БІОХІМІЯ

УДК 582.282.23+577.218+577.23+577.152.193

ПРЕАДАПТАЦІЯ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ПЕРОКСИДОМ ВОДНЮ ДО СТРЕСУ, СПРИЧИНЕНОГО ОЦТОВОЮ КИСЛОТОЮ

Данилюк О. В., Кангіна Т. О., Семчишин Г. М.
Кафедра біохімії, Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника

Досліджено преадаптацію дріжджів S. cerevisiae пероксидом водню до стресу, спричиненого оцтовою кислотою. Сублетальні концентрації H_2O_2 підвищували стійкість клітин дріжджів до дії летальних концентрацій оцтової кислоти. Виявлено, що білки War1 та Yap1 відповідають за резистентність дріжджів до дії стресу, індукованого оцтовою кислотою.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae, виживання, пероксид водню, каталаза, супероксиддисмутаза, кислотний стрес.*

Danyliuk O. V., Kanhina T. O., Semchyshyn G. M. **Preadaptation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by hydrogen peroxide to stress induced by acetic acid.** *Preadaptation of the yeasts S. cerevisiae by hydrogen peroxide to acetic acid-induced stress has been studied. Sublethal concentrations of hydrogen peroxide increased the resistance of the yeast cells to lethal doses of acetic acid. It was found that proteins War1 and Yap1 are responsible for yeast survival under stress induced by acetic acid.*

Key words: *Saccharomyces cerevisiae, survival, hydrogen peroxide, catalase, superoxide dismutase, acid stress.*

Вступ

Слабкі органічні кислоти (СОК) зокрема бензойна, сорбінова та оцтова, широко використовуються як консерванти харчових продуктів та напоїв. В середовищі з низькими значеннями pH оцтова кислота (pK_a 4,75) знаходиться в недисоційованому стані, а отже може вільно проникати всередину клітини [13]. В клітині, де pH є близьким до нейтрального, молекули CH_3COOH дисоціюють на протони і аніони. Збільшення концентрації протонів часто призводить до пригнічення багатьох метаболічних процесів [13]. Акумуляція аніонів в клітині за аеробних умов може збільшувати інтенсивність генерації вільних радикалів, тобто призводити до розвитку оксидативного стресу [13]. Відомо, що антиоксидантні ферменти відіграють важливу роль у захисті дріжджів від оцтової кислоти [7].

Існує припущення, що активовані форми кисню в невеликих кількостях можуть слугувати медіаторами для попередження загибелі клітини внаслідок дії СОК [7]. Дріжджі *S. cerevisiae* мають систему захисту від дії СОК, яка спрямована на зниження акумуляції цих кислот всередині клітини [11].

Дріжджі *S. cerevisiae*, як і інші мікроорганізми, здатні до адаптивних змін у відповідь на дію багатьох чинників, зокрема тих, які зумовлюють оксидативний стрес [2]. Відомо, що сублетальні концентрації пероксиду водню або сполук, які генерують супероксид-аніон, збільшують стійкість клітин дріжджів до летальних доз цих оксидантів за рахунок індукції захисних ферментів [2].

Метою даної роботи було дослідити вплив преадаптації дріжджів *S. cerevisiae* сублетальними концентраціями H_2O_2 до стресу, індукованого оцтовою кислотою.

Матеріали і методи

В дослідженнях використовували штами *S. cerevisiae*: YPH250 (дикий тип, *MATa trp1-Δ1 his3-Δ200 lys2-801 leu2-Δ1 ade2-101 ura3-52*) та його ізогенні похідні: дефектний за двома ізоформами каталази *ΔCTT1ΔCTA1* (YPH250 *ctt1::URA3 cta1::TRP1*) та дефектний за двома ізоформами супероксиддисмутази (СОД) *ΔSOD1ΔSOD2* (YPH250 *Δsod1:: can1 Δsod2:: can1*), ΔYAP1 (*MATa trp1-Δ1 his3-Δ200 lys2-801 leu2-Δ1 ade2-101 ura3-52 yap1Δ::His3*), надані Dr. Inoue (Кіотський університет, Японія); а також W303-1A (дикий тип, *MATa ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100*) і його ізогенний похідний *ΔWAR1*, дефектний за транскрипційним фактором War1 (W303-1A *war1Δ::HIS3*), надані Dr. K. Kuchler (Віденський університет, Австрія).

В роботі використовували реактиви: дріжджовий екстракт ("Микроген", Махачкала, Росія), N,N,N',N' – тетраметилетилендиамін (ТЕМЕД) ("Reanal", Угорщина), фенілметилсульфонілфторид ("Sigma Chemical Co", США). Решта реактивів вітчизняного виробництва класу не нижче ч.д.а.

Дріжджі вирощували в живильному середовищі, яке містило 2% глюкози, 2% пептону і 1% дріжджового екстракту. Посівний матеріал вирощували протягом 24 годин в умовах аерації при температурі 28°С. Для

досліджень відповідний об'єм інокуляту вносили в стерильне середовище такого ж складу з розрахунком початкової кількості клітин – 10^6 кл/мл і вирощували на шейкері (120 коливань за хвилину) при 28°С до досягнення ранньої стаціонарної фази росту.

Для вивчення впливу преадаптації *S. cerevisiae* до кислотного стресу, індукованого оцтовою кислотою, клітини дріжджів попередньо інкубували з 0,05 мМ, 0,1 мМ, 0,25 мМ та 0,5 мМ H_2O_2 протягом 30 хв. Після цього до суспензії дріжджів додавали 200 мМ CH_3COOH та інкубували при температурі 28°С, в середовищі з pH 3,0 протягом 2 годин [1]. Закислення середовища здійснювали соляною кислотою. Як контроль використовували пробу, в якій була відсутня оцтова кислота.

Для підрахунку життєздатних клітин використовували метод серійних розведень [3]. Дріжджі висівали на агаризоване живильне середовище, інкубували при температурі 28°С протягом 72 годин.

Для визначення активності ферментів стрес викликали обробкою клітин 50 мМ, 100 мМ, 150 мМ та 200 мМ CH_3COOH за описаних вище умов. Як контроль використовували проби без CH_3COOH з pH 3,0 та 6,25 (останню не закислювали HCl). Після цього клітини збирали центрифугуванням при 3500 g протягом 5 хв. Осад промивали 50 мМ калій-фосфатним буфером (КФБ) (pH 7,0) і знову осаджували в тому ж режимі. Після цього ре суспендували в середовищі гомогенізації, яке містило 50 мМ КФБ (pH 7,0); 0,5 мМ ЕДТА; 1 мМ фенілметилсульфонілфториду та дезінтегрували на вортекс-міксері зі скляними кульками діаметром 450-500 мкм протягом дев'яти циклів, кожен з яких складався з 1 хв вібрації і 1 хв охолодження на льоду. Скляні кульки і незруйновані рештки осаджували при 13500 g протягом 20 хв.

Активність ферментів визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрах СФ-46 та SPEKOL 211.

Каталазну активність визначали, реєструючи зміну поглинання світла H_2O_2 при довжині хвилі 240 нм. Проба об'ємом 2 мл містила 50 мМ КФБ (pH 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 10 мМ пероксиду водню і 20 мкл супернатанту. Як контрольну використовували пробу, що містила усі перелічені компоненти, окрім пероксиду водню. Реакцію починали внесенням у кювету супернатанту. Для розрахунків використовували молярний коефіцієнт екстинкції для пероксиду водню 39,4 $M^{-1}см^{-1}$ [12].

Активність СОД визначали за ступенем інгібування реакції окислення кверцетину супероксид-аніоном при 406 нм у пробі об'ємом 1,5 мл. Суміш, в якій проводили реакцію, містила 30 мМ Тріс-HCl буферу (pH 9,0), 0,5 мМ ЕДТА, 0,8 мМ ТЕМЕД (N,N,N',N' – тетраметилетилендиамін), 0,08 мМ кверцетину та 1-50 мкл безклітинного екстракту. За одиницю активності СОД приймали таку кількість білка супернатанту, яка інгібувала швидкість реакції окислення кверцетину на 50% від максимальної. Даний показник розраховували за допомогою комп'ютерної програми "Kinetics" [5].

Активність ферментів нормували до кількості білка в пробі. Концентрацію білка в пробах визначали методом Бредфорда [4]. До 1 мл зразка, що містив не більше 50 мкг білка, додавали 1 мл розчину барвника кумасі яскраво-синього G-250 в 3% хлорній кислоті. Через 15--20 хв визначали поглинання світла при довжині хвилі 595 нм. Як стандарт використовували альбумін сироватки бика.

Дані представлено як середнє ± похибка середнього ($M \pm m$). Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали, використовуючи критерій Стьюдента.

Результати та обговорення

Живі організми здатні адаптовуватись до дії стресуючого фактору. Як уже згадувалося вище, сублетальні концентрації пероксиду водню підвищують стійкість клітин дріжджів *S. cerevisiae* до летальних концентрацій оксидантів [2].

Проте нічого не відомо про вплив преадаптації мікроорганізмів низькими дозами H_2O_2 до кислотного стресу. На рис. 1 і 2 показано вплив 200 мМ оцтової кислоти на виживання дріжджів *S. cerevisiae*. Як бачимо, виживання усіх досліджуваних штамів *S. cerevisiae* знижувалося під дією оцтової кислоти. Проте ефект залежав від штаму. Так, дріжджі штамів, дефектних за регуляторними білками War1 (*ΔWAR1*) і Yap1 (*ΔYAP1*) були приблизно в 10 раз чутливіші до дії оцтової кислоти порівняно з відповідними дикими штамами.

Попередня обробка суспензії дріжджів пероксидом водню у концентрації 0,1-0,25 мМ в 1,2-1,3 рази підвищувала виживання диких штамів *S. cerevisiae* (W303-1A і YPH250) і в 5,2-6,6 рази – штаму *ΔWAR1* та в 3,8-4 рази – штаму *ΔYAP1*. В інших роботах було показано, що обробка клітин дріжджів сублетальними концентраціями пероксиду водню суттєво підвищує стійкість клітин до дії летальних концентрацій H_2O_2 [9].

Таким чином можна зробити припущення про те, що дані білки беруть участь у забезпеченні резистентності дріжджів до оцтової кислоти. Білок War1 регулює індукцію транспортного білка Pdr12, координуючи адаптивну відповідь, направлену на виведення аніонів СОК з клітини [10]. Даний транскрипційний фактор локалізується в ядрі та є основним детермінантом стійкості до дії СОК у дріжджів *S. cerevisiae*. Оскільки клітини позбавлені War1p не здатні індукувати Pdr12 [10], то можна зробити висновок, що ABC-транспортер Pdr12 відіграє ключову роль у транспорті оцтової кислоти з клітини. Білок Yap1 регулює адаптивну відповідь, спрямовану на захист клітин від оксидативного стресу [14]. Під контролем цього транскрипційного фактора знаходиться експресія більше 70 генів, які задіяні у відповіді клітини на H_2O_2 стрес [14]. Серед них гени цитозольної і мітохондріальної СОД (*SOD1*, *SOD2*) та пероксисомної і цитозольної каталаз (*CTT1*, *CTA1*) [6]. Проте слід зауважити, що зростання активності ферментів не завжди пов'язане зі збільшенням транскрипції відповідних генів [2].

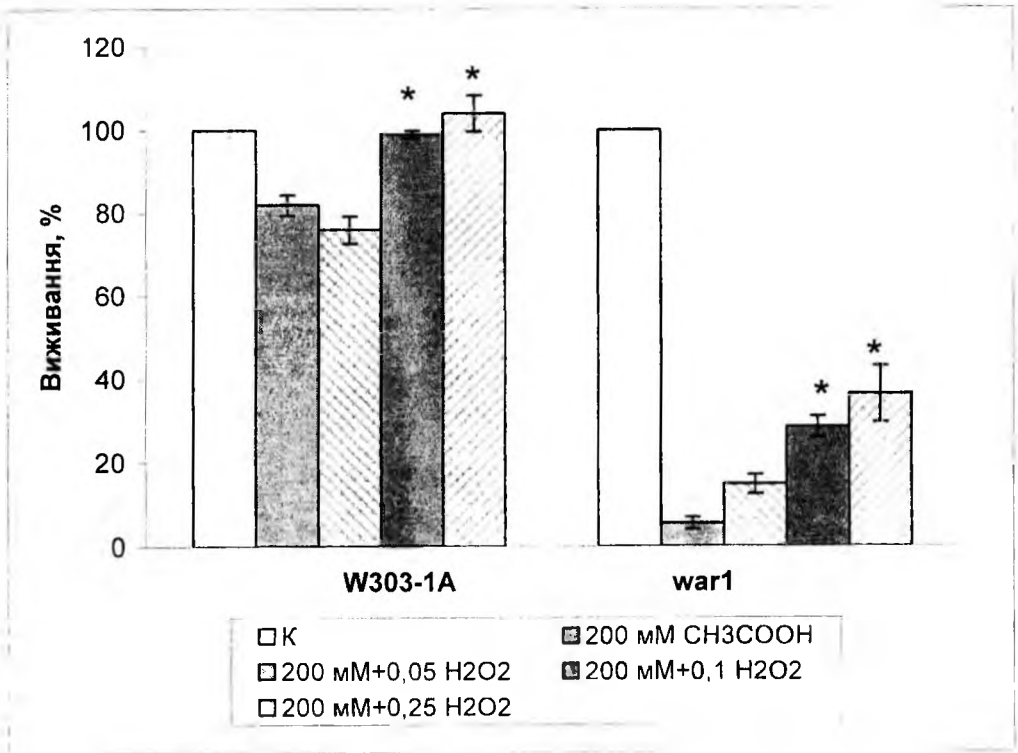

Рисунок 1. Вплив преадаптації H_2O_2 різних концентрації на виживання дріжджів *S. cerevisiae* W303-1A (дикий штам) і ΔWAR1 на ранній стаціонарній фазі росту за дії 200мМ оцтової кислоти. *Вірогідно відмінне від значення при дії 200 мМ CH_3COOH з $P < 0,001$, n=3-4

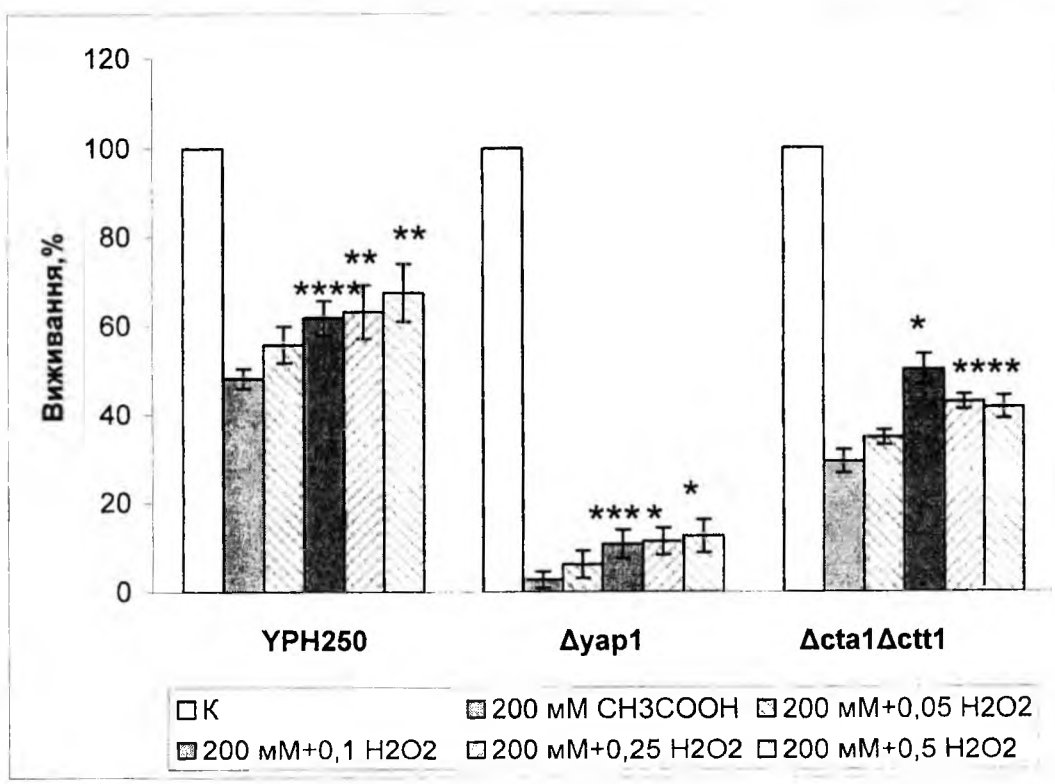

Рисунок 2. Вплив преадаптації H_2O_2 різних концентрації на виживання дріжджів *S. cerevisiae* YPH250 (дикий штам), ΔYAP1, ΔCTT1ΔCTA1 на ранній стаціонарній фазі росту за дії 200мМ оцтової кислоти.*Вірогідно відмінне від значення при дії 200 мМ CH_3COOH з $P < 0,005$; **P<0,025; ***P<0,05; ****P<0,01, n=4-6

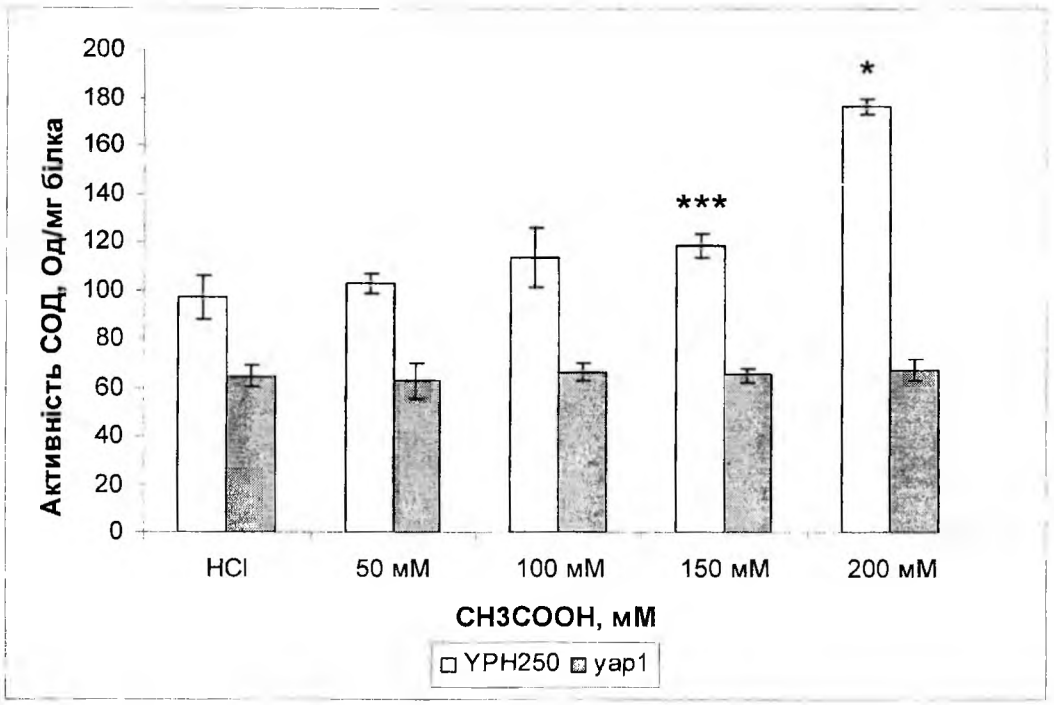

Рисунок 3. Вплив CH_3OOH різних концентрацій на активність СОД у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* YPH250 (дикий штам), та похідного від нього ΔYAP1 на ранній стаціонарній фазі росту. *Вірогідно відміне від відповідних контрольних значень (без ацетату) з $P < 0{,}001$** $P < 0{,}005$ та *** $P < 0{,}05$, n=3-4

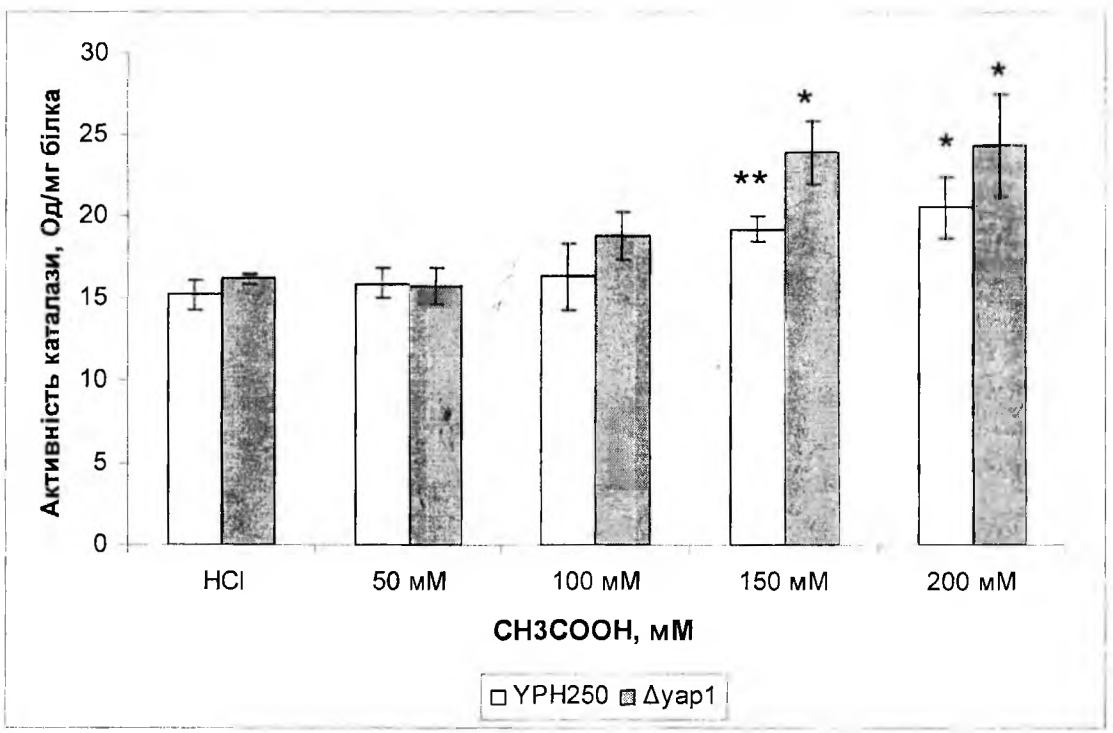

Рисунок 4. Вплив CH_3OOH різних концентрацій на активність каталази у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* YPH250 (дикий штам), та похідного від нього ΔYAP1 на ранній стаціонарній фазі росту. *Вірогідно відміне від відповідних контрольних значень (без ацетату) з $P < 0{,}001$** $P < 0{,}005$ та *** $P < 0{,}05$, n=3-4

Наступним етапом дослідження було вивчення впливу оцтової кислоти на активність антиоксидантних ферментів (Рис. 3, 4). Як бачимо, активність обох досліджуваних ферментів в клітинах дріжджів дикого штаму YPH250 зростала при дії 150-200 мМ CH_3COOH. При цьому активність СОД зросла в 1,2-1,8 рази (рис. 2) і каталази в 1,3-1,4 (рис. 3). Крім того, на Рис. 2 та 3 представлені результати впливу оцтової кислоти на

активність СОД і каталази в дріжджів штаму ізогенного до YPH250. але дефектного за регуляторним білком Yap1. На відміну від вихідного штаму, оцтова кислота не змінила активності СОД в клітинах штаму *ΔYAP1*. Отже, білок Yap1 є відповідальним за збільшення активності СОД в клітинах дикого штаму, підданих дії оцтової кислоти. Проте відсутність регуляторного білка Yap1 не впливає на активацію каталази оцтовою кислотою.

Висновки

War1 та Yap1 є відповідальними за життєздатність дріжджів за дії стресу, індукованого оцтовою кислотою. Показано, що обробка клітин дріжджів сублетальними концентраціями пероксиду водню суттєво підвищує стійкість клітин до дії летальних концентрацій оцтової кислоти. Таким чином, можна припустити що в адаптації *S. cerevisiae* до оцтової кислоти задіяні антиоксидантні системи. Підтвердженням цього може бути також той факт, що токсичний вплив CH_3COOH пов'язаний з продукцією як H_2O_2, так і O_2^- [8].

Література

1. *Абрат О.Б., Семчишин Г.М., Лущак В.І.* Кислотний стрес збільшує активність супероксиддисмутази і каталази у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* // Укр. Біохім. Журн. – 2007.- Т. 79, № 2. – С. 18-24.
2. *Байляк М.М., Семчишин Г.М., Лущак В.І.* Участь каталази і супероксиддисмутази у відповіді *Saccharomyces cerevisiae* н дію пероксиду водню в експоненційній фазі росту // Укр. Біохім. Журн. – 2006. – Т. 78, № 2. – С.79-85.
3. *Мейнел Дж., Мейнел Э.* Экспериментальная микробиология (теория и практика). М.: Мир, 1969. – 347 с.
4. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 289-292.
5. *Brooks S. P.* A simple computer program with statistical tests for the analysis of enzyme kinetics // Bio Techniques – 1992. – Vol. 13. – P. 906 - 911.
6. *Costa V., Moradas-Ferreira P.* Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases // Mol. Asp. Med. - 2001. - N 22. - P. 217-246.
7. *Giannattasio S., Guaragnella N., Corte-Real M., Passarella S., Marra E.* Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death // Gene. – 2005. – 354. – P. 93-98.
8. *Guaragnella N., Antonacci L., Passarella S., Marra E., Giannattasio S.* Hydrogen peroxide and superoxide anion production during acetic-induced yeast programmed cell death // Folia Micribiol. – 2007. – 52. – P. 237–240.
9. *Izawa S., Inoue Y., Kimura A.* Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae* // Biochem J. – 1996. – 320. – P. 61–67.
10. *Kren A., Mammun I.M., Bauer B.E., Schiller Chr., Wolfger H., Hatzixanthis K., Mollapour M., Gregori Chr., Piper P., Küchler K.* War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast // Molecular and Cellular Biology. - 2003. – N 23. - P. 1775 -1785.
11. *Ludovico P., Rodrigyes F., Almeida A., Silva M., Barrientos A., Corte-Real M.* Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* // Molecular Biology of the cell. 2002. 13. P. 2598-2606.
12. *Lushchak V., Semchyshun H., Lushchak O., Mandryk S.* Diethyldithiocarbamate inhibits *in vivo* Cu,Zn – superoxide dismutase and perturbs free radical processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. - Vol. 338. - P. 1739-1744.
13. *Piper P., Calderon C.O., Hatzixanthis K., Mollapour M.* Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives // Microbiology. 2001. 147. P. 2635-2642.
14. Toone W. M., Morgan B. A., Jones N. Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond // Oncogene. – 2001. – 20. – P. 2336–2346.

Стаття поступила до редакції 12.03.2008 р.; прийнята до друку 22.03.2008 р.