

Biochemické vlastnosti kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* so zníženým obsahom fosfatidylserínu

Y. GBELSKÁ—L. KOVÁČ—J. ŠUBÍK

Súhrn. Predmetom štúdia bol jadrový mutant kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* auxotrofný na cholín. Po raste bez cholínu bunky mutanta mali znížený obsah fosfatidyletanolamínu a obsahovali len stopy fosfatidylserínu. Takéto bunky neboli schopné inkorporovať rádioaktívne prekurzory do bielkovín a nukleových kyselín, mali zníženú hybridizačnú schopnosť a ich protoplasty boli rezistentnejšie k hypotonickej lýze. Auxotrofia mutanta na cholín sa ukázala byť dôsledkom štruktúrnej modifikácie syntetázy fosfatidylserínu.

Orientácia na riešenie hospodárskych úloh cestou intenzívneho rozvoja otvorila nové možnosti pre pokrok biologických vied a ich technologických aplikácií. Nové poznatky o podstate rastu buniek, funkciách živej hmoty a jej regulácii tvoria v spojení s technickými možnosťami veľký priestor pre nové výroby založené na biologických princípoch. Do popredia vystupuje otázka veľkokapacitnej výroby mikrobiálnej biomasy s využitím priamo vo výžive, vo forme zdroja kŕmnych bielkovín, vitamínových koncentrátov, ochucovadiel a ďalších nutrične významných látok pre potravinársky priemysel, zdroja metabolitov a základných surovín na výrobu liečiv, diagnostických chemikálií a enzýmov.

Zefektívnenie výťažnosti mikrobiálnej biomasy, zvýšenie konverzie substrátov na žiadané produkty, resp. zvýšený obsah zlúčenín vo frakcionovaných mikrobiálnych systémoch závisia od aktívneho usmernenia činnosti a vlastností mikroorganizmov. Táto úloha predpokladá cielený zásah do biosyntetických dráh a regulačných mechanizmov, pôvodne riešený viac-meňej náhodnou metódou mutácie a selekcie. Nástup genetického inžinierstva priniesol reálnu možnosť konštrukcie nových, v prírode neexistujúcich kombinácií génov, v systémoch hostiteľ—vektor, resp. použitím techniky fúzie protoplastov, v kmeňoch priemyselne významných mikroorganizmov.

Efektívnosť izolácie viacerých mikrobiálnych metabolitov do značnej miery súvisí s vytvorením vhodných podmienok frakcionácie buniek. Frakcionácia buniek, fúzia protoplastov i permeabilita sú problémy, ktoré úzko súvisia so zložením a vlastnosťami membrán mikrobiálnych buniek. Vzťah medzi zložením a funkciou membrán sa dosiaľ detailnejšie študoval predovšetkým v prokaryotických bunkách [1—3].

Mutanty baktérie *E. coli* s blokom v špecifických enzýmoch biosyntézy fosfolipidov sa použili na modifikovanie zloženia bunkových membrán a na štúdium úlohy lipidických komponentov v membránach.

Vzhľadom na množstvo dostupných informácií o genetike a biochemických vlastnostiach sa ako modelový organizmus z eukaryotických mikroorganizmov najčastejšie používa kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* [4].

Mutanty kvasiniek auxotrofné na masné kyseliny [5] boli predmetom štúdií vplyvu zmien v uhľovodíkových častiach fosfolipidov membrán na oxidatívnu fosforyláciu [6], transport adenínových nukleotidov cez membránu mitochondrie [7], respiračnú adaptáciu [8, 9], replikáciu mitochondriálnej DNA [10] a proteosyntézu [11].

Spomedzi mutantov kvasiniek s modifikovanou polárnou časťou molekuly fosfolipidu boli predmetom detailnejších štúdií iba kmene auxotrofné na inozitol [12, 13].

S cieľom zistiť, ako ovplyvní zmena zloženia fosfolipidov funkciu membrány, v tejto práci sa študovali vlastnosti mutantu kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* auxotrofného na cholín.

Materiál a metódy

1. Použité mikroorganizmy

V práci sa použil haploidný kmeň *Saccharomyces cerevisiae* 707-20 A (*a, chol, lys*) od dr. H. Jacoba z roku 1964 (Centre de génétique moléculaire du CNRS, Gif-sur-Yvette, Francúzsko). Po skrížení s kmeňom *S. cerevisiae* 936 (*a, pet* 936) od dr. G. Schatza (Biozentrum, Basel, Švajčiarsko), sa z vysporulovaných diploidov vybral segregant *a, chol, lys*. Tento sa skrížil s pôvodným *a* haploidným kmeňom a vznikol diploidný kmeň auxotrofný na lyzín a cholín EB 20. Kmeň EB 20 sa použil vo väčšine experimentov a v texte sa uvádza ako „mutantný kmeň“. Niektoré experimenty sa uskutočnili s pôvodným haploidným kmeňom. Ako kontrola sa v niektorých prípadoch použil spontánny revertant pôvodného haploidného kmeňa 707-20 A rev (*a, lys*). Hybridizačná schopnosť mutantu 707-20 A (*a, chol, lys*) sa stanovila skrížením s haploidným kmeňom DPI-IB (*a, his1, trp1*).

2. Spôsob kultivácie

Inokulá sa pripravili 24 h aeróbnou kultiváciou kmeňov pri 30 °C v polosyntetickej pôde (obsahujúcej 10 g peptónu, 10 g kvasničného autolyzátu, 20 g glukózy a zmes anorganických solí v 1 l) a dvakrát premyli destilovanou vodou. Použili sa na zaočkovanie tekutých polosyntetických alebo syntetických rastových médií — buď

komerčného YNB média (Difco, USA), buď podobného pripraveného v laboratóriu (20 g glukózy, zmes anorganických solí: 10 mg FeCl_3 , 0,5 g KCl, 0,2 g NaNO_3 , 1,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g KH_2PO_4 a zmes vitamínov; 10 mg inozitolu, 1 mg tiamín-HCl, 600 μg pyridoxín-HCl, 600 μg kyseliny nikotínovej, 600 μg pantotenanu vápenatého, 10 μg biotínu a 200 μg riboflavínu v 1 l média, pH 4,5). Syntetické médiá sa doplňovali rastovými faktormi auxotrofných kmeňov v koncentrácii 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, ak nie je uvedené inak.

Bunky sa kultivovali za trepania pri 30 °C v Erlenmeyerových fľašiach naplnených do 1/10 objemu rastových médiom.

Pevné polosyntetické a syntetické rastové médiá rovnakého zloženia ako tekuté obsahovali navyše 20 g, resp. 30 g agaru v 1 l.

Rast buniek sa sledoval počítaním v Bürkerovej komôrke. Suchá hmotnosť sa stanovila gravimetricky vysušením do konštantnej hmotnosti pri 105 °C.

3. Stanovenie životaschopnosti buniek

Frakcia mŕtvych buniek sa stanovila po výseve na pevné polosyntetické rastové médiá alebo farbením buniek metylénovou modrou (0,3 mmol/l) v CaCl_2 (5 mmol/l).

4. Detekcia respiračno-deficitných mutantov

Respiračno-deficitné mutanty sa detegovali výsevom buniek na pevné polosyntetické rastové médiá s glukózou (1 g $\cdot \text{l}^{-1}$) a glycerolom (30 g $\cdot \text{l}^{-1}$) ako malé kolónie alebo výsevom na pevné polosyntetické médiá s glukózou (20 g $\cdot \text{l}^{-1}$) ako kolónie, ktoré sa nefarbili trifenyltetrazóliom chloridu.

5. Hybridizácia kvasiniek [14]

Haploidné bunky mutantného kmeňa 707-20 A a kmeňa DPI-IB opačného pohlavného typu sa kultivovali oddelene v syntetickom rastovom médiu doplnenom aminokyselinami, na ktoré boli použité kmene auxotrofné. Vyrastené bunky opačných pohlavných typov sa zmiešali v 5 ml kopulačného média (1 $\times 10^7$ buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$ každého kmeňa). Po 2 h trepania pri 30 °C sa kultivačná zmes odstredila a nechala stáť 30 min. Supernatant sa zliat, bunky sa resuspendovali v čerstvom kopulačnom médiu a po ďalších 4 h trepania sa vysiali na pevné syntetické médiá. Počet prototrofných kolónií, stanovený po 4 dňoch inkubácie pri 30 °C na Petriho miskách zodpovedal počtu zygot, ktoré vznikli splynutím haploidných buniek opačných pohlavných typov.

6. Príprava protoplastov

Protoplasty sa pripravili podľa Kováča a spol. [15]. Premyté bunky (100 mg suchej hmotnosti) sa inkubovali 5 min v 2 ml Tris-tlmivého roztoku pH 9,3 (0,1 mol/l), ktorý obsahoval 2 mg ditioerytritolu, premyli sorbitom (1,35 mol/l) v citrát-fosfátovom tlmivom roztoku pH 5,8 (0,01 mol/l) a vystavili účinku lyofilizovanej zmesi hydrolytických enzýmov izolovaných zo žalúdočnej šťavy slimáka záhradného (60 mg · ml⁻¹ roztoku sorbitolu) pri 30 °C na 2 h. Vytvorené protoplasty sa 2-krát premyli roztokom obsahujúcim v 1 litri 1,35 mol sorbitolu a 1 mmol EDTA, pH 7,0 a resuspendovali v tomto roztoku v množstve 3×10^7 protoplastov · ml⁻¹.

7. Osmotická stabilita protoplastov

Osmotická stabilita protoplastov sa merala dvoma spôsobmi:

1. Metódou Alterthuma a Roseho [16]: 0,1 ml suspenzie obsahujúcej 3×10^7 protoplastov · ml⁻¹ sa pridalo k 2 ml sorbitolu v citrátovo-fosfátovom tlmivom roztoku, (5 mmol/l) pH 7,0. Zmes sa nechala stáť 10 min pri izbovej teplote, potom sa zmerala jej turbidita ako absorbanca pri 600 nm.

2. Meraním množstva materiálu absorbujúceho v UV oblasti pri 260 nm, ktorý sa uvoľnil z protoplastov do supernatantu po centrifugácii uvedenej zmesi 10 min pri 1500 g.

8. Inkorporácia značených prekursorov do makromolekúl

Inkorporácia rádioaktívnych prekursorov do bielkovín a nukleových kyselín sa uskutočnila podľa metódy Hartwella [17]. Syntéza nukleových kyselín sa merala stanovením rádioaktivity vo frakcii nerozpustnej v kyseline trichlóroctovej v kultúrach buniek, ktoré rástli v prítomnosti [U-¹⁴C]adenínu (74 MBq a 87 μmol v 1 litri). 0,5 ml vzorky odobratej z kontinuálne značenej kultúry sa zmiešalo s rovnakým množstvom vychladnutej kyseliny trichlóroctovej (100 g · l⁻¹) a nechalo stáť minimálne 1 h pri 0 °C. Syntéza DNA sa stanovila ako frakcia rádioaktivity stabilná proti alkalickému hydrolyze. V príslušných časových intervaloch sa odoberali vzorky do rovnakého množstva „zastavovacej zmesi“ (40 g NaOH, 40 g sarkozyl, 50 mg DNA, 25 mg hovädzieho sérumalbumínu v 1 l) a nechali stáť minimálne 16 h pri laboratórnej teplote. Pred ďalším spracovaním sa vzorky inkubovali 15 min pri 80 °C na vodnom kúpeli a vyzrážali s kyselinou trichlóroctovou.

Syntéza bielkovín sa merala stanovením rádioaktivity vo frakcii nerozpustnej v kyseline trichlóroctovej v kultúrach, ktoré rástli v prítomnosti L-[U-¹⁴C]-leucínu (37 MBq a 82 μmol v 1 litri). V pravidelných časových intervaloch sa odoberalo 0,5 ml vzorky kontinuálne značenej kultúry do rovnakého množstva vychladnutej

kyseliny trichlóroctovej ($100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) a nechalo stáť minimálne 1 h pri 0°C . Pred ďalším spracovaním sa vzorky obsahujúce rádioaktívny leucín inkubovali 15 min pri 90°C na vodnom kúpeli.

Odobraté vzorky sa niekoľkonásobne premyli kyselinou trichlóroctovou ($50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) na membránových filtroch ($0,6 \mu\text{m}$) a nakoniec 96 % etanolom. Rádioaktivita vysušených filtrov zaliatych scintilačnou kvapalinou SLS 31 sa merala na scintilačnom počítachi Packard Tri-Carb.

9. Analýza lipidov

Premyté bunky sa vyzrážali kyselinou trichlóroctovou ($50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), premyli kyselinou trichlóroctovou ($50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) a vodou a extrahovali kombinovanou metódou podľa Lettersa [18] a Bligha a Dyera [19]. Celkové lipidy sa stanovili gravimetricky po vysušení lipidického extraktu vo vákuovom exikátore nad paletou KOH. Množstvo fosfolipidov sa stanovilo kolorimetrickou analýzou anorganického fosfátu [20].

Lipidy sa rozdelili na jednotlivé frakcie chromatografiou na tenkej vrstve. Neutrálne lipidy sa delili chromatografiou v jednom rozmere na platniach, ktoré sa pripravili zo silikagélu G použitím zmesi rozpúšťadiel petroléter—etyléter—kyselina octová (75:25:1). Dvojrozmerná chromatografia fosfolipidov sa uskutočnila na platniach zo silikagélu DS použitím zmesi chloroform—metanol—28 % amoniak (60:40:5) v prvom rozmere a zmesi chloroform—metanol—kyselina octová—voda (25:8:4:1) v druhom rozmere. Zároveň sa fosfolipidy rozdelili v jednom rozmere použitím zmesi chloroform—metanol—kyselina octová—voda (28:4:4:1) [21]. Aminofosfolipidy sa detegovali nastriekaním platní ninhydrínovým reagensom a ostatné fosfolipidy vystavením platní parám jódu.

10. Chemikálie

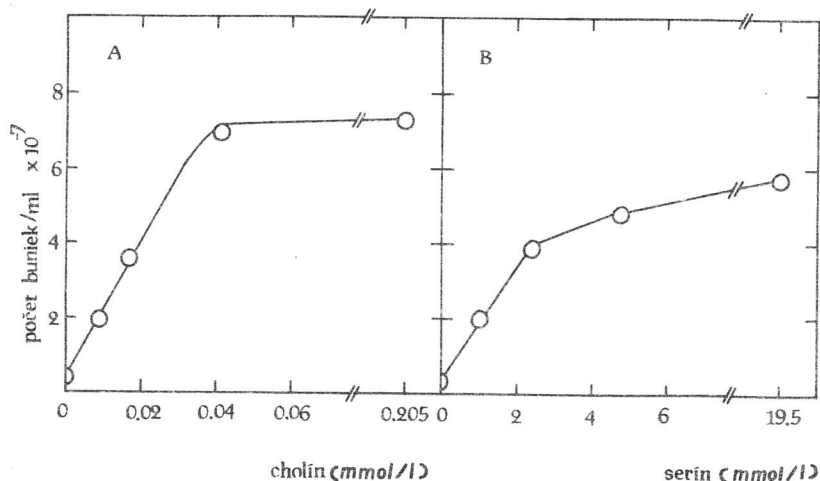
Pôvod komerčných zlúčenín je uvedený v zátvorkách: DL-serín (Reachim ZSSR), štandardy fosfolipidov (Koch-Light Laboratories, Veľká Británia), silikagél G (Serva, NSR), silikagél DC (Woelm, NSR), L-[U- ^{14}C]-leucín, [U- ^{14}C]-adenín (ÚVVR, ČSSR), scintilačná kvapalina SLS 31 (Spolana, ČSSR). Monometyletanolamín a dimetyletanolamín sa získali z Katedry organickej syntézy SVŠT, Bratislava. Zdrojom ostatných použitých chemikálií bola Lachema, ČSSR.

Výsledky a diskusia

Charakteristika rastu

V polosyntetickej pôde s glukózou ($20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) sa mutant auxotrofný na cholín správal ako štandardný kmeň. Rýchlosť rastu a konečný rastový výťažok mutanta sa

v tomto médiu dali porovnať s rýchlosťou rastu a rastovým výťažkom štandardného kmeňa. Glycerol, etanol alebo laktát boli schopné nahradiť glukózu vo funkcii zdroja uhlíka, na základe čoho sa predpokladalo, že mutant je schopný využiť i neskvasiteľné substráty pre svoj rast. Bunky mutantu dýchali, obsahovali všetky cytochrómy a neposkytovali zvýšené množstvo cytoplazmatických respiračno-deficitných mutantov. V syntetických pôdach (YNB alebo podobná, pripravená v laboratóriu) prejavoval mutant auxotrofiu na lyzín a cholín. Ak nebol lyzín v pôde prítomný, mutant nebol schopný rásť vôbec, v jeho prítomnosti rástol iba obmedzený počet generácií (1 až 3). V syntetických pôdach obsahujúcich lyzín ($100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a cholín (1 mmol/l) rástol s dobou zdvojenia asi 2 h a konečným rastovým výťažkom $60\text{--}70 \times 10^6$ buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$. Rovnako rástol aj v prípade, keď sa namiesto cholínu použili v syntetickej pôde s lyzínom monometyletanolamín, dimetyletanolamín alebo etanolamín v koncentrácii 1 mmol/l . Ukázalo sa, že cholín možno nahradiť v syntetickej pôde i serínom. Na dosiahnutie rovnakého rastového výťažku ako pri použití cholínu, resp. ostatných uvedených zlúčenín, bolo potrebné zvýšiť koncentráciu serínu až 100-násobne (obr. 1).



Obr. 1. Rastový výťažok buniek mutantu ako funkcia koncentrácie prekursorov biosyntézy fosfolipidov. Diploidný kmeň mutantu rástol 24 h v polosyntetickej pôde. Premyté bunky sa zaočkovali do syntetickej pôdy s lyzínom na počiatočnú koncentráciu 1×10^6 buniek/ml. Syntetická pôda s lyzínom obsahovala buď cholín chlorid (A) alebo D,L-serín (B) v koncentráciách uvedených na abscise. Rastový výťažok, uvedený na ordináte sa stanovil po 30. h rastu

Analýza fosfolipidov

Predbežná analýza zloženia fosfolipidov v haploidných bunkách mutantu auxotrofného na cholín (*S. cerevisiae* 707-20 A) viedla k zisteniu, že v porovnávaní s odpovedajúcim revertantom sa u mutantu znižuje obsah fosfatidylserínu, resp. sa

tento úplne stráca [22]. Podrobnou analýzou obsahu a zloženia fosfolipidov za rôznych podmienok rastu sa zaoberal vo svojom laboratóriu Kováč [23]. Obsah a zloženie fosfolipidov v bunkách mutanta rastúceho v syntetickej pôde s lyzínom a cholínom boli porovnateľné s obsahom a zložením fosfolipidov buniek mutanta, ktorý rástol v polosyntetickej pôde (tab. 1). Ak sa však zo syntetického média

Tabuľka 1. Zloženie fosfolipidov. Bunky, použité ako inokulum rástli 24 hodín v polosyntetickej pôde. Premyté bunky sa použili na zaočkovanie syntetickej pôdy obsahujúcej lyzín (50 µg/ml) a kde je vyznačené i cholín chlorid (20 µg/ml). Počiatočná koncentrácia buniek bola $1 - 2 \times 10^6$ buniek/ml, okrem kultúry, ktorá rástla v pôde bez cholínu, kde bola počiatočná koncentrácia 2×10^7 buniek/ml. Doba kultivácie: 24 hodín; hodnoty uvedené v tabuľke sú priemerom 2 nezávislých experimentov

| Kmeň | Kultivácia v prítomnosti | Celkové fosfo- lipidy (µmol/g suchej hmot.) | Fosfolipidy % celkových | | | | | Iné |
|-------------------------------------|-----------------------------|---|-------------------------|------|------|-----|------|-----|
| | | | LPCH | PCH | PI | PS | PE | |
| Revertant 707 20A _{rev} | — | 31 | 0 | 47,0 | 16,5 | 4,0 | 23,3 | 9,2 |
| Hapl. mutant 707 20A | — | 12 | 3,9 | 61,5 | 27,5 | 0,9 | 3,3 | 3,7 |
| Hapl. mutant 707 20A | cholín (20 µg/ml) | 30 | 0 | 61,5 | 17,2 | 3,9 | 10,8 | 6,6 |
| Mutant EB 20 | — | 15 | 13,1 | 54,7 | 19,2 | 0,5 | 4,5 | 8,0 |
| Mutant EB 20 | cholín | 31 | 12,5 | 57,3 | 14,9 | 1,9 | 10,3 | 3,1 |
| Mutant EB 20 | etanolamín (50 µg/ml) | 30 | 2,8 | 61,7 | 21,6 | 0,5 | 12,0 | 1,4 |

vynechal cholín, celkový obsah fosfolipidov v bunkách mutanta klesol na polovičnú hodnotu pôvodného množstva. Obsah fosfatidyletanolamínu bol za týchto podmienok nižší ako 1/5 hodnoty zistenej v bunkách revertanta a fosfatidylserín bol prakticky nedetegovateľný. Prítomnosť nepatrných množstiev fosfatidylserínu sa v bunkách mutanta podarilo dokázať po kyslej hydrolýze izolovaných fosfolipidov, po oddelení vo vode rozpustných produktov s pozitívnou reakciou na ninhydrín a ich identifikáciou porovnaním so štandardmi serínu a etanolamínu.

Charakteristika rastu a zloženie fosfolipidov viedli k predpokladu, že u mutanta bola mutáciou zasiahnutá skôr syntéza fosfatidyletanolamínu a fosfatidylserínu ako fosfatidylcholínu. Prítomnosť cholínu v syntetickej pôde spôsobila čiastočnú normalizáciu zloženia fosfolipidov v bunkách mutanta, k úplnému odstráneniu pozorovanej deficiencie fosfatidyletanolamínu a fosfatidylserínu však nedošlo. Ani rast mutanta v syntetickej pôde s etanolamínom uvedenú deficienciu neodstránil (tab. 1). Na základe analógie s mutantmi plesne *Neurospora crassa* auxotrofnými na cholín sa pôvodne očakávalo, že mutácia zasiahne niektorú z metyltransferáz, ktoré sa zúčastňujú na transformácii fosfatidyletanolamínu na fosfatidylcholín [24—26]. Skutočnosť, že cholín možno v rastovom médiu nahradiť bezprostrednými prekur-

zormi jeho biosyntézy — dimetyletanolamínom, monometyletanolamínom alebo etanolamínom, poukázala však na prítomnosť funkčných metyltransferáz. Zloženie fosfolipidov v bunkách mutanta, ktorý bol kultivovaný v neprítomnosti cholínu dokonca naznačilo, že enzýmy metylujúce fosfatidyletanolamín na fosfatidylcholín sú v bunkách mutanta aktívnejšie. Zistené zloženie fosfolipidov v bunkách mutanta vylúčilo i možnosť, že mutácia modifikovala enzým fosfatidylseríndekarboxylázu, ktorý sa uplatňuje pri premene fosfatidylserínu na fosfatidyletanolamín. Mutanty baktérie *E. coli*s defektom v dekarboxyláze fosfatidylserínu akumulovali fosfatidylserín [27]. V spektre fosfolipidov študovaného mutanta však chýbal fosfatidylserín prakticky úplne, na základe čoho sa predpokladalo, že mutáciou vznikla porucha v syntéze fosfatidylserínu. Fosfatidylserín syntetáza (EC 2.7.8.8) katalyzuje de novo syntézu fosfatidylserínu z CDP — diglyceridu a serínu. Pri vyšších eukaryontoch sa enzým spravidla nenachádza a fosfatidylserín sa tvorí výmennou reakciou polárnych častí fosfolipidov (napr. za účasti L-serínu a fosfatidyletanolamínu). Detailná biochemická analýza ukázala, že systém syntetizujúci fosfatidylserín zo serínu má v bunkách mutanta výrazne zníženú afinitu k serínu. Táto by mohla byť dôsledkom štrukturálnej modifikácie syntetázy fosfatidylserínu [23].

Podobné mutanty baktérie *E. coli* označené „pss“ [1] mali zmenené zloženie fosfolipidov (výrazne znížený obsah fosfatidyletanolamínu) a ich rast bol citlivý na teplotu. Pri nepermisívnej teplote nerástli, fosfatidyletanolamín bol nevyhnutný na zabezpečenie rastu baktérií rovnako ako fosfatidylserín, ktorý slúžil ako jediný zdroj fosfatidyletanolamínu v týchto bunkách [28]. Podobne ako „pss“ mutant baktérií *E. coli* mal i mutant kvasiniek auxotrofný na cholín, kultivovaný v médiu bez cholínu, zmenené zloženie fosfolipidov (znížený obsah fosfatidylserínu a fosfatidyletanolamínu). Keďže fosfatidyletanolamín sa tvorí dekarboxyláciou fosfatidylserínu a jeho postupnou metyláciou vzniká fosfatidylcholín, očakával sa i pokles množstva fosfatidylcholínu. Tento sa však nepozoroval, čo viedlo k predpokladu, že mutant kvasiniek rastie dovtedy, kým sa môže tvoriť fosfatidylcholín na úkor znižujúceho sa množstva fosfatidyletanolamínu a fosfatidylserínu. Obsah fosfatidylinozitolu sa v bunkách mutanta významnejšie nemenil pravdepodobne preto, že sa syntetizuje nezávislou dráhou.

V syntetických médiách s cholínom rástol mutant ako štandardný kmeň. Obsahoval normálne množstvo fosfatidylcholínu a mierne znížené množstvá fosfatidylserínu a fosfatidyletanolamínu. Keďže bol cholín v pôde prítomný, fosfatidylcholín sa syntetizoval prevažne CDP — cholínovou dráhou [29, 30]. Za týchto podmienok zabezpečovala defektná syntetáza fosfatidylserínu potrebné množstvá fosfatidylserínu a z neho následnou dekarboxyláciou fosfatidyletanolamínu.

Na základe uvedených zistení sa konštatovalo, že rast buniek kvasiniek nie je striktne závislý od normálneho obsahu fosfatidylserínu a fosfatidyletanolamínu. Množstvo oboch fosfolipidov môže klesať, nie však viac ako na 4 % pôvodného obsahu pre fosfatidyletanolamín, resp. 2 % pre fosfatidylserín. Bunky na rast

potrebujú fosfatidylcholín rovnako ako fosfatidylinozitol, ktorý však nie je schopný fosfatidylcholín nahradiť. Hoci je prítomnosť fosfatidylcholínu potrebná na to, aby mohli bunky rásť, zastavenie jeho syntézy a akumulácie sa neprejavilo stratou životaschopnosti. Naproti tomu, bunky kvasiniek auxotrofné na inozitol strácali životaschopnosť vyčerpaním inozitolu z rastového média [12, 13, 31].

Pri fyziologickom pH majú molekuly fosfatidylserínu a fosfatidylinozitolu záporný náboj, fosfatidyletanolamín je tiež mierne záporne nabitý, kým zwitterión fosfatidylcholínu je neutrálny [32, 33]. Skutočnosť, že v membránach je v prevažnej miere zastúpený fosfatidylcholín a nemožno ho nahradiť inými nabitými fosfolipidmi naznačuje, že membrána netoleruje väčšie zmeny v celkovom náboji. Na existenciu kompenzačných mechanizmov, ktoré udržiavajú konštantný náboj fosfolipidov v membráne, poukázali i štúdiá mutantov *Neurospora crassa* auxotrofných na cholín a inozitol [34], ako aj kvasiniek auxotrofných na inozitol [31]. U baktérií *E. coli* sa pozorovala určitá flexibilita nábojov membrány, ktorej sa pripisuje regulačná funkcia v aktivite niektorých fosfatidyltransferáz [1].

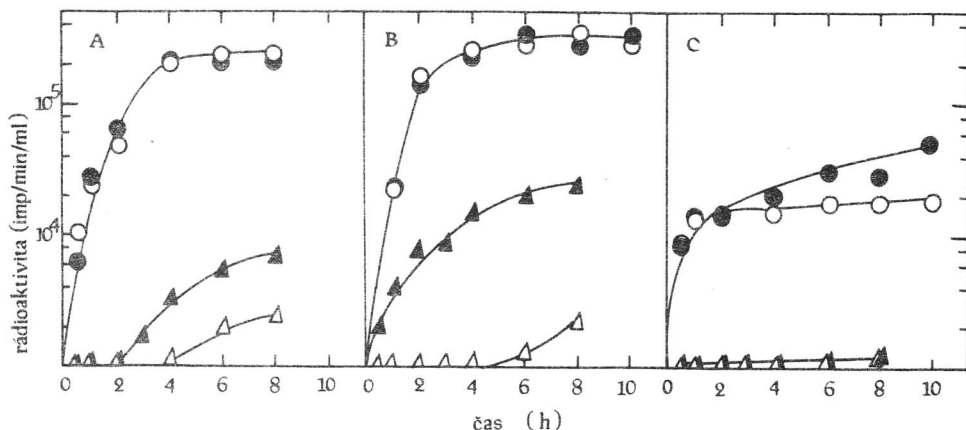
Biochemické vlastnosti mutantu

Rast mutantu v syntetickej pôde bez cholínu bol limitovaný; za týchto podmienok rástli bunky maximálne 3 generácie (asi 6 h), potom sa ich rast zastavil. Zloženie fosfolipidov charakterizoval nízky obsah fosfatidylserínu a znížené množstvo fosfatidyletanolamínu. Napriek tomu boli však bunky mutantu v syntetickej pôde bez cholínu pomerne dlho životaschopné. V 7. hodine rastu bez cholínu bolo 60–80 % buniek populácie schopných tvoriť kolónie, v 24. hodine 30 % a v 48. hodine kultivácie ostalo 10 % buniek populácie schopných tvoriť kolónie po premytí a výseve na pevné polosyntetické médiá.

Schopnosť buniek mutantu inkorporovať rádioaktívne prekurzory do bielkovín a nukleových kyselín závisela od prítomnosti cholínu v rastovom médiu. Ak rástli bunky mutantu v syntetickom médiu s cholínom, boli schopné inkorporovať rádioaktívny leucín do bielkovín, resp. rádioaktívny adenín do nukleových kyselín bez ohľadu na to, či čerstvé médium obsahovalo alebo neobsahovalo cholín. Ak však boli bunky kultivované v médiu bez cholínu, v čerstvom médiu, ktoré neobsahovalo cholín, neboli schopné inkorporácie vôbec. Ak sa dostali do čerstvého média s cholínom, ich schopnosť inkorporácie sa čiastočne obnovila (obr. 2). Zdá sa, že pomer bielkovín a lipidov v membránach sa rozhodujúcou mierou zúčastňuje na zabezpečení normálnych funkcií eukaryotickej bunky. Nie je však vylúčené, že pozorovaná znížená schopnosť inkorporácie je za týchto podmienok dôsledkom straty životaschopnosti značnej časti populácie.

V bunkách kvasiniek auxotrofných na inozitol sa pozorovala pokračujúca syntéza makromolekúl i po zastavení množenia v dôsledku karencie na inozitol [12, 13, 31,

Obr. 2. Inkorporácia [^{14}C]-L-leucínu do bielkovín a [^{14}C]adenínu do nukleových kyselín v bunkách mutanta auxotrofného na cholín. Bunky rástli v lyzín-obsahujúcej syntetickej pôde s cholínom (○ ●) alebo bez (△ ▲) cholínu 24 h. Premyté bunky sa zaočkovali na počiatočnú koncentráciu $5 - 10 \times 10^6$ buniek/ml do lyzín obsahujúcej syntetickej pôdy s cholínom (● ▲) alebo bez cholínu (○ △) a označili použitím [^{14}C]-L-leucínu (82 nmol a 37 kBq/ml) alebo [^{14}C]adenínu (87 nmol a 74 kBq/ml). Bunky sa kultivovali po dobu uvedenú na abscise a v pravidelných intervaloch sa odoberali vzorky na stanovenie rádioaktivity inkorporovanej do bielkovín (A), RNA (B) a DNA (C)



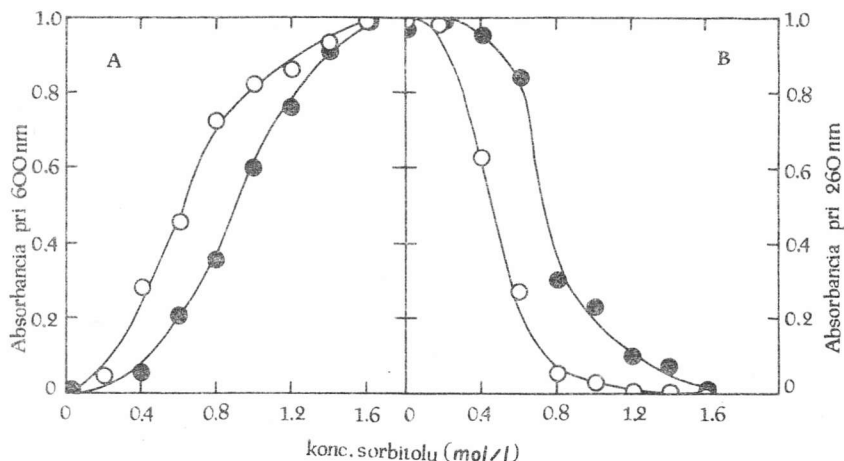
35]. Nerovnováha medzi inhibovaným rastom membrán a pokračujúcou syntézou makromolekúl v bunke sa pokladala za príčinu straty životaschopnosti buniek v dôsledku karencie na inozitol. Strata životaschopnosti buniek však mohla byť i dôsledkom aktivácie proteolytických enzýmov v bunkách, ktoré mali karenciu na inozitol [36—38].

Pri príprave protoplastov sa zistilo, že bunky mutanta kultivované v syntetickom médiu bez cholínu boli rezistentnejšie proti účinku hydrolytických enzýmov izolovaných zo žalúdočnej šťavy slimáka záhradného ako bunky, ktoré rástli v pôdach obsahujúcich cholín. Keďže funkcia týchto enzýmov pri príprave protoplastov spočíva v hydrolýze polysacharidov bunkovej steny, predpokladalo sa, že syntéza polysacharidov v bunkách mutanta pokračuje určitý čas aj po zastavení rastu.

Protoplasty sa z buniek mutanta podarilo pripraviť až vtedy, keď sa množstvo glukózy v syntetickom médiu znížilo z $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (bežne používané) na $2,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, čím sa zabránilo rozsiahlejšej syntéze stenových polysacharidov. Osmotické vlastnosti protoplastov záviseli od toho, či bunky, z ktorých boli pripravené, rástli v prítomnosti alebo neprítomnosti cholínu. Protoplasty, pripravené z buniek mutanta, ktoré boli kultivované v pôde bez cholínu, boli rezistentnejšie proti napučievaniu a lýze v hypotonických roztokoch sorbitolu ako protoplasty pripravené z buniek rastúcich v pôdach s cholínom (obr. 3). Je pravdepodobné, že tieto pozorovania sú dôsledkom rozdielných vlastností plazmatickej membrány v týchto dvoch druhoch vzoriek.

S poklesom množstva fosfatidyletanolamínu a fosfatidylserínu v membráne klesol

Obr. 3. Osmotická stabilita protoplastov pripravených z buniek mutanta auxotrofného na cholín. Protoplasty sa pripravili z buniek, ktoré rástli 24 h v syntetickej pôde s lyzínom a glukózou (2,5 g/l liter média) v prítomnosti (●) alebo neprítomnosti (○) cholínu. 0,1 ml suspenzie protoplastov sa pridalo k 2 ml sorbitolu rozpustenému v 5 mM citrát-fosfátovom tlmivom roztoku pH 7,0, ktorého koncentrácia je uvedená na abscise. Po 10 min. státia pri laboratórnej teplote sa zmerala turbidita zmesí ako absorbancia pri 600 nm (A). Množstvo materiálu, ktorý sa uvoľnil z protoplastov do supernatantu sa zmeralo po odcentrifugovaní zmesí (10 min, 1500 g) pri 260 nm (B). Namerané hodnoty sa normalizovali vzhľadom na extrémne hodnoty absorbancie zistené pri koncentrácii sorbitolu 0 resp. 1,6 mol/l⁻¹.



aj počet vzájomne sa odpudzujúcich záporných nábojov. V dôsledku toho sa fosfolipidy mohli v membráne protoplastov usporiadať kompaktnejšie, čo sa následne prejavilo zvýšenou rezistenciou proti osmotickému stresu.

Závislosť osmotických vlastností membrán od distribúcie fosfolipidov opísali i ďalší autori. Využitím zistenia, že obsah fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu v plazmatickej membráne kvasiniek možno zvýšiť rastom buniek v definovaných médiách obohatených cholínom alebo etanolamínom, Hossack a spol. ukázali, že protoplasty, plazmatická membrána ktorých obsahovala viac fosfatidyletanolamínu, boli osmoticky stabilnejšie ako tie, ktorých membrána obsahovala viac fosfatidylcholínu [39]. Aj životaschopnosť buniek kvasiniek suspendovaných do tlmivých roztokov obsahujúcich SDS súvisela so zložením fosfolipidov ich membrán [40]. Tieto údaje poukazujú na komplexnosť javu a význam asymetrickej distribúcie fosfolipidov pre vlastnosti membrán.

Experimenty s použitím umelých lipidických membrán viedli k zisteniu, že fosfatidylserín a fosfatidyletanolamín majú významnú úlohu v membránach schopných fúzie [41, 42]. Vzhľadom na to, že u študovaného mutanta sa zistil znížený obsah práve fosfatidylserínu a fosfatidyletanolamínu, predpokladalo sa, že schopnosť jeho bunkovej membrány podliehať fúzii sa zmení. Keďže fúzia je nevyhnutným predpokladom toho, aby haploidné bunky opačného pohlavia vytvorili zygotu, bol

Tabuľka 2. Hybridizačná schopnosť. Haploidné bunky mutanta 707 20A a bunky opačného pohlavného typu DPI-1B boli kultivované oddelene v pôdach a po dobu ako je uvedené v tabuľke. Syntetické pôdy obsahovali aminokyseliny, na ktoré boli použité kmene auxotrofné. Kde je vyznačené, bol do pôdy pridaný cholín chlorid (1mM). Bunky oboch pohlavných typov sa zmiešali v hybridizačnom médiu (1×10^7 buniek/ml každého kmeňa) a ďalej spracovali ako je uvedené v časti Materiál a metódy. Percento zygot je vyjadrené vzhľadom na celkový počet buniek prítomných v hybridizačnej zmesi, takže teoretické maximum zygot je 50 %. Životaschopnosť buniek sa stanovila na počiatku experimentu farbením metylénovou modrou.

| Podmienky kultivácie | Hybridizačné médium | Zygoty (%) | Životaschopnosť (%) |
|---|---------------------|------------|---------------------|
| 16 hod. v polosyntetickom médiu | Polosyntetické | 40 | 100 |
| 16 hod. v syntetickom médiu s cholínom | Polosyntetické | 31 | 80 |
| 16 hod. v syntetickom médiu s cholínom | Syntetické | 14 | 80 |
| 8 hod. v syntetickom médiu s cholínom | Syntetické | 17 | 97 |
| 16 hod. v syntetickom médiu bez cholínu | Polosyntetické | 3 | 70 |
| 16 hod. v syntetickom médiu bez cholínu | Syntetické | 0,05 | 70 |
| 8 hod. v syntetickom médiu bez cholínu | Syntetické | 0,9 | 99 |

oprávnený predpoklad, že u mutanta so zmeneným zložením fosfolipidov sa zmení aj schopnosť hybridizácie. Pri sledovaní hybridizačnej schopnosti haploidných buniek mutanta, ktoré vyrástli v pôdach obsahujúcich, resp. neobsahujúcich cholín, skutočne sa zistilo, že táto schopnosť bola výrazne nižšia u buniek kultivovaných v syntetickej pôde bez cholínu (tab. 2). Životaschopnosť buniek bola počas celého experimentu prakticky rovnaká. Nie je však vylúčené, že pozorovaná znížená hybridizačná schopnosť buniek mutanta s nízkym obsahom fosfatidylserínu a fosfatidyletanoláminu je dôsledkom zmenených vlastností bunkovej steny. Konečné rozhodnutie tohto problému vyžaduje ďalšie experimentálne štúdium s použitím izolovaných protoplastov.

Z výsledkov práce vyplýva, že existuje reálna možnosť modifikovať fosfolipidické zloženie buniek a ich membrán. Zmena v zložení membrán sa odrazí v zmene ich funkcií, čo charakteristicky ovplyvní životné prejavy a vlastnosti buniek kvasiniek. Bunky s cielene zmenenou štruktúrou biologických membrán možno uplatniť pri optimalizácii postupov frakcionácie mikrobiálnej biomasy, resp. pri hľadaní efektívnejších postupov fúzie izolovaných protoplastov pri genetických manipuláciách s eukaryotickými mikroorganizmami.

Literatúra

1. RAETZ, C. R. H.: Microbiol. Rev., 42, 1978, s. 614.
2. SILBERT, D. F.: Ann. Rev. Biochem., 44, 1975, s. 315.
3. CRONAN, J. E., Jr.—GELMANN, E. P.: Bacteriol. Rev., 39, 1975, s. 232.

4. ROSE, A. H.—HARRISON, J. S.: *The Yeasts*. Vol. 1, New York, Academic Press 1969.
5. RESNICK, M. A.—MORTIMER, R. K.: *J. Bacteriol.*, 92, 1966, s. 597.
6. HASLAM, J. M.—PROUDLOCK, J. W.—LINNANE, A. W.: *J. Bioenerget.*, 2, 1971, s. 315.
7. HASLAM, J. M.—FELLOWS, N. F.: *Biochem. Soc. Trans.*, 3, 1975, s. 772.
8. GORDON, P. A.—LOWDON, M. J.—STEWART, P. R.: *J. Bacteriol.*, 110, 1972, s. 51.
9. WALENGA, R. W.—LANDS, W. E. M.: *J. Biol. Chem.*, 250, 1975, s. 9130.
10. MARZUKI, S.—HALL, R.—LINNANE, A. W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 57, 1974, s. 372.
11. MARZUKI, S.—COBON, G. S.—CROWFOOT, P. P.—LINNANE, A. W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 169, 1975, s. 591.
12. HENRY, S. A.—ATKINSON, K. D.—KOLAT, A. I.—CULBERTSON, M. R.: *J. Bacteriol.*, 130, 1977, s. 472.
13. BEDNARZ-PRASHAD, A. J.—MIZE, CH. E.: *Biochemistry*, 17, 1978, s. 4178.
14. JACOB, H.: *Acad. Sci. C.R.*, 254, 1962, s. 3909.
15. KOVÁČ, L.—BEDNÁROVÁ, H.—GREKSÁK, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 153, 1968, s. 32.
16. ALTERTHUM, F.—ROSE, A. H.: *J. Gen. Microbiol.*, 77, 1973, s. 371.
17. HARTWELL, L. H.: *J. Bacteriol.*, 93, 1967, s. 1662.
18. LITTELS, R.: in: *Aspects of Yeast Metabolism*. Ed. A. K. Mills. Oxford, Blackwells Sci. Publ. 1968, s. 306.
19. BLIGH, E. G.—DYER, W. J.: *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 37, 1959, s. 911.
20. ROUSER, G.—FLEISCHER, S.—YAMAMOTO, A.: *Lipids*, 5, 1970, s. 494.
21. SKIPSKI, V. P.—BARCLAY, M.: *Methods in Enzymology*, 14, 1969, s. 530.
22. ŠNITTOVÁ, V.: *Rigorózná práca*. Bratislava, Katedra biochémie PFUK 1977.
23. KOVÁČ, L.—GBELSKÁ, Y.—POLIACHOVÁ, V.—ŠUBÍK, J.—KOVÁČOVÁ, V.: *Eur. J. Biochem.*, 111, 1980, s. 491.
24. HALL, M. O.—NYC, J. F.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 81, 1959, s. 2275.
25. HALL, M. O.—NYC, J. F.: *J. Lipid Res.*, 2, 1961, s. 321.
26. SCARBOROUGH, F. A.—NYC, J. F.: *J. Biol. Chem.*, 242, 1967, s. 238.
27. HAWROT, E.—KENNEDY, E. P.: *J. Biol. Chem.*, 253, 1978, s. 8213.
28. KENNEDY, E. P.—WEISS, C. B.: *J. Biol. Chem.*, 222, 1956, s. 193.
29. WAECHTER, C. J.—STEINER, M. R.—LESTER, R. L.: *J. Biol. Chem.*, 244, 1969, s. 3419.
30. WAECHTER, C. J.—RESTER, R. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 158, 1973, s. 401.
31. BECHER, G. W.—LESTER, R. L.: *J. Biol. Chem.*, 252, 1977, s. 8684.
32. KOLBER, M. A.—HAYNES, D. H.: *J. Membrane Biol.*, 48, 1979, s. 95.
33. OHTA, A.—SHIBUYA, I.: *J. Bacteriol.*, 132, 1977, s. 434.
34. HUBBARD, S. C.—BRODY, S.: *J. Biol. Chem.*, 250, 1975, s. 7173.
35. ATKINSON, K.—KOLAT, A. I.—HENRY, S. A.: *J. Bacteriol.*, 132, 1977, s. 806.
36. MATILE, P.: *Science*, 151, 1966, s. 86.
37. SULLIVAN, J. L.—DEBUSK, A. G.: *Nature New Biol.*, 243, 1973, s. 72.
38. ULASZEWSKI, S.—WOODWARD, J. R.—CIRILLO, V. P.: *J. Bacteriol.*, 136, 1978, s. 49.
39. HOSSACK, J. A.—SHARPE, V. J.—ROSE, A. H.: *J. Bacteriol.*, 129, 1977, s. 1144.
40. PRINGLE, A. T.—ROSE, A. H.: *J. Gen. Microbiol.*, 111, 1979, s. 337.
41. PAPAHAJIOPOULOS, D.—POSTE, G.—SCHAEFFER, B. E.—VAIL, W. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 352, 1974, s. 10.
42. KOLBER, M. A.—HAYNES, D. H.: *J. Membrane Biol.*, 48, 1979, s. 95.

Биохимические свойства дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с пониженным содержанием фосфатидилсерина

Резюме

Объектом изучения служил ядерный мутант дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, ауксотрофный по отношению к холину. После роста без холина клетки содержали пониженное количество фосфатидилэтанолamina и лишь следы фосфатидилсерина. Они были неспособны включать в белки и нуклеиновые кислоты промежуточные радиоактивные вещества, обладали пониженной способностью к образованию гибридов, и их протопласты были более устойчивы к гипотоническому лизису. Кажется, что ауксотрофия мутантов по отношению к холину является результатом структурной модификации синтетазы фосфатидилсерина.

Biochemical properties of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with lowered phosphatidylserine content

Summary

The object of this study was the nuclear mutant of yeast *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic to choline. After growing without choline, the mutant cells had a lowered phosphatidyletanolamine content and contained phosphatidylserine traces only. Such cells were unable to incorporate the radioactive precursors into proteins and nucleic acids, they had a lowered hybridization ability and their protoplasts were more resistant to hypotonic lysis. The auxotrophy of the mutant to choline was found to be a result of the modification of phosphatidylserine synthetase.

RNDr. Y. Gbelská, CSc., RNDr. J. Šubík, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

Doc. RNDr. L. Kováč, CSc., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, 900 28 Ivanka pri Dunaji.