

ПРОНИНА О.В.^{1,2}✉, РУШКОВСЬКИЙ С.Р.¹, МОРГУН Б.В.^{1,2}, ДЕМИДОВ С.В.¹¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», Україна, 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 64² Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: olpronina@icbge.org.ua

✉ olpronina@icbge.org.ua, (066) 380-51-22

ВПЛИВ ВТРАТИ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ДНК НА РОЗВИТОК СКЛАДНИХ КОЛОНІЙ ШТАМУ SK1 ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Мета. Визначити вплив втрати мітохондріальної ДНК (мтДНК) на формування складних колоній дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. **Методи.** Протягом 40 діб спостерігали за розвитком гігантських колоній батьківського штаму SK1 (rho^+) та «петіт» штаму SK1p, який втратив мтДНК (rho^0 мутація). Для визначення зон загибелі клітин у колоніях культивували колонії обох штамів на середовищах із додаванням барвників, які накопичуються в мертвих клітинах. Виживання клітин колоній визначали за здатністю до створення мікроколоній. **Результати.** Втрата мітохондріальної ДНК в клітинах штаму SK1p дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* призводить до зменшення площі колоній та спрощення їх морфології на YPD середовищі. За культивування на середовищах із додаванням барвників у центрі колоній штаму SK1p формується яскрава пляма внаслідок накопичення барвників в мертвих клітинах, при цьому для батьківського штаму характерним є незначне рівномірне забарвлення. **Висновки.** rho^0 мутація в SK1p штамі дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* призводить до значного спрощення структури складних колоній, які утворюються на поживному середовищі YPD. Втрата мітохондріальної ДНК призводить до прискореної загибелі клітин у центрі колоній штаму SK1p на YPD.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, rho^0 , колонії, виживаність клітин.

Широкий спектр захворювань людини супроводжується порушеннями у стані мітохондріальної ДНК (мтДНК) [1, 2]. Так, для пухлинних клітин характерними є значні перебудови в мтДНК та перемикання на гліколіз для утворення АТФ [2]. Порушення в стані мітохондрій унаслідок накопичення пошкоджень у мтДНК також вважається однією з причин старіння та

супутніх йому вікових патологічних станів. Важливу роль у вивченні патологій, пов'язаних із дестабілізацією мітохондріального геному, мають дослідження із застосуванням такого широко вживаного модельного об'єкта генетики, як пекарські дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* [3, 4].

Стан мітохондрій у дріжджових клітинах відіграє важливу роль у багатьох процесах регуляції клітинних функцій, зокрема таких, як відповідь на умови навколишнього середовища або на сигнальні молекули, які надходять від інших клітин у популяції [5, 6]. Завдяки здатності реагувати на такі сигнали дріжджова клітинна популяція здатна утворювати складні організовані співтовариства: біоплівки на напіврідких середовищах або складні колонії на щільних поживних середовищах [7–11].

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* є «петіт»-позитивними, тобто вони можуть існувати за значних порушень у стані мітохондріальної ДНК (мтДНК) аж до її повної втрати; запас АТФ в клітині при цьому поповнюється завдяки процесу ферментації [12]. Втрата клітинами мтДНК призводить до порушення дихання в мітохондріях. Унаслідок цього клітини таких колоній втрачають здатність до засвоєння джерел вуглецю, для переробки яких потрібне окислення в мітохондріях. Зміни стану мітохондрій, які виникають унаслідок перебудов або втрати мтДНК, призводять до порушень здатності клітин до реагування на зовнішні сигнали, що викликає різкі зміни в морфології колоній та сповільнення їх росту [12–14].

Таким чином, метою нашого дослідження стало визначення впливу втрати мітохондріальної ДНК як на формування складних колоній дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, так і на стан клітинних популяцій у цих колоніях.

Матеріали і методи

Штами дріжджів. У роботі було використано штами SK1 та SK1p дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Диплоїдний штам SK1 має генотип *MATa/α HO gal2 cup^S can1^R BIO rho⁺* [15]. Цей штам є гомоталічним прототрофом. Він широко використовується для вивчення процесів споруляції, крім того, завдяки здатності утворювати складні колонії та біоплівки, його було запропоновано як зручний об'єкт для вивчення регуляції флокуляції. Для отримання («петіт») штаму SK1p, у якому було видалено мітохондріальну ДНК (*rho⁰* мутація), батьківський штам було оброблено бромистим етидієм (10 мкг/мл). Втрату мтДНК було підтверджено за допомогою люмінесцентної мікроскопії (мікроскоп Люмам-2, СРСР) після прижиттєвого фарбування DAPI.

Поживні середовища. В роботі було використано щільне поживне середовище для культивування дріжджів YPD (2 % глюкоза, 1 % дріжджовий екстракт, 2 % пептон), до складу якого додавався один із барвників (бромкрезоловий пурпуровий, бромфеноловий блакитний, трипановий синій або флоксин Б).

Бромкрезоловий пурпуровий водорозчинний є рН індикатором, інтервал переходу якого знаходиться у межах рН 5,2 (жовтий) до рН 6,8 (пурпуровий). Барвники, які є індикаторами рН, дають змогу спостерігати за змінами цього показника як в самій колонії, так і в поживному середовищі навколо колонії [16]. Бромфеноловий блакитний також є рН індикатором, з інтервалом переходу від 3,0 до 4,6. При цьому відбувається зміна кольору від жовтого до синього. Внесення цього барвника в поживне середовище за культивування дріжджів було запропоновано для виявлення колоній «петітів» на чашці [17]. Флоксин Б є червоним барвником із бактерицидними властивостями завдяки здатності утворювати вільні радикали під час опромінення світлом. Трипановий синій надає розчину синьо-фіолетового забарвлення. Його та флоксин Б використовують для виявлення мертвих колоній у посівах [18]. Усі названі барвники мають властивість накопичуватися в клітинах із пошкодженою цитоплазматичною мембраною, що дає змогу оцінити кількість мертвих клітин у популяції.

Барвники додавали до розплавленого поживного середовища YPD у таких кінцевих концентраціях: бромкрезоловий пурпуровий – 0,01 %, бромфеноловий блакитний – 0,002 %, трипановий синій – 0,0008 %, флоксин Б – 0,0004 %.

Концентрації використаних барвників, які не пригнічували ріст дріжджових культур, було визначено за літературними даними [16–18]. Для виявлення змін у кольорі середовищ із барвниками з часом чашки з ними після розливання залишали інкубували протягом досліду (14 діб) та періодично фотографували. Різниці було зареєстровано тільки для чашок із флоксином Б. За умовами додавання цього барвника середовище набувало рожевого кольору, який поступово вицвітає.

Методи. Для аналізу поступових змін у морфології колоній обох штамів було використано метод гігантських колоній. Для цього клітини висівали в центр чашки Петрі з середовищем YPD уколком та вирощували за 28°C протягом 40 діб і фотографували 2 рази на тиждень. Досліди повторювали тричі. Для характеристики росту обох штамів проводили визначення загальної площі колоній. Для цього аналізували отримані зображення за допомогою програми для обробки та аналізу зображень ImageJ (imagej.nih.gov).

Для аналізу накопичення барвників під час росту колоній SK1p та SK1 штами сіяли по 5 колоній на чашку на середовище YPD без барвників або з додаванням одного з них. Колонії фотографували на 4, 7, 10 та 14 добу. Досліди повторювали двічі. Для виявлення забарвлених зон у внутрішніх шарах колоній робили вертикальні зрізи 14-добових колоній, які росли на середовищі з додаванням флоксину Б.

Фотозйомку проводили за допомогою фотоапарата Canon EOS 1000D. Фотографували як повністю чашки для порівняльного аналізу росту колоній та змін у зафарбовуванні поживного середовища, так і проводили макрозйомку окремих колоній для більш детального аналізу змін у їх морфології або виявлення зон накопичення барвників. Обробку та аналіз отриманих зображень проводили за допомогою графічного редактора FastStone Image Viewer (www.faststone.org).

Оцінку стану клітин колоній проводили за допомогою світлової мікроскопії. Накопичення флоксину Б та бромкрезолового пурпурового в клітинах визначали за допомогою люмінесцентної мікроскопії (мікроскоп Люмам-2). Для оцінки життєздатності клітин у центрі та на межі колоній використовували метод мікроколоній. Для цього суспензії клітин наносили на пластини з YPD і культивували упродовж 1 доби за

28°C, після цього аналізували за допомогою світлової мікроскопії здатність клітин до утворення мікроколоній. Визначені показники виживаності клітин порівнювали методом χ -квадрат [19].

Результати та обговорення

Тривале культивування гігантських колоній дріжджів на щільному поживному середовищі дало змогу виявити різницю в стадіях розвитку колоній батьківського та «петіт» штамів за рядом морфологічних ознак. Як відомо з літературних даних [12], втрата клітинами мтДНК призводить до утворення колоній маленького розміру – так званих «петіт» колоній на противагу типових «гранде» колоній батьківського штаму. Так, за оцінки загальної площі колоній SK1р штаму нами було виявлено, що вони розвиваються значно повільніше та сягають менших розмірів, ніж колонії SK1, внаслідок неспроможності до споживання джерел вуглецю, що потребують ферментації, після виснаження глюкози в середовищі (рис. 1).

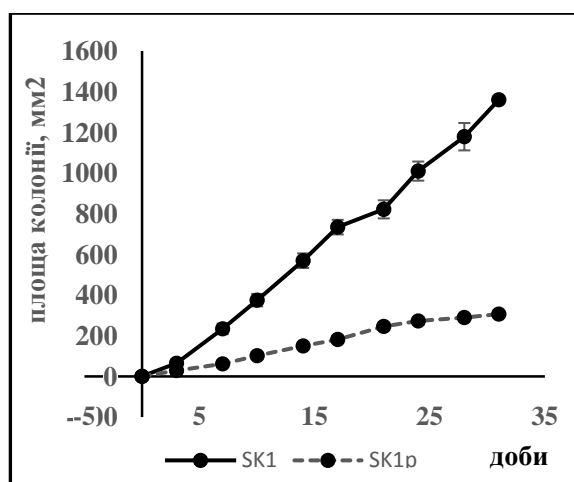


Рис. 1. Залежність площі гігантських колоній штамів SK1 (rho^+) та SK1р (rho^0) від їх віку, YPD.

Цікавою особливістю розвитку «петітів», яку ми спостерігали, є значне спрощення структури поверхні завдяки зникненню розгалужених фракталоподібних структур. Замість цього навкруги плоского центру утворюються чітко розподілені сектори росту з поперечними смугами, що виникають, як ми припускаємо, внаслідок хвильового чергування в активності наростання клітинної популяції (рис. 2Б). Такі особливості морфології колоній «петітів» пояснюються тим, що під впливом rho^0 мутації відбувається зни-

ження активності *FLO11* гена [13, 14], продуктом якого є позаклітинний полісахарид флоккулін, який потрібен для визначального в морфології складних колоній псевдогіфального та інвазивного росту [7].

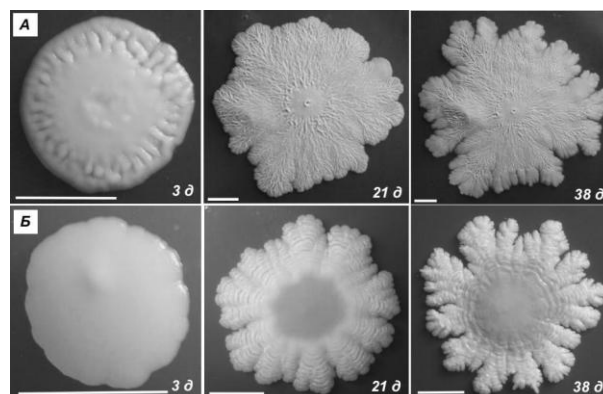


Рис. 2. Морфологія складних колоній на щільному середовищі YPD: (А). SK1 (rho^+); (Б). «Петіт» SK1р (rho^0) на 3, 21, 38 добу, масштабна лінія – 5 мм.

Починаючи з 10 доби культивування, в центрі колоній SK1р, які росли на повному середовищі YPD, починає проявлятися жовте забарвлення, яке поступово розповсюджується значною площею (рис. 2Б). Зміни в структурі колонії в цій ділянці надають нам змогу припустити, що поява такого забарвлення є наслідком хронологічного старіння, за якого відбувається активне відмирання клітинної популяції.

Порушення в фізіологічному стані клітин можуть бути проаналізовані за допомогою внесення в поживне середовище нетоксичних барвників. Так, для ряду барвників була виявлена здатність до накопичення в клітинах із пошкодженою мембраною, що дає змогу вирізнити або повністю мертві колонії, або такі ділянки колонії, які відмирають [18]. Завдяки цьому використання барвників для характеристики розвитку дріжджових колоній дає нам змогу отримати інформацію як про їх фізіологічний стан, так і про метаболічні процеси, що відбуваються в них. Для підтвердження цього припущення та виявлення інших зон загибелі клітин у тілі колонії нами було проведено культивування SK1 та SK1р штамів на YPD середовищі з додаванням барвників, які накопичуються в мертвих клітинах.

Всі використані в роботі барвники накопичувалися в колоніях батьківського штаму за дещо схожою схемою. Так, на 3 добу в центрі

колонії SK1 з'являлося слабке забарвлення, яке поступово рівномірно розповсюджувалося на поверхню всієї колонії, окрім більш слабого забарвлення межі колонії та накопичення барвника в виростах на поверхні колонії. На 14 добу культивування яскраво виражених плям барвника на поверхні SK1 не формувалося (рис. 3А).

У колоніях SK1р штаму на 3 добу ми реєстрували схоже слабке забарвлення центру, але при цьому формувалися несиметричні ділянки більш насиченого кольору. З віком колонії в центрі формується яскрава пляма, що супроводжується змінами в морфології цієї ділянки (рис. 3Б). Формування центральної забарвленої плями виявляється раніше, ніж поява жовтої ділянки в центрі колоній «петітів» на середовищі без додавання барвників. Таким чином, використання середовища з барвниками дає нам змогу чітко виявити ділянки, в яких накопичуються мертві клітини до того, як зміни в стані клітинної популяції спричинять морфологічний прояв у колоніях. Усі використані в роботі барвники накопичувалися колоніями «петітів» за схожою схемою.

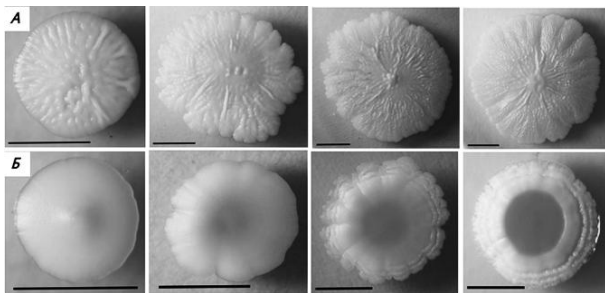


Рис. 3. Накопичення флоксину Б в колоніях SK1 (ρ^+) (А) та SK1р (ρ^0) (Б) штамів дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* на YPD середовищі на 3, 7, 10, 14 добу культивування, масштабна лінія – 5 мм.

Вертикальні зрізи через центральну частину колоній батьківського штаму, що ріс упродовж 14 діб на середовищі з додаванням флоксину Б, показали, що барвник накопичувався значною мірою в серединному шарі колонії. Аналіз суспензії клітин із цих колоній за допомогою люмінесцентного мікроскопа виявив, що накопичення барвника відбувалося значною мірою в оболонках аскоспор, при цьому реєструвалися як мертві вегетативні клітини, так і окремі нежиттєздатні аскоспори в асках.

На зрізі колоній «петіту» забарвленою є вся центральна частина колонії, найбільше накопичення барвника реєструється у поверхне-

вому шарі колонії. У клітинах центральної частини колонії штаму SK1р відбувається активне накопичення барвника, що свідчить про масову загибель клітин у цій ділянці.

Для підтвердження значної втрати життєздатності клітин у центрі колоній нами було відібрано клітини як із центральних, так із межових ділянок колоній штамів SK1 та SK1р і здійснена оцінка їх колонієутворювальної здатності за допомогою методу мікроколоній (рис. 4А, Б).

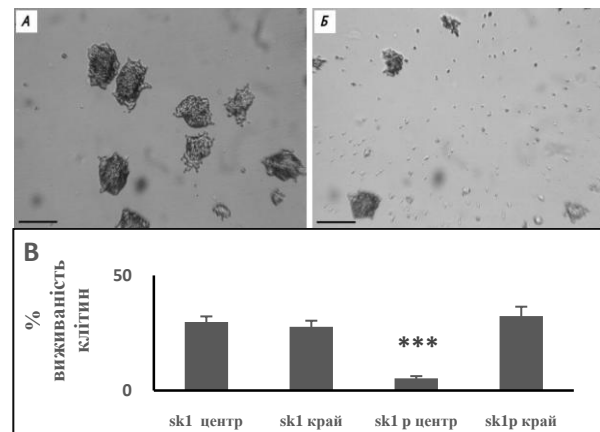


Рис. 4. Мікроколонії, утворені клітинами з центральної частини колоній SK1 (ρ^+) (А) та SK1р (ρ^0) штамів дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (Б) (24 години, YPD, масштабна лінія – 100 мкм); (В) виживаність клітин (%) у центрі та на межі колоній штамів SK1 і SK1р (YPD, 14 діб).

Оцінка стану клітин за допомогою світлової мікроскопії виявила, що клітини центру колонії «петіт» штаму виявляють ознаки значної загибелі на відміну від клітин межі колонії. Підрахунок мікроколоній, утворених під час пересіву клітин колоній обох штамів на свіже поживне середовище підтвердив, що в центральній ділянці виживаність клітин знижується до $5,3 \pm 0,9$ % на відміну від $32,3 \pm 4,1$ % на межі колонії, що є статистично достовірною різницею (рис. 4В). Для вихідного ρ^+ штаму ці дані становлять $29,7 \pm 2,4$ % та $27,7 \pm 2,6$ % відповідно.

Таким чином, було показано, що ρ^0 мутація (втрата мітохондріальної ДНК) призводить до значних змін у морфології структурованих складних колоній та значного зниження виживаності клітин у центрі колонії.

Висновки

1. ρ^0 мутація в SK1р штамі дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* призводить до значно-

го спрощення структури складних колоній, які утворюються на повному поживному середовищі YPD.

2. Втрата мітохондріальної ДНК призводить до прискореної загибелі клітин у центрі колонії SK1p штаму на YPD.

Автори висловлюють подяку Vassiliki Koufopanou (Imperial College London, England) за наданий для дослідження штаму Saccharomyces cerevisiae SK1. Робота була фінансово підтримана відомчою тематикою НАН України (Державний реєстраційний номер 0118U003663).

Література

- Wallace D.C. A Mitochondrial paradigm of and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 2005. Vol. 39. P. 359–407. doi: 10.1146/annurev.genet.39.110304.095751.
- Galluzzi L., Morselli E., Kepp O., Vitale I., Rigoni A., Vacchelli E., Michaud M., Zischka H., Castedo M., Kroemer G. Mitochondrial gateways to cancer. *Mol Aspects Med.* 2009. Vol. 31. P. 1–20. doi: 10.1016/j.mam.2009.08.002.
- Botstein D., Fink G. Yeast: an experimental organism for 21st century biology. *Genetics.* 2011. Vol. 189. P. 695–704. doi: 10.1534/genetics.111.130765.
- Vachova L., Cap M., Palkova Z. Yeast Colonies: A model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity. *Oxidative Med Cell Longev.* 2012 Art. N: 601836 doi: 10.1155/2012/601836.
- Cap M., Vachova L., Palkova Z., Longevity of U cells of differentiated yeast colonies grown on respiratory medium depends on active glycolysis. *Cell Cycle.* 2015. Vol. 14, No. 21, P. 3488–3497. doi: 10.1080/15384101.2015.1093706.
- Podholová K., Plocek V., Rešetárová S., Kučerová H., Hlaváček O., Váchová L., Palková Z. Divergent branches of mitochondrial signaling regulate specific genes and the viability of specialized cell types of differentiated yeast colonies. *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, No. 13. P. 15299–15314. doi: 10.18632/oncotarget.8084.
- Reynolds T.B., Fink G.R. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science.* 2001. Vol. 291. P. 878–881. doi: 10.1126/science.291.5505.878.
- Honigberg S.M. Cell signals, cell contacts, and the organization of yeast communities. *Eukaryot Cell.* 2011. Vol. 10. P. 466–473. doi: 10.1128/EC.00313-10.
- Maršíková J., Wilkinson D., Hlaváček O., Gilfillan G. D., Mizeranschi A., Hughes T., Begany M., Rešetárová S., Váchová L., Palková Z. Metabolic differentiation of surface and invasive cells of yeast colony biofilms revealed by gene expression profiling. *BMC Genomics.* 2017. Vol. 18. P. 1–16. doi: 10.1186/s12864-017-4214-4.
- Arlia-Ciommo A., Pianoy A., Leonov A., Svistkova V., Titorenko V. Quasi-programmed aging of budding yeast: a trade-off between programmed processes of cell proliferation, differentiation, stress response, survival and death defines yeast lifespan. *Cell Cycle.* 2014. Vol. 13, No. 21. P. 3336–3349. doi: 10.4161/15384101.2014.965063.
- Honigberg S.M. Similar environments but diverse fates: responses of budding yeast to nutrient deprivation. *Microbial Cell.* 2016. Vol. 3, No. 8. P. 302–328. doi: 10.15698/mic2016.08.516.
- Chandel N.S., Schumacker P.T. Cells depleted of mitochondrial DNA (p^0) yield insight into physiological. *FEBS Lett.* 1999. Vol. 454. P. 173–176. doi: 10.1016/S0014-5793(99)00783-8.
- Aun A., Tamm T., Sedman J. Dysfunctional mitochondria modulate cAMP-PKA signaling and filamentous and invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2012. Vol. 193. P. 467–481. doi: 10.1534/genetics.112.147389.
- Strudwick N., Brown M., Parmar V.M., Schroder M. Ime1 and Ime2 are required for pseudohyphal growth of *Saccharomyces cerevisiae* on nonfermentable carbon sources. *Mol. Cell Biol.* 2010. Vol. 30, No. 23. P. 5514–5530. doi: 10.1128/MCB.00390-10.
- Kane SM, Roth J. Carbohydrate metabolism during ascospore development in yeast. *Bacteriol.* 1974. Vol. 118. P. 8–14.
- Kurzweilova H, Sigler K. Fluorescent staining with bromocresol purple: a rapid method for determining yeast cell dead count developed as an assay of killer toxin activity. *Yeast.* 1993. Vol. 9. P. 1207–1211. doi: 10.1002/yea.320091107.
- Nagai S. Brom cresol green and brom phenol blue as indicators of respiration deficiency in yeast technology. *Stain technology.* 1965. Vol. 40, No. 3. P. 147–150.
- Kucsera J., Yarita K., Takeo K. Simple detection method for distinguishing dead and living yeast colonies. *Journal of Microbiological Methods.* 2000. Vol. 41. P. 19–21. doi: doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00136-6.
- Quinn G. P., Keough M. J. Experimental design and data analysis for biologists. New York: Cambridge University Press, 2002. 553 p

PRONINA O.V.^{1,2}, RUSHKOVSKY S.R.¹, MORGUN B.V.^{1,2}, DEMIDOV C.V.¹

¹Educational and Scientific Center “Institute of Biology and Medicine”, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 01033, Kyiv, Volodymyrska str., 64, e-mail: olpronina@icbge.org.ua

²Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Science of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 148

INFLUENCE OF MITOCHONDRIAL DNA LOSS ON COMPLEX COLONY DEVELOPMENT IN YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE STRAIN SK1

Aim. Determine the effect of mitochondrial DNA loss on the formation of complex yeast colonies of *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods.** Development of giant colonies of the parent strain SK1 (rho^+) and the "petit" strain SK1p, which lost mtDNA (rho^0 mutation), was observed for 40 days. To find out zones of cell death in colonies, both strains were cultured on solid YPD media containing dyes that accumulate in dead cells. The survival of the cells within colony was

estimated by the ability to create microcolonies. **Results.** The loss of mitochondrial DNA in SK1p cells led to a decrease in colony area and to simplification of colony morphology on the YPD medium. When SK1p colonies were cultivated on media with addition of dyes, bright spot was formed in the center due to the dyes accumulation in dead cells. At the same time, parent strain developed a uniform insignificant coloration. **Conclusions.** *rho*⁰ mutation in SK1p yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* led to a significant simplification of complex colony structure that formed on the nutrient medium YPD. The mitochondrial DNA loss in strain SK1p results in an accelerated cell death in the center of colony on YPD.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *rho*⁰, colonies, cell survival.