

Instytut Żywnienia Zwierząt Akademii Rolniczej w Lublinie  
Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu

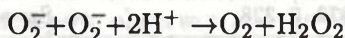
Adam Edmund LICZMAŃSKI, Tomasz BILIŃSKI

**Znoszenie efektów braku dysmutazy ponadtlenkowej  
w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* przez zmiany środowiska.**

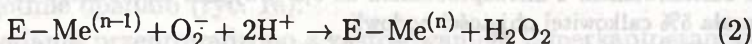
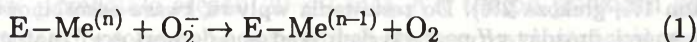
**I. Czynniki redukujące**

Neutralisation of Superoxide Dismutase Deficient Effects  
by Environment Changes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. I. Reducing Agents

W komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zlokalizowane są dwie dysmutazy ponadtlenkowe (SOD; E.C. 1.15.1.1), cynkowo-miedziowa (CuZn SOD) w cytozolu oraz manganowa (MnSOD) w mitochondriach (3). Enzymy te katalizują reakcję dysproporcjonowania rodnikojonów ponadtlenkowych zgodnie z równaniem:



Mechanizm dysmutacji rodnikojonów ponadtlenkowych polega na reakcjach redukcji i utleniania jonów metali wchodzących w skład centrów aktywnych tych enzymów ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ ). Przedstawiono to w reakcjach 1 i 2. W pierwszym etapie katalizy (reakcja 1) jon metalu jest zredukowany przez rodnik ponadtlenkowy. Jednocześnie uwalnia się cząsteczka  $\text{O}_2$ . Następny rodnik ponadtlenkowy utlenia zredukowany jon metalu w obecności protonów i powstaje  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reakcja 2).



W reakcjach tych symbolem E oznaczono enzym, natomiast Me oznacza jon metalu centrum aktywnego. Jon ponadtlenkowy jest wytwarzany tylko

w obecności tlenu, a dysmutazy ponadtlenkowe ochraniają organizmy przed jego cytotoksycznym działaniem (2).

Komórki mutantów otrzymanych z drożdży *S. cerevisiae* nie posiadające CuZnSOD są nadwrażliwe na stres tlenowy (1). Wobec znanego faktu, iż podawanie do środowiska bakterii beztlenowych czynnika redukującego zwiększa tolerancję tych organizmów na tlen, postanowiono sprawdzić, czy zaobserwuje się podobne efekty w mutantach pozbawionych dysmutazy ponadtlenkowej.

#### MATERIAŁY I METODY

Do badań użyto komórek szczepu standardowego SP-4, komórek mutantów nie posiadających CuZnSOD (*scd1*, *scd2*) oraz mutantu pozbawionego MnSOD ( $\text{MnSOD}^-$ ). Genotypy oraz pochodzenie wykorzystanych szczepów drożdżowych zestawiono w tab. 1.

Tab. 1. Szczepy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wykorzystane w pracy oraz ich charakterystyka i pochodzenie  
The yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this paper and their characterization and origin

Szczep Strain	Genotyp Genotype	Pochodzenie Origin
SP-4	$\alpha$ leu1 arg4	Zakład Genetyki Ogólnej IBB PAN w Warszawie
MnSOD1	$\alpha$ his3-11, 3-15, ura 3-251, 3-372, 3-328	A.P. van Loon, G. Schatz Szwajcaria
DSCD1-1C	a leu1 arg4 <i>scd1</i> -1	Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu
173	a leu1 arg4 <i>cta1</i> -9 <i>ctl1</i> -1 <i>scd2</i>	Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu
DSCD6-6B	$\alpha$ ura3 $\text{MnSOD}^-$ <i>scd1</i>	Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu

Drożdże hodowano w pełnej płynnej pożywce YPG-2% (ekstrakt drożdżowy 1%, pepton 1%, glukoza 2%). Do testowania wpływu kwasu askorbinowego na tempo podziału komórek drożdży *pH* pożywki doprowadzano do wartości 6, natomiast w eksperymentach z zastosowaniem 2-merkaptioetanolu do 5,5. Objętość testowanego czynnika nie przekraczała 5% całkowitej objętości hodowli.

Wyniki doświadczeń przedstawiono jako zmiany gęstości optycznej hodowli w funkcji stężeń kwasu askorbinowego (AA) lub 2-merkaptioetanolu (2-ME) i czasu inkubacji.

Każdorazowo pożywki szczepiono świeżym 18-20-godzinnym inokulum.

Badania poprzedziły eksperymenty pilotowe polegające na doborze optymalnego przedziału stężeń testowanych reduktantów. Ustalono, że przedziały koncentracji AA 1–40 mM i 2-ME 0,1–5 mM odpowiadają założeniom eksperymentów.

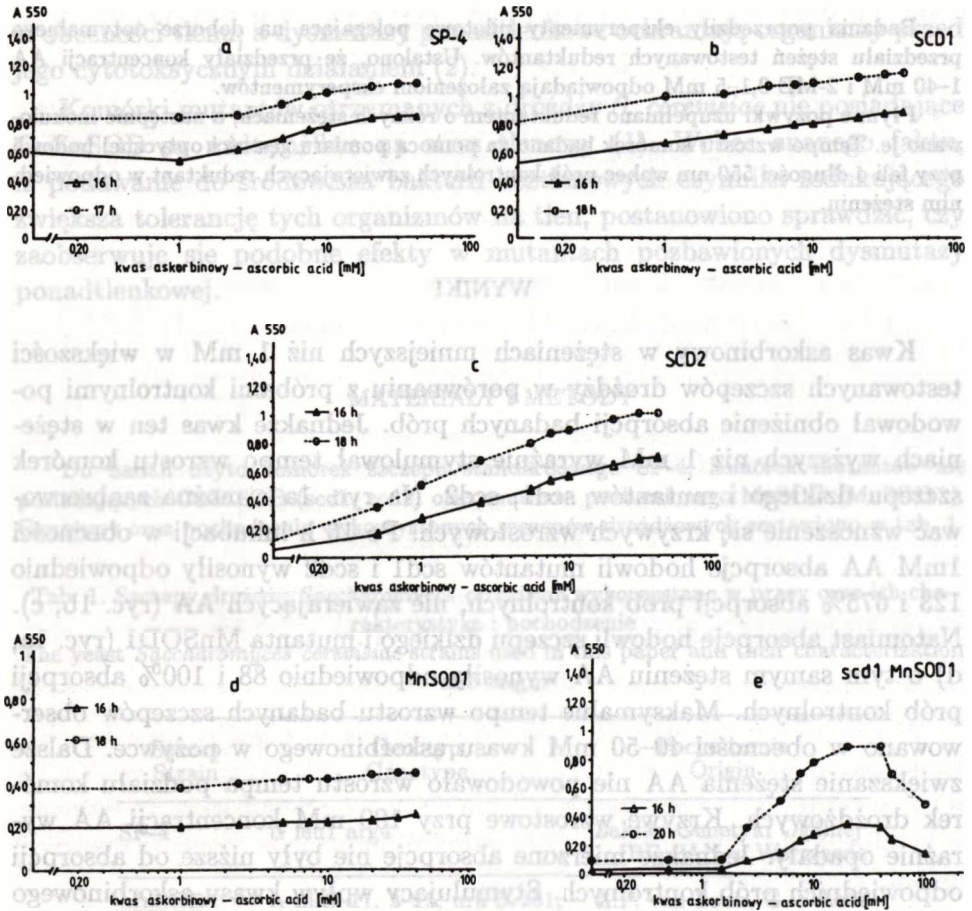
Płynne pożywki uzupełniano reduktantem o różnych stężeniach, a następnie inokulowano je. Tempo wzrostu komórek badano za pomocą pomiaru gęstości optycznej hodowli przy fali o długości 550 nm wobec prób kontrolnych zawierających reduktant w odpowiednim stężeniu.

## WYNIKI

Kwas askorbinowy w stężeniach mniejszych niż 1 mM w większości testowanych szczepów drożdży w porównaniu z próbami kontrolnymi powodował obniżenie absorpcji badanych prób. Jednakże kwas ten w stężeniach wyższych niż 1 mM wyraźnie stymulował tempo wzrostu komórek szczepu dzikiego i mutantów *scd1*, *scd2*. Na ryc. 1a–c można zaobserwować wznoszenie się krzywych wzrostowych. Po 16 h inkubacji w obecności 1mM AA absorpcje hodowli mutantów *scd1* i *scd2* wynosiły odpowiednio 123 i 675% absorpcji prób kontrolnych, nie zawierających AA (ryc. 1b, c). Natomiast absorpcje hodowli szczepu dzikiego i mutantu *MnSOD1* (ryc. 1a, d) o tym samym stężeniu AA wynosiły odpowiednio 88 i 100% absorpcji prób kontrolnych. Maksymalne tempo wzrostu badanych szczepów obserwowano w obecności 40–50 mM kwasu askorbinowego w pożywce. Dalsze zwiększanie stężenia AA nie powodowało wzrostu tempa podziału komórek drożdżowych. Krzywe wzrostowe przy 100 mM koncentracji AA wyraźnie opadały. Jednakże mierzone absorpcje nie były niższe od absorpcji odpowiednich prób kontrolnych. Stymulujący wpływ kwasu askorbinowego na wzrost badanych szczepów obserwowano do 20–24 godz. inkubacji hodowli. Po tym czasie absorpcje płynnych hodowli osiągały wartości zbliżone do absorpcji prób kontrolnych. Maksymalny efekt stymulacji tempa podziału komórek drożdży obserwowano podczas 14–18 h inkubacji w obecności AA.

Odmienny kształt miały krzywe wzrostowe podwójnego mutantu *scd1 MnSOD1* (nie posiadały obu dysmutaz ponadtlenkowych). Kwas askorbinowy w stężeniach 2,5–20 mM wyraźnie stymulował tempo podziału komórek tego mutantu. Krzywa wzrostowa wznosiła się, osiągając maksimum przy 20 mM AA. W przedziale stężeń 20–40 mM AA tempo podziału komórek nie zmieniało się, po czym w miarę dalszego wzrostu stężenia AA w pożywce łagodnie opadało (ryc. 1e).

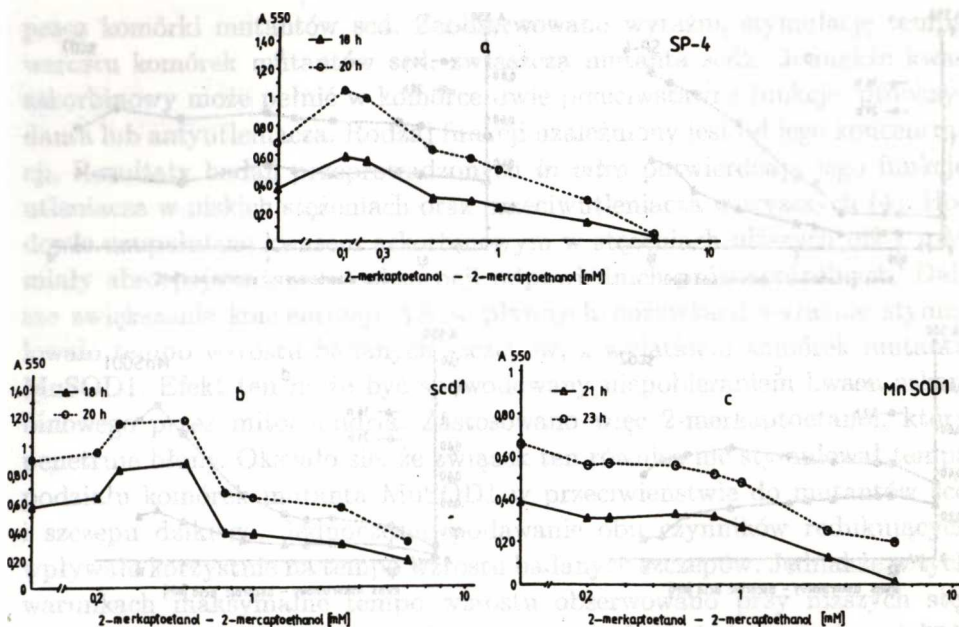
Podobne badania przeprowadzono z zastosowaniem 2-merkaptoetanolu. Stymulujący wpływ tego reduktanta na tempo podziału komórek obserwowano w wąskim przedziale jego stężeń, a mianowicie w granicach 0,1–0,5 mM



Ryc. 1. Badanie wpływu kwasu askorbinowego na tempo wzrostu szczepu standardowego (a) oraz mutantów scd1 (b), scd2 (c), MnSOD1 (d) i scd1MnSOD1 (e). Wskaźnikiem tempa wzrostu jest gęstość optyczna hodowli w jej logarytmicznej fazie, mierzona po czasie wskazanym na poszczególnych rycinach. Przedstawione dane są średnimi arytmetycznymi z dwóch równoległych powtórzeń

Ascorbic acid effect on the standard strain (a) and sod-mutant-cells growth rate; scd1 (b), scd2 (c), MnSOD1 (e), scd1MnSOD1 (e). Optical density of cultures measured in time intervals given in each figure indicates the growth rate. Presented data are arithmetic means of two parallel experiments

(ryc. 2a–c). Przy zawartości 2-ME w pożywce większej niż 0,5 mM krzywe wzrostowe szczepu standardowego i mutantów nie posiadających CuZnSOD gwałtownie opadały. Przy 5 mM stężeniu w pożywce 2-merkaptotoetanol powodował 90% hamowanie tempa podziału komórek badanych szczepów. Komórki szczepu dzikiego maksymalne tempo wzrostu osiągały przy 0,1 mM koncentracji 2-ME w pożywce (ryc. 2a). Absorpcja hodowli po 18 h inkubacji



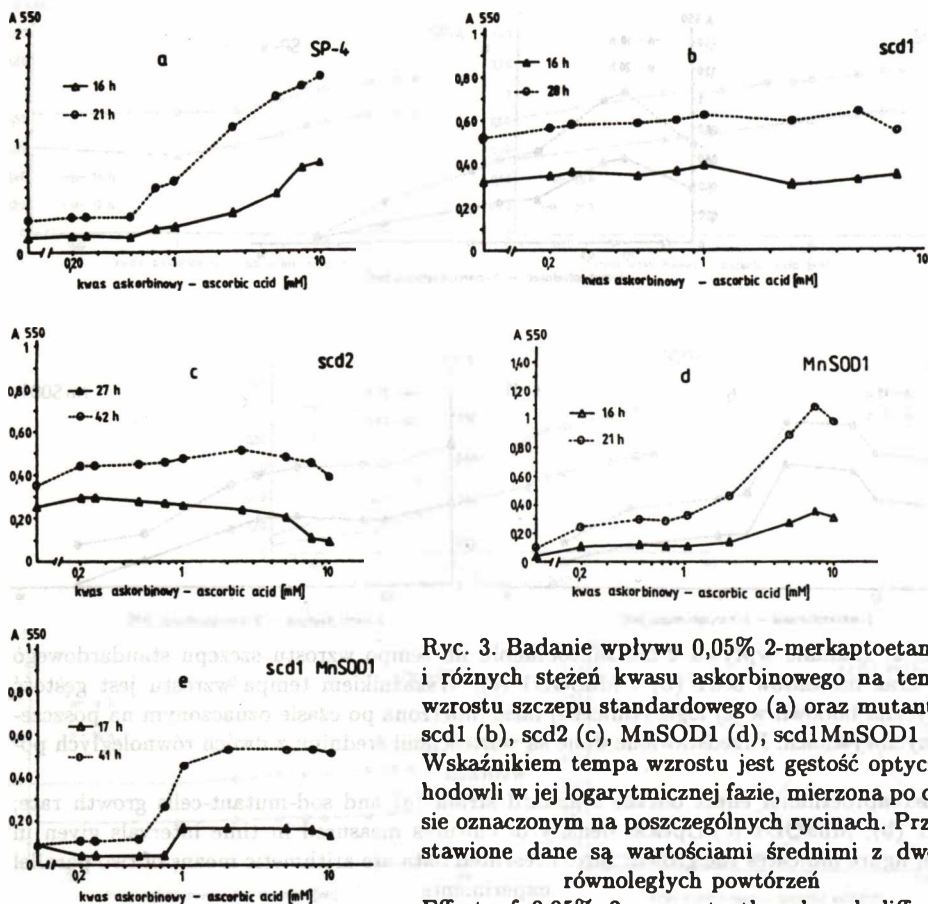
Ryc. 2. Badanie wpływu 2-merkaptioetanolu na tempo wzrostu szczepu standardowego (a) oraz mutantów *scd1* (b) i *MnSOD1* (c). Wskaźnikiem tempa wzrostu jest gęstość optyczna hodowli w jej logarytmicznej fazie, mierzona po czasie oznaczonym na poszczególnych rycinach. Przedstawione dane są wartościami średnimi z dwóch równoległych powtórzeń

2-mercaptoethanol effect on the standard strain (a) and sod-mutant...cells growth rate; *scd1* (b), *MnSOD1* (c). Optical density of cultures measured in time intervals given in each figure indicates the growth rate. Presented data are arithmetic means of two parallel experiments

stanowiła ok. 160% próby kontrolnej. Maksymalne tempo podziału komórek mutantów nie posiadających *CuZnSOD* zaobserwowano przy 0,5 mM stężeniu 2-ME w pożywce YPG-2%. Absorpcja hodowli mutantu *scd1* po 18 h inkubacji wynosiła 153% absorpcji próby kontrolnej (ryc. 2b).

W każdym z testowanych stężeń nie obserwowano stymulującego wpływu 2-ME na tempo wzrostu mutantu nie posiadającego *MnSOD* (ryc. 2c). Krzywe wzrostowe w poszczególnych okresach inkubacji łagodnie opadały do stężenia 0,1 mM, a następnie gwałtownie osiągały oś odciętych przy stężeniu 5 mM 2-ME w pożywce.

Interesujące również było sprawdzenie, w jaki sposób jednoczesne dodawanie do pożywki obydwu czynników redukujących wpływało na tempo wzrostu badanych szczepów. W tym celu pożywki YPG-2% uzupełniano 2-ME o stężeniu stałym 0,05% oraz kwasem askorbinowym w stężeniach 0,1–10 mM (ryc. 3a–e). Okazało się, że kwas askorbinowy w stężeniach



Ryc. 3. Badanie wpływu 0,05% 2-merkaptoetanolu i różnych stężeń kwasu askorbinowego na tempo wzrostu szczepu standardowego (a) oraz mutantów scd1 (b), scd2 (c), MnSOD1 (d), scd1MnSOD1 (e). Wskaźnikiem tempa wzrostu jest gęstość optyczna hodowli w jej logarytmicznej fazie, mierzona po czasie oznaczonym na poszczególnych rycinach. Przedstawione dane są wartościami średnimi z dwóch równoległych powtórzeń

Effect of 0.05% 2-mercaptoethanol and different ascorbic acid concentrations on the standard strain (a) and sod-mutant-cells growth rate; scd1 (b), scd2 (c), MnSOD1 (d), scd1MnSOD1 (e). Optical density of cultures measured in time intervals given in each figure indicates the growth rate. Presented data are arithmetic means of two parallel experiments

0,75–10 mM w obecności 0,05% 2-ME wyraźnie stymulował tempo podziału komórek szczepu standardowego, 0,75–2,5 mM mutantu scd1, 0,1–0,75 mM mutantu scd2 i 1–10 mM mutantu MnSOD1. Hodowle te osiągały maksymalne tempo wzrostu w obecności 2,5 mM kwasu askorbinowego. Synergistyczne działanie obu reduktantów stymulowało również wzrost komórek mutantu scd1MnSOD1 w przedziale stężeń AA 1–7,5 mM (ryc. 3e).

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Rezultaty uzupełniania pożywki kwasem askorbinowym potwierdziły założenie, że zmiana potencjału redoks pozwala na zwiększoną tolerancję tlenu

przez komórki mutantów scd. Zaobserwowano wyraźną stymulację tempa wzrostu komórek mutantów scd, zwłaszcza mutantu scd2. Jednakże kwas askorbinowy może pełnić w komórce dwie przeciwstawne funkcje: prooksydanta lub antyutleniacza. Rodzaj funkcji uzależniony jest od jego koncentracji. Rezultaty badań przeprowadzonych *in vitro* potwierdzają jego funkcję utleniacza w niskich stężeniach oraz przeciwutleniacza w wyższych (4). Hodowle uzupełniane kwasem askorbinowym w stężeniach niższych niż 1 mM miały absorpcje niższe od absorpcji odpowiednich prób kontrolnych. Dalsze zwiększanie koncentracji AA w płynnych pożywkach wyraźnie stymulowało tempo wzrostu badanych szczepów, z wyjątkiem komórek mutantu MnSOD1. Efekt ten może być spowodowany niepobieraniem kwasu askorbinowego przez mitochondria. Zastosowano więc 2-merkaptoetanol, który penetruje błony. Okazało się, że związek ten również nie stymulował tempa podziału komórek mutantu MnSOD1 w przeciwieństwie do mutantów scd i szczepu dzikiego. Jednoczesne podawanie obu czynników redukujących wpływało korzystnie na tempo wzrostu badanych szczepów. Jednakże w tych warunkach maksymalne tempo wzrostu obserwowano przy niższych stężeniach kwasu askorbinowego. Otrzymane rezultaty były prawdopodobnie wynikiem jednoczesnego działania obu reduktantów. Przypuszczalnie 2-ME w stężeniu 0,05% nie tylko ułatwiało penetrację AA, ale również podnosiło poziom „siły redukcyjnej” badanych komórek. Ta z kolei, jak się przypuszcza, jest niezbędna do pobierania jonów metali przez komórki (5). Z przedstawionych badań wynika, że zmiana środowiska polegająca na wprowadzeniu do pożywki egzogenego reduktanta bądź dwóch związków redukujących jednocześnie powoduje znoszenie efektów braku cytozolowej CuZnSOD *in vivo*. Przypuszczalnie związki te są niezbędne do zredukowania endogenych antyutleniaczy ochraniających komórkę drożdży przed cytotoksycznym działaniem rodnikojonów ponadtlenkowych w warunkach braku cytozolowej CuZnSOD.

#### WNIOSEK

Wprowadzenie do środowiska komórek mutantów drożdżowych nie posiadających CuZnSOD czynników redukujących powoduje częściowe zniesienie efektów braku tego enzymu.

\*

Pani Mgr J. Litwińskiej-Bilińskiej serdecznie dziękuję za przygotowanie i wyselekcjonowanie badanego materiału biologicznego.

\* \*

Badania przedstawione w niniejszej pracy zostały wykonane w ramach CPBR PAN 3.13 oraz zawarte w rozprawie doktorskiej pierwszego autora.

## PIŚMIENICTWO

1. Biliński T., Krawiec Z., Liczmański A., Litwińska J.: Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction *in vivo*? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **130**, 533-539 (1985).
2. Hassan H.M. [w:] *Free Radical in Molecular Biology, Aging and Disease*. Red. Armstrong D., Sohal R.S., Cutter R., Slater T.F., Raven Press, New York 1985, t. **27**, ss. 78-85.
3. Liczmański A.E.: Roślinne dysmutazy ponadtlenkowe. *Post. Biochem.* **28**, 113-136 (1982).
4. Liczmański A.E.: Toksyczność tlenu. II. Mechanizmy ochronne. *Post. Biochem.* **34**, 293-310 (1988).
5. Percival S.S., Harris E.D.: Ascorbate enhances copper transport from ceruloplasmin into human K562 cells. *J. Nutr.* **119**, 779-784 (1989).

## SUMMARY

Yeast mutant cells (*Saccharomyces cerevisiae*) deficient in CuZnSOD (*scd1* and *scd2*) are hypersensitive to oxygen stress. It is known however that adding a reducing agent to anaerobic bacteria environment increases these organisms' tolerance to oxygen. We decided to determine if similar effects would be observed in dismutaseless mutants. Experiments involved the use of ascorbic acid (AA), 2-mercaptoethanol, and both compounds simultaneously. Tests were conducted in liquid YPG-2% media, supplemented with various concentrations of a tested reducing agent. The growth rate of cells was tested by measuring optical density of the culture at 550 nm wavelength against control samples.

The results of medium supplementation by ascorbic acid corroborated the assumption that the change in red-ox potential causes a bigger tolerance to oxygen in *scd* mutant cells. A significant stimulation of growth rate of *scd* mutant cells was observed, especially those of *scd2*. The culture supplemented with ascorbic acid in concentrations lower than 1  $\mu$ M showed lower absorptions than those of control samples. A further increase in concentration of AA in liquid media significantly stimulated the growth rate of tested strains, except those of MnSOD1 mutant cells. This effect may be due to the lack of absorption of AA by mitochondria. 2-mercaptoethanol (2ME) was used then, which has been known to penetrate mitochondria. It turned out that this compound does not stimulate the growth rate of MnSOD1 mutant cells either, in contrast to *scd* mutants and wild strains. Simultaneous addition of both reducing agents influences positively the growth rate of tested strains. However, in such conditions, the maximum growth rate was noted in lower AA concentrations. Probably, 2ME at 0.05% concentration not only facilitates AA penetration but also increases the 'reducing force' level of the tested cells. This in turn, as it is assumed, is necessary to absorb metal ions by cells.

The presented research suggests that a change in environment, consisting of adding an exogenic reductant, or two reducing compounds simultaneously, causes neutralisation of cytosolic CuZnSOD deficiency effects *in vivo*. Probably, such compounds are necessary to reduce endogenic antioxidants protecting yeast cells from cytotoxic activity of superoxide radical ions in the conditions of cytosolic CuZnSOD deficiency.