

Instytut Żywności i Żywienia 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.
II. Jony miedzi i manganu**

Neutralisation of Superoxide Dismutase Deficient Effects by Environment Changes
in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. II. Copper and Manganous Ions

Komórki mutantów nie posiadających CuZnSOD (scd) nie rosną na pełnym podłożu w atmosferze 100% tlenu, wykazują nadwrażliwość na parakwat, a także są metioninowymi i lizynowymi auktrofami podczas wzrostu w normalnej atmosferze (4). Szlaki biosyntezy obydwu aminokwasów zlokalizowane są w cytozolu komórek drożdży (9), miejscu występowania SOD1 (CuZnSOD). Badania nad przyczyną auktrofii wskazują, iż może to wynikać z zależnej od tlenu toksyczności siarczynów, produktu pośredniego w normalnej, redukcyjnej asymilacji siarczanów przez drożdże (8).

Wiadomo również, że jony metali grup przejściowych, wchodzące w skład centrów aktywnych dysmutaz ponadtlenkowych w postaci wolnej lub skompleksowanej, *in vitro* dysmutują rodniki ponadtlenkowe (6). Wobec tego postanowiono sprawdzić, czy podobnie jak w *Lactobacillus plantarum*, akumulującym Mn(II) (2), jony tego metalu mogą symulować funkcję ochronną dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach mutantów pozbawionych dysmutazy ponadtlenkowej. Interesujące również może być sprawdzenie, jaki jest udział jonów Cu(II) w podobnych efektach.

MATERIAŁY I METODY

Do badań użyto komórek szczepu standardowego SP-4, komórek mutantów nie posiadających CuZnSOD (scd1, scd2), mutantu pozbawionego MnSOD (MnSOD1), bezkatalazowego (A-50) i bezdysmutazowego (scd1MnSOD⁻). Genotypy oraz pochodzenie wykorzystanych w tej pracy szczepów drożdżowych zestawiono w tab. 1.

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

Szczep Strain	Genotyp Genotype	Pochodzenie Origin
SP-4	α leu1 arg4	Zakład Genetyki Ogólnej IBB PAN w Warszawie
A-50	a leu1 arg4 cta1-9 ctt1-1	Zakład Genetyki Ogólnej IBB PAN w Warszawie
MnSOD1	α his3-11, 3-15, ura 3-251, 3-372, 3-328	A.P. van Loon, G. Schatz Szwajcaria
DSCD1-1C	a leu1 arg4 scd1-1	Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu
172	a leu1 arg4 cta1-9 ctt1-1	Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu
DSCD6-6B	α ura3 MnSOD ⁻ scd1	Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu
R1-6B	α ura3 MnSOD ⁻ SCD1+	Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu

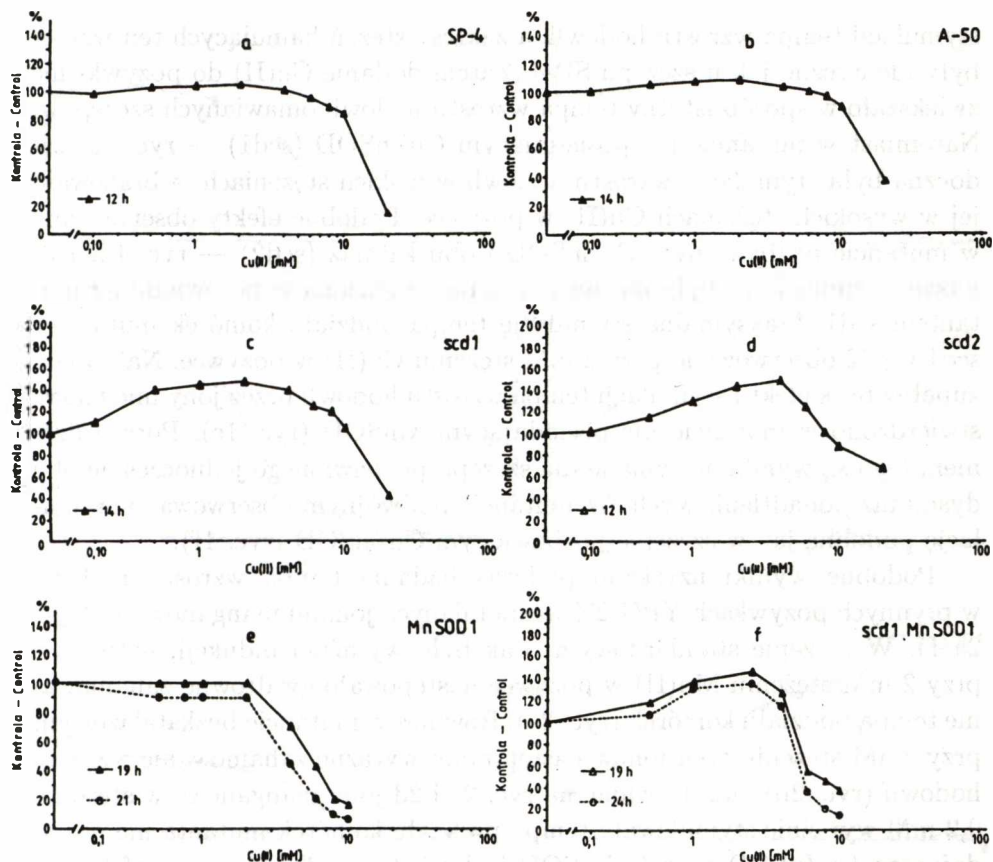
Badanie tempa wzrostu hodowli. Drożdże hodowano w płynnych pożywkach YPG-2% (ekstrakt drożdżowy 1%, pepton 1%, glukoza 2%) o *pH* 5,5 uzupełnianych różnymi stężeniami wodnych roztworów Cu(II) i Mn(II). Wykładnikiem tempa podziału komórek były zmiany absorpcji hodowli mierzone przy fali o długości 550 nm. Interpretując graficznie uzyskane wyniki, absorpcję próby kontrolnej przedstawiono jako 100%, natomiast prób badanych przeliczano w następujący sposób:

$$\% \text{ kontroli} = A_{550B} / A_{550K} \times 100\%$$

gdzie A_{550B} oznacza absorpcję próby badanej, A_{550K} — absorpcję próby kontrolnej.

Wyniki badań przedstawiono w postaci wykresów ilustrujących zależność tempa wzrostu badanych hodowli w stosunku do kontroli, w funkcji stężeń Cu(II) lub Mn(II) i czasu. Każdorazowo pożywki szczepiono świeżym 18-20-godzinnym inokulum.

Stres oksydacyjny. Do płynnej pożywki YPG-2% o *pH* 5,5 dodawano określone ilości standardowego roztworu parakwatu (PQ) w YPG-2% o *pH* 5,5 i stężeniu substancji czynnej 1 mg/ml (4×10^{-3} M). Próby kontrolne zawierały parakwat. Do prób badanych oprócz PQ dodawano wodne roztwory Mn(II) lub Cu(II) w stężeniach końcowych odpowiednio 0,2 i 2 mM. Badania prowadzono przez dwie doby od chwili zainokulowania pożywek. Wykonywano pomiary absorpcji przy fali o długości 550 nm wobec odpowiednich prób kontrolnych, a następnie z krzywej wzorcowej odczytywano ilość suchej masy drożdży wyrażoną w miligramach w przeliczeniu na 1 ml hodowli. Wyniki przedstawiono w formie wykresów ilustrujących zmiany ilości suchej masy komórek jako funkcję czasu.



Ryc. 1. Badanie wpływu różnych stężeń jonów Cu(II) na wzrost komórek szczepu standardowego (a) oraz mutantów A-50 (b), scd1 (c), scd2 (d), MnSOD1 (e), scd1MnSOD1 (f). Gęstość optyczną testowanych hodowli przedstawiono jako procent absorpcji odpowiednich prób kontrolnych. Przedstawione dane są wartościami średnimi z dwóch powtórzeń

Effect of different Cu(II) ion concentrations on the growth rate of standard strain (a) and mutant cells; A-5 (b), scd1 (c), scd2 (d), MnSOD1 (e), scd1MnSOD1 (f). Optical density of tested cultures is calculated as % of control samples extinction. Presented data are arithmetic means of two parallel experiments

WYNIKI

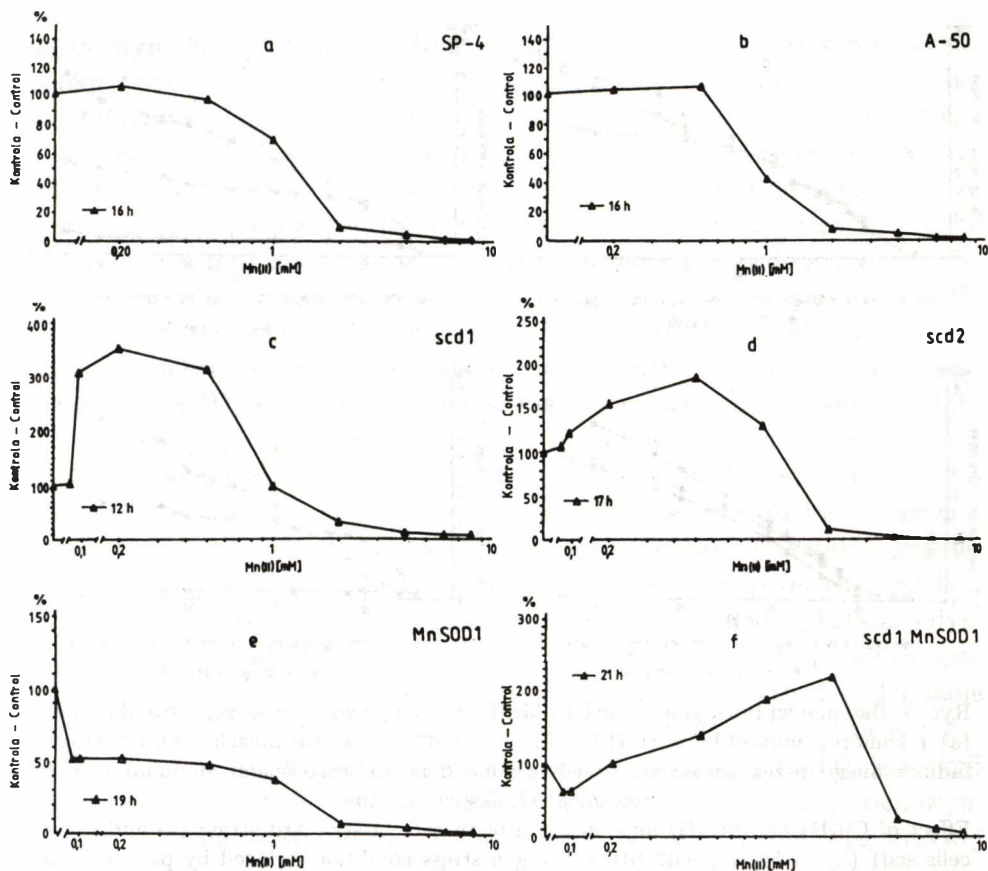
Jony miedzi w stężeniu 0,5–10 mM tylko w nieznacznym stopniu stymulowały tempo wzrostu komórek szczepu standardowego SP-4 (maksymalnie ok. 10% przy 2 mM Cu(II)). Natomiast obserwowano wyraźny efekt obniżania szybkości podziału komórek powyżej 10 mM Cu(II), nastąpiło bowiem gwałtowne obniżenie krzywej (ryc. 1a). Podobne wyniki uzyskano dla mutantu pozbawionego obu katalaz (A-50) — ryc. 1b. Nie obserwowano istotnej

stymulacji tempa wzrostu hodowli, a zakresy stężeń hamujących ten wzrost były identyczne jak u szczepu SP-4. Zatem dodanie Cu(II) do pożywki nie zwiększało w sposób istotny tempa wzrostu hodowli omawianych szczepów. Natomiast w mutancie nie posiadającym CuZnSOD (*scd1*) — ryc. 1c, widoczna była stymulacja wzrostu hodowli w niskich stężeniach, a brakowało jej w wysokich stężeniach Cu(II) w pożywce. Podobne efekty obserwowano w mutancie pozbawionym CuZnSOD i obu katalaz (*scd2*) — ryc. 1d, jednakże stymulacja ta była nieznacznie lepiej wyrażona w porównaniu z mutantem *scd1*. Maksymalną stymulację tempa podziału komórek mutantów *scd1* i *scd2* obserwowano przy 2 mM stężeniu Cu(II) w pożywce. Natomiast zupełny brak efektu stymulacji tempa wzrostu hodowli przez jony miedziowe stwierdzono w mutancie nie posiadającym MnSOD (ryc. 1e). Potwierdzeniem tego są wyniki otrzymane dla szczepu pozbawionego jednocześnie obu dysmutaz ponadtlenkowych. W mutancie podwójnym obserwowano stymulację podobną jak w szczepie pozbawionym CuZnSOD (ryc. 1f).

Podobne wyniki uzyskano podczas badania tempa wzrostu hodowli w płynnych pożywkach YPG-2% uzupełnianych jonami manganowymi (ryc. 2a-f). W szczepie standardowym brak było wyraźnej indukcji, natomiast przy 2 mM stężeniu Mn(II) w pożywce następowało gwałtowne zahamowanie tempa podziału komórek (ryc. 2a). Również w mutancie bezkatalazowym przy 2mM stężeniu tych jonów następowało wyraźne zahamowanie wzrostu hodowli (ryc. 2b). Jak to widać na ryc. 2c i 2d jony manganowe w stężeniu 0,2 mM wyraźnie stymulowały tempo podziału komórek mutantu nie posiadającego CuZnSOD oraz CuZnSOD i obu katalaz. Jednocześnie efekt ten był lepiej wyrażony w pojedynczym mutancie, gdyż gęstość hodowli przy 0,2 mM stężeniu Mn(II) była o ok. 250% wyższa niż w próbie kontrolnej, a w mutancie *scd2* — o 80%. Wyraźne hamowanie obserwowano, podobnie jak w mutancie A-50 i szczepie standardowym, przy 2 mM stężeniu jonów manganowych w pożywce. Natomiast w mutancie nie posiadającym MnSOD (*MnSOD1*) nie stwierdzono stymulacji (ryc. 2e), podczas gdy w mutancie bezdysmutazowym (*scd1MnSOD1*) była ona silnie wyrażona przy 2 mM stężeniu Mn(II) w pożywce (ryc. 2f). Kontrolą dla tych wyników były dane uzyskane dla rewertanta szczepu *scd1* (R1-6B), w którym nie stwierdzono stymulacji tempa wzrostu hodowli w obecności Mn(II).

Skoro jony Cu(II) i Mn(II) przyspieszają tempo podziału komórek mutantów nie posiadających CuZnSOD, to nasuwa się pytanie, czy proces ten może polegać na symulowaniu przez nie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej?

Aby wyjaśnić to zagadnienie, komórki badanych szczepów poddano stresowi tlenowemu powodującemu swoiste podniesienie poziomu rodników

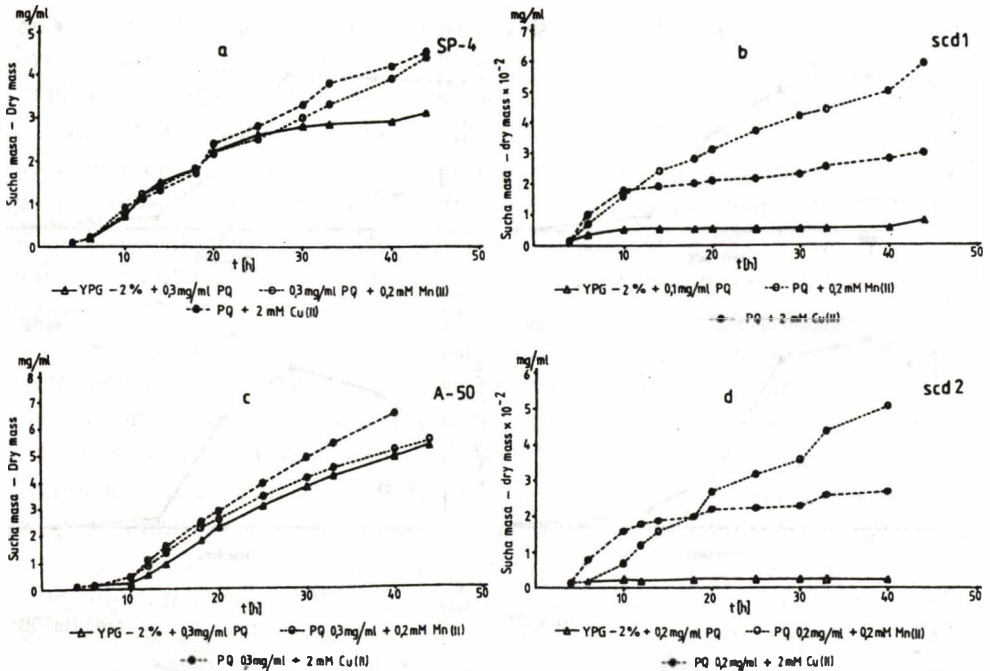


Ryc. 2. Badanie wpływu różnych stężeń jonów Mn(II) na tempo wzrostu szczepu standardowego (a) oraz komórek mutantów A-50 (b), scd1 (c), scd2 (d), MnSOD1 (e), scd1MnSOD1 (f). Gęstość optyczną testowanych hodowli przedstawiono jako procent absorpcji odpowiednich prób kontrolnych. Przedstawione dane są wartościami średnimi z dwóch powtórzeń

Effect of different Mn(II) ion concentrations on the growth rate of standard strain (a) and mutant cells; A-50 (b), scd1 (c), scd2 (d), MnSOD1 (e), scd1MnSOD1 (f). Optical density of tested cultures is calculated as % of control samples extinction. Presented data are arithmetic means of two parallel experiments

ponadtlenkowych. Osiągnięto to poprzez podawanie parakwatu do pożywki. Próby badane hodowano w płynnych pożywkach YPG 2% zawierających PQ oraz Cu(II) lub Mn(II), próby kontrolne natomiast w płynnych pożywkach zawierających tylko PQ.

Jak widać to na ryc. 3a i 3c, parakwat nie wywierał istotnego wpływu na tempo wzrostu szczepu standardowego i mutantu bezkatalazowego, podobnie jak suplementacja pożywek jonami Cu(II) i Mn(II). Mutanty nie posiadające CuZnSOD, bardzo wrażliwe na PQ (4), nie wykazywały wzro-



Ryc. 3. Badanie wpływu jonów Cu(II) i Mn(II) na tempo wzrostu szczepu standardowego (a) i komórek mutantów scd1 (b), A-50 (c), scd2 (d) w warunkach stresu tlenowego indukowanego przez parakwat. Przedstawione dane są wartościami średnimi z dwóch równoległych eksperymentów

Effect of Cu(II) and Mn(II) ions on the growth rate of standard strain (a) and mutant cells scd1 (b), A-50 (c), scd2 (d), in oxygen stress condition induced by paraquat. Dry matter/ml of cultures measured in time intervals given in each figure indicates the growth rate. Presented data are arithmetic means of two parallel experiments

stu w jego obecności. Jednakże dodanie jonów Cu(II) lub Mn(II) umożliwiło wzrost mutantów scd1 i scd2 w pożywce zawierającej parakwat (ryc. 3b i 3d). Bezpośrednio po zakończeniu eksperymentów wykonano posiewy kontrolne na podłoża różnicujące w celu określenia efektów mutagennych akumulacji jonów manganowych, jak również częstości mutacji rho- w badanych drożdżach. Wynika z nich, że częstość mitochondrialnie dziedzicznych mutacji odpornościowych na erytromycynę zwiększała się jedynie powyżej stężenia optymalnego dla wzrostu mutantów, natomiast częstość mutacji rho- zwiększała się po dodaniu zarówno Mn(II), jak i Cu(II) (5, 10).

DYSKUSJA

Z przedstawionych badań wynika, że wzbogacanie środowiska komórek mutantów nie posiadających CuZnSOD jonami manganowymi i miedzi-

wymi stymuluje ich tempo podziału, a także umożliwia wzrost w warunkach szoku tlenowego, indukowanego przez parakwat. Wspomniany wcześniej *Lactobacillus plantarum* akumuluje jony manganowe w warunkach stresu tlenowego (1, 2). Jony te są prawdopodobnie przyłączane przez wysokocząsteczkowe ligandy polifosforano-białkowe (7). Można więc przypuszczać, że jest to swoisty mechanizm zastępowania aktywności SOD przez nieswoiste organiczne kompleksy manganu wewnątrz komórki. Prawdopodobnie osiągnięto ten sam efekt przez podawanie komórce drożdżowej Mn(II) i Cu(II) w ilościach znacznie przewyższających ich zawartość w podłożu mineralnym. W efekcie obserwowano wzrost tempa podziału mutantów pozbawionych CuZnSOD, choć tylko w wąskim zakresie stężeń jonów obydwu metali. Nie obserwuje się natomiast stymulującego wpływu tych metali na komórki mutanta nie posiadającego MnSOD. Interesujący jest również fakt, że w porównaniu ze szczepem standardowym nie obserwowano różnic we wrażliwości na Cu(II) i Mn(II) szczepów pozbawionych aktywności katalaz. Inaczej mówiąc, stopień zahamowania wzrostu różnych szczepów przez jony obydwu metali nie zależy od możliwości syntetyzowania przez komórkę katalaz i dysmutaz ponadtlenkowych, gdyż krzywe wzrostowe opadają w podobny sposób we wszystkich badanych szczepach. Sugeruje to, że toksyczne działanie jonów metali nie dotyczy efektów przypisywanych reakcji Fentona w przypadku miedzi ani też tworzenia wysoce reaktywnej formy MnO_2^+ w reakcji O_2^- z Mn(II) (3). Gdyby reakcje te były istotne w metabolizmie tlenowym komórki, to nie obserwowano by stymulacji wzrostu, a przebieg krzywej zahamowania wzrostu byłby odmienny w szczepie dzikim w porównaniu z mutantami SOD^- i CAT^- . Natomiast brak stymulującego wpływu jonów manganowych i miedziowych na komórki mutanta $MnSOD^-$ może być wynikiem precyzyjnej kontroli transportu metali przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, co w konsekwencji nie dopuszcza do nagromadzenia ich w dostatecznych ilościach wewnątrz mitochondriów. Należy rozważyć również inną możliwość, jeśli nawet jony te penetrują błony mitochondrialne, to nie ma w matriks związków wydajnie kompleksujących je w sposób symulujący aktywność dysmutazową.

Jedynie miedź może być swoiście wiązana w cytoplazmie komórek drożdży przez cząsteczki metalotionein (MT). Ponadto wiadomo, że w warunkach stresu miedziowego indukowana jest wzmożona synteza CuMT, które wykazują właściwość usuwania rodników ponadtlenkowych (11). Jednakże aktywność dysmutazowa tych cząsteczek jest zbyt niska, aby one mogły przejmować funkcję natywnego enzymu. W świetle tych rozważań, przedstawione wyniki sugerują symulowanie aktywności SOD *in vivo* przez nieswoiste lub dotychczas nie odkryte kompleksy metali o wysokiej aktywności dysmuta-

wania rodników ponadtlenkowych. Do tych samych konkluzji, lecz nieco później, doszli między innymi Chang i Kosman (7).

WNIOSEK

Skutki braku cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej (cytozolowej) mogą być częściowo zneutralizowane przez wprowadzanie do środowiska komórek mutantów jonów miedzi i manganu. Jony te prawdopodobnie pełnią we wnętrzu komórki rolę zastępczych dysmutaz w postaci kompleksów ze składnikami komórki.

*

Pani mgr J. Litwińskiej-Bilińskiej serdecznie dziękuję za przygotowanie i selekcję genetyczną wykorzystanego przeze mnie materiału, jak również za wykonanie testów na oporność erytromycynową i częstość mutacji rho- w analizowanych mutantach.

* *

Prezentowane badania zostały wykonane w ramach CPBR PAN Nr 3.13 i zamieszczone w pracy doktorskiej pierwszego autora.

PIŚMIENNICTWO

1. Archibald F. S., Fridovich I.: Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. J. Bacteriol. **145**, 442–451 (1981).
2. Archibald F. S., Fridovich I.: Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. J. Bacteriol. **146**, 928–936 (1981).
3. Bielski B. H. J., Chan P. C.: Products of reactions of superoxide and hydroxyl radicals with Mn^{2+} cation. J. Am. Chem. Soc. **100**, 1920–1921 (1978).
4. 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).
5. Biliński T., Liczmański A.: Simulation of SOD Activity by Manganese and Copper Salts *in vivo*. [w:] UCLA Symposia on Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology. Park City, Utah 1988. J. Cell. Biochem., Supp. **12A**, 43 (1988).
6. Bull Ch., McClune G. J., Fee J. A.: The mechanism of Fe-EDTA catalyzed superoxide dismutation. J. Amer. Chem. Soc. **105**, 5290–5301 (1983).
7. Chang E. C., Kosman D. J.: Intracellular Mn(II)-associated superoxide scavenging activity protects Cu, Zn superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* against dioxygen stress. J. Biol. Chem. **264**, 12172–12178 (1989).
8. Chang E. C., Kosman D. J.: O_2^- dependent methionine auxotrophy in Cu, Zn superoxide dismutase — deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. **172**, 1840–1845 (1990).

9. Jones E. W., Fink G. R.: The Regulation of Amino Acid and Nucleotide Biosynthesis in Yeast. [w:] The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* — Metabolism and Gene Expression. Red. Strather J. N., Jones E. W., Broach J. R., Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 1982, ss. 181-299.
10. Liczmański A., Biliński T.: Znoszenie efektów braku dysmutazy ponadtlenkowej przez jony miedzi i manganu *in vivo*. [w:] XXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok — wrzesień 1987, Streszczenia, ss. 303-304.
11. Tamar K. T., Gralla E. B., Ellerby L. M., Valentine J. S., Thiele D. J.: Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 8013-8017 (1993).

SUMMARY

Metal ions of transition groups, which are part of active sites of superoxide dismutases, in their free or complex form, dismutate superoxide radicals (6). Therefore, we meant to demonstrate if the introduction of copper and manganese ions to dismutaseless environment of yeast mutants can stimulate SOD neutralizing function. It would also be interesting to see what part is played by these ions in oxygen stress conditions induced by paraquat (PQ). *Scd1* and *scd2* mutants are known to be hypersensitive to PQ and do not grow in its presence (4). The experiments were conducted in liquid YPG-2% media with *pH* 5.5, supplemented with various Cu(II), Mn(II) concentrations, and PQ. The cell growth rate was evaluated by measuring optical density of the culture at 550 nm wavelength and was presented as percentage of control samples or as dry matter increase in 1 ml. Copper ions concentrated at 0.5^{-6} M insignificantly stimulated the growth rate of a wild strain (SP-4) and a catalaseless mutant (A-50). Above 10 mM concentration of Cu in the medium, the growth rate falls down abruptly. However, *scd1* and *scd2* mutants show a culture growth stimulation in low concentrations (optimally 2 mM), and no stimulation at all in highly concentrated environments.

No stimulation effect by Cu(II) ions was observed in MnSOD1 mutant. Similar results were obtained with cultures supplemented with Mn(II) ions. At 2 mM concentration of Mn(II), an abrupt inhibition of the growth rate of cells occurs in the medium. Mn(II) ions concentrated at 0.2 mM stimulate significantly the growth rate of *scd* mutants. This effect is best expressed in *scd1*, because the culture density is about 250% higher than that of the control sample, and that of *scd2* is about 80% higher. In MnSOD1 mutant no stimulation effect is observed, whereas in the double mutant (*scd1*MnSOD1) it is strongly expressed at 2 mM concentration of Mn(II) in the medium. Paraquat does not influence greatly the growth rate of SP-4 and A-50 strains, nor does an additional supplementation of Cu(II) and Mn(II) ions. However, the addition of these ions to the medium containing PQ enables the *scd* mutant growth. The presented data suggest that supplementing mutant cell environments lacking CuZnSOD by Cu(II) and Mn(II) ions stimulates their growth rate, and enables their growth in condition of oxygen stress induced by PQ. *Lactobacillus plantanum* accumulates manganese ions under oxygen stress (1, 2). These ions seem to be bonded to high molecular weight polyphosphate-protein ligands (7). It may be assumed then, that it is a specific mechanism of mimicking SOD activity by unspecific organic complexes inside the cell.

Most likely, the same effect may be achieved by supplementing a yeast cell with Mn(II) and Cu(II) in such quantities which exceed their natural occurrence in the mineral base. As an effect, an accelerated growth rate was observed of mutants lacking CuZnSOD, though

only in a narrow range of concentration of both metals. It is interesting to note that no difference was seen in sensitivity to Cu(II) and Mn(II) on the part of the strains lacking catalases. In other words, the inhibition rate of various strains by ions of the two metals does not depend on the cells' ability to produce catalases and superoxide dismutases, since the growth rate curves fall down in a similar way in all tested strains. It suggests that the toxic activity of metal ions does not involve the effect caused by Fenton reaction in case of copper, nor the production of highly reactive form of MnO_2^+ , in the reaction of O_2^- with Mn(II) (3). If these reactions were significant in the oxygen metabolism, no growth stimulation would be observed, and the course of the inhibition curve would be different in the wild strain when compared to CAT^- and SOD^- mutants. The absence of stimulation effect of Mn(II) and Cu(II) ions on MnSOD^- may be a result of precise control of chemical transportation through mitochondrial inner-membrane, which does not lead to their sufficient accumulation inside the mitochondria. One more possibility needs to be taken into consideration, even though such ions can penetrate mitochondrial membranes. There may be no compounding complexes present in the matrix to simulate dismutase activity effectively. Only copper can be specifically bonded in the yeast cell's cytoplasm by metallothioneins (MT). It is also known that copper stress conditions induce intense CuMT synthesis, whose products have the property of superoxide radicals reduction (11). However, the dismutase activity of these molecules is too low to take over the function of a native enzyme. In view of the considerations, the test results suggest that SOD activity *in vivo* is simulated by unspecific or unknown metal complexes of high superoxide dismutase activity. The same conclusions, though at a later date, were reached by Chang and Kosman (7).