

Analiza proteoma mitohondrija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303

Radolović, Simone

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:184:262640>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Simone Radolović

ANALIZA PROTEOMA MITOHONDRIJA KVASCA

Saccharomyces cerevisiae W303

Završni rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Simone Radolović

ANALIZA PROTEOMA MITOHONDRIJA KVASCA

Saccharomyces cerevisiae W303

Završni rad

Rijeka, 2022.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Gordana Čanadi Jurešić, dipl. ing.

Preddiplomski rad obranjen je dana 15.09.2022. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu :

1. doc. dr. sc. Božena Ćurko-Cofek, dr. med.

2. doc. dr. sc. Sunčica Buljević, dipl. san. ing.

3. izv. prof. dr. sc. Gordana Čanadi Jurešić, dipl. ing

Rad ima 37 stranica, 12 slika, 6 tablica i 20 literaturnih navoda.

Zahvala

Veliko hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Gordani Čanadi Jurešić dipl. ing. na predanosti, pruženoj pomoći, savjetima, izdvojenom vremenu i trudu prilikom izrade završnog rada.

Najveću zahvalu dugujem svojim roditeljima, sestri i dečku koji su vjerovali u mene i bili uvijek velika podrška u svemu što radim.

Rad je izrađen uz financijsku potporu Slovensko-hrvatskog bilateralnog projekta (IPS-2020-01-7418): „Utvrdjivanje pojavnosti, uzroka i štetnih učinaka oksidativnog stresa izazvanog uporabom fiksnih ortodontskih naprava“

Sažetak

Kvasci su pripadnici carstva gljiva (*Fungi*) kao i plijesni i mesnate gljive. Eukariotski su organizmi koji se često nazivaju jednostaničnim gljivama, a razmnožavaju se pupanjem. *Saccharomyces cerevisiae* neinfektivni je mikrob čiji je eukariotski genom bio prvi sekvencioniran. Svojim fenotipskim svojstvima poput učinkovitosti parenja ili sporulacije, doprinio je napretku u istraživanjima. Često korišteni modelni organizam upravo je soj *Saccharomyces cerevisiae* W303 koji je usko povezan s prvim potpuno sekvencioniranim sojem kvasca S288C te se stoga naziva njegovim potomkom. Mitohondriji, kao organeli većine eukariotskih organizama razlikuju se između različitih vrsta eukariota, po veličini, ali i sadržaju genoma.

Cilj ovog rada je analizirati proteom mitohondrija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303. Stanice kvasca uzgajane su na kvaščevoj podlozi do ulaska u ranu stacionarnu fazu. Iz takvih su stanica izolirani mitohondriji, a iz njih proteini. Ekstrahirani proteini mitohondrija su nakon pripreme analizirani LC/MS metodom. Nakon identifikacije, dobiveni su proteini sistematizirani i utvrđena im je uloga i važnost u funkcioniranju stanice kvasca.

Ključne riječi: *Saccharomyces cerevisiae* W303, mitohondriji, proteom, proteini

Summary

Yeasts are members of the fungi kingdom (*Fungi*), as well as molds and fleshy mushrooms. They are eukaryotic organisms often called unicellular fungi, and they reproduce by budding. *Saccharomyces cerevisiae* is a non-infectious microbe whose eukaryotic genome was the first to be sequenced. With their phenotypic properties such as mating efficiency or sporulation, they have contributed to scientific research progress. A frequently used model organism is the strain *Saccharomyces cerevisiae* W303, which is closely related to the first fully sequenced yeast strain S288C and is therefore called its descendant. Mitochondria, as organelles of most eukaryotic organisms, differ between different types of eukaryotes in terms of size and genome content.

The aim of this work was to analyze the mitochondrial proteome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* W303. Yeast cells were grown on yeast medium until they reached the early stationary phase. Mitochondria and proteins were isolated from such cells. After preparation, extracted mitochondrial proteins were analyzed by the LC/MS method. After identification, the obtained proteins were systematized and their role and importance in the functioning of the yeast cell was determined.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae* W303, mitochondria, proteome, proteins

Sadržaj

1. Uvod.....	8
1.1. Kvasac kao organizam	8
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1.3. Mitohondrij kvasca.....	9
1.4. Proteom mitohondrija.....	10
2. Cilj istraživanja	11
3. Materijali i metode	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	12
3.1.2. Uređaji, laboratorijski pribor, kemikalije.....	12
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Priprema hranjive podloge	13
3.2.2. Uzgoj kvasca	13
3.2.3. Određivanje broja stanica kvasca	13
3.2.3.1. Određivanje optičke gustoće stanica kvasca	13
3.2.3.2. Brojanje stanica na LUNA-FLTM Dual fluorescence cell counter	13
3.2.4. Izolacija mitohondrija	15
3.2.5. Izolacija proteina iz mitohondrijske frakcije.....	16
3.2.6. Mjerenje koncentracije proteina.....	16
3.2.7. Analiza i identifikacija proteina mitohondrija LC/MS metodom	17
3.2.8. Utvrđivanje interakcija među proteinima pomoću baze String.....	18
4. Rezultati	19
4.1. Određivanje broja stanica.....	19
4.2. Mjerenje optičke gustoće stanica	21
4.3. Određivanje koncentracije proteina u izolatu mitohondrija.....	21
4.4. Identifikacija i karakterizacija proteina mitohondrija	22

5. Rasprava	29
6. Zaključak.....	31
7. Literatura	32
8. Prilozi	34
8.1. Popis slika	34
9. Životopis.....	36

1. Uvod

1.1. Kvasac kao organizam

Kvasci pripadaju carstvu gljiva (*Fungi*) poput plijesni i mesnatih gljiva. Eukariotski su organizmi koji se razmnožavaju pupanjem. Nazivaju se još i jednostaničnim gljivama. Kako gljive ne sadrže klorofil, energiju i CO₂ ne mogu stvarati procesom fotosinteze, već kemijskim procesima, pa se stoga svrstavaju u kemoheterotrofne organizme (1). Gledajući po brojnosti, čine najznačajniju skupinu mikroorganizama (2).

Blastokonidijom, koje mogu biti okruglog, ovalnog ili izduženog oblika, naziva se stanica kvasca, a njen promjer varira. On se može kretati od dva do petnaest mikrometara, no u većine kvasaca on iznosi od pet do sedam mikrometara. Blastokonidija je obavijena višeslojnom staničnom stijenkom, ispod koje je smještena citoplazmatska membrana, dok su u citoplazmi blastokonidije uočljive razne organele (1). Osnovni dijelovi blastokonidije koji su vidljivi pod elektronskim mikroskopom, osim višeslojne stanične stijenke i citoplazmatske membrane jesu periplazmatski prostor, mitohondriji, jezgra, ribosomi, lipidne čestice, glikogenska zrnca, Golgijev aparat, endoplazmatski retikulum te peroksisomi i vakuole (3).

Oblik i čvrstoću gljivičnoj stanici daje upravo stanična stijenka koja ujedno i štiti protoplast od mehaničkog oštećenja i osmolize stanica (1).

Stanična stijenka kvasca je struktura izražene složenosti i sastoji se uglavnom od dva strukturno i funkcionalno različita dijela. Unutarnji sloj pretežno je građen od glukana i osigurava mehaničku stabilnost stanice, a vanjski se sloj sastoji od manoproteina koji štite stanicu od vanjskog djelovanja (4). Također, stanična stijenka ima važnu ulogu u transformaciji blastokonidije u filamentozni oblik, ali i za patogenost kvasca (1). Citoplazmatska membrana koja kontrolira propusnost tvari u stanicu, izgrađena je od dvaju slojeva fosfolipida s višestrukim uvrnućima, a u njoj se nalaze razni enzimi koji učestvuju u sintezi molekula stanične stijenke (1).

Ergosterol, glavni je sterol u kvascima koji ima važnu ulogu u reguliranju čvrstoće, propusnosti, ali i fluidnosti membrane (3). Prednost kvasaca kao modelnih organizama je to što su jednostavni za uzgoj na definiranim podlogama s kratkim vremenom generiranja i lakom dostupnošću (5).

1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, također poznat kao pekarski ili pivski kvasac, neinfektivni je mikroorganizam i model za proučavanje genskih obilježja (6). Prvi eukariotski genom koji je bio sekvencioniran bio je upravo genom *Saccharomyces cerevisiae* (7). Jedinstvenim fenotipskim svojstvima kao što su velika učinkovitost parenja ili sporulacije doprinio je napretku u istraživanju (8). *Saccharomyces cerevisiae* jednostanična je gljiva koja posjeduje nuklearnu genomsku DNA koja sadrži 12068 kilobaza i organizirana je u 16 kromosoma. Njegov genom potpuno su sekvencionirali Goffeau i suradnici 1996. godine i utvrdili da približno sadrži 6000 gena, od kojih se smatralo da njih 5570 kodiraju proteine. Također, nizom bioinformatičkih analiza otkriveno je da je niz gena koji kodiraju proteine stranog podrijetla, tj. rezultat lateralnog prijenosa gena kako je definirao Doolittle 1999. godine (9). Sekvencionirani genom postao je prekretnica u genomici, po prvi put otvorivši priliku za globalno proučavanje ekspresije i funkcioniranja eukariotskog genoma kao i za mogućnosti daljnje studije komparativne, evolucijske i funkcionalne genomike (10).

Kao često korišteni modelni organizam koristi se soj *Saccharomyces cerevisiae* W303. Nastao je 1970-ih godina križanjem sojeva kvasca nejasne genealogije (11). *Saccharomyces cerevisiae* W303 laboratorijski je soj koji je usko povezan s prvim potpuno sekvencioniranim sojem kvasca, S288C. W303 naziva se potomkom S288C te je odabran da zadrži njegove poželjne karakteristike, odnosno da dobro sporulira i da se transformira sa visokom učinkovitošću. Široku primjenu ima u genetskim analizama popravka DNK i drugim biološkim mehanizmima. (8).

Analize sekvenci genoma W303 impliciraju kako se sojevi W303 i S288C razlikuju u približno 9700 identificiranih pozicija nukleotida, ali su složenije razlike ostale neokarakterizirane. Također, neki određeni aleli SWI-SNF globalnog aktivatorskog kompleksa transkripcije pridonose sporom rastu u pozadini W303, ali su pak smrtonosni u S288C. Upravo je zbog toga važno razumijevanje preciznih varijacija na razini nukleotida između sojeva kako bi se mogli razjasniti temeljni uzroci fenotipskih razlika (8).

1.3. Mitohondrij kvasca

Mitohondriji, organele većine eukariotskih organizama, sastoje se od dvije membrane, vanjske i unutarnje mitohondrijske membrane koje okružuju dva odjeljka, a to su intermembranski prostor i mitohondrijski matriks. Kako su domaćini ciklusa limunske kiseline i oksidativne

fosforilacije, poznatiji su i kao pogoni eukariotskih stanica pošto imaju ulogu u sintezi većine staničnog ATP-a (12).

Genom mitohondrija raznolik je između različitih vrsta eukariota, po veličini, ali i sadržaju. Cjeloviti mitohondrijski genom kvasca *S. cerevisiae* prvi je puta sekvencioniran 1998. godine. Mitohondrijska DNA kvasca u prosjeku čini 15% ukupnog sadržaja stanične DNA i sastoji se od linearnih molekula u rasponu duljina od približno 75 do 150 kilobaza, a prisutne su i male količine kružne DNK. Kod *S. cerevisiae*, njegova mitohondrijska DNA kodira osam proteina od kojih je sedam podjedinica lanca prijenosa elektrona i oksidativne fosforilacije, a jedna je ribosomski protein male podjedinice. Sastoji se i od tri aktivna ishodišta replikacije, a to su ori2, ori3 i ori5, ali i od pet elemenata sličnih ishodištu replikacije. Prema Fouryju i suradnicima, osim navedenog, mitohondrijska DNA kvasca sadrži i gene za kompletan skup tRNA potrebnih za mitohondrijsku translaciju te 15S i 21S rRNA (12).

1.4. Proteom mitohondrija

Preduvjet za potpuno razumijevanje funkcije organela kao i mehanizama koji leže u osnovi mitohondrijske patologije je upravo definiranje mitohondrijskog proteoma. Osnovne funkcije mitohondrija osim oksidativne fosforilacije su oksidacija masnih kiselina i metabolizam aminokiselina (13).

Kako bi se unaprijedila analiza mitohondrija važno je identificirati cjeloviti mitohondrijski proteom. Napredak u masenim spektroskopskim metodama u posljednjem desetljeću omogućio je poboljšanu karakterizaciju mitohondrijskog proteoma. U bazi podataka genoma roda *Saccharomyces* ukupan broj mitohondrijskih gena je 1205, što je ustanovljeno u rujnu 2017. godine. Zanimljiva činjenica je da je samo 15% mitohondrijskih proteina uključeno u energetske metabolizam, dok je oko 20% proteina još uvijek nepoznate funkcije. Mitohondriji posjeduju kompletan genetski stroj koji je odgovoran za transkripciju i translaciju mitohondrijskog genoma (12).

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada bio je analizirati proteom mitohondrija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 LC/MS metodom. Kako bi se to postiglo bilo je važno izolirati što čistiju frakciju mitohondrija iz stanica kvasca te ekstrahirati što više proteina iz te frakcije. Identificirani proteini mitohondrija su sistematizirani, utvrđena im je uloga te istražena važnost u funkcioniranju stanice kvasca.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizam

U ovom istraživanju korišten je soj W303 kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (auksotrofni mutant MATa {his3-11,15 leu 2-3, 112 ura3-1 trp1-1, ade2-1}). Kao histidinski autotrofni mutant jako je osjetljiv na prisutstvo metalnih iona u podlozi – može rasti na podlogama s metalnim ionima, ali za svaki metal do određenih koncentracija i uz određenu pH-vrijednost. (14). Stoga je za ovo istraživanje određen pH 5.5 kao optimalan.

3.1.2. Uređaji, laboratorijski pribor, kemikalije

Stakleno posuđe (tikvice od 250 mL, 500 mL, 1000 mL; čaše, epruvete)

Automatske pipete različitih volumena, Eppendorf, Njemačka

pH-metar MP 220, Mettler Toledo, EU

Tehnička vaga PCB 1000-2, Kern-Sohn, Njemačka

Magnetska miješalica MR Hei Standard, Heidolph, Njemačka

Autoklav za sterilizaciju, CertoClav, Austrija

Tresilica Unimax 1000, Heidolph, Njemačka

Vorteks, Technokartell TK3S, Australija

Koncentrirana otopina klorovodične kiseline (HCl), Merck

Glukoza, Biolife, Italija

Pepton, Liofilchem, Italija

Kvašćev ekstrakt, Biolife, Italija

LIVE/DEAD Yeast Viability Kit, Thermo-Scientific™, SAD

LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter, Logos Biosystems, Južna Koreja

Yeast Viability Kit, Logos Biosystems, Južna Koreja

Optički čitač mikrotitarskih pločica, Tecan EL808, Austrija

Kit za određivanje proteina PierceTM Rapid Gold BCA Protein Assay Kit, Thermo ScientificTM, SAD

3.2. Metode

3.2.1. Priprema hranjive podloge

Hranjiva podloga za uzgoj kvasca je potpuna podloga (YPD) koja se sastoji se od peptonske vode (YPD), glukoze (YPD) i kvašćevog ekstrakta (YPD). Na 1 l vode doda se 20 g peptonske vode, 20 g glukoze i 10 g kvašćevog ekstrakta. Sastojci se izvažu, nakon čega im se doda određena količina destilirane vode, te miješa na magnetskoj miješalici dok otopina ne postane bistra. Potrebno je namjestiti pH na 5,5 (s koncentriranom HCl) kako bi se pripremila optimalna podloga za rast kvasca (15).

3.2.2. Uzgoj kvasca

Pomoću sterilne bakterijske ušice prenese se dio biomase kvasce s krute hranjive podloge u epruvetu s 10 mL YPD hranjive podloge. Nakon laganog miješanja, koje služi da se biomasa rasprši po hranjivom mediju, uzgoj se nastavlja na tresilici (Unimax 1000; 200 rpm) kroz 24 h na temperaturi od 30 °C. Porast kvasca odaje se zamućenjem podloge.

3.2.3. Određivanje broja stanica kvasca

3.2.3.1. Određivanje optičke gustoće stanica kvasca

Određivanje optičke gustoće kvasca (OD) spektrofotometrijska je metoda kojom se određuje približan broj stanica u kulturi pri valnoj duljini od 620 nm koristeći optički čitač (Tecan). Optimalno je očitavanje kad je očitana vrijednost <1. Da bi očitavanje stanica bilo manje od 1,0 kulture stanica je potrebno razrijediti podlogom ili destiliranom vodom.

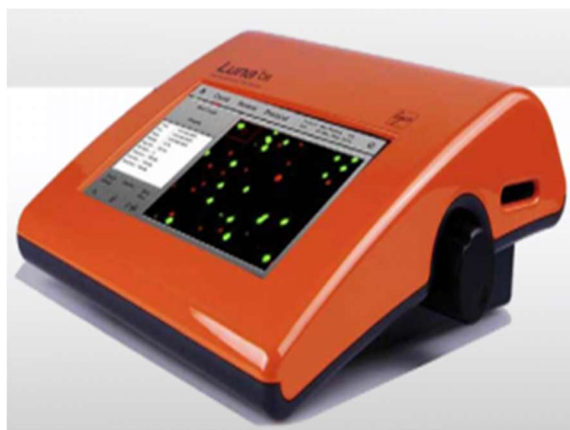
3.2.3.2. Brojanje stanica na LUNA-FLTM Dual fluorescence cell counter

LUNA-FLTM fluorescence cell counter aparat je pomoću kojeg se prebrojavaju stanice kvasca. Uređaj za brojanje stanica zasnovan na slikama, sadrži svijetlo polje i dvostruku fluorescentnu optiku koji automatski prebrojava različite vrste stanica (16).

Kako bi se što točnije očitala vrijednost na optičkom čitaču, uzorke je najčešće potrebno razrijediti. U Eppendorf tubicu se ispipetira 900 µl vode i 100 µl suspenzije kvasca, kako bi se uzorak razrijedio 10x. Sadržaj se promiješa te se iz tubice ispipetira po 13 µl i nanosi na komoricu za očitavanje broja stanica.

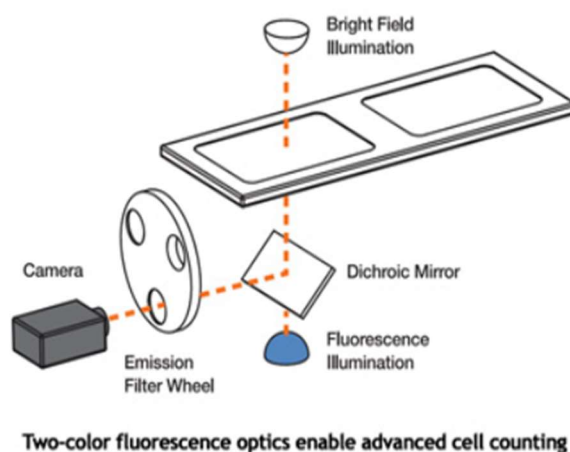
Dio aparata LUNA-FL™ čini dvostrana komorica, koja ima 2 jažice i za svako se mjerenje koristi nova jažica. Preporuča se koristiti 13 μ l suspenzije kvasca za svako očitavanje.

Mjeri se svjetlosnom metodom, kvaliteta brojanja provjeri s „tagiranjem“ tj. provjerom koliko je stanica aparat prebrojio, odnosno zaokružio kao prebrojane. Uređaj može pokazati još neke podatke, kao na primjer, prosječnu veličinu stanica, te kakav je rast tih stanica kvasca (rastu li samostalno ili u nakupinama).



Slika 1. LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter.

<https://www.vitascientific.com/luna-automated-fluorescence-cell-counter-luna-fl-120001.html>



Slika 2. Shematski prikaz funkcioniranja dvobojne fluorescentne mikroskopske optike koja doprinosi izvrsnoj točnosti brojanja stanica.

<https://www.vitascientific.com/luna-automated-fluorescence-cell-counter-luna-fl-120001.html>

Uređaj smo koristili za namještanje početne vrijednosti stanica te za kontrolu poraslih stanica.

3.2.4. Izolacija mitohondrija

Izolacija mitohondrija provodi se po protokolu proizvođača (Abcam). Ukratko, potrebno je uzgojiti kvasac, centrifugirati biomasu, skupljeni talog resuspendirati u odgovarajućem puferu te iz takvih stanica pripremiti sferoplaste (stanice bez stanične stijenke). Mitohondriji se izoliraju upravo iz sferoplasta (17).

Komponente kupovnog kita za izolaciju mitohondrija:

STAVKA	KOLIČINA
Pufer A	50 ml
Pufer B	50ml
1M DTT	1 ml
Homogenizacijski pufer	50 ml
Mješavina enzima za lizu	200 μ l
Pufer za pohranu	10 ml
Koktel inhibitora proteaza (liofiliziran)	1 bočica

Komplet je potrebno čuvati na -20°C i zaštititi ga od svjetlosti te treba izbjegavati ponavljane cikluse odmrzavanja/zamrzavanja.

Postupak izolacije mitohondrija:

Stanice kvasca uzgajaju se u odgovarajućem mediju (YPD) preko noći na 30°C , na tresilici pri 200 rpm. Kada su stanice u kasnoj log fazi određuje se OD kulture na 600 nm. Dobiveni OD množi se s ukupnim volumenom kulture u mililitrima kako bi se izračunao ukupni OD. Količina reagensa prilagođava se ukupnom OD-u. Nakon uzgoja kultura kvasca se centrifugira na 3000 rpm tijekom pet minuta i baca se supernatant. Stanični talog se ispire resuspendiranjem u dva volumena ultračiste vode. Nakon toga, talog se resuspendira u 1 ml pufera A koji sadrži 10 mM svježeg DTT-a i inkubira se deset minuta na 30°C uz lagano mućkanje. Onda se centrifugira na 1500g tijekom pet minuta i baca se supernatant. Dobiveni se talog resuspendira u 1 ml pufera B koji sadrži i mješavinu enzima za lizu stanične stijenke i inkubira oko 1 h na 30°C . Povremeno se kontrolira stvaranje sferoplasta, praćenjem izbistravanja otopine. Nakon učinkovitog formiranja, sferoplasti se centrifugiraju na 1500 g pet minuta i baca se supernatant. Od ovog koraka pa nadalje, epruvete za centrifugiranje, kao i sav pribor, drže se na ledu. Dobiveni pelet resuspendira se u 1 ml pufera za homogenizaciju s koktelom inhibitora proteaze.

Suspenzija se prebaci u Dounce-ov homogenizator te homogenizira 10-15 puta, a zatim se centrifugira na 600 g pet minuta na 4 °C i sakupi se supernatant koji sadrži mitohondrije. Ponovno se centrifugira supernatant na 600 g tijekom pet minuta na 4 °C i sakupi se supernatant. Postupak se ponovi još jednom. Skupljeni se supernatant centrifugira na 12000 g deset minuta na 4 °C te se pažljivo baci supernatant bez dodirivanja peleta. Talog se resuspendira u 50 µl pufera za pohranu. U toj se otopini određuje koncentracija proteina i prilagodi na željenu koncentraciju pomoću pufera za pohranu (17).

Uvjeti skladištenja izoliranih mitohondrija razlikovat će se ovisno o primjeni za koji će se uzorci koristiti.

Mitohondriji se resuspendiraju u puferu za pohranu i brzo zamrznu u tekućem dušiku te se nakon toga čuvaju na -80 °C, a dio se pohranjuje u pufer za lizu s deterdžentom ili SDS page bojom za neke druge analize (17).

3.2.5. Izolacija proteina iz mitohondrijske frakcije

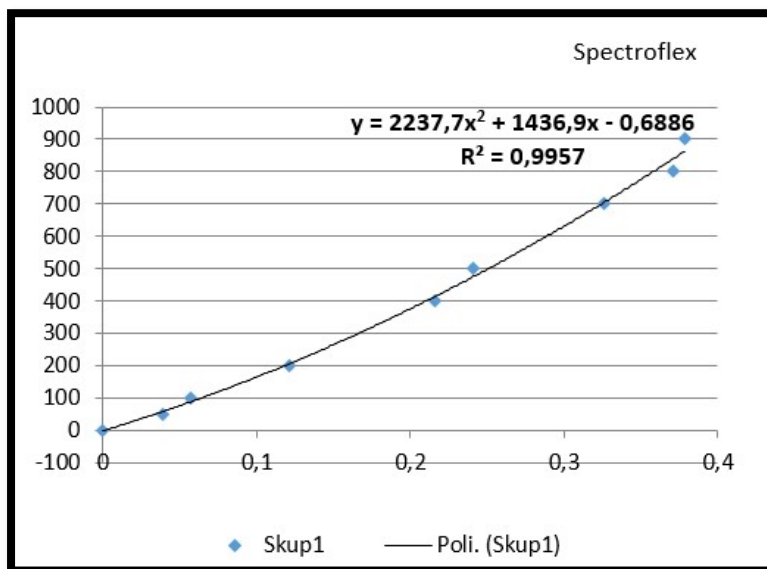
Na dobiveni talog izoliranog mitohondrija dodaje se 2 mL acetona, kako bi se ekstrahirali proteini. Ekstrakcija proteina odvija se preko noći na hladnom. Nakon toga, uzorak se centrifugira 3000 o/min, na 0 °C, a dobiveni talog otopi u 25 µL otopine sastavljene od 5M uree u 50 mM amonijevom bikarbonatu. Takav je uzorak spreman za LC/MS analizu.

3.2.6. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina frakcije mitohondrija određena je Rapid gold testom, prema protokolu proizvođača.

To je kolorimetrijska metoda koja se temelji na promjeni boje Bradfordovog reagensa (zapravo Commassie Brilliant Blue G-250 boje) koja u kiselim uvjetima veže proteine te mijenja boju iz smeđe u plavu. Prije svakog određivanja koncentracije proteina, potrebno je pripremiti baždarnu krivulju pomoću serije razrjeđenja standarda proteina (najčešće je to BSA (engl. *bovine serum albumin*)). Serija razrjeđenja standarda proteina priprema se u rasponu koncentracija od 50 do 1000 µg/mL. Nakon mjerenja, korištenjem Excell programa izrađena je baždarna krivulja i izračunata koncentracija proteina u uzorcima.

A	c (µg/ml) BSA
0	0
0,039	50
0,0567	100
0,121	200
0,216	400
0,2412	500
0,3262	700
0,3705	800
0,3782	900



Slika 3. Baždarna krivulja izrađena na temelju serije razrjeđenja standarda, korištena za izračun koncentracije proteina.

3.2.7. Analiza i identifikacija proteina mitohondrija LC/MS metodom

Uzorci su analizirani na Institutu „Ruđer Bošković“ u Zagrebu na spektrometru masa visoke rezolucije ESI-Q-TOF Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA, SAD) koji je vezan s tekućinskim kromatografom nanoACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, SAD). Instrumentalni parametri podešeni su korištenjem software-a MassLynx verzije 4.1. SCN902 (Waters, Milford, MA, SAD). Peptidi su radvojeni na analitičkoj koloni nanoAcquity UPLC 1,7 µm BEH130 C18, 100 µm × 100 mm (Waters, Milford, MA, SAD) uz korištenje pretkolone UPLC 2G-V/M Trap 5 µm Symmetry C18, 180 µm × 20 mm (Waters, Milford, MA, SAD). Injektirano je 1 µL uzorka. Ispiranje primijenjeno za optimalno razdvajanje triptičkih peptida kromatografijom obrnutih faza bilo je gradijentno. Ionizacija elektroraspršenjem (ESI) je bila pozitivna, pri čemu je napon kapilare iznosio 4,3 kV, a elektrode u obliku stošca u koju ulazi ionizirani uzorak 40 V. Temperatura izvora bila je 80 °C. Tlak dušika iznosio je 1,4 bara. Spektri peptidnih uzoraka su prikupljeni pri niskoj i visokoj energiji MSE pristupom. U uvjetima niske energije, podaci su prikupljeni kod konstantne kolizijske energije od 4 eV, dok je u uvjetima visoke energije kolizijska energija linearno podizana od 20 do 45 eV. Podaci su prikupljeni svake sekunde u području masa 50 – 3200 Da. Tijekom analize uzoraka korišten je stalni protok leucin-enkefalina (1 ng/µL, protok 0,4 µL/min, [M+H]⁺ = 556,2771 Da) s ciljem korigiranja točnosti masa.

3.2.8. Utvrđivanje interakcija među proteinima pomoću baze String

Kako bi se utvrdila povezanost te međudjelovanje identificiranih proteina korištena je mrežna biološka baza podataka String (engl. *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*).

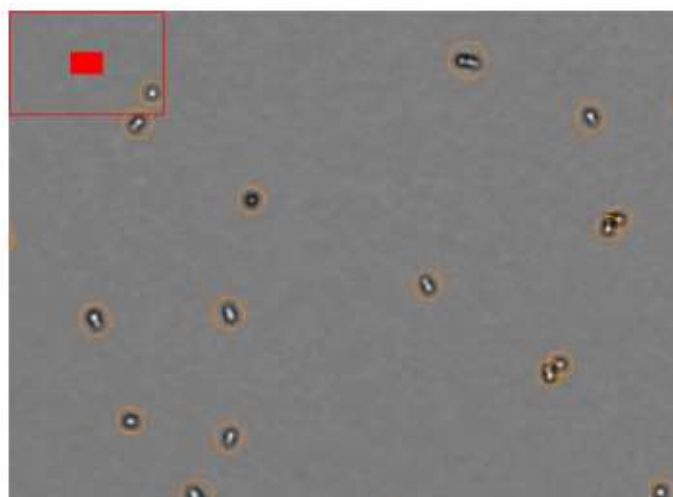
Značajna odrednica za sistemsko razumijevanje staničnih procesa je upravo poznavanje i shvaćanje interakcija među proteinima. Ova baza daje podatke o strukturnim, funkcionalnim i evolucijskim svojstvima proteina. Povezanost Stringa sa brojnim bazama podataka ima svoje prednosti, a sinergije među proteinima uočljive su na nivou dokaznosti, pouzdanosti i molekuskog međudjelovanja.

LC-MS metodom identificiraju se proteini. Pomoću Stringa, svaki od njih se sistematizira na temelju obavljanja određene funkcije u organizmu. Kada se pristupi ovoj bazi podataka, u tražilici se odabere da se ubaci više proteina, odnosno npr. proteini metabolizma u organizmu *Saccharomyces cerevisiae* te se pretražuje. String tada izbaci jednu shemu gdje se prikazuje povezanost tih proteina, opis pojedinog, dok boja linije između proteina označuje način kako proteini djeluju jedan na drugoga, bilo da je u pitanju aktivacija, inhibicija ili pak kataliza. Između ostalog, String pruža odabir modelnog organizma čija se proteinska sinergija analizira čime pridonosi suvislosti i vjerodostojnosti dobivenih podataka.

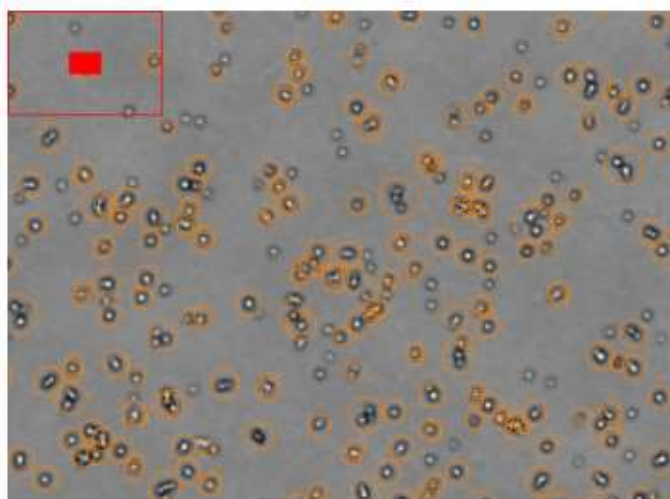
4. Rezultati

4.1. Određivanje broja stanica

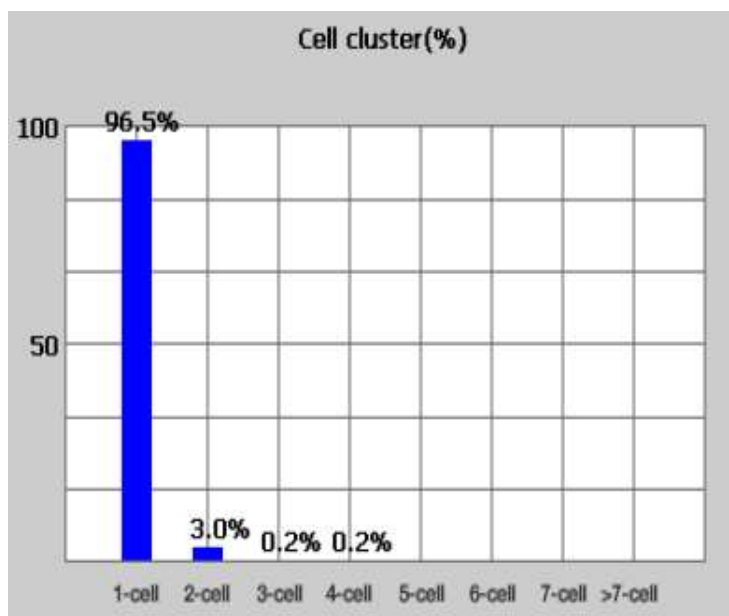
Stanice kvasca:	Početak uzgoja:	Kraj uzgoja:
Ukupna koncentracija	$1,09 \times 10^6$ stanica/mL	$1,24 \times 10^7$ stanica/mL
Prosječna veličina	11,5 μm	7,0 μm
Ukupan broj	507	5747
Pojedinačne	96,5%	91,4%
Dvostruke	3,0%	5,5%
Trostruke	0,2%	2,3%
Četverostruke	0,2%	0,7%
Peterostruke	/	0,2%



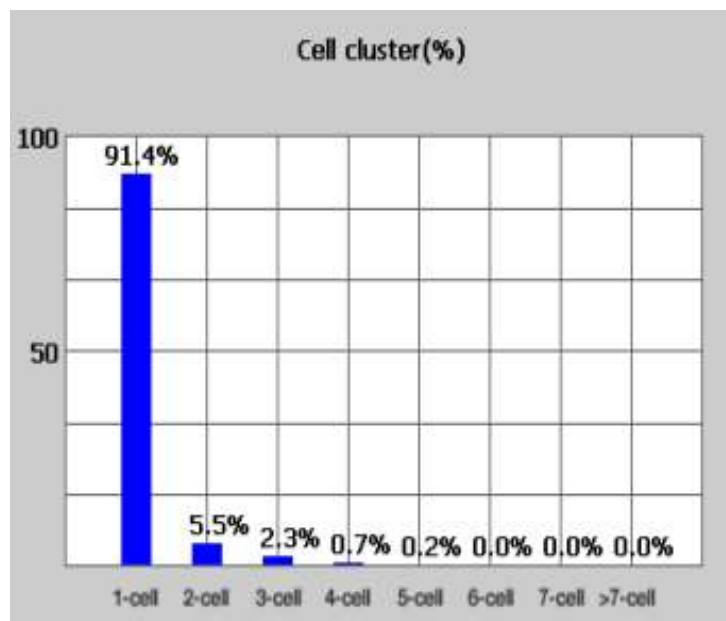
Slika 4. Stanice kvasca vidljive na aparatu LUNA na početku uzgoja.



Slika 5. Stanice kvasca na kraju uzgoja uočljive na aparatu LUNA.



Slika 6. Zastupljenost stanica kvasca koje rastu pojedinačno, kao dvostruke trostruke te kao četverostruke stanice na početku uzgoja.



Slika 7. Zastupljenost stanica kvasca koje rastu pojedinačno, kao dvostruke, trostruke, četverostruke, te peterostruke.

4.2. Mjerenje optičke gustoće stanica

Na Tecan aparatu izmjerena je OD₆₂₀ za kulturu kvasca nakon završenog rasta. Dobiveni podatak potrebno je pomožiti s ukupnom količinom uzgojenog kvasca, u ovom slučaju 10 (jer je ukupni volumen iznosio 10 mL).

UZORAK 1 UZORAK 2

OD₆₂₀	1,050	1,059
OD₆₂₀ X10	10,50	10,59

4.3. Određivanje koncentracije proteina u izolatu mitohondrija

	uzorak 1	uzorak 2
A	0,178	0,184
c (µg/µL)	1,299	1,358

4.4. Identifikacija i karakterizacija proteina mitohondrija

U ovom istraživanju LC/MS metodom identificirano je 71 proteina. U tablicama su isti prikazani te grupirani prema funkcijama koje imaju u organizmu.

Tablica 1. Identificirani proteini koji sudjeluju u procesima biogeneze i prometa proteina.

BIOGENEZA I PROMET PROTEINA	
Proteini:	Naziv:
HSP26_YEAST	Mali protein toplinskog šoka
HSP60_YEAST	Protein toplinskog šoka 60
HSP77_YEAST	Protein toplinskog šoka
CH10_YEAST	10 kDa protein toplinskog šoka
PDI_YEAST	Protein disulfid izomeraza
HSC82_YEAST	ATP-ovisan molekularni šaperon

Tablica 2. Identificirani proteini koji sudjeluju u procesima ekspresije mitohondrijskih gena (DNA, mRNA te tRNA vezani procesi).

EKSPRESIJA MITOHONDRIJSKIH GENA	
Proteini:	Naziv:
PIL1_YEAST	Sfingolipid dugolančani protein
EF1A_YEAST	Faktor translacijske elongacije EF-1 alfa
MMF1_YEAST	Mitohondrijski protein
RS2_YEAST	Proteinska komponenta male (40S) podjedinice
RIM1_YEAST	ssDNA-vezujući protein
RS31_YEAST	Fuzijski protein
HSP26_YEAST	Mali protein toplinskog šoka
ILV3_YEAST	Dihidroksi-kisela dehidrataza
EFTU_YEAST	Mitohondrijski faktor elongacije translacije

MRM2_YEAST	Mitohondrijska 2`O-riboza-metiltransferaza
POR1_YEAST	Mitohondrijski porin
ATP14_YEAST	Podjedinica h 50 sektora mitohondrijske F1F0 ATP sintaze
PMA1_YEAST	Plazma membrana P2-tip H ⁺ -ATPaze
FHP_YEAST	Flavoprotein; dušikov oksid-oksidoireduktaza
ILV5_YEAST	Keto-kisela reduktioizomeraza

Tablica 3. Identificirani proteini koji imaju određene funkcije u respiratornome lancu.

PROTEINI RESPIRATORNOG LANCA	
Proteini:	Naziv:
COX12_YEAST	Podjedinica VIb citokrom c-oksidge
CY1_YEAST	Ubikinol-citokrom-c-reduktaza katalitička podjedinica cyt1
NDI1_YEAST	NADH- ubikinon oksidoireduktaza neosjetljiva na rotenon
SDHA_YEAST	Flavoproteinska podjedinica sukcinat-dehidrogenaze

Tablica 4. Identificirani proteini koji sudjeluju u procesima metabolizma, kao na primjer, metabolizmu, lipida, aminokiselina, nukleotida.

METABOLIZAM	
Proteini:	Naziv:
PDC1_YEAST	Piruvat-dekarboksilaza izoenzim 1
PGK_YEAST	3-fosfoglicerat-kinaza
ENO2_YEAST	Enolaza 2, fosfopiruvat-hidrataza
ENO1_YEAST	Enolaza 1, fosfopiruvat-hidrataza

G3P2_YEAST	Gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza izoenzim 2
ALDH4_YEAST	Mitohondrijska aldehyd-dehidrogenaza
G3P3_YEAST	Gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza izoenzim 3
PMG1_YEAST	Tetramerna fosfoglicerat-mutaza
G3P1_YEAST	Gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza izoenzim 1
ALF_YEAST	Fruktoza 1,6-bisfosfat-aldolaza
ADH1_YEAST	Alkohol-dehidrogenaza
ILVB_YEAST	Acetolaktat sintaza katalitička podjedinica
TPIS_YEAST	Triozafosfat-izomeraza
SCS2_YEAST	Integralni ER membranski protein
CYC1_YEAST	Citokrom c, izoforma 1
QCR7_YEAST	Podjedinica 7 ubikinol citokrom-c-reduktaze
COX4_YEAST	Podjedinica IV citokrom c-oksidadze
HSP60_YEAST	Protein toplinskog šoka 60
CYB2_YEAST	Citokrom b2
QCR2_YEAST	Podjedinica 2 ubikinol citokrom-c-reduktaze
SDHA_YEAST	Flavoproteinska podjedinica sukcinat-dehidrogenaze
HSP12_YEAST	12 kDa protein toplinskog šoka
ATPB_YEAST	Beta podjedinica F1 sektora mitohondrijske F1F0 ATP-sintaze
ATP14_YEAST	Podjedinica h F0 sektora mitohondrijske F1F0 ATP-sintaze
ODPA_YEAST	E1 alfa podjedinica kompleksa piruvat-dehidrogenaze
IDH1_YEAST	Podjedinica mitohondrijske NAD(+) ovisne izocitrat-dehidrogenaze
MAOM_YEAST	Malat-dehidrogenaza
HXKA_YEAST	Heksokinaza izoenzim 1
ACON_YEAST	Aconitat-hidrataza

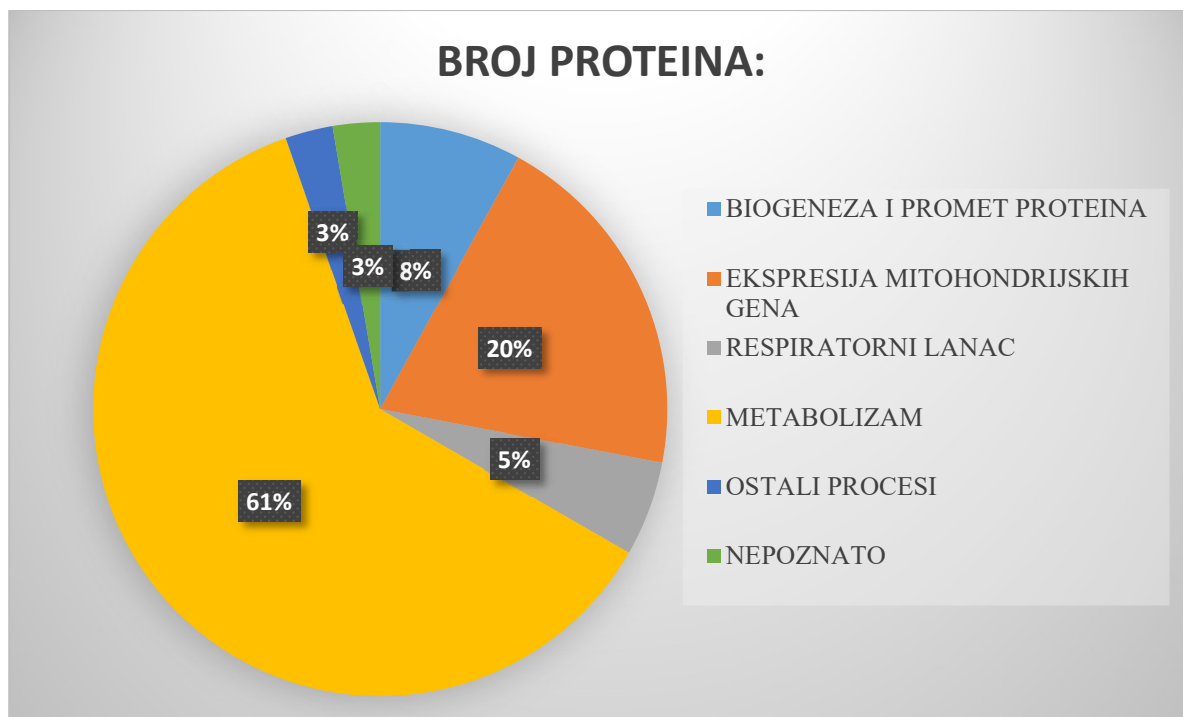
QCR1_YEAST	Citokrom b-c1 kompleksna podjedinica 1
SUCA_YEAST	Sukcinat-CoA-ligaza
QCR8_YEAST	Podjedinica 8 ubikinol citokrom-c reduktaze
FUMH_YEAST	Fumarat-hidrataza
ODPB_YEAST	Podjedinica beta komponente piruvat-dehidrogenaze E1
MPCP_YEAST	Mitohondrijski fosfatni transporter
MDHM_YEAST	Mitohondrijska malat-dehidrogenaza
ATPA_YEAST	Alfa podjedinica F1 sektora mitohondrijske F1F0 ATP-sintaze
ACH1_YEAST	Acetil-CoA hidrolaza
COX6_YEAST	Podjedinica VI citokrom c-oksidge
ODO1_YEAST	2-oksoglutarat-dehidrogenaza
PRX1_YEAST	Mitohondrijski peroksiredoksin s aktivnošću tioredoksin-peroksidaze
BCA1_YEAST	Mitohondrijska aminotransferaza razgranatog lanca
MCR1_YEAST	Mitohondrijska NADH-citokrom b5 reduktaza
CISY1_YEAST	Citrat-sintaza
KPYK1_YEAST	Piruvat-kinaza
ADT2_YEAST	Mitohondrijski adenin nukleotid translokator

Tablica 5. Proteini koji nisu svrstani i sudjeluju u nekim drugim procesima.

OSTALI PROCESI	
Proteini:	Naziv:
SOD2_YEAST	Mitohondrijska mangan superoksid-dismutaza
LSP1_YEAST	Sfingolipid dugolančani protein

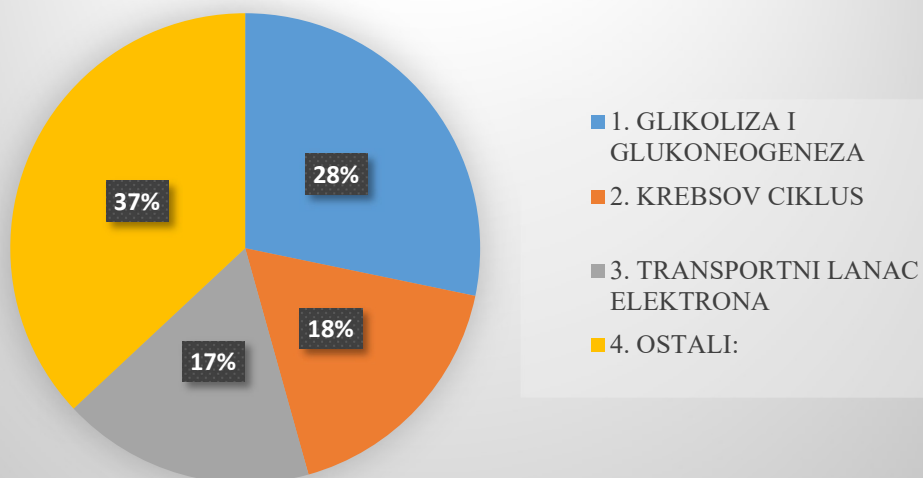
Tablica 6. Identificirani proteini čije je funkcija nepoznata.

PROTEINI NEPOZNATE FUNKCIJE	
Proteini:	Naziv:
OM45_YEAST	Protein mitohondrijske vanjske membrane
MPM1_YEAST	Mitohondrijski osebujni membranski protein 1

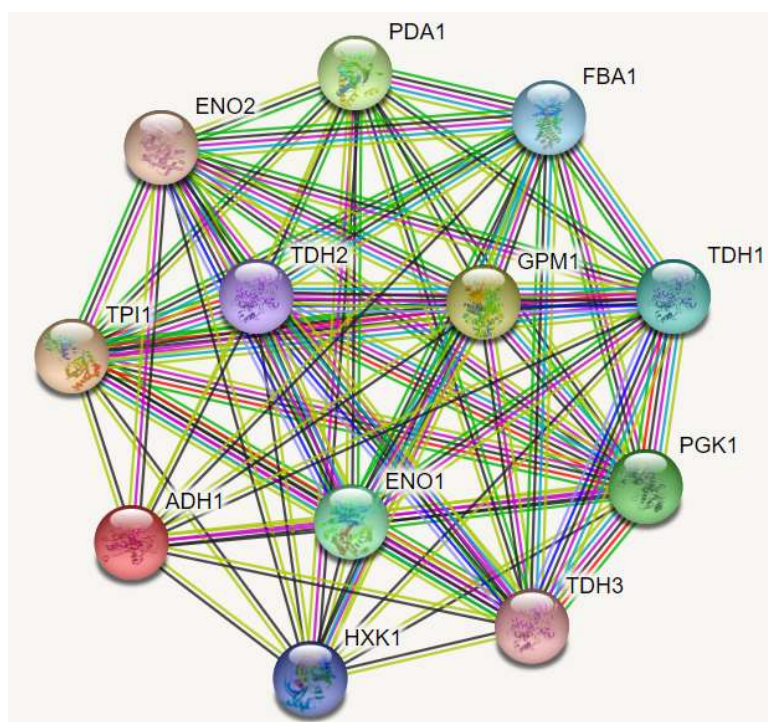


Slika 8. Udio identificiranih proteina prema skupinama (proteini koji sudjeluju u procesima biogeneze i prometa proteina, ekspresiji mitohondrijskih gena, respiratornome lancu, metabolizmu, u nekim drugim procesima i proteini nepoznate funkcije).

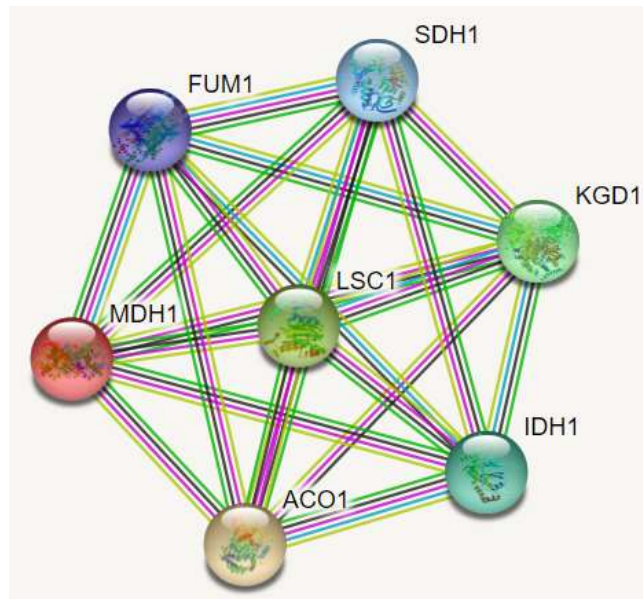
PODJELA PROTEINA U METABOLIZMU



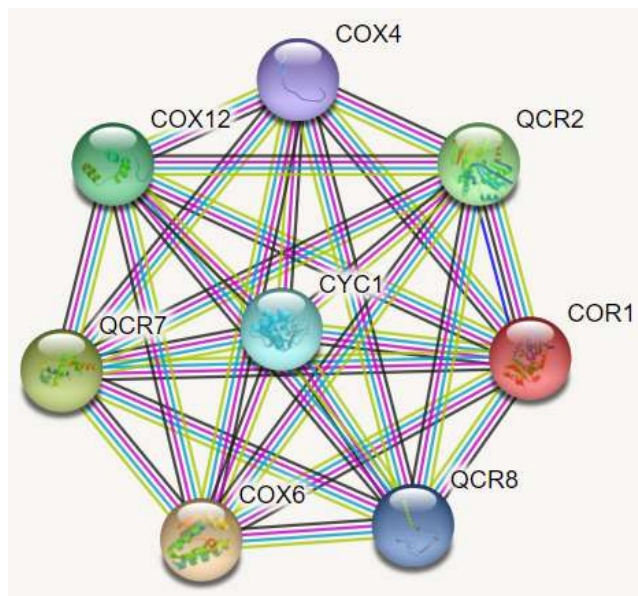
Slika 9. Podjela proteina prema ulozi u metabolizmu (u procesima glikolize i glukoneogeneze, Krebsovom ciklusu te transportnom lancu elektrona).



Slika 10. Proteini koji sudjeluju u procesima glikolize i glukoneogeneze, te njihova povezanost (18).



Slika 11. Proteini ciklusa limunske kiseline (18).



Slika 12. Proteini koji sudjeluju u transportnom lancu elektrona te njihova povezanost (18).

5. Rasprava

Na početku uzgoja kvasca ukupna koncentracija stanica iznosila je $1,09 \times 10^6$ stanica/mL, dok se je na kraju uzgoja povećala i iznosi $1,24 \times 10^7$ stanica/mL, što znači da se ukupan broj stanica povećao više od 11 puta. S druge strane, prosječna veličina stanice je u početku iznosila 11,5 mikrometara, a na kraju 7,0 mikrometara, što je manje u odnosu na početak. To se pripisuje ubrzanoj diobi stanica u povoljnim uvjetima za rast. U radu Čanadi Jurešić i sur. (20) pokazali su da se koncentracija stanica tog istog kvasca u optimalnim uvjetima povećava nekoliko desetaka puta. Rast je bitno smanjen ukoliko se u podlogu u prekomjernoj količini dodaju primjerice ioni metala (Fe^{3+} , Pb^{2+}) što rezultira manjom koncentracijom stanica na kraju rasta (20). Na mikroskopskim slikama prikazanim na slikama 6. i 7. može se vidjeti da stanice tokom rasta, osim veličine mijenjaju i način svog rasta. Na početku rasta 96,5% stanica kvasca rastu pojedinačno, dok ih je nakon završenog uzgoja 91,4%. S povećanjem broja stanica u podlozi, stanice imaju tendenciju stvaranja nakupina, što se vidi i iz dobivenih rezultata: ima 5,5% onih koje rastu kao dvostruke, 2,3% rastu kao trostruke, 0,7% kao četverostruke pa čak i peterostruke (oko 0,2%).

Brzim (Rapid Gold BCA) testom određena je količina proteina u izolatu mitohondrija. Iznosila je $1,3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, što je bilo dovoljno za planiranu LC/MS analizu.

U ovome istraživanju LC/MS metodom identificirano je 71 proteina.

Morgenstern i sur. (2017.) razvili su integrativni eksperimentalni pristup za definiranje proteoma mitohondrija kvasca i klasificirali više od 3300 proteina mitohondrija i frakcija povezanih s mitohondrijima te su definirali 901 mitohondrijski protein visoke pouzdanosti. (19). U svojoj su analizi proteoma mitohondrija imali najviše proteina koji pripadaju procesima metabolizma, a zatim onih koji sudjeluju u procesima ekspresije mitohondrijskih gena. Nakon njih slijede oni nepoznate funkcije, a onda i proteini koji imaju svoju ulogu u respiratornome lancu i naposljetku, proteini koji svoju ulogu obavljaju u biogenezi i prometu proteina (19).

Iako je rad Morgensterna i sur. opširniji i detaljniji, i rezultati ovog rada pokazali su da su najzastupljeniji proteini koji sudjeluju u procesima metabolizma i na njih otpada 61%, a zatim, 20% otpada na proteine procesa ekspresije mitohondrijskih gena (Slika 8). 8% otpada na proteine koji sudjeluju u procesima biogeneze i prometa proteina, 3% proteina ima nepoznatu ulogu, dok je svega 5% onih koji pripadaju respiratornome lancu, što se razlikuje od Morgensternove podjele. Samo je 3% proteina koji imaju funkcije u nekim drugima procesima. Razlika među rezultatima je očekivana, pošto je u ovom istraživanju identificirano 71 proteina,

dok je u radu Morgensterna i sur. identificirano sveukupno 901 proteina što je puno više, pa je stoga razumljivo da rezultati odskoču.

Na slici 9 prikazana je podjela identificiranih proteina prema njihovoj uključenosti u različite metaboličke procese. Prema Malina i sur. (12), mitohondriji se smatraju staničnim elektranama zbog njihove najvažnije uloge u procesu stvaranja energije u obliku ATP-a, putem ciklusa limunske kiseline i oksidativne fosforilacije. No, oni su uključeni i u metabolizam aminokiselina i lipida, sintezu željezo-sumpor proteina i hema te održavanje staničnog redoks statusa. U ovom je radu utvrđeno da 28% identificiranih proteina pripada procesima glikolize i glukoneogeneze, 17% otpada na proteine transportnog lanca elektrona, a 18% sudjeluju i obavljaju svoju ulogu u ciklusu limunske kiseline, dok većina, (37%) pripada ostalim procesima u metabolizmu.

U Morgensternovoj podjeli po metabolizmu također su najzastupljeniji oni proteini koji sudjeluju u energetske metabolizmu (19).

Najbrojniji proteini energetske metabolizma su oni koji obavljaju svoje funkcije u procesima glikolize i glukoneogeneze. Slika 10 prikazuje proteine ovih procesa te njihovu međusobnu povezanost. Mrežnih čvorova, odnosno predstavnika proteina, identificirano je 12. Svaki čvor predstavlja sve proteine koje proizvodi jedan lokus gena koji kodira protein. Interakcije protein-protein predočene su linijama, a njih je 66, što znači da ti proteini doprinose zajedničkoj funkciji, no to ne znači nužno da su fizički vezani. Nadalje, na slici 11 prikazani su proteini koji sudjeluju u ciklusu limunske kiseline. Prikazano je 7 čvorova, to jest proteina i 21 povezna linija. Slika 12 opisuje prikaz proteina transportnoga lanca elektrona. Identificirano je 8 čvorova, znači 8 različitih proteina i 28 rubova.

Identificirani proteini vezani uz procese glikolize/glukoneogeneze smatraju se citosolnim proteinima (prikazani slikom 10), dok su svi ostali proteini identificirani u mitohondrijskoj frakciji - proteini transportnog lanca elektrona i Krebsovog ciklusa (prikazani slikama 11 i 12) i većina proteina razvrstanih pod ostalo, ustvari mitohondrijski proteini. Ostali proteini, koji čine > 37% identificiranih proteina dio su metabolizma reaktivnih kisikovih vrsta (SOD2) ili mitohondrija lipida (LSP1), ili su pak gradivni mitohondrijski lipidi (poput porina, podjedinica F₀ ili F₁ i slično). Prisustvo glikolitičkih/glukoneogenetskih proteina u mitohondrijskoj frakciji nije neočekivano. Prema Malina i sur. mitohondriji su uključeni u brojne i različite metaboličke procese koji zahtijevaju konstantnu „razmjenu“ metabolita između mitohondrijskog matriksa i citosola (12).

6. Zaključak

Na kraju ovog rada može se zaključiti:

1. Sukladno povećanju koncentracije stanica kvasca na kraju uzgoja, dogodila se promjena u veličini, obliku i načinu rasta stanica kvasca.
2. Iz uzgojenih stanica izolirani su mitohondriji, a iz njih proteini u dovoljnoj količini za LC/MS analizu.
3. Analiza proteoma mitohondrija dokazala je da su većina identificiranih proteina metabolički proteini. Osim njih, identificirani su proteini uključeni u ekspresiju mitohondrijskih gena, proteini koji sudjeluju u biogenezi i prometu proteina i naposljetku proteina koji svoju funkciju obavljaju u respiratornome lancu.
4. Kada se sagleda podjela proteina unutar metabolizma, uz proteine koji pripadaju procesima glikolize i glukoneogeneze, identificirani su i proteini transportnog lanca elektrona te Krebsovog ciklusa.

7. Literatura

1. Kalenić S., i suradnici: Medicinska mikrobiologija; Zagreb: Medicinska naklada; 2013.; str. 511.-515.
2. Vrsalović Presečki, Ana, Studij procesa pridobivanja enzima u rastućim stanicama pekarskog kvasca, 2003., magistarski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb. [Citirano 9.8.2022.] Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/141973>
3. Škara Josip, Sergej Nadalin, Alena Buretić-Tomljanović, Branka Blagović, Izučavanje neurodegenerativnih bolesti na kvascu kao modelnom organizmu; Medicina fluminensis 2016, [Internet] Vol. 52, No. 1, p. 14-27. [Citirano 13.8.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/file/225168>
4. Teparić R, Stuparević I, Mrša V. Incorporation of Homologous and Heterologous Proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. Food Technology and Biotechnology [Internet]. 2010 [pristupljeno 01.09.2022.];48(3):317-328. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/57563>
5. Van der Klei, I. J., & Veenhuis, M.: Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2006., stranica 1367. [citirano 9.8.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17050005>
6. Duman-Scheel M. *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's Yeast) as an Interfering RNA Expression and Delivery System. Curr Drug Targets. 2019;20(9):942-952. [citirano 10.8.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6700756/pdf/CDT-20-942.pdf>
7. Ratledge C., Hull: Yeast physiology- a micro-synopsis, Bioprocess Engineering 6 (1991), 195-203
8. Matheson K, Parsons L, Gammie A. Whole-Genome Sequence and Variant Analysis of W303, a Widely-Used Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. G3 (Bethesda). 2017 Jul 5;7(7):2219-2226. [citirano 15.8.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28584079/>
9. Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra AS, Hatziloukas E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. AIMS Microbiol. 2020 Feb 11;6(1):1-31. [citirano 12.8.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7099199/>

10. Eldarov MA, Kishkovskaia SA, Tanaschuk TN, Mardanov AV. Genomics and Biochemistry of *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains. *Biochemistry (Mosc)*. 2016 Dec;81(13):1650-1668. [citirano 12.8.2022] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28260488/>
11. Ralser M, Kuhl H, Ralser M, Werber M, Lehrach H, Breitenbach M, Timmermann B. The *Saccharomyces cerevisiae* W303-K6001 cross-platform genome sequence: insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt. *Open Biol*. 2012 Aug;2(8):120093. [citirano 10.8.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3438534/pdf/rsob-2-120093.pdf>
12. Malina C., Larsson C. and Nielsen J. Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology; *FEMS Yeast Research*, Volume 18, Issue 5, August 2018. [Citirano 10.8.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29788060/>
13. Elstner M., C. Andreoli, T. Klopstock, T. Meitinger, H. Prokisch, Chapter 1 The Mitochondrial Proteome Database: MitoP2, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Volume 457, 2009, Pages 3-20. [citirano 12.8.2022.] Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687909050010>
14. Pearce, D. A., Sherman, F. (1999). Toxicity of copper, cobalt, and nickel salts is dependent on histidine metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 181(16), 4774–4779. [citirano 29.8.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4774-4779.1999>
15. Dymond, J. S. (2013). *Saccharomyces cerevisiae* growth media. *Methods in enzymology*, 533, 191–204. [citirano 30.8.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00012-X>
16. <https://www1.cgmh.org.tw/intr/intr2/c3s000/corelab/RadiationBiology/doc/LUNA-FL%20user%20manual.pdf> (pristupljeno 10.8.2022.)
17. [https://www.abcam.com/ps/products/65/ab65321/documents/Mitochondrial-DNA-Isolation-Kit-protocol-book-v6c-ab65321%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/65/ab65321/documents/Mitochondrial-DNA-Isolation-Kit-protocol-book-v6c-ab65321%20(website).pdf) (pristupljeno 15.8.2022.)
18. https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bkANOLsFBRPq&input_page_show_search=on (pristupljeno 24.8.2022.)

19. Morgenstern M, Stiller SB, Lübbert P, Peikert CD, Dannenmaier S, Drepper F, Weill U, Höß P, Feuerstein R, Gebert M, Bohnert M, van der Laan M, Schuldiner M, Schütze C, Oeljeklaus S, Pfanner N, Wiedemann N, Warscheid B. Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Rep.* 2017 Jun 27;19(13):2836-2852. [citirano 13.8.2022.]
Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28658629/>
20. Čanadi Jurešić, G, Ćurko-Cofek, B., Barbarić, M; Mumiši, N; Blagović, B; Jamnik P. Response of *Saccharomyces cerevisiae* W303 to Iron and Lead Toxicity in Overloaded Conditions, *Current Microbiology* 78 (4), 1188-1201. [citirano 31.8.2022.]
Dostupno na : <https://www.bib.irb.hr/1104907>

8. Prilozi

8.1. Popis slika

- Slika 1. LUNA-FLTM Dual fluorescence cell counter.....14
<https://www.vitascientific.com/luna-automated-fluorescence-cell-counter-luna-fl-120001.html>
- Slika 2. Shematski prikaz funkcioniranja dvobojne fluorescentne mikroskopske optike koja doprinosi izvrsnoj točnosti brojanja.....14
<https://www.vitascientific.com/luna-automated-fluorescence-cell-counter-luna-fl-120001.html>
- Slika 3. Baždarna krivulja izrađena na temelju serije razrjeđenja standarda, korištena za izračun koncentracije proteina.....17
- Slika 4. Stanice kvasca vidljive na aparatu LUNA na početku uzgoja.....19
- Slika 5. Stanice kvasca na kraju uzgoja uočljive na aparatu LUNA.....20
- Slika 6. Zastupljenost stanica kvasca koje rastu pojedinačno, kao dvostruke, trostruke te četverostruke stanice na početku uzgoja.....20
- Slika 7. Zastupljenost stanica kvasca koje rastu pojedinačno, kao dvostruke, trostruke, četverostruke, te peterostruke.....21
- Slika 8. Udio identificiranih proteina prema skupinama (proteini koji sudjeluju u procesima biogeneze i prometa proteina, ekspresiji mitohondrijskih gena, respiratornome lancu, metabolizmu, u nekim drugim procesima i proteini nepoznate funkcije).....26

Slika 9. Podjela proteina prema ulozi u metabolizmu (u procesima glikolize i glukoneogeneze, Krebsovom ciklusu te transportnom lancu elektrona).....	27
Slika 10. Proteini koji sudjeluju u procesima glikolize i glukoneogeneze, te njihova povezanost.....	27
Slika 11. Proteini ciklusa limunske kiseline.....	28
Slika 12. Proteini koji sudjeluju u transportnom lancu elektrona te njihova povezanost.....	28

9. Životopis

Simone Radolović rođena je 30.08.1999. godine u Puli. U mjestu Marčana završava osnovnoškolsko obrazovanje, te onda upisuje srednju školu, opću gimnaziju u Puli. Završetkom srednje škole, upisuje preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Tijekom studiranja radila je u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Istarske županije u Puli u službi za epidemiologiju na epidemiološkim anketiranjima novooboljelih od Covida-19 te upisivanjem u digitalnu platformu.