFM sustav za Mikroskopiju atomskih sila .....	29
3.2.5. Masena spektrometrija visoke razlučivosti s induktivno spregnutom plazmom .....	30
3.3. Metode određivanja biokemijskih značajki uzoraka .....	31
3.3.1. Izolacija i pročišćavanje proteina organskog matriksa iz biomineralnih struktura .....	31
3.3.2. Mjerenje koncentracije proteina .....	32
3.3.3. Diskontinuirana SDS- poliakrilamid gel elektroforeza .....	32
3.3.4. Dvodimenzionalna gel elektroforeza .....	34
3.1.1. Masena spektrometrija – Nano LC - MS .....	37
3.1.2. Analiza aminokiselinskog slijeda proteina metodom Edmanove odgradnje .....	39
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>41</b>
4.1. Morfološke i strukturne značajke biomineralnih struktura morskih beskralješnjaka .....	41
4.1.1. Mineralni sastav biominerala morskih beskralješnjaka .....	41
4.1.2. Termalne značajke biomineralnih struktura morskih beskralješnjaka .....	46
4.1.3. Elementni sastav biomineralnih struktura morskih beskralješnjaka .....	48
4.1.4. Morfološke značajke biomineralne strukture koralja .....	49
4.1.5. Morfološke značajke biomineralne strukture kunjke .....	55
4.1.6. Morfološke značajke biomineralne strukture periske .....	61
4.1.7. Morfološke značajke biomineralne strukture sipovine .....	65
4.2. Biokemijske značajke biomineralnih struktura morskih beskralješnjaka .....	77
<b>5. Rasprava .....</b>	<b>92</b>



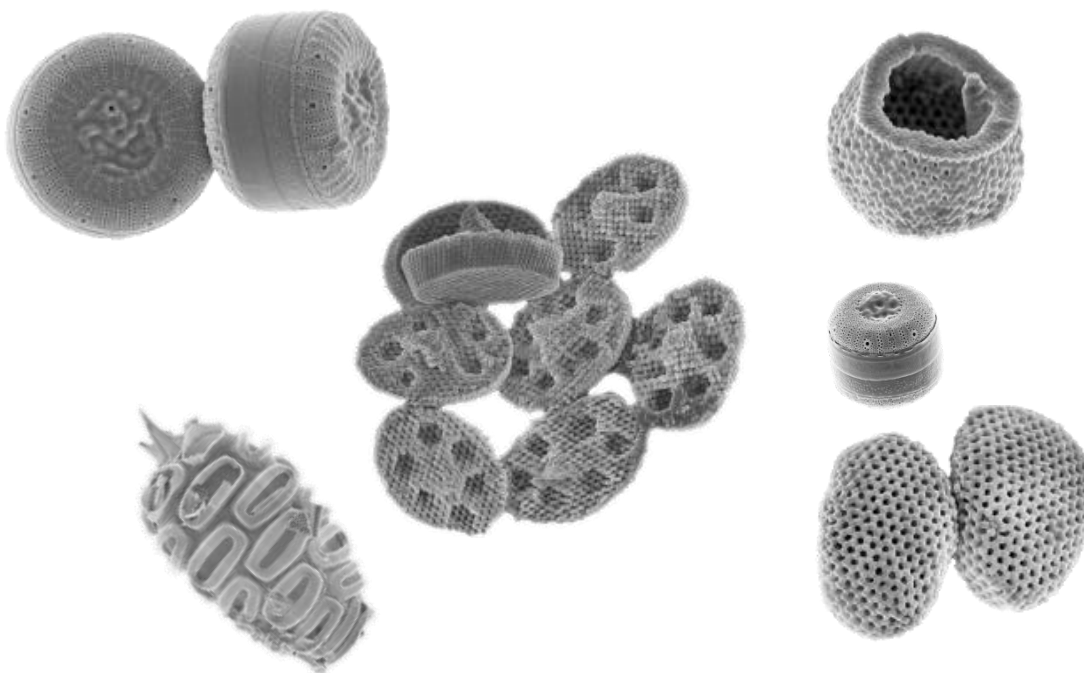
5.1. Biomineralizacijski procesi na nanoskali .....	92
5.2. Utjecaj organskog matriksa na formiranje biomineralnih struktura .....	99
5.3. Mogućnosti uporabe biomineralizacije za razvoj novih metoda i proizvodnju biomaterijala .....	105
<b>6. Zaključci .....</b>	<b>109</b>
<b>7. Literatura .....</b>	<b>111</b>
<b>8. Sažetak .....</b>	<b>125</b>
<b>9. Summary .....</b>	<b>126</b>
<b>10. Životopis i popis publikacija .....</b>	<b>127</b>

# **1. UVOD**

---

### **1.1. OSNOVNE ZNAČAJKE PROCESA BIOMINERALIZACIJE**

Biom mineralizacija je složeni biokemijski proces formiranja visoko organiziranih mineralnih struktura pod kontrolom živih organizama (Cuif i sur., 2011; Lowenstam i Weiner, 1989; Marin i Luquet, 2007). Poznato je preko 60 minerala koji sudjeluju u ovom procesu, a morski organizmi najčešće koriste tri mineralne vrste: opal (silika), aragonit i kalcit (Weiner i Addadi, 1997; Weiner i sur., 2000). Jednostavniji organizmi poput dijatomeja te određenih spužvi često grade skelete od opalinskih silikata koji postižu zadivljujuće strukture, a mnoge vrste gotovo jednako uspješno upotrebljavaju karbonate (Slika 1).



**Slika 1**

Biom mineralne strukture fitoplanktonskih organizama prikupljenih u Jadranskom moru tijekom terenskih istraživanja provedenih 2012. godine (neobjavljeni podaci snimljeni FESEM mikroskopom).

Biominerale morskih organizama u pravilu nastaju pri ambijentalnim uvjetima vodenog sustava, pri niskom tlaku i temperaturi, u uvjetima gdje gradivni elementi često nisu dostupni u dovoljnim količinama. Primjerice, Weiner i suradnici (2000) navode kako bi amorfni silikati vjerojatno bili i prvi izbor mnogih drugih organizama, međutim njihova dostupnost u oceanima nije dostatna, te su se mnoge vrste morale prilagoditi ostalim izvorima minerala. Velika rasprostranjenost karbonatnih biominerale često je objašnjavana kao evolucijski odgovor organizama na supersaturaciju oceana karbonatima. Ona je bila znatno izražena prije približno 540 milijuna godina, u periodu kada su se karbonatni skeleti eukariota počeli naglo razvijati, neovisno jedni o drugima (Knoll, 1989; Veis, 2008). U takvim uvjetima se vjerojatno javljala spontana precipitacija kalcij karbonata na površini mekih tkiva slabo pokretnih organizama (Marin i sur., 1996).

Kako bi se obranili od neželjene kalcifikacije, organizmi su prenamijenili mukozne epitelne ekskrecije u inhibitorne mehanizme koji lokalno spečavaju kalcifikaciju, a kasnije su isti počeli koristiti te mehanizme za fiziološku kontrolu procesa biomineralizacije. Ova teorija je poznata pod nazivom „anti-kalcifikacijska teorija“ (Marin i sur., 1996; Marin i sur., 2000). Posljedica razvitka biomineralizacijskih mehanizama je i smanjenje supersaturacije karbonata, zbog čega su kalcificirajući organizmi postali i važni puferi oceana (Marin i Luquet, 2007; Westbroek i Buddemeier, 1994).

Oblik biomineralizacije koja podrazumijeva spontanu precipitaciju minerala potaknutu izlučevinama metabolizma je i danas prisutan kod nižih organizama poput bakterija (Ehrlich i sur., 2009; Mann, 2001; Sarayu i sur., 2014). Ovakav oblik biomineralizacije nema kontrolu nad svojstvima minerala i nazivamo ga biološki inducirana mineralizacija. Evolucijski znatno napredniji te rašireniji oblik je biološki kontrolirana mineralizacija. To je visoko reguliran proces kojeg karakterizira uniformnost čestica, kompleksna morfologija biominerale s dobro definiranim strukturama i hijerarhijskim organiziranim mineralnim jedinicama.

Biološki kontrolirana mineralizacija se bazira na mehanizmima kontrole koji se prema Mannu (2001) dijele na:

1. kemijske: topivost, supersaturacija, nukleacija, rast kristala;
2. prostorne: stvaranje delineacijskih prostora za mineralizaciju pomoću vezikula i organskih molekula;
3. strukturne: molekularno prepoznavanje, preferencijalna nukleacija;
4. morfološke: kontrola mineralnog rasta organskim granicama koje usmjeravaju rast i
5. konstrukcijske: kontrolu izgradnje visoko uređenih hijerarhijska struktura.

Uporabom ionskih pumpi i kanala, kontrolom pH te interakcijom s organskim komponentama, organizmi aktivno odabiru mineralnu fazu i na taj način često nastaju minerali koji bi u okolišnim uvjetima bili nestabilni. Ioni se moraju prikupiti u zatvoreni prostor kako bi se postiglo stanje supersaturacije, potrebno za početak nukleacije. Ovakav oblik biomineralizacije može se odvijati (Mann, 2001; Weiner i sur., 2001);

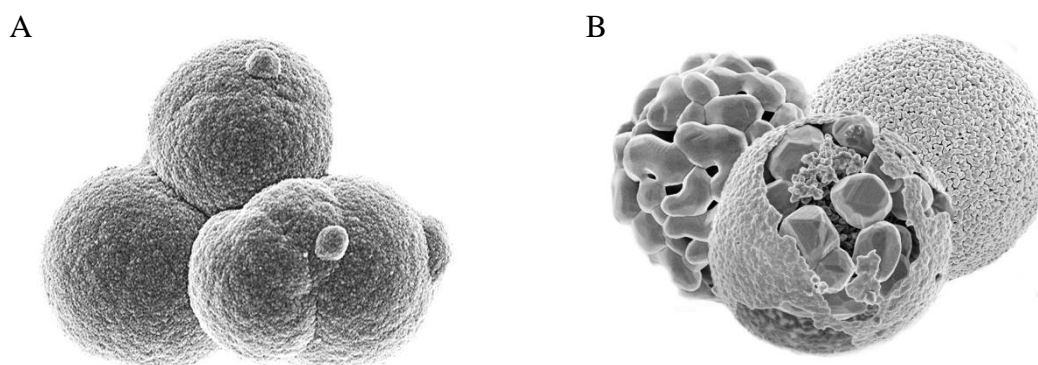
1. u izvanstaničnom prostoru – ljuštore mekušaca kao što je *P. fucata* (Saruwatari i sur., 2009) ili *N. macromphalus* (Marie i sur., 2009);
2. unutar specijaliziranih stanica - spikule morskih ježinaca kao *Paracentrotus lividus* (Vidavsky i sur., 2014) i
3. u međustaničnom prostoru – rijedak tip, kod jednostaničnih organizama koji formiraju kolonije kao što su koralinske alge (Borowitzka, 1982).

Glavni regulator procesa su organske makromolekule koje stvaraju povoljne uvjete i predložak za nukleaciju, određuju tip polimorfa te vode proces mineralnog rasta (Addadi i sur., 2006). Općeniti način formiranja biomineralnih struktura koji se može primijeniti na mnoge biominerale su predložili Cölfen i Antonietti (2005). Autori tvrde da se u uvjetima supersaturacije spontano formiraju nakupine kristala nanometarskih dimenzija koje tvore nukleuse, i kada se prikupi kritična masa, dolazi do strukturno definiranog periodičnog slaganja, odnosno do stvaranja kritičnog kristalnog nukleusa te nastanka nano-amorfne prekursorske faze izgrađene od nestabilne forme, amornog kalcijevog karbonata. Ova faza ne mora biti u potpunosti neuređena, već često postoji kratkotrajna uređena struktura koja se javlja u zrejoj fazi kristalizacije. Kiseli polimeri se prihvaćaju na površine primarnih nanočestica čime dolazi do njihove stabilizacije. Nanočestice tako mogu formirati veće nakupine (klastere) i pomoću orijentiranog prihvaćanja nastaju strukture koje su autori

nazvali mezokristali (Cölfen i Antonietti, 2005, 2007). Daljnjim udruživanjem mezokristali postaju „mono“kristali koji se u biti sastoje od niza orijentiranih nanokristala međusobno spojenih organskom komponentom, ali makroskopski pokazuju karakteristike monokristala (Sondi i sur., 2011b). Ako su drugi uvjeti ostali nepromijenjeni, jednom kada otopina više nije supersaturirana, stopa nukleacije i kristalnog rasta se smanjuje, sustav dolazi u ravnotežno stanje, a kristal prestaje rasti.

### 1.1.1. ULOGA BIOMINERALA U BIOMIMETICI

Biominerale nastali u okolišnim uvjetima često imaju znatno naprednija mehanička svojstva u usporedbi s njihovim anorganskim inačicama (Katti i Katti, 2006; Stempflé i sur., 2010). Trenutno nije moguće proizvesti u istovjetne biomaterijale u laboratorijskim uvjetima, koji bi posjedovali takva svojstva. Zbog toga se često koriste spojevi, materijali pa i cijeli organizmi iz prirode. Često je dovoljan samo jedan bakterijski enzim za postizanje precipitacije karbonatnih čestica i njihovu daljnju transformaciju. Primjerice, oponašanjem procesa mikrobiološke precipitacije bakterija uporabom enzima ureaze, mogu se proizvesti submikrometerske čestice bezvodnih karbonata željenih strukturnih, kemijskih i morfoloških značajki (Slika 2) (Sondi i Salopek-Sondi, 2005; Škapin i Sondi, 2005; Škapin i sur., 2015).



**Slika 2**

Formiranje čestica manganskog karbonata uporabom ureaze (A) i njihova termalna transformacija u manganske okside (B) s unaprijed određenim karakteristikama

(Škapin i sur., 2015).

Nadalje, mogu se uporabiti žive bakterije koje imaju sposobnost precipitacije karbonata (Bachmeier i sur., 2002; Li i sur., 2010; Stocks-fischer i sur., 1999;). Primjerice, Sarayu i suradnici (2014) su demonstrirali kako se ove bakterije mogu nadodati u smjese za popravak pukotina u zidovima arheološki važnih spomenika i sličnih građevina. Bakterije prirodnim metabolizmom precipitiraju nanočestice kalcij karbonata na svojoj površini, a iste onda mogu ispuniti i najsitnije pukotine do kojih striktno kemijske smjese ne mogu doprijeti .

Iako su ovakva istraživanja sve više aktualna, jedno od najperspektivnijih područja uporabe biomineralizacije je u biomedicini (Clarke i sur., 2011). Tu se najviše istražuje uporaba karbonatnih biominerala, proizvedenih od strane raznih morskih organizama poput koralinskih algi, spužvi, ježinaca, sipa, puževa i školjkaša (Clarke i sur., 2011; Green i sur., 2014). Primjerice, oblikovanjem sedefnih ljuštura izrađeni su vijci i pločice koje se mogu koristiti za popravke koštanih oštećenja, a već postoji i komercijalni pripravak na bazi koraljnog praha, Pro-Osteon® koji se koristi kao zubni ispun (Braye i sur., 1996; Niu i sur., 2014). Ipak, najveću pozornost je privukla mogućnost konverzije kalcij karbonatnih biominerala u hidroksiapatit i njihove posljedične ugradnje u koštano tkivo (Braye i sur., 1996; Clarke i sur., 2011; Zhang i Vecchio, 2013). U usporedbi s klasičnima, ovakvi implantati pokazuju bolju osteokonduktivnost, mogu se koristiti i za donos lijekova u kost, a mogućnost prijenosa zaraznih bolesti svedena je na minimum (više detalja u Čadež, 2011).

Za uspješnu uporabu biomineralnih struktura u biomimetici, nužno je dobro poznavanje native strukture i morfologije biominerala, te detaljno karakteriziranje organskih komponenti koje su sastavni dio biominerala. Također, proučavanje fiziologije biomineralizirajućih životinja te njihove evolucijske povijesti nužno je za razumijevanje osnovnih načina funkcioniranja procesa biomineralizacije. Stoga je interdisciplinarni pristup ovoj tematici jedini način razotkrivanja načina na koji se biominerali formiraju, a tek nakon toga će se isti moći uspješno imitirati u laboratorijskim uvjetima.



**1.1.2. KALCIJ KARBONAT U SASTAVU BIOMINERALA**

Prema (Lowenstam i Weiner, 1989), oko 50% poznatih biominerala sadrži kalcij, a tu spadaju spojevi poput kalcijevog fosfata, karbonata, oksalata i slično. Isti autori tvrde kako su minerali izgrađeni od kalcij karbonata najviše zastupljeni biogeni minerali, i po količini i po rasprostranjenosti.

Postoji šest različitih polimorfa kalcij karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ), 5 je kristalinično, a samo jedan je amorfni. Vaterit, aragonit i kalcit su jedini „čisti“  $\text{CaCO}_3$  minerali, a metastabilne odnosno prijelazne faze su amorfni kalcij karbonat (ACC) i kalcij karbonat monohidrat ( $\text{CaCH}_2\text{O}_4$ , monohidrokalцит) s jednom molekulom vode po kalcij karbonatu, te heksahidrat ( $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , ikait) sa 6 molekula vode (Addadi i sur., 2003; Fricke i Volkmer, 2007).

Od navedenih polimorfa, aragonit i kalcit su najčešće korišteni za izgradnju čvrstih biomineralnih struktura. Njih organizmi upotrebljavaju za izgradnju skeleta i mehaničku zaštitu, ali i kao uređaje za regulaciju plovnosti, zatim leće za recepciju svjetlosti, otolite za kontrolu gravitacije i slično (Lowenstam i Weiner, 1989; Mann, 2001). Amorfni kalcij karbonat se također može pronaći u obliku tranzicijske faze nekih morskih organizama, uglavnom kao prva faza u formiranju aragonitnih/kalcitnih biominerala, dok ga mješčičnice koriste i u potpuno formiranim spikulama, gdje je pronađen i kalcij karbonat monohidrat (Addadi i sur., 2003). Poznato je da organizmi mogu iskoristiti i vaterit za izgradnju struktura kao što su otoliti riba, biseri školjkaša te kao materijal za popravak pukotina na ljušturi (Falini i sur., 2005; Fricke i Volkmer, 2007; Natoli i sur., 2010).

Iako kalcit i aragonit imaju isti kemijski sastav ( $\text{CaCO}_3$ ), njihove kristalne strukture su različite. Ortorobni aragonit nema lomne plohe i ima bolje pakiranje jedinične ćelije, što mu omogućava veću otpornost na klanje u usporedbi s romboedarnim kalcitom (Fricke i Volkmer, 2007; Weiner i Addadi, 1997). Aragonit ima preferentni rast u c-smjeru te formira polimorfne strukture slične sitnim iglicama, dok kalcit formira velike (mono)kristale romboedarnog oblika, koji su i više skloni klanju. Nadalje, aragonit ima veću gustoću od kalcita i predstavlja bolji građevni materijal pri formiranju guste i kompaktne kristalne rešetke (Nelyubina i Lyssenko, 2012). Iako se oba polimorfa mogu razviti iz početnog amornog kalcij karbonata, u morskom okolišu bogatom magnezijem obično je aragonit preferirani mineral, posebice kada je naglasak na mehaničkoj zaštiti (Fricke i Volkmer, 2007). Naime, magnezij ne može prodrijeti u strukturu aragonita, ali se lagano ugrađuje u kristalnu

rešetku kalcita, koju posljedično destabilizira pa je čini još više podložnom klanju (Mann, 2001; Meldrum i Hyde, 2001).

Sam odabir minerala koji će se koristiti ovisi o pojedinom organizmu te o okolišnim uvjetima u kojima je određena vrsta prvotno nastala (Porter, 2010). Primjerice, kada je u oceanu omjer Mg/Ca bio manji od 2 (tzv. kalcitno more), većina vrsta je preferirala izgradnju skeleta od kalcita, a kada je omjer bio veći od 2 (tzv. aragonitno more), biominerali su formirani od aragonita. Međutim, kada je jednom odabran taj polimorf, bez obzira na promjenu okolišnih uvjeta, vrste i dalje proizvode isti biomineral (Porter, 2010). Ovo se javlja vjerojatno zato što je energetski manje zahtjevno proizvesti taj polimorf nego izmijeniti evolucijske mehanizme potrebne za promjenu polimorfa. Ovi mehanizmi su prvenstveno regulirani proteinima koji se nalaze u vrlo malom postotku samog sastava biominerala. Primjerice, kalcij karbonat u biomineralu može zauzeti i do 99% ukupnog sastava (Marin i sur., 2012). Međutim proces biomineralizacije je kontroliran s ostalim komponentama poput proteina, polisaharida i sličnih tvari koje se ukupno nazivaju organski matriks (Mann, 2001). Upravo taj međuodnos organsko – anorganskih komponenti biominerala daje zadivljujući raspon oblika i formi te je detaljno proučavanje komponenti organskog matriksa i glavni način razumijevanja procesa biomineralizacije.

### **1.1.3. ORGANSKI SASTAV BIOMINERALA**

Organski matriks je kompleksna mješavina raznih proteina, polisaharida te u manjoj mjeri lipida, pigmenata i sličnih spojeva koji čine organski dio biomineralne strukture (Farre i Dauphin, 2009; Ren i sur., 2011). Klasična podjela makromolekula koje sudjeluju u procesu biomineralizacije bazira se na njihovoj topivosti. Posljedično razlikujemo topivi (proteini; polipeptidi, proteoglikani) i netopivi (fibrozni proteini, polisaharidi) organski matriks (Fricke i Volkmer, 2007; Mann, 2001). Iako je ovo vrlo kruta klasifikacija, naročito kada se uzme u obzir velika raznolikost do sada izoliranih proteinskih sekvenci, i dalje je česta u literaturi, prvenstveno zbog metodologije njihove izolacije, te će biti korištena i u ovoj disertaciji.

Netopivi, hidrofobni organski matriks je potreban kako bi se formirala mreža koja određuje mikrometarske odjeljke, odnosno predloške za budući rast kristala (Fricke i Volkmer, 2007). Na takav predložak mogu se pričvrstiti i kontrolne makromolekule topivog organskog matriksa koje kontroliraju rast biominerala. Topivi matriks često sadrži tzv. kisele proteine koji u velikom postotku sadrže asparaginsku i glutaminsku kiselinu (odnosno njihove soli aspartat i glutamat) (Marin i Luquet, 2007). Takvi proteini imaju jaki negativni naboj na svojoj hidrofilnoj grupi i tu vjerojatno fiksiraju metalne ione te primjerice u kontaktu s  $\text{Ca}^{2+}$  zauzimaju formu  $\beta$ -nabrane ploče (Addadi i sur., 2006; Worms i Weiner, 1986). Iako su proteini najviše proučavan dio organskog matriksa, i dalje postoje velike prepreke u njihovom istraživanju, posebice njihova polidisperznost, polianionska svojstva i posttranslacijske modifikacije (Marin i sur., 2012). Jedna od najčešćih posttranslacijskih modifikacija je glikozilacija, s obzirom da glikoproteini preuzimaju razne funkcije u procesima biomineralizacije. Npr. često utječu na formiranje neuređene prekursorske mineralne faze, utječu na nukleaciju i rast kristala te svojom ugradnjom mijenjaju gradivna svojstva kristala (Mann, 2001). *In vitro* pokusi su pokazali da je već i sama prisutnost određenog broja aminokiselinskih ostataka dovoljna da se kontrolira struktura i oblik čestica kalcijevog karbonata, te aktivnost enzima nije nužno potrebna (Sondi i Salopek-Sondi, 2005). Istovremeno je pokazano kako razlike u slijedu aminokiselina uzrokuju razvoj različitih morfologija te se pretpostavlja da bi to moglo biti vezano uz stereokemijsku prepoznatljivost, ali i termodinamičke te kinetičke parametre.

Pri stvaranju biomineralne strukture mnogih morskih organizama važnu ulogu u hijerarhijskoj izgradnji i mehaničkoj stabilnosti ljuštura ima hitin, linearni polisaharid  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-2-deoksi-D-glukoze. On je sastavni dio ljuštura mnogih organizama npr. raznih mekušaca i rakova. Smatra se da je hitin jedan od glavnih čimbenika kontrole rasta biominerala, iako taj podatak i dalje nije detaljno istražen (Marin i sur., 2013). Hitin je nakon celuloze drugi najčešći prirodni polimer, a strukturno se razlikuju samo u hidroksilnoj grupi, koja je kod hitina zamijenjena s acetamidom. Postoje tri polimofna oblika hitina;  $\alpha$ -hitin s anti-paralelnom konfiguracijom,  $\beta$ -hitin s paralelnom konfiguracijom i  $\gamma$ -hitin koji je kombinacija prva dva oblika (Slika 2). Anti-paralelna konfiguracija  $\alpha$ -hitina povezana vodikovim vezama mu omogućava čvrstu i visoko orijentiranu strukturu, zbog čega se taj oblik i najčešće pojavljuje u prirodi (Meyers i sur., 2008).

Ostale sastavnice kao lipidi i pigmenti čine vrlo mali postotak organskog matriksa i njihova prisutnost ponekad uopće nije detektirana. Iako su lipidi često u sastavu proteina tj. u obliku proteolipida, smatra se da oni ne utječu u značajnijoj mjeri na formiranje biomineralne strukture, ali ova tvrdnja nije detaljno ispitana. Npr. Goffredo i suradnici (2011) smatraju da bi lipidi mogli stabilizirati amorfnu kalcijev karbonat, s naglaskom na fosfolipide i njihovu sposobnost izolacije minerala formiranjem vezikula. Pigmenti poput melanina, karotenoida i poliena su zabilježeni u ljušturama školjkaša, iako su vrlo rijetko predmet interesa u istraživanjima biominerala (Hedegaard, 2006; Lowenstam i Weiner, 1989).

## 1.2. BIOMINERALNE STRUKTURE ARAGONITA MORSKIH BESKRALJEŠNJAKA

Morski beskralješnjaci koji u svoju strukturu kontrolirano ugrađuju aragonit široko su rasprostranjeni duž taksonomskih grupa. Ipak, najviše znanstvene pozornosti su privukla dva koljena: žarnjaci i mekušci (Drake i sur., 2014). Kao što je već napomenuto, oni predstavljaju vrlo obećavajući izvor biomaterijala za uporabu u biomimeticima, a njihova strukturalna svojstva su i dalje nedovoljno poznata.

### 1.2.1. BIOMINERALI ŽARNJAKA

Najpoznatiji pripadnici žarnjaka koji formiraju aragonitne strukture su koralji (Lowenstam i Weiner, 1989). Oni su također i među prvim mnogostaničnim životinjama koje imaju sposobnost izgradnje skeleta od kalcij karbonata (Knoll, 1989). Koralji predstavljaju najveći izvor biogenog kalcij karbonata u polimorfnoj modifikaciji aragonita jer ne pružaju toliku pozornost organizaciji biomineralnih struktura koja je vidljiva kod školjkaša, što im omogućuje i jako velike stope mineralizacije (Falini i sur., 2013). Oni su važni i u reguliranju ekosustava, jer predstavljaju idealan habitat za veliki niz različitih vrsta. Primjerice, veliki koraljni greben zauzima područje od otprilike 344,400 km<sup>2</sup>, predstavlja jedno od najraznovrsnijih staništa na svijetu sa nekoliko tisuća različitih vrsta i smatra se jedinom biološki stvorenom strukturom vidljivom iz svemira (Hutchings i sur., 2008). Klasifikacija koralja se temelji na građi njihovog skeleta, za razliku od mekušaca gdje se ona bazira na anatomskim karakteristikama vrste (Cuif i sur., 2011). U budućnosti zbog razvoja metoda molekularne filogenije će zasigurno doći do klasifikacijskih izmjena kod obje skupine.

Pojam koralj označava cijeli skelet, a sam koralit je pojedinačni polip u obliku čaše na osnovici koje je bazalna ploča (Slika 3). Iz nje izlazi vapneni cilindar ili teka koja okruži aboralni dio životinje pa je jedan dio tijela izvan skeleta (Slika 3). Ektoderm polipa u kontaktu sa skeletom se naziva kalikoblastični ektoderm (eng. *calicoblastic ectoderm*) i na njegovoj vanjskoj strani se odvijaju svi biomineralizacijski procesi na analogan način kao kod epitela plašta mekušaca (Cuif i sur., 2011). Na ovaj način životinja gradi privremene platforme i napušta ranije formirano područje, bez nužnog rasta samog polipa. Zato postoje dvije mineralizirajuće domene koje se mogu usporediti s dvoslojnom građom mekušaca (Cuif i Dauphin, 2005a; Cuif i Dauphin, 2005b). Prva domena su rane mineralizirajuće zone koje

imaju nasumičnu orijentaciju i u kontrastu su sa domenom dobro definiranih fibroznih vlakana. One čine gradivni sistem koralita i na taj način formiraju biomineral koji životinja koristi kao supstrat za pričvršćivanje, ali jednako tako i utočište od predatora (Slika 3).



**Slika 3**

Opća anatomija koralja (životinje) i koralita (skeleta) uz prikaz dviju mogućnosti grananja koralita (aksijalno i radijalno). Modificirano prema Kelley, E.

(<http://www.coralhub.info/terms/wall>).

### **SKELET KAMENOG KORALJA, *CLADOCORA CAESPITOSA***

Kameni koralj, *Cladocora caespitosa* (Scleractinia: Faviidae) je endemska vrsta Mediteranskog mora koja se smatra jednom od glavnih proizvođača karbonata u Mediteranu (Peirano i sur., 2001). Spada u kolonijalne vrste, a najveća kolonija je zabilježena u Mljetskim jezerima gdje zauzima preko 650 m<sup>2</sup> (Kružić i Požar-Domac, 2002). S obzirom da živi u simbiotskim zajednicama s algama zooksantelama koje ne mogu preživjeti bez sunčeve svjetlosti, ovaj koralj ne obitava ispod 40 m dubine. Kameni koralj pokazuje tipičnu faceloidnu formaciju (eng. *phaceloid form*) u kojoj pojedini koraliti formiraju vertikalne strukture neovisne od susjednim (zidovi nisu spojeni) (Montagna i sur., 2007).

### **1.2.2. BIOMINERALI MEKUŠACA**

Preko 100 000 vrsta mekušaca proizvodi neki oblik ljuštore te se nakon koralja smatraju jednim od najčešćih i najrasprostranjenijih životinja sa sposobnošću biomineralizacije (Marin i Luquet, 2004). Najčešće proučavani biominerali mekušaca pripadaju školjkašima. To su visoko regulirani mikrolamelarni kompoziti organizirani u čvrste strukture čija je primarna uloga zaštita životinje (Fricke i Volkmer, 2007). Kalcit i aragonit u ljušturi odvaja tanki organski sloj kojeg izlučuje vanjski epitel plašta (Feng, 2011). Između unutarnje strane ljuštore i gornjeg sloja epitela plašta školjkaša nalazi se prostor ispunjen ekstrapalijalnom tekućinom (Marin i Luquet, 2004). Osim ljušturom i epitelom, ograničen je i periostrakumom, vanjskim organskim slojem koji prekriva ljušturu (Addadi i sur., 2006). Periostrakum nastaje još u embrionalnoj fazi kada periostrakalni nabor ruba plašta luči periostracin koji zahvaljujući kinonu postaje visoko netopiv, a služi za stvaranje zatvorenog ekstrapalijalnog prostora te kao prva potpora rastućim biomineralima (Marin i Luquet, 2004). U ovom prostoru dolazi do aktivne sekrecije iona kalcija i bikarbonata kako bi nastali supersaturirani uvjeti potrebni za mineralizaciju. Ekstrapalijalna tekućina sadrži i razne druge elemente. Glavna komponenta koja određuje tijek biomineralizacije ispuštena u ekstrapalijalni prostor je organski matriks kojeg izlučuju specijalizirane stanice kalcificirajućeg plašta (Furuhashi i sur., 2010; Marin i sur., 2012).

Najčešće strukture se mogu podijeliti u 3 grupe (Subramanyam, 2007 i citirana literatura):

1. sedefna: izvana sloj prizmatične strukture, unutar ljuštore sedefni;
2. listasta: iskrižana lamelarna struktura izvana, unutar ljuštore kompleksno iskrižana lamelarna struktura i
3. iskrižana lamelarna: fibrozna struktura ili kompozitna prizmatična struktura izvana, srednji sloj iskrižane lamelarne i/ili homogene strukture i unutarnji sloj od kompleksno iskrižane lamelarne strukture i/ili homogene strukture.

**LJUŠTURA KUNJKE, *ARCA NOAE*****Slika 4**

Vanjski izgled ljušture kunjke, *Arca noae*.

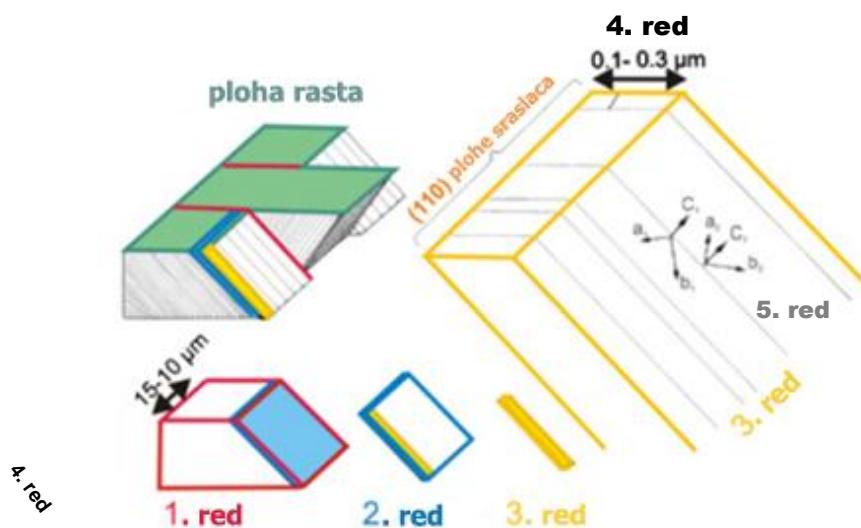
Kunjka, *Arca noae* (O. Arcoida), karakteristična je za područje Mediteranskog mora, a može narasti do 10 cm i doživjeti 16 godina starosti (Peharda i sur., 2002). Brava joj je taksodontna, a ljuštura ima trapezoidni oblik i na vanjskoj površini izražene radijalne žljebove (Oliver i Holmes, 2006) (Slika 4). Ljuštura ima listastu strukturu i u potpunosti je izgrađena od aragonita. Unutarnji dio izgrađen od kompleksno iskrižanog lamelarnog sloja, a ispunjen je paralelnim cjevčicama (tubulima) koji se protežu kroz cijelu unutarnju površinu ljušture, do palijalne linije (Waller, 1980).

Prostor od palijalne linije do periostrakuma ispunjen je ponešto drugačijim slojem od onoga u unutarnjem dijelu i sastoji se od iskrižanih lamelarnih struktura. Ovaj prostor se naziva marginalni rub plašta i, u usporedbi sa unutarnjim slojem ljušture, lagano je uzdignut. Taj prostor prekriva tanki fibrozni organski film koji se proteže i na vanjski sloj ljušture. Ljušturu izvana oblaže debeli sloj periostrakuma (Waller, 1980).

Razlog slabom proučavanju ovakvog tipa građe ljušture je velika kompleksnost 3D organizacije iskrižano lamelarne strukture (Nouet i sur., 2012). Ona je izgrađena od pravilno izmjenjujućih nizova međusobno ukrštenih lamela (lamele prvog reda), koje se formiraju okomito na rastući rub školjke i sastoje se od gusto poredanih uskih aragonitnih ploha, odnosno lamela drugog reda (Slika 5). Te plohe su također su izgrađene od sličnih tvorbi,



odnosno još sitnijih lamela trećeg reda. Osnovna struktura lamele trećeg reda su submikrometarski agregati aragonita međusobno srasli u smjeru c-osi koji se agregiraju u podjedinice, lamele četvrtog reda koje zauzimaju oblik heksagonalne ploče (Hayashi i sur., 2010). Te ploče su definirane kao monokristali izgrađeni od sraslih nanočestica petog reda (Hayashi i sur., 2010, Dauphin i sur., 2003a). Svaka od ovih podjela je okomita na prethodnu, što čini ovu strukturu najkompleksnijom strukturom mekušaca (Nouet i sur., 2012). Ovakav način pakiranja omogućuje životinji dodatnu mehaničku čvrstoću, posebno prilagođenu obrani od predatora. Također, žlijebovi na vanjskoj strani ljuštire predstavljaju pogodan supstrat za prihvat raznih obraštajnih organizama što kunjki omogućava dodatnu prilagodbu okolini radi zaštite od prirodnih neprijatelja (Slika 4).



Slika 5

Shematski prikaz iskrizano lamelarne građe ljuštire. Modificirano prema Nouet i sur., 2012 i Dauphin i sur., 2003a.

**LJUŠTURA PERISKE, *PINNA NOBILIS***

**Slika 6**

Izgled ljušture periske, *Pinna nobilis*, s vidljivim bodljama na gornjem dijelu ljušture.

Periska, *Pinna nobilis* (Pteriomorphia: Pinnoidea) spada u strogo zaštićene endemske vrste u Mediteranu (Siletic i Peharda, 2003). Ona može narasti do 120 cm i doživjeti 30 godina starosti (Zavodnik i sur., 1991). Ljuštura ima karakterističan i lako prepoznatljiv oblik lepeze (Slika 6) koja ima oštre bodlje s vanjske strane koje služe kao zaštita od predatora, ali i za prihvaćanje epibionata, odnosno kamuflažu životinje. Ta vanjska ljuštura crvenkaste boje je izgrađena od kalcita na kojem se nalazi i tanak sloj periostrakuma, koji kao i bodlje, sa starenjem životinje erodira (Marin i sur., 2011).

Periska je u prošlosti smatrana glavnim biomineralizacijskim modelom zbog građe njenih kalcitnih prizmi (Marin i sur., 2011). Taj sloj prekriva veći dio ljušture ovog školjkaša, a samo prva polovica unutarnjeg dijela je prekrivena unutarnjim slojem izrađenim od aragonita (Cuif i sur., 1985). Ove slojeve je jednostavno razlikovati zahvaljujući njihovoj obojanosti. Vanjski sloj je sastavljen od jednostavnih, paralelno položenih velikih prizmi crvenkaste boje koje

rastu u smjeru c-osi i izgledom podsjećaju na strukturu pčelinjeg saća, a unutarnji je bijeli i ograničen je na područje između dva ožiljka mišića. Ta dva sloja su međusobno odvojena organskim slojem (Feng, 2011). Specifičnost periske je u tome da se ova dva sloja odvojeno formiraju, za razliku od drugih školjkaša kao što je primjerice dagnja (Marin i sur., 2011). Epitelne stanice ruba plašta periske proizvode vanjski, prizmatični sloj koji raste prema unutra, a zatim stanice koje su postavljene u području brave proizvode sedef. Aragonitni, odnosno sedefni dio je, kod mlađih jedinki je gotovo proziran, dok kod starijih može biti i do 1 cm deo na vršnom dijelu. On je karakteriziran kao sedef naslagan u redove (*eng. row – stack*), odnosno sedefna struktura koja omogućuje dodatnu fleksibilnost, različita od strukture ciglenog zida, tipične za sedef drugih školjkaša (Carter, 1990).

### **SIPOVINA OBIČNE SIPE, *SEPIA OFFICINALIS***



**Slika 7**

Poprečni presjek sipovine obične sipe *Sepia officinalis*, L. vidljive su paralelno poredane komore, ispunjene okomitim stupovima i međusobno odvojene lamelarnim zidovima. Cijelu strukturu dorzalno natkriva tvrd dorzalni štit.

*Sepia officinalis* (O. Sepiida), obična sipa pripada rijetkim morskim beskralješnjacima koji imaju skelet unutar tijela. Taj skelet se naziva sipovina ili fragmokon (*eng. cuttlebone, phragmocone*) i zahvaljujući svom dizajnu, zauzima svega 9% tjelesne mase (Webber i sur., 2000). Nalazi se zaštićen u vreći sipovine (*eng. cuttlebone sack*). Građen je od niza aragonitnih komora (oko 100 kod odraslih jedinki), međusobno odmaknutih oko 0,6 mm, anteriorno i lateralno pričvršćenih na dorzalni štit (Denton i Gilpin-Brown, 1961a; Webber i sur., 2000) (Slika 7). Komore su neovisne jedna od druge, odijeljene lamelarnim zidom i s oko

6 tankih organskih membrana koje su pričvršćene na gusto poredane stupove čija je uloga strukturalna potpora i održavanje poroznosti strukture (Denton i Gilpin-Brown, 1961b). Ova naizgled kontradiktorna svojstva pružaju životinji potrebnu mehaničku potporu i istovremeno joj daju mogućnost precizne kontrole izmjene tekućine i plinova unutar komora, odnosno regulacije vertikalnih gibanja.

Sam dorzalni štit je izgrađen od nekoliko tankih i čvrstih slojeva aragonita koji su ugrađeni u mrežu hitina. Ti slojevi se ugrubo mogu podijeliti u vanjski periostrakum (sferulitični prizmatični sloj), srednji ostrakum (laminarni sedefni sloj) i unutarnji hipostrakum (polu-prizmatični sloj) (Dauphin, 1980; Subramanyam, 2007). Obod dorzalnog štita (konus) sadrži vrlo malo aragonita u svom sastavu i dijeli se na vanjski i unutarnji dio. Vanjski konus ima strukturu koja podsjeća na krila koja definiraju granice sifunkularnog prostora ventralnog dijela sipovine, važnog za regulaciju plovnosti.

Uloga sifunkularnog prostora je kontrola izmjene plinova i tekućine u sipovini, odnosno regulacija plovnosti. Komore sipovine rastu brzinom od oko c. Najmlađa je početna komora na trbušnom dijelu sipovine koja istovremeno čini njen donji svod. Tu su biomineralizacijski procesi uvijek aktivni i grade nove komore od aragonita. Prva komora je uvijek ispunjena tekućinom bogatom natrijem i kalijem, u koncentracijama koje su slične morskoj vodi (Denton i Gilpin-Brown, 1961b). Tlak u prvih desetak novije formiranih komora je vrlo nizak i one su ispunjene uglavnom plinom, koji slobodno difundira u njih (Denton i Gilpin-Brown, 1961b; Webber i sur., 2000). Dorzalni i prednji dio sipovine više je ispunjen plinom jer tekućina (koja se širi s kaudalne strane prema naprijed) tu kasnije dopire. Ovaj plin ima konstantnu masu, neovisno o promjenama gustoće u sipovini (Denton i Gilpin-Brown, 1961b). Najveće promjene se odvijaju u starijim, posteriornim komorama koje se nalaze bliže membrani i uglavnom su ispunjene tekućinom. Npr. tokom dana životinja uglavnom miruje na morskom dnu, pri čemu su posterioarne komore sipovine ispunjene tekućinom i time održavaju horizontalnu poziciju. Po noći sipa postaje aktivnija, te ispusti dio tekućine iz sipovine što rezultira stvaranjem mjerljivog vakuuma, smanjenjem gustoće i olakšavanjem vertikalnog kretanja, odnosno lova (Denton i sur., 1961; Webber i sur., 2000). Ispuštanje tekućine iz posteriornog dijela sipovine rezultira podizanjem stražnjeg kraja životinje u tipičnu poziciju sipe kada se sprema za lov po dnu (Denton i Gilpin-Brown, 1961b). Regulacija

plovnosti se održava unosom, odnosno izbacivanjem iona natrija i klora preko sifunkularne membrane (Denton i sur., 1961). Kada je životinja na dnu mora, ioni su izbačeni iz sifunkularne vreće, sastav tekućine time postaje hipotoničan, što uzrokuje ulaz vode u sipovinu i olakšava zaron životinje. Jednako tako, kada životinja želi izroniti, ioni se ubacuju u tekućinu sipovine i olakšavaju pražnjenje komora.

Sipa balansira hidrostatski pritisak morske vode razlikom osmotskih tlakova između krvi i tekućine u sipovini (Denton i sur., 1961). Zahvaljujući svojoj građi, sipovina može održavati konstantan volumen neovisno o dubini. To predstavlja evolucijsku prednost u odnosu na funkcionalno sličan plivači mjehur riba (Webber i sur., 2000), čiji tlak je jednak vanjskom hidrostatskom tlaku mora (Denton i Gilpin-Brown, 1961b; Tiseanu i sur., 2005). To znači da će tlak pri dubini od 7 metara u ribljem mjehuru iznositi 8 atm (što uzrokuje njegovu kompresiju, brže tonjenje i teže prilagodbe izranjanju), ali kod sipovine je pri istoj dubini tlak je i dalje manji od atmosferskog, odnosno gotovo neovisan o dubini. Jednako tako, sipovina ima sposobnost spore difuzije tekućine unutar uskih kanala komora, te se pri njenom izranjanju izjednačavanje tlakova odvija samo u dijelu najbližem sifunkularnoj membrani, a dublje u sipovini tlak ostaje sličan onom s prosječne dubine boravka i do par sati nakon izranjanja, što olakšava ponovno uranjanje (Denton i sur., 1961a). Na ovaj način životinja praktički i ne prilagođava svoju plovnost pri kratkoročnom odlasku u pliće slojeve. Iako sipa može kontrolirati osmotske razlike pomoću izjednačavanja iona u krvi i tekućine sipovine, maksimalna dubina zarona je određena otpornošću na pucanje sipovine, odnosno njenom građom. Zato vrste koje žive na većim dubinama imaju zadebljane zidove lamela i blisko postavljene stupove unutar komora, te njihova sipovina može podnijeti veće hidrostatske pritiske, testirane do 200 atmosfera (Denton i Gilpin-Brown; 1961b; Sherrard, 2000). Iako je sipa u prednosti pred ribama što se tiče brzine vertikalnog gibanja i dnevnih migracija, utrošak njene energije je veći od prosječnog utroška plivajućeg mjehura riba (Webber i sur., 2000). Iako bi neki na prvi pogled sipovinu mogli smatrati reliktom, to nije točno. Sipovinu uspješno upotrebljava preko 120 vrsta sipa, koje spadaju u jednu od najbrojnijih skupina glavonožaca u plitkim vodama (Ward i Boletzky, 1984).

### 1.3. KONCEPT ISTRAŽIVANJA UZ PREGLED DOSADAŠNJIH SAZNANJA

Iako se biominerali morskih organizama istražuju već desetljećima, još uvijek nije razjašnjen točan mehanizam njihovog formiranja. Razvojem novih tehnika istraživanja poput FESEM i AFM mikroskopije te metoda proteinske karakterizacije kao što je masena spektrometrija, stjeću se nove spoznaje o tome da su procesi biomineralizacije mnogo kompliciraniji nego što se smatralo. Osnovna saznanja o biomineralima i procesima biomineralizacije kod pojedinih skupina morskih organizama su najbolje ilustrirana u knjigama „On biomineralization“ (Lowenstam i Weiner, 1989), „Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry“ (Mann, 2001), „Biomineralization, Vol 54“ (ed. Dove i sur.) „Handbook of Biomineralization“ (ed. Bauerlein i sur., 2007) „Topics in Current Chemistry, Vol. 270, Biomineralization I i Vol. 271 Biomineralization II“ (ed. Naka, 2007), “Mesocrystals and Nonclassical Crystallization“ (Colfen i Antonietti, 2008), Biominerals and Fossils Through Time (Cuif i sur., 2011) te u nizu članaka od kojih se posebno ističu pregledni radovi radnih grupa pod vodstvom dr. Cölfena (Cölfen i Mann, 2003; Cölfen i Antonietti, 2005) dr. Meyersa (Meyers i sur., 2008; Chen i sur., 2012) i dr. Weinerja (Addadi i sur., 2006; Levi i sur., 1998; Nudelman i sur., 2006; Weiner i Addadi 1997; Weiner i sur., 2000; Weiner i sur., 2009; Weiss i sur., 2002). Osim samih svojstava biominerala, u fokusu mnogih istraživanja je proučavanje procesa nukleacije i mogućnosti uporabe tih saznanja u biomimeticima (Cölfen i Mann 2003; Nudelman i sur., 2006; Qiao i sur., 2011; Zhang i Xu 2013).

Povijest naše radne grupe je također blisko vezana uz istraživanje mineralizacijskih procesa kalcij karbonata, kako u laboratorijskim uvjetima (Sondi i Matijević, 2001; Sondi i Salopek-Sondi, 2005; Sondi i sur., 2009; Škapin i Sondi, 2005; Škapin i Sondi, 2010; Wang i sur., 1999), tako i u prirodi (Lojen i sur., 2010; Sondi i Juračić, 2010; Sondi i sur., 2010; Sondi i sur., 2011a). U prirodi već dugi niz godina istražujemo i formiranje aragonitom bogatih sedimenata u mljetskim jezerima (Lojen i sur., 2010; Sondi i Juračić 2010;), ali mljetska jezera imaju još jednu specifičnost – ona su stanište najvećeg koraljnog grebena na Mediteranu (Kružić i Požar - Domac, 2002). Istraživanje biomineralne strukture tog koralja, objavljeno 2011 godine čini temelj ove doktorske disertacije (Sondi i sur., 2011a).

Taksonomski gledano, koralji su jedni od prvih životinja koji koriste aragonit za izgradnju svoje biomineralne strukture. Kao takvi, oni imaju i relativno jednostavnu strukturu sastavljenu od fibroznih aragonitnih vlakana koji se starenjem transformiraju u kristalografski dobro definirane oblike. Sličnih radova koji bi se mogli usporediti s našim istraživanjem ima vrlo malo i uglavnom se odnose na druge vrste koralja (Allemand i sur., 2004; Cuif i Dauphin, 2005a,b; Cuif i sur., 1999; Falini i sur., 2013; Przeniosło i sur., 2008), te namjeravamo dodatno produbiti naša dosad prikupljena saznanja. Ova disertacija je stoga koncipirana na način da uspoređuje mineralizaciju koralja s kompleksnijim procesima u evolucijski razvijenijim pripadnicima koljena mekušaca, koji također imaju aragonitne biominerale u svojoj strukturi.

Kunjka, *Arca noae*, je odabrana kao početni predstavnik primitivnog roda školjkaša sa široko rasprostranjenim tipom biomineralne strukture, kompleksno iskrižanom lamelarnom strukturom građenom isključivo od aragonita (Waller, 1980). Iako je tip strukture poznat, biomineralizacija ovog školjkaša je gotovo u potpunosti zapostavljena u novijoj literaturi te se pri njenom proučavanju moramo osloniti na procese biomineralizacije sličnih vrsta (Meyers i sur., 2013; Morton, 2012; Morton i Jones, 2009; Oliver i Holmes, 2006; Waller, 1980).

Slijedeći školjkaš odabran za istraživanje je periska, *Pinna nobilis*, kao predstavnik modernog tipa biomineralne strukture školjkaša. Njena ljuštura je izgrađena od dva sloja; vanjskog kalcitnog i unutarnjeg aragonitnog (Marin i sur., 2011). Ona je bolje zastupljena u literaturi, iako i sami autori ovih radova govore da su nužna dodatna istraživanja (Marin i sur., 2012). Također, većina radova obrađuje građu kalcitnih prizmi (Checa i sur., 2005; Dauphin, 2003b; Dauphin, 2002; Marin i sur., 2005; Marin i Luquet, 2005; Pokroy i sur., 2006a, b; Wolf i sur., 2012), a rijetki opisuju sastav aragonitnog dijela ljušture, i pritom su usmjereni na organski matriks (Cuif i sur., 1985; Marin i sur., 2000; Marin i Luquet, 2004; Marin i sur., 2011). Ovakvim odabirom su obuhvaćene dvije krajnosti struktura školjkaša (primitivna i "moderna") koje će biti komparirane sa strukturom još jednog, evolucijski naprednijeg mekušca.

Radi se o običnoj sipi, *Sepia officinalis*. Iako ona nije sesilni organizam i po tome odudara od ostalih, njena biomineralna struktura je izgrađena od aragonita, a posebna je po tome što je jedna od rijetkih morskih beskralješnjaka koji imaju unutarnji skelet s posebnom funkcijom –

regulacijom plovnosti (Denton i Gilpin-Brown, 1961a). Njena struktura je visokokompleksna i striktno prilagođena funkciji, visoko porozna i istovremeno otporna na hidrostatske pritiske (Gutowska i sur., 2010). Zbog toga je i izrazito interesantan biomineral za biomimetička istraživanja, te se u literaturi najčešće susreću radovi gdje sipovinu konvertiraju u hidroksiapatit (Cadman i sur., 2009; Cadman i sur., 2010; Cadman i sur., 2012; Cadman i sur., 2013). Iako postoji nekolicina radova koji obrađuju tematiku njene biomineralne građe (Florek i sur., 2009; Jia i sur., 2009; Subramanyam, 2007), oni su fokusirani samo na jedan dio strukture ili sastava te ne obrađuju sipovinu kao cjelinu. S obzirom da sipovina ima najveći potencijal uporabe u biomimeticima, jedinstven endoskelet s vrlo preciznom strukturiranosti, ona će biti i najdetaljnije karakterizirana u ovom istraživanju.



## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

---

Cilj istraživanja je detaljno opisati morfološke i strukturne značajke složene biomineralne strukture aragonita kod obične sipe (*Sepia officinalis*) i kunjke (*Arca noae*) te biokemijske značajke njihovih topivih proteinskih frakcija. Dobiveni rezultati će biti uspoređeni s prethodno proučenim biomineralima periske (*Pinna nobilis*) i kamenog koralja (*Cladocora caespitosa*), uz dodatnu karakterizaciju pojedinih uzoraka po potrebi. Osim prema sistematici, ove vrste su odabrane i prema brzini biomineralizacijskih procesa, te tako koralj i kunjka spadaju u spororastuće vrste sa godišnjim rastom od svega par centimetara, dok su periska i sipa brzorastuće jedinke koje mogu narasti i do 15 cm u prvoj godini. Istraživanje je ovako koncipirano s ciljem da pruži dodatnu potvrdu raširenosti osnovne hipoteze koja tvrdi da su temelj formiranja i razvoja složenih biomineralnih struktura aragonita morskih beskralješnjaka upravo agregacijski procesi na nanoskali, uvjetovani vrstom organizma i biokemijskim značajkama organskog matriksa, s naglaskom na proteinskoj frakciji.

Usporedbom razvijenijih biomineralnih struktura s evolucijski manje specijaliziranim jedinkama dodatno će se karakterizirati i načini prilagodbe ovih biominerala pojedinim fiziološkim ulogama. Istraživanje će time doprinijeti boljem razumijevanju procesa početnog rasta i razvoja složenih biomineralnih struktura aragonita i njegovog utjecaja na morfološke značajke formiranih biominerala. Cilj istraživanja je i povećanje osnovnog znanja koje definira razvoj novih metoda biomimetičkih načina pripreme samoorganizirajućih biomineralnih struktura aragonita željenih morfoloških i strukturnih značajki.

### **3. Materijali i metode istraživanja**



## 3.1. MATERIJALI

### 3.1.1. POPIS KEMIKALIJA

1.  $\alpha$ -cijano-4-hidroksi cimetna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
2. Aceton (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
3. Acetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
4. Agaroz (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
5. Akrilamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
6. Amonijev bikarbonat (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
7. Amonijev peroksodisulfat (APS, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
8.  $\beta$ -merkptoetanol (Fluka, Sigma- Aldrich, St. Louis, SAD)
9. Bio-Rad Protein Assay otopina (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD)
10. Bis - akrilamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
11. Bromfenol plavilo (Fischer Scientific, New Jersey, SAD)
12. CHAPS (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD)
13. Coomassie brilijant plavo, R 250 i G250 (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD)
14. Deuterijev oksid ( $D_2O$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
15. Ditiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
16. Etanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
17. Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
18. Glicerol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
19. Glicin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
20. Jodacetamid (IAA; Kemika, Zagreb, Hrvatska)
21. Klorovodična kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
22. Metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
23. Natrijev azid ( $NaN_3$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
24. Natrijev laurilsulfat (SDS, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
25. Natrijeva lužina (NaOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska)

26. Octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska)
27. Pokrovno ulje Immobiline Drystrip cover fluid (GE Healthcare, Freiburg, Germany)
28. Tetrametilendiamin (TEMED, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
29. Tiourea (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
30. Trifluorooctena kiselina (TFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
31. Tris pufer (Sigma – Aldrich, St. Louis, SAD)
32. Vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska)
33. Ultračista klorovodična kiselina (HCl, Merck, Darmstadt, Njemačka)
34. Urea (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

#### **3.1.2. KOMERCIJALNI STANDARDI**

1. Albumin goveđeg seruma (BSA; Serva, Heidelberg, Njemačka)
2. Smjesa proteina niskih molekulskih masa od 14,4 do 97,0 kDa kao standard molekulske mase pri analizi proteina (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Velika Britanija)
3. Multielementna standardna otopina za HR ICP-MS, CZ 9090 mix 010 (Analytika, Prague, Czech Republic).

#### **3.1.3. MATERIJAL ZA PROČIŠĆAVANJE I ANALIZU PROTEINA**

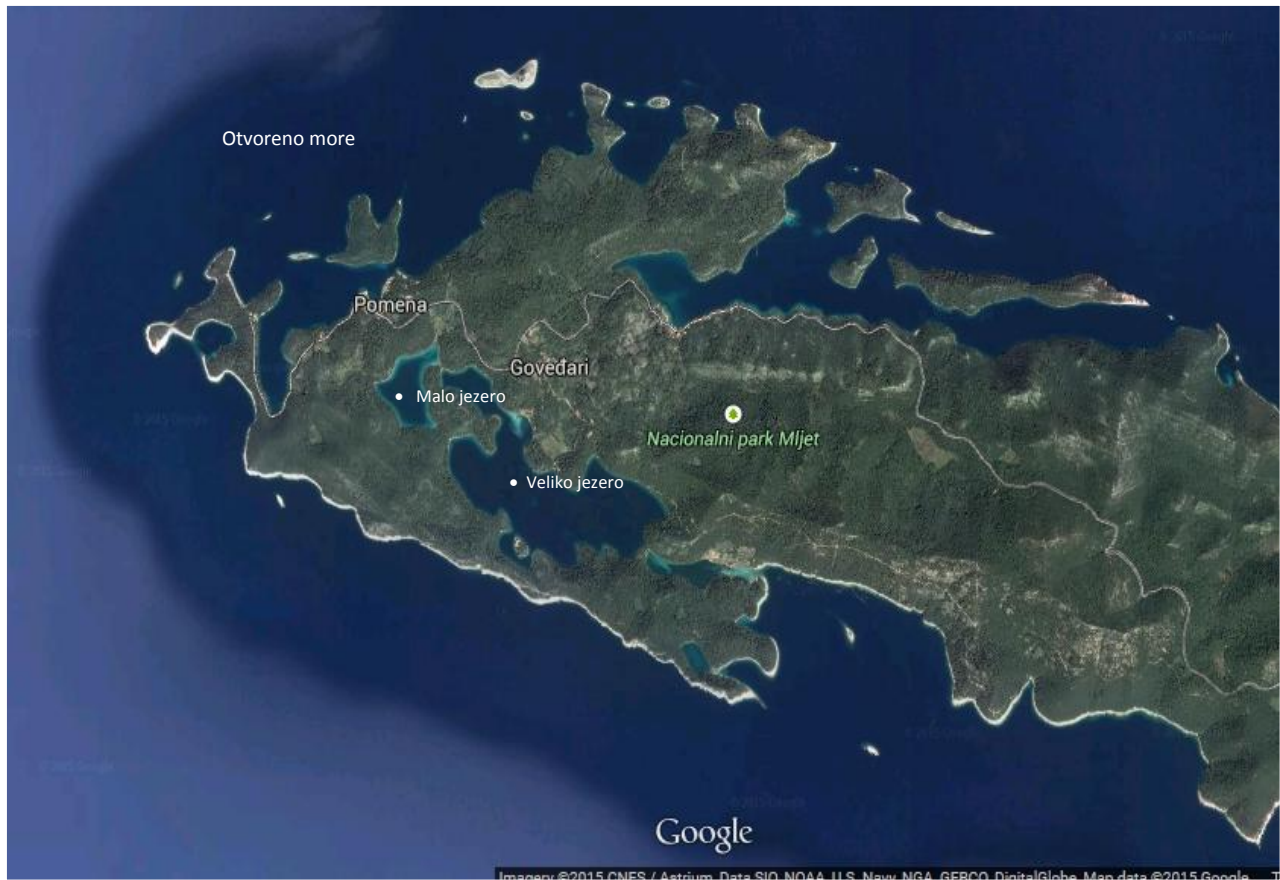
1. Celulozne membrane za dijalizu 12-14 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
2. Kolone PD10 Sephadex G-25 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
3. Immobilized pH gradient (IPG) trake ReadyStrip<sup>tm</sup> pH 3-10NL, 18 cm (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD)
4. PVDF membrana (Sequi-Blot PVDF Bio-Rad membrane ili IMMOBILON PSQ Millipore)
5. ACQUITY UPLC kolona za peptide, BEH C18, 300Å, 1.7 μm, 15 cm (Waters, MA, SAD)
6. Endoproteinaza Lys-C iz *Lyso bacter enzymogenes* (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
7. Trypsin (Promega, WI, SAD)

#### 3.1.4. UZORCI

Uz dozvolu uprave Nacionalnog parka Mljet, organizmi od interesa (Tablica 1) su prikupljeni u Velikom i Malom jezeru na području Nacionalnog parka Mljet (Slika 8). Odmah po prikupljanju uzorci su živi smrznuti kako bi se što više očuvali u prvotnom stanju. Odmrznuti su neposredno prije obrade, a biomineralne strukture su odvojene od ostatka tkiva, mehanički očišćene i višestruko isprane s deioniziranom vodom.

Tablica 1. Vrsta organizama, oznake njihovih biomineralnih struktura te mjesta uzorkovanja organizama korištenih u istraživanju

<b>Organizam</b>	<b>Biomineral</b>	<b>Oznaka</b>	<b>Lokacija uzorkovanja</b>
<b>Kunjka (<i>Arca noae</i>)</b>	Ljuštura školjke	AN	Veliko jezero
<b>Periska (<i>Pinna nobilis</i>)</b>	Ljuštura školjke	PN	Veliko jezero
<b>Kameni koralj (<i>Cladocora caespitosa</i>)</b>	Skelet koralja	CC	Veliko jezero
<b>Obična sipa (<i>Sepia officinalis</i>)</b>	Cijela sipovina	SO	Otvoreno more
	Vanjski konus	K	
	Lamele	L	
	Dorzalni štit	DS	



**Slika 8**

Lokaliteti uzorkovanja, Nacionalni park Mljet u Dubrovačko – Neretvanskoj županiji. Izvor slike:

Google maps, URL: <http://goo.gl/H5waab>

## 3.2. METODE ODREĐIVANJA MINERALOŠKIH, STRUKTURNIH I MORFOLOŠKIH ZNAČAJKI BIOMINERALNIH STRUKTURA

### 3.2.1. RENDGENSKA DIFRAKCIJA NA PRAHU I NATIVNIM (ORIJENTIRANIM) UZORCIMA BIOMINERALNIH STRUKTURA

Mineraloški sastav uzoraka je određen metodom rendgenske difrakcije na prahu (XRD). Uzorci su pripremljeni mljevenjem u fini prah pomoću visokoenergetskog kugličnog mlina Pulverisette 7 (Fritsch, Njemačka). Pojedini uzorci su snimljeni u nativnom obliku kako bi se ispitala preferentna orijentacija njihovih mineralnih struktura. Korišten je rendgenski difraktometar D4 Endeavor (Bruker AXS, Njemačka), s  $\text{CuK}\alpha$  radijacijom te Sol-X energijsko disperzivnim detektorom (Bruker AXS, Njemačka). Prilikom snimanja korišten je korak od 0,02 stupnja s vremenom snimanja od 5 sekundi. Za određivanje minerala aragonita su korištene dvije JCPDS kartice: br. 47-1743 za kalcit te br. 41-1475 za aragonit.

### 3.2.2. TERMOGRAVIMETRIJSKA ANALIZA I DIFERENCIJALNA SKENIRAJUĆA KALORIMetriJA

Termogravimetrijska analiza (TGA) je korištena u kombinaciji s diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) kako bi se procijenila količina organske tvari u uzorku, termalna stabilnost i fazne transformacije te način termalne razgradnje biomineralnih struktura.

Korišten je uređaj Netzsch STA 449 Jupiter thermal analyzer, simultani termoanalitički instrument opskrbljen masenim spektrometrom – MS (QMS 403 C Aëoloss quadripole, Netzsch, SAD). Analiza se provodila na zraku zagrijavanjem uzorka na 1000°C s brzinom zagrijavanja od 10°C/min.



#### **3.2.3. PRETRAŽNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA S EMISIJOM POLJA I ENERGIJSKI RAZLUČUJUĆA/DISPERZIVNA RENDGENSKA ANALIZA**

Morfološke i strukturne značajke površina biomineralnih struktura na mikronskoj i submikronskoj skali analizirane su uporabom pretražnog elektronskog mikroskopa s emisijom polja (eng. *Field-Emission Scanning Electron Microscopy*, FESEM; Zeiss Supra 35 VP, Njemačka). Mikroskop je opremljen spektrometrom za energijski razlučujuću/disperzivnu rendgensku analizu (eng. *Energy-Dispersive X-Ray Spectrometer*, EDXS; Inca 400, Oxford instruments, UK).

#### **3.2.4. AFM SUSTAV ZA MIKROSKOPIJU ATOMSKIH SILA**

Morfološke značajke površine uzoraka dodatno su analizirane mikroskopom atomskih sila Multimode Scanning Probe Microscope (MM-SPM, Bruker, Billerica, SAD) s Nanoscope IIIa kontrolnom jedinicom (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA). Korišteno je piezoelektrično pretraživalo s vertikalnom spregom: AS-130V ("J" pretraživalo), lateralnog raspona 125  $\mu\text{m}$   $\times$  125  $\mu\text{m}$  i vertikalnog raspona od 5  $\mu\text{m}$ . Ovaj AFM instrument ima mogućnost snimanja u kontaktnom i tapkajućem modu. U kontaktnom režimu rada korištene su pretražne probe od silicijevog nitrida,  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (eng. *Silicon nitride, SN-tips* OEC8-10, Bruker, Billerica, UDA nominalna frekvencija 50-90 kHz, nominalna konstanta opruge 0,73 N/m) u ambijentalnim uvjetima na zraku. Stopa linearnog skeniranja je optimizirana između 1 i 2 Hz po liniji sa rezolucijom skeniranja od 512 uzoraka. Prilikom oslikavanja u kontaktnom režimu rada na jednom kanalu se generirala topografska slika (eng. *height image*), dok se na drugom kanalu generirala slika odstupanja otklona poluge (eng. *deflection image*).

U tapkajućem režimu rada korištene su pretražne probe od silicija dopiranog s antimonom (TESP, Veeco, nominalna frekvencija 320 kHz, nominalna konstanta poluge 42 N/m) u ambijentalnim uvjetima na zraku. Linearna brzina skeniranja optimizirana je između 1 i 2 Hz po liniji s razlučivanjem od 512 točaka po liniji. Prilikom oslikavanja u tapkajućem režimu rada na jednom kanalu se generirala topografska slika, dok se na drugom kanalu generirala slika promjene amplitude (eng. *amplitude image*). Za dodatnu modifikaciju i poboljšanje prethodno

snimljenih topografija upotrijebljeni su programi NanoScope™ v. 6.14R1 (Bruker, Billerica SAD) i Gwyddion 2.39 (<http://gwyddion.net/>). Pri izradi kompjutorski generiranih modela temeljenih na AFM podacima korišten je program Blender 2.73a (<http://www.blender.org/>).

#### **3.2.5. MASENA SPEKTROMetriJA VIsoKE RAZLUčIVOSTI S INDUKTIVNO SPREGNUTOM PLAZMOM**

Sadržaj natrija, magnezija, cinka, kadmija, željeza, mangana, stroncija i barija u biomineralnim strukturama određen je metodom masene spektrometrije visoke razlučivosti s induktivno spregnutom plazmom (eng. *Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, HR ICP-MS; Element 2, Thermo Finnigan, Germany). Prije analize uzorci su detaljno mehanički očišćeni i isprani u deioniziranoj vodi te osušeni na zraku preko noći. Skelet koralja (CC) i ljuštura kunjke (AN) su tretirani kao jedan uzorak. Kod periske (PN) analiziran je unutarnji, aragonitni dio ljušture, a sipovina sipe je podijeljena na dorzalni štit (DS) te lamelarni dio (L). Uzorci su usitnjeni i uronjeni na četiri sata u 20 %-tnu otopinu vodikovog peroksida. Nakon toga su ponovno dobro isprani, osušeni i smrvljeni u prah. Od svakog uzorka odvojen je 0,1 g i tretiran je s koncentriranom ultračistom klorovodičnom kiselinom, HCl (Merck, Darmstadt, Njemačka) u omjeru 0,05g uzorka na 1 mL kiseline. Takve otopine su kratko stavljene u ultrazvučnu kupelj na usitnjavanje, te su dodatno razrijeđene s deioniziranom vodom (Milli-Q voda) kako bi se postigli optimalni koncentracijski nivoi za HR ICP-MS mjerenja. Vanjska kalibracija je korištena za kvantifikaciju sa standardima (0,1- 10 µg/L), pripremljena prikladnim otapanjem multielementne standardne otopine CZ9090.

### 3.3. METODE ODREĐIVANJA BIOKEMIJSKIH ZNAČAJKI UZORAKA

#### 3.3.1. IZOLACIJA I PROČIŠĆAVANJE PROTEINA ORGANSKOG MATRIKSA IZ BIOMINERALNIH STRUKTURA

Za izolaciju topivih proteina organskog matriksa minimalna masa pojedinog uzorka sipovine i ljušture kunjke iznosila je 20 g, a gdje je bilo moguće, korištene su i dvostruko veće količine. Nakon mehaničkog čišćenja, uzorci su uronjeni u 5 % natrijevoj lužini (NaOH) preko noći na 4°C kako bi se otklonile sve vanjske nečistoće, te nakon ponovnog mehaničkog čišćenja i detaljnog ispiranja deioniziranom vodom uzorci su izvagani i smrvljeni u prah.

Dobiveni prah je otapan u 10 %-tnoj otopini hladne octene kiseline (CH<sub>3</sub>COOH) na 4°C, a pH te otopine je reguliran dodatkom iste kiseline dok se nije ustalio na pH 4 (preko noći) prema prilagođenom protokolu Marie i suradnika (2009). Na svakih 100 mL ove otopine dodan je i 1 mL 1 M natrijevog azida (NaN<sub>3</sub>) kako bi se spriječilo moguće zagađenje bakterijama, te 1 mL 100 mM otopine fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF) kako bi se inaktivirale potencijalno prisutne peptidaze. Zatim je otopina kratko centrifugirana (5000 g, u trajanju 10 minuta pri 4°C) da se topivi organski matriks odvoji od taloga. Isti postupak je proveden na uzorcima sipovine i uporabom razrijeđene otopine klorovodične kiseline (HCl-a) uz dodatak NaN<sub>3</sub> i PMSF-a, prema protokolu Sondi i suradnika (2011a). Metoda je bila jednako učinkovita, ali s octenom kiselinom su promijene bile blaže i ujednačenije te je ona bila preferirana kiselina za uporabu.

Nadtalog (koji sadrži topivi organski matriks) je potrebno dijalizirati da bi se uklonila ostatna kiselina. Nadtalog je stoga premješten u membrane za dijalizu (pora 12-14 kDa) i dijaliziran u dvolitrenoj menzuri uporabom 10 mM Tris - HCl pufera (pH 8). Dijaliza je provedena pri temperaturi od 4°C u trajanju od 4 dana s 10 izmjena pufera. Nakon dijalize uzorak je još jednom centrifugiran (7000 g, u trajanju od 60 minuta pri 4°C), te su uzorci smrznuti i liofilizirani koristeći instrument FreeZone 2,5 (Labconco, SAD). Liofilizirani uzorci su otopljeni u 10 mM Tris-HCl puferu (pH 8) do ukupnog volumena od 2,5 mL i centrifugirani (15000 g u trajanju od 15 minuta pri 4°C) kako bi se uklonili mogući netopivi dijelovi.

Uzorci su potom bili pročišćeni (odsoljeni) kromatografskom metodom gel filtracije na kolonama PD10 Sephadex G-25 prema uputama proizvođača. Gel filtracijom se molekule odvajaju na osnovi veličine čestica te se na taj način molekule proteina uspješno separiraju od malih molekula (manjih od 5 kDa). Ukratko, kolona je prije upotrebe isprana vodom i ekvilibrirana u puferu (10 mM Tris-HCl, pH 8,0). Kroz kolonu je potom propušteno 2,5 mL uzorka, te 3,5 mL pufera s kojim su eluirani proteini u uzorku. Nakon ponovnog dodavanja po 3,5 mL pufera u kolonu, eluirane su i preostale male molekule (soli). Kolona je isprana s 20 mL pufera i pohranjena u 20 % etilnom alkoholu u hladnjaku do slijedećeg korištenja.

#### **3.3.2. MJERENJE KONCENTRACIJE PROTEINA**

Za određivanje koncentracije proteina pročišćenih kromatografijom korištena je kolorimetrijska metoda prema Bradford-u (Bradford, 1976). Mjerenje se zasniva na svojstvu promijene boje otopine Coomassie brilijant plavo (eng. *Coomassie Brilliant Blue*) prilikom vezanja na bazične i aromatske aminokiseline u proteinima. Ovisno o proteinskom uzorku, korišteno je od 5-20  $\mu$ l uzorka koji je razrijeđen s deioniziranom vodom do 100  $\mu$ l ukupnog volumena, te je toj smjesi dodana komercijalna otopina Bio-Rad Protein Assay (1 mL). Nakon kratkog miješanja na Vortex miješalici, uzorci su inkubirani 45 minuta pri sobnoj temperaturi, te su izmjerene njihove apsorbancije na valnoj duljini 595 nm korištenjem spektrofotometra CamSpec M-501 (Cambridge, Engleska). Koncentracija proteina je potom određena korištenjem standardne baždarne krivulje (prethodno pripremljene sa serijom poznatih koncentracija goveđeg serumskog albumina, BSA).

#### **3.3.3. DISKONTINUIRANA SDS- POLIAKRILAMID GEL ELEKTROFOREZA**

Elektroforeza označava gibanje čestica u električnom polju, a elektroforetska pokretljivost proteina ovisi o omjeru naboja i mase (što je omjer viši, pokretljivost je bolja). Poliakrilamid gel elektroforeza u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE) se temelji na dodavanju anionskog deterdženta natrij laurilsulfata (SDS; omjer 1,4 g SDS-a na 1 g proteina) u smjesu proteina koji se zbog toga denaturiraju i poprimaju negativan naboj te se zato mogu razdvajati samo prema

### 3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

molekularnoj masi (Balen i sur., 2011). Diskontinuirana elektroforeza omogućuje bolje razdvajanje proteina, a osniva se na upotrebi gelova različitih pH vrijednosti: donji (gel za razdvajanje) i gornji (gel za sabijanje). Razlika između ova dva gela je u puferiranju kroz dva sustava – gornji gel sadrži pufer koji ima pH 6,8, a pufer donjeg gela ima pH 8,8. Na ovaj način kada proteini prolaze kroz gornji gel oni se sabijaju, odnosno koncentriraju u usku prugu što rezultira boljim razdjeljivanjem tijekom njihovog prolaska kroz gel za razdvajanje. Korišteni su gelovi veličine 8,6 x 6,7 cm. Sastav gelova prikazan je u Tablici 2.

**Tablica 2.** Sastav gelova za diskontinuiranu SDS-PAGE.

<b>Gel za sabijanje (5 %)</b>	<b>Gel za razdvajanje (12,5 %)</b>
1,525 mL deionizirane H <sub>2</sub> O	1,675 mL deionizirane H <sub>2</sub> O
0,625 mL 0,5 M Tris-glicinski pufer pH 6,8	1,250 mL 1,5M Tris - glicinski pufer pH 8,8
0,330 mL 30 % akrilamid /Bis	2,000 mL 30 % akrilamid /Bis
0,025 mL 10 % SDS	0,050 mL 10 % SDS
0,025 mL 10 % APS	0,025 mL 10 % APS
0,0025 µL TEMED	0,0025 mL TEMED

Poliakrilamidni gel nastaje polimerizacijom monomera akrilamida u duge lance (dužina ovisi o koncentraciji) koji se isprepliću pomoću ugradnje molekule ko-monomera Bis-a (N, N' – metilen-bis-akrilamid) u tu strukturu. Reakcija je katalizirana dodatkom APS-a (amonij peroksodisulfata) i TEMED-a (N, N, N', N' – tetrametiletilendiamin) te se formira trodimenzionalna mreža. Učestalost unakrsnih veza između lanaca je određena koncentracijom Bis-a, koji zajedno s poliakrilamidom određuje fizikalna svojstva gela, a time i veličinu proteina koji se optimalno razdvajaju. Gelovi s nižim postotkom su bolji za razdvajanje proteina viših molekularnih masa i obrnuto. U ovom istraživanju korišteni su 12,5 %-tni gelovi što omogućava optimalno razdvajanje proteina molekularne mase od približno 10 do 80 kDa. Za pripremu gelova i provođenje elektroforeze korišten je uređaj za okomitu elektroforezu proteina (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD). Nakon izlivanja gela za razdvajanje (Tablica 2) nadslojen je s deioniziranom

vodom (za ravnanje gela) i ostavljen na sobnoj temperaturi kako bi gel polimerizirao. Nakon toga je voda uklonjena, a na površinu gela za razdvajanje je dodan gel za sabijanje (Tablica 2) u koji je uklopljen kalup za formiranje jažica (tzv. „češalj“). Nakon sat vremena gel je bio spreman za analizu proteina.

Prije elektroforetske analize proteini su denaturirani u puferu za nanošenje (0,062M Tris; pH 6,8; 10 % glicerol; 2 % (w/v) SDS; 0,05 %  $\beta$ -merkaptetoetanol; 0,05 % bromfenol plavo), te inkubirani 5 min na 95°C. Tako pripremljeni proteinski uzorci nanoseni su u jažice gela za sabijanje u količini maksimalno 20  $\mu$ l po jažici. Pri svakoj analizi korišteni su proteinski standardi (14,4 do 97,0 kDa). Elektroforeza se provodila u 1 $\times$  puferu za elektroforezu (25 mM Tris; 14,5 % (w/v) glicin; 10 % (w/v) SDS; pH 8,3) u trajanju od 1 sat pri 150 V (Laemmli, 1970).

#### **3.3.4. DVODIMENZIONALNA GEL ELEKTROFOREZA**

Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE) se koristi za detaljniju analizu složenih proteinskih smjesa kako bi se značajno povećala rezolucija razdvajanja proteina. Sastoji se od izoelektričnog fokusiranja (IEF) u kojem se proteini razdvajaju na temelju pH gradijenta, nakon čega slijedi razdvajanje proteina prema molekularnoj masi, već opisanim postupkom SDS-PAGE elektroforeze.

Izoelektrično fokusiranje se provodi na širokim imobiliziranim nosačima gradijenta pH (3-10 pH). Oni na sebi sadrže niskomolekularne amfoterne molekule (tj. amfolite bliskih pI vrijednosti za uspostavu stabilnog pH) u poliakriamidnom gelu. Bez električnog polja, amfoliti su nasumično raspoređeni u gelu, ali čim se polje uspostavi, amfoliti počinju putovati prema elektrodi, ovisno o naboju (kiseli se zaustave u blizini anode, ovisno o pH). Amfoliti imaju jaki puferski kapacitet što rezultira kontinuiranim gradijentom pH, s obzirom da je pH okolnog medija jednak pI vrijednosti svakog amfolita. Nanošenjem proteina na gel, oni migriraju električnim poljem od pozitivnog prema negativnom naboju, pritom otpuštajući ili primajući protone sve dok ne dosegnu svoju izoelektričnu točku (pI), odnosno pH vrijednost pri kojoj nemaju neto naboj te gube pokretljivost. Ovakvo koncentriranje proteina omogućava njihovo razdvajanje s obzirom na

vrlo male razlike u naboju. Da se izbjegne efekt sita, u IEF-u se koriste gelovi s nižom koncentracijom poliakrilamida (3-5 %).

Esencijalna stavka ove metode je dobra priprema uzorka, svedena na najjednostavniju moguću mjeru. Odsoljeni nadtalog svakog uzorka je dodatno ugušćen i pročišćen od malih ionskih molekula (nukleotida, metabolita, fosfolipida itd.) precipitacijom u barem dvostruko većem volumenu ledenog acetona na  $-20^{\circ}\text{C}$  u periodu od 2 sata uz povremeno okretanje. Nakon precipitacije otopina je kratko centrifugirana (15000 g, u trajanju od 10 minuta pri  $4^{\circ}\text{C}$ ), preostala tekućina je odlivena, a talog je osušen na sobnoj temperaturi. Za rehidraciju taloga i istovremenu potpunu denaturaciju proteina uzorci su otopljeni u 50 do 100  $\mu\text{L}$  pufera za rehidraciju (9 M urea; 4 % (w/v) CHAPS) u koji je nadodano 5,2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  smjese amfolita Bio Lyte 3/10, 2 mg/mL DTT te 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  bromfenol plavila.

Otopljeni uzorak je apliciran na sredinu keramičke podloge (kadica) i na njega je pažljivo položena IPG traka (imobilizirani pH gradijenti s intervalom od 3 do 10 pH, dužina 17 cm) tako da je strana na kojoj se nalazi gel okrenuta prema uzorku. Tako pripremljena podloga je prekrivena rehidracijskim puferom do ukupnog volumena od 300  $\mu\text{L}$  i poklopljena. Nakon 30 minuta početne inkubacije podloga je do vrha ispunjena uljem (Plusone Dry strip cover fluid) za sprječavanje kontaminacije i isušivanja uzorka. Uzorci su rehidrirani na sobnoj temperaturi u trajanju od 12 do 16 sati (preko noći) nakon čega su podvrgnuti izoelektričnom fokusiranju korištenjem Ettan IPFphore uređaja prema programu prikazanom u Tablici 3. Izoelektrično fokusiranje je trajalo dok napon nije dosegao 32 kVh (otprilike nakon 8 sati), nakon čega je pokrovno ulje uklonjeno, a IPG trake spremljene preko noći na  $-20^{\circ}\text{C}$  do izvođenja SDS-PAGE.

**Tablica 3.** Uvjeti izoelektričnog fokusiranja na uređaju Ettan IPGphore za analitičke gelove 2-DE, pH raspon 3-10.

Koraci	Napon (V)	Vrijeme (h)	Postignuti napon (kVh)
S1	500	1	0,5
S2	1000	1	1,0
S3	8000	8	32,0

Za razdvajanje proteina prema njihovoj molekularnoj masi (druga dimenzija) upotrijebljen je vertikalni sustav za elektroforezu PROTEAN II XL cell (Bio-Rad, SAD). Prethodno su pripremljeni 15 %-tni gelovi poliakrāmida veličine 15 x 15 cm (Tablica 4).

**Tablica 4.** Sastav SDS-poliakrilamid gela (15 %), veličine 15 x 15 cm.

15 % SDS-PAGE gel	Volumen (mL)
0,5 M Tris-glicinski pufer pH 8.8	27,5
30 % akrilamida /Bis	13,75
10 % SDS	0,55
Deionizirana voda	12,925
10 % APS	0,275
TEMED	0,0176

Prije druge faze 2-DE, IPG traka je temperirana na sobnoj temperaturi te je odrezana oko 1,5 cm sa svake strane da odgovara veličini gela. Tako pripremljena traka je položena u plastični žlijeb gdje se odvijala ekvilibracija, odnosno priprema za elektroforezu. Ekvilibracija se odvijala u dva koraka uporabom pufera za ekvilibraciju (6M urea; 50 mM Tris-Cl pH 8,8; 30 % glicerol; 20 % (w/v) SDS) koji denaturira i negativno nabija proteine u uzorku. U prvom koraku je u žlijeb sa IPG trakom dodana otopina DTT-a pripremljenog u puferu za ekvilibraciju (20 mg/ml) te su trake



inkubirane na tresilici (Kotterman 3042, Njemačka) u trajanju od 15 minuta. Nakon toga IPG trake su položene u čiste žljebove te su 15 min inkubirane u otopini IAA prethodno pripremljenoj u puferu za ekvibraciju (25 mg/mL), uz konstantno miješanje na tresilici.

Nakon postupka ekvibracije IPG trake su uronjene u čisti pufer za elektroforezu položene na vertikalni sustav za 2-DE elektroforezu, tako da pozitivna strana bude lijevo (po dogovoru). Na kvadratić Ethmann papira je nanoseno 7  $\mu$ L standarda molekulskih masa i papirić je položen na SDS gel, desno od IPG trake. Na to je nalivena 0,5 % otopina agaroze (125 mg agaroze; 25 mL elektrodnog pufera; 25  $\mu$ L brom fenol plavila) koja je uskoro polimerizirala i fiksirala gel.

Ovako pripremljen gel korišten je za elektroforezu koja se odvijala pri 100 V prvih 30 minuta te nakon toga je napon povećan na 220 V do kraja elektroforeze (otprilike 5 sati). Nakon elektroforeze gelovi su obojani standardnim postupkom sa Commasie brilliant blue bojilom i odbojani u toploj vodi. Marie i suradnici (2009) su naveli kako je reproducibilnost sa srebrnim bojanjem znatno lošija od commasie brilijant plavoga, što smo i potvrdili u preliminarnom istraživanju, te su zato svi gelovi bojani isključivo Commasie brilliant blue bojilom.

#### **3.3.5. MASENA SPEKTROMetriJA – NANO LC - MS**

Pročišćeni ukupni proteini (pripremljeni na način opisan u 3.3.1.) analizirani su metodama spektrometrije masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI) i matricom potpomognutu ionizaciju uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI). Proteini u smjesi ispitani su određivanjem njihove molekulske mase (MALDI spektri) i na temelju fragmentiranja triptičkih peptida (ESI spektri) koji su prethodno generirani proteolitičkim cijepanjem svih proteina u smjesi i njihovom separacijom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (UPLC) prije uvođenja u spektrometar masa.

MALDI spektri intaktnih proteina snimljeni su na spektrometru masa s analizatorom vremena leta (TOF, Bruker microflex LT, Bremen Germany). Otopina izvornog uzorka je razrijeđena dodatkom ultra čiste vode (LC-MS Grade, J.T. Baker) do 1  $\mu$ M koncentracije ukupnog proteina. MALDI matrica je pripremljena otapanjem 3 mg  $\alpha$ -cijano-4-hidroksi cimetine kiseline (MW189.04 Da) u 1 mL 50/50 acetonitril (ACN)/0,1 % trifluorooctene kiseline (TFA). Uzorak za snimanje je pripremljen nanošenjem 1  $\mu$ L razrijeđene otopine proteina na MALDI pločicu i dodatkom 1  $\mu$ L

otopine MALDI matrice te je ostavljen na zraku da se potpuno osuši. Za desorpciju/ionizaciju uzorka korišten je dušikov laser valne duljine 337 nm. MALDI TOF spektar je dobiven kao prosječni spektar iz 100 pojedinačnih spektara snimljenih desorpcijom/ionizacijom iz različitih točaka na MALDI pločici s ciljem umanjenja efekta nehomogenosti uzorka.

Za proteolitičku razgradnju proteina u uzorku, kromatografsku separaciju nastalih peptida (NanoAcquity UPLC system, Waters) i njihovu fragmentaciju u spektrometru masa ionske stupice (LTQ-Orbitrap-XL, Thermo Fisher Scientific upotrijebljeno je oko 1-2 µg ukupnih proteina iz svih ispitanih uzoraka). Solubilizacija i denaturacija tih proteina su provedene dodatkom 9 µL denaturacijskog pufera (6M urea, 2 M tiorurea, 20mM Tris HCl, pH 8.0) na liofilizirani ostatak. Proteini su reducirani na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 sat, u 1 µL redukcijske otopine (10 mM DTT-a i 50 mM amonij bikarbonata) koja je u njih nadodana kako bi se u uzorcima postigla konačna koncentracija DTT –a od 1 mM. Nakon toga su proteini alkilirani u trajanju od 1 sat, u mraku, uz dodatak jodoacetamida (IAA, konačne koncentracije 5,5 mM).

U početnoj fazi proteolize korištena je rekombinantna endopeptidaza rLys-C (Promega), koja je aktivna i pri visokim koncentracijama uree. Prije dodatka enzima, pH otopine je prilagođen na 8 dodajući 1 µL pufera (1M Tris pH=8,0). Omjer enzim/proteinaza pri digestiji je bio 1:10. U svaki uzorak je nadodan 1 µL enzimatske stoke otopine (koncentracija otopine je bila 0,2 µg/µl) i zatim su uzorci inkubirani 3 sata na sobnoj temperaturi.

Prije dodatka tripsina (Promega) koncentracija uree je razrijeđena dodatkom volumena vode četiri puta većeg od volumena reakcijske otopine. Digestija proteina provedena je dodatkom tripsina u omjeru enzim:protein 1:10 uz konstantno miješanje pri sobnoj temperaturi preko noći. Reakcija digestije je prekinuta zakiseljavanjem uzoraka na pH 2,5 dodavanjem trifluorooctene kiseline (TFA), a reakcijska smjesa je inkubirana 10 min pri sobnoj temperaturi uz miješanje. U slučaju precipitacije da bi se uklonile krute čestice iz otopine uzorci su centrifugirani (14000 rpm, Eppendorf centrifuga 5427, u trajanju od 5 minuta) prije same LC-MS analize.

Kromatografska separacija peptida pri nanolitarskim protocima (nano-UPLC) je izvršena na ACQUITY UPLC koloni za peptide (BEH C18, 300Å, 1.7 µm, 15 cm). 1 µL smjese triptičkih peptida

je injektiran na kolonu u otapalu A koje predstavlja vodenu fazu pri UPLC separaciji (0,5 % octena kiselina) pri protoku od 500 nL/min i posljedično su eluirane kontinuiranim gradijentom otapala B (80 % acetonitril u 0,5 % octenoj kiselini) 5 % do 90 % u trajanju 87 minuta, pri protoku od 200 nL/min. Snimani su pozitivni ioni. Prikupljanje podataka je provedeno dinamički u tzv. „modu ovisnom o podacima“ (eng. *data-dependent*) koji uključuje naizmjenično snimanje MS spektara eluiranih peptida i konsektivno snimanje više fragmentacijskih MS/MS spektra iona peptida koji su detektirani u netom prije snimljenom MS spektru masa. Dinamički karakter ovog procesa se ogleda u tome da je nemoguće unaprijed zadati koje peptidne ione instrument treba fragmentirati već je potrebno u toku eksperimenta iz svakog snimljenog MS spektra sa kolone eluiranih peptida izabrati što veći broj neredundantnih kandidata za MS/MS fragmentiranje da bi se prikupio što potpuniji skup podataka za analizu. MS spektri su snimljeni u Orbitrap analizatoru masa pri rezoluciji od 60000 FWHM na  $m/z = 400$  Da, i u rasponu  $m/z$  vrijednosti od 300 do 2000 Da. Točnost mjerenja je osigurana uporabom internog kalibranta za rekaliibraciju u realnom vremenu tijekom snimanja svih spektara masa (Olsen i sur. 2005).

Deset najintenzivnijih iona je sekvencijalno izolirano i fragmentirano u analizatoru linearne ionske stupice koristeći kolizijom-induciranu disocijaciju (eng. *collision – induced dissociation*, CID). Ioni već odabrani za MS/MS fragmentaciju su dinamički isključeni u trajanju od 90 sekundi. Obrada sirovih (RAW) podataka je procesuirana s komercijalnim Mascot Distiller (Matrix Science) programom i rezultirajući MS/MS podatci su pretraženi pomoću Mascot servera i NCBI nr proteinske baze podataka (verzija 69, 07. siječanj 2015.) za proteinsku identifikaciju. Da se procijene lažno pozitivni rezultati, MS/MS spektri su pretraženi simultano i u lažnim bazama podataka u kojima su sve proteinske sekvence obrnute. Oksidacija (M) je odabrana kao varijabilna modifikacija.

#### **3.3.6. ANALIZA AMINOKISELINSKOG SLIJEDA PROTEINA METODOM EDMANOVE ODGRADNJE**

Nakon 2-DE gel elektroforeze, proteini su s gela preneseni na PDVF membranu kako bi se mogli podvrći daljnjoj analizi aminokiselinske sekvence metodom Edmanove odgradnje.

Prije prijenosa na membranu dijelovi gela s proteinskim mrljama od interesa su izrezani i tretirani u Towbinovom puferu za prijenos (25 mM Tris; 192 mM (w/v) glicin; 1 % (w/v) SDS; 20 % metanol; pH 8,3). Deset puta veća koncentracija SDS-a omogućila je uspješan prijenos proteina iz gela na PVDF membranu.

PVDF membrana dimenzija koje odgovaraju gelu je prije namakanja u puferu kondicionirana 10 minutnim namakanjem u metilnom alkoholu te ispirana u vodi (oboje uz konstantno gibanje na tresilici). Zatim su membrana, gel s proteinima, filter papir (Whatmann 3 MM) i spužvice inkubirani 5 do 15 minuta u puferu za prijenos. Za orijentaciju, i gel i membrana su zarezani u jednom od kutova sa skalpelom. Ovako tretirani materijal je slagan u plastični držač u obliku sendviča: na crni dio plastičnog držača je postavljena namočena spužvica, pa filter papir na koji je postavljen gel; na gel je pažljivo prenesena membrana, pa opet filter papir i spužvica. Valjanjem staklenog štapića po spužvici su istisnuti zaostali mjehurići koji bi mogli smetati pri prijenosu. Plastični držač je zatvoren i postavljen u kadicu za prijenos (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD), pazeći na položaj elektroda. U kadicu je stavljen i magnet za miješanje. Do vrha kadice je naliven Towbinov pufer i postavljen poklopac s izvorom struje. Prijenos proteina se odvijao pri sobnoj temperaturi, 3 sata na 40 V (300 mA), uz stalno lagano miješanje pufera.

Nakon završenog prijenosa, gelovi su fiksirani i obojani nekoliko minuta uranjanjem u bojilo Coomasie brilijant plavo R-250 uz odbojavanje u vrućoj deioniziranoj vodi. Gelovi su bojani da bismo provjerili uspješnost prijenosa. Membrane su dobro isprane s vodom te saturirane u metilnom alkoholu u trajanju od nekoliko sekundi. Bojane su bojom Coomasie brilijant plavo R250 u trajanju od 1-2 minute nakon čega su odbojavane u 50 %-tnoj otopini metanola, uz promjenu te otopine svake 2 minute. Nakon 2 x 5 min ispiranja u deioniziranoj vodi, komadići membrane s prenesenim proteinima su izrezani i nakon sušenja na zraku spremjeni na -20°C do daljnje analize filter papir (Whatmann 3 MM), spužvica.

Membrane s proteinima od interesa su poslone na sekvencioniranje automatiziranom Edmanovom odgradnjom. Sekvencioniranje je izvršeno pomoću Procise® 492A (Applied Biosystems, SAD) sekvencionirajućeg sistema u Institutu Jožef Stefan, Odjela za molekularne i biomedicinske znanosti u suradnji s prof dr.sc. Igorom Križajem prema ustaljenom protokolu (Kurtović i sur., 2014).

## **4. REZULTATI**

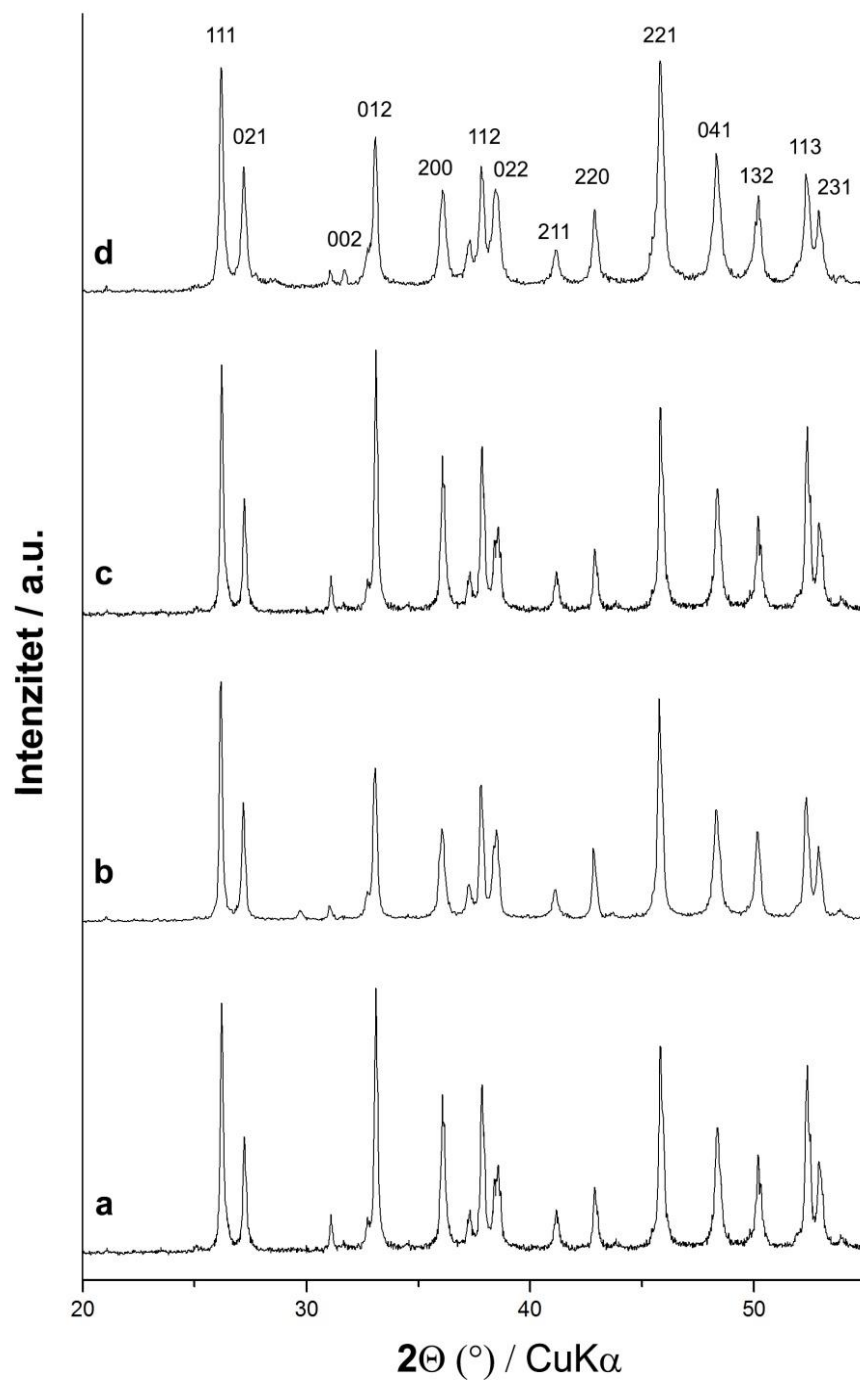
---

## 4.1. MORFOLOŠKE I STRUKTURNE ZNAČAJKE BIOMINERALNIH STRUKTURA MORSKIH BESKRALJEŠNJAKA

### 4.1.1. MINERALNI SASTAV BIOMINERALA MORSKIH BESKRALJEŠNJAKA

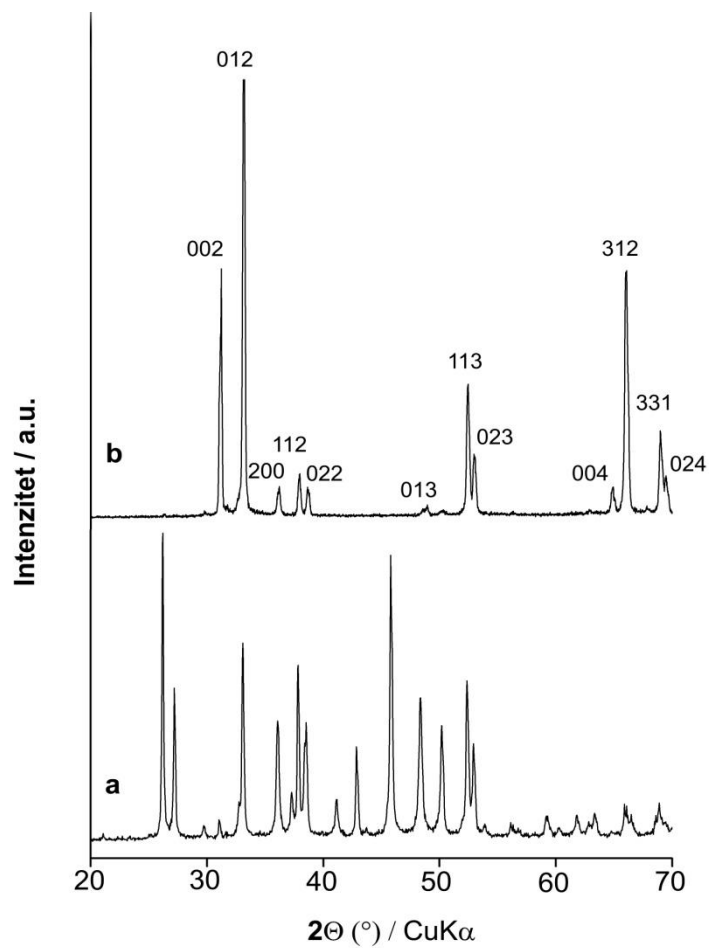
Mineralni sastav uzoraka određen je metodom rendgenske difrakcije na prahu. Analizirani su uzorci praha te orijentirani (nativni) uzorci biomineralnih struktura koralja *Cladocora caespitosa*, kunjke *Arca noae*, periske *Pinna nobilis* i sipe *Sepia officinalis*. Difraktogrami na slikama 9-11 pokazuju kako su svi uzorci izgrađeni od istog minerala, aragonita. Proširenje pikova difraktograma ukazuje da uzorci imaju granulirane čestice u svom sastavu.

U slučaju kunjke (Slika 10) i sipe (Slika 12) ne postoji značajna razlika između difraktograma praha i nativnih uzoraka, što se smatra karakteristikom polikristala. Međutim, kod periske difraktogram orijentirane strukture (Slika 11B) prikazuje izrazitu orijentiranost, karakterističnu za difraktograme monokristala. Struktura koralja je bila previše porozna za mjerenje rendgenske difrakcije nativnog koralita te je prikazana samo difrakcija praha tog uzorka.



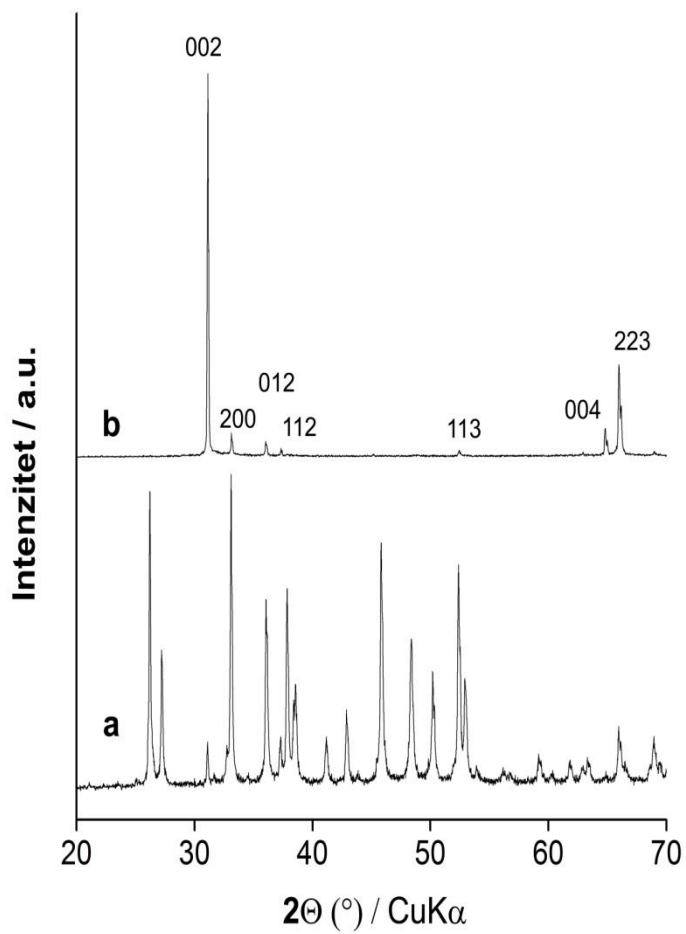
Slika 9

Rendgenske difrakcijske slike praha biomineralnih struktura koralja *Cladocora caespitosa* (a), kunjke *Arca noae* (b), periske *Pinna nobilis* (c) i sipe *Sepia officinalis* (d).

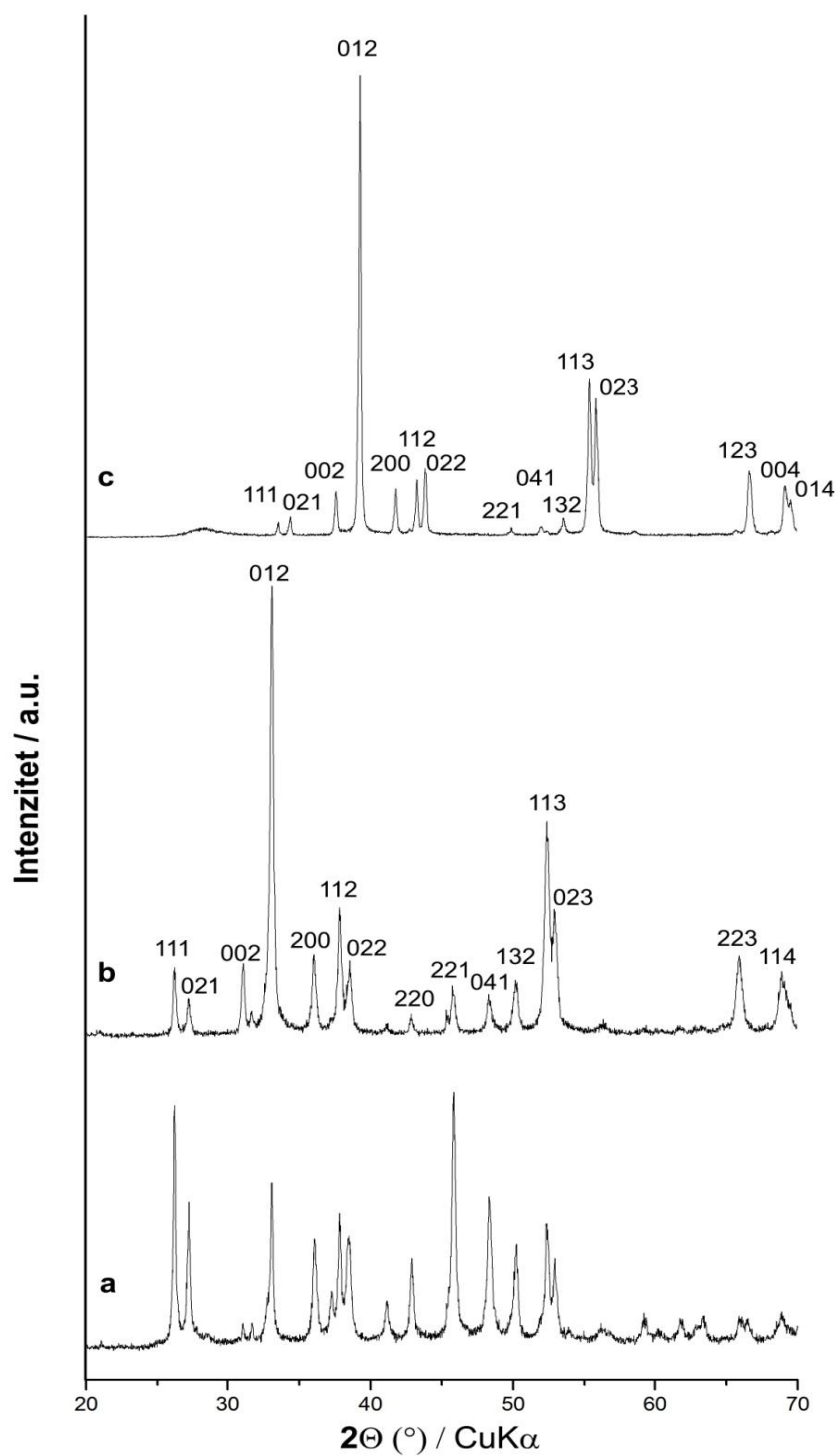
**Slika 10**

Rendgenske difrakcijske slike biomineralne strukture kunjke *Arca noae*: prah ljušture (a), orijentirani uzorak ljušture (b).



**Slika 11**

Rendgenske difrakcijske slike biomineralne strukture periske *Pinne nobilis*: prah ljuštore (a), orijentirani uzorak ljuštore (b).



Slika 12

Rendgenske difrakcijske slike biomineralne strukture sipe *Sepia officinalis*: prah dorzalnog štita (a), orijentirani uzorak dorzalnog štita (b), orijentirani uzorak lamelnog dijela sipovine (c).

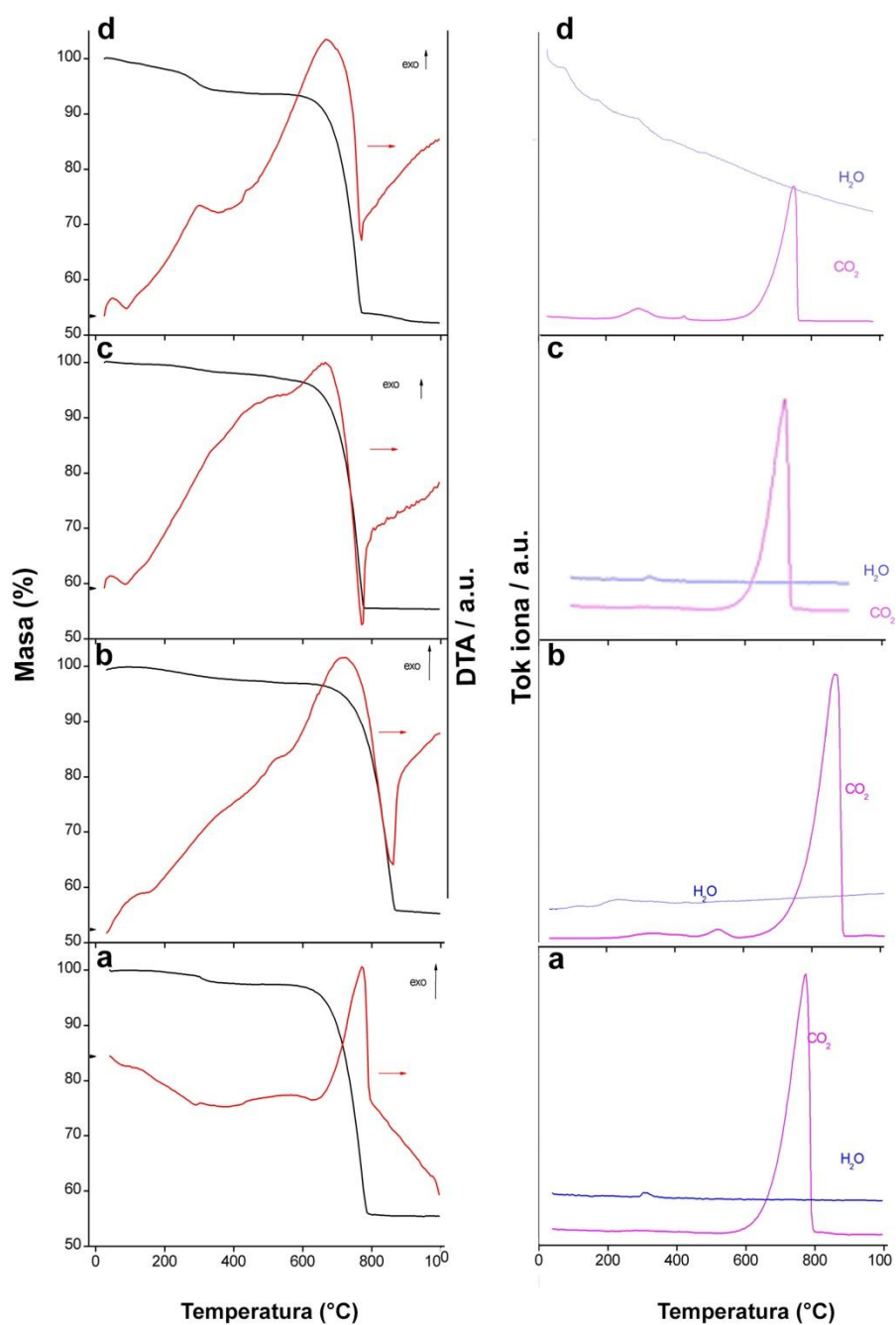
#### 4.1.2. TERMALNE ZNAČAJKE BIOMINERALNIH STRUKTURA MORSKIH BESKRALJEŠNJAKA

Na temelju termalnog raspada uzorka i posljedičnog gubitka mase termogravimetrijska analiza i diferencijalna termalna analiza s GC-MS masenom spektrometrijom omogućuje procjenu postotka organske tvari koja je ugrađena u biomineralnu strukturu. Prilikom zagrijavanja dolazi do kemijskih reakcija koje uzrokuju karakterističan otklon na krivuljama (Slika 13).

Prvi lokalni maksimum vidljiv na krivuljama oko 100°C je egzotermna reakcija uzrokovana evaporacijom vode. Drugi maksimum se javlja oko 300°C i on također spada u egzotermne reakcije uzrokovane degradacijom organskog matriksa (Florek i sur., 2009; Sarin i sur., 2011) te je popraćen sporim i stabilnim padom postotka mase. Završni raspad karbonatne strukture je vidljiv oko 800°C s velikim endotermnim pikom uočljivim na svim krivuljama.

Ovi podaci se podudaraju sa TIC (eng. *total ion current*) kromatogramima izmjerenim GC-MS uređajem, koji prikazuju koncentracije plinova (CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O) oslobođenih prilikom termalnog raspada uzoraka (Slika 13).

Analizom ukupnih podataka procjenjuje se da 2,5 % ukupne mase koralja, 2,5 % kunjke, 2 % periske i 6 % ukupne mase sipovine pripada organskom matriksu.



Slika 13

TG (crna linija) i DTA (crvena linija), (lijevi stupac) te TIC (II) krivulje (desni stupac) temperaturnog raspada biominerala koralja (a), kunjke (b), periske (c) i sipovine (d).

#### 4.1.3. ELEMENTNI SASTAV BIOMINERALNIH STRUKTURA MORSKIH BESKRALJEŠNJAKA

Elementni sastav biominerala koralja, kunjke, periske i sipe utvrđen je metodom masene spektrometrije visoke razlučivosti s induktivno spregnutom plazmom – HR ICP-MS. Rezultati mjerenja su prikazani u Tablici 5.

**Tablica 5.** Elementni sastav biominerala koralja *C. caespitosa*, kunjke *A. noae*, periske *P. nobilis* i sipe *S. officinalis*.

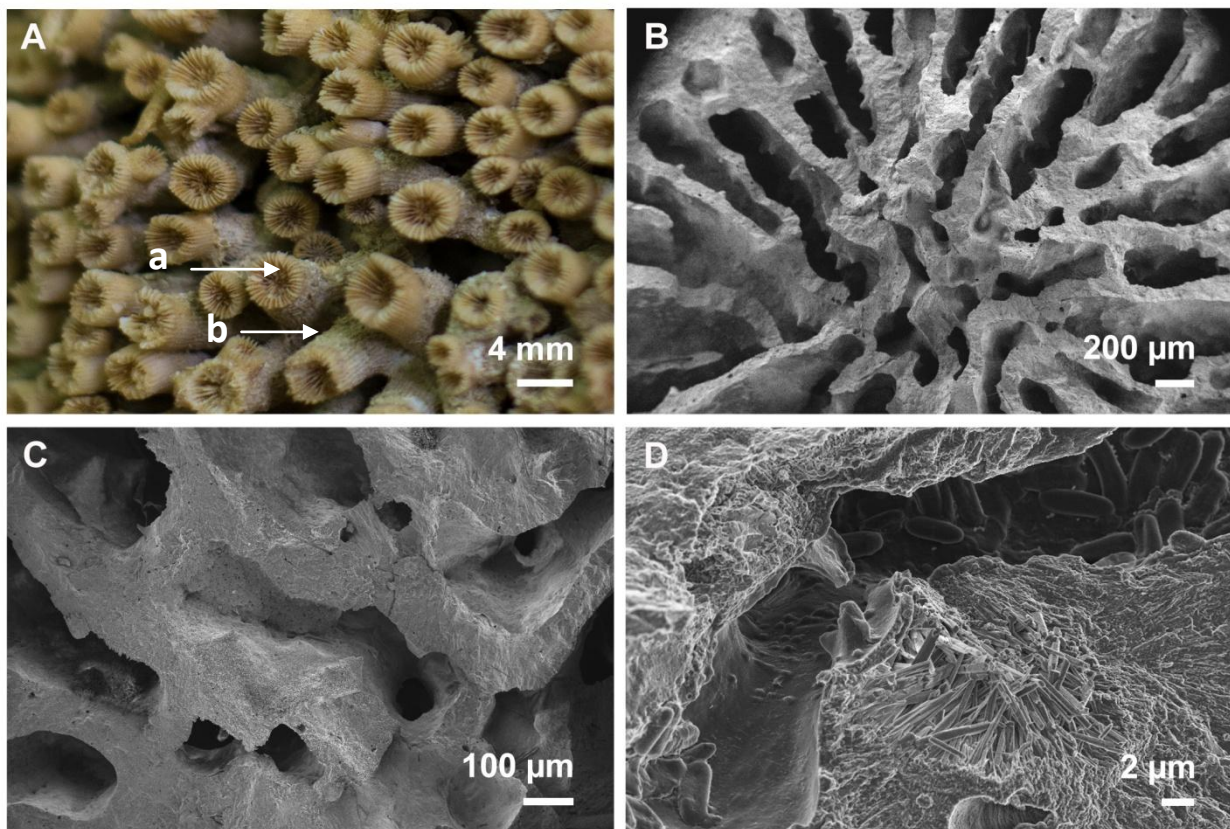
<b>Biomineral / Element</b>	<b>Mg</b> <b>( µg/g )</b>	<b>Mn</b> <b>( µg/g )</b>	<b>Fe</b> <b>( µg/g )</b>	<b>Zn</b> <b>( µg/g )</b>	<b>Sr</b> <b>( µg/g )</b>	<b>Ba</b> <b>( µg/g )</b>
<b>Skelet koralja</b>	828,62	3,42	11,30	2,11	9131,84	10,52
<b>Ljuštura kunjke</b>	406,29	3,79	13,26	0,31	2486,19	5,63
<b>Sedef periske</b>	222,45	16,22	7,09	0,75	1067,78	1,52
<b>Dorzalni štit sipovine</b>	225,98	2,49	12,91	24,19	2552,73	2,24
<b>Konus sipovine</b>	179,35	3,06	7,32	0,00	2689,86	2,38
<b>Lamele sipovine</b>	248,56	4,93	3,69	1,46	3563,22	10,76

Skelet koralja ima značajno više magnezija od ostalih ispitanih biominerala. Iako ima upola manje magnezija u svojoj strukturi, u ljušturi kunjke je zabilježena dvostruko veća koncentracija ovog elementa nego u sastavnicama biominerala ostalih školjkaša. Koncentracija mangana je stabilna osim kod sedefa periske koji ima sličnu koncentraciju mangana i u svojim prizmama (10,75 µg/g). Povećanje mangana je vidljivo i u konusu sipovine, koji je puno manje mineraliziran od dorzalnog štita. U sastavu ovih biominerala maksimalna koncentracija kadmija je iznosila 0,09 µg/g kod koralja, te kod ostalih uzoraka manje od 0,01 µg/g. Utvrđeno je da su stroncij i barij bogato zastupljeni u svim uzorcima. Visok sadržaj ova dva elementa je posebno vidljiv u skeletu koralja. Barij se također u velikim koncentracijama ugrađuje u lamele sipovine, ali ne i u ostale

dijelove, dok stroncij u lamelama manje odudara od ostatka sipovine, iako je i dalje povišen u odnosu na druge uzorke.

#### 4.1.4. MORFOLOŠKE ZNAČAJKE BIOMINERALNE STRUKTURE KORALJA

Kameni koralj, *Cladocora caespitosa* pokazuje tipičnu koraljnu strukturu koja se sastoji od niza aksijalnih koralita i njihovih pojedinih radijalnih grana koje čine osnovnu građevnu jedinicu koraljne kolonije (Slika 14A).



Slika 14

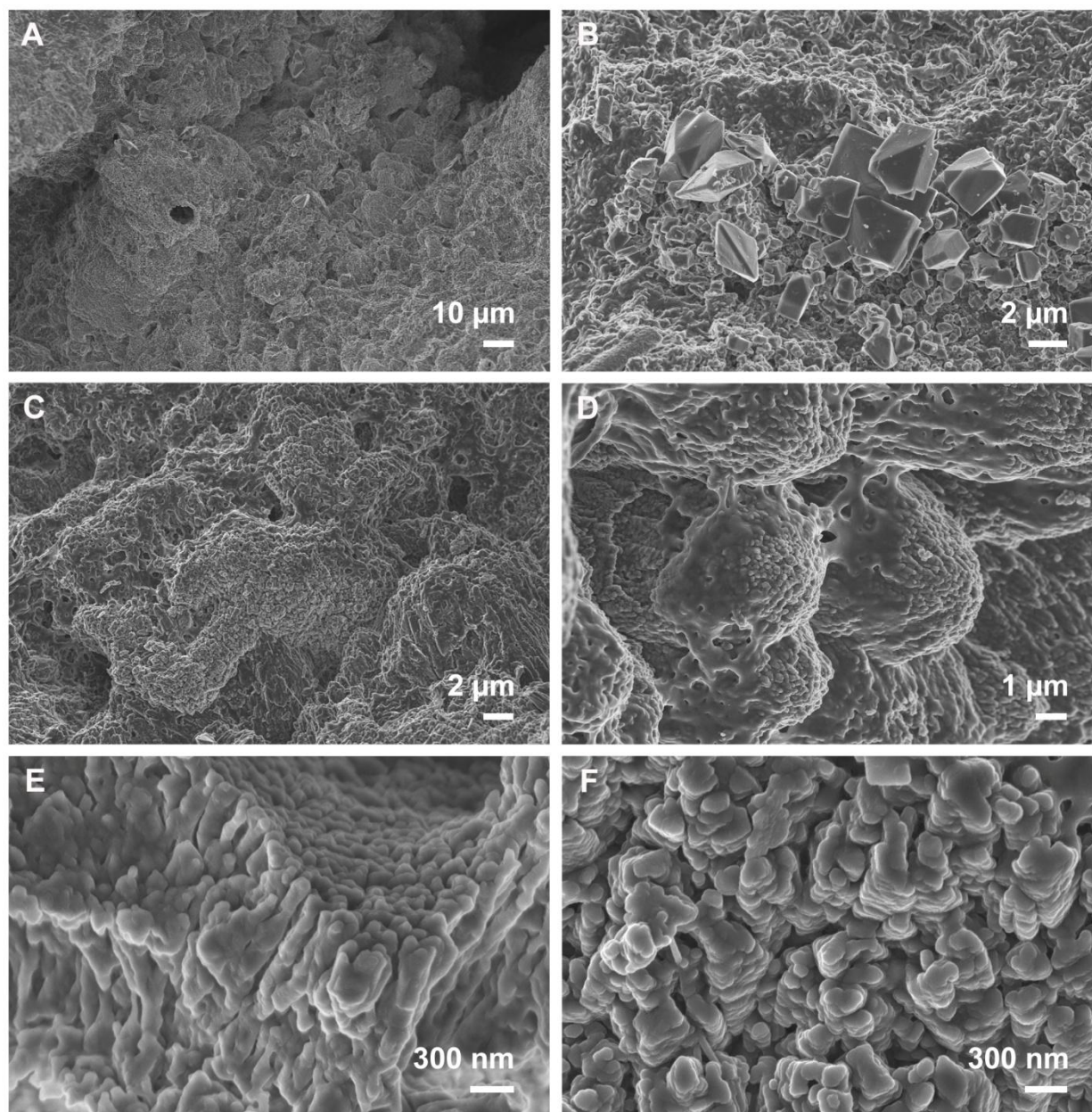
FESEM mikrofotografija općeg izgleda kamenog koralja *C. caespitosa* (A), poprečni presjek (B), nativna površina na aksijalnoj grani (C) i kanal koralita u kojem su naseljene bakterije (D).

Poprečni presjek koralita prikazuje radijalno poredane septe koje se centralno spajaju u kolumelu (Slika 14B), a izvana prelaze u rebra i daju karakterističan nazubljeni izgled vršnog dijela koralita.

Iako koraliti makroskopski djeluju kao kompaktne ponavljajuće jedinice, FESEM mikroskopijom je pokazano kako postoje dva različita tipa površina, ovisno o starosti koralita. Strelice na Slici 14 A prikazuju lokacije mjesta uzorkovanja struktura prikazanih na slikama 15 i 16. Na vršnom dijelu nativnog, nedavno formiranog koralita (oznaka a na Slici 14A) uočljiva su glatka vlakna koja predstavljaju karakteristične strukture koralita u rastu. Ona i dalje nemaju dobro definirane kristalografske forme, relativno su malih dimenzija, s osnovnim koraljnim vlaknom promjera oko 150 nm, i dužinom od 2-3  $\mu\text{m}$  (Slika 15). Mjestimično se kroz uzorak mogu pronaći i precipitirani kristaliti koji se morfološki mogu okarakterizirati kao kalcit (Slika 15B).

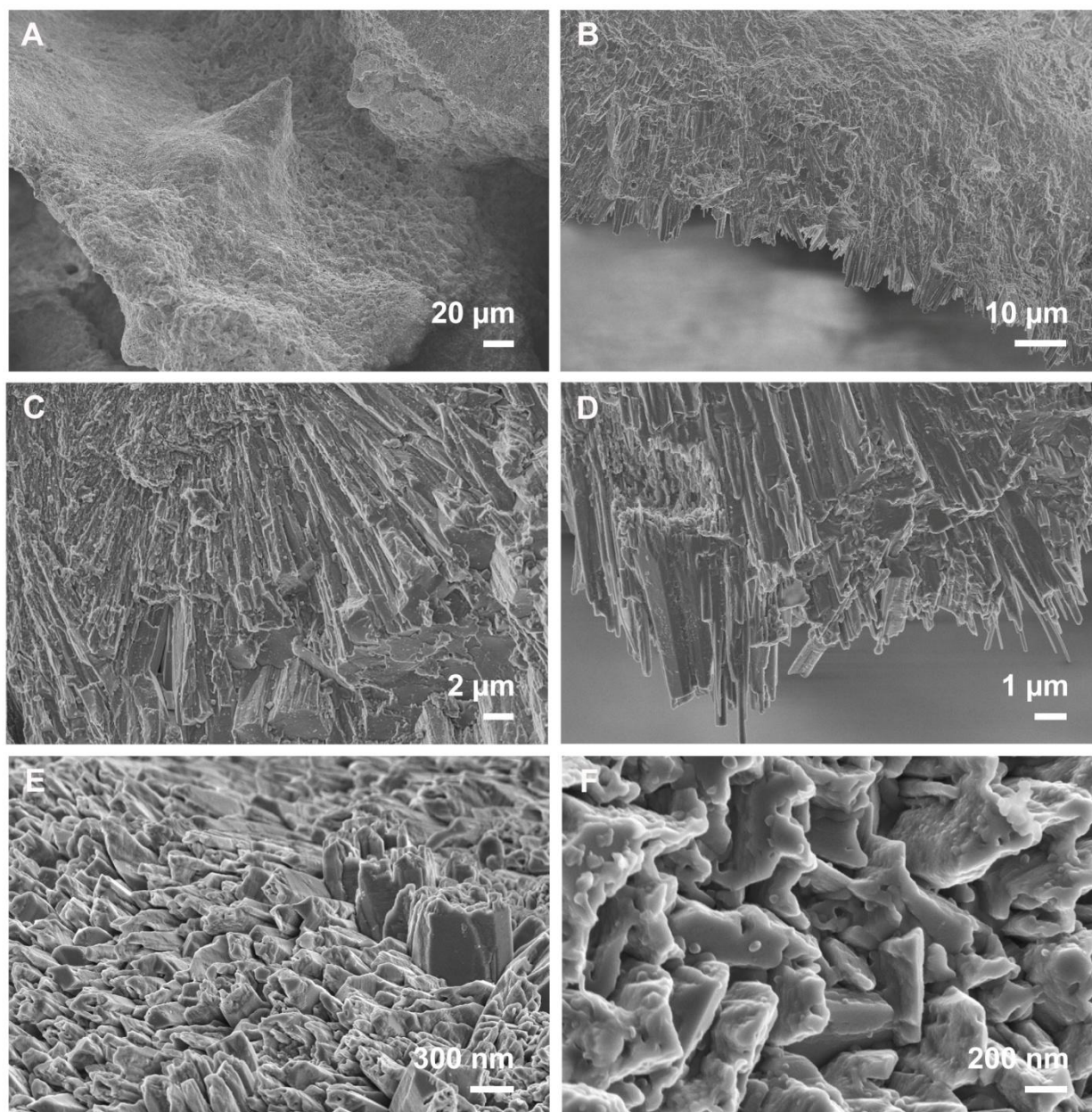
Slika 16 predstavlja stariji, formirani dio koralita (oznaka b na Slici 14A) i prikazuje kristalografski znatno bolje orijentirane forme s karakterističnim većim kristalitimima, poredanim u nakupine od 4-6  $\mu\text{m}$  duljine i 500 nm promjera. U svim dijelovima koralita bez obzira na starost izražen je rast aragonitnih minerala u smjeru c-osi uz agregaciju sitnih submikrometarskih čestica koje se vertikalno slažu i time formiraju substrukturu koralita.

Kroz oba dijela primijećena je i pojava tubula (Slike 15A,B i 16B,D) s vrlo diferenciranim bridovima i nasumičnim pojavljivanjem kroz uzorak. Osim tubula, površina nativnog uzorka je ispunjena žljebovima i utorima koji pružaju dodatno uporište životinji (Slika 15C,D).

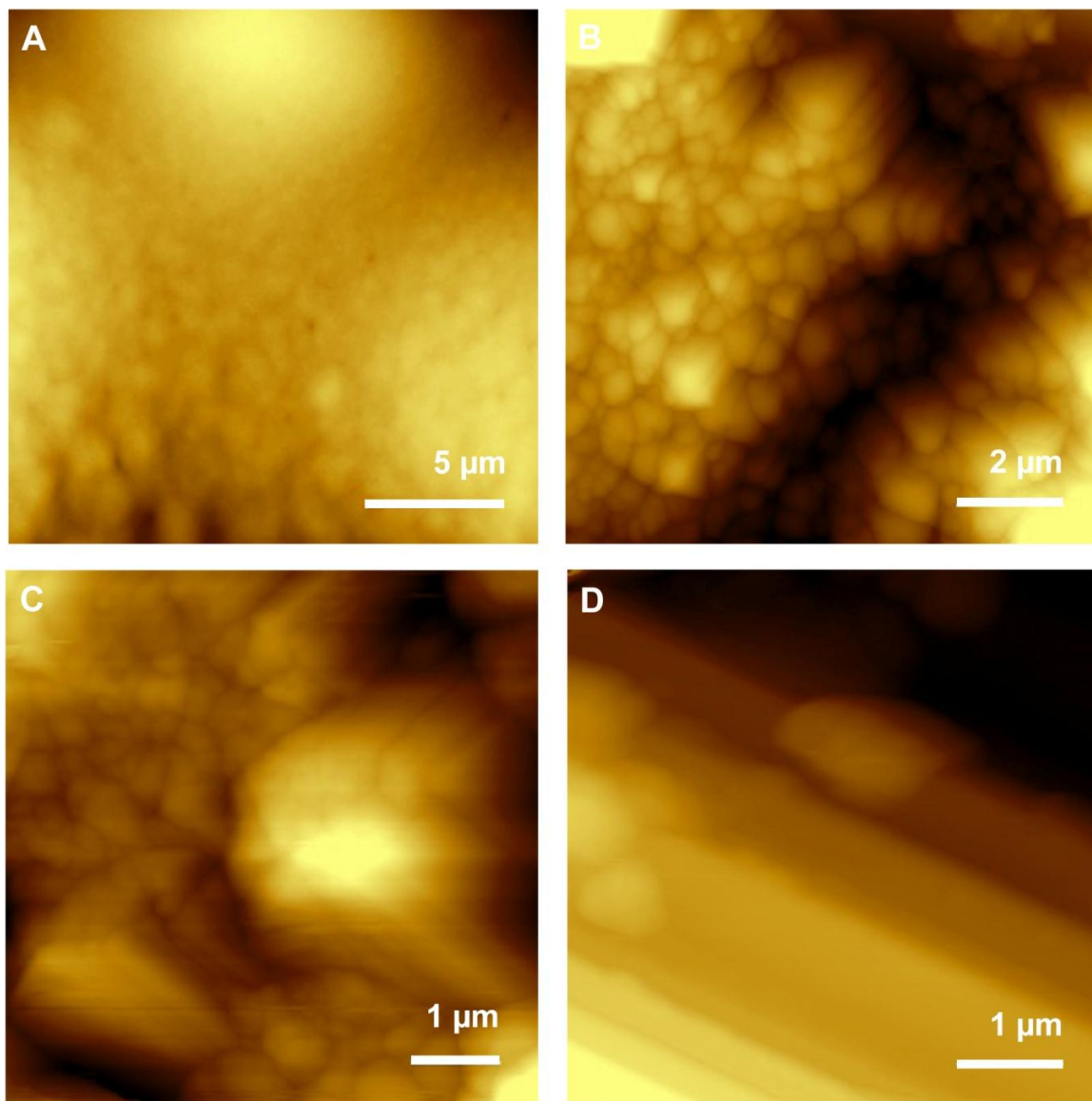
**Slika 15**

FESEM mikrofotografije vršnog dijela koralita (A); nasumično formirani kalcitni kristali (B), submikrometarske čestice neuređene forme (C), uvećanje pokazuje organski matriks (D) koji okružuje sferične nakupine (E, F), osnovnu građevnu jedinicu čine agregirane nanočestice.



**Slika 16**

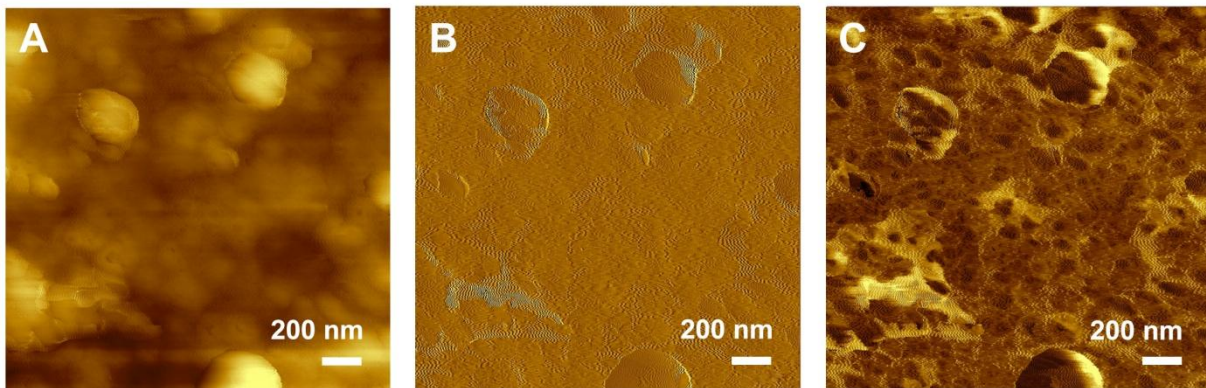
FESEM mikrofotografije unutarnjeg dijela koralita (A); vršni (B) i centralni (C) dio septe pokazuje orijentirane kristalite. Pod većim povećanjem vršnog dijela (D) vidljive su definirane kristalne forme s usmjerenim rastom, sastavljene od agregiranih nanočestica (E, F).



**Slika 17**

AFM prikazi površine koralita snimljeni u kontaktnom modu i vizualizirani na različitim skalama; skeletalna nanogranularna (A, B) područja nativnog dijela septuma kaliksa u usporedbi sa starijim dijelom koralita gdje se vide gusto pakirani prizmatični aragonitni kristali (C i D).

AFM prikazi površine koralita snimljeni u kontaktnom modu omogućavaju dobivanje kvantitativnih podataka o veličini pojedinog nanozrnca, odakle je vidljivo da nedavno formirani nanogranulirani aragoniti imaju promjer između 100 i 200 nm (Slika 17A,B), a stariji aragonitni kristaliti dobro definirane kristalne forme mikrometarskih dimenzija (Slika 17C,D). Fazni prikaz tapkajućeg moda snimanja AFM uređajem omogućuje razlikovanje raznih faktora poput elastičnosti, adhezije, deformacije i sličnog. S obzirom na velike razlike u svojstvima organske i anorganske faze biominerala, može se smatrati da tamnije linije vidljive na Slici 17 označavaju nakupljenu organsku tvar, a svjetlije obojan dio je tvrdi mineral koji na drugačiji način stupa u interakciju sa šiljkom AFM uređaja. Zbog toga se može zaključiti kako se agregirane čestice aragonita nalaze okružene organskom tvari.

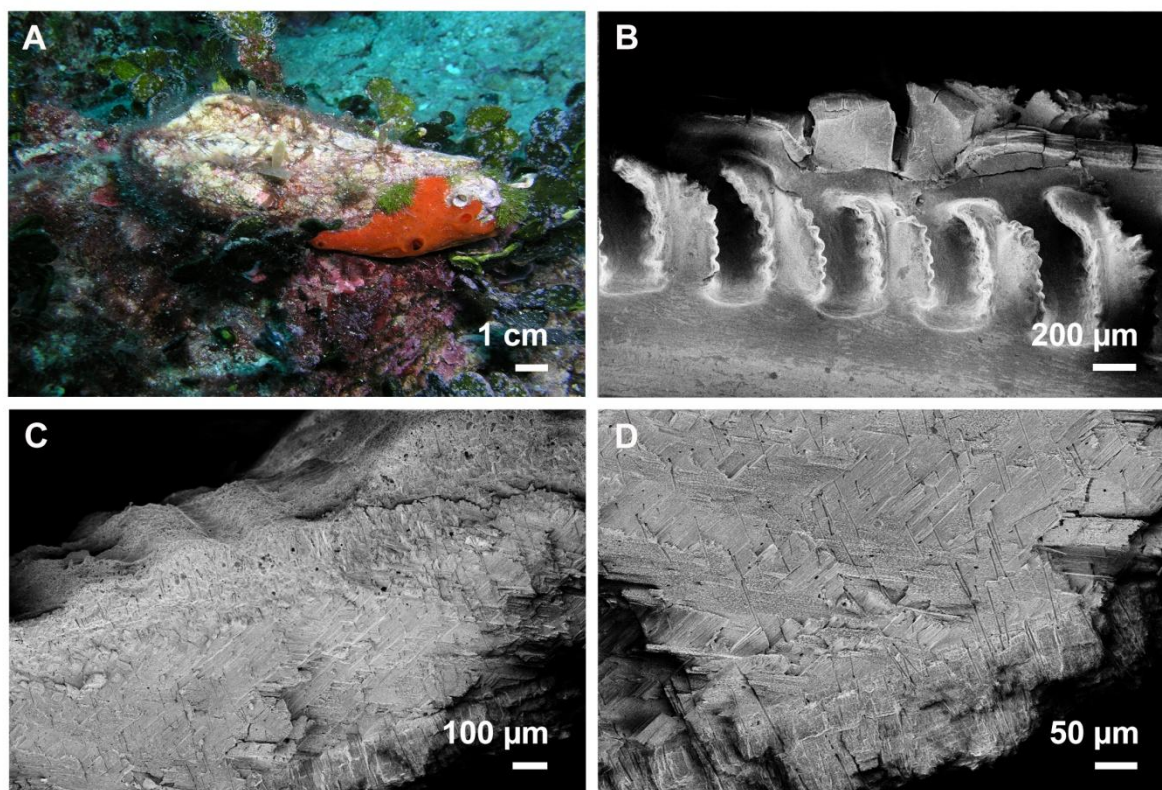


**Slika 18**

AFM prikazi površine koralita snimljeni u tapkajućem modu na površini od 500 x 500 nm; topografski (A), amplitudni (B) i fazni (C) način prikaza snimke istog mjesta na uzorku.

#### 4.1.5. MORFOLOŠKE ZNAČAJKE BIOMINERALNE STRUKTURE KUNJKE

Kunjka, *Arca noae* (Slika 14A) pripada primitivnom rodu školjkaša koji imaju bravu ispunjenu homodontnim zubima (Slika 19B) i kompleksno iskrižanu lamelarnu strukturu ljuštura, izgrađenu od hijerarhijski poredanih kristala (Slika 19C-D). Od umba do palijalne linije ljuštura je prošarana tubulima koji prolaze kroz cijelu debljinu ljuštura, a dopiru i do površine (Slika 19C,D). To je prva regija ljuštura nakon koje slijedi uzdignuta zona marginalnog plašta, vidljiva i golim okom kao sjajni sloj uz sam unutarnji rub školjke.



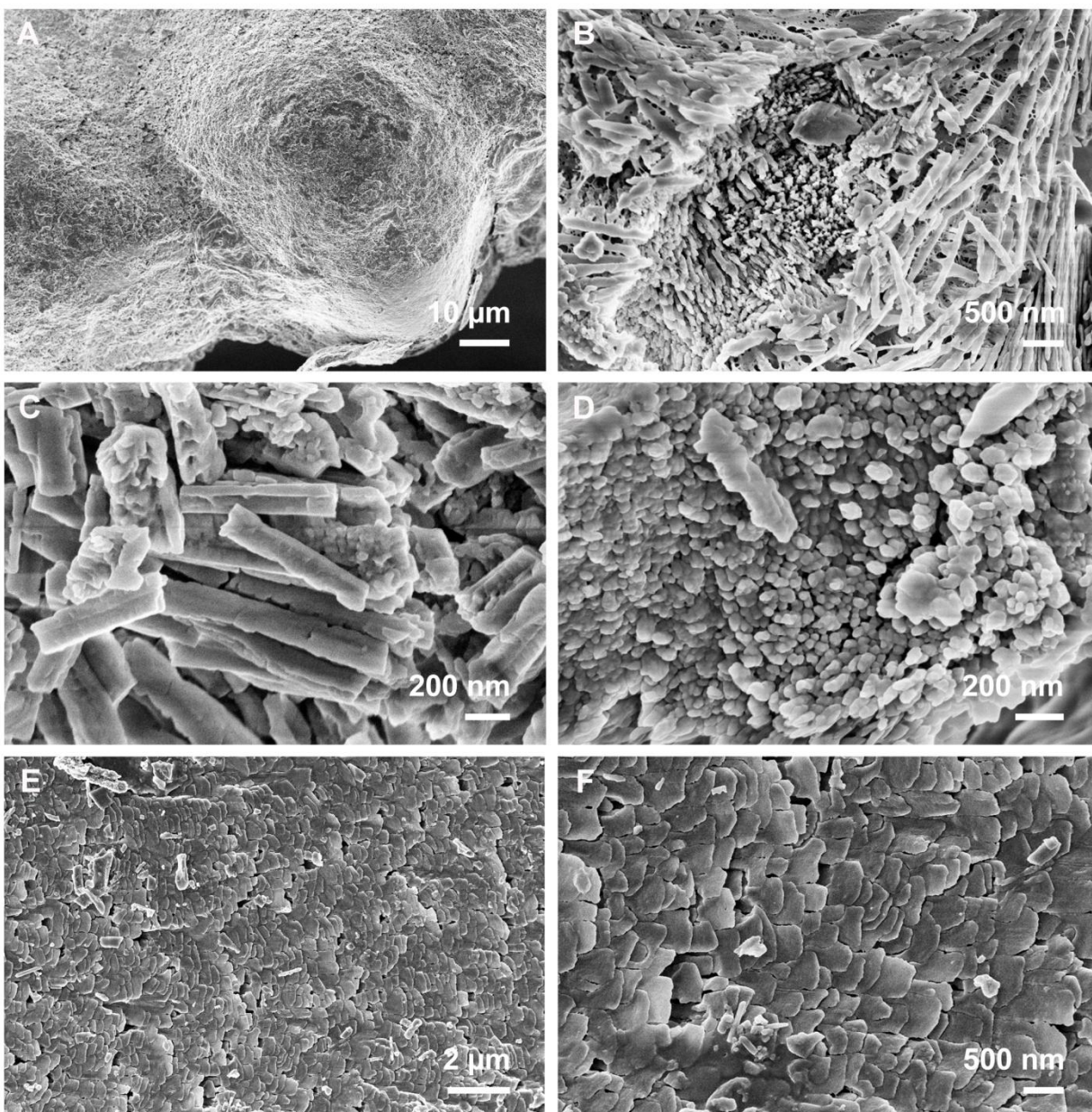
Slika 19

Osnovne značajke ljuštura kunjke (A): FESEM mikrofotografije brave sa homodontnim zubima (B), te poprečnog presjeka ljuštura kunjke (C); kompleksno iskrižana struktura ljuštura prošarana tubulima (C).

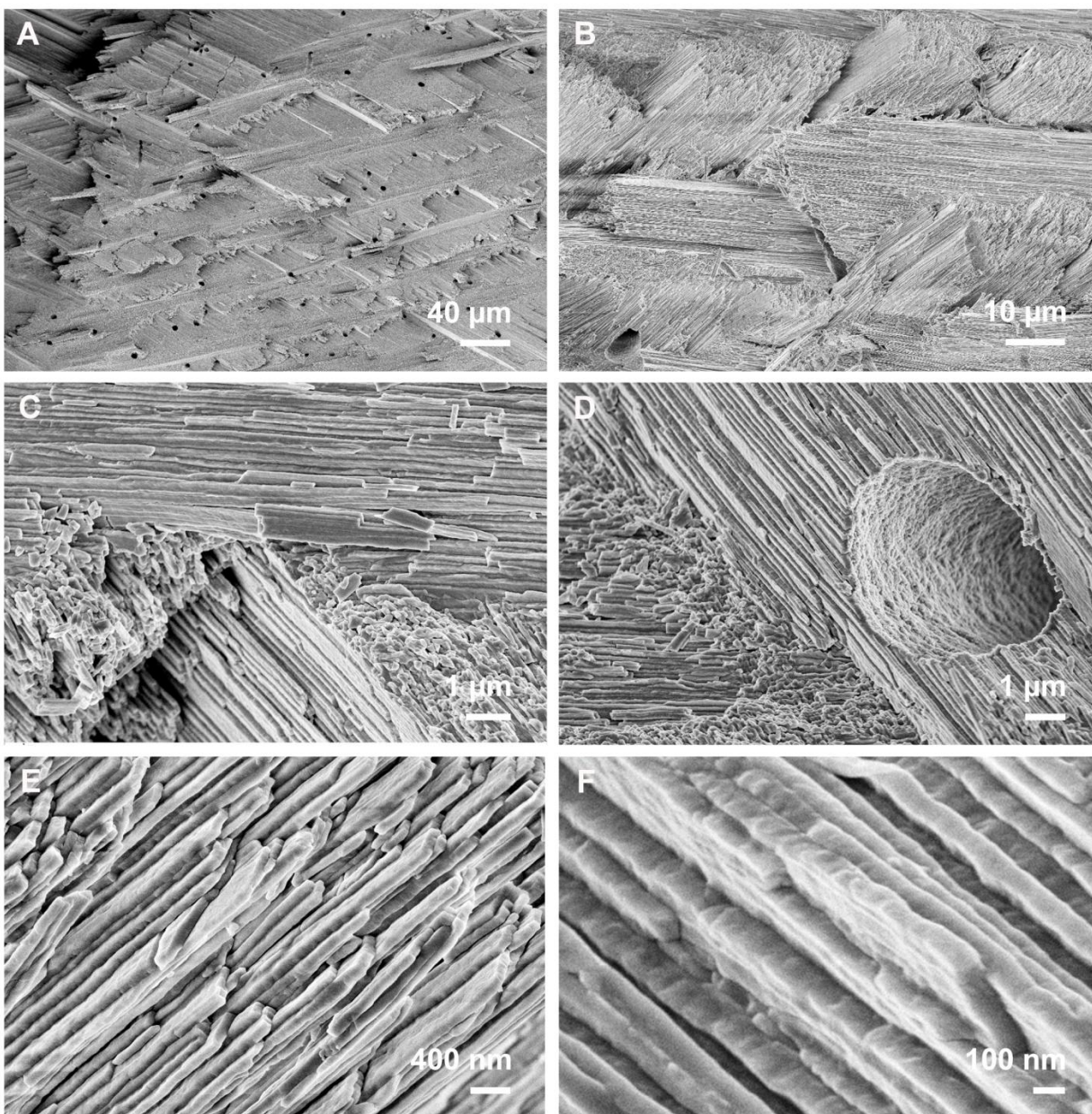
Zubi brave su najizloženiji dio školjke, jer je bisus za pričvršćivanje smješten na suprotnom bridu ljušture, pa je ovo dio okrenut prema moru (Slika 20A). Primjerice, kod dagnje (*M. edulis*) bisus je smješten uz bravu i umbo pa je ona mala i zaštićena jer se nalazi blizu mjesta pričvršćivanja. Kod kunjke su zubi izuzetno široko rasprostranjeni unutar brave; prostiru se po cijeloj dužini brida ljušture, smještenog posteriorno od umba (Slika 20B). Dodatnu zaštitu pružaju i snažni mišići zatvarači koji dodatno osiguravaju školjku od nasilnog otvaranja, smješteni na lateralnim plohama ljušture, u blizini brave. Dakle, iako se radi o primitivnom školjkašu, vidljivo je da je visokospecijalizirana za obranu od predatora. Iskrižano- lamelarna struktura je i najrašireniji tip strukture koju upotrebljavaju školjkaši, što dodatno označava kako se radi o visokospecijaliziranoj strukturi zadivljujućih svojstava.

Tome u prilog ide i građa same ljušture, sastavljena od pravilno poredanih aragonitnih slojeva, orijentiranih u različitim smjerovima čime se dodatno stabilizira njena struktura (Slika 20, B-D). Ona je karakterizirana kao iskrižano- lamelarna struktura. Unutarnja površina ljušture je glatka, prekrivena aragonitnim štapićima poredanim u listaste slojeve (eng. *foliated laths*), prikazanim na Slikama 20 i 21. Slika 20 A-D prikazuje unutrašnjost ljušture nakon tretmana natrijevim hipokloritom izvršenog da bi se uklonila organska tvar. Vide se rane mineralizacijske zone (Slika 20B) izgrađene od nanočestica velikih otprilike 50 nm oko kojih su poredani aragonitni štapići, također sastavljeni od agregiranih nanočestica slične veličine (Slika 20C). Netretirana površina ljušture u blizini zuba brave ima listastu građu ispunjenu izduženim plosnatim pločicama širokih otprilike 500 nm (Slika 20E-F).

Poprečni presjek ljušture kunjke (Slika 21) otkriva niz tubula, međusobno poredanih gotovo paralelno duž unutarnjeg dijela ljušture kunjke, sve do ruba plašta. Na poprečnom presjeku vidljivo je također kako tubuli prodiru kroz cijelu ljušturu, od umba sve do periostrakuma. Struktura kompleksno iskrižano- lamelarno iskrižanog aragonita je vidljiva u poprečnom presjeku (Slika 21). Takve strukture izgrađuju paralelni nizovi aragonitnih štapića promjera svega 100-150 nm, nastali međusobnom agregacijom te su zbog toga formirani u nizove duge nekoliko desetaka mikrometara (Slika 21E,F).

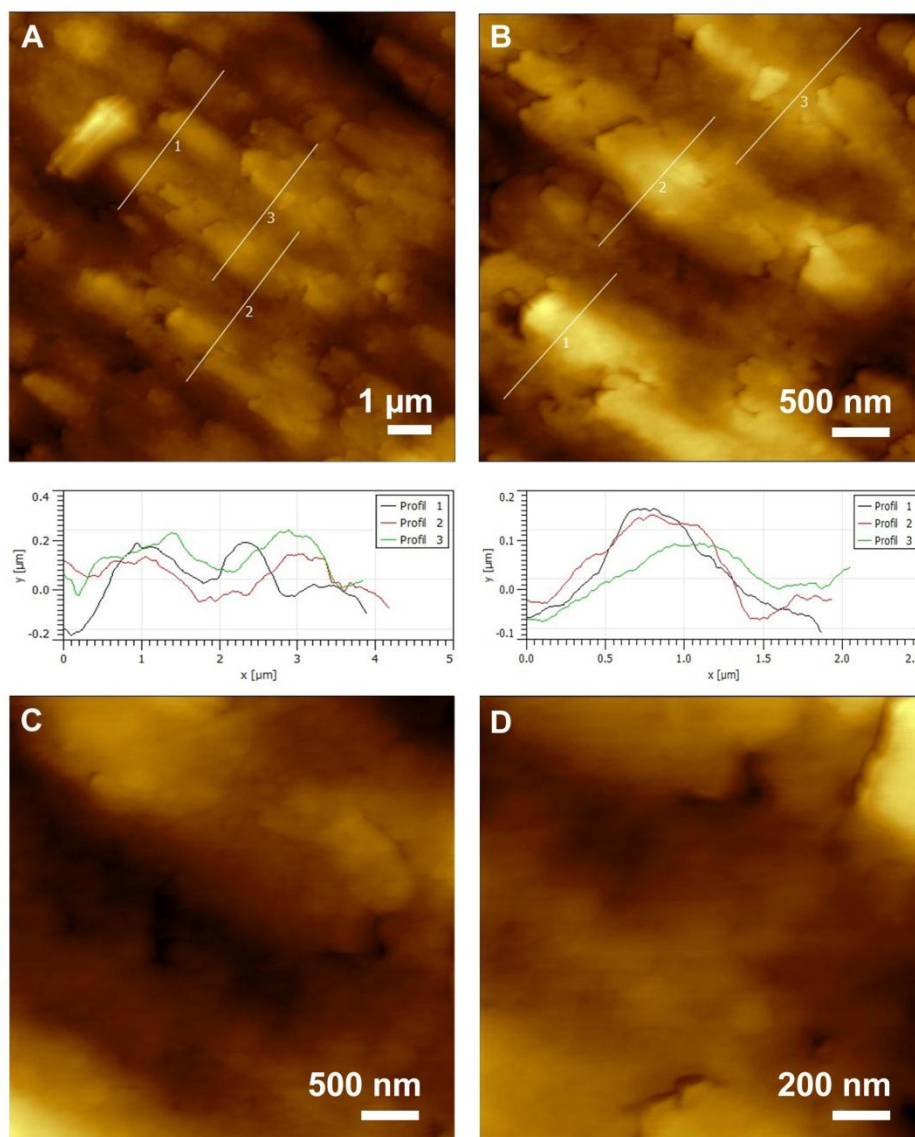
**Slika 20**

FESEM mikrofotografije homodontnih zubi brave ljušture kunjke tretirane s 15 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ /15 min (A-D). Topografija unutarnje površine native ljušture pokazuje listastu građu (E i F).

**Slika 21**

FESEM mikrofotografija poprečnog presjeka ljušture kunjke; kompleksno iskrižana lamelarna struktura je ispunjena nizom tubula (A-D): pojedini sloj ima visokoorijentirane paralelno posložene aragonitne štapiće (E-F).

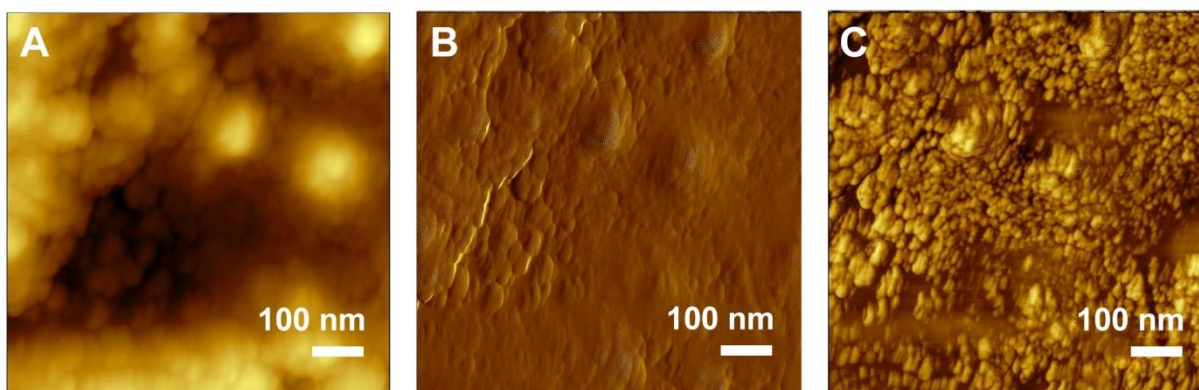
Prikaz unutarnje površine ljuštire kunjke je vidljiv na slikama 20 i 22. Listasti slojevi se izmjenjuju u pravilnim razmacima, na otprilike svakih 1  $\mu\text{m}$ .



**Slika 22**

Topografski AFM prikazi površine ljuštire kunjke snimljeni u kontaktnom modu i vizualizirani na različitim skalama.





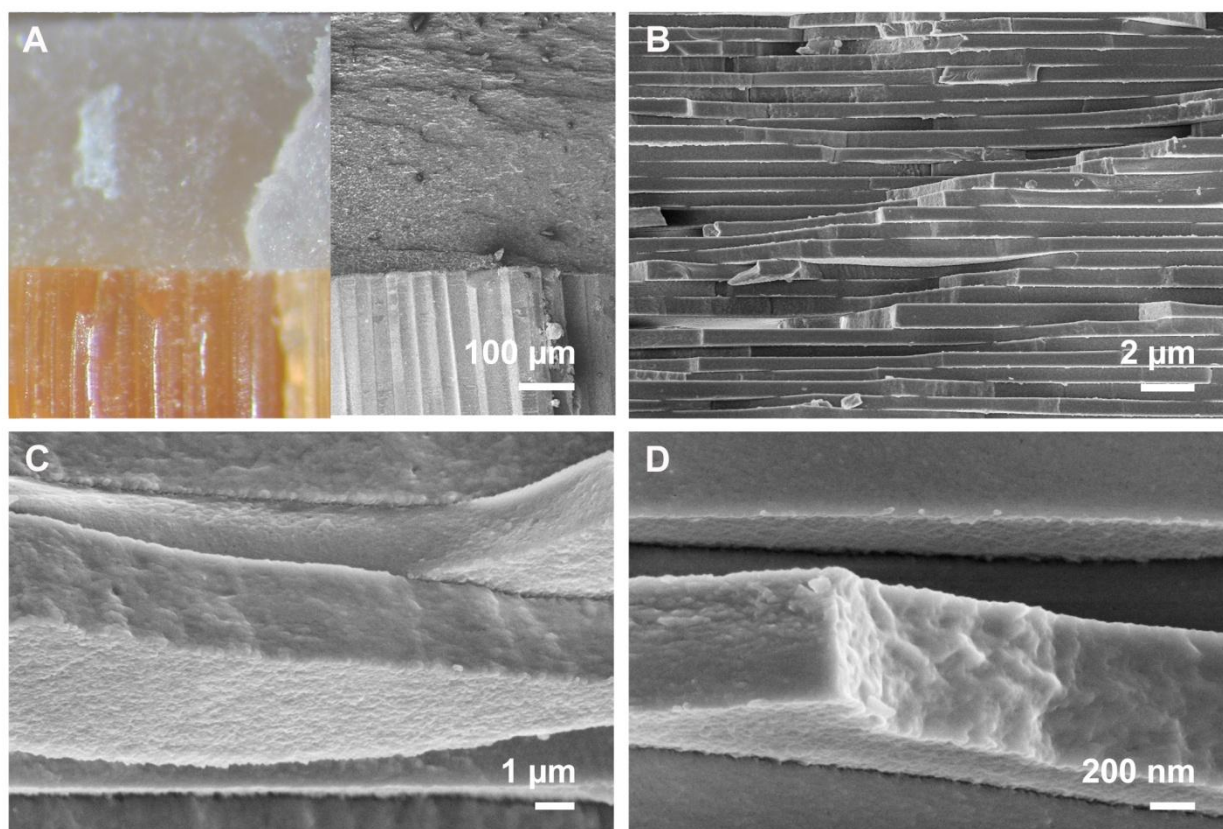
**Slika 23**

Topografski AFM prikazi površine ljuštura kunjke snimljeni u tapkajućem modu: topografski (A), amplitudni (B) i fazni (C) način prikaza snimke istog mjesta na uzorku.

Pod većim povećanjem snimljenim kontaktnim modom ljuštura izgleda homogeno i bez značajnih granulacija, međutim takva struktura snimljena tapkajućim modom prikazuje znatno drugačiju građu. Slika 23 prikazuje kako se radi o nanogranuliranoj strukturi, pogotovo vidljivoj na faznom prikazu (Slika 23C) koji omogućuje razlikovanje razlika u svojstvima površine. On prikazuje sitne granule, velike nekoliko desetaka nanometara koje se međusobno spajaju u veće agregate.

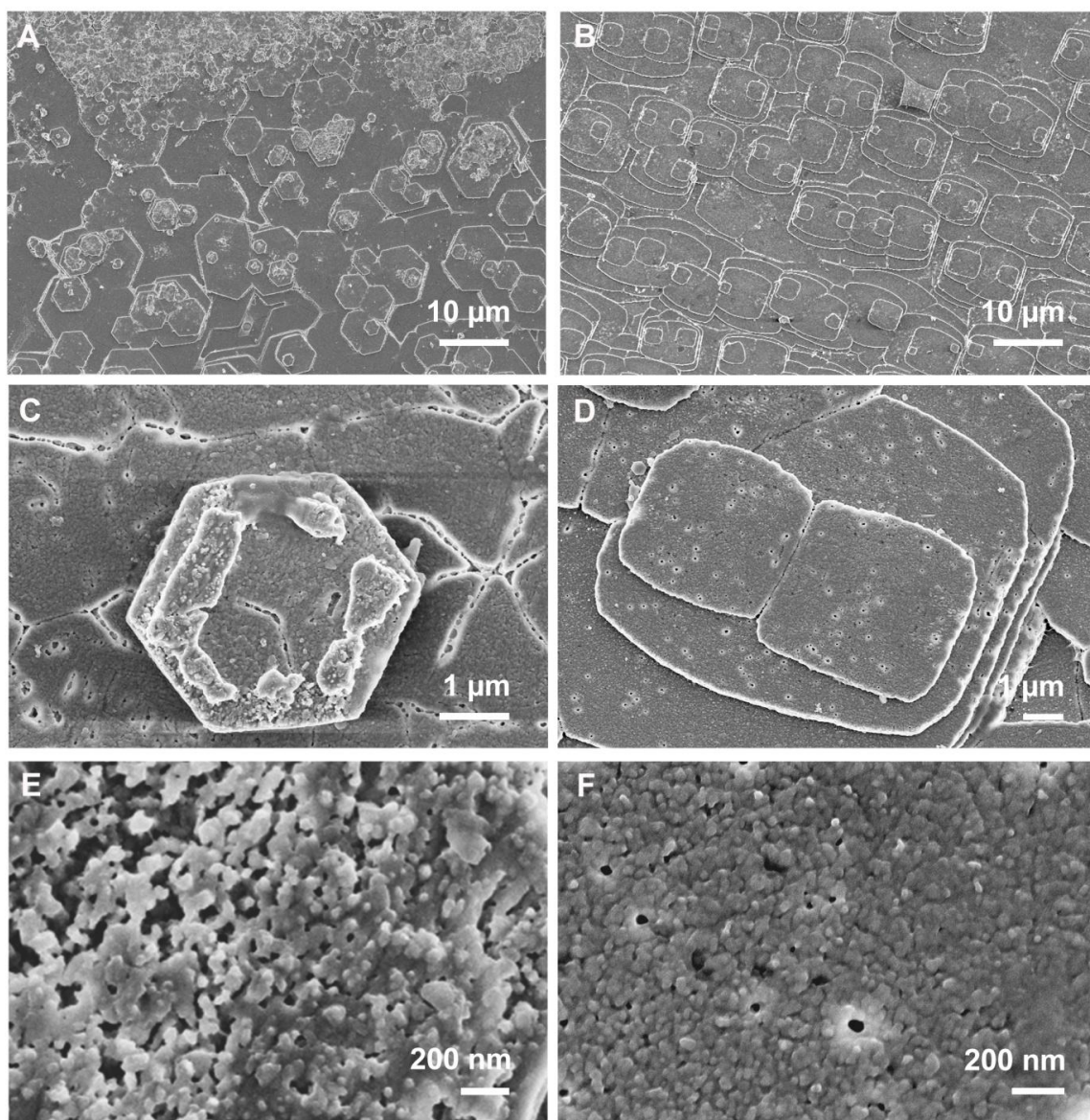
#### 4.1.6. MORFOLOŠKE ZNAČAJKE BIOMINERALNE STRUKTURE PERISKE

Periska, *Pinna nobilis* gradi ljušturu od dva dijela (Slika 24A); velike kalcitne prizme poligonalnih oblika štite ljušturu izvana dok sedefni sloj izgrađen od aragonita priliježe na njih s unutarnje strane. Osnovna građevna jedinica tog sloja su sedefne pločice (Slike 24, 25). One počinju rasti na debelom organskom sloju koji ih odvaja od prizmi (Slika 24A) u formi koja strukturom podsjeća na stepenište, odakle je i dobila ime (eng. *stair step manner*) (Carter 1990). Pločice sedefa periske su međusobno paralelne i znatno izduženije od klasičnih. Pojedine pločice su debele oko 500 nm, a velike oko 5 x 10 μm i sastavljene od agregiranih nanočestica (Slika 25).



Slika 24

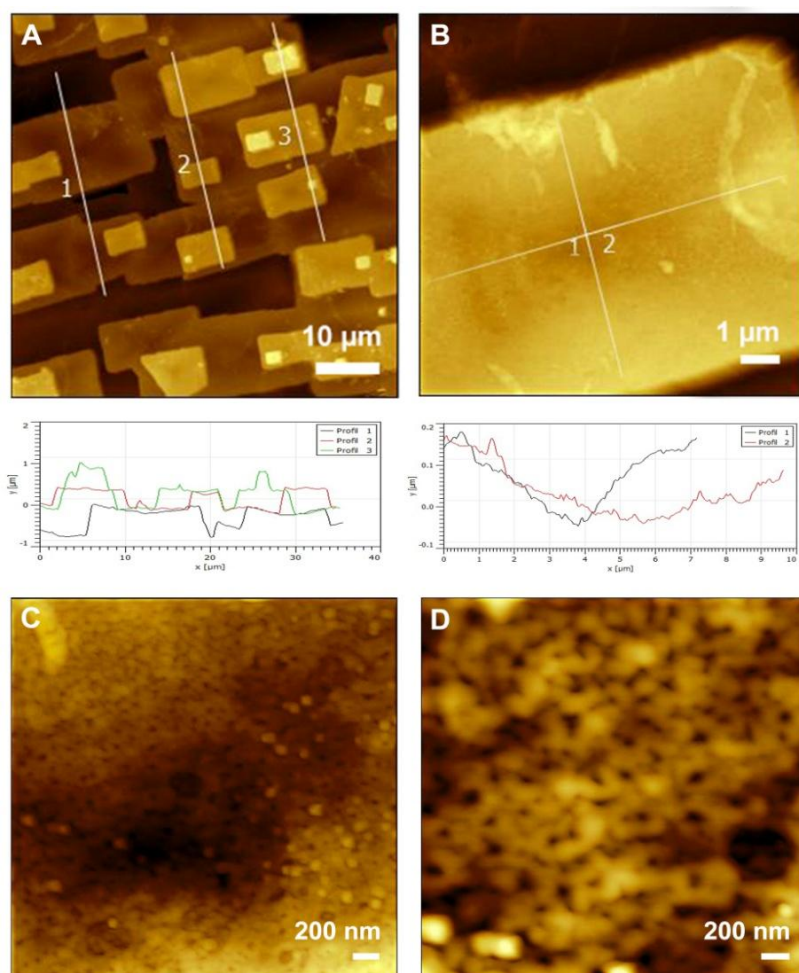
FESEM mikrofotografije (A) poprečnog presjeka ljušture periske, usporedni prikaz snimljen pomoću polarizacijskog i elektronskog mikroskopa; velike narančaste kalcitne prizme su orijentirane okomito na bijeli sedef. Poprečni prikaz sedefnih pločica (B) prikazuje slaganje u formi stepenica, a same pločice (C,D) su sastavljene od agregiranih nanozrnaca (D).



Slika 25

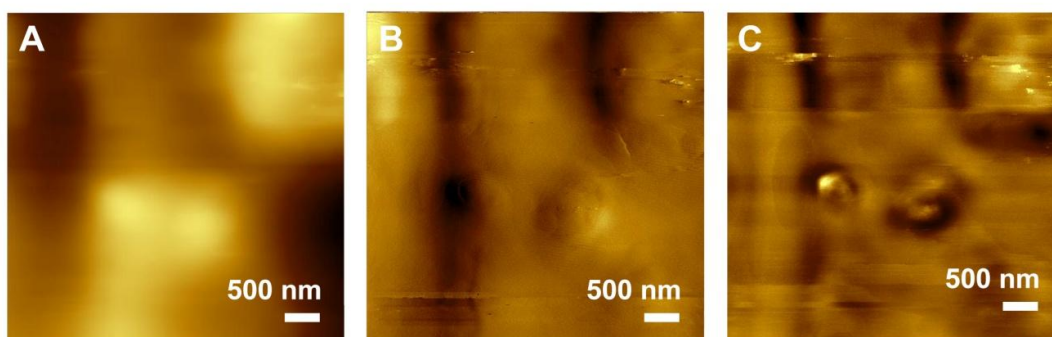
FESEM mikrofotografije aragonitne površine ljušture periske; usporedba sedefnih pločica u nastanku (lijevo) i njihov završni izgled (desno). Pseudoheksagonske sedefne pločice međusobno srastaju (A) i formiraju sedefni sloj (B); početni pseudoheksagonalni oblik pločice (C); pločice rastu vertikalno jedna na drugoj te se može razabrati 5 slojeva (D); nanostruktura pločica za vrijeme formiranja (E) koja se razaznaje i u konačnom izgledu (F).

Struktura sedefa aragonita pokazuje karakterističnu pravilnost izmjenjivanja slojeva visokih otprilike 500 nm (Slika 26A), sastavljenih od niza aragonitnih pločica koje međusobno srastaju. One su velike otprilike 5-10  $\mu\text{m}$ , a sredina im je lagano udubljena (Slika 26B). Iako je tipična nanogranulacija teže uočljiva, vidi se kako je pojedina pločica sastavljena od niza sitnih čestica velikih svega nekoliko desetaka nanometra (Slika 26C,D).



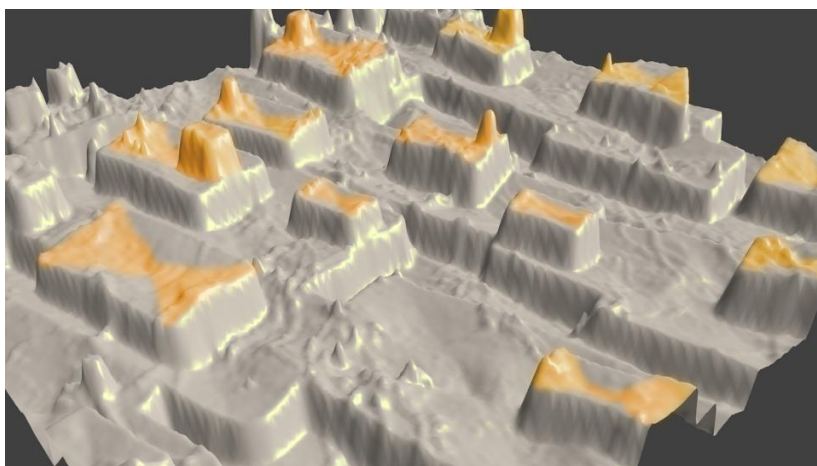
Slika 26

Topografski AFM prikazi površine ljušture periske snimljeni u kontaktnom modu i vizualizirani na različitim skalama. Izgled unutarnjeg sloja ljušture otkriva aragonitne pločice poredane u obliku stepenica, karakteristične za ovu vrstu (A). Pločice su središnje lagano udubljene (B), a građene su od niza submikrometarskih čestica (C, D).



Slika 27

Topografski AFM prikazi površine ljušturre periske snimljeni u tapkajućem modu: topografski (A), amplitudni (B) i fazni (C) način prikaza snimke iste lokacije uzorka.



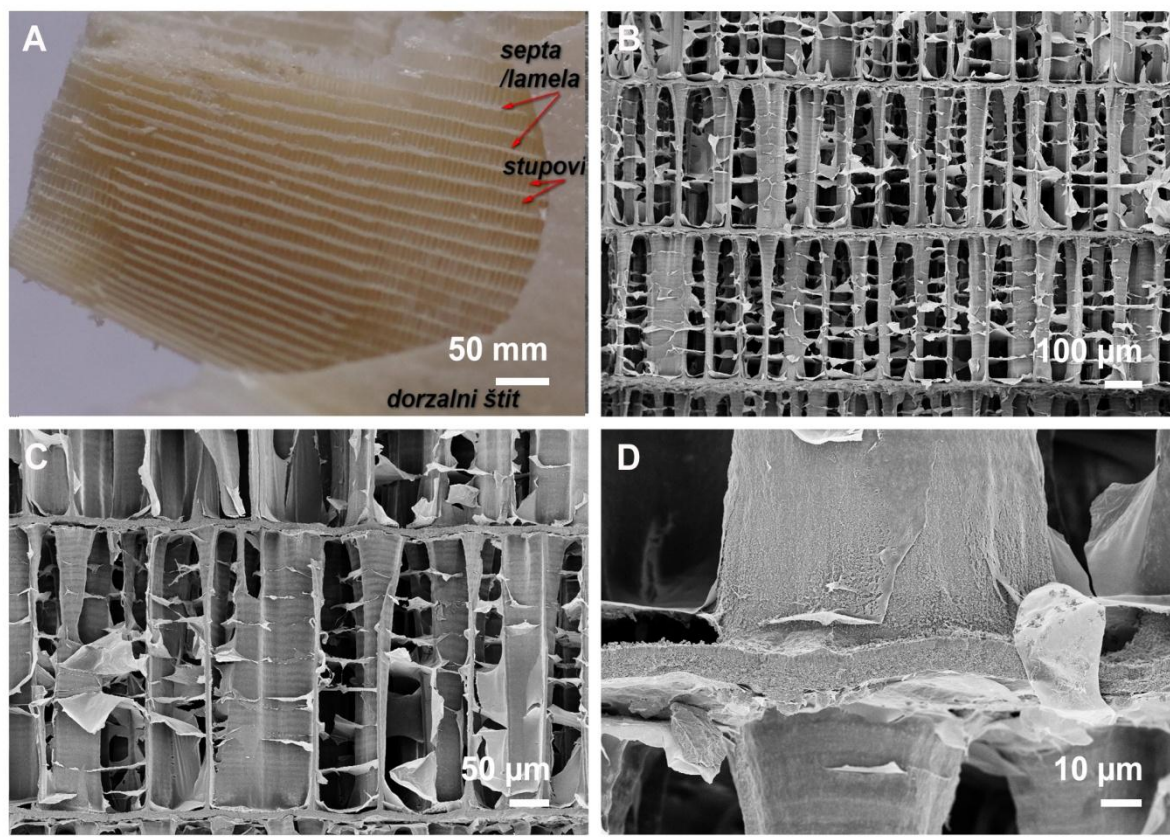
Slika 28

Kompjutorski generiran prikaz površine ljušturre periske uporabom AFM podataka prikazanih na Slici 26 A kako bi se dodatno naglasile karakteristike površine sedefne pločice. Dio naznačen narančastom bojom se odnosi na područja bogata organskom tvari.

Sedefne pločice sadrže više organske tvari u području označenom narančastom bojom na Slici 28 prema Checa i suradnicima (2013). Vidljivo je kako se zapravo na tom području stvaraju novi agregati aragonita koji se s rastom spajaju i formiraju novu pločicu, odnosno novi sloj aragonita. Takva struktura novih, nesraslih agregata je vidljiva i na Slici 27.

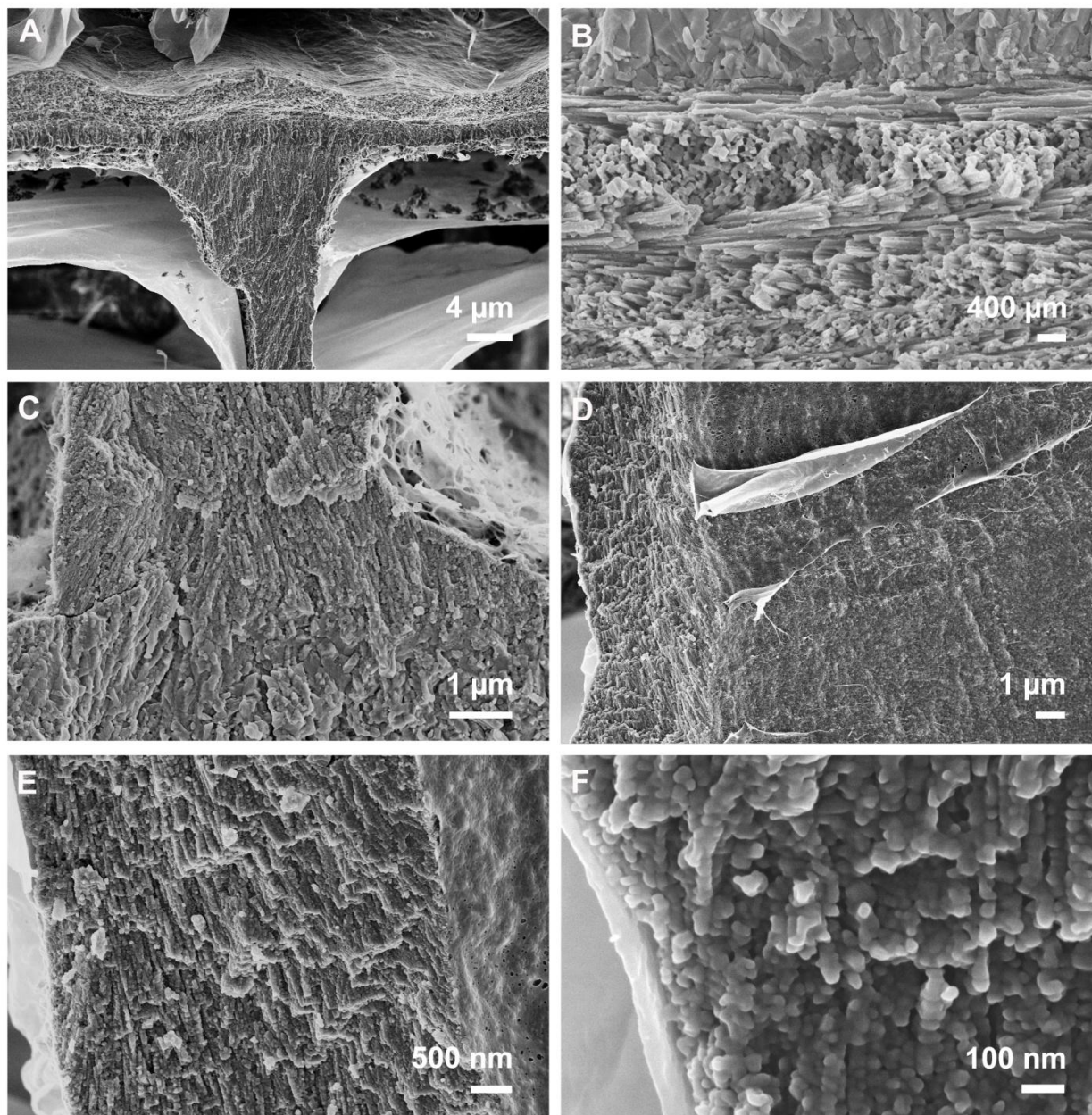
#### 4.1.7. MORFOLOŠKE ZNAČAJKE BIOMINERALNE STRUKTURE SIPOVINE

Obična sipa, *Sepia officinalis*, ima sipovinu podijeljenu na komore koje su ispunjene gusto poredanim stupovima (Slika 29). Svaki stup obložen je čvrstim organskim slojem koji prerasta sam stup i tvori paralelno poredana uporišta duž komore, najbolje uočljiva na Slici 29 A. Osim tog organskog sloja, stupove karakteriziraju i linije rasta (Slika 29B,C). Veće povećanje (Slika 29D) otkriva zrnatu strukturu stupa ispod organskog omotača koja ukazuje da se procesi agregacije zaustavljaju nakon određenog stupnja udruživanja čestica.



Slika 29

FESEM mikrofotografije lamelnog dijela sipovine; komore lamelnog dijela su ispunjene stupovima i odjeljene paralelnim lamelnim zidovima (A-B) koji su i dorzalno i ventralno povezani sa lamelnim zidom (C); te bogato obloženi organskim slojem (D).



Slika 30

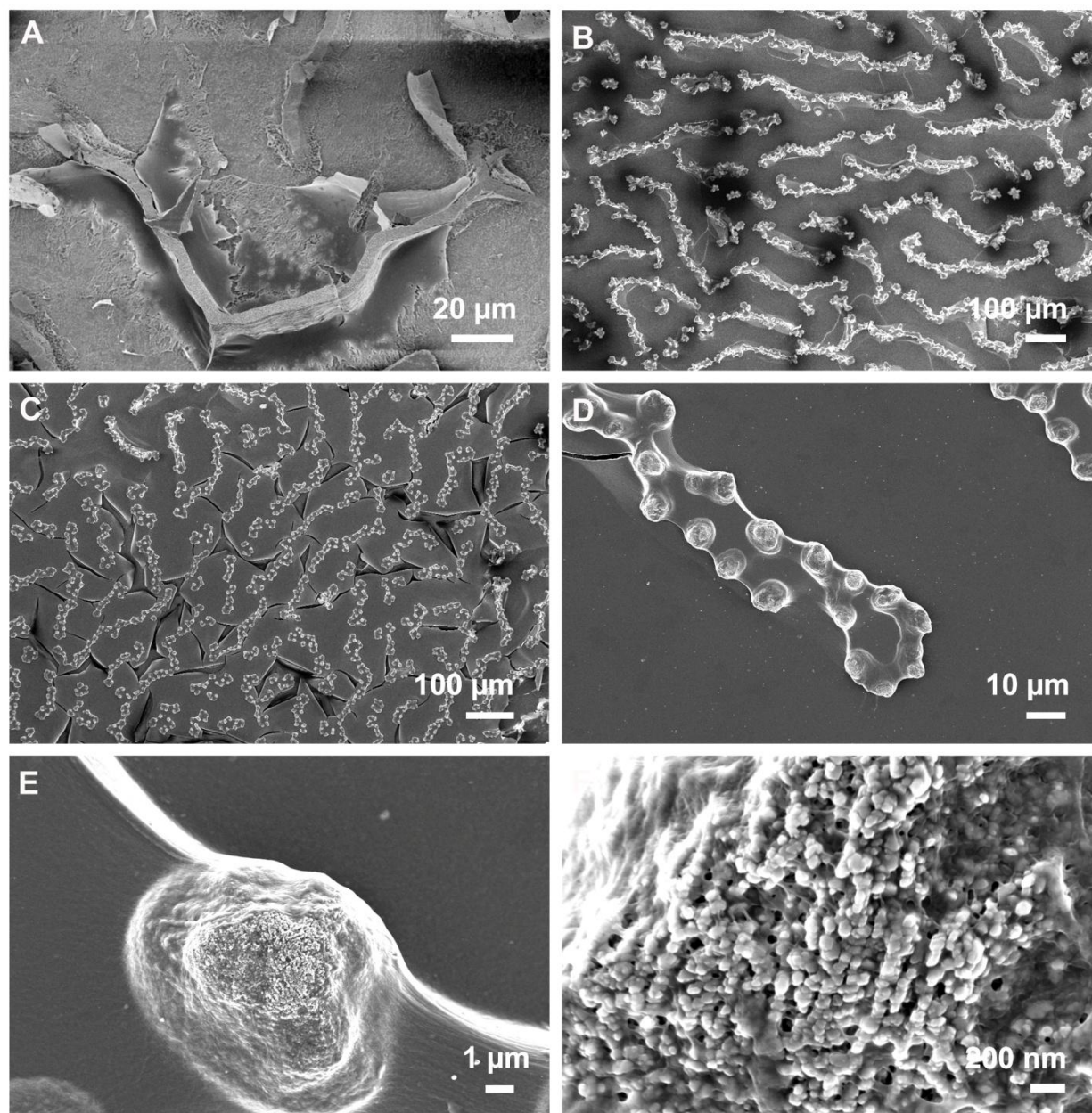
FESEM mikrofotografije lamelnog dijela sipovine, građa lamelnog zida. (A) Segment podnožja jednog stupa; (B, C) zidovi su građeni od više slojeva čiji broj nije jednolik, ali ima pravilnu raspodjelu precizno izmjenjućih smjerova rasta (D). Nanostrukturiranost stupa koji i nakon završetka formiranja zadržava granuliranu strukturu (E) koja je istovremeno i vrlo orijentirana u smjeru c-osi (F).

Komore sipovine su ispunjene stupovima koji im pružaju mehaničku čvrstoću, nužno potrebnu za opiranje tlakovima u dubinama, međutim lamelarni zidovi osiguravaju delineaciju i neovisnost komora. Na taj način sipovina može pravilno regulirati omjer plinova i tekućine, ovisno o dubini na kojoj se životinja nalazi. Lamelarni zidovi su izgrađeni od više slojeva pravilno poredanih aragonitnih minerala (Slika 30). Slojevitost nije jednaka na svim područjima, i njihova debljina se također izmjenjuje. Ovisno o mjestu uzorkovanja moguće je pronaći od tri do šest pa i više podslojeva (Slika 30C,D). Završni (prijelazni) sloj u blizini stupa je znatno deblji od ostalih i njegov rast je orijentiran u smjeru c-osi, okomito na ostale podslojeve lamelarnog zida (Slika 30B,C). Ti podslojevi su paralelno poredani, nejednolike debljine i rastu u slojevima, tzv. LbL rast (eng. *Layer by Layer*). Oni stalnom promjenom smjera rasta minerala omogućavaju dodatnu strukturnu čvrstoću lamelarnog zida (Slika 30C,D). Svaki sloj se sastoji od niza nanočestica poredanih jedna na drugu tako da tvore listaste strukture.

Na površini lamelarnog zida koji je ventralno okrenut prema sifunkularnoj vreći počinje se formirati nova komora (Slika 31A,B). Prije srastanja lamelarnog zida u komoru se luči gelasti organski matriks na kojem se počinju formirati aragonitne nakupine (Slika 31B,C). Paralelno sa srastanjem lamelarnog zida, srastaju i aragonitne nakupine i počinju rasti u smjeru c-osi. Sam oblik organskog matriksa koji je sekretiran u početku nastanka nove komore određuje konačni izgled stupova koji najčešće poprimaju sigmodalan oblik (Slika 31D-F).

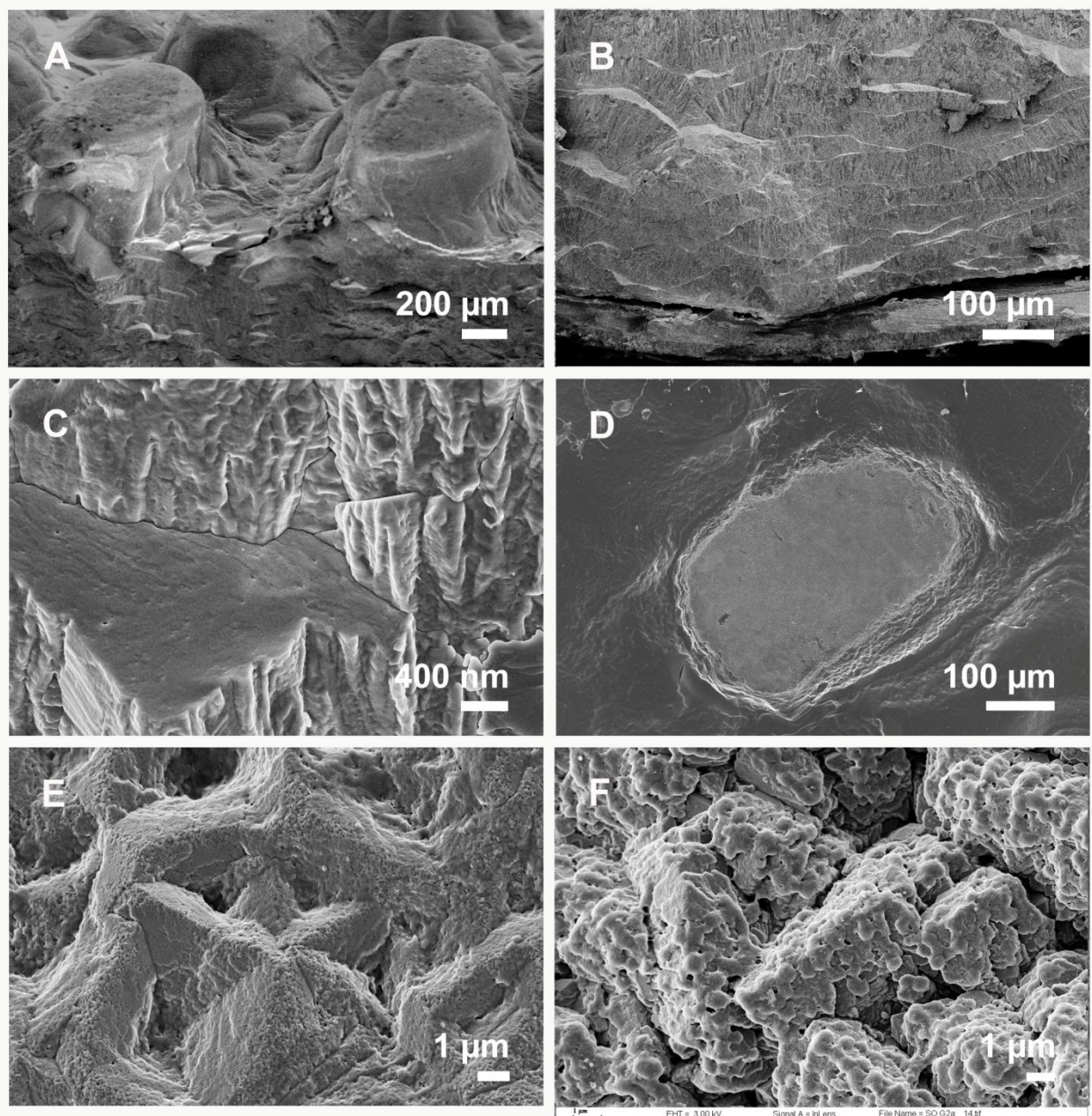
Strukture slične stupovima u ranoj fazi rasta mogu se pronaći i na dorzalnoj strani sipovine, točnije na kaudalnom dijelu dorzalnog štita. One se nazivaju tubuli i imaju znatno kompaktniju, zaobljenu građu koja podsjeća na brežuljke (Slika 32A,B). Na prednjoj strani dorzalnog štita tubuli su manje izraženi iako je to područje i dalje vrlo mineralizirano, a struktura ima oštrije konture i veću kompaktnost. Aragonitne plohe na pojedinim segmentima tvore sraslace (Slika 32C,D).





Slika 31

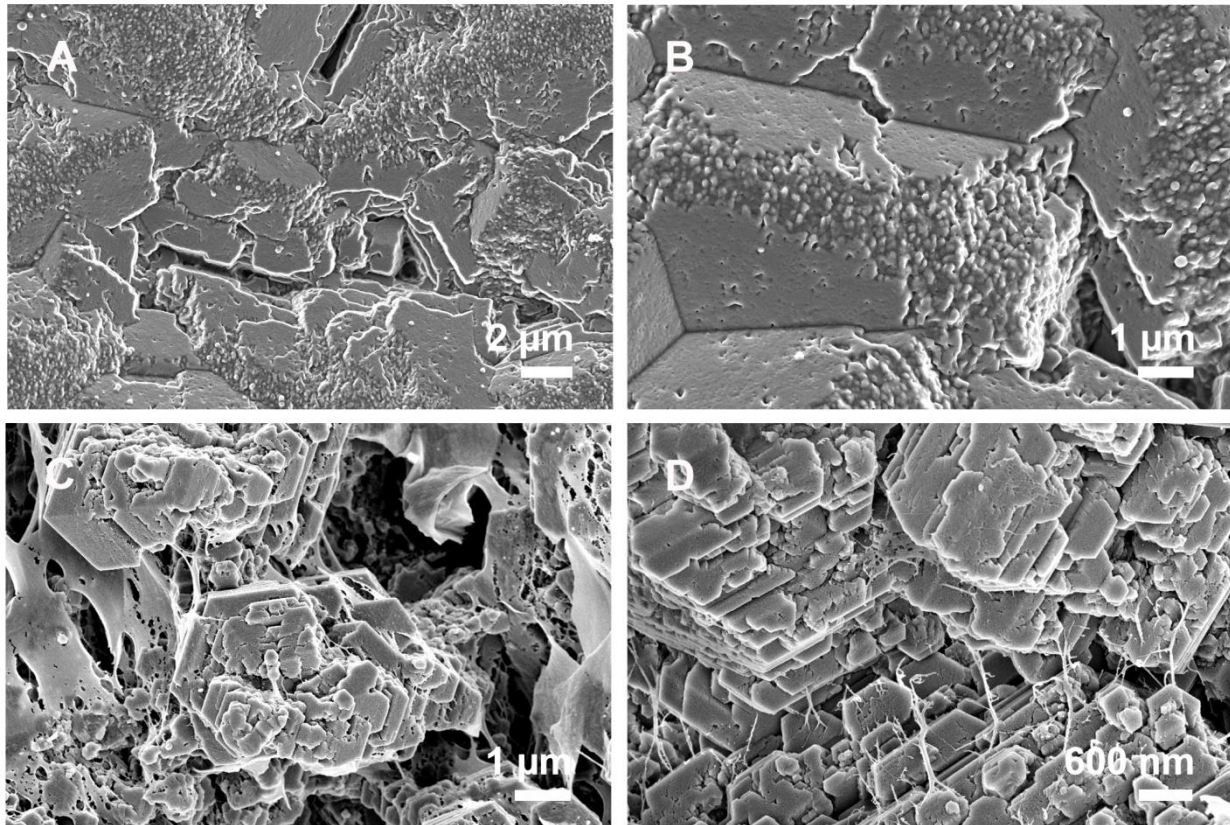
FESEM mikrofotografije predstavljaju rast nove komore na ventralnoj površini sipovine: nakon srastanja lamelnog zida i popunjavanja prostora ispunjenog organskom tvari stupovi počinju intenzivno rasti u visinu (A-B), međutim u vrijeme početnog formiranja stupova još nije srastao do kraja (C.). U toj fazi su vidljive novo formirane nakupine aragonitnih nanočestica okružene organskom tvari koja izgledom podsjeća na gel (D-F).



**Slika 32**

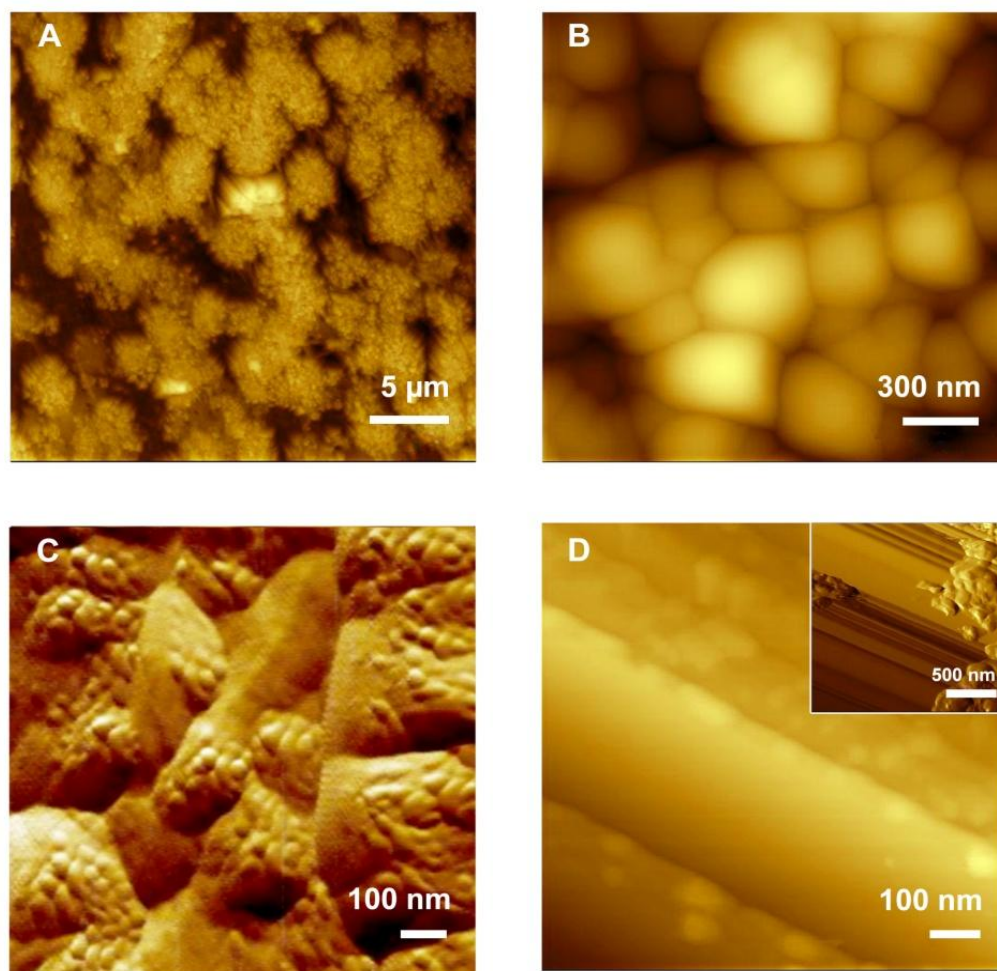
FESEM mikrofotografije najtanjeg dijela dorzalnog štita sipovine (mediokaudalno). Poprečni presjek (A-C); uvećanje jedne izbočine (D); uvećani prikaz segmenta dorzalnog štita, sraslaci aragonita (E, F).

Aragonitne plohe u dorzalnom štitu su paralelne s c- osi što ukazuje na to da je centralni dio dorzalnog štita zadebljao u smjeru najbržeg rasta (Cusack i Chung, 2013) (Slika 33A-D). Građa konusa sipovine je najbolje vidljiva nakon što se ukloni organski dio (tretman s 1 % NaOCl/4 dana), kada se ističu međusobno srasle pseudoheksagonalne pločice aragonita (Slika 33E,F).



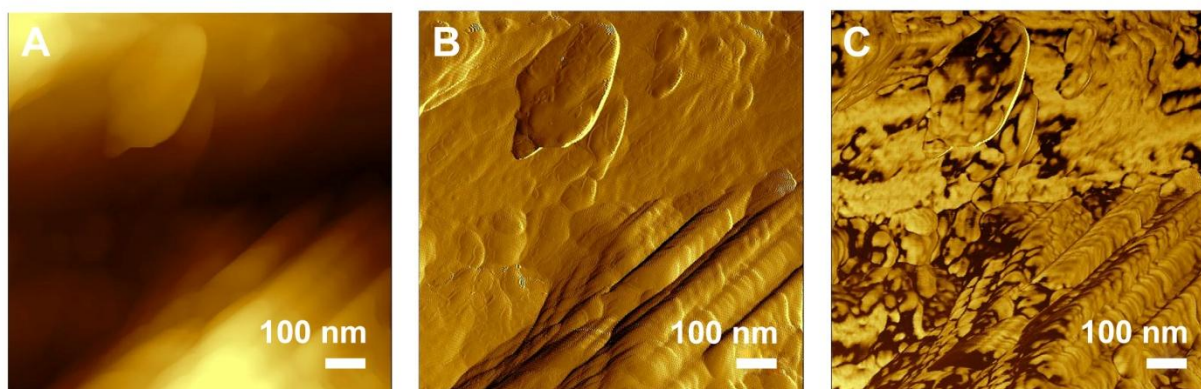
Slika 33

FESEM mikrofotografije dorzalnog štita sipovine. Sraslaci aragonita su bogato obloženi organskom tvari (A ,B); nakon tretmana s 1 % NaOCl/4 dana da se ukloni organski materijal vidljiva je heksagonalna građa aragonitnih sraslaca (C, D).

**Slika 34**

Topografski AFM prikazi sipovine snimljeni u kontaktnom modu: topografija ventralne površine (A, B) i poprečni presjek lamelarnog zida u nastanku (C, prikaz odstupanja otklona poluge). Poprečni presjek kroz strukturu lamelarnog zida (D, prikaz odstupanja otklona poluge, umetnuta slika).

AFM prikazi pokazuju kako je sipovina izgrađena od agregiranih nanočestica velikih 100 do 300 nm (Slika 33A,B) koji u poprečnom presjeku formiraju lamelarne strukture na kojima se i dalje nadziru nanočestice (Slika 34C). Još sitnije nanočestice velike 10 nm (Slika 34D) vidljive su u poprečnom presjeku lamelnog zida dobivenog samo odizanjem dorzalnog štita i mjerenjem nativnog izgleda lamela ispod štita.



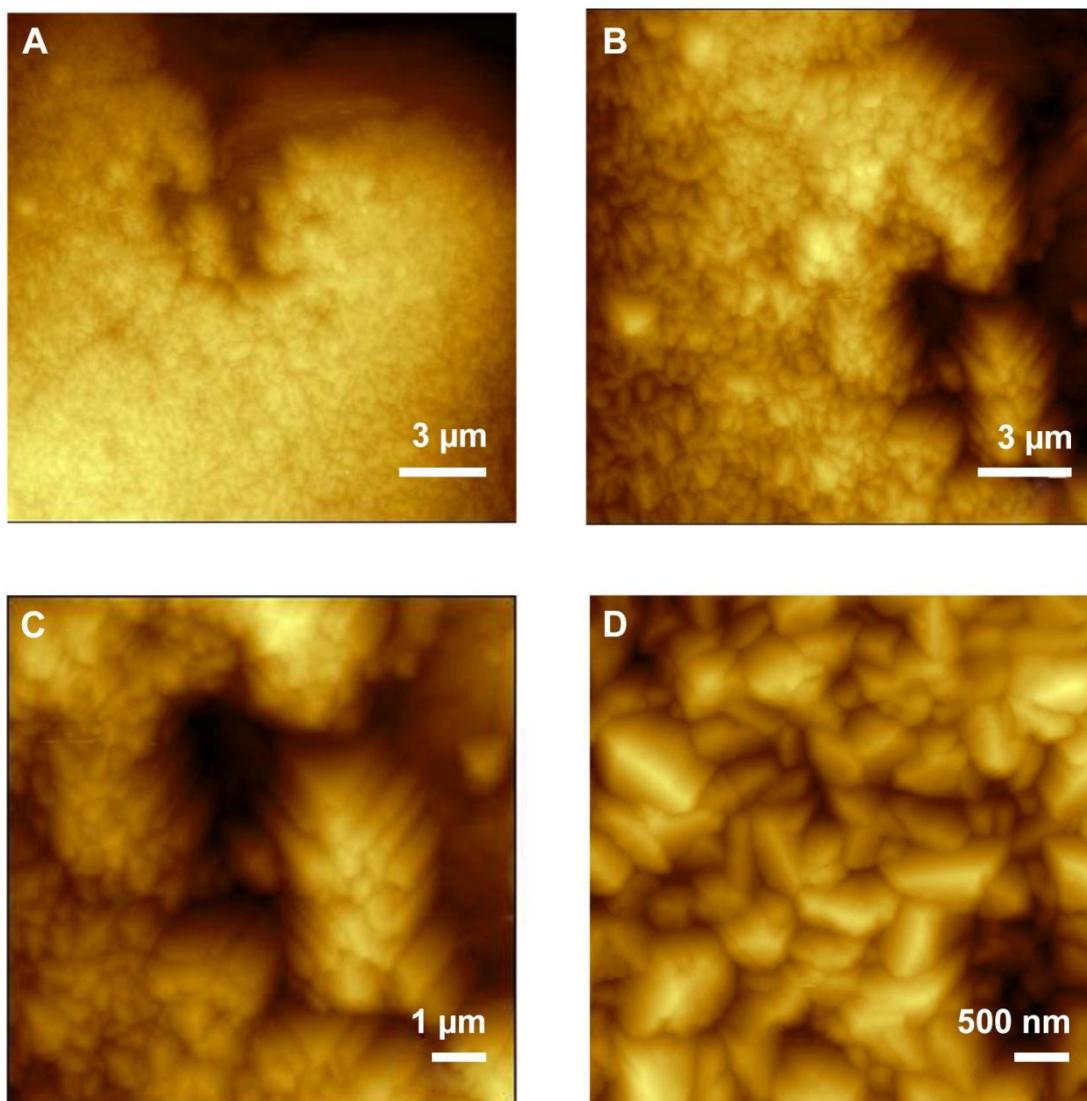
**Slika 35**

AFM prikaz ventralne površine sipovine snimljena u tapkajućem modu na površini od 800 x 800 nm: topografski (A), amplitudni (B) i fazni (C) način prikaza snimke istog mjesta na uzorku.

Nanoagregacijski procesi su najizraženiji na ventralnoj površini sipovine, odnosno mjestu nastanka nove komore. Međutim, kroz cijelu sipovinu se ponavlja homogena struktura nanoagregata veličine od otprilike 100 x 100 do 200 x 500 nm.

Dorzalni štit je hrapaviji i tvrdi od lamelnog dijela. Središnji dio je znatno hrapaviji, u samom centru je uzet uzorak, ali je prehrapav za mjerenje nativne strukture AFM-om. Zbog toga je s prednjeg dijela dorzalnog štita sipovine uzet uzorak na čijoj površini su također pronađene tvorbe slične mjehurićima (Slika 36 A,D) građene od agregata sa skalenoedarskom strukturom. Kako sam šiljak AFM-a može snimanjem uzrokovati artefakte sa trokutastim formama, snimljeno je nekoliko različitih mjesta na uzorku i svi pokazuju sličnu strukturu, te se može smatrati da se ne radi o artefaktima (Slika 36B). Agregati su prosječno veliki 150 nm do 1  $\mu$ m, ali mogu

formirati i veće tvorbe zaobljenog oblika (Slika 36C). Slika 36D prikazuje rani tubul u izgradnji koji nema znakova skalenoedarskih tvorbi već je formiran od agregiranih nanočestica.



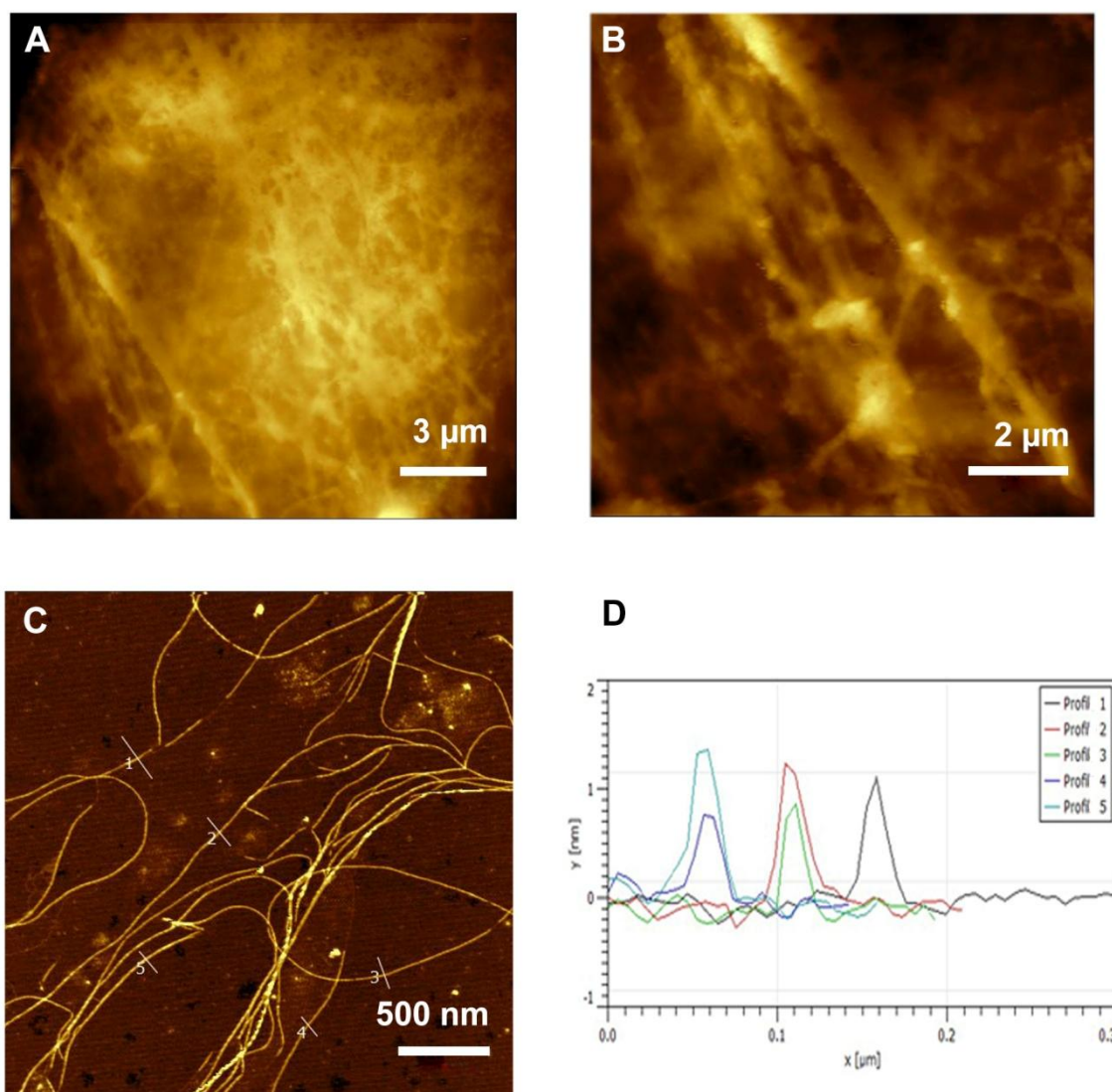
**Slika 36**

Topografski AFM prikazi glatkog dijela dorzalnog štita na kranijalnom dijelu sipovine, snimljeni u kontaktnom modu: skalenoedarski oblik tubula u kasnijim fazama rasta (A-C), a rana forma ima naznake nanoagregacijskih procesa (umetnuta Slika u D je prikaz odstupanja otklona poluge).

Lateralno od hrapave centralne pozicije na dorzalnom štitu dobiven je mjerljiv uzorak i uočena je zanimljiva mreža koja podsjeća na organsku te je moguće da se radi o otisku hitinskih vlakana (Slika 37A). Slična struktura je pronađena i na samom konusu, odnosno na njegovom prozirnog dijelu koji se nakon sušenja odvoji od sipovine (Slika 37B).

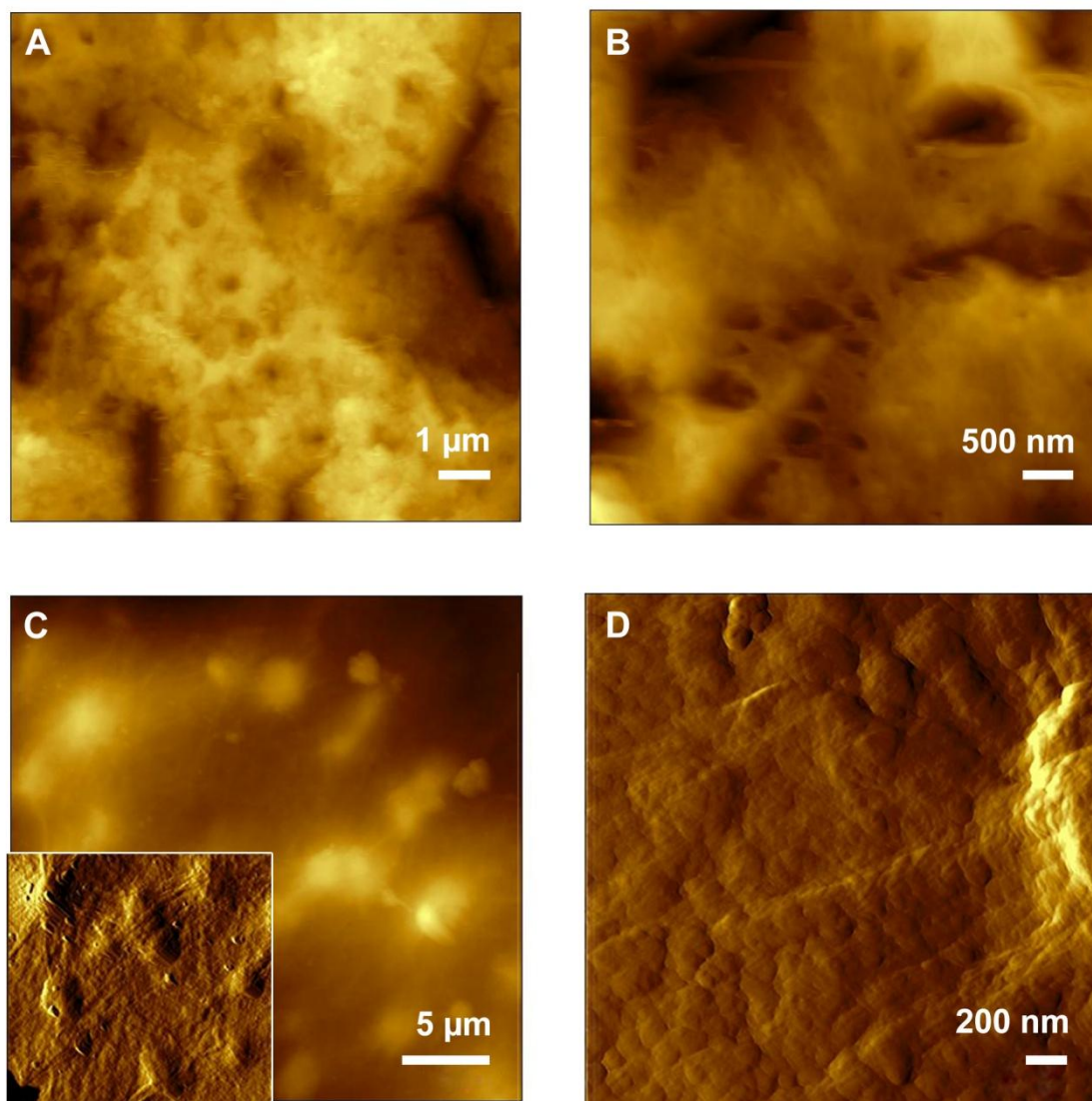
Za potvrdu ovog nalaza netopivi dio organskog matriksa je prikupljen nakon postupka izolacije organske tvari octenom kiselinom za potrebe proteinske analize (prema postupku za izolaciju proteina) i dodatno je ispran, razrijeđen i analiziran (Slika 37C,D). Nerazrijeđen uzorak i dalje zadržava izgled mreže slične onoj snimljenoj na nativnom uzorku (Slika 37A,B), a nakon dodatnog razrijeđenija se ukazuju pojedina vlakna. Ona su visoka između 0,7 i 1,5  $\mu\text{m}$ , a široka između 300 i 600 nm (Slika 37D).

U slijedećem pokusu su uzorci pripremljeni na način da je očuvan mineralni dio, a tretmanom s hipokloritom (1 % NaOCl/4 dana) uklonjen je suvišni organski dio. Na Slici 37 su prikazani dobiveni rezultati. Izgleda da se na dorzalnom štitu dio netopivog organskog matriksa i dalje održava i cijela struktura izgleda i dalje obložena organskim matriksom (Slika 38A,B). Iako bi se slično moglo pomisliti i za ventralnu površinu lamelarnog dijela sipovine (Slika 38C, Slika umetnuta u C, prikaz odstupanja otklona poluge), na većem povećanju (Slika 38D, Slika umetnuta u D, prikaz odstupanja otklona poluge) je vidljivo da taj izgled potječe od agregiranih nakupina aragonita, a ne organske tvari, kao što je to slučaj kod dorzalnog štita (Slika 38B, Slika umetnuta u B, prikaz odstupanja otklona poluge). Prema tome bi se moglo naslutiti kako se u lamelarnom dijelu nalazi puno više topivog organskog matriksa, za razliku od dorzalnog štita, bogatog netopivim organskim matriksom.

**Slika 37**

Topografski AFM prikazi snimljeni u kontaktnom modu rada: rubni centralni dio dorzalnog štita (A), uvećani prikaz hitinskih vlakana vizualiziranih na nativnom uzorku (bijeli kvadrat na slici A) (B), izolirane hitinske niti otapanjem karbonata; analiza vertikalnog presjeka duž naznačenih linija na hitinskim vlaknima (D).



**Slika 38**

Topografski AFM prikaz snimljen u kontaktnom režimu rada. Svi uzorci su tretirani s 1 % natrijevim hipokloritom u trajanju od 4 dana uz konstantno miješanje kako bi se uklonio dio organske tvari s površine uzorka. Dorzalni štit (A i B) te ventralna lamela (C i D). Prikaz greške (umetnuta slika u C i D) ukazuju kako su linije koje djeluju organske u biti sastavljene od nanometarskih aragonitnih nakupina.

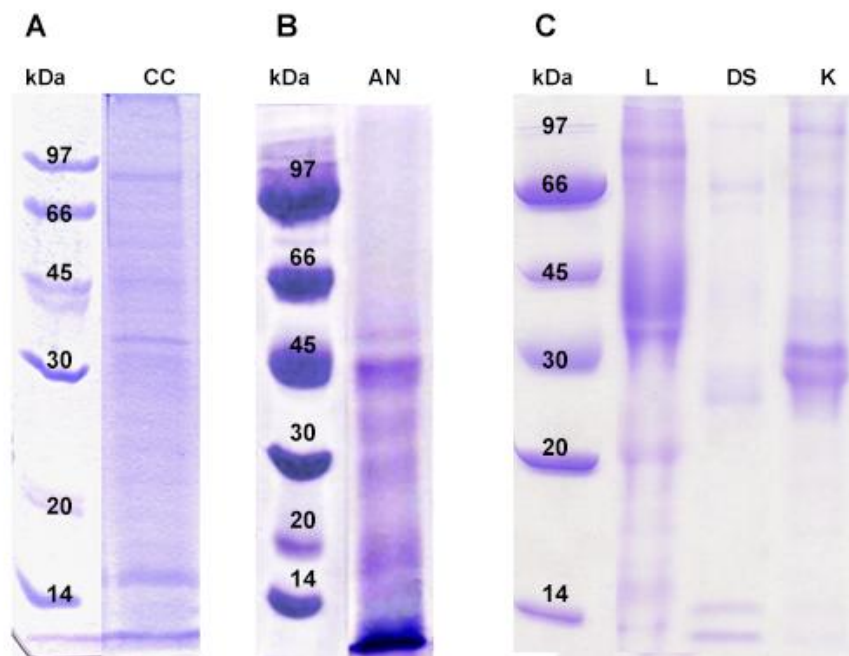
## 4.2. BIOKEMIJSKE ZNAČAJKE BIOMINERALNIH STRUKTURA MORSKIH BESKRALJEŠNJAKA

Topivi proteini organskog matriksa uspješno su izolirani i pročišćeni iz biomineralne strukture koralja, ljušture kunjke te sipovine i njenih pojedinih dijelova. Pri tome su količine ukupnih proteina izoliranih iz sipovine oko 10 puta veće u odnosu na količine proteina koje je bilo moguće izolirati iz skeleta koralja i ljušture kunjke (Tablica 6). Nadalje, pojedini dijelovi sipovine kao npr. lamele su bogatije sadržajem proteina u odnosu na vanjski konus ili dorzalni štit sipovine.

**Tablica 6.** Odnos početne mase uzorka, koncentracije i prinosa ukupnih topivih proteina organskog matriksa skeleta koralja (*Cladocora caespitosa*), ljušture kunjke (*Arca noae*) i sipovine (*Sepia officinalis*).

Uzorak	Ukupna masa uzorka (g)	Koncentracija proteina (mg/mL)	Prinos proteina (mg/g)
Koralj (CC)	40	0,2	0,02
Kunjka (AN)	25	0,35	0,05
Cijela sipovina (SO)	20	2,5	0,44
Dorzalni štit sipovine (DS)	15	1,1	0,26
Konus sipovine (K)	15	2,4	0,56
Lamele sipovine (L)	45	3,2	0,27

Ukupni proteini organskog matriksa su nakon izolacije i pročišćavanja razdvojeni elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima. Profil ukupnih proteina organskog matriksa skeleta koralja, ljušture kunjke i sipovine prikazan je na Slici 39.



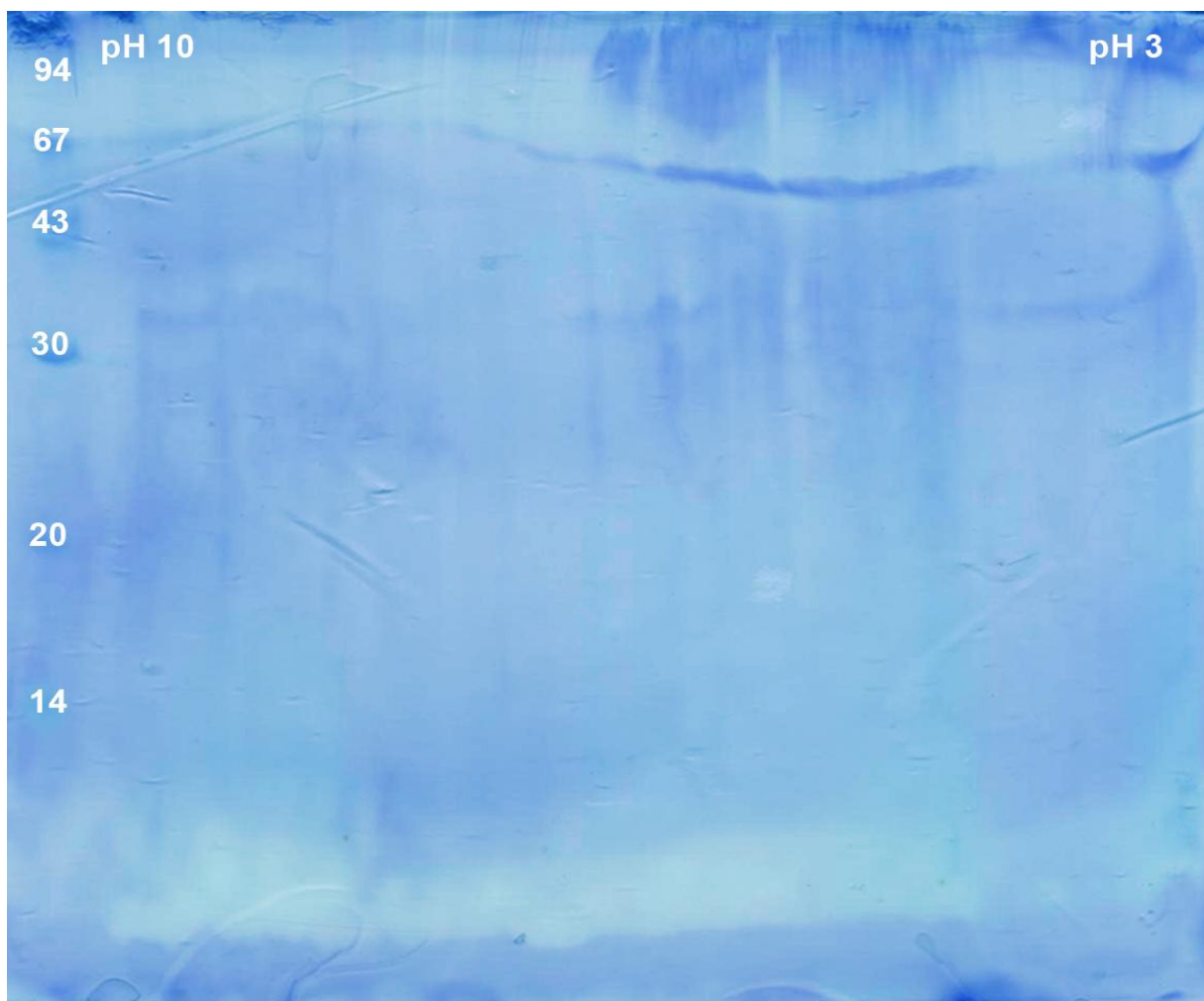
Slika 39

Profil ukupnih proteina skeleta koralja (C; kDa = standardi proteina, CC = skelet koralja), ljušture kunjke (B; kDa = standardi proteina, AN = kunjka) i sipovine (A; kDa = standardi proteina, L = lamele, DS = dorzalni štit, K = konus), razdvojenih elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE).

Proteini izolirani iz koralita koralja prikazuju najizraženije proteine pri 15, 40 i 80 kDa (Slika 39A). U proteinskom izolatu ljušture kunjke izraženiji su proteini molekularnih masa oko 17, 30, 40, 45 i 50 kDa (Slika 39B). Najizraženije proteinske vrpce u ekstraktu proteina lamelnog dijela sipovine su velike otprilike 20, 35, 40, 66 i 80 kDa. Profil proteina izoliranih iz dorzalnog štita (kojem je uklonjen konus) pokazuje da su vrpce izraženije oko 10, 14, 27, 35, 66 i 95 kDa (Slika 39C). Slično štitu, u konusu su prisutni neki od proteina zabilježenih u dorzalnom štitu poput 35, 66 i 95 kDa, ali s jasnije izraženim proteinom mase oko 27 i 30 kDa te puno slabije vidljivim proteinskim vrcama niskih molekularnih masa. Proteini dorzalnog štita i konusa se znatno razlikuju od proteina lamela, što je u skladu s vrlo različitom prirodom tih dviju struktura.

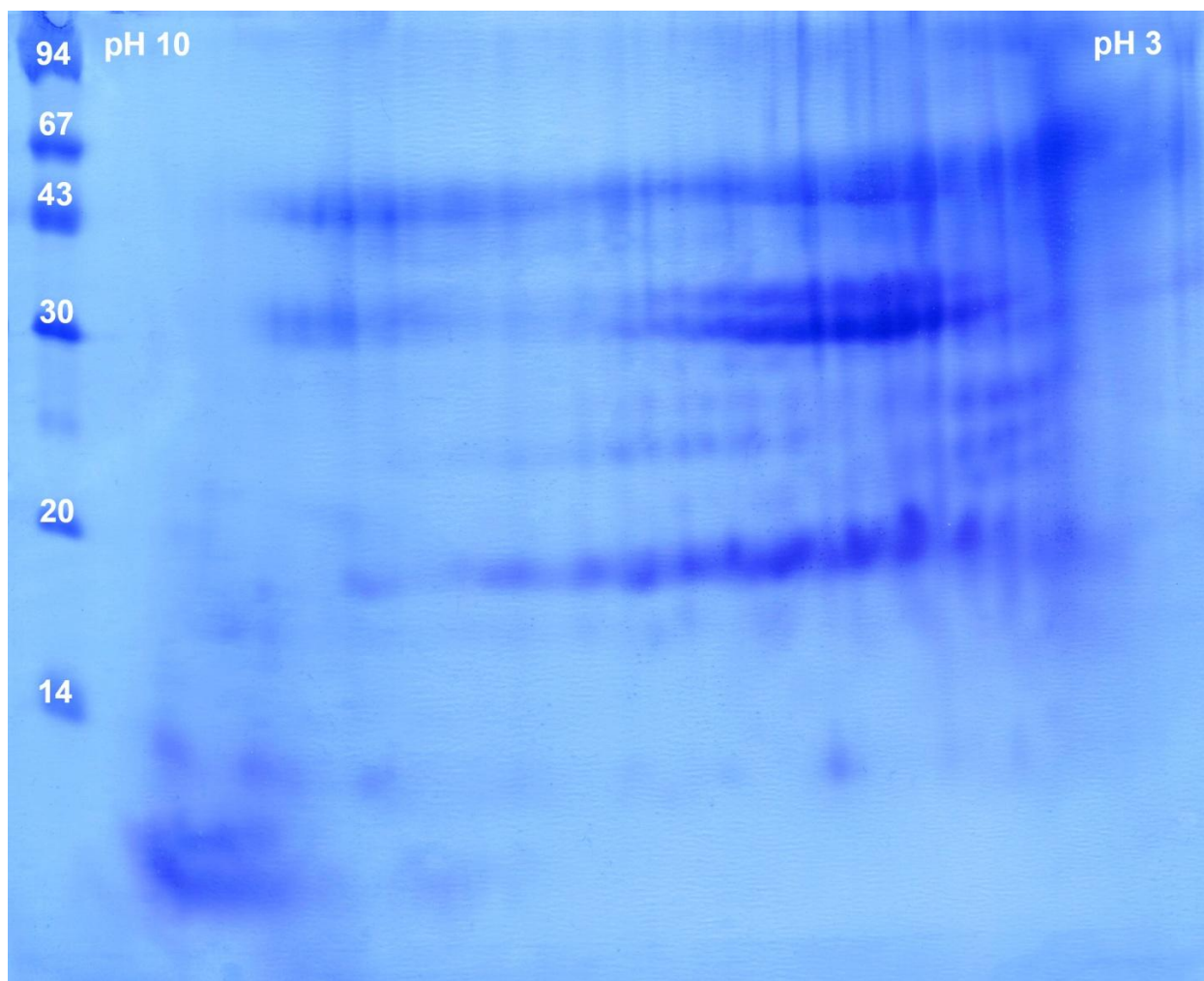
Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE) potvrđuje da u uzorcima kunjke (Slika 40) i sipovine (Slike 41 i 42) prevladavaju kiseli proteini čije su vrpce pozicionirane na gelovima prema nižim pH vrijednostima (oko pH vrijednosti 3-5). Proteini često imaju „šmirasti“ uzorak koji je primijećen i kod jednodimenzionalnih elektroforeza. U slučaju proteina izoliranih iz ljuštore kunjke često se pojavljuju proteinske mrlje u horizontalnim nizovima pri istoj molekularnoj masi, a različitim pH. Takva raspodjela upućuje da se vjerojatno radi o glikoformama odnosno o posttranslacijskim modifikacijama istog proteina. Uzorak kunjke je bilo znatno teže vizualizirati pomoću 2-DE (Slika 42) te primjerice proteini manje molekularne mase jasno vidljivi na jednodimenzionalnom gelu (Slika 39 B) ovdje nisu jasno identificirani.

Molekularne mase proteina vidljivih na gelovima jedno- (Slika 39) i dvodimenzionalne (Slika 41) elektroforeze topivog organskog matriksa sipovine se podudaraju. Lamelle sipovine su karakterizirane s nekoliko izraženijih pruga pri čemu su proteini niskih molekularnih masa oko 10-14 kDa uglavnom bazičnog karaktera. Proteini molekularnih masa 17, 30 i 67 kDa imaju širi izoelektrični raspon. Primjerice, protein molekularne mase 67 kDa proteže se gotovo kroz cijeli spektar, s najizraženijim točkama od pH 4 do pH 6. Dorzalni štit sipovine ima manje raznolike proteine (Slika 42) u odnosu na lamelarni dio, što je prethodno pokazano i jednodimenzionalnom SDS-PAGE (Slika 39). Najizraženiji su bazični proteini (pH 8- 9), molekulske mase oko 8 kDa, te kiseli proteini (pH 3-5) molekulske mase oko 35 kDa. I u uzorku dorzalnog štita vidljivi su vodoravni „šmirovi“ koji mogu ukazivati na glikozilirane proteine.

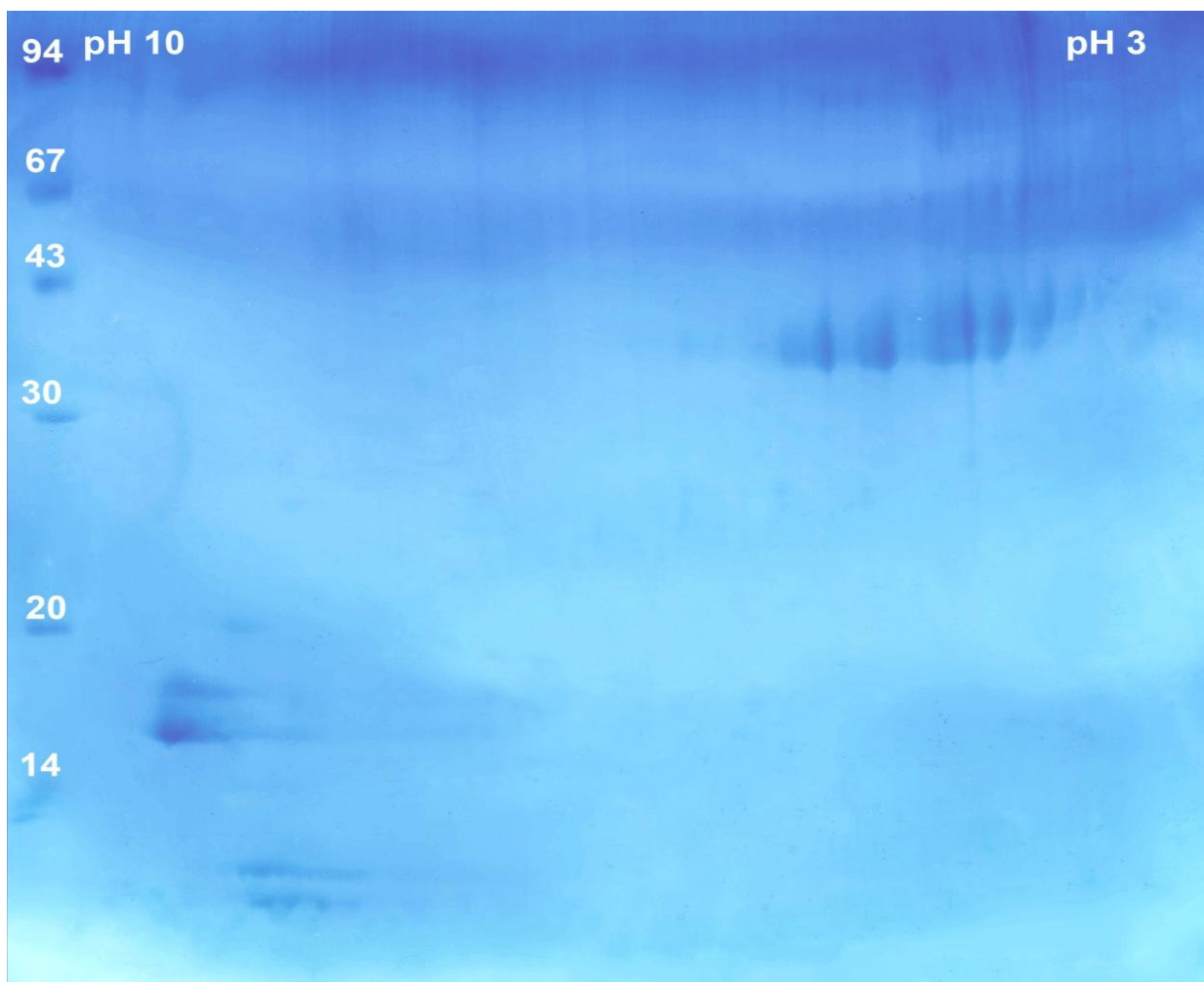


**Slika 40**

Prikaz ukupnih proteina ljuštore kunjke razdvojenih dvodimenzionalnom elektroforezom u 15 % gelu poliakrilamida.

**Slika 41**

Prikaz ukupnih proteina lamelarnog dijela sipovine razdvojenih dvodimenzionalnom elektroforezom u 15 % gelu poliakrilamida.



**Slika 42**

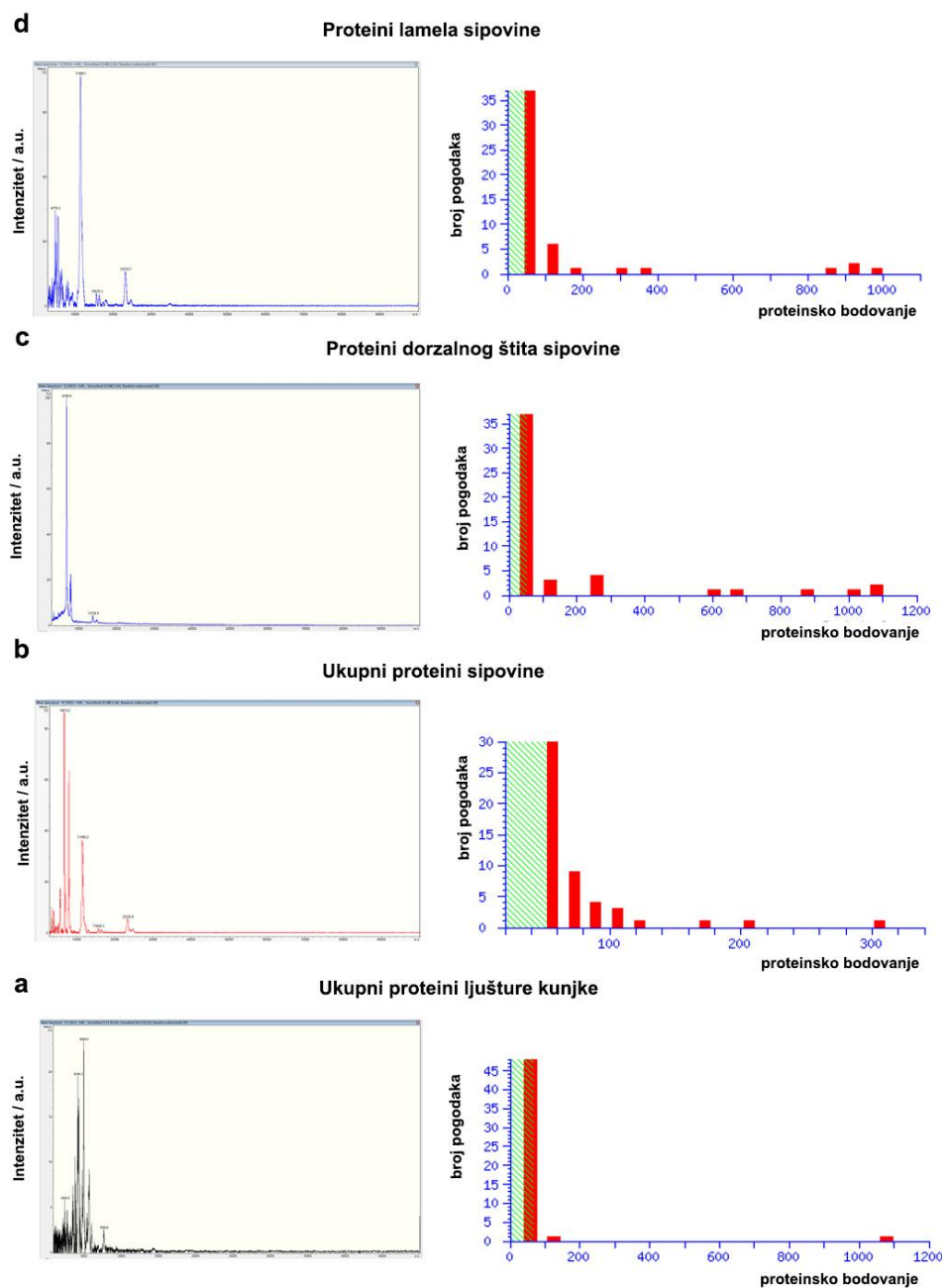
Prikaz ukupnih proteina dorzalnog štita sipovine razdvojenih dvodimenzionalnom elektroforezom u 15 % gelu poliakrilamida.

Proteini biomineralnih struktura kunjke i sipovine analizirani su i tekućinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa (Nano LC-MS). Prvobitne analize pojedinih proteinskih vrpca izreznanih nakon SDS-PAGE nisu rezultirale kvalitetnim spektrima. Stoga su slijedeće analize provedene koristeći otopine ukupnih proteina (Slika 43). Proteinska identifikacija pomoću Mascot programa (Matrix Science, Ltd) rezultirala je s mnogo nedodijeljenih proteinskih pikova, a često se javljaju i lažno pozitivni rezultati. Iako je očito da u uzorcima postoje brojni proteini, usporedba s proteinskim bazama podataka (Swiss-Prot i MSDB) nije dala značajne rezultate. Histogrami (Slika 43) pokazuju nekoliko peptida s visokim ionskim bodovanjem, a analizom je utvrđeno da se radi o peptidima poput keratina, aktina i tripsina. Ti peptidi, iako potencijalno odgovarajući za ovu studiju ne mogu se isključiti kao kontaminacije pri rukovanju (Hodge i sur., 2013) te zbog toga nisu navedeni u popisu rezultata prikazanih tablicama 7-9. Većina proteina vidljiva na histogramima se nalazi u području s malim ionskim bodovanjem, što je oznaka da postoji velika skupina neidentificiranih proteina u uzorku (Slika 43). Kod sva tri ispitana uzorka primijećeni su slični rezultati, jedino na histogramu kunjke se vidi kako je proteinsko bodovanje

U uzorku proteina kunjke najveća sličnost (Tablica 7) je pronađena s dihidrofolat reduktazom iz *Bacteroides* sp. gdje postoji 6 statistički značajnih preklapanja aminokiselinskih sekvenci. Kako je to protein s najvišim preklapanjem, napravljeno je sravnjenje identificiranih peptida kunjke i kompletne proteinske sekvence dihidrofolat reduktaze iz *Bacteroides* sp. (gi|496043202). Utvrđena je podudarnost od 17 % sekvence (Slika 44a).

Statistički značajna preklapanja peptida u ukupnim proteinima sipovine pronađena u bazama podataka prikazana su u Tablici 8. Jedino preklapanje s više od dvije statistički značajne peptidne sekvence pokazuje imunoglobulin G, i to kod 7 različitih vrsta organizama. Ostala statistički značajna preklapanja su vezana uz određene peptide ATP-aznih podjedinica i translokaza koja ne ukazuju na specifične proteine.





Slika 43

Prikaz masenog spektra i pripadajućeg histograma koji prikazuje rezultate pretraživanja cjelokupne baze podataka pomoću Mascot programa: ukupni proteini ljuštore kunjke (a), ukupni proteini sipovine (b), proteini dorzalnog štita sipovine (c), proteini lamela sipovine (d).

**Tablica 7.** Rezultati ukupne Mascot analize proteina kunjke *Arca noae*. Prikazani su proteini s bodovanjem većim od 65 koji pokazuju statistički značajnu homologiju.

Protein	Identifikacijski broj	Masa (Da)	Bodovanje	Aminokiselinska sekvenca sa statistički značajnim preklapanjem ( $p > 0,05$ )
Dihidrofolat reduktaza [ <i>Bacteroides sp.</i> ]	gi 496043202	76329	1079	R.IDFVNGFTESYGDPLGVK.A* K.AEYITFLMNGLMTQLVR.I K.DGNITDVTVSYNEDYVEQMLR.Y* K.ELVYYLTQAALEGRDILFDQNGK.Y K.VITAAILAGDLYPATAIGINLPNAN WIR.A
Transkripcijski regulator LysR obitelji [ <i>Acidiphilium sp.</i> ]	gi 494664965	34639	82	R.VTLTSAGVTLLAQIER.V *
Hipotetski protein [ <i>Methylobacterium mesophilicum</i> ]	gi 498369972	44228	80	K.IMRQADVTPDILQR.S + Oxidation (M)*
Hipotetski protein [ <i>Phytophthora infestans</i> T30-4]	gi 301111472	86880	78	M.QQSAEDAAAELQR.R*

\*jedinstvena sekvenca za ovaj protein

**Tablica 8.** Rezultati ukupne Mascot analize proteina sipovine *Sepia officinalis*. Prikazani su proteini s individualnim ionskim bodovanjem većim od 51 koji pokazuju statistički značajan identitet ili ekstenzivnu homologiju.

Proteini cijele sipovine				
Protein	Identifikacijski broj	Masa	Bodovanje	Aminokiselinska sekvenca sa statistički značajnim preklapanjem ( $p > 0,05$ )
Imunoglobulin G-vežujući protein G	gi 124267	47538	92	K.TFTVTEKPEVIDASELTPAVTTY K.L* K.GETTTEAVDAATAEK.V* 7 setova

Nastavak tablice je na slijedećoj strani

Nastavak tablice s prethodne strane:

rplL genetski produkt <i>E. coli</i> O157:H7	gi 15804576	12288	116	K.FGVSAAA AVAVAAGPVEAAEE KTEFDVILK.A
Podjedinica ATP-aze 9	gi 179255	10480	107	K.FIGAGAATVGVAGSGAGIGTVF GSLIIGYAR.N 180 setova
ADP-ATP translokaza	gi 339723	29331	73	R.GLYQGFSVSVQGIHYYR.A* >30 setova
<b>Proteini dorzalnog štita sipovine</b>				
<b>Protein</b>	<b>Identifikacijski broj</b>	<b>Masa</b>	<b>Bodovanje</b>	<b>Aminokiselinska sekvenca sa statistički značajnim preklapanjem (<math>p &gt; 0,05</math>)</b>
Imunoglobulin G-vežući protein G	gi 124267	47538	78	K.TFTVTEKPEVIDASELTPAVTTY K.L* 8 setova
Hipotetski protein smi_2079 [ <i>S. mitis</i> ]	gi 289168906	93205	69	K.SQELIAGVVDK.L* 7 setova
<b>Proteini lamelarnog dijela sipovine</b>				
<b>Protein</b>	<b>Identifikacijski broj</b>	<b>Masa</b>	<b>Bodovanje</b>	<b>Aminokiselinska sekvenca sa statistički značajnim preklapanjem (<math>p &gt; 0,05</math>)</b>
Poliubikvitin [ <i>Chelon labrosus</i> ]	gi 336111806	12094	124	K.ESTLHLVLR.L K.TITLEVEPSDTIENMRPR.S*
RplL genetski produkt	gi 15804576	12288	116	K.FGVSAAA AVAVAAGPVEAAEE KTEFDVILK.A* 12 setova
Proteolipid protein PLP [ <i>Pelodiscus sinensis</i> ]	gi 15991391	20790	94	K.NYQDYEYLIDVIHAFQYVIYGTA SFFFLYGALLLAEGFYTTGAVR.Q* 3 seta
Glikozilatni transkripcijski regulator [ <i>A. aurescens</i> TC1]	gi 119960892	27185	81	K.SIGDIDSLADLK.L*
Mijelin proteolipid protein [ <i>Homo sapiens</i> ]	gi 187417	30841	79	K.NYQDYEYLINVIHAFQYVIYGTA SFFFLYGALLLAEGFYTTGAVR.Q, * 34 seta
Imunoglobulin G-vežući protein G	gi 124267	47538	72	K.TFTVTEKPEVIDASELTPAVTTY K.L* 8 setova

\*jedinstvena sekvenca za ovaj protein

U proteinima dorzalnog štita sipovine (Tablica 8) nije pronađeno statistički značajno preklapanje proteina kod dvije sekvence, već samo ista peptidna sekvenca imunoglobulina G kao i u prethodnom slučaju, koja se javlja i u lamelarnom dijelu sipovine. U lamelama sipovine je zabilježeno i preklapanje najvećeg broja proteina s 2 peptidne sekvence. S obzirom da se baza podataka temelji na statističkoj vjerojatnosti, ona je tim preciznija što je više sličnih peptida već uneseno u bazu. Na žalost, kod ovako specifičnih peptida u relativno slabo istraženom području biomineralizacije morskih beskralješnjaka s proteomskog aspekta česti su problemi pri identifikaciji (Marie i sur., 2009). Zbog toga je osim cjelokupne baze (Tablica 8, Slika 43) pretražena i sužena baza koja se odnosi samo na taksonomsku skupinu mekušaca (Tablica 9).

Da bi se dodatno specificirali rezultati, uzorak je ispitan koristeći specifičnu bazu podataka za mekušce. Ubikvitin je jedni protein koji se nalazi u rezultatima pretraživanja obje baze. Rezultati ukazuju na sličnost peptida u dorzalnom štitu sipovine s proteinima poput hitin sintaze 1, a lamela s fikolinom-2 i ubikvitinom (Slika 44). Iako je relativno maleno preklapanje sekvenci s danim proteinima (ubikvitin 8,6 %, fikolin-2 3,75 %) ta preklapanja su statistički značajna što znači da se ta sekvenca nalazi u uzorku. U ostalim rezultatima koji imaju veću mogućnost slučajne pojave zabilježena je sekvenca hitin sintaze *C.gigas* u svim dijelovima sipovine (gi|405957609), te se uz ubikvitin pojavljuje i E3 ubikvitin protein ligaza mib 1, (gi|405972091). Prema tipu proteina, za očekivati je da bi se ovi proteini ipak trebali nalaziti u uzorku, ali zbog statističke nesigurnosti nisu navedeni u tablicama 8-9.

**Tablica 9.** Rezultati sušene Mascot analize proteina sipovine *Sepia officinalis*. Prikazani su proteini s individualnim ionskim bodovanjem većim od 24 koji pokazuju statistički značajan identitet ili ekstenzivnu homologiju.

<b>Proteini cijele sipovine</b>				
<b>Protein</b>	<b>Identifikacijski broj</b>	<b>Masa</b>	<b>Bodovanje</b>	<b>Aminokiselinska sekvenca sa statistički značajnim preklapanjem (<math>p&gt;0,05</math>)</b>
Fikolin-2 [ <i>Crassostrea gigas</i> ]	gi 405964369	36954	107	R.RFDGSENFYR.S*
<b>Proteini dorzalnog štita sipovine</b>				
<b>Protein</b>	<b>Identifikacijski broj</b>	<b>Masa</b>	<b>Bodovanje</b>	<b>Aminokiselinska sekvenca sa statistički značajnim preklapanjem (<math>p&gt;0,05</math>)</b>
Tripartit motiv-sadržeci protein 56 [ <i>C.gigas</i> ]	gi 405962460	108410	36	K.DALKYSELCLQK.E*
Hitin sintaza 1 [ <i>C.gigas</i> ]	gi 405957609	189277	32	K.YNGISEICR.I*
<b>Proteini lamela sipovine</b>				
<b>Protein</b>	<b>Identifikacijski broj</b>	<b>Masa</b>	<b>Bodovanje</b>	<b>Aminokiselinska sekvenca sa statistički značajnim preklapanjem (<math>p&gt;0,05</math>)</b>
Fikolin-2 [ <i>C.gigas</i> ]	gi 405964369	36954	98	R.RFDGSENFYR.S*
Ubikvitin [ <i>Biomphalaria glabrata</i> ]	gi 12240012	14949	58	K.ESTLHLVLR.L* 21 set
Fikolin-2, parcijalni [ <i>Crassostrea gigas</i> ]	gi 405964370	20887	35	R.FDGSEDFYR.S*

\*jedinstvena sekvenca za ovaj protein

**A**

MAVTATILASCGGAKTTTAEADKFDYTVVEQFADLQILRYKVPFETLTLKQKELVYYLTQAALEGRDILFD  
 QNGKYNLRIRRMLEAVYTNYKGDKSAPDFKNMEVYLKRVWFNSNGIHHHYGMEKFVPGFSQDFLKQAVLGTD  
 AQLLPLSEGQTAEQLCDELFPVMFDPAILAKRVNQADGEDLVLTSAACNYYDGVTTQQAESFYGAMKDPKDE  
 TPVSYGLNSRLVKEDGKIQEKVWVGGGLYTQAIEKIVYWLKKAETVAENDAQKAVISKLIQFYETGSLKDF  
 DEYAILWVKDLDSRIDFVNGFTESYGDPLGVKASWESLVNFKDLDAHRTEI ISSNAQWFEDHSPVDKSFK  
 KEKVKGVSAKVITAAI LAGDLYPATAIGINLPANWIRAHHGSKSVTIGNITDAYNKAAHGNGFNEEFVCN  
 DEERQRIDQYGDLTGELHTDLHECLGHGSGKLLPGVDPDALKAYGSTIEEARADLFGLYYVADPKLVELKL  
 VPDAEAYKA EYTF LMNGLMTQLVRI EPGNNIEEAHMRNRQLIARWVFEKGAPDKVEMVKKDGKTYVVVN  
 DYEKVRQLFGELLA EIQR IKSTGDFEGARTLVENYAVKVDPALHAEVLARYKKLNLAPYKGFINPVYELVT  
 DKDGNITDVTVSYNEDYVEQMLRY SKDYSPLPSVNN

**B**

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLI FAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVL  
 RL RGGIIEPSLRILASKFNCDKMICRKYARLHPRATNCRKRKCGHTSNIRPKKLLK

**C**

MLHGERFSGPVVTVVATVVGQKQCVKECLARPNLCKGINYQRKHLLECVVSSTEKSESSQDYAKASIEQMDE  
 INSCRACTANQKCVQLKNNSTYCVKDDVDMADCTGYSSISPFLPNGLYRIKLPVVGHVTAFCVMDIDGGGW  
 TVFQRRFDGSENFYRSWAEYKNGFGNITAEFWFGNEKLHLLSQGSFELRMDMSDFTDQTRYVKYTHVDVM  
 DESSKYTISISGYSNGVDCFTGNHI INSMKFTTKDQDNDMDASNNCGILFPSGWWHRSCHCSNPNGLYLA  
 GTNDKFGQGGINYEPWLGYYYSRLRTVRLMVRKVGKKI

**Slika 44**

**A)** SraVnjenje dihidrofolat reduktaze iz *Bacteroides* sp. (gi|496043202) i polipeptida identificiranih u školjki kunjke. Crveno su označena preklapanja sa sekvencom proteina kunjke koja iznose 17 %; **B)** SraVnjenje ubikvitina iz *Biomphalaria glabrata* (gi|12240012) i polipeptida identificiranih u lamelama sipovine. Crveno su označena preklapanja sa sekvencom proteina sipovine koja iznose 8,6 %; **C)** SraVnjenje fikolina-2 iz *Crassostrea gigas* (gi|405964370) i polipeptida identificiranih u lamelama sipovine. Crveno su označena preklapanja sa sekvencom proteina sipovine koja iznose 3,75 %.

S obzirom na poteškoće u identifikaciji proteina masenom spektrometrijom u ukupnom proteinskom uzorku, te kako bi se dobila detaljnija informacija o proteinima organskog matriksa biomineralnih struktura, uzorci su analizirani dvodimenzionalnom elektroforezom. Najistaknutiji proteini nakon razdvajanja dvodimenzionalnom elektroforezom, preneseni su potom na membranu te su bili podvrgnuti analizi N-terminalnog sekvencioniranja. Rezultati Edmanove odgradnje pojedinih proteina lamela i dorzalnog štita sipovine te ljuštore kunjke prikazani su u Tablici 10. Proteini lamelarnog dijela sipovine dijele istu N-terminalnu sekvencu (EASDS), ali imaju različite  $pI$  i molekularne mase, te se vjerojatno radi o različitim posttranslacijskim modifikacijama istog proteina (glikoforme i proteolitički procesuirani oblici).

Opće je poznato da su proteini povezani s biomineralizacijom mekušaca različiti bez jasno izraženih homologa. Nažalost metodom pretrage i usporedbe (BLAST algoritam) dobivenih proteinskih sekvenci (iz Tablice 10) s dostupnim proteinima u bazi podataka NCBI (National Center for Biotechnology information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nismo uspjeli identificirati dotični protein. Slijedom navedenoga može se zaključiti da sipovina ima vrlo specifične proteine koji za sada nisu identificirani i prezentirani u postojećim bazama podataka.

Identifikacija pojedinih proteina metodom dvodimenzionalne elektroforeze u kombinaciji s analizom Edmanove odgradnje bila je uspješnija u slučaju ljuštore kunjke gdje je pronađena homologija s SLC43A proteinom. Kako bi se dodatno ispitala pouzdanost metoda masene spektrometrije i Edmanove odgradnje, izrađena je i posebno prilagođena baza u koju su uneseni podaci prikazani u tablici 10. Kao što je i očekivano, za te peptide je pronađena točna sekvenca, međutim to i dalje ne otkriva njihov identitet, već samo pokazuje kako su oni prisutni u oba uzorka, ali ne i u bazi podataka.

**Tablica 10.** Rezultati N-terminalnog sekvencioniranja metodom Edmanove odgradnje proteina iz sipovine i kunjke.

<b>KUNJKA</b>		
<b>Protein</b>	<b>Ljuštura</b>	<b>NCBI ID</b>
<b>Protein</b>	<b>N-terminalna sekvenca</b>	
~67 kDa	pARPGPGLRL	SLC43A*, Solute carrier family 43 member
<b>SIPOVINA</b>		
<b>Dorzalni štit</b>		
<b>Protein</b>	<b>N-terminalna sekvenca</b>	<b>NCBI ID</b>
~ 10 kDa	VVFRHPHFVCHNVPD	-
~ 35 kDa	EVTLCVTSQQETMTNXSoFloN	-
<b>Lamele</b>		
<b>Protein</b>	<b>N-terminalna sekvenca</b>	
~ 70 kDa	EADSD, DNLXL	-
~ 40 kDa	EADSDGKKSEELMNKNPDA	-
~ 25 kDa	EADSX	-
~ 20 kDa	EADSDGKSSEELMNK	-



## **5. RASPRAVA**

---

### 5.1. BIOMINERALIZACIJSKI PROCESI NA NANOSKALI

U ovom radu detaljno su istražene morfološke strukturne i biokemijske značajke složenih biomineralnih struktura aragonita kod četiri morska beskralješnjaka s ciljem da se detaljno karakterizira njihova građa i dodatno utvrdi postojanost tvrdnje o raširenosti mehanizama agregacije na nanoskali. Istraženi biominerali se razlikuju u građi, ali i u funkciji: koralit kamenog koralja (*Cladocora caespitosa*), služi kao supstrat, školjke kunjke (*Arca noae*) i periske (*Pinna nobilis*) kao zaštita, a sipovina obične sipe (*Sepia officinalis*) za regulaciju plovnosti.

Analizom mineraloških značajki te uporabom naprednih tehnika nanovizualizacije poput FESEM i AFM mikroskopije pokazano je kako se ispitani biominerali koralja, kunjke, periske i sipe sastoje od agregiranih submikrometarskih čestica aragonita okruženih slojem organskog matriksa. Izgledno je kako su početne faze nastanka biomineralne strukture ovdje ispitanih organizama međusobno vrlo komparabilne jer rezultiraju aragonitnim nanočesticama veličine od 50 do 300 nm. Te nanočestice istovremenim odvijanjem procesa agregacije i koalescencije poprimaju gotovo sferičan oblik i čine osnovnu građevnu jedinicu aragonitnih biominerala. Unatoč tome što mnogi biominerali imaju zajedničke karakteristike početnog formiranja, nastanak ovakvih čestica i dalje nije u potpunosti razriješen (Cuif i sur., 2011). Naši rezultati odgovaraju hipotezi o orijentiranom prihvaćanju iona na organskom matriksu, gdje nastaju prvotne neuređene forme amorfnog kalcijevog karbonata (Niederberger i Colfen, 2006). Selektivna fuzija tih formi dovodi do razvoja kristalografski uređenog kalcijevog karbonata, u ovom slučaju aragonitnih nanočestica. Nanočestice se udružuju u veće nakupine te se međusobno spajaju. Organski matriks priječi potpunu agregaciju nanočestica pri čemu nastaju submikrometarske nakupine koje se, vođene matriksom, formiraju u orijentirane i hijerarhijski uređene strukture. Ovakve strukture često zadržavaju polikristalinsku morfologiju, a individualni nanokristali su kristalografski uređeni na način da imaju optička svojstva monokristala te se karakteriziraju kao mezoskopski strukturirani kristali, ili skraćeno, mezokristali (Cölfen, 2007). Od ovdje istraženih struktura do sada su kao mezokristalinske strukture potvrđeni sedef periske i fibrozne podjedinice koralja (Marin i sur., 2011) Međutim, postoje strukture koje ne zadovoljavaju oba ova uvjeta (agregacija na nanoskali i optička svojstva monokristala). Primjerice, Nouet i suradnici

(2012) tvrde kako se iskrižano lamelarna struktura ljuštore *N. undata* ne može smatrati mezokristalom, iako se sastoji od nanogranularnih podjedinica. Jednako tako, za ostale iskrižano lamelarne tipove ljuštura do sada nisu pronađene poveznice s mezokristalima. Nisu pronađeni ni literaturni podaci o povezanosti sipovine i mezokristalinske građe. Ono što povezuje ove strukture sa onima od mezokristala je njihova nanostrukturna građa. Iz dostupnih podataka se stoga može zaključiti da su procesi agregacije na nanoskali rasprostranjeniji od procesa formiranja mezokristala.

Doprinos razumijevanju formiranja biominerala je vidljiv na Slici 31 koja prikazuje ranu fazu nastanka komore sipovine. Vidljiva je sekrecija gelu-sličnog organskog matriksa iz još nepotpuno formiranih lamelarnih zidova, na čijoj će se površini razviti nov sloj stupova. Na rubnom dijelu organskog matriksa prvotno se formiraju aragonitne nakupine u više nukelacijskih lokacija istovremeno, koji će se daljnjim rastom spojiti u stupove komora. Ovo je prema našim saznanjima jedini primjer koji jasno pokazuje kako su rubni dijelovi organskog matriksa ključni pri formiranju ranih mineralizacijskih zona, dok je središnji dio gelu-sličnog matriksa u tom stadiju još „prazan“ . Sa zrenjem dolazi do spajanja ovih zona i formiranja osnove za rast stupova. Nanočestice koje su sastavni dio pojedine zone okružuje organska tvar, a cijela nakupina je omotana slojem organskog porijekla koji sadrži  $\beta$ -hitin (Denton i Gilpin – Brown, 1961a). Ova konstrukcija je održana i u potpuno formiranim stupovima gdje su na poprečnom presjeku vidljive visokoorijentirane nanočestice aragonita bogate isprepletenom organskom tvari, a izvana je stup prekriven hitinskim omotačem (Denton i Gilpin-Brown, 1961a) (Slika 30).

Sličan sistem rasta možemo pronaći i kod sedefa periske. Esteban-Delgado i suradnici (2008) navode kako sedef nastaje tek nakon što prizme prestanu rasti jer tada dolazi do njihovog postepenog prekrivanja interprizmatičnim organskim slojem. Zbog toga se i prve sedefne pločice pojavljuju u ravnini s bridovima prizmi, pseudoheksagonalnog oblika kao posljedica njihovog preferentnog rasta u a-b smjeru, a rastom ih prostorna kompeticija orijentira u pravilno poredane strukture (Checa i Rodríguez-Navarro, 2005). Izrazito interesantna i pravilno poredana mezokristalinska struktura karakterizira građu sedefnih pločica periske. Na Slici 28 prikazan je kompjutorski generirani model rasta sedefnih pločica periske koji se temelji na stvarnim podacima prikupljenim pomoću AFM uređaja. Zbog veličinske distorzije, prikaz visine pločica je

znatno detaljniji nego u stvarnosti te dodatno naglašava novoformirane strukture na nanoskali. Narančasta boja označava područja bogata organskim matriksom (Checa i sur., 2013), koja se poklapaju sa mjestima izbijanja novih aragonitnih izdanaka. Ti izdanci se postepeno spajaju i formiraju novi nivo pločica. Opis mogućeg rasta sedefa periske su ponudili Marin i suradnici (2011) i on se temelji na rastu sedefa ispitanog kod drugih školjkaša. Oni tvrde kako iako prisutnost hitina nije dokazana u perisci, može se pretpostaviti da on prije mineralizacije organizira interlamelarni predložak za rast sedefa. Unutar slojeva hitina ugrađuju se hidrofobni proteini, u kombinaciji s proteinima topivim u kiselinu. Takvi proteini su često bogati karboksilatnim grupama za koje je laboratorijski pokazano da bi mogle imati ulogu u nukleaciji (Tong i sur., 2004), dok bi polimeri bogati sulfatima mogli koncentrirati kalcijeve ione u blizini karboksilatnih grupa (Cuif i sur., 2008). Marin i suradnici (2011) navode kako se na temelju ovako opisanog predloška formira amorfni kalcijev karbonat, koji sazrijeva u aragonit. Nadalje, pretpostavljaju da pločice sedefa rastu od centra i to prvo vertikalno, a zatim lateralno. Međutim, Slika 26 jasno prikazuje kako je sredina sedefne pločice udubljena te kako se novi aragonitni izdanci formiraju na stranama pločica, prema modelu pješčanog sata, opisanog od strane Chece i suradnika (2013) i dodatno karakteriziranog modelom prikazanim na Slici 28. Očito je da se centralni dio zadnji spaja, a ne prvi, te je iz istog razloga udubljen. Moguće je da se na taj način osigurava lokalizacija organskog matriksa na vrhu sedefnog tableta te su time kiseli proteini bitni za nukleaciju uhvaćeni u strukturu, a hidrofobni predložak se potiskuje u stranu i istisne pri sjedinjavanju dviju pločica, što se poklapa s modelom Marina i suradnika (2011). Takav gel polimerizira i formira intertabularni netopivi matriks.

Checa i suradnici (2013) nisu mogli prepoznati površinska svojstva sedefnih pločica koja su ovdje opisana jer su pri karakterizaciji biominerala koristili poliranje, čime se izgubila nativna struktura pločica, a olakšala AFM vizualizacija, koja je zbog prirode same tehnike snimanja otežana kod neravnih uzoraka. Međutim vidljivo je kako se na taj način gube izrazito vrijedni podaci, koji su ovim istraživanjem dodatno potvrđeni na novom uzorku školjke snimljene u tapkajućem modu rada (Slika 27).

Sipovina koristi velike količine gelu sličnog matriksa pri formiranju aragonitnih izbočina koje će se međusobno spojiti i formirati stup komore. Dakle, princip je vrlo sličan sedefnim pločicama,

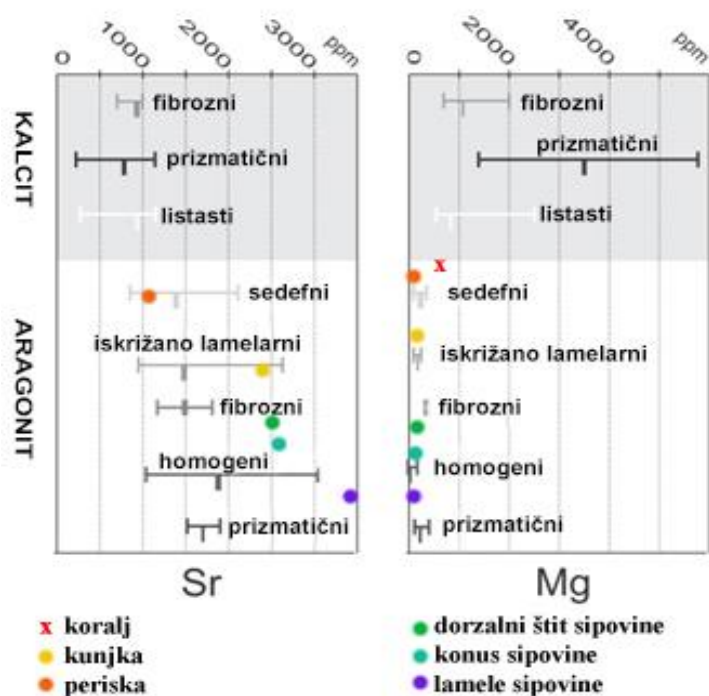
ali razlika je u tome što intertabularni matriks razdvaja sedefne pločice, dok se stupovi komore sipovine ne približavaju jedan drugome već ostaju u zoni organskog matriksa i zahvaljujući tome poprimaju sigmoidalan oblik (Slika 31), a ostatak prostora ostaje neispunjen, čime se omogućuje funkcioniranje plovnosti sipe (Denton i Gilpin- Brown, 1961a). Moguće je da se i kod sipe u organskom omotaču bogatom hitinom nalaze proteini slični mucinu, no nažalost iako je izvršena karakterizacija proteinskog matriksa s posebnim naglaskom na hitinom bogate zone, ovim istraživanjem ta pretpostavka nije potvrđena. Ako oni postoje, za očekivati je da su izgurani rastom aragonitnih nukleusa te da zajedno s hitinom čine omotač vidljiv na slikama 29 i 33. U svakoj komori postoji 6 horizontalnih organskih membranskih izbočenja, koja navodno pomažu u usmjeravanju toka vode (Denton i Gilpin-Brown, 1961b). Moguće je da imaju i dodatnu funkciju, odnosno se rastom stupova u visinu u jednom trenutku omotači dva susjedna stupa dotaknu i time ponovno formiraju temelj za razvoj novog lamelarnog zida. Potvrda ove pretpostavke je i u samoj strukturi donjeg dijela lamelarnog zida koja je izgrađena na isti način kao i stupovi (Dauphin, 1980) (Slika 30). Organizmi uporabom ovih mehanizama mogu brzo i efikasno izgraditi mehanički i funkcionalno napredne biominerale aragonita. Sipa novu komoru formira u otprilike tjedan dana, a u prvoj godini na ovaj način naraste oko 15 cm (Denton i Gilpin-Brown, 1961b). Periska također ima sličnu stopu rasta u prve tri godine života, s prosječnim napredovanjem od 15 cm/god (Marin i sur., 2011). Za razliku od njih, kunjka u istim okolišnim uvjetima naraste 1cm/god (Peharda, 2002). Kunjka posjeduje jednu od najčešće zastupljenih struktura kod mekušaca, iskrižano lamelarnu strukturu, čija su svojstva i način formiranja slabo poznate. Na AFM faznom prikazu se najbolje vidi kako je i naizgled jedinstvena površina unutarnje strane ljuštire kunjke u biti izgrađena od niza agregiranih čestica okruženih organskom tvari, što je uzorak koji se ponavlja u svim ispitanim organizmima. Nouet i suradnici (2012) su predložili model rasta iskrižano lamelarne strukture koji se sastoji od 2 faze: slaganje amorfnog prekursora na organo-mineralne čestice te koalescencija sferoidnih jedinica tijekom rasta kristalne fronte. Slične faze su vidljive i u rastu koralja. Cuif i Dauphin (2005b) opisuju kako se koralj širi koncentrično iz centara kristalizacije u kojima su vidljive rane mineralizirajuće zone, a proces rasta ima 2 faze. U prvoj se na par mikrometara debelom površinskom sloju septe nalazi gelu sličan matriks koji se sinkrono proizvodi za svaku septu i ovdje nastaju sitni,

nasumično poredani kristali (Falini i sur., 2013). Te strukture su zatim prekrivene mineralnim slojevima koji progresivno formiraju vlakna.

Iako se može na prvi pogled činiti neobičnim uspoređivati dvije sistematski relativno udaljene skupine, sličnost u općem modelu izgradnje biomineralnih struktura koralja i školjkaša je velika (Cuif i sur., 2011). Oboje koriste mehanizme ekstracelularne kalcifikacije u kojima glavnu ulogu imaju epitelne stanice (kalikoblastičan epitel koralja, te epitelne stanice plašta školjkaša). Obje strukture definiraju granice biomineralizacijskog područja, zbog čega se moraju pomicati i „rasti“ zajedno sa biomineralom. Pri tome koraliti koriste skelet kao supstrat, a meko tkivo im je u većoj ili manjoj mjeri izloženo vanjskim utjecajima, dok školjkaši primjenjuju obrnutu strategiju i grade svoju ljušturu oko mekog tkiva. Kako se kod školjkaša mineralizacijska zona nalazi uz sam rub plašta (time uglavnom i uz rub ljušture) one obično nisu znatno zadebljale u visinu, odnosno rastu više u dužinu i širinu. Za razliku od njih, koralj stvara novi sloj na ostacima starog, koji može potjecati i od prethodne životinje i ima znatno manju preciznost organizacije svoje strukture (Falini i sur., 2013). Stoga se kaže da koralji rastu u tri, a školjkaši u dvije dimenzije (Cuif i sur., 2011).

Moguća oznaka smanjene selektivnosti pri izgradnji skeleta koralja u usporedbi s ostalim ovdje ispitanim biomineralima je znatno veći udio stroncija i barija u koraljnoj strukturi (Tablica 5). Naime, stroncij i barij su veći elementi od kalcija kojeg mogu zamijeniti pri izgradnji aragonita, a to dovodi do promijene u dimenzijama njegove rešetke što rezultira i različitim karakteristikama. U kalcitnoj rešetci tu ulogu ima magnezij, međutim on ne može ući u strukturu aragonita. Poznato je da magnezij može biti vezan s organskom sastavnicom biominerala (Schone i sur., 2010). Magnezijevi ioni mogu utjecati na stabilizaciju amornog kalcijevog karbonata, faze koja ima veliki utjecaj u početnom stadiju formiranja nanočestica biominerala (Addadi i sur., 2003 i tu citirani radovi). Zbog toga se pronađene koncentracije magnezija u koraljnom skeletu (828,617 µg/g) vjerojatno odnose na one koje su bile pohranjene u organskoj tvari, s mogućim inhibitornim efektom na biomineralizacijske procese (Carter, 1990). Skelet koralja ima jednak postotak organske tvari u svom sastavu kao i ljuštura kunjke, koji iznose 2,5 % (Slika 13). Međutim, zbog svoje građe ljuštura kunjke je znatno otpornija na utjecaj temperature, te joj je završni raspad pri zagrijavanju pomaknut za gotovo 100° C u usporedbi s ostalim ispitanim

vrstama, i time je raspad najbliži anorganskom aragonitu (Slika 13), unatoč tome što ima udio organskog matriksa istovjetan onome u koralju. Obje strukture imaju i visoke koncentracije magnezija, s time da ga ljuštura kunjke ima upola manje (406,289  $\mu\text{g/g}$ ) od skeleta koralja (828,617  $\mu\text{g/g}$ ). Međutim, ta koncentracija je i dalje dvostruko veća u usporedbi s ostalim ispitanim biomineralima (cca 179 – 248  $\mu\text{g/g}$ ).



Slika 46

Usporedba količine stroncija i magnezija u biomineralima koralja, kunjke, periske i sipovine sa količinama tih elemenata prisutnim u tipičnim strukturama mekušaca (udio stroncija u skeletu koralja koralja je oko 9000 ppm pa iz tog razloga nije vidljiv na slici). Modificirano prema Cuif i Dauphin (2011).

Cuif i Dauphin (2005a) navode da sloj bogat magnezijem služi kao signal za zaustavljanje mineralizacije tijekom rasta koralja jer je pozicioniran na vrhu svakog sloja rasta. Raspodjela magnezijevih iona u tom sloju je neovisna o sličnim elementima veznim za organsku tvar, poput sumpora, što je oznaka visoke selektivnosti pri regulaciji i organizaciji rasta biominerala. Ta

velika koncentracija magnezija vjerojatno utječe i na smanjenu brzinu rasta biominerala ove dvije vrste, u usporedbi s mineralima kunjke i sipe.

Slika 46 prikazuje prosječnu koncentraciju metala stroncija i magnezija u tipičnim strukturama mekušaca. Iako sipa spada u mekušce, vidljivo je kako se koncentracija metala u pojedinim djelovima sipovine ne može komparirati sa koncentracijama u tipičnim strukturama školjkaša, za razliku od kunjke i periske, čiji elementni sastav odgovara referentnim vrijednostima njihovih tipova struktura (Slika 46). Koralj, kao što je i očekivano, najviše odudara od navedenih podataka jer se radi o sistematski udaljenoj vrsti koja, kao što je već napomenuto, ima znatno manje reguliranu biomineralizaciju s velikim udjelom stroncija ugrađenim u aragonitnoj strukturi (Tablica 5, Slika 46). Barij ima sličnu sposobnost ugradnje u aragonitnu strukturu kao i stroncij. Njega također ima znatno više u skeletu koralja (10,518  $\mu\text{g/g}$ ) nego u ostalim ispitanim vrstama s iznimkom lamela sipovine (10,763  $\mu\text{g/g}$ ). Lamelle, osim što imaju slične koncentracije barija, sadrže i više mangana (4,932  $\mu\text{g/g}$ ) koja je najviša u sedefu periske (5982,861  $\mu\text{g/g}$ ). Povećanje mangana je vidljivo i u konusu, dijelu sipovine koji je puno manje mineraliziran od dorzalnog štita. Ovaj element je vezan uz organski matriks (Cuif i Dauphin, 2011), a trend njegove veće koncentracije je komparabilan s većim postotkom organske tvari izmjeren u biomineralima periske i sipovine pomoću termalnih analiza.



## **5.2. UTJECAJ ORGANSKOG MATRIKSA NA FORMIRANJE BIOMINERALNIH STRUKTURA**

Proučavanje organskog matriksa biominerala je i dalje u početnim fazama gdje mnoga istraživanja ne donose jasne rezultate zbog kompleksnosti proteina uključenih u ovaj proces i njihovih modifikacija poput glikozilacija, sulfhidriranih polisaharida te fosforilacija aminokiselina serina i treonina (Marin i sur., 2001, 2008). Očito je da se radi o specifičnim proteinima koji ne mogu biti jednostavno identificirani korištenjem postojećih baza podataka koje se zasnivaju na proteomu mikroorganizama, čovjeka te određenih biljnih vrsta. Trenutno nedostaju specifične baze podataka biomineralnih struktura različitih organizama koje bi olakšale identifikaciju nepoznatih proteina od interesa. Proteini su često vrlo raznoliki, bez jasnih strukturnih ili funkcionalnih veza, a uloga im je često vezana uz transport iona, enzimatsku aktivnost, ili izgradnju strukture (Nagasawa, 2004).

S obzirom na način izolacije primijećene su zajedničke karakteristike proteina koji se tijekom izolacije otapaju u kiselini. Iako se pri tom postupku koriste nagrizajuće kiseline, smatra se da proces dekalifikacije ne utječe značajno na svojstva organskog matriksa jer dekalificirajuća otopina i matriks imaju sličan pH (Dauphin, 2006). Topivi proteini organskog matriksa najčešće su bogati kiselim aminokiselinama (Asp, Gly) zbog čega i imaju izoelektričnu točku ispod 4 te se navode kao fiksatori iona kalcija u procesu biomineralizacije (Worms i Weiner, 1986; Cuif i sur., 2011). Proteini koji se ne otapaju u kiselini tijekom te izolacije su uglavnom smatrani proteinima matriksa, odnosno proteinima koji zajedno s hitinom i drugim sastavnicama grade organsku mrežu na kojoj će se odvijati nukleacija (Addadi i sur., 2006; Xie i sur., 2011). Sulfhidrirani kiselinski proteoglikani i polisaharidi su potrebni jer imaju sposobnost stvaranja polimernih mreža koje utječu na građu minerala u nastanku (Cuif i Dauphin, 2005a; Marin i sur., 2011). Vezanje iona kalcija se najvjerojatnije odvija preko negativno nabijenih lanaca aspartatnih i glutamatnih ostataka češće povezanih s kiselim proteinima, uz utjecaj posttranslacijskih modifikacija, a na principu molekularnog prepoznavanja na površini organskog matriksa (Addadi i sur., 2006; Marin i sur., 2011; Nudelman i sur., 2006). Heterogena priroda takvih proteina, njihova različita

lokalizacija i brojna posttranslacijska svojstva odbacuju mogućnost uniformne funkcije proteina organskog matriksa (Fricke i Volkmer, 2007).

Proteini sličnih svojstava su pronađeni i u ovom istraživanju, izolirani iz skeleta koralja, ljuštore kunjke i sipovine (Tablica 6). Nakon detaljne karakterizacije uporabom masene spektrometrije i Edmanove odgradnje nismo bili u mogućnosti točno identificirati ove proteine na temelju pretraživanja proteinskih baza podataka. Slične rezultate su postigli i drugi autori analizirajući primjerice proteine sedefa indijske lađice, čak i kada su koristili pojedine odsječke s 2D gela (Marie i sur., 2009), a ne otopine kao u ovdje prikazanom istraživanju.

Skelet koralita je prethodno analiziran MALDI-TOF masenom spektrometrijom (4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer, USA) (Sondi i sur., 2011a). Kod proteina molekularne mase 80 kDa pronađena je sličnost 5.7% sekvence s ugljičnom anhidrazom *Sulfurilhydrogenibium* sp. Y03A0P1 (identifikacijski broj YP\_001930770). U usporedbi sa sekvencama ugljične anhidraze koralja *Stylophora pistillata* (GenBank: ACE95141.1 i ACA53457.1) identičnost od 20 i 28% je pokazano za ne-konzervirane regije ugljične anhidraze, ali s drugim ugljičnim anhidrazama, osim par konzerviranih regija gotovo i nema preklapanja (Sondi i sur., 2011a). Dakle i ovdje je očito da se radi o proteinima specifičnim za vrstu.

Kod najraširenije, iskrižano lamelarne strukture ljuštore školjkaša situacija je još manje poznata jer je ona manje istraživana s obzirom da je vrlo jako mineralizirana (tj. treba puno više materijala i truda za izolaciju mjerljivih proteina) i komercijalno nije toliko interesantna kao sedef. Najpoznatiji protein koji je izoliran iz iskrižano lamelarne strukture i to iz ljuštore slatkovodnog puža *B. glabrata* je dermatopontin koji podsjeća na onaj sisavaca i indicira moguć razvitak od istog evolucijskog prethodnika (Marxen i Becker, 1997). Nije pronađena sličnost s proteinima izoliranim iz kunjke iako dijele tip strukturne građe. U ljušturi kunjke je pronađena najveća sličnost aminokiselinske sekvence s dihidrofolat reduktazom (Tablica 9), te je prikazano i njihovo sravnjenje (Slika 43) koje pokazuje podudaranje u 17% sekvence. Dihidrofolat reduktaza ima ulogu u regulaciji folata, molekule koja je zadužena za transport atoma ugljika i zabilježena je u svim organizmima (Goodsell, 2015). Ostali identificirani peptidi se sravnjuju u manje od 20 aminokiselinskih ostataka te ne ukazuju na specifične rezultate (Tablica 9).

Mascot analizom je pronađeno parcijalno sravnjenje sekvence s hitin sintazom 1 *Crassostrea gigas* (identifikacijski broj gi|405957609, Tablica 7). Postojanje  $\beta$ -hitina je već dokazano u sipovini (Okafor, 1965, Vino i sur., 2012) pa je unatoč malom sravnjenju sekvence, vrlo vjerojatna prisutnost hitin sintaze u dorzalnom štitu sipovine.

Istraživanje organskog matriksa sipovine se bazira na vrlo ograničenom broju radova gdje nije rađena detaljna proteomska analiza. Jedina detaljnija karakterizacija proteina i to samo iz dorzalnog štita sipovine prikazana je u doktoratu dr. sc. G. Subramanyam (2007) gdje su karakterizirana tri nova proteina, Sep7, Sep8 i Sep17. Ni jedan od njih nije pokazivao homologiju s poznatim aragonitnim proteinima, a Sep7 i Sep8 imaju strukturu  $\beta$ -nabrane ploče, induciraju i stabiliziraju formiranje vaterita, te ispoljavaju koncentracijski ovisno samo-slaganje koje rezultira nanoagregatima. Ti proteini su pronađeni i u izoliranim uzorcima sipovine uporabom posebno izrađene Mascot baze podataka koja se sastojala od sekvenci određenih Edmanovom odgradnjom (Tablica 10) i podataka iz Subramayanam (2007).

U lamelarnom području do sada nisu karakterizirani proteini te ovo istraživanje predstavlja osnovu za buduća istraživanja. Sužena Mascot analiza pokazala je sličnost s fikolinom-2 *C. gigas* (gi|405964369, gi|405964370, Tablica 9), lektinom čija se aktivnost veže uz N-acetilglukozamin, odnosno sastavnicu hitina (Masuta i Misao, 2010). Također, identificiran je i imunoglobulin G (gi|124267, Tablica 8) za kojeg je karakteristično međudjelovanje s fikolinom u imunološkoj zaštiti. Pronađena je i sekvenca ubikvitina (gi|12240012, tablica 9), proteina koji se često povezuje s biomineralizacijom i ulogom vezanja na specifične plohe aragonita (Fang i sur., 2012).

Očito je da se i kod sipovine i kod ljuštare kunjke radi o visokospecijaliziranim proteinima pretežno kiselog karaktera. Rezultati N-terminalnog sekvencioniranja metodom Edmanove odgradnje pokazuju dominaciju Glu i Asp aminokiselinskih ostataka, uz vrlo malo metionina u svojoj strukturi (Tablica 10). Ovo je poznata karakteristika proteina topivog organskog matriksa biominerala (Joubert i sur., 2010; Marie i sur., 2009, 2011; Suzuki i Nagasawa, 2013; Zhao i sur., 2012). U dosad poznatim proteinskim sekvencama također je zabilježeno često ponavljanje dijela sekvence, te modularni multidomenski proteini kao vjerojatna posljedica procesa premještanja egzona, što dovodi do pojave sličnih domena u naizgled nepovezanim proteinima (Xie i sur., 2011). Najviše su proučavani proteini bisera odnosno sedefa, prvenstveno zbog

njihovog komercijalnog potencijala (Nagasawa, 2004). Prvi potpuno sekvencionirani protein je nakrein koji sadrži domene slične ugljičnoj anhidrazi s umetnutim Gly-X-Asn ponavljajućim jedinicama za ione kalcija, a sam protein djeluje na način da kontrolira koncentraciju bikarbonatnih iona i utječe na rast inhibicijom procesa kalcifikacije (Miyamoto i sur., 2005, Suzuki i Nagasawa, 2013). Inhibitornu funkciju ima i mukoperlin, jedini diferencirani protein matriksa aragonita u ljušturi periske, bogat prolinskim i serinskim ostacima (Marin i sur., 2000, 2003). Predložen model nastanka sedefa periske podupire hipotezu da bi mukoperlin pri rastu minerala mogao biti istisnut u intertabularni prostor (zona pritisnuta s dvije bočne strane pločice sedefa), gdje je i lokaliziran histološkim bojanjem (Marin i sur., 2000, 2011). Autori opisuju mukoperlin kao protein bogat aminokiselinama serina i prolina te glikozilacijama i zaključuju da se radi o sekretornom mucinu koji je vrlo specifičan jer, za razliku od nakreina, ne reagira s ekstraktima kalcitnog sloja ljuštire periske, već samo sa sedefnim ekstraktima. Histološkim bojanjem je pokazano da je mukoperlin smješten samo u sedefnom sloju i to najviše u intertabularnim zonama, a nešto manje u interlamelarnom matriksu. Uloga mucina kod drugih životinjskih vrsta često je vezana uz kalcifikaciju. Primjerice, mucini sline sprečavaju kalcifikaciju, vežu se na hidroksiapatit zuba i sprečavaju njegovu demineralizaciju, a u urinu sprečavaju nastanak kalcij oksalata ili urične kiseline (Marin i sur., 2011). Moguće je da su na ovaj način mukoperlin i njemu slični proteini umreženi u hitinski omotač gdje kontroliraju oblik biominerala te usmjeravaju rast sedefnih pločica prema središtu, kao što je ranije opisano u predstavljenom modelu početnog rasta sedefa periske. Lustrin, mrežni protein sedefa je također karakteriziran serinskim i prolinskim ostacima, koji uz glicin i cistein čine 50% ukupnog aminokiselinskog sastava ovog proteina, karakteriziranog kao elastomer sa svojstvima adhezije, smješten unutar mreže mineraliziranog matriksa petrovog uha (Shen i sur., 1997). U sedefu su zabilježeni i razni drugi proteini, posebice vezani uz kontrolu kristalnog rasta i morfologiju poput N 16 (pearlin) koji sudjeluje u slaganju početne mreže za mineralizaciju (Ponce i Evans, 2011), MSI7 koji inducira kalcifikaciju (Schen i sur., 1997), N 14 koji pokazuje svojstva ugljične anhidraze (Suzuki i Nagasawa, 2013) i slično. Ovdje izolirani i analizirani proteini ne pokazuju sličnosti sa literaturno opisanim i okarakteriziranim proteinima sedefa. Međutim, mogu biti indikativni u razumijevanju općeg procesa rane faze mineralizacije. Primjerice, naznake postojanja sulfhidriranih

modifikacija bi mogle biti indikacija postojanja sličnih granula onima iz sekreta plašta *P. fucata*. Tu su identificirana dva tipa organskih granula *P. fucata*: metakromatske u kojima koncentracija sulfatnih grupa raste do početka kalcifikacije (nakon čega opada), i eozinofilne koje postaju dio organskih zidova ili periostrakuma (Suzuki i Nagasawa, 2013). Periostrakum je lokacija početne kalcifikacije, gdje se prije kristalizacije kalcij karbonata javlja amorfnu fazu koju organski matriks i okolni ioni mogu stabilizirati dovoljno dugo da nastane biološki kompozit prema gore opisanom modelu (Addadi i sur., 2006; dePaula i Silveira, 2009; Gower, 2008). Proteini koji sudjeluju u nukleaciji aragonita su uglavnom lokalizirani u centru mineralizacijskih zona te u prostoru kao što je interlamelarni prostor sedefa (Marin i sur., 2011; Nudelman i sur., 2006). Mrežni proteini u sedefu bogati aminokiselinskim ostacima alanina i glicina ispunjavaju prostor između dva interlamelarna sloja u hidratiziranom gelu prije biomineralizacije (Nudelman i sur., 2006). U ovaj proces su moguće upleteni i lipidi, steroli, trigliceridi i masne kiseline, koje su također zabilježene kao sastavni dio organskog matriksa (Farre i Dauphin, 2009). Iz navedenog je očito kako za procese biomineralizacije nije zadužen jedan protein već međudjelovanje proteinskih kompleksa koji jedino zajedničkim, točno tempiranim djelovanjem u odgovarajućim uvjetima rezultiraju biomineralnim svojstvima.

Iako je nesumnjivo da je ovakav specifičan organski matriks zaslužan za toliku raznolikost struktura koje se mogu pronaći kod biomineralizirajućih organizama, stupanj njegove raznolikosti i specifičnosti je veći nego što se očekivalo pa divergentna evolucija proteina matriksa nije vjerojatna (Nagasawa, 2004). Raznolikost proteina koji su izolirani iz ljuštura kalcificirajućih organizama govori kako su se evolucijski ti mehanizmi vrlo rano razvili i specificirali (Marin i Luquet, 2004). Što je manje organske tvari u biomineralnoj strukturi, to je metabolički „jeftinije“ proizvesti tu strukturu. Međutim, takvim strukturama je potreban duži period rasta. Zbog toga sipa, koja živi prema principu „živi brzo i umri mlad“ mora trošiti puno energije na proizvodnju biominerala, što je upravo moguć razlog izoliranosti ovakve strukture, za razliku od strukturnog mehanizma kunjke ili koralja koji su znatno više rasprostranjeni. Slično je i kod sedefa gdje je evolucijski vidljiva tendencija smanjenja njegove proizvodnje i supstitucija s energetski povoljnijim materijalima. Tijekom procesa evolucije te zahvaljujući fiziološkim adaptacijama izgledno je kako su ovi organizmi od početno sličnog mehanizma biomineralizacije

prilagodili strukturne karakteristike specifičnim fiziološkim potrebama organizama. Tu prvenstveno prednjači sipa koja svoj biomineral koristi kao jedinstven sustav za regulaciju plovnosti. Zbog toga je dodatno potrebno ulaganje velike količine organskog matriksa koji osigurava pravilnu izgradnju visoko porozne strukture.

### 5.3. MOGUĆNOSTI UPORABE BIOMINERALIZACIJE ZA RAZVOJ NOVIH METODA I PROIZVODNJU BIOMATERIJALA

Struktura sipovine je intrigantna za istraživanje jer pokazuje veliki potencijal uporabe u biomedicini zbog njene građe i visoke poroznosti (Clarke i sur., 2011; Čadež, 2011). Prostorni razmaci u sipovini iznose 200 do 600  $\mu\text{m}$ , što je idealan medij za osteogenezu (Cadman i sur., 2009). Zbog toga se sipovina u novije doba najviše ispituje s ciljem njene uporabe kao zamjenskog materijala za kost, odnosno mogućnosti njene konverzije u hidroksiapatit te uporabe kao bioimplantata (Cadman i sur., 2012, 2013; Ivankovic i sur., 2010; Okumuş i Yildirim, 2005; Orlić i sur., 2006; Rocha i sur., 2005). U slične svrhe se ispituju i ljuštore školjkaša, s naglaskom na sedef (Clarke i sur., 2011). Sedef je već komercijaliziran u obliku praha ProOsteon® koji se koristi kao dentalni ispun i postiže vrlo dobre rezultate (Clarke i sur., 2011; Čadež, 2011; Rousseau, 2011; Westbroek i Marin, 1998). Osim same osteogene aktivnosti, ovakvi materijali imaju i dodatnu mogućnost za uporabu kao dostavljači lijekova, jer bi svojom građom mogli omogućiti i ravnomjernije otpuštanje lijekova pri zarastanju (Čadež, 2011). Nadalje, zbog različite fiziologije ovakav tip biomaterijala ne predstavlja opasnost od prijenosa zaraznih bolesti što dodatno naglašava važnost ovakvih istraživanja u budućnosti (Clarke i sur., 2011).

Osim uporabe već formiranih biomineralnih struktura, veliki potencijal uporabe postoji i u bioinspiriranim načinima pripreme naprednih materijala koji su već u mnogim poljima znatno unaprijedile industriju (Chen i sur., 2012; Flammang, 2010; Meyers i sur., 2011). Iako je moguće u laboratorijskim uvjetima postići precipitaciju čestica kalcijevog karbonata u ambijentalnim uvjetima uporabom samo otopine soli u prisutnosti organskih tvari poput uree (Wang i sur., 1999), dodatkom prikladnog enzima ovom procesu ta reakcija se znatno ubrzava te se javlja i metastabilna faza, bitna pri razumijevanju fiziologije živih organizama (Raz i sur., 2003; Sondi i Matijević, 2001). U ovim pokusima je pokazano kako je već sama prisutnost enzima dovoljna za poticanje mineralizacije, odnosno aktivnost organizma nije potrebna da se razviju biominerali sa specifičnim karakteristikama (Sondi i Salopek-Sondi, 2005). Ova metoda je uspješno razvijena i u

sustavima precipitacije manganskog karbonata te njegove konverzije u manganske okside a takva, biomimetički inspirirana pretvorba, ima široku mogućnost uporabe u raznim industrijama (Škapin i sur., 2015). Istraživanja laboratorijski inducirane precipitacije karbonata uporabom enzima ureaze u različitim sustavima su pokazala kako bogat karboksilni karakter kiselih aminokiselinskih ostataka omogućava kontrolu amorfne faze na način da stabilizira inače vrlo nestabilan polimorf  $\text{CaCO}_3$ , vaterit (Sondi i Salopek-Sondi, 2005). Dodatno pojednostavljenje procesa, proučavanjem samo jedne aminokiseline i njenog utjecaja na biomineralizaciju je pokazalo kako aminokiseline mogu sterički sprečavati daljnju agregaciju biominerala u nastanku čime dolazi i do stabilizacije polimorfa poput amornog kalcijevog karbonata ili vaterita te kako i najmanja promjena u aminokiselinskoj sekvenci može dovesti do različitih završnih svojstava biokristala (Ren i sur., 2011; Sondi i Salopek - Sondi, 2005; Tong i sur., 2004). Naravno da aminokiselinski sastav nije jedini faktor koji utječe na rast biominerala jer on ovisi i o aditivima, okolišnim uvjetima, prostornim ograničenjima i sličnom (Addadi i sur, 2006; Cuif i sur., 2011). Za biomineralizacijske procese je posebno važan utjecaj magnezija, koji može promijeniti termodinamičke uvjete interakcijom s nanokristalitima kalcita pri velikom omjeru Mg/Ca, kao što je to slučaj u moru (50-60 mM  $\text{Mg}^{2+}$  vs. 12 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) do te mjere da će se spriječiti formiranje kalcita, te stabilizirati ACC faza (Gower, 2008). Također, dodatak inhibitora će utjecati na stabilnost primarnih čestica pri njihovom nastanku, te je agregacija jedini način da se one povećaju (Meldrum i Hyde, 2001; Prieto, 1994).

Bitan faktor pri formiranju primarnih čestica u laboratorijskim uvjetima predstavlja i negativan naboj čestica pri agregaciji. S obzirom da su čestice dovoljno male, elektrostatska barijera njihovog negativnog naboja nije dovoljno velika te pri njihovim sudarima one vrlo brzo mogu agregirati u nano-nakupine, što i predstavlja osnovu procesa agregacije na nanoskali, u ovom slučaju potaknute biomimetički (Sondi i sur., 2008, 2010).

Sferične čestice anhidridnih spojeva kalcijevog karbonata slične onima postignutim laboratorijskim pokusima se često mogu naći i široko rasprostranjene u prirodi, te se može smatrati da je uporaba mehanizma orijentirane agregacije u prirodnim sistemima znatno rasprostranjenija nego što se prije smatralo (Cölfen, 2007; Sondi i sur., 2010, 2011a). Pojava organski inducirane anorganske precipitacije kalcijevog karbonata također slijedi proces



inicijalnog formiranja nanokristalinskih čestica i njihove agregacije u veće nakupine vidljivih nanoagregata (Sondi i sur., 2011b). Iako ovaj proces nije vođen organskim matriksom na način kao što je to kod biomineralizacije morskih organizama, njihova morfologija na nanorazini otkriva mnoge sličnosti mehanizama početnog formiranja. S obzirom da proteine organskog matriksa karakterizira veliki broj kiselih aminokiselinskih ostataka, razmatrano je da bi početni sloj karboksilatnih ostataka mogao privlačiti i usmjeravati ione kalcija u epitaksijalno vođenu biomineralizaciju posredovanu stereokemijskim slaganjem, međutim ovo nije uspješno dokazano (Fricke i Volkmer, 2007).

Na žalost, na temelju same precipitacije biominerala u laboratoriju uporabom samo jednog izoliranog proteina teško će se razumjeti način na koji se formiraju biominerali u prirodi. Također, predviđanje načina na koji biominerali nastaju je ambiciozan i riskantan posao, pogotovo na temelju već stvorenog, odraslog biominerala koji je osušen (izvan prirodnog okruženja). Nadalje, trenutno je poznat samo mali dio proteina u sastavu biominerala, a Jackson i suradnici (2006) su pokazali kako u izgradnji biomineralnih struktura sudjeluju i druge sastavnice koje se ne ugrađuju u biomineralnu strukturu te je njihova funkcija pri izgradnji biominerala trenutno ignorirana (Marin i sur., 2011).

Koje su poveznice koncepta mezokristala i nanoagregacijskih procesa, je li to isključivo dio kemijskog procesa ili je on biološki kontroliran te možemo li barem djelomično upotrijebiti saznanja u biomimetici i prije nego li otkrijemo sve tajne biomineralizacijskih procesa na nanorazini samo su neka od pitanja koja su ovdje raspravljena. Za jasnije odgovore potrebna su svakako dodatna istraživanja. Ako je koncept agregacije na nanorazini stvarno toliko raširen, za pretpostaviti je da će biti prisutan i u sistematski jednostavnijim organizmima, kao i u onim kompleksnijim. Usporedbom četiri tipa biominerala kod morskih beskralješnjaka koji imaju i različite stope biomineralizacije, dobiven je uvid u kompleksnost ovih mehanizama na nanoskali, te su predloženi koncepti i dalje održivi. Daljnji koraci u istraživanju su usmjereni u izolaciju specifičnih proteina iz organskog matriksa, njihovo de-novo sekvencioniranje te ispitivanje utjecaja na laboratorijski induciranu biomineralizaciju uporabom samo jednog proteina, smjese svih topivih proteina, te izmjenom nukleacijskih supstrata, po uzoru na slična istraživanja (Levi i

sur., 1998; Ma i sur., 2012; Qiao i sur., 2011; Zhang i sur., 2012). Nadalje, prema već uhodanoj metodi biomimetički inducirane precipitacije anhidrida kalcijevog karbonata, planirana je uporaba novih enzima koji bi mogli imati potencijalnu ulogu u biomineralizaciji, poput ugljične anhidraze. Važnost ovakvih ispitivanja nije samo u razumijevanju bioloških procesa mineralizacije, već i u razvoju novih metoda razvoja čestica s unaprijed određenim karakteristikama koje imaju i značajan industrijski potencijal, te u boljem razumijevanju tih struktura koje imaju značajan potencijal uporabe u biomedicini.

## **6. ZAKLJUČCI**

---

- U ovom radu detaljno su istražene morfološke, strukturne i biokemijske značajke složenih biomineralnih struktura aragonita kod četiri morska beskralješnjaka: kamenog koralja (*Cladocora caespitosa*), kunjke (*Arca noae*), periske (*Pinna nobilis*) i obične sipe (*Sepia officinalis*).
- Metodom rendgenske difrakcije utvrđeno je da su sve ispitane biomineralne strukture izrađene isključivo od aragonita. Utvrđene su strukturne značajke aragonita na nativnim uzorcima, prvenstveno veličina i orijentacija nano-kristalita. Termička istraživanja su pokazala da 2,5% ukupne mase biomineralne strukture koralja, 2,5% kunjke, 2% periske i 6% ukupne mase sipovine pripada organskom matriksu.
- Stroncij i barij su bogato zastupljeni u svim biomineralnim strukturama kao posljedica njihove ugradnje (izomorfne zamjene) u kristalnu strukturu aragonita. U strukturu skeleta koralja se lakše ugrađuju elementi poput stroncija, barija i magnezija u usporedbi s drugim ispitanim organizmima. Ljuštura kunjke također sadrži dvostruko veće koncentracije magnezija (406,29  $\mu\text{g/g}$ ) od ostalih mekušaca (179-226  $\mu\text{g/g}$ ), no one su i dalje upola manje od koralja (828,62  $\mu\text{g/g}$ ). Ovo ukazuje na smanjenu kontrolu izomorfniham zamjena kod organizama jednostavnije biološke građe.
- Biomineralna struktura koralja i kunjke ima karakterističnu pojavu ranih mineralizacijskih zona koncentričnog oblika sa sferičnim česticama aragonita 50 nm veličine, te starije, potpuno formirane zone ispunjene paralelnim nizovima aragonitnih štapića promjera 100-150 nm, poredane u nizove duge nekoliko desetaka mikrometara.
- Sipovina obične sipe ima kompliciranu strukturnu građu koja se sastoji od višeslojnih lamelarnih zidova sa pravilnom raspodjelom slojeva čiji se smjerovi rasta precizno izmjenjuju i služe kao temelj za rast stupova, odnosno formiranje komore. Strukturu prekriva dorzalni štit koji je bogat netopivim organskim matriksom. Iz njega su izolirana i karakterizirana hitinska vlakna promjera od 300 do 600 nm.
- Na temelju morfološke i strukturne karakterizacije sipovine obične sipe po prvi puta je opisan proces nastanka nove komore. Uporabom AFM podataka generiran je i kompjutorski model nastanka novog sloja sedefa periske koji je nadopunio do sada postojeći prijedlog izgradnje te strukture.

- Strukturna i morfološka karakterizacija svih uzoraka ukazuje da je njihova građa na nanoskali vrlo slična. Sastoji se od sitnih granula, velikih nekoliko desetaka nanometara, okruženih organskim slojem koji priječi njihovu daljnju agregaciju. Pokazano je kako su strukture formirane ekstracelularnom precipitacijom, procesom orijentirane agregacije na nanoskali.
- Uspješno su izolirani ukupni proteini organskog matriksa iz biomineralnih struktura sipovine, kunjke i koralja. Najveće količine proteina izmjerene su u sipovini (0,44 mg/g) dok su ljuštura kunjke i skelet koralja sadržavale oko 10 puta manje proteina (0,05 i 0,02 mg/g).
- Jednodimenzionalnom elektroforezom u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE) ukupni proteini izolirani iz biomineralnih struktura su razdvojeni i identificirane su najizraženije proteinske vrpce prema molekulskim masama: 20, 35, 40, 60 i 67 kDa u sipovini; 17, 40, 45 i 50 kDa u ljušturi kunjke te 15, 40 i 80 kDa u skeletu koralja. Dvodimenzionalnom gel elektroforezom (2-DE) dodatno su analizirani uzorci proteina. Potvrđeno je da su proteini većinom kiselog karaktera, pozicionirani na gelu u području pH 3-5.
- Analiza proteina sipovine i kunjke tekućinskom kromatografijom sa spektrometrom masa (Nano LC-MS) nije rezultirala pronalaskom komplementarnih proteina u bazama podataka. Očito je da se radi o visokospecifičnim proteinima koji do sada nisu zabilježeni u bazama podataka, a pokazuju određeni stupanj sličnosti s hitin sintazom, fikolinom-2, ubikvitinom i imunoglobulinom G.
- Dodatna analiza najistaknutijih proteina sipovine izoliranih iz 2-DE gelova metodom Edmanove odgradnje je rezultirala identifikacijom N-terminalne sekvence za 2 proteina dorzalnog štita, te 4 proteina lamelnog dijela. Zabilježeno je i često ponavljanje sekvence EADS u lamelama sipovine kod sva 4 proteina što ukazuje da se radi o različitim posttranslacijskim modifikacijama istog proteina (glikoforme i alternativno proteolitički procesuirani oblici). Pretraživanjem baze podataka za protein mase od oko 67 kDa i pH 3 izoliranog iz ljuštire kunjke pokazano je 100% preklapanje s proteinom „solute carrier family 43 member“ koji je karakteriziran kao membranski protein.

## **7. LITERATURA**

---

1. Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., Weiner, S., 2006. Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry*. 12, 980–987.
2. Addadi, L., Raz, S., Weiner, S., 2003. Taking advantage of disorder: amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization. *Adv. Mater.* 15, 959–970.
3. Allemand, D., Ferrier-Pagès, C., Furla, P., Houlbrèque, F., Puvarel, S., Reynaud, S., Tambutté, É., Tambutté, S., Zoccola, D., 2004. Biomineralisation in reef-building corals: from molecular mechanisms to environmental control. *Comptes. Rendus. Palevol.* 3, 453–467.
4. Bachmeier, K.L., Williams, A.E., Warmington, J.R., Bang, S.S., 2002. Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *J. Biotechnol.* 93, 171–181.
5. Balen, B., Pavoković, D., Peharec Štefanić, P., Krsnik-Rasol, M., 2011. Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Hrvatska sveučilišna naknada, Zagreb, str. 126.
6. Borowitzka, M.A., 1982. Morphological and cytological aspects of algal calcification. *Int. Rev. Cytol.* 74, 27-162.
7. Braye, F., Irigaray, J.L., Jallot, E., Oudadesse, H., Weber, G., Deschamps, N., Deschamps, C., Frayssinet, P., Tourermet, P., Tixier, H., Terve, S., Lefavirell, J., Amirabad, A., 1996. Resorption kinetics of osseous substitute : natural coral and svnthetic hydroxyapatite. *Biomaterials.* 17, 1345–1350.
8. Čadež, V., 2011. Nove metode priprave bioimplantanata: značaj istraživanja biomineralne strukture morskih beskralješnjaka za razumijevanje procesa mineralizacije kralješnjaka. *Med. Vjesn.* 43, 91–101.
9. Cadman, J., Chang, C.-C., Chen, J., Chen, Y., Zhou, S., Li, W., Li, Q., 2013. Bioinspired lightweight cellular materials--understanding effects of natural variation on mechanical properties. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 33, 3146–3152.
10. Cadman, J., Chen, Y.H., Zhou, S.W., Li, Q., 2010. Assessing the effects of natural variations in microstructure for the biomimetic modeling of cuttlebone. *Adv. Mater. Res.* 123-125, 295–298.
11. Cadman, J., Zhou, S., Chen, Y., Li, Q., 2012. Cuttlebone: characterisation, application and development of biomimetic materials. *J. Bionic Eng.* 9, 367–376.

12. Cadman, J., Zhou, S., Chen, Y., Li, W., Appleyard, R., Li, Q., 2009. Characterization of cuttlebone for a biomimetic design of cellular structures. *Acta Mech. Sin.* 26, 27–35.
13. Carter, J.G., 1990. Skeletal biomineralization: patterns, processes and evolutionary trends Vol I and II “Atlas and Index.” Van Nostrand Reinhold, New York. str. 832.
14. Checa, A.G., Rodríguez-Navarro, A.B., Esteban-Delgado, F.J., 2005. The nature and formation of calcitic columnar prismatic shell layers in pteriomorphian bivalves. *Biomaterials* 26, 6404–6414.
15. Chen, P.-Y., McKittrick, J., Meyers, M.A., 2012. Biological materials: functional adaptations and bioinspired designs. *Prog. Mater. Sci.* 57, 1492–1704.
16. Clarke, S.A., Walsh, P., Maggs, C.A., Buchanan, F., 2011. Designs from the deep: marine organisms for bone tissue engineering. *Biotechnol. Adv.* 29, 610–617.
17. Cölfen, H., Antonietti, M., 2005. Mesocrystals: inorganic superstructures made by highly parallel crystallization and controlled alignment. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44, 5576–5591.
18. Cölfen, H., Antonietti, M., 2008. Mesocrystals and nonclassical crystallization. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. str. 276.
19. Cölfen, H., Mann, S., 2003. Higher-order organization by mesoscale self-assembly and transformation of hybrid nanostructures. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42, 2350–2365.
20. Cuif, J., Allemand, D., Flamand, D., Frerotte, B., 1985. Etude ultrastructurale de la transition prismes/nacre dans le test de *Pinna nobilis* L. (Mollusque, Lamellibranche). *Sci. Rep. Port. Cros. Natl. Park. Fr.* 11, 95–107.
21. Cuif, J.P., Dauphin, Y., 2005a. The environment recording unit in coral skeletons: structural and chemical evidences of a biochemically driven stepping-growth process in coral fibres. *Biogeosciences*. 2, 61-73.
22. Cuif, J.-P., Dauphin, Y., 2005b. The two-step mode of growth in the scleractinian coral skeletons from the micrometre to the overall scale. *J. Struct. Biol.* 150, 319–31.
23. Cuif, J.P., Dauphin, Y., Farre, B., Nehrke, G., Nouet, J., Salomé, M., 2008. Distribution of sulphated polysaccharides within calcareous biominerals suggests a widely shared two-



- step crystallization process for the microstructural growth units. *Mineral. Mag.* 72, 233–237.
24. Cuif, J.-P., Dauphin, Y., Gautret, P., 1999. Compositional diversity of soluble mineralizing matrices in some recent coral skeletons compared to fine-scale growth structures of fibres: discussion of consequences for biomineralization and diagenesis. *Int. J. Earth Sci.* 88, 582–592.
  25. Cuif, J.-P., Dauphin, Y., Sorauf, J.E., 2011. *Biominerals and fossils through time*. Cambridge University Press. str. 504.
  26. Dauphin, Y., 1980. Zoologie - Organisation microstructurale de l'os de Seiche (Cephalopoda - Dibranchiata). *C. R. Seances Acad. Sci.* 6, 619–622.
  27. Dauphin, Y., 2002. Comparison of the soluble matrices of the calcitic prismatic layer of *Pinna nobilis* (Mollusca, Bivalvia, Pteriomorpha). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 132, 577–590.
  28. Dauphin, Y., 2003a. Microstructure, nanostructure and composition of the shell of *Concholepas concholepas* (Gastropoda, Muricidae). *Aquat. Living Resour.* 16, 95–103
  29. Dauphin, Y., 2003b. Soluble organic matrices of the calcitic prismatic shell layers of two Pteriomorphid bivalves *Pinna nobilis* and *Pinctada margaritifera*. *J. Biol. Chem.* 278, 15168–15177.
  30. Dauphin, Y., 2006. Structure and composition of the septal nacreous layer of *Nautilus macromphalus* L. (Mollusca, Cephalopoda). *Zoology (Jena)*. 109, 85–95.
  31. De Paula, S.M., Silveira, M., 2009. Studies on molluscan shells: contributions from microscopic and analytical methods. *Micron* 40, 669–690.
  32. Denton, E., Gilpin-Brown, J., 1961a. The buoyancy of the cuttlefish, *Sepia officinalis* (L.). *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 41, 319–342.
  33. Denton, E., Gilpin-Brown, J., 1961b. The distribution of gas and liquid within the cuttlebone. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 41, 365–381.
  34. Denton, E., Gilpin-Brown, J.B., Howarth, J., 1961. The osmotic mechanism of the cuttlebone. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 41, 351–364.

35. Drake, J.L., Mass, T., Falkowski, P.G., 2014. The evolution and future of carbonate precipitation in marine invertebrates: Witnessing extinction or documenting resilience in the Anthropocene? *Elem. Sci. Anthr.* 5, 1-26.
36. Ehrlich, H., Koutsoukos, P.G., Demadis, K.D., Pokrovsky, O.S., 2009. Principles of demineralization: Modern strategies for the isolation of organic frameworks. Part II. Decalcification. *Micron.* 40, 169–193.
37. Falini, G., Fermani, S., Vanzo, S., 2005. Influence on the formation of aragonite or vaterite by otolith macromolecules. *Eur. JIC.* 2005, 162–167.
38. Falini, G., Reggi, M., Fermani, S., Sparla, F., Goffredo, S., Dubinsky, Z., Levi, O., Dauphin, Y., Cuif, J.-P., 2013. Control of aragonite deposition in colonial corals by intra-skeletal macromolecules. *J. Struct. Biol.* 183, 226–238.
39. Farre, B., Dauphin, Y., 2009. Lipids from the nacreous and prismatic layers of two Pteriomorpha mollusc shells. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 152, 103–109.
40. Feng, Q., 2011. Principles of Calcium-based biomineralization. *Mol. Biominer., Progress in Molecular and Subcellular Biology.* 52, 141–197.
41. Flammang, P., Satos, R. 2015. Marine adhesives : from biology to biomimetics. *Biological adhesives. Interface Focus.* 5, 1-3.
42. Florek, M., Fornal, E., Gómez-Romero, P., Zieba, E., Paszkowicz, W., Lekki, J., Nowak, J., Kuczumow, A., 2009. Complementary microstructural and chemical analyses of *Sepia officinalis* endoskeleton. *Mater. Sci. Eng. C* 29, 1220–1226.
43. Fricke, M., Volkmer, D., 2007. Crystallization of Calcium Carbonate Beneath Insoluble Monolayers : Suitable Models of Mineral – Matrix Interactions in Biomineralization? *Top Curr Chem.* 270, 1–41.
44. Furuhashi, T., Miksik, I., Smrz, M., Germann, B., Nebija, D., Lachmann, B., Noe, C., 2010. Comparison of aragonitic molluscan shell proteins. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 155, 195–200.

45. Goffredo, S., Vergni, P., Reggi, M., Caroselli, E., Sparla, F., Levy, O., Dubinsky, Z., Falini, G., 2011. The skeletal organic matrix from Mediterranean coral *Balanophyllia europaea* influences calcium carbonate precipitation. PLoS One. 6, e22338.
46. Gower, L.B., 2008. Biomimetic model systems for investigating the amorphous precursor pathway and its role in biomineralization. Chem. Rev. 108, 4551–4627.
47. Green, D.W., Lai, W.-F., Jung, H.-S., 2014. Evolving marine biomimetics for regenerative dentistry. Mar. Drugs. 12, 2877–2912.
48. Gutowska, M. A., Melzner, F., Pörtner, H.O., Meier, S., 2010. Cuttlebone calcification increases during exposure to elevated seawater pCO<sub>2</sub> in the cephalopod *Sepia officinalis*. Mar. Biol. 157, 1653–1663.
49. Hayashi, A., Watanabe, T., Nakamura, T., 2010. Crystalline arrangement and nanostructure of aragonitic crossed lamellar layers of the *Meretrix lusoria* shell. Zoology 113, 125–130.
50. Hedegaard, C., 2006. Molluscan shell pigments: an in situ resonance raman study. J. Molluscan Stud. 72, 157–162.
51. Hodge, K., Ten Have, S., Hutton, L., Lamond, A.I., 2013. Cleaning up the masses: Exclusion lists to reduce contamination with HPLC-MS/MS. J. proteomics. 88, 92-103.
52. Ivanković, H., Tkalčec, E., Orlić, S., Ferrer, G.G., Schauerl, Z., 2010. Hydroxyapatite formation from cuttlefish bones: kinetics. J. Mater. Sci. Mater. Med. 21, 2711–2722.
53. Jackson, D.J., McDougall, C., Green, K., Simpson, F., Wörheide, G., Degnan, B.M., 2006. A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. BMC Biol. 4, 40.
54. Jia, X., Qian, W., Wu, D., Wei, D., Xu, G., Liu, X., 2009. Cuttlebone-derived organic matrix as a scaffold for assembly of silver nanoparticles and application of the composite films in surface-enhanced Raman scattering. Colloids Surf. B. Biointerfaces. 68, 231–7.
55. Joubert, C., Piquemal, D., Marie, B., Manchon, L., Pierrat, F., Zanella-Cléon, I., Cochennec-Laureau, N., Gueguen, Y., Montagnani, C., 2010. Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: focus on biomineralization. BMC Genomics. 11, 613.
56. Katti, K.S., Katti, D.R., 2006. Why is nacre so tough and strong? Mater. Sci. Eng. C 26, 1317–1324.

57. Knoll, A.H., 1989. Biomineralization and evolutionary history. *Rev. Mineral. Geochem.* 54, 329–356.
58. Kružić, P., Požar - Domac, A., 2002. Skeleton growth rates of coral bank of *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in lake Veliko jezero (Mljet National Park). *Period. Biol.* 104, 123–129.
59. Kurtović, T., Brgles, M., Leonardi, A., Lang Balija, M., Sajević, T., Križaj, I., Allmaier, G., Marchetti-Deschmann, M., Halassy, B., 2014. VaSP1, catalytically active serine proteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom with unconventional active site triad. *Toxicon.* 77, 93–104.
60. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680–685.
61. Levi, Y., Albeck, S., Brack, A., Weiner, S., Addadi, L., 1998. Control over aragonite crystal nucleation and growth: an in vitro study of biomineralization. *Chem. - A Eur. J.* 4, 389–396.
62. Li, W., Liu, L., Chen, W., Yu, L., Li, W., Yu, H., 2010. Calcium carbonate precipitation and crystal morphology induced by microbial carbonic anhydrase and other biological factors. *Process Biochem.* 45, 1017–1021.
63. Lojen, S., Sondi, I., Juračić, M., 2010. Geochemical conditions for the preservation of recent aragonite-rich sediments in Mediterranean karstic marine lakes (Mljet Island, Adriatic Sea, Croatia). *Mar. Freshw. Res.* 61, 119–128.
64. Lowenstam, H., Weiner, S., 1989. *On biomineralization.* Oxford University press, New York. str. 336.
65. Ma, Y., Qiao, L., Feng, Q., 2012. In-vitro study on calcium carbonate crystal growth mediated by organic matrix extracted from fresh water pearls. *Mater. Sci. Eng. C* 32, 1963–1970.
66. Mann, S., 2001. *Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry.* Oxford University Press. str. 675.
67. Marie, B., Marin, F., Marie, A., Bédouet, L., Dubost, L., Alcaraz, G., Milet, C., Luquet, G., 2009. Evolution of nacre: biochemistry and proteomics of the shell organic matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. *Chembiochem.* 10, 1495–1506.

68. Marie, B., Trinkler, N., Zanella-Cleon, I., Guichard, N., Becchi, M., Paillard, C., Marin, F., 2011. Proteomic identification of novel proteins from the calcifying shell matrix of the Manila clam *Venerupis philippinarum*. *Mar. Biotechnol.* (NY). 13, 955–962.
69. Marin, F., Amons, R., Guichard, N., Stigter, M., Hecker, A., Luquet, G., Layrolle, P., Alcaraz, G., Riondet, C., Westbroek, P., 2005. Caspartin and calprismín, two proteins of the shell calcitic prisms of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis*. *J. Biol. Chem.* 280, 33895–33908.
70. Marin, F., Corstjens, P., de Gaulejac, B., de Vrind-De Jong, E., Westbroek, P., 2000. Mucins and molluscan calcification. Molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, pteriomorphia). *J. Biol. Chem.* 275, 20667–20675.
71. Marin, F., de Groot, K., Westbroek, P., 2003. Screening molluscan cDNA expression libraries with anti-shell matrix antibodies. *Protein Expr. Purif.* 30, 246–252.
72. Marin, F., Luquet, G., 2004. Molluscan shell proteins. *Comptes. Rendus. Palevol.* 3, 469–492.
73. Marin, F., Luquet, G., 2005. Molluscan biomineralization: The proteinaceous shell constituents of *Pinna nobilis* L. *Mater. Sci. Eng. C* 25, 105–111.
74. Marin, F., Luquet, G., 2008. Unusually acidic proteins in biomineralization. *Handbook of Biomineralization*. Wiley Online Library, 273–290.
75. Marin, F., Narayanappa, P., Motreuil, S., 2011. Acidic shell proteins of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis*. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 52, 353–395.
76. Marin, F., Roy, N. Le, Marie, B., 2012. The formation and mineralization of mollusk shell. *Front. Biosci.* 4, 1099–1125.
77. Marin, F., Smith, M., Isa, Y., 1996. Skeletal matrices, mucí, and the origin of invertebrate calcification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 1554–1559.
78. Marxen, J.C., Becker, W., 1997. The organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 118, 23–33.
79. Meldrum, F.C., Hyde, S.T., 2001. Morphological influence of magnesium and organic additives on the precipitation of calcite. *J. Cryst. Growth.* 231, 544–558.

80. Meyers, M. a, Chen, P.-Y., Lopez, M.I., Seki, Y., Lin, A.Y.M., 2011. Biological materials: a materials science approach. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 4, 626–657.
81. Meyers, M.A., Chen, P.-Y., Lin, A.Y.-M., Seki, Y., 2008. Biological materials: Structure and mechanical properties. *Prog. Mater. Sci.* 53, 1–206.
82. Meyers, M.A., McKittrick, J., Chen, P.-Y., 2013. Structural biological materials: critical mechanics-materials connections. *Science.* 339, 773–779.
83. Miyamoto, H., Miyoshi, F., Kohno, J., 2005. The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*. *Zoolog. Sci.* 22, 311–315.
84. Montagna, P., McCulloch, M., Mazzoli, C., Silenzi, S., Odorico, R., 2007. The non-tropical coral *Cladocora caespitosa* as the new climate archive for the Mediterranean: high-resolution (~weekly) trace element systematics. *Quat. Sci. Rev.* 26, 441–462.
85. Morton, B., 2012. The biology and functional morphology of *Nucula pusilla* (Bivalvia: Protobranchia: Nuculidae) from Western Australia, Australia: primitive or miniature simplicity? *Rec.West.Austr.Museum.* 27, 85-100.
86. Morton, B., Jones, D., 2009. A new genus and species of barnacle (Cirripedia, Pedunculata) commensal with *Arca Navicularis* Bruguière, 1789 (Mollusca, Bivalvia, Arcoidea) from Queensland, Australia, with an Analysis of the Relationship. *Crustaceana.* 82, 847–868.
87. Nagasawa, H., 2004. Macromolecules in biominerals of aquatic organisms. *Thalass. An Int. J. Mar. Sci.* 20, 15-24.
88. Natoli, A., Wiens, M., Schröder, H.-C., Stifanic, M., Batel, R., Soldati, A.L., Jacob, D.E., Müller, W.E.G., 2010. Bio-vaterite formation by glycoproteins from freshwater pearls. *Micron.* 41, 359–366.
89. Nelyubina, Y. V, Lyssenko, K. a, 2012. From “loose” to “dense” crystalline phases of calcium carbonate through “repulsive” interactions: an experimental charge-density study. *Chemistry.* 18, 12633–12636.
90. Niu, L.-N., Zhang, W., Pashley, D.H., Breschi, L., Mao, J., Chen, J.-H., Tay, F.R., 2014. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent. Mater.* 30, 77–96.

91. Nudelman, F., Gotliv, B.A., Addadi, L., Weiner, S., 2006. Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *J. Struct. Biol.* 153, 176–187.
92. Okafor, N., 1965. Isolation of chitin from the shell of the cuttlefish, *Sepia officinalis* L. *Biochim. Biophys. Acta* 101, 193–200.
93. Okumuş, Z., Yildirim, Öm.S., 2005. The cuttlefish backbone: A new bone xenograft material? *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 29, 1177–1184.
94. Oliver, P.G., Holmes, A.M., 2006. The Arcoidea (Mollusca: Bivalvia): a review of the current phenetic-based systematics. *Zool. J. Linn. Soc.* 148, 237–251.
95. Olsen, J. V, de Godoy, L.M.F., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., Makarov, A., Lange, O., Horning, S., Mann, M., 2005. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol. Cell. Proteomics.* 4, 2010–2021.
96. Orlić, S., Ivanković, H., Tkal, E., 2006. Preparation of highly porous hydroxyapatite ceramics from cuttlefish bone, 11. Conference on Materials, Processes, Friction and Wear MATRIB'06, Vela Luka, 162-167.
97. Peharda, M., Richardson, C.A., Onofri, V., Crnc, M., Bratoš, A., Crnčević, M., 2002. Age and growth of the bivalve *Arca noae*, L. in the Croatian Adriatic sea. *J. Molluscan Stud.* 68, 307–310.
98. Peirano, A., Morri, C., Bianchi, C., Rodolfo-Metalpa, R., 2001. Biomass, carbonate standing stock and production of the Mediterranean coral *Cladocora caespitosa* (L.). *Facies.* 44, 75–80.
99. Pokroy, B., Fitch, A.N., Marin, F., Kapon, M., Adir, N., Zolotoyabko, E., 2006a. Anisotropic lattice distortions in biogenic calcite induced by intra-crystalline organic molecules. *J. Struct. Biol.* 155, 96–103.
100. Pokroy, B., Fitch, A.N., Zolotoyabko, E., 2006b. The microstructure of biogenic calcite: a view by high-resolution synchrotron powder diffraction. *Adv. Mater.* 18, 2363–2368.
101. Ponce, C.B., Evans, J.S., 2011. Polymorph crystal selection by N16, an intrinsically disordered nacre framework protein. *Cryst. Growth Des.* 11, 4690–4696.

102. Porter, S.M., 2010. Calcite and aragonite seas and the de novo acquisition of carbonate skeletons. *Geobiology*. 8, 256–277.
103. Przeniosło, R., Stolarski, J., Mazur, M., Brunelli, M., 2008. Hierarchically structured scleractinian coral biocrystals. *J. Struct. Biol.* 161, 74–82.
104. Qiao, L., Feng, Q., Lu, S., 2011. In vitro growth of nacre-like tablet forming: from amorphous calcium carbonate, nanostacks to hexagonal tablets. *Cryst. Growth Des.* 2008 59, 1–6.
105. Raz, S., Hamilton, P.C., Wilt, F.H., Weiner, S., Addadi, L., 2003. The transient phase of amorphous calcium carbonate in sea urchin larval spicules: the involvement of proteins and magnesium ions in its formation and stabilization. *Adv. Funct. Mater.* 13, 480–486.
106. Ren, D., Feng, Q., Bourrat, X., 2011. Effects of additives and templates on calcium carbonate mineralization in vitro. *Micron*. 42, 228–245.
107. Rocha, J.H.G., Lemos, a F., Agathopoulos, S., Valério, P., Kannan, S., Oktar, F.N., Ferreira, J.M.F., 2005. Scaffolds for bone restoration from cuttlefish. *Bone*. 37, 850–857.
108. Rousseau, M., 2011. Nacre, a Natural Biomaterial. *Biomater. Appl. Nanomedicine*. 281–298.
109. Sarayu, K., Iyer, N.R., Murthy, a R., 2014. Exploration on the biotechnological aspect of the ureolytic bacteria for the production of the cementitious materials--a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 2308–2323.
110. Saruwatari, K., Matsui, T., Mukai, H., Nagasawa, H., Kogure, T., 2009. Nucleation and growth of aragonite crystals at the growth front of naces in pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Biomaterials*. 30, 3028–3034.
111. Schone, B.R., Zhang, Z., Jacob, D., Gillikin, D.P., Tutken, T., Garbe-Schonberg, D., McConnaughey, T., Soldati, A., 2010. Effect of organic matrices on the determination of the trace element chemistry (Mg, Sr, Mg/Ca, Sr/Ca) of aragonitic bivalve shells (*Arctica islandica*)-Comparison of ICP-OES and LA-ICP-MS data. *Geochem. J.* 44, 23–37.
112. Shen, X., Belcher, A.M., Hansma, P.K., Stucky, G.D., Morse, D.E., 1997. Molecular cloning and characterization of lustrin a, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. *J. Biol. Chem.* 272, 32472–32481.



113. Sherrard, K.M., 2000. Cuttlebone morphology limits habitat depth in eleven species of *Sepia* (Cephalopoda: Sepiidae). *Biol. Bull.* 198, 404–414.
114. Siletić, T., Peharda, M., 2003. Population study of the fan shell *Pinna nobilis* L. in Malo and Veliko Jezero of the Mljet National Park (Adriatic Sea). *Sci. Mar.* 67, 91–98.
115. Sondi, I., Bišćan, J., Vdović, N., Škapin, S.D., 2009. The electrokinetic properties of carbonates in aqueous media revisited. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 342, 84–91.
116. Sondi, I., Juračić, M., 2010. Whiting events and the formation of aragonite in Mediterranean Karstic Marine Lakes: new evidence on its biologically induced inorganic origin. *Sedimentology.* 57, 85–95.
117. Sondi, I., Matijević, E., 2001. Homogeneous precipitation of calcium carbonates by enzyme catalyzed reaction. *J. Colloid Interface Sci.* 238, 208–214.
118. Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2005. Influence of the primary structure of enzymes on the formation of CaCO<sub>3</sub> polymorphs: a comparison of plant (*Canavalia ensiformis*) and bacterial (*Bacillus pasteurii*) ureases. *Langmuir.* 21, 8876–8882.
119. Sondi, I., Salopek-Sondi, B., Škapin, S.D., Šegota, S., Jurina, I., Vukelić, B., 2011a. Colloid-chemical processes in the growth and design of the bio-inorganic aragonite structure in the scleractinian coral *Cladocora caespitosa*. *J. Colloid Interface Sci.* 354, 181–189.
120. Sondi, I., Škapin, S., Jurina, I., Slovenec, D., 2011b. A novel concept in the growth and design of anhydrous carbonate minerals: nano-scale aggregation mechanisms. *Geol. Croat.* 64, 61–65.
121. Sondi, I., Škapin, S. 2010. A biomimetic nano-scale aggregation route for the formation of submicron-size colloidal calcite particles. *Biomimetics, Learning from Nature*, Amitava Mukherjee (Ed.) InTECH, Rijeka. 241–256.
122. Stempflé, P., Pantalé, O., Rousseau, M., Lopez, E., Bourrat, X., 2010. Mechanical properties of the elemental nanocomponents of nacre structure. *Mater. Sci. Eng. C* 30, 715–721.
123. Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K., Bang, S.S., 1999. Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>. *Soil. Biol. Biochem.* 31, 1563-1571.

124. Subramanyam, G., 2007. Biochemical approaches to investigate biomineralization of magnesium calcite and aragonite. National University of Singapore, Thesis. str. 172.
125. Škapin, S., Sondi, I., 2005. Homogeneous Precipitation of Mixed Anhydrous Ca-Mg and Ba-Sr Carbonates by Enzyme-Catalyzed Reaction. *Cryst. Growth Des.* 5, 1933–1938.
126. Škapin, S.D., Sondi, I., 2010. Synthesis and characterization of calcite and aragonite in polyol liquids: control over structure and morphology. *J. Colloid Interface Sci.* 347, 221–226.
127. Tiseanu, I., Craciunescu, T., Mandache, N.B., Dului, O.G., 2005.  $\mu$ -X-Ray computer axial tomography. Application In Life Sciences. *J. Optoelectron Adv. M.* 7, 1073–1078.
128. Tong, H., Ma, W., Wang, L., Wan, P., Hu, J., Cao, L., 2004. Control over the crystal phase, shape, size and aggregation of calcium carbonate via a L-aspartic acid inducing process. *Biomaterials.* 25, 3923–3929.
129. Veis, A., 2008. An introduction, in biomineralization: from nature to application, Volume 4. John Wiley & Sons. 4, 1–35.
130. Vidavsky, N., Addadi, S., Mahamid, J., Shimoni, E., Ben-Ezra, D., Shpigel, M., Weiner, S., Addadi, L., 2014. Initial stages of calcium uptake and mineral deposition in sea urchin embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 39–44.
131. Vino, A.B., Ramasamy, P., Shanmugam, V., Shanmugam, A., 2012. Extraction, characterization and in vitro antioxidative potential of chitosan and sulfated chitosan from Cuttlebone of *Sepia aculeata* Orbigny, 1848. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, S334–S341.
132. Waller, T.R., 1980. Scanning electron microscopy of shell and mantle in the order Arcoida (Mollusca: Bivalvia). *Smithson. Contrib. to Zool.* 1–58.
133. Wang, L., Sondi, I., Matijević, E., 1999. Preparation of uniform needle-like aragonite particles by homogeneous precipitation. *J. Colloid Interface Sci.* 218, 545–553.
134. Ward, P.D., Boletzky, S. Von, 1984. Shell implosion depth and implosion morphologies in three species of *Sepia* (Cephalopoda) from the Mediterranean Sea. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 64, 955–966.
135. Webber, D.M., Aitken, J.P., O’Dor, R.K., 2000. Costs of locomotion and vertic dynamics of cephalopods and fish. *Physiol. Biochem. Zool.* 73, 651–662.

136. Weiner, S., Addadi, L., 1997. Design strategies in mineralized biological materials. *J. Mater. Chem.* 7, 689–702.
137. Weiner, S., Addadi, L., Wagner, H.D., 2000. Materials design in biology. *Mater. Sci. Eng. C* 11, 1–8.
138. Weiner, S., Israel, R., Dove, P.M., Tech, V., Virginia, U.S.A., 2001. An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. *Rev. Mineral. Geochem.* 54, 1–29.
139. Weiner, S., Mahamid, J., Politi, Y., Ma, Y., Addadi, L., 2009. Overview of the amorphous precursor phase strategy in biomineralization. *Front. Mater. Sci. China.* 3, 104–108.
140. Weiss, I.M., Tuross, N., Addadi, L., Weiner, S., 2002. Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *J. Exp. Zool.* 293, 478–91.
141. Westbroek, P., Buddemeier, B., 1994. Strategies for the study of climate forcing by calcification. *Bull. l'Institut Oceanogr.* 13, 37–60.
142. Westbroek, P., Marin, F., 1998. A marriage of bone and nacre. *Nature.* 392, 861-862.
143. Wolf, S.E., Lieberwirth, I., Natalio, F., Bardeau, J.-F., Delorme, N., Emmerling, F., Barrea, R., Kappl, M., Marin, F., 2012. Merging models of biomineralisation with concepts of nonclassical crystallisation: is a liquid amorphous precursor involved in the formation of the prismatic layer of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis*? *Faraday Discuss.* 159, 433-448.
144. Worms, D., Weiner, S., 1986. Mollusk shell organic matrix: Fourier transform infrared study of the acidic macromolecules. *J. Exp. Zool.* 237, 11–20.
145. Xie, L.-P., Zhu, F.-J., Zhou, Y.-J., Yang, C., Zhang, R.-Q., 2011. Molecular approaches to understand biomineralization of shell nacreous layer. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 52, 331–352.
146. Zavodnik, D., Hrs.Brenko, M., Legac, M., 1991. Synopsis on the fan shell *Pinna nobilis* L. in the eastern Adriatic Sea. *Les Especies Marines a Proteger En Mediterranee.* GIS Posidonie publications, Marseille. 161–178.

147. Zhang, G., Xu, J., 2013. From colloidal nanoparticles to a single crystal: new insights into the formation of nacre's aragonite tablets. *J. Struct. Biol.* 182, 36–43.
148. Zhang, X., Vecchio, K.S., 2013. Conversion of natural marine skeletons as scaffolds for bone tissue engineering. *Front. Mater. Sci.* 7, 103–117.
149. Zhang, Z., Xie, Y., Xu, X., Pan, H., Tang, R., 2012. Transformation of amorphous calcium carbonate into aragonite. *J. Cryst. Growth.* 343, 62–67.
150. Zhao, X., Wang, Q., Jiao, Y., Huang, R., Deng, Y., Wang, H., Du, X., 2012. Identification of genes potentially related to biomineralization and immunity by transcriptome analysis of pearl sac in pearl oyster *Pinctada martensii*. *Mar. Biotechnol.* 14, 730–739.

## **8. SAŽETAK**

---

Detaljnou usporedbom morfoloških, strukturnih i biokemijskih značajki složenih biomineralnih struktura aragonita morskih beskralješnjaka utvrđena je postojanost hipoteze o raširenosti mehanizama agregacije na nanoskali. Istraženi biominerali se razlikuju u građi, ali i u funkciji: koralit kamenog koralja (*Cladocora caespitosa*) služi kao supstrat, školjke kunjke (*Arca noae*) i periske (*Pinna nobilis*) kao zaštita, a sipovina obične sipe (*Sepia officinalis*) za regulaciju plovnosti. Iako su organizmi morali prilagoditi svoje biomineralne strukture pojedinim ulogama, provedenim analizama morfoloških i strukturnih značajki aragonitnih biominerala pokazano je da istraženi biominerali imaju vrlo slična svojstva na nanorazini.

AFM i FESEM mikrofotografije podupiru hipotezu da se početna mineralizacija odvija u gelu-sličnom organskom matriksu koji kontrolira cjelokupan proces te rezultira nakupinama orijentiranih i agregiranih nanočestica aragonita, okruženih tankim organskim omotačem koji sprečava daljnju agregaciju minerala. Time je pokazano kako četiri različita organizma prilikom ekstracelularnog formiranja hijerarhijski organizirane biomineralne strukture upotrebljavaju isti početni mehanizam orijentirane nanoagregacije. Nanovizualizacijom nativnih biominerala je po prvi puta opisana početna faza nastanka nove komore sipovine, a dodatno su produbljena saznanja o rastu i razvoju sedefa periske.

Kako bi se detaljno ispitaio sastav organskog matriksa, biokemijskim metodama su izolirani i analizirani proteini za koje se smatra da imaju utjecaj na procese formiranja biomineralnih struktura. Izolirani proteini su uglavnom posttranslacijski modificirani s niskom pI vrijednosti. Iako je vidljivo kako svi uzorci imaju bogat proteinski udio u organskom matriksu, radi se o visokospecifičnim proteinima koji nisu do sada registrirani u bazama podataka.

Rezultati ovog istraživanja omogućuju bolje razumijevanje mehanizama formiranja složenih biomineralnih struktura aragonita kod morskih beskralješnjaka na nanorazini. Oni također doprinose i proširenju osnovnog znanja koje definira metode biomimetičke pripreve aragonitnih materijala željenih morfoloških i strukturnih značajki.

## **9. SUMMARY**

---

Thorough comparison of morphological, structural and biochemical properties of complex aragonitic biomineral structures from marine invertebrates has confirmed the hypothesis that aggregation mechanisms on the nanoscale are more widespread than it was previously assumed. These biominerals have different structures and functions: scleractinian coral (*Cladocora caespitosa*) use its biomineral as a substrate for growth, shells from Noah's ark (*Arca noae*) and noble fan mussel (*Pinna nobilis*) are used for protection and cuttlebone from the common cuttlefish (*Sepia officinalis*) is used for the buoyancy control. Even though these organisms needed to adapt their structures to specific roles, here conducted analysis of the morphological and structural biomineral properties show that these biominerals have very similar nanostructural characteristics.

AFM and FESEM microphotographs have supported the hypothesis that the initial mineralization is ongoing in a gel-like organic matrix that controls the process of biomineralization and results with the clusters of oriented and aggregated aragonitic nanoparticles, surrounded with a thin organic coating that prevents further mineral aggregation. Therefore, this research shows that four different organisms during the extracellular formation of their hierarchically organized biomineral structures use the same starting mechanism, an oriented nanoaggregation. For the first time a new growth model of a cuttlebone chamber is described using the nanovisualization techniques on the native biomineral structures. It also enabled further clarification of the nacreous tablet formation in the noble fan mussel.

For detailed examination of organic matrix, biochemical methods are used for extraction and analysis of proteins that supposedly have a role in the formation of biomineral structures. Isolated proteins mostly have posttranslation modifications and low pI value. It is visible that all samples have large ratio of different proteins in organic matrix but these are very specific proteins that cannot be identified in the protein databases.

Research results provide a better understanding of complex aragonitic biomineral formation mechanisms at the nanoscale. They contribute to the expansion of knowledge base that defines bioimimetic preparation of aragonitic materials with desired morphological and structural features.



## **10. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA**

---

Vida Čadež rođena je 11. srpnja 1983. u Zagrebu. Srednju školu završava s najvišim pohvalama, a 2002. godine upisuje studij na novootvorenom smjeru Akvakultura Sveučilišta u Dubrovniku. Tijekom studija osvaja brojne nagrade između ostalog i tri rektorove nagrade te Top stipendiju za Top studente. Pri završetku studija osvaja i stipendiju studentske organizacije IAESTE za rad na Queen's University College u Sjevernoj Irskoj. Studij završava 2009. godine kao najbolja studentica na Odjelu s prosjekom ocjena 5.00 (*Summa cum laude*). Iste godine počinje raditi kao znanstveni novak na Institutu Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora u Rovinju na problematici biomineralizacije morskih organizama u sklopu čega je boravila na Max Planck Institutu za inteligentne sisteme i Sveučilištu u Stuttgartu 2010. godine. Od ožujka 2011. godine radi u Zagrebu, u Zavodu za istraživanje mora i okoliša. Uz osnovnu djelatnost, aktivno sudjeluje i u popularizaciji znanosti kao član organizacijskog odbora na manifestacijama kao što su Znanstveni susreti 3. vrste i Otvoreni dani Instituta Ruđer Bošković. Članica je Hrvatskog mikroskopijskog društva te Hrvatskog biofizičkog društva, a u slobodno vrijeme se bavi volonterskim radom u nekoliko neprofitnih udruga.

Na kongresima je aktivno sudjelovala s ukupno pet priopćenja, a bila je i na pet ljetnih škola i radionica.

### **Znanstveni radovi u postupku objavljivanja u časopisima koji se indeksiraju u Current Contents:**

1. Škapin, S.D., Čadež, V., Suvorov, D., Sondi I. 2015. Structure, morphology and surface properties of nanostructured colloidal manganese oxide particles obtained through the thermally controlled transformation of a biomimetically designed manganese carbonate precursor phase. *Journal of Colloid and Interface Science* (poslano).
2. Čadež, V., Škapin, S.D., Salopek – Sondi, B., Vukelić, B., Kazazić, S., Križaj, I, Sondi I. 2015. Biomineralization mechanism in the cuttlebone: nanomorphological and protein characterization of the aragonitic structure from the cuttlefish *Sepia officinalis* (u postupku objavljivanja)

### Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Čadež, Vida. Nove metode priprave bioimplantata: značaj istraživanja biomineralne strukture morskih beskralješnjaka za razumijevanje procesa mineralizacije kralješnjaka. // Medicinski vjesnik. 43 2011., 1-4; 91-101 (pregledni rad, znanstveni).
2. Čadež, Vida. Bolesti školjkaša regulirane zakonom u Republici Hrvatskoj. // Ribarstvo. 63 2005., 3; 105-116 (pregledni rad, znanstveni).
3. Čadež, Vida; Teskeredžić, Emin. Patogeni mikroorganizmi i toksini koje prenose školjkaši iz onečišćenih područja - zoonoze. // Ribarstvo. 63 2005., 4; 135-145 (pregledni rad, znanstveni).

### Sažeci u zbornicima skupova

1. Čadež, Vida; Škapin, Srečo; Šegota, Suzana; Sondi Ivan. Biomineral structures of aragonite in marine mollusks at the nanoscale: FESEM and AFM studies. Hrvatski mikroskopijski kongres: knjiga sažetaka. Zadar, 2015. (odabrano predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
2. Čadež, Vida; Pletikapić, Galja; Škapin, Srečo D.; Svetličić, Vesna; Sondi, Ivan. Nov koncept rasta i oblikovanja biomineralnih struktura na primjeru sipe (*Sepia officinalis*): agregacijski mehanizmi na nanoskali. 11. Hrvatski biološki kongres: zbornik sažetaka. Jelaska, Sven D; Klobučar, Goran IV; Šerić Jelaska, Lucija; Leljak Levanić, Dunja; Lukša, Žaklin (ur.). Zagreb: Hrvatsko biološko društvo, 2012., 48-49 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
3. Čadež, Vida; Škapin, Srečo D.; Salopek - Sondi, Branka; Vukelić, Bojana; Pletikapić, Galja; Svetličić, Vesna; Sondi, Ivan. The complex architecture of bioinorganic aragonite produced by marine invertebrates: nano scale organization of the cuttlebone. 7<sup>th</sup> Christmas Biophysics Workshop: Book of Abstracts. Pabst, Georg; Heftberger, Peter; Kollmitzer, Benjamin (ur.). Austrija, 2012., 22-23 (predavanje, sažetak, znanstveni).
4. Čadež, Vida; Škapin, Srečo; Pletikapić, Galja; Svetličić, Vesna; Sondi, Ivan. Comparison of bioinorganic aragonitic structures from two marine invertebrates. Hrvatski

mikroskopijski simpozij Knjiga sažetaka. Andrea Gajović, Nenad Tomašić (ur.). Pula, 2012., 48-49 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

5. Čadež, Vida. Formation of carbonates through the biomineralization processes: nano-scale aggregation route. Znanstveni susreti 3. vrste. Zagreb 2011., (nagrađeni poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

### Neobjavljena sudjelovanja na skupovima

1. Čadež, Vida; Škapin, Srečo, D.; Pletikapić, Galja; Vukelić, Bojana; Salopek-Sondi, Branka; Svetličić, Vesna; Sondi, Ivan. New concept of cuttlebone growth and design: lamellar structure at the nano – scale. Training School „AFM in Biology“ – a focus on marine biology. Italija, 2013., (poster, neobjavljeni rad, znanstveni).

### Diplomski radovi

1. Čadež, Vida. Aktivnost Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATP-aze u anteriornim škrgama i srednjem crijevu bočatog raka *Carcinus aestuarii* (Nordo, 1847). Završni rad - diplomski/integralni studij. Sveučilište u Dubrovniku, Diplomski studij Marikultura, 19.06. 2009., 43 str. Voditelj: Lucu, Čedomil
2. Čadež, Vida. Bolesti školjkaša. Diplomski rad. Sveučilište u Dubrovniku, Preddiplomski studij Akvakultura, 25. 05. 2005., 46 str. Voditelj: Teskeredžić, Emin.