

Wpływ metabolizmu fermentacyjnego i oksydacyjnego na chronologiczną długość życia drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Agata Święciło

Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin, agata.swiecilo@up.lublin.pl

Wstęp

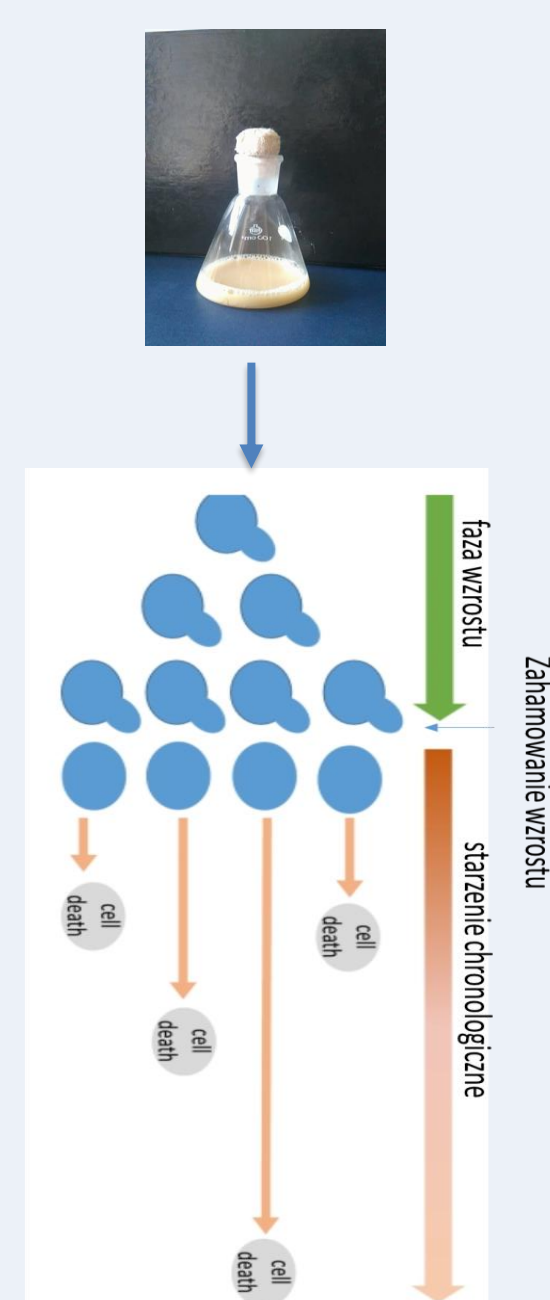
Starzenie jest skomplikowanym procesem biologicznym, przebiegającym zarówno u jednokomórkowych mikroorganizmów jak i u wielokomórkowych, złożonych tkankowców. Ze względu na to, że jest to proces uniwersalny i generujący podobne lub takie same symptomy u różnych organizmów, wiele jego aspektów można badać na prostych, jednokomórkowych organizmach modelowych. W tego typu badaniach ważną pozycję zajmują drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Jedną z metod badania procesu starzenia u drożdży jest analiza żywotności populacji komórek w hodowli stacjonarnej (tzw. starzenie się chronologiczne). Przyjmuje się, że jest ono analogiczne do procesów zachodzących w postmitotycznych komórkach ssaków.

Cel pracy

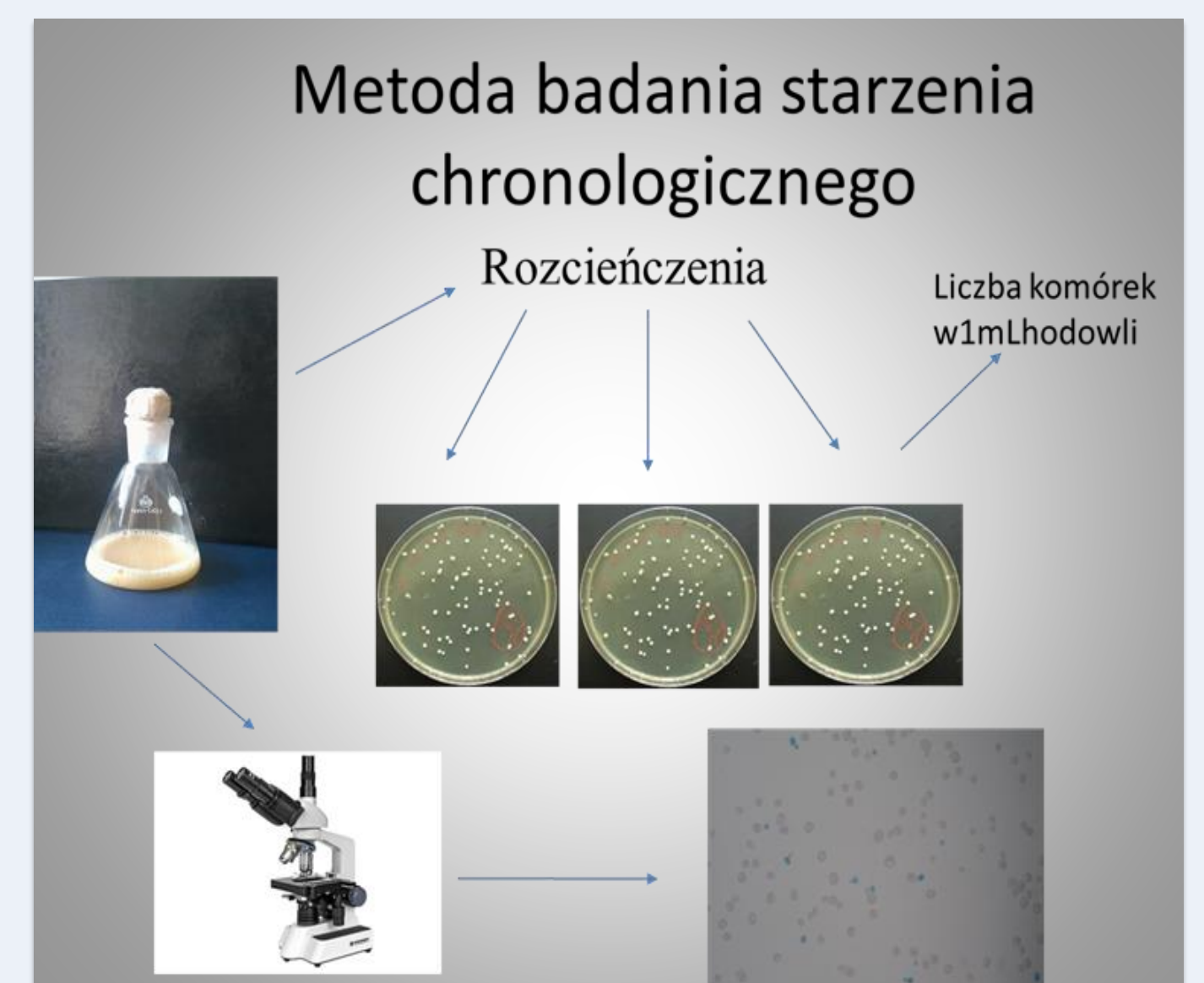
Celem badań była analiza chronologicznej długości życia komórek drożdży różniących się metabolizmem energetycznym (komórki oddychające tlenowo lub fermentujące), sprawnością systemu antyoksydacyjnego i adaptacyjnej odpowiedzi na stres środowiskowy. W celu uzyskania jednorodnej populacji komórek oddychających tlenowo wykorzystano komórki kompetentne oddechowo hodowane na glicerolu jako niefermentowalnym źródle węgla. W tych warunkach komórki drożdży prowadzone w hodowli okresowej we wszystkich fazach wzrostu zdobywają energię na drodze oddychania tlenowego. Natomiast komórki zdobywające energię na drodze fermentacji uzyskano poprzez wykorzystanie mutantów oddechowych *rho-*, pozbawionych funkcjonalnych mitochondriów czyli niezdolnych do oddychania tlenowego. Rolę systemu antyoksydacyjnego oraz odpowiedzi na stres w procesie chronologicznego starzenia się komórek drożdży zbadano wykorzystując komórki mutantu $\Delta sod1$, pozbawionego aktywności cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej oraz mutantu $\Delta msn2msn4$, pozbawionego czynników transkrypcyjnych włączających odpowiedź na stres środowiskowy

Materialy i metody

Szczep drożdży i jego charakterystyka	Warunki hodowli
Wpływ mutacji prowadzących do obniżenia sprawności systemu antyoksydacyjnego na chronologiczną długość życia	
SP4 (wt), szczep dziki	pożywka YPG (pepton -1%, ekstrakt drożdżowy-1%, glicerol-2%)
DSCD1-1C(<i>sod1</i>), mutant pozbawiony aktywności cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej	
Wpływ mutacji znoszącej odpowiedź na stres środowiskowy na chronologiczną długość życia	
BY4741 (wt), szczep dziki	pożywka YPG (pepton -1%, ekstrakt drożdżowy-1%, glicerol-2%)
$\Delta msn2msn4$, mutant pozbawiony aktywności czynników transkrypcyjnych Msn2 i Msn4, włączających odpowiedź na stres środowiskowy	
Wpływ mutacji oddechowych (<i>rho-</i>), prowadzących do braku możliwości oddychania tlenowego na chronologiczną długość życia	
SP4 (wt) - SP4 <i>rho-</i>	pożywka YPD (pepton -1%, ekstrakt drożdżowy-1%, glukoza-2%)
DSCD1-1C (<i>sod1</i>) - DSCD1-1C <i>rho-</i>	
BY4741 (wt) - BY4741 <i>rho-</i>	
$\Delta msn2msn4$ - $\Delta msn2msn4$ <i>rho-</i>	



Długość życia komórek drożdży oznaczano analizując gęstość hodowli okresowych czyli ich liczebność w zależności od czasu jej trwania. Liczebność hodowli oznaczano metodą płytkową, poprzez wysiew zawiesiny komórek pobranych z hodowli okresowych z odpowiedniego rozcieńczenia na pożywkę stałą YPD. Zdolność komórek do proliferacji i wytworzenia kolonii w tych warunkach była podstawą do określenia ich liczebności. Dodatkowo żywotność komórek w hodowlach oceniano na podstawie liczby komórek wybarwionych (martwych) i niewybarwionych (żywych) błękitem metylenowym zaobserwowanych w preparacie przyżyciowym, natomiast kondycję metaboliczną za pomocą barwienia live-dead (Yeast Viability Kit, Invitrogen)

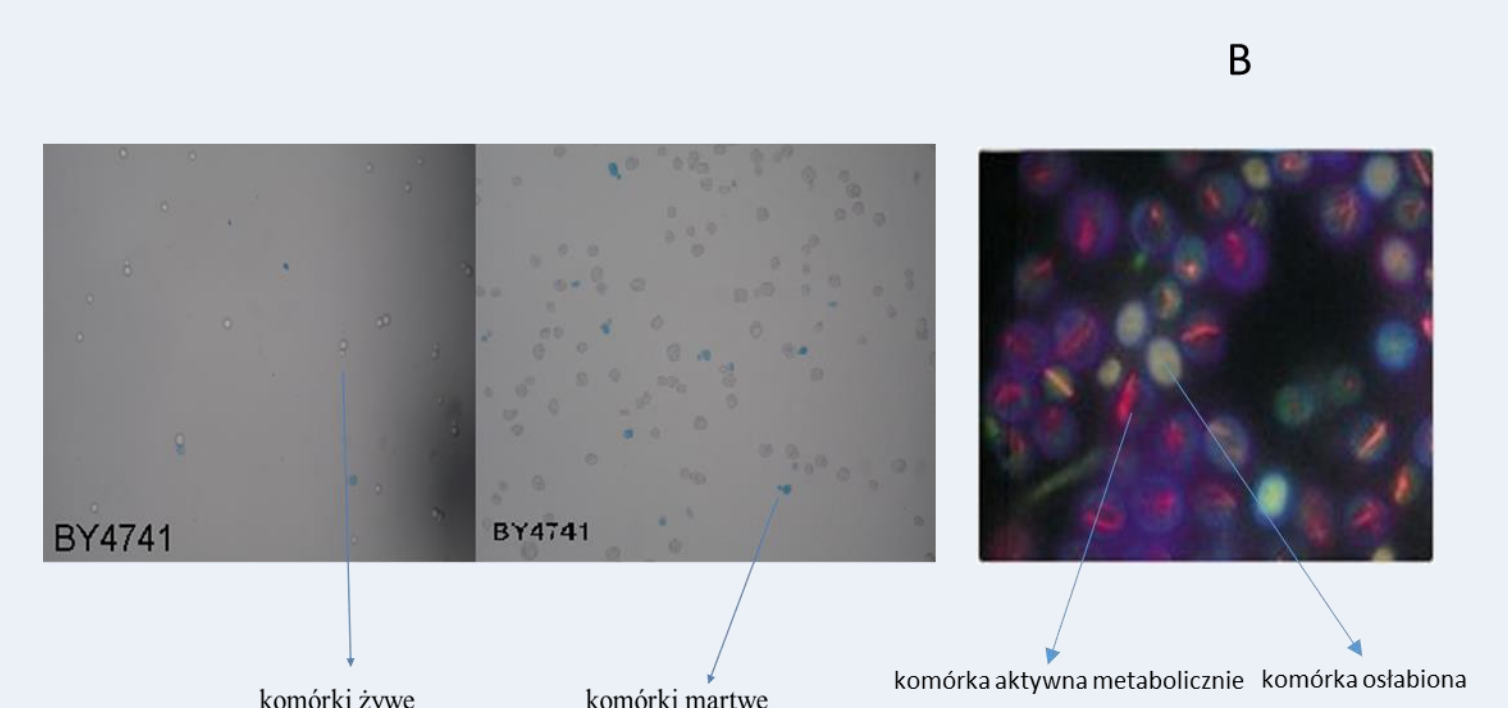


Wyniki

Tab.1 Maksymalna długość życia komórek drożdży różnych szczepów hodowanych w różnych warunkach eksperymentalnych

Charakterystyka szczepów drożdży <i>S. cerevisiae</i> i warunki hodowli	Maksymalna długość życia [dni]
SP4 (wt, <i>rho-</i>), YPD	24
DSCD1-1C (<i>sod1</i> , <i>rho-</i>), YPD	24
BY4741 (wt, <i>rho-</i>), YPD	3
$\Delta msn2msn4$, <i>rho-</i> , YPD	3
SP4 (wt), YPG	<45
DSCD1-1C (<i>sod1</i>) - YPG	<45
BY4741 (wt), YPG	<45
$\Delta msn2msn4$, YPG	31

Rys. 1 Preparaty przyżyciowe z hodowli młodych (3 dniowych) i starych (38 dniowych) szczepu dzikiego, barwione błękitem metylenowym (A), barwnikami Live-dead (B)



Wnioski

1. Maksymalny chronologiczny czas życia szczepów dzikich (SP4(wt) i BY4741(wt)), a także mutantu DSCD1-1C(*sod1*) hodowanych na pożywce YPG był dłuższy niż 45 dni
2. Maksymalny chronologiczny czas życia szczepu pozbawionego programu odpowiedzi na stres środowiskowy $\Delta msn2msn4$ na pożywce YPG wynosił 31 dni
3. Mutanty oddechowe tych szczepów charakteryzowały się skróceniem maksymalnej chronologicznej długości życia. Komórki szczepów BY4741*rho-*, $\Delta msn2msn4$ *rho-* żyły tylko do 3 dnia hodowli, natomiast mutanty SP4*rho-*, DSCD1-1C(*sod1*)*rho-* do 24 dnia hodowli
4. Komórki pochodzące ze starych, 38 dniowych hodowli stacjonarnych pomimo utraty zdolności do rozmnażania się nadal posiadały integralną błonę komórkową i były aktywne metabolicznie

Uzyskane wyniki wskazują, że intensywność chronologicznego starzenia drożdży z gatunku *S. cerevisiae* jest silnie uzależniona od metabolizmu energetycznego komórek drożdży oraz tła genetycznego użytych szczepów a w mniejszym stopniu od sprawności mechanizmów odpowiedzi na stres środowiskowy i oksydacyjny