

Vplyv energetického stavu mitochondrií na indukovanú syntézu α -D-glukozid-glukohydrolázy v bunkách kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*

EDITA DUDÍKOVÁ—ZUZANA LEŠKOVÁ—JÜLIUS ŠUBÍK

Súhrn. Sledovala sa indukovaná syntéza α -D-glukozid-glukohydrolázy (E.C. 3.2.1.20) za podmienok deficiencie ATP v mitochondriách kvasiniek. Zistilo sa, že deficit ATP v mitochondriách dereprimovaných buniek štandardného kmeňa a zodpovedajúceho respiračnodeficitného mutanta *Saccharomyces cerevisiae* nezabráni syntéze α -D-glukozid-glukohydrolázy indukovanej maltózou. Výsledky naznačujú, že expresia jadrových génov špecifikujúcich α -D-glukozid-glukohydrolázu a katabolizmus maltózy v kvasinkách je zrejme nezávislá od riadnej funkcie mitochondriálneho translokátora pre adenínové nukleotidy a dokonca nevyžaduje ani prítomnosť normálnej hladiny ATP v mitochondriách kvasiniek.

Jedným z biochemických parametrov, ktoré určujú kvalitu pekárskoho droždia, je katabolizmus maltózy. Rýchlosť degradácie maltózy a rast kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* na tomto substráte závisia od aktivít α -D-glukozid-permeázy a intracelulárnej α -D-glukozid-glukohydrolázy [1, 2]. Syntéza obidvoch enzýmov je indukovateľná maltózou [3—6] a aspoň v prípade α -D-glukozid-glukohydrolázy zahŕňa transkripciu DNA a *de novo* syntézu proteínu. Pri vyššej koncentrácii glukózy [7] je syntéza α -D-glukozid-permeázy a α -D-glukozid-glukohydrolázy reprimovaná [3, 6, 8] a naviac prvý enzým sa rýchlo inaktívuje [3, 9].

Pre fermentáciu maltózy kvasinkami je nevyhnutná prítomnosť niektorého zo siedmich nespojitých MAL génov [10—12]. Nedávno publikované práce naznačili, že expresia týchto génov súvisí s funkčným stavom mitochondrií [13—16]. Aj keď mitochondriálne gény zjavne nehrajú priamu úlohu pri determinácii schopnosti katabolizovať maltózu, niektoré funkcie, ktoré vykonávajú alebo kontrolujú mitochondrie, môžu ovplyvňovať expresiu jadrových génov alebo ich produktov zodpovedných za katabolizmus disacharidu [16].

Či sa táto funkcia vzťahuje na mitochondriálny ATP, tvorený buď oxidatívnou fosforyláciou, buď transportovaný do mitochondrií z cytozolu, zatiaľ sa neurčilo. Faktom však ostáva, že intramitochondriálny ATP je potrebný tak na normálnu replikáciu mitochondriálnych génov [17], ako aj pre kontinuálny rast buniek kvasiniek i na glukóze ako substráte [18, 19].

V tejto práci sme študovali úlohu energetického stavu mitochondrií v regulácii syntézy α -D-glukozid-glukohydrolázy indukovanej maltózou v kvasinkách *Saccha-*

romyces cerevisiae. Zistilo sa, že indukovaná syntéza α -D-glukozid-glukohydrolázy je zjavne nezávislá od funkcie translokázy pre mitochondriálne adenínové nukleotidy a nemožno jej zabrániť dokonca ani deficienciou ATP v mitochondriách dereprimovaných buniek.

Materiál a metódy

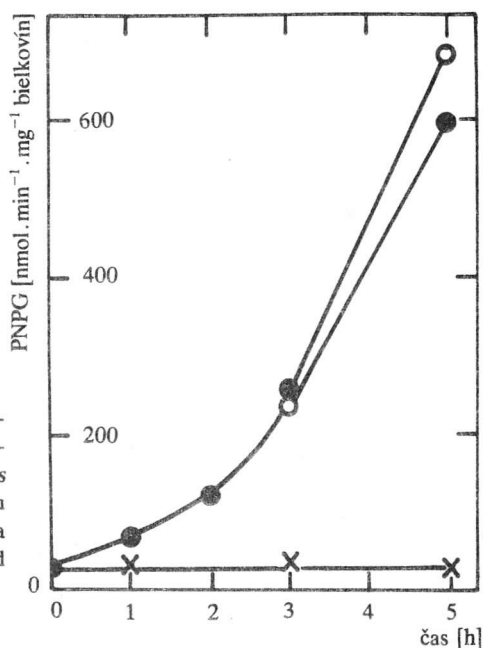
Bunky prototrofného diploidného štandardného kmeňa *Saccharomyces cerevisiae* DT XII a odpovedajúceho neutrálneho cytoplazmatického respiračnodeficitného mutanta DT XII A rástli v polosyntetickom médiu obsahujúcom v 1 litri: 5–20 g glukózy, 5 g peptónu, 5 g kvasničného extraktu a zmes anorganických solí [17]. Pri indukcii boli bunky inkubované aeróbne v médiu obsahujúcom v 1 litri: 10 g maltózy, 2 g glukózy, 10 g casamino acids (DIFCO), 50 mmol fosfátového tlmivého roztoku pH 6,2 a 2×10^{11} buniek kvasiniek.

Aktivita α -D-glukozid-glukohydrolázy sa stanovila v bezbunkovom extrakte po mechanickom rozbití buniek: 2×10^8 buniek sa odcentrifugovalo, $2 \times$ premylo vychladenou destilovanou vodou, k sedimentu buniek sa pridal 10-násobný objem balotiny (priemer guľôčok ca 0,5 mm) a toľko vychladeného K-fosfátového tlmivého roztoku (0,01 mol/l) pH 6,8, aby všetka balotina bola zmáčaná. Táto zmes sa trepala na vibračnej trepačke Mikrotechna, Praha, typ VT pri maximálnej frekvencii vibrácií. Suspenzia dezintegrovaných buniek sa odsala kapilárkou, guľôčky sa premyli $3 \times 0,2$ ml K-fosfátového tlmivého roztoku pH 6,8 a objem sa doplnil na 1 ml. Po odcentrifugovaní 10 minút pri 2000 g sa supernatant použil na stanovenie aktivity α -D-glukozid-glukohydrolázy, resp. bielkovín. Premytie a dezintegrácia buniek prebiehali pri teplote 0–4 °C. Aktivita α -D-glukozid-glukohydrolázy sa stanovila v reakčnej zmesi, ktorá obsahovala 0,5 mg *p*-nitrofenyl- α -D-glukozidu (PNPG) v 0,5 ml fosfátového tlmivého roztoku (0,05 mol/l) pH 7,0 a 0,2 ml bezbunkového extraktu. Reakcia sa zastavila pridaním 1 ml Na_2CO_3 (40 g/l). Vzniknuté modré sfarbenie sa meralo spektrofotometricky pri 410 nm. Aktivita α -D-glukozid-glukohydrolázy sa vyjadrila ako množstvo PNPG (nmol) rozloženého za 1 minútu v prepočte na 1 mg bielkovín [20]. Bielkoviny sa stanovili mikrobiuretovou metódou [21]. Ako štandard bielkovín sa použil hovädzí sérumalbumín.

Výsledky a diskusia

Bunky štandardného kmeňa kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* vyrastené na glukóze ako substráte mali nízku aktivitu intracelulárnej α -D-glukozid-glukohydrolázy, ktorá sa však podstatne zvýšila v priebehu následnej inkubácie buniek

s maltózou. Keď sa indukcia α -D-glukozid-glukohydrolázy uskutočnila v prítomnosti kyseliny bongkrekovej, ktorá účinne blokuje translokáciu adenínových nukleotidov cez mitochondriálnu membránu [18], bol priebeh syntézy α -D-glukozid-glukohydrolázy indukovanej maltózou veľmi podobný priebehu pozorovanému v kontrolnom experimente bez inhibítora. V oboch prípadoch indukovaná syntéza α -D-glukozid-glukohydrolázy bola citlivá na inhibičný účinok inhibítora cytoplazmatickej proteosyntézy — cykloheximid, čo potvrdilo, že ide o syntézu bielkoviny enzýmu *de novo* (obr. 1). Ak syntéza ATP v mitochondriách dereprimovaných buniek bola zastavená inhibíciou dýchania kyanidom alebo navyiac sa zabránilo prístupu glykolyticky tvoreného ATP do mitochondrií kyselinou bongkrekovou, pozorovala sa iba mierna inhibícia syntézy indukovanej α -D-glukozid-glukohydrolázy (tab. 1). Tieto výsledky



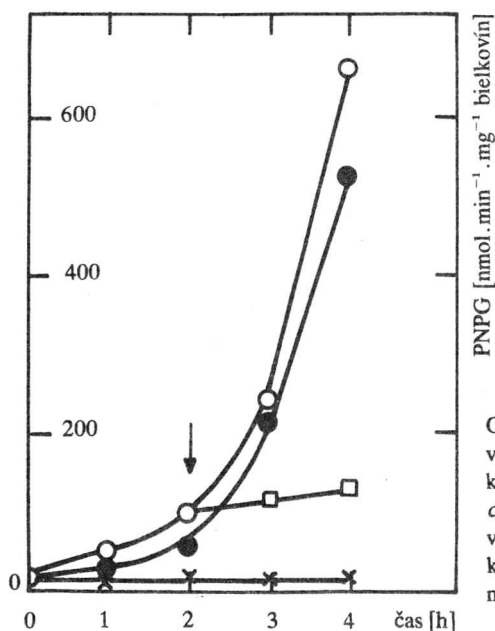
Obr. 1. Účinok kyseliny bongkrekovej na indukovanú syntézu α -D-glukozid-glukohydrolázy v bunkách štandardného kmeňa kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* DT XII, vyrastených 24 h v médiu s glukózou (20 g/l). ○—○ kontrola, ●—● kyselina bongkreková (10 μ g/ml), x—x cykloheximid (200 μ g/ml).

Tabuľka 1. Syntéza indukovanej α -D-glukozid-glukohydrolázy pri štandardnom kmeni kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* DT XII v prítomnosti KCN a kyseliny bongkrekovej. Aktivity α -D-glukozid-glukohydrolázy v bunkách vyrastených 24 h v médiu s glukózou (20 g/l) boli stanovené po 4 h indukcie v prítomnosti a neprítomnosti uvedených inhibítorov

Inhibítor	α -D-glukozid-glukohydroláza (% kontroly)
KCN (2 μ mol/ml)	84
Kyselina bongkreková (10 μ g/ml)	95
KCN (2 μ mol/ml) + kyselina bongkreková (10 μ g/ml)	73

naznačujú, že u kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* pre syntézu α -D-glukozid-glukohydrolázy indukovanej maltózou nie je potrebné ani spojenie hladín ATP medzi mitochondriami a cytozolom ani normálna hladina intramitochondriálneho ATP.

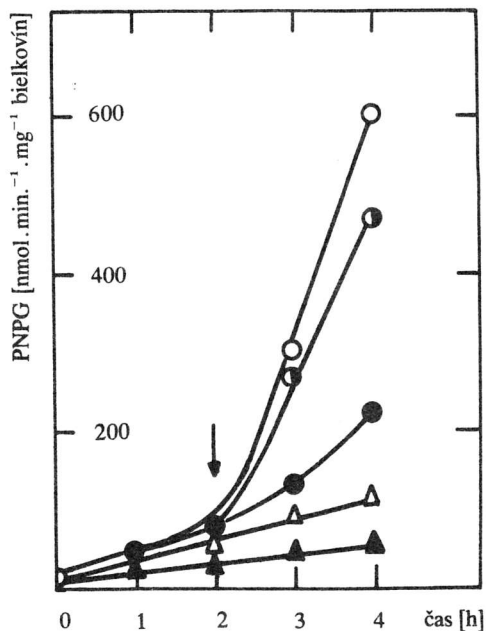
Tento záver potvrdilo aj štúdium syntézy α -D-glukozid-glukohydrolázy v neutrálnom cytoplazmatickom respiračnodeficitnom mutante *Saccharomyces cerevisiae*, ktorému chýba mitochondriálny genóm a nie je schopný syntetizovať bielkoviny



Obr. 2. Účinok kyseliny bongkrekovej na indukovanú syntézu α -D-glukozid-glukohydrolázy v bunkách respiračno-deficitného mutantu kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* DT XII A, vyrastených 24 h v médiu s glukózou (5 g/l). ○—○ kontrola, ●—● kyselina bongkreková (10 μ g/ml), x—x cykloheximid (200 μ g/ml), □—□ glukóza (20 mg/ml) pridaná v čase označenom šipkou.

vnútri mitochondrií [22]. Tento mutant však bol schopný syntetizovať α -D-glukozid-glukohydrolázu indukovanú maltózou obdobne ako štandardný kmeň. V dereprimovaných bunkách vyrastených do stacionárnej fázy v médiu s glukózou (5–20 g/l) prítomnosť kyseliny bongkrekovej v indukčnom médiu nezabránila syntéze α -D-glukozid-glukohydrolázy. Syntéza α -D-glukozid-glukohydrolázy bola však veľmi citlivá na glukózovú represiu (glukóza pridaná v 2. hodine), pričom bola úplne inhibovaná inhibítorom translácie — cykloheximidom (obr. 2). Na druhej strane v bunkách zobratých z exponenciálnej fázy rastu v médiu obsahujúcom vyššie koncentrácie glukózy (20–50 g/l) bola indukovaná syntéza α -D-glukozid-glukohydrolázy v prítomnosti kyseliny bongkrekovej oveľa nižšia (obr. 3). Navyše citlivosť proti inhibičnému účinku sa zvýšila, pričom bola oveľa vyššia v prvých dvoch hodinách indukcie ako po pridaní kyseliny bongkrekovej v druhej hodine. Tento rozdielny účinok kyseliny bongkrekovej sa môže pripisovať zvýšenému stupňu katabolickej represie [18], čo sa viac prejavilo v bunkách vyrastených v médiu s glukózou (50 g/l).

Ak sa bunky respiračnodeficitného mutanta, predrastené v médiu obsahujúcom glukózu (5–20 g/l), preniesli do rovnakého média obsahujúceho namiesto glukózy ako zdroja uhlíka maltózu (20 g/l), pozoroval sa normálny rast buniek na disacharide. Prídavok kyseliny bongkrekej do maltózového média nezabránil využitiu maltózy, aj keď rozmnožovanie buniek v tomto prípade sa obmedzilo iba na 2–3 generácie, ako sa dalo predpokladať podľa nedávnych zistení pre glukózu [18, 19].



Obr. 3. Účinok kyseliny bongkrekej na indukovanú syntézu α -D-glukozid-glukohydrolázy v bunkách respiračnodeficitného mutanta kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* DT XII A, vyrastených 18 h v médiu obsahujúcom rôzne koncentrácie glukózy: 20 g/l (○) a 50 g/l (△). ○—○ kontrola pre bunky predrastené s glukózou (20 g/l), △—△ kontrola pre bunky predrastené s glukózou (50 g/l), ●—● kyselina bongkreková (10 µg/ml), ●—● kyselina bongkreková (10 µg/ml) pridaná v čase označenom šípkou, ▲—▲ kyselina bongkreková (10 µg/ml).

Tieto poznatky naznačujú, že aj za rastových podmienok, keď je požiadavka na glykolyticky tvorený ATP vyššia, kvasinky deficitné na intramitochondriálny ATP sú stále schopné syntetizovať α -D-glukozid-glukohydrolázu umožňujú katabolizmus maltózy v bunkách.

Výsledky tejto práce demonštrujú, že dereprimované bunky kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* v podmienkach deficiencie intramitochondriálneho ATP sú schopné syntetizovať α -D-glukozid-glukohydrolázu, indukovanú maltózou, pričom sa ukazuje, že schopnosť kvasiniek využívať maltózu nemusí závisieť od energetického pozadia mitochondrií.

Tabuľka 2. Rast respiračnodeficitného mutantu kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* DT XII A na maltóze v prítomnosti a neprítomnosti kyseliny bongkrekej. Bunky predrastené 24 h v polosyntetických médiách obsahujúcich uvedené zdroje uhlíka boli inokulované do média obsahujúceho maltózu na začiatočnú koncentráciu $2 \cdot 10^6$ buniek/ml. Po 24 h rastu pri 30 °C sa koncentrácia buniek v kultúre stanovila počítaním v Bürkerovej komôrke a po 48 h sa opäť prekontrolovala

Bunky predrastené v médiách obsahu- júcich	Rastový výťažok v médiu s maltózou (20 g/l) (10^6 buniek/ml)	
	bez inhibítora	kyselina bongkreková (5 µg/ml)
glukózu (5 g/l)	220	32
glukózu (20 g/l)	216	36
maltózu (20 g/l)	206	43

Literatúra

1. BARNETT, J. A.: Advan. Carbohydr. Chem. Biochem., 32, 1976, s. 126.
2. HAUTERA, P.—LÖVGREN, T.: V. Inst. Bew., 81, 1975, s. 309.
3. SIRO, M. R.—LÖVGREN, T.: Eur. J. Appl. Microbiol., 7, 1979, s. 59.
4. ALONSO, A.—KOTYK, A.: Folia microbiol., 23, 1978, s. 97.
5. DE PA FUENTE, G.—SOLS, A.: Biotrim. Biophys. Acta, 56, 1962, s. 49.
6. VAN WIJK, R.: Proc. Koninkl. Nederland. Akad. Wetenshap., C 71, 1968, s. 60.
7. ELORZA, M. V.—LOSTAN, C. M.—VILLANUEVA, J. R.—SENTANDREU, R.—SANCHEZ, E.: Biotrim. Biophys. Acta, 475, 1977, s. 638.
8. ZIMMERMAN, F. K.—EATON, N. R.: Mol. Gen. Genet., 134, 1974, s. 261.
9. GÖRTS, C. P. M.: Antonie van Leeuwenhoek, 35, 1969, s. 233.
10. MORTIMER, R. K.—HAWTHORNE, D. C.: in The Yeast (Rose, A. H., Harvis, J. S., Eds.), Vol. 1, s. 385. London-New York, Academic Press 1969.
11. KHAN, N. A.—ZIMMERMAN, F. K.—EATON, N. R.: Mol. Gen. Genet., 124, 1973, s. 365.
12. ZIMMERMAN, F. K.—KAUFMANN, J.—ROSENBERGER, H.—HAUSMANN, P.: Mol. Gen. Genet., 151, 1977, s. 95.
13. PUGLISI, P. P.—ALGERI, A. A.: Mol. Gen. Genet., 110, 1971, s. 110.
14. SCHAMHART, D. H. J.—TEN BERGE, A. M. A.—VAN DE POLL, K. W.: J. Bacteriol., 121, 1975, s. 747.
15. EVANS, I. H.—WILKIE, D.: Genet. Res. Comb., 27, 1976, s. 89.
16. MAHLER, A. R.—WILKIE, D.: Plasmid, 1, 1978, s. 125.
17. ŠUBÍK, J.—TAKÁČSOVÁ, G.—KOVÁČ, L.: Mol. Gen. Genet., 166, 1978, s. 103.
18. ŠUBÍK, J.—KOLAROV, J.—KOVÁČ, L.: Biotrim. Biophys. Acta, 49, 1972, s. 192.
19. ŠUBÍK, J.—KOLAROV, J.—KOVÁČ, L.: Biotrim. Biophys. Acta, 357, 1974, s. 453.
20. KRÁTKY, Z.—BIELY, P.—BAUER, Š.: Eur. J. Biochem., 54, 1975, s. 459.
21. ZAMENHOF, S.: in Methods in Enzymology (Colowick, S. P., Kaplan, N. O., Eds.). Vol. 3, s. 702. New York, Academic Press 1957.
22. KUŽELA, Š.—GREČNÁ, E.: Experientia, 25, 1969, s. 776.

Влияние энергетического состояния митохондрий на индуцированный синтез α -D-глюкозид-глюкогидролазы в клетках *Saccharomyces cerevisiae*

Резюме

Изучался индуцированный синтез α -D-глюкозид-глюкогидролазы (Е.С. 3.2.1.20). В условиях недостатка АТФ в митохондриях дрожжей. Было обнаружено, что дефицит АТФ в митохондриях дерепрессированных клеток стандартного штамма и соответствующего респирационно дефицитного мутанта *Saccharomyces cerevisiae* не воспрепятствовал синтезу α -D-глюкозид-глюкогидролазы, индуцированному мальтозой. Результаты указывают на то, что экспрессия генов ядра, специфицирующих α -D-глюкозид-глюкогидролазы и катаболизм мальтозы в дрожжах, очевидно, не зависит от регулярной функции митохондриального транслокатора для адениновых нуклеотидов и даже не требует наличия нормального уровня АТФ в митохондриях дрожжей.

The influence of mitochondria energy state on induced synthesis of α -D-glucoside-glucohydrolase in *Saccharomyces cerevisiae* cells

Summary

An induced synthesis of α -D-glucoside-glucohydrolase (E.C. 3.2.1.20) has been studied under the conditions of ATP deficiency in yeast mitochondria. It was found, that the ATP deficiency in mitochondria of derepressed cells of a standard strain and corresponding respiratory deficient mutant *Saccharomyces cerevisiae* did not prevent synthesis of α -D-glucoside-glucohydrolase induced by maltose. Results indicate that the expression of nuclear genes specifying α -D-glucoside-glucohydrolase and maltose catabolism in yeast is evidently independent of regular function of mitochondrial translocator for adenine nucleotides and it even does not require the presence of normal ATP level in yeast mitochondria.