

# Utjecaj iona olova Pb<sup>2+</sup> na mitohondrije kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303

---

Mumiši, Nermina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:807309>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

**Nermina Mumiši**

**Utjecaj iona olova  $Pb^{2+}$  na mitohondrije kvasca  
*Saccharomyces cerevisiae* W303**

Diplomski rad

Rijeka, 2016.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

**Nermina Mumiši**

**Utjecaj iona olova  $Pb^{2+}$  na mitohondrije kvasca  
*Saccharomyces cerevisiae* W303**

Diplomski rad

Rijeka, 2016.

Mentor rada: Doc.dr. sc. Gordana Čanadi Jurešić

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv.prof.dr. sc. Marin Tota
2. Izv.prof.dr. sc. Branka Blagović
3. Doc.dr. sc. Gordana Čanadi Jurešić

Rad ima 65 stranica, 16 slika, 13 tablica, 37 literaturnih navoda.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Gordani Čanadi Jurešić na strpljenju, podršci i vremenu tijekom izvođenja praktičnog dijela i savjetima prilikom pisanja diplomskog rada. Zahvaljujem se prof. dr. sc. Poloni Jamnik na velikoj stručnoj pomoći i trudu pri eksperimentalnom radu na Biotehniškom fakultetu u Ljubljani, Također hvala i ostalim djelatnicima na Zavodu za kemiju i biokemiju. Posebno hvala prof.dr.sc. Branki Blagović.*

*Zahvaljujem se mojoj obitelji i prijateljima na velikoj podršci, pomoći i strpljenju tijekom studiranja i pisanja ovog rada. Veliko hvala kolegici Martini na pomoći tijekom izvođenja praktičnog dijela.*

## SAŽETAK

Industrijalizacija je dovela do povećane upotrebe konzerviranih namirnica, boja, baterija i akumulatora u kojima se nalaze velike koncentracije olova. Čak i male koncentracije su štetne jer se olovo putem zraka i hrane apsorbira i kumulira u organima (kosti, jetra) i to najviše u središnjem živčanom sustavu. Olovo, kao teški metal, stvara veliku količinu ROS-a te posljedično uzrokuju promjene na proteinima i lipidima..

U ovom radu istražili smo utjecaj olovovih (II) iona,  $Pb^{2+}$ , na mitohondrije kvasca. Pri tom se kao modelni organizam koristio kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, poznat kao pivski kvasac ili pekarski kvasac, zbog jednostavnosti uzgoja i sekvencioniranog genoma.

U istraživanju je korišten kvasac uzgojen na YPD podlozi s dodatkom olovovih iona u koncentraciji od 8 mmol/L i inkubiran paralelno s netretiranim kvascem koji je služio kao kontrola. Inhibicija na rast kvasca iznosila je 93,8%. Glavne masne kiseline u svim uzorcima bile su oleinska i palmitoleinska, a zatim miristinska, palmitinska i stearinska kiselina. Analiza lipida pokazala je ekspresiju masenog udjela proteina prema proteinima u mitohondrijima kvasca tretiranog olovom.

Proteini mitohondrija izolirani su dvodimenzionalnom elektroforezom i obojeni dvjema metodama (bojanje s Sypro Ruby i sa srebrom). Proteinski profili tretiranih uzoraka sa  $Pb^{2+}$  i netretiranih uzoraka uspoređeni su kroz njihov volumen. Proteini su analizirani MS MALDI – TOF/TOF tehnikom i identificirani pomoću nrNCBI baze podataka.

Od zajedničkih proteina, 25 je pokazalo značajni izričaj ( $p < 0,05$ ). Njih 13 pokazalo je povećani ( $> 2$ ), a 12 smanjeni izričaj proteina ( $< -2$ ). Identificirano je 7 proteina uključenih u ciklus limunske kiseline, sintezu proteina i transport molekula.

Ključne riječi: kvasac, mitohondrij, olovo

## SUMMARY

Industrialization increased the amount of canned foods, paints, electrical devices, and the need to use batteries, accumulator and other products that contain high levels of lead. Even low concentrations are toxic to humans, because the lead is absorbed through the air and food and accumulated in organs (bones, liver), mostly in the central nervous system. Lead, a heavy metal, produce a large amount of ROS and consequently cause changes in proteins and lipids.

The aim of this research was to study the effect of lead-ions on the yeast mitochondria. *Saccharomyces cerevisiae* yeast, also known as baker's or brewer's yeast was used, because it is simple to grow and manipulate and has sequenced genome.

Yeast was cultivated in a YPD media with 8 mmol/L of lead ion. Untreated yeast was used as a control sample. Inhibition of the cell growth was 93,8%. The main fatty acids in all samples were oleic and palmitoleic, followed by myristic, palmitic and stearic acids. Lipidomic analysis revealed expression of the lipid to protein mass ratio induced by lead ions.

Proteins from mitochondria were separated using 2D electrophoresis. Proteins from mitochondria were stained with 2 methods (staining with Sypro Ruby solution and with silver) and processed. Proteins profiles of treated (with  $Pb^{2+}$ ) and untreated cells were compared by the ratio of volume in proteins. The proteins were analyzed by MS MALDI - TOF/TOF technique and identified by nrNCBI database.

25 of matched proteins were significantly changed ( $p < 0,05$ ). 13 of matched proteins were significantly up- regulated ( $> 2$  fold) and 12 were down- regulated ( $< -2$  fold). 7 proteins involved in the citric acid cycle, protein synthesis and transport of molecules, were identified.

Key words: yeast, mitochondria, lead

## SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....	1
1.2. Kvasci.....	1
1.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
1.1.2. Mitochondriji.....	7
1.2. Neurodegenerativne bolesti.....	9
1.3. Teški metali .....	10
1.3.1. Olovo.....	11
1.4. Lipidi.....	13
1.4.1. Masne kiseline.....	16
1.5. Dvodimenzionalna (2D) elektroforeza .....	18
1.5.1. Izoelektrično fokusiranje.....	18
1.5.2. Elektroforeza na SDS – poliakrilamidnom gelu.....	19
1.6. Proteom mitohondrija.....	20
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	21
3. MATERIJALI I METODE.....	22
3.1. MATERIJAL.....	22
3.1.1. Kvasac kao radni mikroorganizam.....	22
3.1.2. Uređaji i kemikalije.....	22
3.2. METODE .....	25
3.2.1. Uzgoj kvasca .....	25
3.2.2. Brojanje stanica .....	26
3.2.2.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije .....	26
3.2.3. Priprava sferoplasta .....	27
3.2.4. Izolacija mitohondrija.....	28
3.2.5. Ekstrakcija lipida iz mitohondrija .....	29
3.2.6. Analiza masnih kiselina.....	30
3.2.6.1. Priprava metilnih estera.....	30
3.2.6.2. Određivanje sastava masnih kiselina.....	31
3.2.7. Priprema proteina iz uzoraka.....	33
3.2.8. Analiza proteina – Biotehniški fakultet u Ljubljani .....	34
3.2.8.1. Određivanje proteina metodom prema Bradford-u.....	34
3.2.8.2. Izoelektrično fokusiranje .....	35
3.2.8.3. SDS – PAGE elektroforeza .....	36
3.2.8.4. Obrada gelova.....	37



3.2.8.5.	Slikanje gela .....	37
3.2.8.6.	Analiza gelova.....	37
3.2.8.7.	Rezanje spotova.....	37
3.2.9.	Analiza proteoma – Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci .....	38
3.2.9.1.	Mjerenje koncentracije proteina metodom prema Bradford-u .....	38
3.2.9.2.	Izoelektrično fokusiranje .....	39
3.2.9.3.	SDS PAGE- elektroforeza .....	40
3.2.9.4.	Bojanje gelova srebrom (metoda po Mortz-u).....	40
3.2.10.	Analiza proteina iz 2D SDS – PAGE gela obojanog srebrom.....	41
3.2.11.	Protein – protein interakcije .....	42
4.	REZULTATI.....	43
4.1.	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije .....	43
4.2.	Prirast kvašćevih stanica.....	44
4.3.	Maseni udio lipida po gramu proteina.....	45
4.4.	Sastav masnih kiselina mitohondrijskih lipida .....	46
4.5.	Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu .....	50
4.6.	Proteinski profil.....	51
4.7.	Interakcije proteina.....	55
5.	RASPRAVA.....	56
5.1.	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije .....	56
5.2.	Prirast kvašćevih stanica.....	56
5.3.	Maseni udio lipida po gramu proteina.....	57
5.4.	Sastav masnih kiselina ukupnih lipida mitohondrija.....	57
5.5.	Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu .....	59
5.6.	Proteinski profil.....	59
5.7.	Interakcije proteina.....	60
6.	ZAKLJUČAK .....	61
7.	LITERATURA.....	62

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

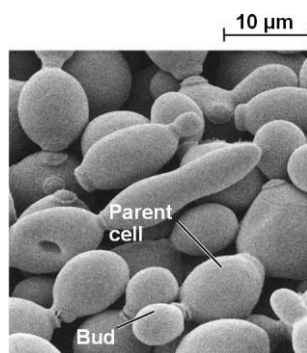
## 1.1. Kvasci

Kvasac je čovječanstvu poznat od davnina u proizvodnji kruha, piva i vina. Danas se metabolizam kvasca koristi u proizvodnji farmaceutskih pripravaka, enzima, različitih okusa te drugih tvari. Kako je njegova upotreba sve češća i raznovrsnija, detaljno su istraženi njegovi fiziološki procesi te metabolizam, a kvasac je postao ne samo u vodeći industrijski mikroorganizam, nego i vodeći eukariotski model u znanstvenim istraživanjima (Andrišić, 2013).

Gljive su jednostanični i višestanični organizmi. Nemaju pigment klorofil i stoga fotosintezom ne mogu samostalno stvarati hranu. Za metabolizam koriste se gotovim organskim spojevima iz mrtvih ili živih organizama. Nalaze se u zraku, zemlji, vodi, životinjama i u biljkama.

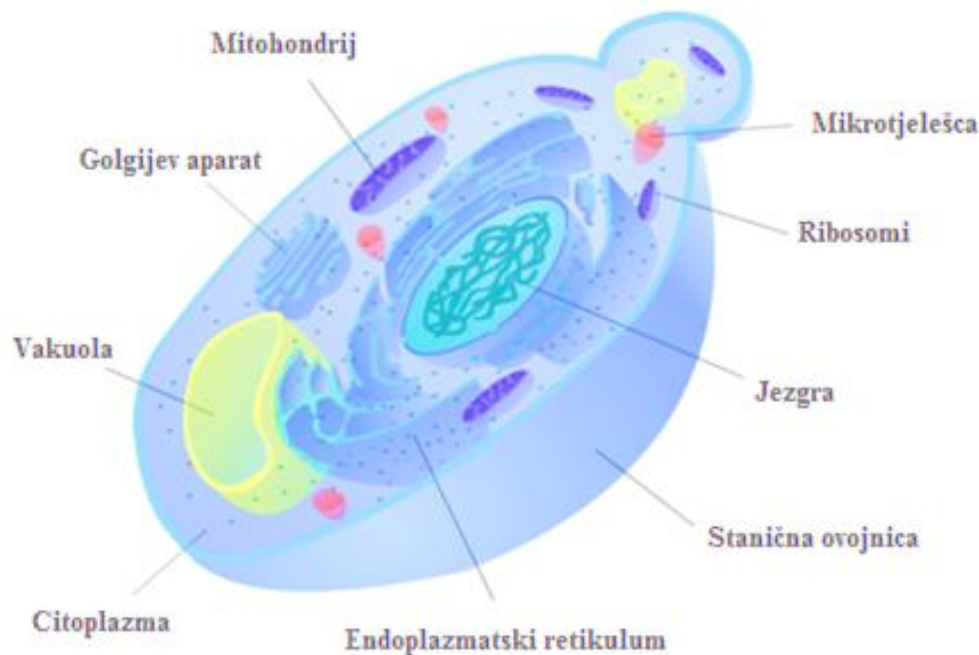
Jednostanične se gljive nazivaju kvascima, a višestanične gljive plijesnima. Bez obzira na pripadnost pojedinim skupinama, stanice gljiva međusobno su slične. U usporedbi s bakterijama, gljive imaju složeniju organizaciju stanice i stoga su na višem razvojnem stupnju od njih. Jezgra gljivične stanice obavijena je jezgrinom ovojnicom. Zbog toga morfološkog obilježja gljive su svrstane u eukariote.

Kvasci se sastoje od jedne stanice koja može biti okrugla, jajolika ili izdužena. Oblik stanice kvasca nije svojstven za određenu vrstu kvasca, a često ovisi o starosti kulture i o sastavu hranjive podloge na kojoj kvasac raste. Prosječna je veličina kvašćeve stanice 5 do 7  $\mu\text{m}$  (slika 1).



Slika 1. Stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Stanica svih vrsta kvasaca sastoji se od citoplazme u kojoj se nalaze jezgra, endoplazmatski retikulum, ribosomi, mitohondriji, vakuole i inkluzije te citoplazmatske membrane i stanične stijenke (slika 2).



Slika 2. Građa kvaščeve stanice

Unutrašnjost stanice ispunjava polutekuća citoplazma. Jezgra (lat. *nucleus*) obavijena je dvoslojnom ovojnicom na koju se nastavlja endoplazmatski retikulum. Ta tvorba sadrži neke metaboličke enzime i za nju je povezan dio staničnih ribosoma. Ribosomi su male nukleoproteinske čestice koje su u eukariotskih stanica veće od tvorbi u prokariotskih stanica. Mjesta su sinteze bjelančevina, a osim onih koji su povezani s endoplazmatskim retikulom, postoje i ribosomi slobodni u citoplazmi.

U citoplazmi se nalaze i mitohondriji koji oblikom (kuglastim ili štapićastim) i veličinom mogu biti različiti. Sadrže enzime disanja i značajni su za stanični metabolizam. U citoplazmi se također nalaze vakuole i inkluzije (poput masnih tjelešaca i pričuvnih citoplazmatskih zrnaca koja sadrže glikogen).

Citoplazmu okružuje dvoslojna citoplazmatska membrana koja je polupropusna i regulira promet tvari između stanice i njezine okoline. Stanična stijenka daje stanici kvasca oblik i čvrstoću. Građena je od ugljikohidrata (uključujući i hitin) (Volner i sur., 2005).

Debela stanična stijenka služi kao čvrsti vanjski omotač stanice, a tanka stanična membrana koja se nalazi tik uz stijenku, okružuje citoplazmu. Zajedno, stanična stijenka i membrana, čine staničnu ovojnici. Staničnu stijenku nemaju sve stanice, ali je imaju stanice većine mikroorganizama, a u kvasaca je ona izrazito čvrsta. Uglavnom je građena od polisaharida glukana i manana na koje su kompleksno vezani proteini. U sastavu proteina stanične stijenke kvasca ima dosta aminokiselina s SH-skupinama. One su u mladim stanicama slobodne, a u starijim stanicama povezuju proteinske lance disulfidnim mostovima što je, kako se pretpostavlja, razlog velike čvrstoće stijenke. Staranjem kulture stijenka postaje sve deblja, a time i čvršća.

Za razliku od stanične stijenke, koju nemaju sve stanice iako im daje čvrstoću, stanična membrana okružuje svaku stanicu. Ona definira njen sastav, razdvaja ju od njene okoline i održava bitnu različitost između nje i okoline. Nadzire ulaz hranjivih sastojaka u stanicu i izlaz otpadnih tvari iz stanice; stvara razliku u koncentraciji iona između unutrašnjosti stanice i njezine okoline. Ima ulogu visokoselektivnog filtra i uređaja za aktivni transport.

Djeluje i kao prijemnik vanjskih signala koji upravljaju prilagodbom stanice na promjene u okolini. Osim toga, stanična membrana je mjesto sinteze određenih sastojaka stanice, u prvom redu sastojaka same membrane i stijenke, te služi kao nosač mnogih enzima i staničnih organela, kao npr. ribosoma.

Mitohondriji su organele građene od dvostrukog membranskog sastava: unutarnje i vanjske membrane odijeljene međumembranskim prostorom. Unutarnja membrana tvori brojne nabore (kriste) koji ulaze u unutrašnjost organele tzv. matriks. Svaki od tih dijelova ima specifičnu ulogu, pa stoga i građu, s time da najvažniju ulogu imaju matriks i unutarnja membrana.

Dvije citoplazmatske organele, endoplazmatski retikulum i Golgijev aparat, specifično su određeni za raspoređivanje i transport proteina namijenjenih za sekreciju, ugradnju u staničnu membranu i unošenje u lizosome. Endoplazmatski retikulum je opsežna mreža unutarstaničnih membrana, koja se prostire od jezgrine ovojnice kroz čitavu citoplazmu. Njegova funkcija nije samo u doradi i transportu proteina nego također u sintezi lipida.

Od endoplazmatskog retikuluma proteini se transportiraju vezikulama do Golgijeva aparata, gdje se dalje doraduju i razvrstavaju za transport do konačnih odredišta. Uz ulogu u transportu proteina,

Golgijev aparat predstavlja mjesto gdje se sintetiziraju lipidi i mjesto gdje se sintetiziraju neki polisaharidi koji izgrađuju staničnu stijenku (Cooper, 2004).

Kvasci se najčešće razmnožavaju pupanjem. To je nespolni način razmnožavanja tijekom kojega se na nekom mjestu roditeljske stanice kvasca pojavi izbočina, tj. pup, tvorevina koja raste i u koju postupno ulaze citoplazma i jezgra. Za vrijeme pupanja nastupa mitotička dioba jezgre. Kada pup dosegne određenu veličinu (koja može biti jednaka veličini roditeljske stanice ili manja od nje), između dviju stanica stvori se pregradna stijenka i one se odvoje. Novonastale stanice zovu se blastokonidije i genski su istovjetne roditeljskoj stanici (Volner i sur., 2005).

### 1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac je prvi eukariotski organizam čiji je genom u potpunosti sekvencioniran, čime su stvoreni preduvjeti za stvaranje banke sojeva kvasca kojima nedostaju pojedini geni i time kvasac postaje sve popularniji model i u temeljnim medicinskim istraživanjima.

Kao što je u molekularnoj biologiji i biologiji stanice *Escherichia coli* najintenzivnije proučavan modelni organizam za prokariote, tako je *Saccharomyces cerevisiae* jedan od najintenzivnije proučavanih modelnih organizama za eukariote. *Saccharomyces cerevisiae* se lako uzgaja, pa je vrlo koristan za proučavanje staničnog ciklusa, a kao eukariot dijeli istu kompleksnu strukturu stanice s biljkama i životnjama. ([www.inpharma.hr](http://www.inpharma.hr))

Genom najistraženijeg kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*, sastoji se od oko 12 milijuna parova baza DNA i sadržava oko 6000 gena. Premda je genom kvasca tri puta veći od *E. coli*, s njim se može puno lakše izaći na kraj tijekom istraživanja nego s genomima složenije građenih eukariota, kao što su ljudi. I u svojoj jednostavnosti, stanica kvasca pokazuje sve tipične osobine eukariotske stanice. Ona ima jezgru obavijenu jezgrinom ovojnicom, njezina je genomska DNA organizirana u 16 linearnih kromosoma, a citoplazma sadržava citoskelet i stanične organele.

U elementarnom sastavu kvasca *Saccharomyces cerevisiae* prevladavaju ugljik s 48% i kisik s 31%, slijedi dušik (8%) i vodik (7%) pa kalij, fosfor, magnezij, kalcij, sumpor i elementi u tragovima.

Kvasci se mogu lako uzgajati u laboratoriju i mogu se istraživati mnogim od molekularnih pristupa koji su bili toliko uspješni s *E. coli*. Premda se kvasci ne mogu replicirati tako brzo kao bakterije, oni se ipak često dijele, svaka 2 sata, a mogu se lako stvarati kolonije iz jedne stanice. Prema tome, kvasci se mogu koristiti za različite genetičke manipulacije slične onima koje se mogu izvoditi s bakterijama.

Ove su osobine učinile stanicu kvasca najpristupačnijom eukariotskom stanicom sa stajališta molekularne biologije. Mutanti kvasca postali su važni za razumijevanje mnogih temeljnih procesa u eukariota, uključujući replikaciju DNA, transkripciju, doradu RNA, razvrstavanje proteina i regulaciju stanične diobe.

Jedinstvo molekularne biologije stanica postalo je prilično jasno činjenicom da su temeljna načela stanične strukture i funkcije otkrivena u proučavanjima kvasaca primjenjiva na sve eukariotske stanice (Cooper, 2004).

Zbog navedvenog, kvasac je idealan za izučavanje humane DNK sekvencije, biosinteze, metabolizma i transporta staničnih sastojaka, njihovih funkcija, utjecaja stresnih faktora na stanicu te populacijske genetike (Blagović, 2009).

No postoje i određene negativne karakteristike poput ograničenog kapaciteta proizvodnje proteina, prekomjerna glikolizacija heterolognih, većinom humanih proteina, naglašen Crabtree učinak<sup>1</sup> te izrazito čvrsta stanična stijenka (Vrsalović Presečki, 2003).

---

<sup>1</sup> Kvasac, koji se uzgaja u podlozi s relativno visokom koncentracijom ugljikohidrata, proizvodi etanol čak i u potpuno aerobnim uvjetima (ugljikohidrat se razgrađuje fermentativnim putem).

### 1.1.2. Mitochondriji

Mnogim znanstvenicima su mitochondriji kvasca služili kao model za istraživanje strukture, funkcije i biogeneze mitochondrija.

Mitochondrij kvasca, kao i kod drugih eukariota, je okružen s dvostrukom membranom, vanjskom i unutarnjom, odvojen međumembranim prostorom (slika 3). Unutarnja membrana mitochondrija naziva se još "mitochondrijska matrica." Vanjska membrana sadrži enzime koji sudjeluju u metabolizmu lipida, dok unutarnja membrana sadrži citokrome respiratornog lanca, ATP sintazu (veže se na respiratorni lanac) i brojne transportne proteine koje služe za razmjenu komponenata niske molekularne težine. Matrica predstavlja lokaciju ciklusa limunske kiseline i sadrži mitochondrijsku DNK. Jedna od najvažnijih obilježja u mitochondrijima su sustavi za internalizaciju (ulazak u stanicu) i obradu proteina koji su proizvedeni u citosolu ribosoma, a potom uvezeni u mitochondrije. Samo se nekoliko bjelančevina sintetiziraju pomoću mitochondrijske mehanizacije, dok se velika većina mitochondrijskih proteina (više od 800) mora uvoziti. Ovisno o uvjetima uzgajanja stanica *S. cerevisiae*, mitochondriji imaju različitu morfologiju (Feldmann, 2012).

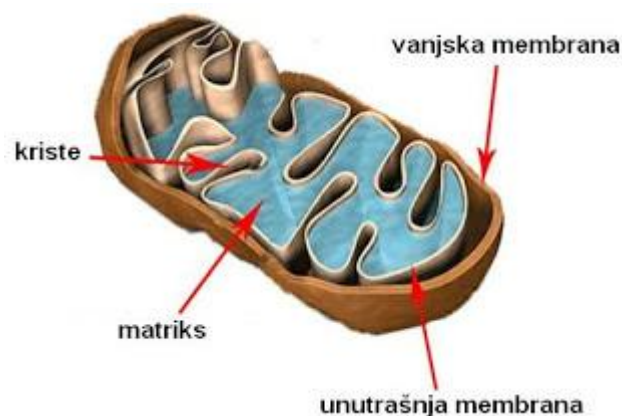
Mitochondriji se smatraju tvornicom energije u stanici jer su odgovorni za stvaranje velike količine energije u obliku ATP-a. Osim stvaranja energije, mitochondriji su uključeni u  $\beta$ -oksidaciju i biosintezu masnih kiselina, u održavanju homeostaze proizvodnje i promjene strukture reaktivnih kisikovih spojeva. (Blagović i sur., 2016)

Mitochondriji imaju glavnu ulogu u stvaranju metaboličke energije u eukariotskim stanicama. Oni su zaslužni za najveći dio korisne energije koja se dobiva razgradnjom ugljikohidrata i masnih kiselina procesom oksidativne fosforilacije, a koja se pohranjuje u obliku ATP-a. Većina mitochondrijskih proteina nastaje translacijom na slobodnim ribosomima citosola nakon čega se unose u organelu specifičnim transportnim mehanizmima. Mitochondriji su jedinstvene stanične organele koje posjeduju i vlastitu DNK koja kodira tRNK, rRNK i neke mitochondrijske proteine. Tako su sastojci mitochondrija, osim proteina unošenih iz citosola, i proteini sintetizirani u samoj organeli.



Matriks sadrži mitohondrijski genetski sustav, kao i enzime odgovorne za glavne reakcije oksidativnog metabolizma (ciklus limunske kiseline). Oksidacijom glukoze i masnih kiselina nastaje acetil-CoA, koji potpunom oksidacijom daje  $\text{CO}_2$ , uz istovremeno nastajanje reduciranih koenzima, NADH i  $\text{FADH}_2$ . Iz vodika reduciranih koenzima i molekularnog kisika, nizom reakcija prijenosa elektrona i protona putem specifičnih membranskih prenosioca, nastaje voda, a oslobođena energija koristi se za sintezu ATP-a. Ovaj proces, u kojem se od svih oksidativnih procesa dobiva najviše energije, zove se oksidativna fosforilacija, a odvija se na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani. Unutarnja mitohondrijska membrana predstavlja glavno mjesto sinteze ATP-a, pa ta važna uloga određuje i njenu građu. Njena površina je bitno povećana nabiranjem u kriste, a zbog proteina, koji su uključeni u oksidativnu fosforilaciju i prijenos metabolita (piruvat i masne kiseline), ona sadrži neobično visok postotak proteina, više od 70%. Unutarnja membrana je visoko selektivna barijera i praktično nepropusna za većinu iona i malih molekula.

Nasuprot tome, vanjska membrana je propusna za male molekule. To je moguće zato jer sadrži proteine zvane porini, koji grade kanale koji omogućuju slobodnu difuziju molekula manjih od 6000 daltona (Blagović, 2009).



Slika 3. Građa mitohondrija

## 1.2. Neurodegenerativne bolesti

Neurodegenerativne bolesti obuhvaćaju niz bolesti kojima je zajedničko da su progresivne i neizlječive. Proces neurodegeneracije selektivno zahvaća različite populacije neurona što dovodi i do različite kliničke manifestacije. U ovu široku skupinu bolesti ubrajamo u prvom redu Parkinsonovu bolest, Huntingtonovu koreju, spinocerebelarne ataksije, progresivnu supranuklearnu paralizu, multiplu sklerozu, kortikobazalnu degeneraciju i brojna druga stanja ([www.wikipedia.hr](http://www.wikipedia.hr)).

Neke neurodegenerativne bolesti poput Huntingtonove koreje su genetski nasljedne te danas za njih postoje metode genetskog testiranja koje omogućuju otkrivanje asimptomatskih nosilaca mutacija. Kod nosilaca mutacije neophodno je učiniti genetsko savjetovanje kako bi se zdravu mladu osobu pripremio na mogućnost razvoja teške infaustne bolesti u budućnosti (Klepac, 2011).

Nažalost, u većini slučajeva uzroci su nepoznati, iako mnoga istraživanja upućuju na određene okolišne i genetski rizične čimbenike.

Multipla skleroza (MS) je bolest upale živaca gdje su masne kiseline mijelinske ovojnice mozga i leđne moždine oštećeni, što u konačnici dovodi do demijelinizacije, ožiljaka i degeneracije aksona. Neurološki simptomi su rašireni i utječu na motoričku, senzornu, vizualnu i autonomnu funkciju. Ti simptomi proizlaze iz poteškoće u komunikaciji između neurona. Gubitak mijelina inhibira sposobnost neurona da provodi akcijski potencijal. Uzroci MS ostaju i dalje nepoznati, iako je poznato da specifični genetski faktori uzrokuju upalu neurona pri čemu utječu i okolišni čimbenici (Cannon i Greenamyre, 2011).

U području Republike Hrvatske utvrđeno je da je broj oboljelih od MS najveći u gradu Čabru (Gorski kotar) i to s prevalencijom od 179.9/100.000 stanovnika, zatim u Vrbovskom 66.3/100.000 stanovnika te Istra s prevalencijom od 40.6/100.000 stanovnika što predstavlja javnozdravstveni problem (Perković i sur., 2010).

### 1.3. Teški metali

Velike količine teških metala otpuštene su u okoliš kao produkt tehnoloških procesa. Utjecaj tih metala u vodenom sustavu i njihova povećana vrijednost u hrani predstavlja ozbiljnu prijetnju za životinje i ljude.

Metali poput bakra, nikla i cinka su esencijalni elementi potrebni za rast i metabolizam mikroorganizama. No, ukoliko njihova koncentracija unutar stanice raste iznad potrebne vrijednosti tada postaju toksični. Toksični učinci metala, poput blokiranja funkcionalnih skupina, supstitucije esencijalnih metalnih iona iz biomolekula, konformacijske modifikacije, denaturacija i inaktivacija enzima, te poremećaj stanične membrane rezultat je njihove jake koordinacijske sposobnosti.

Metali kao što su olovo, kadmij i živa su neesencijalni za biološke funkcije, a neki teški metali poput kadmija i žive su jaki inhibitori metabolizma mikroorganizama, čak i pri niskim koncentracijama. Međutim, malo je informacija dostupno o glavnoj toksičnosti u stanicama kvasca. Upravo se kvasac koji je ujedno jeftin izvor biomase, može koristiti kao alternativna metoda u detoksikaciji teških metala (Soares i dr., 2003).

Teški metali se ne mogu razgraditi niti modificirati, već ostaju u stanici nepromjenjivog oblika i kao takvi ometaju homeostazu stanice. Toksičnost metala očituje se na staničnoj razini izazivajući oksidativni stres, lipidnu peroksidaciju, promjene enzima i funkcije proteina te oštećenje DNA (Hosiner i sur., 2014).

### 1.3.1. Olovo

Olovo je plavkasto-sivi teški metal koji je prisutan u Zemljinoj kori u relativno visokoj koncentraciji u odnosu na druge teške metale. U elementarnom stanju upotrebljava se 40% olova, 25% u legurama i 35% u spojevima. Čisto olovo se zbog poznate postojanosti prema koroziji upotrebljava u obliku ploha ili cijevi u kemijskoj i građevinskoj industriji. Poznat je i kao zaštitni materijal od ionizirajućeg zračenja, a upotrebljava se još i u proizvodnji akumulatora, olovnih boja i dr. Olovovi oksidi upotrebljavaju se u proizvodnji električnih baterija i akumulatora ( $PbO$  i  $Pb_3O_4$ ), kao sastojci u proizvodnji gume, boja, cakline posuđa i stakla. Olovove soli čine bazu mnogih boja i pigmenata: olovov karbonat,  $PbCO_3$ , i sulfat,  $PbSO_4$ , upotrebljavaju se kao bijeli pigment, dok se olovov kromat,  $PbCrO_4$ , upotrebljava kao olovovo žutilo, crvenilo i zelenilo. Olovov arsenat je insekticid.

Prva opasnost od olova, odnosno njegovih iona  $Pb^{2+}$  je toksičnost. Postalo je očito da razni neurofiziološki efekti na živčani sustav, moždane disfunkcije i oslabljena brzina provodljivosti nastaju i kod manjih izlaganja tim ionima (Lalić i Kabalin, 2005).

Stvaranje slobodnih radikala u uskoj je sprezi s aerobnim metabolizmom. Relativno male količine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), trajno se proizvode u svim aerobnim organizmima. Velike količine ili nedovoljno učinkovito uklanjanje ROS-a ima za posljedicu oksidacijski stres koji može oštetiti biološke makromolekule i uzrokovati metaboličke poremećaje. ROS ima neprijepornu važnost u mnogobrojnim procesima, primjerice u unutarstaničnoj signalizaciji, proliferaciji, apoptozi, te imunološkom odgovoru (Štefan i dr., 2007).

Olovo uzrokuje oksidativni stres u stanicama stvarajući pri tom velike količine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Odmah nakon apsorpcije ulazi u krv, distribuira se posebno u jetri i bubregu, a zatim pohranjuje u kostima i oštećuje jetru, bubrege, srce, spolne žlijezde te utječe na imunološki i živčani sustav (Payal, 2009).

- *učinak na živčani sustav*

Uspoređujući ostale organske sustave, živčani sustav je najosjetljiviji i glavna meta toksičnosti olova. Encefalopatija je direktna posljedica izloženosti povišenoj koncentraciji  $Pb^{2+}$  iona, a glavni simptomi su razdražljivost, pad koncentracije, glavobolja, mišićni tremor, gubitak pamćenja i halucinacije.

- *učinak na hematopoetski sustav*

Olovo direktno utječe na sintezu hemoglobina u hematopoetskom sustavu. Također smanjuje život eritrocita povećavajući pri tom broj retikulocita.

- *renalni učinak*

Renalna disfunkcija pojavljuje se pri izlaganju velikim količinama olova, ali postoji također i opasnost i pri manjim količinama. Renalna disfunkcija manifestira se kao akutna i kronična nefropatija. Akutna nefropatija karakterizirana je oslabljenim mehanizmom tubularnog transporta, a kao posljedica su degenerativne promjene u tubularnim epitelima.

- *kardiovaskularni učinak*

Kronična i akutna toksičnost olova uzrokuje kardiovaskularna oštećenja s potencijalnim letalnim posljedicama uključujući hipertenziju i kardiovaskularne bolesti.

Ionski mehanizam djelovanja olova uglavnom nastaje zbog njegove sposobnosti da zamijeni druge bivalente katione kao što su  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  i monovalentne poput  $Na^+$  (iako dvovalentne katione lakše supstituira), utječući na taj način na razne biološke procese u tijelu. Olovo može čak i u manjim koncentracijama zamijeniti se s  $Ca^{2+}$  ionima, a zatim prijeći krvno-moždanu barijeru i ometati formiranje mijelinske ovojnice. Zamjenom natrijevih iona, utječe na brojne vitalne biološke procese poput stvaranja akcijskog potencijala, unosa neurotransmitera itd. (Flora i dr., 2012).

## 1.4. Lipidi

Masti su zajedno sa „spojevima sličnim mastima“ obuhvaćene u skupinu lipida. Lipidi su netopljivi u vodi, a u vodenom mediju stvaraju koloidne ili micelarne otopine. Topljivi su u organskim otapalima kao što su benzen, eter, kloroform ili smjesa kloroform-metanol. Mnogi lipidi su važni sastojci bioloških membrana, te određuju njihova svojstva.

U tablici 1 prikazana je podjela lipida.

Tablica 1. Podjela lipida (Karlson, 1993).

<b>I. Lipidi koji ne hidroliziraju</b>	<b>II. Jednostavni esteri</b>	<b>III. Fosfolipidi</b>	<b>IV. Glikolipidi</b>
<b>Ugljikovodici</b> alkani, karotenoidi (skvalen, $\beta$ -karoten)	<b>Masti</b> (masne kiseline + glicerol)	<b>Fosfatidne kiseline</b> (masne kiseline + glicerol + fosfat)	<b>Cerobrozidi</b> (masna kiselina + sfingozin + šećer)
<b>Alkoholi</b> dugolančani alkoholi, karotenoidni alkoholi (zeaksantin), steroli (kolesterol)	<b>Voskovi</b> (masne kiseline + alkohol)	<b>Fosfatidi</b> (masne kiseline + glicerol + fosfat + aminoalkohol)	<b>Gangliozidi</b> (masna kiselina + sfingozin + šećer + neuraminska kis.)
<b>Kiseline</b> dugolančane masne kiseline (palmitinska)	<b>Sterolni esteri</b> (masna kiselina + kolesterol)		

U prirodi ima najviše kiselina sa 16 i 18 ugljikovih atoma, tj. palmitinske kiseline,  $C_{16}H_{32}O_2$ , i stearinske kiseline,  $C_{18}H_{36}O_2$  (Karlson, 1993).

Uvriježena je podjela složenih lipida na fosfolipide i glikolipide. Pod fosfolipidima se podrazumjevaju spojevi koji sadrže fosforu kiselinu kao mono- ili diester, uključuju glicerofosfolipide i dio sfingolipida. Glikolipidi su spojevi koji u sebi sadrže jedan ili više monosaharida pa obuhvaćaju glikoglicerolipide i neke sfingolipide. Najzastupljeniji glicerofosfolipidi su: fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol, fosfatidilserin, difosfatidilglicerol ili kardiolipin, fosfatidna kiselina i fosfatidilglicerol. Osnovne vrste sfingolipida čine ceramidi, koji su po kemijskoj građi amidi dugolančanih baza i masnih kiselina. One lipide koji su po svojoj kemijskoj građi esteri, što ih čini nepolarnima, često nazivamo nepolarnim ili neutralnim lipidima. Najvažniji predstavnici su masti (mono-, di- i triacilgliceroli) i sterolni esteri. Za razliku od acilglicerola, alkoholna komponenta u sterolnim esterima je kolesterol, odnosno ergosterol u kvascima.

Lipidi imaju važnu ulogu u nizu biokemijskih procesa i procesa stanične biologije. Budući da su temeljni sastojci bioloških membrana, važni su za biogenezu i ulogu staničnih organela. To se ne odnosi samo na glavne skupine membranskih lipida već i na manje zastupljene vrste.

Sve biološke membrane, uključujući staničnu membranu i unutrašnje membrane eukariota, imaju istu opću građu: to su nakupine lipidnih i proteinskih molekula međusobno povezane nekovaletnim vezama. Lipidne molekule poredane su u kontinuirani dvosloj debljine 4-5 nm koji čini osnovu membrane i služi kao relativno nepropusna prepreka za većinu u vodi topljivih molekula. Proteinske molekule „otopljene“ u lipidnom dvosloju sudjeluju u različitim membranskim funkcijama.

Tri su glavne skupine membranskih lipida: fosfolipidi, glikolipidi i steroli. Svojstva bioloških membrana, kao što su čvrstoća, fluidnost i permeabilnost, velikim su dijelom određena molarnim odnosom fosfolipida i sterola, te udjelom strukturno različitih masnih kiselina u fosfolipidima.

Značajka lipida stanične membrane je njihova raznolikost po sastavu i koncentraciji, te ovisnost o izvanstaničnim uvjetima.

Budući da je stanična membrana važna struktura za održavanje stanične veze s okolinom, sastav masnih kiselina u njoj ima važan utjecaj na otpornost stanica kvasca prema naglim promjenama u okolini, kao što su npr. osmotski i temperaturni stres. To je zato što vrsta masnih kiselina, njihova duljina, nezasićenost i razgranatost, utječu na fluidnost membrane. Mikroorganizmi podvrgnuti stresu reguliraju fluidnost membrana različitim mehanizmima, među ostalim, pojačanom sintezom nezasićenih masnih kiselina i sterola.

Tako neki lipidi služe kao senzori u staničnom stresu, neki sudjeluju u signalnim procesima, neki u prijenosu signala. Lipidi su često tijesno povezani s membranskim proteinima čime omogućuju njihovo pravilno funkcioniranje kao enzima i prijenosnika. Neke vrste služe kao rezerve lipida koje se mogu koristiti kao izvor energije za vrijeme gladovanja ili pak kao izvor masnih kiselina potrebnih za sintezu membranskih fosfolipida (Blagović, 2009).



### 1.4.1. Masne kiseline

Masne kiseline su dugolančane karboksilne kiseline koje su građene iz ugljikovog lanca s terminalnom metilnom ( $\text{CH}_3$ -) grupom, na jednom, i karboksilnom ( $-\text{COOH}$ ) grupom na drugom kraju lanca. Masne kiseline međusobno se razlikuju prema broju ugljikovih atoma u ugljikovodičnom lancu, te broju, položaju i konfiguraciji dvostrukih (nezasićenih) veza, kao i prisutnosti drugih funkcionalnih grupa duž lanca. Prema vrsti kemijskih veza, mogu biti zasićene i nezasićene (tablica 2).

Tablica 2. Podjela zasićenih i nezasićenih masnih kiselina

zasićene masne kiseline		nezasićene masne kiseline	
laurinska	12:0	palmitoleinska	16:1
miristinska	14:0	oleinska	18:1
pentadekanska	15:0	linolna	18:2
palmitinska	16:0	linolenska (ALA)	18:3
margarinska	17:0	linolenska (GLA)	18:3
stearinska	18:0	eikozaenska	20:1
arahinska	20:0	arahidonska	20:4
behenska	22:0	eikozapentaenska (EPA)	20:5
lignocerinska	24:0	dokozaheksaenska (DHA)	22:6

Masne kiseline, koje su sastavni dio masti i ulja, u prirodnim namirnicama i industrijskim proizvodima mogu se javiti kao slobodne ili esterski vezane u obliku mono-, di- i triacilglicerola, fosfolipida, lipoproteina ili glikolipida.

U molekuli zasićenih masnih kiselina (engl. saturated fatty acid ili SFA) svi atomi ugljika međusobno su povezani jednostrukim vezama, a na svakom ugljikovom atomu nalazi se maksimalno mogući broj vodikovih atoma. Takva je struktura stabilna i manje podložna kemijskim reakcijama. Masnim kiselinama može nedostajati jedan par vodikovih atoma u lancu, i u tom slučaju masna kiselina sadržava jednu dvostruku ( $\text{C}=\text{C}$ ) vezu te je jednostruko ili mononezasićena (engl. monounsaturated fatty acid, MUFA). Višestruko nezasićene ili polinezasićene masne kiseline (engl. polyunsaturated fatty acid, PUFA) u ugljikovom lancu sadržavaju više od jedne nezasićene ili dvostruke veze.

Zbog mogućnosti pucanja dvostrukih veza, nezasićene masne kiseline su nestabilnije, a reaktivnost im raste s porastom broja dvostrukih veza. Omega ( $\omega$ ) ili n-broj u nomenklaturi polinezasićenih masnih kiselina uveden je radi njihove identifikacije, a označava položaj prve dvostruke veze u ugljikovom lancu, brojeno od  $\text{CH}_3$  skupine. Osnovni predstavnik skupine  $\omega$ -6 PUFA je linolna kiselina (LA, C18:2 n-6), a skupine omega-3 PUFA  $\alpha$ -linolenska kiselina (ALA, C18:3 n-3). Zbog nepostojanja enzima potrebnih za oksidaciju masnih kiselina na položaju C3 i C6 od metilnog kraja, čovjek i drugi sisavci ne mogu sintetizirati LA i ALA već ih moraju unositi u organizam putem hrane, što uvjetuje njihovu esencijalnost (Vrdoljak, 2011).

Kvasac ima vrlo jednostavan sastav masnih kiselina, od kojih palmitinska (16:0), palmitoleinska (16:1,  $\omega$ -7), stearinska (18:0) i oleinska (18:1,  $\omega$ -9) kiselina čine oko 95% ukupnog udjela acilnih lanaca membranskih lipida. Ovakva, relativno mala raznolikost masnih kiselina, čini kvasac atraktivnim i jednostavnim modelnim organizmom u temeljnim istraživanjima puteva metabolizma masnih kiselina i lipida te njihove toksičnosti..

Sinteza masnih kiselina je ubikvitaran proces koji se dešava u svim organizmima. Osnovni prekursor u ovom procesu je acetil-koenzim A (acetyl-CoA) koji se u inicijalnom koraku sinteze masnih kiselina pomoću enzima acetyl-CoA karboksilaze (Acc1) konvertira u malonil-CoA. Od malonil-CoA se pomoću enzima sintetaze masnih kiselina dalje sintetiziraju masne kiseline u ponavljajućim koracima elongacije, prilikom čega se koristi acetyl-CoA i redukcijski ekvivalent, NADPH. Najčešće masne kiseline koje nastaju ovakvom *de novo* sintezom su palmitinska (16:0) i stearinska (18:0) (Andrišić, 2013).

## 1.5. Dvodimenzionalna (2D) elektroforeza

2D elektroforeza je jedna od osnovnih metoda za analizu proteina iz stanica, tkiva ili drugih bioloških uzoraka. Sastoji se od dva koraka: izoelektričnog fokusiranja (IEF) i elektroforeze na poliakrilnom gelu (SDS - PAGE).

### 1.5.1. Izoelektrično fokusiranje

Prvi korak 2D elektroforeze, izoelektrično fokusiranje (IEF), odvaja proteine prema njihovim izoelektričnim točkama (pI).

Proteini su amfoterne molekule te ovisno o pH vrijednosti okoline, imaju pozitivan, negativan ili neutralan naboj. Naboj proteina čini zbroj svih negativnih (karboksilni kraj,  $\text{COOH}^-$ ) i pozitivnih (amino kraj,  $\text{NH}_4^+$ ) naboja aminokiselinskih lanaca. Izoelektrična točka (IP) je specifična pH vrijednost u kojem je naboj proteina neutralan.

Proteini putuju duž gela, s imobiliziranim pH gradijentom, pod utjecajem električnog polja do pH vrijednosti u kojem je ukupan naboj neutralan, tj. jednak nuli. Stoga, proteini s pozitivnim nabojem putovat će prema katodi, a proteini s negativnim nabojem prema anodi, dok ne postignu svoju pI vrijednost.

Imobilizani pH gradijent se postiže dodavanjem IPG pufera (engl. *immobilized pH gradient*, IPG), mješavina koja sadrži kiselu i bazičnu komponentu, koja se veže na monomer akrilamida. (GE Healthcare)

### 1.5.2. Elektroforeza na SDS – poliakrilamidnom gelu

Nakon izoelektričnog fokusiranja slijedi drugi korak dvodimenzionalne elektroforeze, elektroforeza na SDS – poliakrilamidnom gelu (SDS – PAGE, eng. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). SDS – PAGE razdvaja proteine prema njihovoj molekularnoj masi.

SDS – PAGE se sastoji od nekoliko koraka: priprema poliakrilamidnog gela, uravnotežavanje stripa, nanošenje stripa na gel te elektroforeza. Kod uravnotežavanja stripa koristi se pufer za uravnotežavanje, koji sadrži pufer Tris/Cl, ureu, glicerol, reducense, SDS i boju. Pufer Tris/Cl (pH = 8,8) održava odgovarajući pH raspon, dok urea i glicerol smanjuju elektroendosmozu, čime se poboljšava transfer proteina kroz gel. Od reducensa, koriste se ditionitrol (DTT) i jodacetamid (JAA). DTT održava denaturirane i alkilirane proteine u reduciranom stanju, a JAA alkilira tiolne skupine na proteinima, što sprječava njihovu oksidaciju tijekom elektroforeze. Dodavanjem boje, poput bromtimol – plavo, omogućuje se praćenje napretka elektroforeze.

Tehnika se izvodi u poliakrilamidnom gelu koji sadrži natrijev dodecil-sulfat (SDS). SDS je anionski detergent koji formira anionski kompleks s proteinima, dajući konstantan negativan naboj. Osim SDS-a, dodaje se i redukcijski reagens, poput DTT, koji razbija disulfidne veze prisutne u proteinima. Uz ova dva reagensa, stupanj elektroforetskog razdvajanja u poliakrilamidnom gelu znatno ovisi o molekularnoj masi proteina. (GE Healthcare)

## 1.6. Proteom mitohondrija

Promjene u proteomu izazvane različitim uvjetima, kao što su nedostatak hranjivih tvari ili stres, može poslužiti kao polazište za analizu funkcija proteina.

Mitohondriji su prve stanične organele u kojoj je postignuta sveobuhvatna proteomska analiza. U kvascima je identificirano oko 85% mitohondrijskih proteina. Samo 1% proteina je kodiran pomoću mitohondrijskog genoma i sintetiziran u matrici, dok je 99% kodirano pomoću genoma jezgre, koji se potom transportiraju u mitohondrije. Na površini membrane se nalaze receptori, kompleksi TIM (translokaza unutarnje membrane) i TOM (translokaza vanjske membrane), koji usmjeravaju prekursore tih proteina prema mitohondriju. Potom se prekursori obrađuju u mitohondriju te postaju funkcionalni proteini. (Schmidt i sur., 2010)

Sickmann i suradnici proveli su proteomsku studiju na visoko pročišćenim mitohondrijama. Budući da je većina proteina hidrofobna, ova proteomska studija temeljila se na metodi separacije kao što je SDS PAGE. Izdvojene proteine identificirali su koristeći masenu spektrometriju.

Identificirano je ukupno 750 proteina, što čini oko 90% proteoma mitohondrija kvasca. Od toga, 14% proteina sudjeluju u metabolizmu energije (oksidativna fosforilacija, ciklus limunske kiseline, piruvat dehidrogenaza), dok je 25% proteina uključeno u održavanju i ekspresiju mitohondrijskog genoma (sintezu proteina u matriksu). U transportu metabolita ili u metabolizmu aminokiselina, lipida i željeza sudjeluje 14% proteina. Funkcija proteina je nepoznata u 25% proteina, a ostatak djeluje u procesima fuzije i fisije, stanične signalizacije i drugim funkcijama mitohondrija.

Baza podataka o mitohondrijskom proteomu kvasca sada predstavlja sveobuhvatan izvor za karakterizaciju novih mitohondrijskih funkcija, signalnih puteva i proteolitičkih sustava te osnovu za molekularnu identifikaciju kod mitohondrijskih bolesti. (Sickmann i sur., 2003 )

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je analizirati utjecaj olova na mitohondrij kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303, odnosno pratiti promjene na lipidima i proteinima tretiranog kvasca u odnosu na netretirani.

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

#### **3.1. MATERIJAL**

##### **3.1.1. Kvasac kao radni mikroorganizam**

U istraživanju je korišten laboratorijski soj kvasca *S. cerevisiae*, W303 iz kolekcije Instituta za molekularnu biotehnologiju Tehničkog sveučilišta u Grazu.

##### **3.1.2. Uredaji i kemikalije**

- Tehnička vaga PCB1000 – 2, Kern, Njemačka
- Analitička vaga AB204-S/FACT, Mettler Toledo, Švicarska
- Vorteks, Technokartell TK3S, Australija
- pH metar Metler Toledo MP220
- Mješalica MR Hei – standard, Heidolph Instruments, Njemačka
- Mikroskop Olympus BX40
- Tresilica Unimax 1010 s inkubatorom 1000, Heidolph Instruments, Njemačka
- Vodena kupelj, Sutjeska, Beograd, Srbija
- UV – VIS spektrofotometar, Varian Cary 100s, Australija
- UV – VIS spektrofotometar, SpectroFlex 6600, Njemačka
- Laboratorijska centrifuga Hettich Rotina 420R, Njemačka
- Rotori za centrifugu Hettich: 4790 i 4723 A, Njemačka
- Ultracentrifuga Sorwall WX Ultra 80, Thermo Scientific, Japan
- Rotor za ultracentrifugu Sorwall: 80 – ti, Japan
- Termomiješalica, Eppendorf AG 22331, Njemačka
- Rotavapor, Heidolph Laborota 4002
- Vakuummodul MLS- Milestone
- Sonifikacijska kupelj Sonorex, Bandelin elektronik, Berlin, Njemačka

- Dounce homogenizator (Tight Fitting Pestle; S- pestle)
- Uređaj za izoelektrično fokusiranje Ethan IPGphor 3, GE Healthcare, Švedska
- Nosač za rehidraciju traka (Amersham Pharmacia Biosciences)
- Multiphor II elektroforetska jedinica (Amersham Pharmacia Biosciences)
- Staklena podloga s elektrodama (Amersham Pharmacia Biosciences)
- Plastična ploča s utorima za stripove
- Elektrode (Amersham Pharmacia Biosciences)
- Izvor napajanja EPS 3501 XL (Amersham Pharmacia Biosciences)
- MultiTemp III termostatski cirkulator (Amersham Pharmacia Biosciences)
- Sustav za vizualizaciju gelova G:Box Chemi XT (Syngene)
- Računalni program za slikanje gelova GeneSnap (Syngene)
- Računalni program za analizu slika gelova 2D-Dimension (Syngene)
- Uređaj za elektroforezu – TV400YK, Scie-Plas Ltd., Velika Britanija
- Vertikalni sustav za elektroforezu Hoefer SE 600 Ruby
- izvora napajanja EPS 3501 XL (Amersham Pharmacia Biosciences)
- Termostatični cirkulator 2219 Multitemp II, LKB –Bromma, Švedska
- Plinski kromatograf Perkin-Elmer Auto System XL, Norwalk, CT, USA
- Kapilarna kolona SP- 2560 (100 m x 0,25 mm x 0,2 μm) Supelco, Bellefonte. PA, SAD
- Računalni program za analizu kromatograma Turbochrom 4 chromatography software (Perkin- Elmer)
- Standard proteina GE Healthcare Amersham™ LMW Calibration kit for SDS Electrophoresis, Švedska
- Enzim zimoliza - Zymolyase 20T Arthrobacter luteus, SEIKAGAKU CORPORATION, Tokyo, Japan
- Enzim Tripsin, Merck, Njemačka
- Immobiline DryStrip gelovi 13 cm, pH 4 – 7, Amersham Pharmacia Biosciences
- Immobiline DryStrip gelovi, 13 cm, pH 3 – 11, GE Healthcare, Švedska



- ProteoSilver™ Plus Silver Stain Kit, Sigma, SAD
- Thiourea, Sigma, SAD
- CHAPS, GE Healthcare, Švedska
- IPG pufer, GE Healthcare, Švedska
- Bromfenol modro, Sigma, SAD
- Glicerol, Sigma, SAD
- SDS, Sigma, SAD
- DTT, Sigma, SAD
- Jodacetamid, Sigma, SAD
- Agarozna, Sigma, SAD
- 100% Metanol, Merck, Njemačka
- 100% Octena kiselina, Merck, Njemačka
- Boja Sypro Ruby (Invitrogen)
- Comassie Blue G- 250, Sigma, SAD
- Standard proteina albumina goveđeg seruma (BSA), Sigma, SAD
- TEMED (Tetramethylethylene-diamine), for Electrophoresis , approx. 99%, Sigma, SAD

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Uzgoj kvasca

Za uzgoj kvasca korištena je tzv. YPD-podloga (yeast extract – peptone – dextrose) sastava 2% glukoze, 2% peptona i 1% kvašćevog ekstrakta koja se priprema na sljedeći način: odvagani sastojci pomiješaju se u Erlenmeyerovu tikvicu od 1L te otope u redestiliranoj vodi. Podesi se pH s 0,1 M HCl do vrijednosti 5,5-6,0 i dopuni do oznake. Podloga se potom sterilizira u autoklavu.

Na vrh laboratorijske ušice uzme se kvasac, nacijepi u epruvetu s 10 mL podloge i uzgaja 24 sata pri 28 – 30 °C i uz mješanje od 170 rpm.

Pod sterilnim uvjetima (otvoreni plamenik) suspenzija kvasca se prelije u 200 mL podloge u Erlenmeyerovoj tikvici, doda se toksične tvari (1 M  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) do koncentracije  $\text{Pb}^{2+}$  od 8 mmol/l, uravnoteži pH sa 2M NaOH (do pH 5,5) i ponovno uzgaja 20 sati pri istim uvjetima.



Slika 4. Tresilica za uzgoj kvasca

### 3.2.2. Brojanje stanica

Dio uzorka suspenzije kvasca (prije i poslije inkubacije) izdvoji se za brojanje stanica. Od toga, uzima je 1 ml suspenzije i razrijedi s 9 ml redestilirane vode. Takvu suspenziju nanese se pomoću mikropipete na Burker-Turk komorici za brojanje. Pod svjetlosnim mikroskopom broje se žive stanice raspoređene u 16 malih kvadratića s ukupnim volumenom od  $10^{-4} \text{ cm}^3$ .

Broj stanica u 1 ml uzorka računa se prema sljedećoj formuli:

$$\text{CFU/ml} = \frac{16 * n * f}{V},$$

Gdje je **n** srednja vrijednost izbrojenih stanica, **f** recipročna vrijednost razrijeđenja, a **V** ukupni volumen komorice koji iznosi  $10^{-4} \text{ cm}^3$ .

#### 3.2.2.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Minimalna inhibitorna koncentracija je ona koncentracija toksične supstance pri kojoj je, iako inhibiran, još uvijek vidljiv porast stanice. Krutu YPD podlogu tretirali smo s  $1 \text{ M Pb}(\text{NO}_3)_2$  u rasponu koncentracija od 0,1 – 10 mmol/L. Nakon inkubacije kvasca u tekućoj YPD podlozi tijekom 24 h nacijepi se po 10  $\mu\text{L}$  suspenzije u razrjeđenjima od 0.-tog do -7. na krutu podlogu.

Nakon inkubacije kvasca na netretiroj krutoj podlozi i podlogama tretiranim s  $\text{Pb}^{2+}$  ionima kroz 72 h, prebroji se broj kolonija i odredi CFU / mL prema sljedećoj formuli:

$$\text{CFU/ml} = \frac{n * f}{V},$$

Gdje je **n** srednja vrijednost izbrojenih stanica, **f** recipročna vrijednost razrjeđenja, a **V** volumen inokulirane suspenzije koji iznosi 10  $\mu\text{L}$ .

### 3.2.3. Priprava sferoplasta

Suspenzija kvasca, nakon 20-satnog uzgoja u tikvici, prelije se u izvagane staklene centrifugirke te potom centrifugira (Hettich Rotina 420R) na 3500 – 4000 rpm kroz 5 min na 4 °C. Talog se ispere s malo ledeno hladne redestilirane vode (da bi se sprječilo djelovanje lipaze) i ponovo centrifugira na 3500 – 4000 rpm kroz 5 min na 4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant se odbaci i odredi vlažna stanična biomasa (VSM).

Vlažna stanična biomasa se rasprši u 2 mL pufera 0,1 M Tris/SO<sub>4</sub>, pH 9,4, doda se 3 mg 1,4-dithiothreitol (DTT)/g VSM te inkubira na 30 °C kroz 10 min. Nakon inkubacije slijedi centrifugiranje na 3500 – 4000 rpm kroz 5 min na 4 °C. Talog u kojem se nalaze destabilizirane stanice ispere se s malo 1,2 M sorbitola te centrifugira na 3500 – 4000 rpm kroz 5 min na 4 °C. Nakon toga talog se otopi u 6,67 mL "sferoplasting" pufera (1,2 M sorbitol, 10 mM Tris/Cl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5 )/g VSM. Napravi se nulta proba testiranja na sferoplaste, tako da se u epruveticu s 2 mL H<sub>2</sub>O, doda 20 µL suspenzije. Suspenziji se zatim doda 2 mg zimolijaze/g VSM (enzim koji razgrađuje staničnu stijenu kvasca) i inkubira na 30 °C u vodenoj kupelji. Svakih 5 – 10 min uzima se po 20 µL uzoraka i testira na sferoplaste. Sferoplasti su formirani kada se suspenzija razbistri. Nakon što se suspenzija razbistri, centrifugira se na 3500 – 4000 rpm kroz 5 min na 4 °C.

Tako dobivena stanična masa predstavlja uzorak za izolaciju pojedinih staničnih organela.

### **3.2.4. Izolacija mitohondrija**

Iz dobivenih sferoplasta provodi se ekstrakcija mitohondrija. Sferoplasti se otope u 2 mL ledeno hladnom puferu za razbijanje stanica (0,6 M manitol, 10 mM Tris/Cl, pH = 7,4)/g VSM uz 2  $\mu$ L 1 M PMSF U DMSO/g VSM te homogenizira pomoću tučka (15 puta) u Dounce homogenizator (Tight Fitting Pestle; S- pestle). Sakupljeni uzorak se centrifugira na 3600 rpm kroz 5 min na 4 °C. Dobiveni supernatant (homogenat), u kojem se nalaze mitohondriji, se čuva, a talog ponovno homogenizira. Dio homogenata dobivenog u posljednjem koraku odvoji se i zamrzne na –80 °C dok se ostatak centrifugira na 11 300 rpm kroz 10 minuta na +4 °C (Ultracentrifuga Sorwall WX Ultra 80). U dobivenom supernatantu se nalazi frakcija citosola s mikrosomima, koji se centrifugira na 11 300 rpm na +4 °C. Dobiveni talog se otapa u ledeno hladnom puferu za razbijanje i centrifugira pod istim uvjetima. Talog dobiven u posljednjem koraku predstavlja frakciju mitohondrija, koji se ispere s puferom i ponovno centrifugiraju na isti način. Istaloženi mitohondriji rasprše se u malom volumenu pufera, alikvotiraju u u mikroeprovete te spremne na – 80 °C.

### 3.2.5. Ekstrakcija lipida iz mitohondrija

Za izolaciju ukupnih lipida iz mitohondrija koristi se smjesa otapala kloroform: metanol (v/v 2:1) u količini od 4 mL po 150 uL suspenzije. Nakon ekstrakcije (1h) uzorku se dodaje 1 ml 0,034%  $\text{MgCl}_2$  koji odvaja organsku od vodene faze, a zatim se slojevi odvajaju centrifugiranjem. Donja se faza ispire dva puta s umjetnim, gornjim slojem (smjesa kloroform:metanol:voda = 48:3:47, v/v/v). Nakon toga, donja se faza prebaci u prethodno izvaganu tikvicu, upari u rotavaporu do suha te suši u eksikatoru do konstantne mase. Lipidi dobiveni u zadnjoj fazi koriste se za analizu masnih kiselina metodom plinske kromatografije.

### 3.2.6. Analiza masnih kiselina

#### 3.2.6.1. Priprava metilnih estera

Kako su masne kiseline karakterizirane visokom polarnošću, malim tlakom para i visokom tendencijom stvaranja vodikovih veza, vrlo teško se izravno određuju plinskom kromatografijom (GC). Stoga GC analizi prethodi derivatizacija masnih kiselina u hlapljivije i stabilnije derivate kao što su metil-, etil-, propil-, izopropil- ili butilesteri. Esterifikacijom se poboljšava oblik pikova, separacija i osjetljivost detektora. Da bi se vezane (esterificirane) masne kiseline iz složenih lipida (mono-, di- i triacilgliceroli, sterolni esteri i fosfolipidi) mogle prevesti u metilne estere (fatty acid methyl ester, FAME) i analizirati plinskom kromatografijom, potrebno je najprije cijepati postojeće esterske veze. Pri transesterifikaciji i metanolizi postojeće se esterske veze cijepaju pomoću kiseline ( $H_2SO_4$ , HCl ili  $BF_3$ ) i zatim se stvaraju esterske veze između masnih kiselina iz složenih lipida, kao i slobodnih masnih kiselina, i metanola pri čemu se stvaraju FAMEs.

Metilni esteri masnih kiselina pripremaju se tako da se uzorci kojima se doda reagens za metiliranje (metanol:heksan:konc.  $H_2SO_4=75:25:1$ , v/v/v) i nekoliko kuglica za vrenje kuhaju pod povratnim hladilom u vodenoj kupelji na  $90\text{ }^\circ\text{C}$  kroz 1,5h.

Nakon metanolize u tikvicu se, preko povratnog hladila (da se hladilo dobro ispere) doda petroleter i destilirana  $H_2O$  (po 10 mL na 5 mL reagensa). Smjesa se protrese pa pusti 1 – 2 h da se slojevi odijele.

Gornji organski sloj se pažljivo “pokupi” Pasteurovom pipetom i stavi u čistu epruvetu s navojem. Na lijevčič s filter papirom (nabrani) dodaje se 1 žličica bezvodnog  $Na_2SO_4$ . Prije nego što se organska faza profiltrira preko filter papira i bezvodnog  $Na_2SO_4$ , filter papir navlaži se s petroleterom.

Filtrat se hvata u epruvetu s navojem pa zatim upari pod strujom dušika ili na rotavaporu. Dobiveni uzorak metilnih estera masnih kiselina otopi se u 50 – 100  $\mu\text{L}$  kloroforma i tako ubaci u plinski kromatograf.

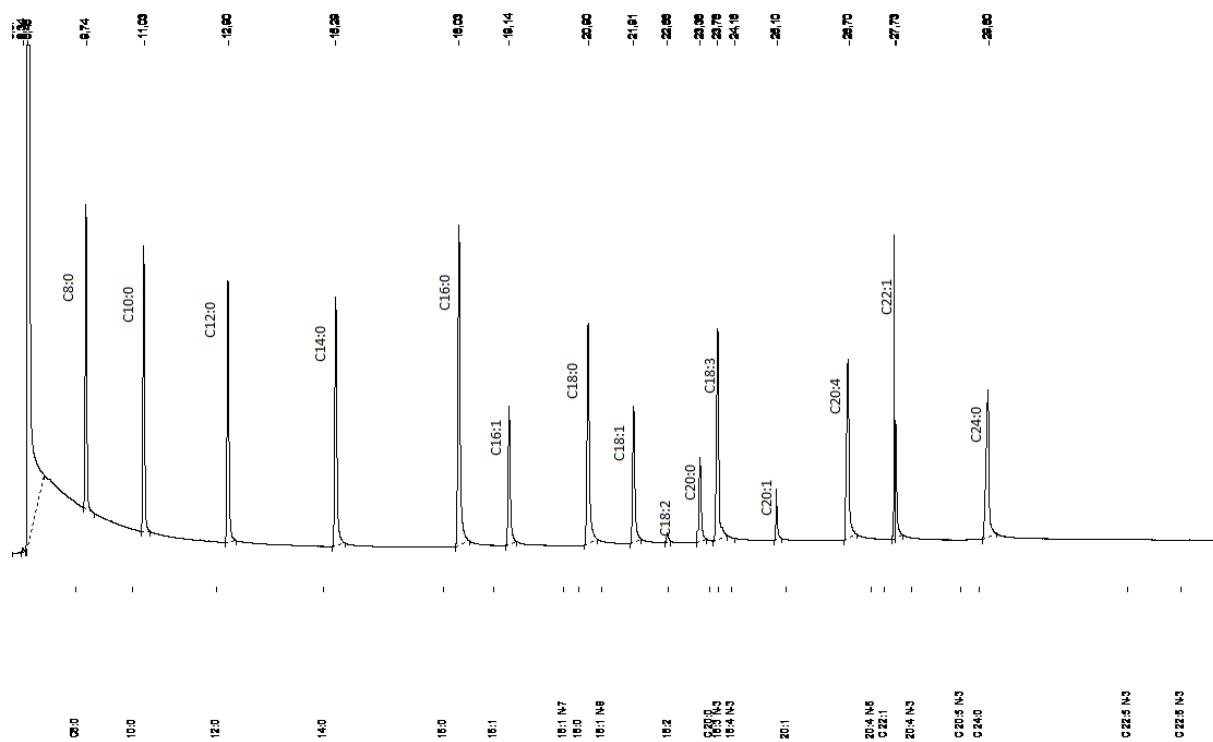
### 3.2.6.2. Određivanje sastava masnih kiselina

Masne kiseline, u obliku njihovih metilnih estera (FAMES) određuju se plinskom kromatografijom s plameno-ionizacijskim detektorom na kapilarnoj koloni SP-2560 (100 m · 0,25 mm · 0,2 μm ; Supelco, Bellefonte, SAD) i Turbochrom 4 programskim paketom. Kao mobilna faza korišten je helij. Početna temperatura kolone bila je 140° C kroz 1 minutu, pa se povećavala za 5° C/minuti do temperature od 180° C i za 4° C/minuti do konačne temperature od 240° C, a nakon toga izotermno 15 minuta. s visoko polarnom stacionarnom fazom. Kao mobilna faza (plin nosač) korišten je helij. Prije injektiranja uzoraka u kolonu, unijeta je standardna smjesa metilnih estera masnih kiselina (Smjesa masnih kiselina od C8:0 - C24:0, 189-18; Sigma, SAD) (tablica 3). Uzorci su injektirani u volumenu od 1 μL. Masne kiseline identificirane su usporedbom relativnih vremena zadržavanja (relativnih retencijskih vremena) sa standardnom smjesom (slika 5), dok su udjeli izračunati iz površine pikova (tablica 3).

Tablica 3. Sastav standardne smjese metilnih estera masnih kiselina (Smjesa 189-18) korištene u plinskoj kromatografiji

<b>Metilni ester masne kiseline</b>	<b>Maseni udio, w/%</b>
<b>8:0</b>	8
<b>10:0</b>	8
<b>12:0</b>	8
<b>14:0</b>	8
<b>16:0</b>	11
<b>16:1(n-7)</b>	5
<b>18:0</b>	8
<b>18:1(n-9)</b>	5
<b>18:2(n-6)</b>	5
<b>18:3(n-3)</b>	5
<b>20:0</b>	8
<b>22:0</b>	8
<b>22:1(n-9)</b>	5
<b>24:0</b>	8





Slika 5. Kromatogram standardne smjese

### **3.2.7. Priprema proteina iz uzoraka**

Izolirani uzorci mitohondrija pipetiraju se u izvaganim mikroeprijetama i centrifugiraju na 12 000 rcf (Hettich Rotina 420 R) kroz 20 min na +2 °C. Na masu peleta (taloga) doda se peterostruki volumen pufera za lizu (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS) i 1% proteaznih inhibitora te drži na ledu kroz 1 h, povremeno mješajući (Vortex, Technokartell TK3S). Tijekom tih sat vremena, uzoci se i sonificiraju (3 puta po 15 sekundi), a nakon toga centrifugiraju 1 sat na 20 000 rcf na +4 °C. Dobiveni supernatant, u kojem se nalaze proteini, alikvotira se na manje volumene i čuva na -80 °C do daljne analize.

### 3.2.8. Analiza proteina – Biotehniški fakultet u Ljubljani

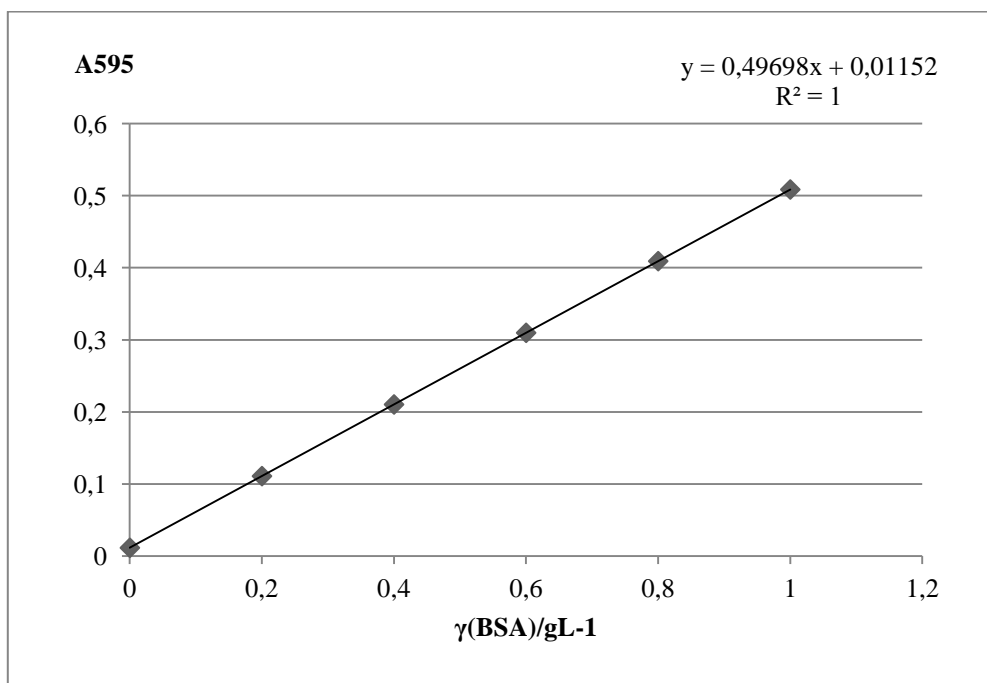
#### 3.2.8.1. Određivanje proteina metodom prema Bradford-u

U jažice mikrotitarske ploče nanijeli smo 4  $\mu\text{L}$  uzorka proteina i 196  $\mu\text{L}$  1% Bradford otopine. Kao slijepu probu umjesto uzorka nanijeli smo 4  $\mu\text{L}$  redestilirane  $\text{H}_2\text{O}$ . U reakciji s proteinima, Bradford reagens mijenja boju u plavu. Ukoliko je promjena boje intenzivna potrebno je provesti razrjeđenje. Nakon 5 min mjeri se apsorbancija. Mjerenje apsorbancije se provodi na spektrofotometru (Safire II) pri valnoj duljini  $\lambda = 595 \text{ nm}$ .

Koncentracija proteina izračunava se pomoću apsorbancije preko jednadžbe baždarnog pravca

$$y = 0,49689x + 0,01152,$$

gdje je  $x$  vrijednost koncentracije proteina u  $\text{g/L}$ , a  $y$  vrijednost apsorbancije.



Slika 6. Baždarna krivulja za određivanje koncentracije proteina

### 3.2.8.2. Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje je prva dimenzija 2D elektroforeze, koja se izvodi na gel-stripu *Immobiline DryStrip* (GE Healthcare), veličine od 13 cm i pH raspona od 4 – 7. Uzorak, koji sadrži 40 µg proteina, treba otopiti u 250 µL otopine za rehidraciju (7 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 2% IPG pufer i par kapi bromfenol modrila). Takvu pripremljenu suspenziju ravnomjerno se nanese na nosač za strip. Sa stripa se otkloni plastična folija i provuče kroz suspenziju na nosaču, tako da je gel okrenut prema donjoj strani i da je pozitivan kraj stripa stavljen na pozitivan kraj nosača, odnosno negativan kraj stripa na negativan kraj nosača. Na nosač doliti mineralno ulje i poklopiti. Nakon rehidracije preko noći, tako pripremljene stripove staviti na uređaj i pokrenuti izoelektrično fokusiranje (tablica 4).

Tablica 4. Koraci u izoelektričnom fokusiranju

Korak	Način mijenjanja napona	Napon (V)	Vrijeme (h : min)
1	Izokratno	500	1 : 00
2	Gradijent	1000	1 : 00
3	Gradijent	8000	2 : 30
6	Faza održavanja	8000	0 : 45 – 1 : 15
Ukupno			5 : 45 – 6 : 15

### 3.2.8.3. SDS – PAGE elektroforeza

Nakon izolektričnog fokusiranja slijedi druga dimenzija 2D elektroforeze, SDS – poliakrilamidna gel elektroforeza, koja se odvija se u više koraka: slaganje aparature i priprema gela, uravnotežavanje stripova, nanošenje stripova na gel i elektroforeza.

Aparatura za pripremu dva gela slaže se tako da se stakleni nosači, između kojeg se nalazi razmaknica, pričvrste s vijcima. Takav model se stavi na nosač i također pričvrsti s vijcima, da bi se spriječilo curenje gela.

Otopina za pripravu 2 gela, veličine 14 x 16, se sastoji od: 13,0 ml redistirane H<sub>2</sub>O, 9,8 ml 1,5 M otp. Tris/Cl (pH=8,8), 0,4 ml 10% (w/v) SDS, 15,7 ml 30% akrilamida, 195 µL 10% (w/v) otp APS, 13 µL TEMED. Sastojci se redom miješaju i takva pripremljena smjesa ulijeva među staklima do 1 cm od gornjeg ruba. Da bi površina bila ravna, dodaje se redestilirana voda. Gel se pusti preko noći da se polimerizira, tj. stisne.

Prije nanošenja stripa na gel, stripovi se moraju uravnotežiti. Pufer za uravnotežavanje priprema se tako da se u Erlenmeyer-ovu tikvicu stavi 5 ml 1,5 M Tris/Cl pH =8,8, 36 g urea, 30 mL glicerol, 2 g SDS i 1 kristal bromfenol modrila i nadopuni do 100 ml s redestiliranom vodom. Prvih 15 min, strip se miješa sa 1% DTT-om otopljenim u 5 mL pufera za uravnotežavanje, a zatim 15 min sa 4,8% jodacetamidom otopljenim u 5 mL pufera za uravnotežavanje. Nakon uravnotežavanja, strip se spusti do površine gela te učvrsti s 0,5% agaroznim gelom. U agarozni gel dodaje se 1xSDS i bromfenol modriilo (BMF).

Nakon što agarozni gel očvrstne, model prenijeti u kadu za elektroforezu i ispuniti sa 1x SDS elektroforeznim puferom.

Namjeste se elektrode i pokreće program (SDS-page) sa konst. temperaturom od 20°C. Prvih 15 min, putovanje iona prema anodi, ima tok od 20 mA, a potom 40 mA. Proces elektroforeze prekinemo kada plava linija (BFM) dosegne donji dio gela.

#### **3.2.8.4. Obrada gelova**

Nakon elektroforeze, iz modela se odvoji gel s proteinima (veličine 14x16 cm), označi i pažljivo prenese u posudu s 200 ml otopine za fiksiranje (50% (v/v) metanol, 7% (v/v) octena kis.) i inkubira 30 min (x2). Za bojanje gela koristi se 200 ml boje Sypro Ruby (u mraku), prekrije folijom i pusti preko noći. Nakon bojanja proteina na gelu, gelovi se odbojavaju sa 200 ml WASH otopinom (10% (v/v) metanol, 7% (v/v) octena kis.) i inkubira 30 min (x2). Zatim se ispiru s 200 ml ddH<sub>2</sub>O i inkubira 5 min (x3). Obojani gelovi pohranjuju se na 4°C do slikanja.

#### **3.2.8.5. Slikanje gela**

Gel se pažljivo prenese na aparat za slikanje (G-BOX), tako da je pozitivna strana gela okrenuta na lijevo. Slikanje se vrši pod UV lampom (UV transiluminator) preko programa GENE SNAP.

#### **3.2.8.6. Analiza gelova**

Analiza gelova se vrši preko programa *Dymension From Syngene*. Uspoređuju se spotovi između kontrole i uzorka tretiranog sa teškim metalom (Pb<sup>2+</sup>).

#### **3.2.8.7. Rezanje spotova**

Gel s proteinima se stavi na uređaj sa UV lampom pomoću kojega se spotovi proteina vizualiziraju emitirajući ružičastu svjetlost.

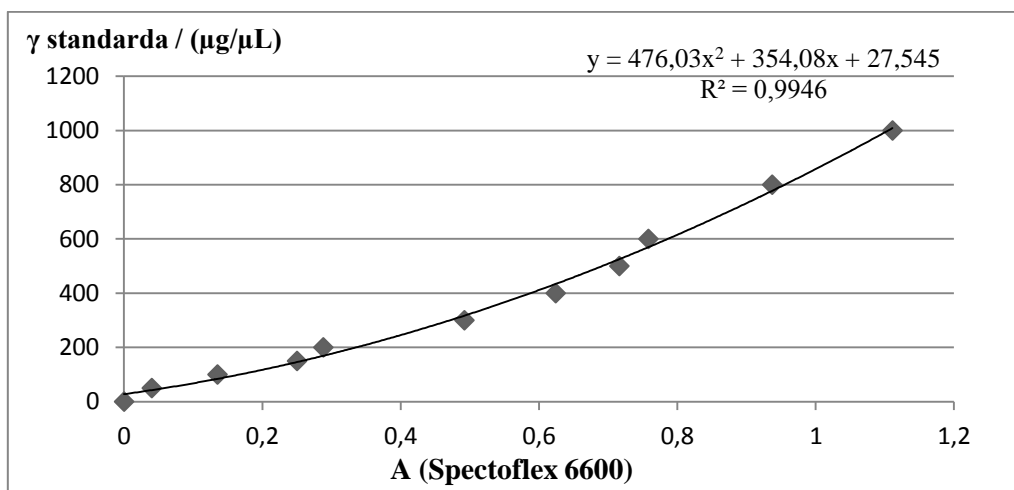
Spotovi koji su pokazali značajnu razliku  $p < 0,05$ , kao i spotovi koji su se pojavili u uzorku tretiranog s teškim metalom, izrežu se pomoću vrha nastavka za pipetiranje te šalju na daljnu identifikaciju.

### 3.2.9. Analiza proteoma – Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

#### 3.2.9.1. Mjerenje koncentracije proteina metodom prema Bradford-u

Bradford reagens se priprema tako da se najprije pripremi svježa otopina Bradfordovog reagensa (Coomassie Blue G-250 boja otopi se u 95%-tnom etanolu u koji se dodaje i 85%-tna (w/v) fosforna kiselina. Reagens bi trebao biti svijetlo smeđe boje, stoga ga je potrebno neposredno prije uporabe filtrirati kroz naborani filter papir kako bi se višak plave boje uklonio te pohraniti u tamnoj boci s čepom.

Iz stock standardne otopine proteina albumina goveđeg seruma (BSA – Bovine Serum Albumin), koncentracije 2 mg/ml, napravi se serijsko razrijeđenje u rasponu od 0 do 1000 µg/ml. Zatim se 50 µL standarda određene koncentracije promiješa sa 1500 µL Bradford reagensa i inkubira na sobnoj temperaturi tijekom 1 min. Apsorbancija standarda BSA očituje se spektrofotometrom (SpectroFlex 6600) na valnoj duljini od 595 nm, unutar 15 min prema negativnoj kontroli, tj. red. H<sub>2</sub>O i Bradford reagens. Iz vrijednosti koncentracija standardnih otopina i pripadajućih apsorbancija izradi se baždarna krivulja (slika 7.) iz koje se dobiva podatak o koncentraciji proteina u ispitivanim uzorcima.



Slika 7. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda BSA

### 3.2.9.2. Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje proteina provodi se na gel stripu (Immobiline DryStrip, GE Healthcare) duljine 13 cm u pH rasponu od 3 do 11. Stripovi se najprije rehidriraju u rehidracijskoj (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, i par kapi bromfenol modrila). Na nosač stripa nanosi se 250  $\mu$ L smjese s uzorkom, koja se sastoji od određenog volumena uzorka koji sadrži 60  $\mu$ g proteina, 0,5% ukupnog volumena IPG pufera, 1% ukupnog volumena DTT-a te rehidracijske otopine do 250  $\mu$ L. Sa stripa se otkloni plastična folija i provuče kroz suspenziju na nosaču, tako da je gel okrenut prema donjoj strani. Na nosač se dolije s 1mL otopine (*Dry strip cover fluid*) radi zaštite od sušenja i poklopi. Postupak rehidracije traje 12 sati tijekom kojih dolazi do vezanja proteina na gel. Nakon rehidracije, pokreće se izoelektrično fokusiranje.

Tablica 5. Koraci u izoelektričnom fokusiranju

Korak	Način mijenjanja napona	Napon (V)	Vrijeme (h : min)
1	Izokratno	50	1 : 00
2	Izokratno	200	1 : 00
3	Izokratno	500	1 : 00
4	Gradijent	1000	1 : 00
5	Gradijent	8000	2 : 30
6	Faza održavanja	8000	0 : 30
7		200	10 : 00



### 3.2.9.3. SDS PAGE- elektroforeza

U pripremljeni kalup, veličine 16x16 cm, ulijeva se poliakrilamidni gel koncentracije od 12%. Otopina za pripremu 2 gela se sastoji od: 60,2 ml redistirane H<sub>2</sub>O, 35,0 ml 1,5 M otp. Tris/Cl (pH=8,8), 1,4 ml 10% (w/v) SDS, 42,0 ml 30% akrilamida, 1,4 mL 10% (w/v) otopine APS, 56 µL TEMED. Sastojci se redom miješaju i takva pripremljena smjesa ulijeva među staklima do 1 cm od ruba gornjeg stakla. Površina gela prekrije se izopropanolom, da bi površina gela bila ravna te pusti preko noći da se stisne. Prije nanošenja stripa na gel, stripovi se moraju uravnotežiti u puferu za uravnotežavanje (8 ml 1,5 M Tris/Cl pH =8,8, 86,4 g urea, 72 mL glicerol, 4,8 g 2% SDS i redistirana voda do 240 mL). Pufer za uravotežavanje se podijeli u dva jednaka dijela, a zatim u jednom dodaje 1% DTT, a u drugom 2,5% jodacetamid. Stripovi se u svakoj smjesi inkubiraju po 15 min. Pripremljeni 1xSDS se ulije na gel (1 mL) i u kadicu za elektroforezu. Na jedan kraj gela postavljaju se stripovi, a na drugi kraj standard sa smjesom proteina poznate molekulske mase. Na kraju se stripovi učvrste sa 0,5% agarozom (u SDS puferu) i pokreće elektroforeza. Prva faza traje 20 min pri jakosti struje od 20 mA i snazi od 1 W, a druga faza pri jakosti struje od 60 mA i snazi od 12 W. Proces elektroforeze traje dok plava linija (bromfenol modriilo) ne dospije donji rub gela.

### 3.2.9.4. Bojanje gelova srebrom (metoda po Mortz-u)

Nakon elektroforeze, slijedi fiksiranje gelova u otopinu za fiksaciju (50% MeOH, 12% HAc, 0,05% formalin), najmanje 2 h ili preko noći. Zatim se gelovi ispiru sa 35% etanolom (3 puta po 20 min). Osjetljivost gela pojačava se s 0,02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> kroz 2 min, a potom se ispiru s redistiranom vodom (3 puta po 5 min). Bojanje gela vrši se metodom po Mortz-u sa otopinom srebrom (0,2% AgNO<sub>3</sub>, 0,076% formalin) tijekom 20 min, gdje se ioni Ag<sup>+</sup> vežu za proteine. No, da bi se proteini vizualizirali, nakon bojanja i ispiranja s vodom, na gel se ulije otopina za razvijanje (6% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,05% formalin, 0,0004% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Razvijanje gela se provodi dok ne pojave smeđe mrljice, a zatim zaustavlja sa Stop otopinom (50% metanol, 12% octena kiselina) kroz 5 min.

Nakon bojanja, gelovi se skeniraju i obrađuju u *UVIspot* programu.

### 3.2.10. Analiza proteina iz 2D SDS – PAGE gela obojanog srebrom

Analiza uzoraka proteina mitohondrija odjeljena 2D elektroforezom provedena je u Centru za proteomiku i spektrometriju masa u Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu.

Prvi korak, nakon primitka uzoraka proteina na gelu, je odbojavanje uz pomoć ProteoSilver™ Plus Silver Stain kompleta kemikalija prema uputama proizvođača.

Nakon odbojavanja gela slijedi digestija u gelu, pri čemu se uzorci inkubiraju na tresilici (500 rpm, sobna temperatura) u sljedećim 3 otopinama:

- 1) 50 mM otopina  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 7,8 kroz 30 min
- 2) 500  $\mu\text{L}$  otopine 1:1 (v/v) 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 7.8/acetonitril kroz 30 min sobna temperatura).
- 3) 100  $\mu\text{L}$  acetonnitrila tijekom 5 min na tresilici

Nakon inkubacije uklonjen je acetonitril, a gelovi se posuše u SpeedVac uređaju. Na osušene uzorke gela je dodano 10  $\mu\text{L}$  otopine tripsina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 7.8) te inkubiraju 18 h (450 rpm, 37 °C).

Nakon digestije proteina u gelu odvojen je tripsinski pufer od gela koji je posušen u SpeedVac uređaju. Ekstrakcija gela provodi se s 10  $\mu\text{L}$  otopine 1:1 (v/v) 5% TFA/acetonitril te inkubiraju 30 min u sonifikacijskoj kupelji, a zatim na termomikseru (500 rpm, sobna temperatura) kroz 15 min. Ekstrakti se spajaju s pripadajućima prethodno osušenim uzorcima i osuše u SpeedVac uređaju. Tako spojeni uzorci peptida dodatno se pročišćuju uz pomoć robota AssayMAP BRAVO koristeći C18 kolonice nakon čega se suše u SpeedVac uređaju.

Posušeni peptidi se resuspendiraju u matrici,  $\alpha$ -Ciano-4-hidroksicimetnoj kiselini (5 mg / mL u otopini 1:1 v/v voda/acetonitril) i nakapaju na MALDI pločicu. Analiza je provedena na spektrometru masa MALDI TOF/TOF.

Za identifikaciju proteina i pretragu baze podataka korišten je software ProteinPilot v4.5 (Sciex, SAD). Kombinirana pretraga iona iz MS i MS/MS eksperimentalnih podataka uspoređivana je NCBI Inr bazom podataka koristeći MASCOT pretraživač.

### **3.2.11. Protein – protein interakcije**

Da bi shvatili funkcionalnost stanice ili živog organizma važno je poznavati interakcije proteina. Proteini su jedna od osnovnih građevnih jedinica u organizmu. Proučavanje bioloških procesa kao i promjene na proteinima, koje razvijaju razne bolesti, od velike su važnosti za razumjevanje stabilnosti i funkcije proteina

U ovom radu koristili smo bazu podataka *String* (<http://string-db.org/>), koja služi za kreiranje i analizu mape interakcija među proteinima. Ona prikuplja podatke o proteinima iz drugih baza podataka te prikazuje njihovu strukturu, opis i povezanost sa drugim proteinima, kao i njihovu međusobnu komunikaciju.

String baza podataka trenutno pokriva 9'643'763 proteine iz 2'031 organizama.

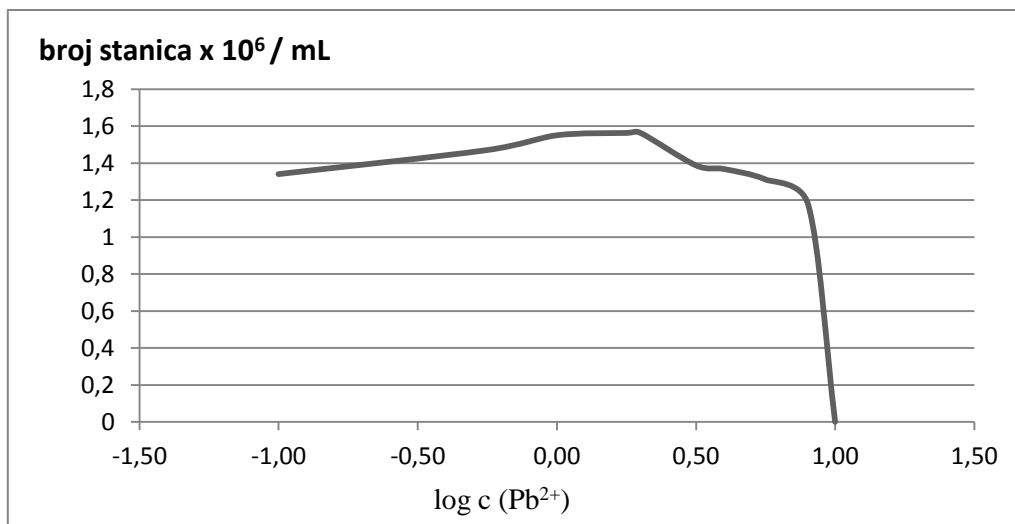
## 4. REZULTATI

### 4.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije iona olova prikazane su u tablici 6, kao broj izraslih stanica u 1 mL suspenzije, odnosno kao inhibicija rasta u odnosu na broj stanica u netretiranom uzorku.

Tablica 6. Inhibicija na rast kvašćevih stanica

<b>koncentracija Pb<sup>2+</sup> iona u hranjivoj podlozi / (mmol / L)</b>	<b>broj stanica x 10<sup>6</sup> / mL</b>	<b>% inhibicije</b>
<b>0,10</b>	1,34	35,89
<b>0,562</b>	1,47	29,67
<b>1,00</b>	1,55	25,84
<b>1,78</b>	1,5625	25,24
<b>2,00</b>	1,5625	25,24
<b>3,16</b>	1,3875	33,61
<b>4,00</b>	1,367	34,59
<b>5,62</b>	1,311	37,27
<b>8,00</b>	1,175	43,78
<b>10,00</b>	0	100,00



Slika 8. Grafički prikaz broja izraslih kolonija u ovisnosti o logaritmu koncentracije iona olova

#### 4.2. Prirast kvašćevih stanica

Tijekom rada, izdvojene su suspenzije kvasca na početku i na kraju perioda inkubacije, kako bi se odredio prirast broja stanica (tablica 7.) na temelju broja stanica izbrojanih u Burken-Turk –ovoj komorici, u kontroli i suspenziji kvasca tretiranog s Pb<sup>2+</sup> ionima.

Tablica 7. Prirast kvašćevih stanica u netretiranom i tretiranom (Pb<sup>2+</sup>) uzorku

	<b>kontrola</b>	<b>Pb<sup>2+</sup></b>
<b>broj stanica kvasca na početku inkubacije</b>	3534000	1919500
<b>broj stanica kvasca na kraju inkubacije</b>	180431429	6131667
<b>prirast</b>	51,6869	3,1944
<b>% inhibicije</b>	93,8	

### 4.3. Maseni udio lipida po gramu proteina

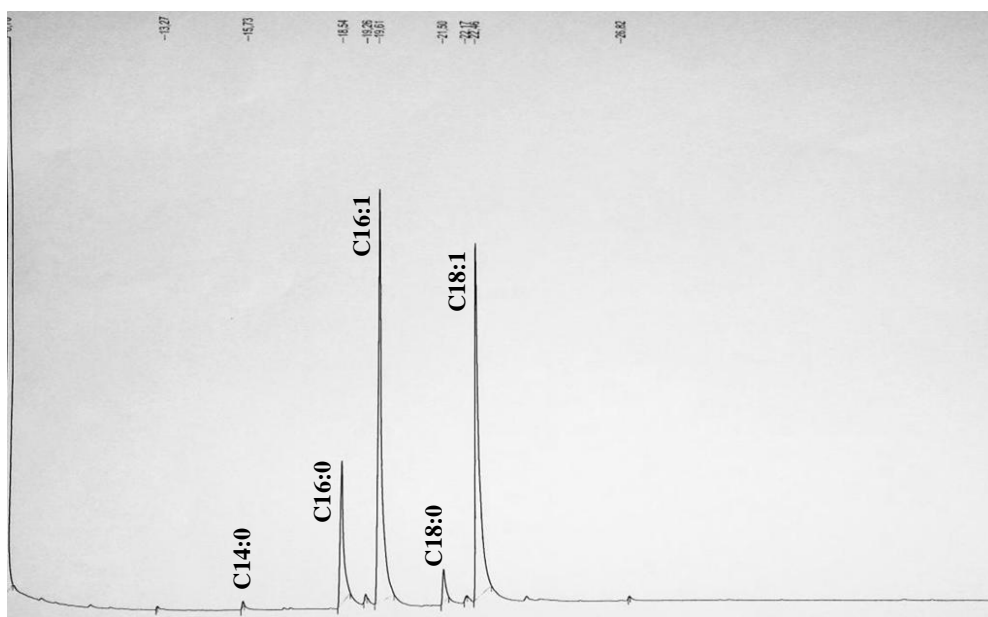
Nakon ekstrakcije lipida iz staničnih organela određena je masa ukupnih lipida. Metodom po Bradfordu određene su koncentracije proteina u pojedinim uzorcima, pomoću koje je izračunata masa proteina (volumen uzorka proteina je 800  $\mu\text{L}$ , osim kod uzorka Pb1 gdje je 700  $\mu\text{L}$ ).

Tablica 8. Mase mitohondrijskih lipida i proteina u netretiranim (K) i tretiranim uzorcima (Pb)

uzorak	masa ukupnih lipida / mg	koncentracija proteina/ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	masa proteina/mg	maseni udio lipida po gramu proteina (mg/mg)	srednja vrijednost $\pm$ st. dev.
K1	3,60	2,057	1,6456	2,1877	2,53 $\pm$ 0,49
K2	3,70	2,057	1,6456	2,2484	
K3	3,50	2,057	1,6456	2,1269	
K4	2,50	0,968	0,7744	3,2283	
K5	2,10	0,968	0,7744	2,7118	
K6	3,40	1,849	1,4792	2,2985	
K7	2,90	1,849	1,4792	1,9605	
K8	3,30	1,849	1,4792	2,2309	
K9	4,20	1,719	1,3752	3,0541	
K10	4,50	1,719	1,3752	3,2723	
Pb1*	1,10	0,861	0,4305	2,5552	3,60 $\pm$ 1,46
Pb2	4,00	0,968	0,7744	5,1653	
Pb3	2,50	0,968	0,7744	3,2283	
Pb4	2,90	2,193	1,7544	1,6530	
Pb5	3,80	2,193	1,7544	2,1660	
Pb6	1,60	0,526	0,4208	3,8023	
Pb7	2,40	0,526	0,4208	5,7034	
Pb8	1,90	0,526	0,4208	4,5152	

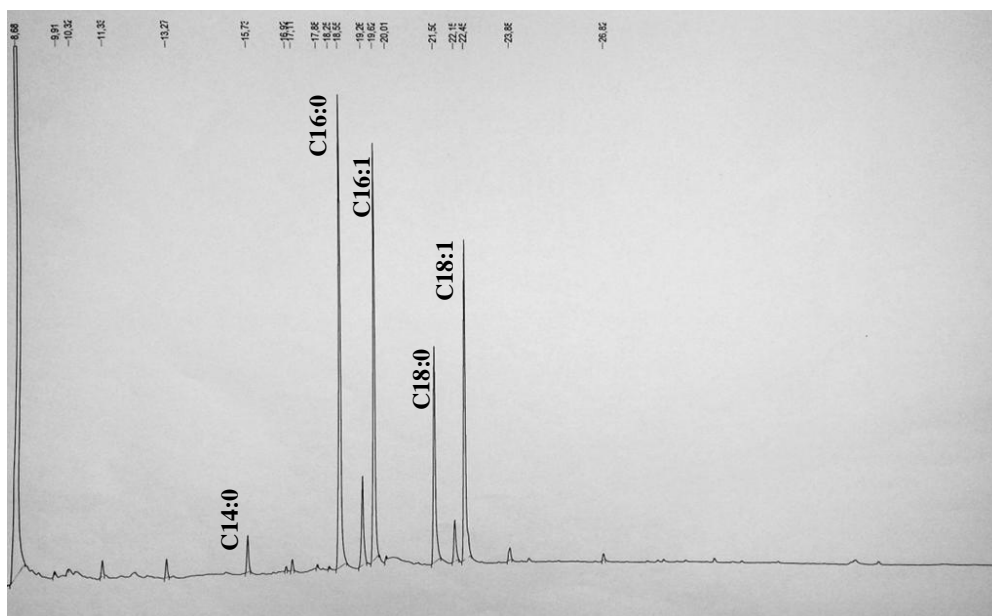
#### 4.4. Sastav masnih kiselina mitohondrijskih lipida

Sastav masnih kiselina ukupnih lipida očitano s kromatograma uzoraka određen je u odnosu na sastav masnih kiselina standardne smjese (slika 5). Na slikama 9 i 10 prikazani su kromatogrami kontrolnog uzorka, bez  $Pb^{2+}$ -iona u podlozi, i uzorka uzgojenog s 8 mmol/L  $Pb^{2+}$  u podlozi.



Slika 9. Kromatogram kontrolnog uzorka (bez  $Pb^{2+}$  u podlozi)

U uzorku bez  $Pb^{2+}$  u podlozi možemo uočiti da su od masnih kiselina najzastupljenije palmitoleinska i oleinska kiselina, a potom palmitinska i stearinska kiselina (slika 9.), dok su u uzorku s  $Pb^{2+}$  ionima najzastupljenije masne kiseline palmitinska i stearinska, a zatim palmitoleinska i oleinska kiselina (slika 10.).



Slika 10. Kromatogram uzorka s  $8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Pb}^{2+}$  u podlozi

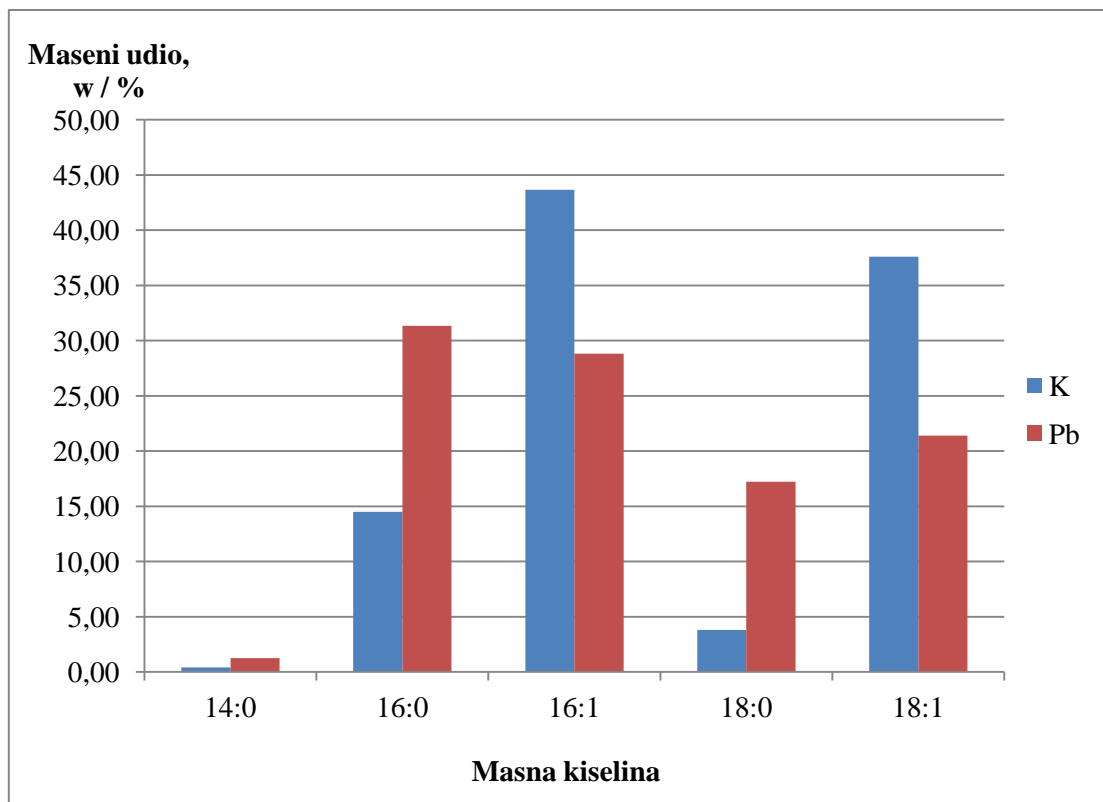
Analizom kromatograma dobiven je ukupni sastav masnih kiselina u kontrolnom (netretiranom) uzorku i uzorcima tretiranim s  $\text{Pb}^{2+}$ -ionima te njihovi maseni udjeli čije su vrijednosti prikazane u tablici 9.



Tablica 9. Sastav masnih kiselina ukupnih lipida kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

	<b>K-1</b>	<b>K-2</b>	<b>K-3</b>	<b>Pb-1</b>	<b>Pb-2</b>	<b>Pb-3</b>
<b>14:0</b>	0,81	0,16	0,28	0,0	2,03	1,71
<b>16:0</b>	15,17	14,06	14,30	31,45	30,09	32,44
<b>16:1</b>	45,94	44,19	40,87	29,34	30,22	26,90
<b>18:0</b>	3,74	2,29	5,38	19,87	14,47	17,31
<b>18:1</b>	34,34	39,30	39,18	19,34	23,19	21,64

U sastavu masnih kiselina ukupnih lipida svih uzoraka identificirano je 5 masnih kiselina: miristinska (14:0), palmitinska (16:0), palmitoleinska (16:1), stearinska (18:0) i oleinska (18:1) kiselina.





Slika 11. Grafički prikaz odnosa karakterističnih skupina masnih kiselina između netretiranog (K ) i tretiranog (Pb ) uzorka

Promjene vidljive u masenom udjelu identificiranih masnih kiselina između netretiranog i tretiranog uzorka su značajne.

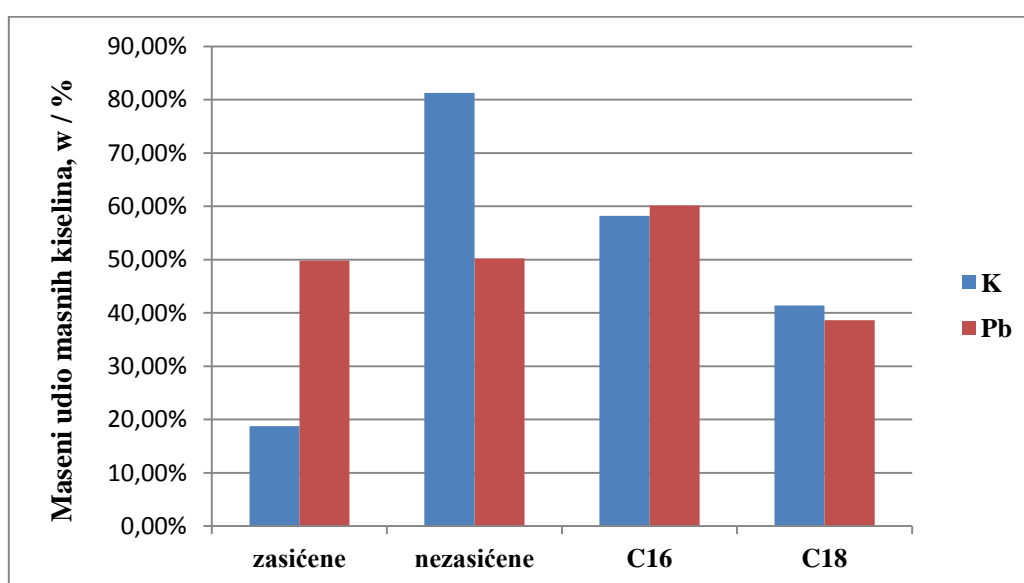
Iz slike 11. je vidljivo da je porast zasićenih masnih kiselina u tretiranim uzorcima u odnosu na netretirani, na račun nezasićenih masnih kiselina.

Tablica 10. Omjeri karakterističnih skupina masnih kiselina u mitohondrijskim lipidima kontrolnog i tretiranog (Pb) uzorka

	<b>Kontrola</b>	<b>Pb</b>
<b>NMK/ZMK</b>	4,34	1,01
<b>C16/C18</b>	1,41	1,56
<b>C16:0/C16:1</b>	0,33	1,09
<b>C18:0/C18:1</b>	0,10	0,81

ZMK = zasićene masne kiseline; NMK = nezasićene masne kiseline.

U tablici 10 prikazane su glavne karakteristike sastava masnih kiselina pojedinih uzoraka.



Slika 12. Grafički prikaz ovisnosti karakterističnih skupina u mitohondrijskim lipidima u netretiranom i tretiranom uzorku

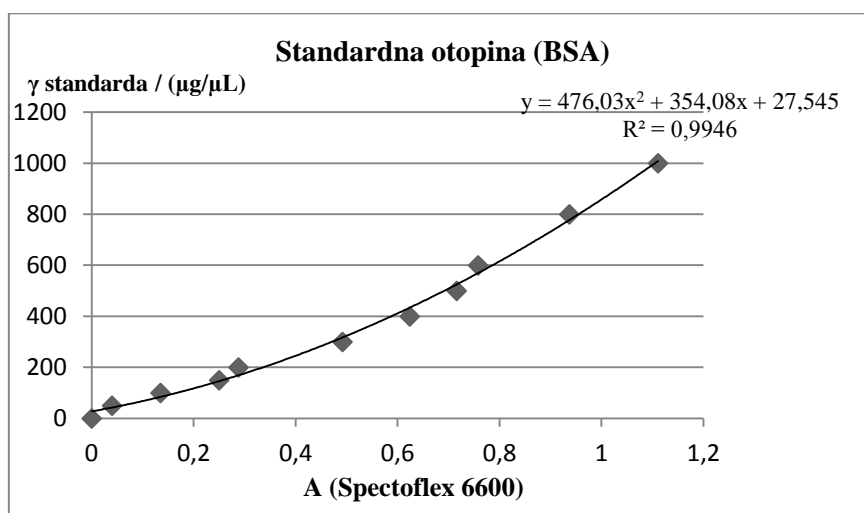
Iz slike 12. je vidljivo da su promjene između tretiranog i netretiranog uzorka u masnim kiselinama veličine C16, odnosno C18 vrlo male, ali su zato promjene zasićenih, odnosno nezasićenih masnih kiselina značajno velike. Vidljivo je da je porast zasićenih masnih kiselina u tretiranim uzorcima u odnosu na netretirani, na račun nezasićenih masnih kiselina.

## 4.5. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Koncentracija proteina izračunava se pomoću apsorbancije uzoraka preko jednadžbe baždarnog pravca (slika 13):

$$y = 476,03x^2 + 354,08x + 27,545,$$

gdje je x vrijednost koncentracije proteina u  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , a y vrijednost apsorbancije.



Slika 13. Baždarna krivulja za određivanje koncentracije proteina

Tablica 11. Koncentracija proteina u netretiranim i tretiranim ( $\text{Pb}^{2+}$ ) uzorcima

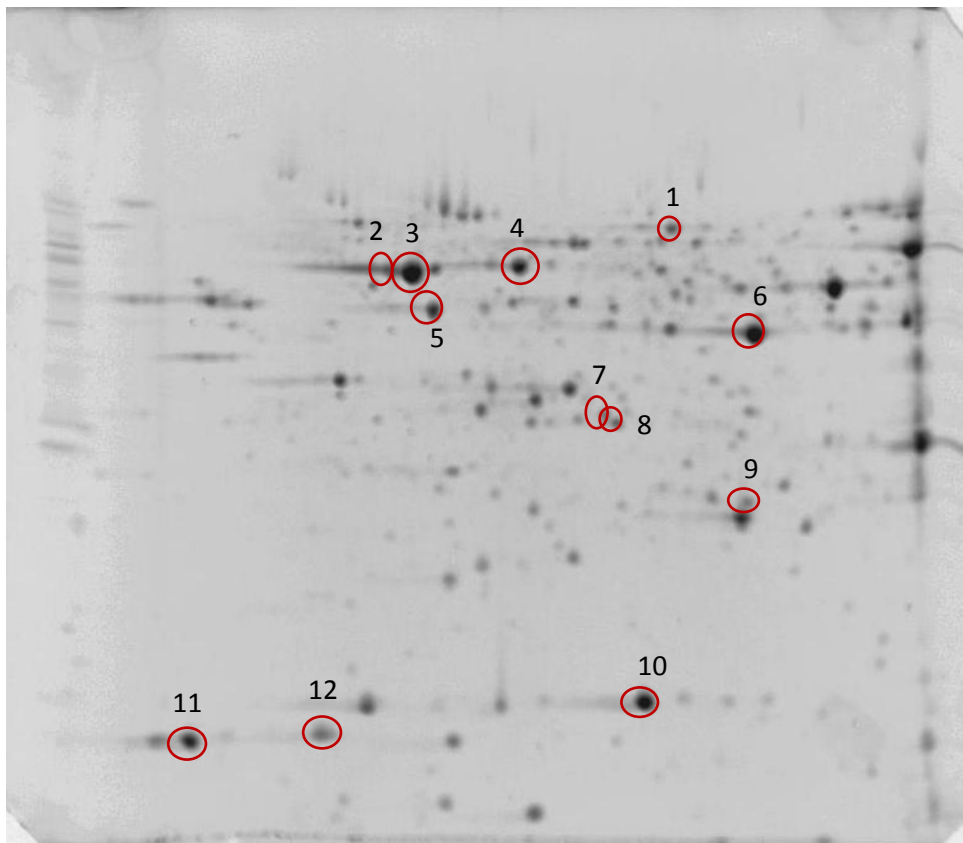
br. uzorka	UZORCI	A	$\gamma$ ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
1	K 9.3.	0,600	2,057
2	K 11.3.	0,554	1,849
3	K 15.3.	0,524	1,719
4	PB 11.3.	0,293	0,861
5	PB 15. 3.	0,629	2,193
6	PB 16. 3.	0,177	0,526

Koncentracije proteina u pojedinim uzorcima, tretiranim i netretiranim, prikazane su u tablici 11.

## 4.6. Proteinski profil

Proteini u uzorcima mitohondrija odijeljeni su dvodimenzionalnom elektroforezom. Na slici x i slici x prikazani su proteinski profili na kojima su označeni proteini koji pokazuju promjene. Nakon obrade gelova s proteinima s odgovarajućim programom (*Dymension From Syngene*) dobili smo podatak o promjeni izričaja proteina kroz promjenu volumena pojedinog proteina. Promjena izričaja izražava se kao smanjenje, odnosno povećanje odnosa volumena proteina tretiranog s  $Pb^{2+}$  ionima i volumena proteina netretiranog uzorka.

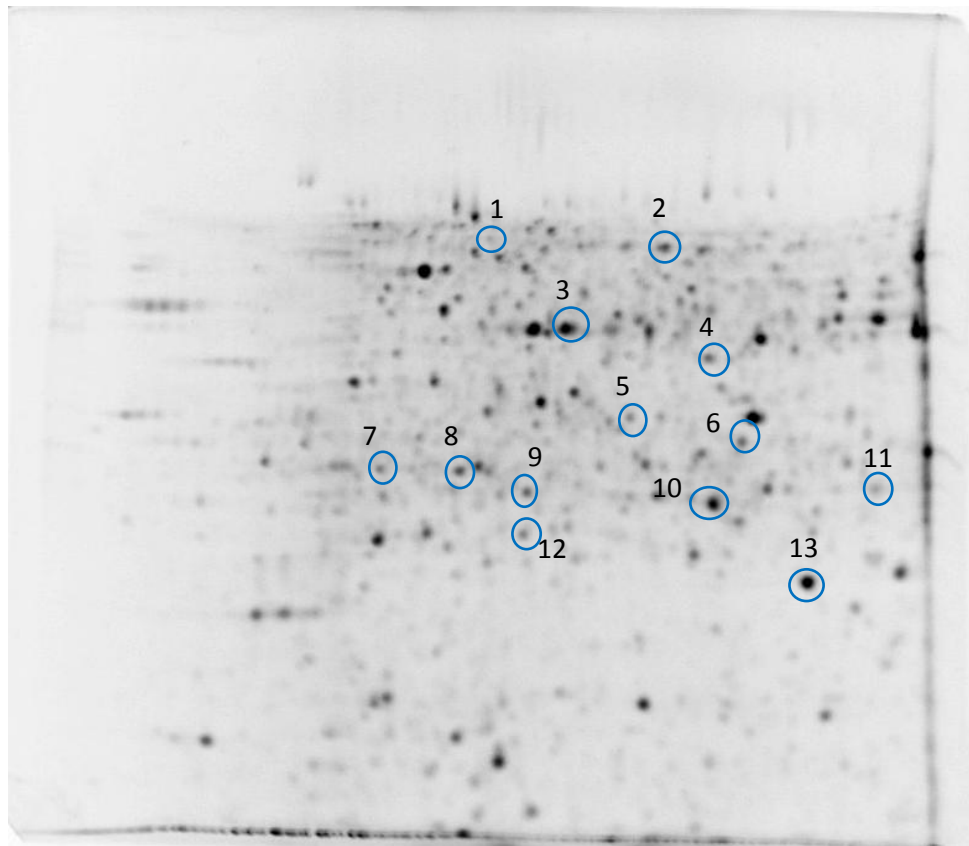
Na slici 14. i slici 15. prikazani su proteinski profili na kojima su označeni proteini koji pokazuju značajne promjene.



Slika 14. Proteinski profil netretiranog kvasca

Usporedbom spotova (proteina) između kontrole i uzorka tretiranog sa  $Pb^{2+}$  ionima, promatrane su njihove promjene izričaja s udjelom (R) između 2 i 10 te -2 i -10, sa značajnom razlikom od  $p < 0,05$ .

Na proteinskom profilu kontrolnog uzorka (slika 14.) prikazani su proteini koji su pokazali smanjeni izričaj, a na proteinskom profilu uzorka tretiranog s  $Pb^{2+}$  (slika 15.) proteini s povećanim izričajem.



Slika 15. Proteinski profil uzorka tretiranog s  $Pb^{2+}$  ionima

Usporedbom netretiranog i tretiranog uzorka izdvojeni su 147 zajedničkih spotova. Od tih zajedničkih spotova, njih 25 su pokazali značajnu promjenu izričaja ( $p < 0,05$ ).

Tablica 12. Proteini s povećanim izričajem

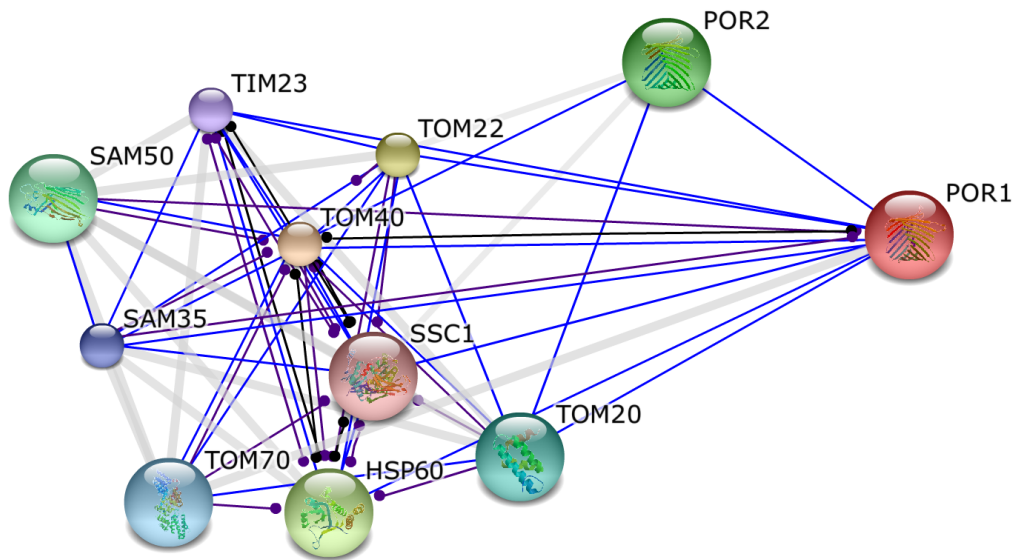
Naziv proteina		V <sub>N</sub> udio	t-test (p < 0,05)
1	-	2,061	0,043
2	-	2,079	0,025
3	-	16,133	0,002
4	-	6,972	0,018
5	-	2,205	0,001
6	-	3,299	0,035
7	-	2,947	0,035
8	-	4,987	0,009
9	-	4,018	0,002
10	-	2,819	0,025
11	-	4,67	0,036
12	MNP1P - podjedinica proteina u mitohondrijskim ribosomima	3,362	0,02
13	-	10,977	0,001

Značajni povećani izričaj (> 2), uočeno je u 13 proteina (tablica 12.), dok je smanjeni izričaj (< -2) bilo u 12 (tablica 13) proteina.

Tablica 13. Proteini sa smanjenim izričajem

N (spot)	Naziv proteina	V <sub>N</sub> udio	t-test (p < 00,5)
1	NOP7 –podjedinica u mitohondrijskim ribosomima	-10,417	0,005
2	-	-3,164	0,032
3	-	-5,272	0,008
4	KGD2 – dihidrolipoil-transsukcinilaza	-6,464	0,045
5	-	-2,978	0,024
6	-	-7,218	0,019
7	Regulatorne podjedinice acetolaktat sintaze	-2,198	0,005
8	Regulatorne podjedinice acetolaktat sintaze	-3,536	0,008
9	-	-5,573	0,002
10	Mitohondrijski porin	-7,031	0,033
11	-	-5,538	0,024
12	MIF2 - Kinetohora protein	-4,791	0,016

## 4.7. Interakcije proteina



Slika 16. Interakcija mitohondrijskog porina s drugim proteinima (string-db.org)

Pomoću web alata String moguće je prikazati interakciju proteina. Na slici x. se nalazi protein POR1 koji je mitohondrijski porin. Vidljivo je da sudjeluje s podjedinicama iz kompleksa SAM i TOM.



## 5. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj  $Pb^{2+}$ -iona na proteom te sadržaj i sastav lipida mitohondrija kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Očekivano je da u stanicama, kao odgovor na prisutnost iona olova, dolazi do promjena i u proteinskom i u lipidnom izričaju .

### 5.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

U radu je određena minimalna inhibitorna koncentracija  $Pb^{2+}$  iona. Krutu YPD podlogu tretirali smo sa 1 M  $Pb(NO_3)_2$  u rasponu koncentracija iona olova od 0,1 – 10 mmol/L, kvasac nacijepili u razrjeđenjima od 0.-tog do -7.-og i prebrojali izrasle stanice kvasca nakon inkubacije od 3 dana. Pri većim koncentracijama olovovih iona u podlozi, rast je bio duži, odnosno, da bi stanice dostigle (približno) istu veličinu kao u kontrolnom uzorku, trebalo im je više vremena. Najveću inhibitornu moć, a pri kojoj je još uvijek vidljiv porast kvašćevih stanica, pokazala je koncentracija od 8 mmol / L (tablica 6). Rast kvasca na krutoj YPD podlozi pri toj koncentraciji bio je izuzetno spor, kolonije su bile sitne, a dobiveni broj stanica postignut je tek nakon 8 dana rasta. Inhibicija na rast kvasca pri toj koncentraciji iznosila je 43,78%. Na temelju rezultata tih pokusa određena je koncentraciju  $Pb^{2+}$  iona koja će se koristiti u daljnjim pokusima, od 8 mmol / L.

### 5.2. Prirast kvašćevih stanica

U tablici 7. prikazani prirast kvašćevih stanica u netretiranom i tretiranom ( $Pb^{2+}$ ) uzorku ukazuje na značajnu inhibiciju rasta ispitivanog kvasca ionima  $Pb^{2+}$ . Izračunati postotak inhibicije olovovih iona na stanicu kvasca iznosi 93,8%, što je (prividno) mnogo više nego u rezultatima dobivenima tijekom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije. Razlog je taj, što je u izračunu broja poraslih kolonija (CFU) korišten broj kolonija izraslih i nakon 8 dana, a u stvarnom uzgoju taj je period 20 sati i ustvari je dobivena vrijednost i očekivana.

U istraživanju koje su proveli Busche i Soares (2011), stanice kvasca bile su izložene ionima  $Pb^{2+}$  tijekom 6 h, pri čemu je došlo do 86% gubitka proliferacije stanice. No unatoč tome, većina stanica održala je membranski integritet, ali nisu bile u mogućnosti formirati kolonije na krutoj podlozi.

Izloženost olovu, stanica stvara znatne količine ROS – a te je često povezan s gubitkom stanične proliferacije (Busche i Soares, 2011). Obzirom da je u ovom istraživanju izloženost olovu trajala 20 h, može se pretpostaviti da duža izloženost uzrokuje veće oštećenje na stanici.

### **5.3. Maseni udio lipida po gramu proteina**

Biološke membrane čine barijeru između stanice i njene okoline. One se sastoje od lipida i proteina u masenim udjelima od 1 : 4 do 4 : 1. Njezin sastav utječe na polupropusnost membrane, pa time i na regulaciju hranjivih i otpadnih tvari (Foster i sur., 2009). Iz srednjih vrijednosti masenih udjela lipida po gramu proteina, prikazanih tablicom 8., u netretiranim (K1 – K10) i tretiranim (Pb1 – Pb8), vidljivo je da je veća ekspresija lipida izražena u tretiranim uzorcima ( $3,60 \pm 1,46$ ) u odnosu na kontrolne uzorke ( $2,53 \pm 1,46$ ).

### **5.4. Sastav masnih kiselina ukupnih lipida mitohondrija**

Sastav masnih kiselina kvasca uzgojenog u podlozi s različitim koncentracijama  $Pb^{2+}$  uspoređen je sa sastavom masnih kiselina kvasca uzgojenog bez prisustva  $Pb^{2+}$  u podlozi (kontrolni uzorak). Rezultati analize kontrolnog uzorka razlikuju se od literaturnih podataka (Daum i dr., 1999) zbog različitog sastava podloge za uzgoj. Udio C16 masnih kiselina u kontrolnom uzorku iznosi 58%, što je znatno više nego u literaturi (31%). Također, odnos nezasićenih i zasićenih kiselina u kontrolnom uzorku čini 4,34, dok u literaturnim podacima iznosi 7,4. Daum i suradnici (1999) proveli su analizu masnih kiselina na ukupnim lipidima, dok je ovo istraživanje provedena na mitohondrijskim lipidima. Također, rezultati se razlikuju i sa literaturnim podacima koji su proveli Blagović i suradnici (2005), na mitohondrijima. Udio C12 masne kiseline čini 13% od ukupnih lipida, dok se u kontrolnom uzorku pojavljuje u tragovima.

U sastavu masnih kiselina ukupnih lipida kontrolnog uzorka prevladavale su nezasićene kiseline, palmitoleinska (C16:1) i oleinska (C18:1) kiselina čineći pritom zajedno 81% masnih kiselina (tablica 10). Od zasićenih masnih kiselina najzastupljenije su bile palmitinska (C16:0) i stearinska (C18:0) kiselina. Razlike su vrlo male, ali se može uočiti blagi porast nezasićenih masnih kiselina na račun zasićenih. No, u sastavu masnih kiselina tretiranih uzoraka udio zasićenih (49,8%) i nezasićenih (50,2%) kiselina bio je gotovo jednak.

Biosintezom masnih kiselina u većini organizama nastaju C16 i C18 masne kiseline. *Saccharomyces cerevisiae* prvenstveno proizvodi zasićene i mononezasićene C16 i C18 masne kiseline. Uvođenjem dvostruke veze na položaju  $\Delta 9$  zasićenih masnih kiselina, palmitinske (C16:0) i stearinske (C18:0) kiseline, nastaju mononezasićene masne kiseline, palmitoleinska (C16:1) i oleinska (C18:1) kiselina (H. Uemura, 2012).

U sastavu masnih kiselina u uzorcima uzgojenim s 8 mmol/L  $Pb^{2+}$  udio palmitinske, C16:0, i palmitoleinske kiseline, C16:1, s vrijednostima oko 60% malo su više od vrijednosti u kontrolnom uzorku koji iznosi 58%, dok su udio stearinske i oleinske kiseline s vrijednostima od 37% nešto malo niže od vrijednosti kontrolnog uzorka 41%.

Nezasićene masne kiseline imaju bitnu ulogu u fluidnosti membrane i procesima signalizacije. Stoga je velika važnost uvođenja polinezasićenih masnih kiselina u sastav masnih kiselina kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kao mogući odgovor na stres (Uemura, 2012).

## 5.5. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Koncentracije proteina u mitohondrijima (tablica 11.), određene Bradford metodom, značajno se smanjila u tretiranim uzorcima (osim kod uzorka 5) u odnosu na kontrolnu skupinu. Koncentracija proteina služila nam je u izračunu količine uzorka koji se mora nanijeti za dvodimenzionalnu elektroforezu.

## 5.6. Proteinski profil

Proteini mitohondrija odjeljeni su 2D SDS – PAGE i i obrađeni na *Dymension From Syngene* .

U uzorku tretiranog s  $Pb^{2+}$  ionima detektirano je 325 proteinskih spotova, dok je u netretiranom detektirano 211, što je ukazuje da je na tretiranom uzorku došlo do ekspresije novih proteina. Izračunat je i korelacijski faktor, koji iznosi  $R^2=0,136919$ . Usporedbom netretiranog i tretiranog uzorka izdvojeni su 147 zajedničkih spotova. Od tih zajedničkih spotova, njih 25 su pokazali značajnu promjenu izričaja ( $p<0,05$ ). Značajni povećani izričaj ( $> 2$ ), uočen je u 13 proteina, dok je smanjeni izričaj ( $< -2$ ) bio u 12 proteina.

Od ukupno 25 izdvojenih proteina, identificirana je njih 7: 2 regulatorne podjedinice acetolaktat-sintaze, 2 podjedinice u mitohondrijskim ribosomima, kinetohorni protein, dihidrolipoil-transsukcinilaza i mitohondrijski porin. Ovi proteini sudjeluju u ciklusu limunske kiseline (acetolaktat-sintaza, dihidrolipoil-transsukcinilaza), sintezi proteina (kinetohora, podjedinice mitohondrijskih ribosoma) te u transportu molekula (mitohondrijski porin).

## 5.7. Interakcije proteina

Dihidrolipoil-transsukcinilaza (KGD2P) je komponenta mitohondrijskog kompleksa  $\alpha$ -ketoglutarat-dehidrogenaze (string-db.org) koja katalizira oksidativnu dekarboksilaciju  $\alpha$ -ketoglutarata u sukcinilkoenzim A u ciklusu limunske kiseline. U tretiranom uzorku zabilježeno je smanjenje izričaja za 6,5 puta. Studiju koju su proveli Yang i suradnici (2009) na miševima, pokazali su smanjenu aktivnost mitohondrijskog kompleksa  $\alpha$ -ketoglutarat-dehidrogenaze, kao i smanjenu razinu mitohondrijske RNA i proteina, što pojačava DNA oksidaciju. Također smanjenje kompleksa pogoršava prilagodbu na oksidacijski stres i doprinosi razvoju neurodegenerativnih bolesti. (Yang i sur., 2009)

Porin je protein vanjske membrane potreban za održavanje osmotske stabilnosti i permeabilnosti membrane u mitohondrijama. U interakciji (slika 16) je s komponentama iz kompleksa TOM (translokaza vanjske membrane) i SAM (mašinerija sortiranje i sastavljanje). Na površini mitohondrija nalaze se receptori iz kompleksa TOM koji prepoznaju prekursore koje sadrže signalne komponente. Oni usmjeravaju prekursore na ciljnom mjestu unutar mitohondrija, dok SAM kompleks sudjeluje u obradi i sortiranju proteina nakon ulaska u mitohondrij. U unutarnjim mitohondrijima prekursori postaju funkcionalni proteini (Schmidt i sur., 2010). U mitohondriju tretiranog uzorka porin je smanjenog izričaja za 7 puta, što najvjerojatnije uzrokuje programiranu staničnu smrt, odnosno apoptozu zajedno s kompleksima SAM i TOM (Wiedemann i sur., 2004).

Na mitohondriju kontrolnog uzorka identificirana je podjedinica (MNP1P) u mitohondrijskim ribosomima, čiji je izričaj povećan za 3,4 puta. Ona se nalazi u frakciji mitohondrijskog nukleotida. Zajedno sa podjedinicom RPO sudjeluje u translaciji i transkripciji proteina. Homologan je ljudskom proteinu RPL7, koji sudjeluje u apoptozi. U istraživanju, koje su proveli Naora i Naora (1999), pratili su promjene na RPL7 proteinu u fibroblastima miša. Pratili su razne stanične odgovore uslijed ekspresije proteina te došli su do zaključka da ovisno o signalizaciji drugih proteina, stanični odgovor pod djelovanjem RPL7 ne dovodi uvijek do smrti stanica (Naora i Naora, 1999.). Za pretpostaviti je da prisustvo MNP1P u kontrolnom uzorku ukazuje na sudjelovanje u sintezu proteina.

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Na temelju rezultata pokusa testa toksičnosti određena je koncentraciju  $Pb^{2+}$  iona koja će se koristiti u daljnjim pokusima, od 8 mmol / L.
- Kvasac uzgojen na YPD podlozi s dodatkom olovovih iona u koncentraciji od 8 mmol / L inhibiran je za 93,8%.
- Maseni udio lipida u odnosu na proteine u membrana mitohondrija se pod utjecajem olova povećao
- U sastavu masnih kiselina u tretiranim uzorcima vidljivo je značajno smanjenje nezasićenih masnih kiselina, što se može objasniti mehanizmom obrane od oksidacijskog stresa, jer su nezasićene masne kiseline podložnije  $\beta$ -oksidaciji.
- U mitohondriju kvasca tretiranog s  $Pb^{2+}$  ionima detektiran je veći broj proteina u odnosu na netretirani uzorak što pokazuje da je došlo do ekspresije novih proteina u mitohondriju kvasca pod utjecajem olova
- U tretiranom uzorku identificirano je 6 proteina koji pokazuju smanjeni izričaj proteina, i to: podjedinica u mitohondrijskim ribosomima (NOP7) s najvećim izričajem od -10,4, zatim dihidrolipoilna transsukcinilaza, regulatorne podjedinice acetolaktat sintaze, mitohondrijski porin te kinetohora, s najmanjim izričajem (4,8 puta manji udio). Jedini protein koji pokazuje povećani izričaj identificiran je kao podjedinica u mitohondrijskim ribosomima (MNP1P) i to za 3,4 puta.
- Pod utjecajem olova smanjila se ekspresija proteina koji sudjeluju u ciklusu limunske kiseline (acetolaktat-sintaza, dihidrolipoil-transsukcinilaza), sintezi proteina (kinetohora, podjedinice mitohondrijskih ribosoma) te u transportu molekula (mitohondrijski porin).
- Veće koncentracije olova uzrokuju veća oksidacijska oštećenja na lipidima i proteinima u mitohondrijskoj membrani, što u konačnici dovodi do promjene membranskog potencijala

## 7. LITERATURA

1. L. Andrišić, Mehanizmi stanične toksičnosti uzrokovani višestruko nezasićenim masnim kiselinama – pristup kvascem, doktorski rad , Zagreb (2013)
2. B. Blagović, *Kvasac kao modelni organizam u izučavanju bioloških membrana*, priručnik za seminare i vježbe, Medicinski fakultet Sveučilišta, Rijeka (2009)
3. B. Blagović, J. Rupčić, M. Mesarić, V. Marić, Lipid Analysis of the Plasma Membrane and Mitochondria of Brewer's Yeast, *Folia Microbiol.* 50 (1), (2005), 24 – 30
4. J. V. Bussche, E. V. Soares, Lead induces oxidative stress and phenotypic markers of apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Microbiol Biotechnol* 90 (2011) 679–687
5. J. R. Cannon, J. T. Greenamyre, The Role of Environmental Exposures in Neurodegeneration and Neurodegenerative Diseases, *Toxicological sciences* 124(2) (2011) 225 – 250
6. G. M. Cooper, R. E. Hausman: Pregledno o stanicama i istraživanju stanica. U: *Stanica – molekularni pristup*, Gordan Lauc (ur), Medicinska naklada, Zagreb (2004) pp. 9 – 17
7. G. Daum, G. Tuller, T. Nemeč, C. Hrastnik, G. Balliano, L. Cattell et al., Systematic Analysis of Yeast Strains with Possible Defects in Lipid Metabolism, *Yeast* 15 (1999) 601 – 614
8. G. Flora, D. Gupta, A. Tiwari, Toxicity of lead: A review with recent updates, *Interdiscip Toxicol.*; Vol. 5(2) (2012) 47 – 58

9. Feldmann, H. (ed) (2012). Yeast Cell Architecture and Functions, in Yeast: Molecular and Cell Biology, Second Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
10. GE Healthcare, First dimension isoelectric focusic (IEF), U: 2 –D Electrophoresis, Principles and Methods, 2004, Germany
11. GE Healthcare, Second-dimension SDS-PAGE using vertical electrophoresis systems, U: 2 –D Electrophoresis, Principles and Methods, 2004, Germany
12. D. Hosiner i suradnici, Impact of Acute Metal Stress in *Saccharomyces cerevisiae* ([www.plosone.org](http://www.plosone.org))
13. P. Karlson, G. Fuchs, J. Koolman, G. Schafer: Masti i metabolizam masti. U: *Biokemija*, V. Runje, D. Bešenić (ur), Školska knjiga, Zagreb (1993) pp. 243 - 244
14. N. Klepac: Neurodegenerativne bolesti i palijativna medicina, *Neurol. Croat. Vol. 60* (2011) 3 – 4
15. H. Lalić, M. Kabalin: Metali. U: *Medicina rada*, Medicinski fakultet Sveučilišta, Rijeka (2005) pp. 152 – 154
16. H. Naora and H. Naora, Involvement of ribosomal proteins in regulating cell growth and apoptosis: translational modulation or recruitment for extraribosomal activity?, *Immunol Cell Biol.*, 77(3) (1999) 197-205
17. B. Payal, H. P. Kaur and D. V. Rai : New insight into the effects of lead modulation on antioxidant defense mechanism and trace element concentration in rat bone , *Interdisc Toxicol.*; Vol. 2(1) (2009) 18–23



18. O. Perković, A. Jurjević, I. Antončić, S. Dunatov, M. Bralić, S. Ristić: The Town of Čabar, Croatia, Familiar Pseudocluster for Multiple Sclerosis –Descriptive Epidemiological Study, *Coll. Antropol.* 34 Suppl. 2 (2010) 141–144
19. O. Schmidt, N. Pfanner, C. Meisinger, Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(9), 2010). 655-667.
20. A. Sickmann i suradnici: The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria, PNAS, vol.100 no.23 (2003) 13207–13212
21. E. V. Soares, K. Hebbelinck, H. M. V. M. Soares, Toxic effect caused by heavy metal in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study, *Can. J. Microbiol.* 49 (2003) 336 - 343
22. J. Škara, S. Nadalin, A. Buretić – Tomljanović, B. Blagović, Izučavanje neurodegenerativnih bolesti na kvascu kao modelnom organizmu, *Medicina fluminensis*, Vol. 52, No. 1 (2016) 14-27
23. L. Štefan, T. Tepšić, T. Zavidčić, M. Urukalo, D. Tota, R. Domitrović: Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice, *Medicina* 43 (2007) 84-93
24. H. Uemura, Synthesis and production of unsaturated and polyunsaturated fatty acids in yeast: current status and perspectives, *Appl Microbiol Biotechnol* 95 (2012) 1 – 12
25. Z. Volner, D. Batinić i suradnici: U: *Opća medicinska mikrobiologija i imunologija*, Z. Volner, D. Batinić (ur), udžbenik Visoke zdravstvene škole, Školska knjiga, Zagreb (2005) pp. 55 – 60
26. M. Vrdoljak: Kloniranje i ekspresija gena CgKCS za elongazu nezasićenih masnih kiselina iz grčke režuhe (*Cardamine graeca* L.), Zagreb, 2011

27. A. Vrsalović Presečki, Studij procesa pridobivanja enzima u rastućim stanicama pekarskog kvasca, magistarski rad, Zagreb (2003)
28. N. Wiedemann, A. E. Frazier and N. Pfanner, The Protein Import Machinery of Mitochondria, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 14473-14476.
29. L. Yang et al: Mice deficient in dihydrolipoyl succinyl transferase show increased vulnerability to mitochondrial toxins, *Neurobiology of Disease*, Volume 36, Issue 2 (2009) 320–330
30. Y. Z. Zheng, K. B. Berg, L. J. Foster: Mitochondria do not contain lipid rafts, and lipid rafts do not contain mitochondrial proteins, *The Journal of Lipid Research*, , 50 (5), (2009) 988 - 998
31. <http://www.inpharma.hr/index.php/news/34/19/Svojstva-i-djelovanje-beta-1-3-glukana>
32. [http://hr.wikipedia.org/wiki/Degenerativne\\_bolesti](http://hr.wikipedia.org/wiki/Degenerativne_bolesti)
33. <http://string-db.org/>

Slike preuzete iz:

34. <http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/ch31/yeast.html> (slika 1)
35. <http://www.biocourseware.com> (slika 2)
36. <http://www.instrukcije-poduka.com/instrukcije-iz-biologije-mitohondriji.html> (slika 3)

## **ŽIVOTOPIS**

Zovem se Nermina Mumiši. Rođena sam 1991. godine u Rijeci. Osnovnu školu pohađam u Rijeci gdje i upisujem Medicinsku školu. 2010. godine maturirala sam kao zdravstveno – laboratorijski tehničar te iste godine upisujem studij Sanitarno inženjerstvo na Medicinskom fakultetu u Rijeci, kojeg sam završila 2014. godine. Te iste godine upisala sam Diplomski studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, kojeg završavam ove, 2016. godine. Od 2013. godine obavljam dužnost demonstratora na Zavodu za kemiju i biokemiju.