

# APOPTOZA U DROŹDŹY PĄCZKUJĄCYCH *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* – MECHANIZM ŚMIERCI CZY PRZETRWANIA?

Małgorzata Szabelska, Eugenia Gospodarek\*, Emilia Ciok-Pater

Katedra i Zakład Mikrobiologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy  
UMK w Toruniu, 85-094 Bydgoszcz, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9

Wpłynęło w marcu 2007 r.

1. Wstęp. 2. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* modelowym organizmem eukariotycznym. 3. Czynniki indukujące apoptozę u *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Czynniki pro- i antyapoptotyczne w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*. 5. Fizjologiczna rola programowanej śmierci komórkowej u *Saccharomyces cerevisiae*. 6. Podsumowanie

## Apoptosis in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* – mechanism of death or survival?

**Abstract:** Apoptosis is a highly regulated form of programmed cell death (PCD) crucial for life and health in *Metazoa*. Yeast have been used as a model eucaryotic organism to study apoptosis. Unexpectedly, several researchers observed a PCD process in yeast in response to heterologous expression of proapoptotic genes. Following that discovery, different factors inducing apoptosis in yeast cells were identified, e.g. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acetic acid, cellular ageing, failed mating. Further investigations revealed that several regulators of apoptosis are conserved between *Metazoa* and yeast. There are three natural conditions of yeast population i.e. environmental stress conditions, failure to mate, and aging in which PCD in yeast cells occurs and seems to be beneficial for the whole population. Therefore, PCD might serve as an important regulator of yeast cell populations. However, the lack of homologs of crucial PCD regulators, such as Bcl-2 family proteins or unidentified genuine substrates for Yeast Caspase-1, make the existence of PCD mechanism in yeast disputable. The ability to manipulate fungi still presents exciting challenges. The manipulations of fungal PCD could provide a basis for future therapies.

1. Introduction. 2. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model eukaryotic organism. 3. Apoptosis inducing factors in *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Pro- and antiapoptotic factors in *Saccharomyces cerevisiae* cells. 5. Physiological role of programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. 6. Conclusion

**Słowa kluczowe:** apoptoza, drożdże, kaspazy, PCD, ROS

**Key words:** apoptosis, yeast, caspases, PCD, ROS

## 1. Wstęp

Apoptoza, zwana także programowaną śmiercią komórki (programmed cell death, PCD), jest to niezwykle precyzyjnie regulowany proces fizjologicznej śmierci. Odgrywa kluczową rolę w rozwoju organizmów wielokomórkowych, utrzymaniu homeostazy tkankowej i narządowej oraz eliminacji komórek nieprawidłowych. Zaburzenia mechanizmu PCD u ludzi mogą prowadzić do rozwoju poważnych chorób neurodegeneracyjnych, nowotworowych, wirusowych. Zmiany morfologiczne i biochemiczne zachodzące w apoptotycznych komórkach ssaków zostały szeroko badane i opisane. Należą do nich przede wszystkim: pofałdowanie błony komórkowej, eksternalizacja fosfatydyloseryny (phosphatidyloserine, PS), kondensacja i marginacja chromatyny, fragmentacja DNA, tworzenie ciałek apoptotycznych [28, 34]. W celu poznania molekularnego podłoża apoptozy niejednokrotnie wykorzystywano modelowy organizm eukariotyczny – *Saccharomyces cerevisiae* (rzadziej *Schizosaccharomyces*

*pombe*) [11, 12]. Nieoczekiwanie okazało się, że ten jednokomórkowy grzyb w pewnych warunkach ginie wykształcając fenotyp komórki apoptotycznej [19, 24]. Odkrycie to zapoczątkowało szereg badań nad zdolnościami komórek drożdży do wchodzenia w apoptozę.

## 2. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* modelowym organizmem eukariotycznym

Drożdże, w szczególności *S. cerevisiae*, stanowią modelowy organizm eukariotyczny [3, 4]. Istnieje ku temu wiele powodów. Dają się łatwo hodować w dużych ilościach na rozmaitych podłożach, w tym syntetycznych o ściśle określonym składzie. Znana jest obecnie pełna sekwencja DNA genomu *S. cerevisiae* [6]. Żaden inny organizm eukariotyczny nie poddaje się tak łatwo różnorodnym doświadczeniom genetycznym. Znane są proste i skuteczne techniki wydajnej transformacji, ukierunkowanej inaktywacji genów, izo-lacji kwasów nukleinowych i białek. Opracowano

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu; 85-094 Bydgoszcz, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9; tel. (052) 585-40-47; e-mail: kizmikrob@cm.umk.pl

szereg dogodnych wektorów dwufunkcyjnych, replikujących się autonomicznie w komórkach drożdży, łatwych do izolacji i pozwalających na regulowanie liczby kopii w komórce [27].

Badania genetyczne i biochemiczne nad drożdżami miały zasadnicze znaczenie dla zrozumienia wielu podstawowych procesów przebiegających w komórkach eukariotycznych, włącznie z cyklem podziałów komórkowych [4]. Jeszcze dziesięć lat temu nikt nie przypuszczał, że ten prosty jednokomórkowy organizm może posiadać tak złożony mechanizm, jakim jest PCD. Komórka *S. cerevisiae* miała stanowić pewnego rodzaju pustą przestrzeń, wolną od czynników mogących interferować z produktami heterologicznych genów pro- i antyapoptotycznych.

Zaobserwowano, że ekspresja heterologicznych genów proapoptotycznych w komórkach drożdży powoduje na ich proliferację i może wywoływać śmierć [11, 12, 14, 15]. O tym, że jest to śmierć nosząca znamiona apoptozy donieśli *L i g r* i wsp. [19] opisując ekstermalizację PS, kondensację i marginację chromatyny, fragmentację DNA oraz tworzenie pęcherzyków apoptotycznych w komórkach *S. cerevisiae* z ekspresją genu *bax*. Koekspresja czynników antyapoptotycznych Bcl-x<sub>L</sub> lub Bcl-2 zapobiega efektem wywoływanym przez białka Bax i Bak [14, 15, 19].

*M a d e o* i wsp. [24] obserwowali cechy apoptotycznej śmierci – kondensację chromatyny, fragmentację DNA, ekstermalizację PS – w komórkach *S. cerevisiae* z mutacją punktową w genie cyklu komórkowego *cdc48* (*cdc*<sup>SS65G</sup>). Był to pierwszy opis apoptotycznych zmian w komórkach drożdży bez udziału heterologicznych czynników proapoptotycznych, sugerujący zatem obecność mechanizmu PCD u drożdży.

### 3. Czynniki indukujące apoptozę u *Saccharomyces cerevisiae*

W kolejnych latach, po odkryciu apoptotycznej komórki *S. cerevisiae*, opisano szereg czynników indukujących w komórkach drożdży śmierć ze znamionami apoptozy. Szczegółowe informacje dotyczące czynników apoptogennych dla drożdży przedstawia tabela I.

Jednak, brak homologicznych do ssaczych czynników pro- i antyapoptotycznych u drożdży, w szczególności homologów kaspaz, uznawanych za głównych „wykonawców” apoptozy, przez długi czas budził wątpliwości odnośnie istnienia mechanizmu PCD u drożdży.

### 4. Czynniki pro- i antyapoptotyczne w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*

W 2000 roku *U r e n* i wsp. [45] przeszukując bazy danych i porównując sekwencje aminokwasowe białek, zidentyfikowali dwie spokrewnione z kaspazami rodziny proteaz: parakaspazy u organizmów grupy *Metazoa* i *Dictyostelium discoideum*, oraz metakaspazy u roślin, grzybów i *Plasmodium falciparum*. Ich podobieństwo do kaspaz obejmuje zarówno strukturę pierwszorzędowną – z charakterystyczną parą aminokwasów Cys-His w centrum katalitycznym, jak i strukturę drugorzędowną. Wśród zidentyfikowanych metakaspaz znalazła się proteaza cysteinowa *S. cerevisiae*, Yor197w, nazwana później przez *S z a l l i e s* i wsp. [41] metakaspazą-1 (metacaspase-1, MCA1).

*M a d e o* i wsp. [26] oceniali aktywność proteazową MCA1. Badania dowiodły, że MCA1 jest akty-

Tabela I

Morfologiczne i biochemiczne zmiany obserwowane w komórkach drożdży pod wpływem działania wskazanych czynników

| Czynnik apoptogenny                                | Marker apoptozy | ROS | PS | Fragmentacja DNA | Kondensacja chromatyny | Aktywność Yca1p | Fragmentacja mitochondriów | Piśmiennictwo   |
|--|-----------------|-----|----|------------------|------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| Stres oksydacyjny (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) |                 | +   | +  | +                | +                      | +               | +                          | [9, 25, 26, 35] |
| Kwas octowy  |                 | +   | +  | +                | +                      | n               | +                          | [9, 23, 35]     |
| Stres hiperosmotyczny (NaCl, glukoza)              |                 | +   | +  | +                | +                      | +               | n                          | [10, 38]        |
| Szok cieplny                                       |                 | n   | n  | n                | n                      | n               | +                          | [9]             |
| Amfoterycyna B                                     |                 | +   | n  | +                | n                      | n               | n                          | [35]            |
| Toksyny killerowe                                  |                 | +   | +  | +                | +                      | n               | n                          | [36]            |
| Osmotyna   |                 | +   | n  | +                | +                      | n               | n                          | [32]            |
| Kwas walproinowy                                   |                 | +   | +  | n                | +                      | n               | n                          | [30]            |
| Aspiryryna   |                 | +   | +  | n                | n                      | n               | n                          | [1]             |
| Etanol   |                 | +   | n  | +                | +                      | n               | +                          | [16]            |
| Replikacyjna długość życia                         |                 | +   | +  | n                | +                      | n               | n                          | [18]            |
| Chronologiczna długość życia                       |                 | +   | +  | +                | +                      | +               | n                          | [13, 21]        |
| Feromony drożdżowe                                 |                 | +   | n  | n                | +                      | n               | n                          | [37]            |

+ – obserwowano; n – nie oceniano

wowana w sposób typowy dla kaspaz, po zadziałaniu czynnika indukującego apoptozę. Ponadto, wykazuje aktywność proteolityczną w stosunku do substratów kaspaz – VEID-AMC [N-acetyl-Val-Glu-Ile-Asp-AMC (AMC-7-Amino-4-methylcoumarin)] i IETD-AMC [N-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-AMC]. Niespecyficzny inhibitor kaspaz zVAD-FMK [benzylloksykarbonyl-Val-Ala-Asp(OCH<sub>3</sub>)-fluorometyloketon] całkowicie inaktywuje MCA1. Substytucja cysteiny w centrum katalitycznym prowadzi do zmniejszenia aktywności proteolitycznej MCA1. Ma d e o i wsp. [26] stwierdzili, że MCA1 funkcjonuje jako *bona fide* kaspaza u drożdży i zaproponowali nazwę – kaspaza-1 drożdży (yeast caspase-1, Yca1, gen *ycal*). Dotychczas nie zidentyfikowano rzeczywistych substratów Yca1p obecnych w komórkach drożdży.

Coraz większa wiedza na temat budowy i funkcjonowania kaspaz skłoniła do podjęcia badań nad związkami, które mogłyby hamować ich aktywność, a przez to regulować przebieg apoptozy. Zidentyfikowano wiele związków negatywnie regulujących aktywność kaspaz – IAP (inhibitor-apoptosis protein) [20]. Wspólną cechą IAPs jest domena BIR (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat), występująca w liczbie 1–3 kopii, uczestnicząca w oddziaływaniu między IAPs i kaspazami. Działanie antagonistyczne w stosunku do IAPs wykazuje u ssaków proteaza serynowa z rodziny HtrA (high temperature requirement) – HtrA2/Omi [46].

F a h r e n k r o g i wsp. [8] opisali homologiczne białko u drożdży, nazwane przez nich Nma111p (nuclear mediator of apoptosis). Wykazali jego proapoptotyczne działanie, zależne od aktywności proteazowej. Szczep *S. cerevisiae*  $\Delta$  *nma111* w porównaniu ze szczepem dzikim miał zwiększoną termotolerancję, a pod wpływem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nie wykazywał badanych cech komórki apoptotycznej – kondensacji chromatyny, fragmentacji DNA oraz zwiększonej produkcji ROS (reactive oxygen species). W przypadku szczepu z nadekspresją Nma111p obserwowano wskaźnik przeżywalności poniżej 40% z udziałem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jako induktora apoptozy, podczas gdy w tych samych warunkach przeżywało około 80% komórek szczepu *S. cerevisiae*  $\Delta$  *nma111*. Ponadto, sama nadekspresja Nma111p prowadziła do spadku przeżywalności komórek, wynosząc w 26-godzinnej hodowli około 75%, w porównaniu z 95% szczepu *S. cerevisiae*  $\Delta$  *nma111*.

W a l t e r i wsp. [47] wykazali, że substratem dla Nma111p jest białko Bir1p, homologiczne do IAPs, początkowo zidentyfikowane jako czynnik uczestniczący w procesie segregacji chromosomów i cytokinezie [44]. W a l t e r i wsp. [47] dowiedli, że Bir1p ma również właściwości antyapoptotyczne. Podobnie ssacze białko surwiwin wykazuje dwie aktywności [42]. Komórki szczepu *S. cerevisiae*  $\Delta$  *bir1* ujawniały typowy fenotyp apoptotyczny pod wpływem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Prze-

ciwnie zachowywał się szczep z nadekspresją Bir1p, który po zadziałaniu czynnika indukującego apoptozę miał zwiększony wskaźnik przeżywalności w porównaniu z dzikim szczepem oraz nie wykazywał charakterystycznych cech fenotypowych. Jednoczesna nadekspresja Nma111p znosiła ochronne dla komórek działanie Bir1p. Podobnie do surwiwinu Bir1p nie oddziałuje bezpośrednio z Yca1p [42]. Prawdopodobnie działanie zarówno surwiwinu, jak i Bir1p polega na stabilizacji innych czynników antyapoptotycznych. Zatem proapoptotyczna aktywność Nma111p, przynajmniej częściowo, polega na degradacji białka Bir1p.

Istnieje wiele dowodów na udział mitochondriów w procesie apoptozy u *Metazoa*. Nazywane są nawet organellami śmierci komórkowej. Szczególne znaczenie mają proapoptotyczne czynniki uwalniane z mitochondriów do cytoplazmy, tj. cytochrom c (cyt c), AIF (apoptosis inducing factor) i ROS. W komórkach ssaków uwolniony cyt c wraz z cytosolowym białkiem Apaf-1, ATP i prokaspazą-9 tworzą, tzw. apoptosom, w którym dochodzi do autokatalitycznej aktywacji prokaspazy-9. Z kolei kaspaza-9 aktywuje efektorową kaspazę-3 [5].

Pomimo iż uważano, że drożdże nie posiadają mechanizmu programowanej śmierci, M a n o n i wsp. [29] podjęli próbę oceny wpływu heterogenego białka Bax na mitochondria drożdży. Zaobserwowali gwałtowny spadek ilości cytochromów a i a<sub>3</sub>, a w konsekwencji spadek aktywności oksydazy cytochromowej oraz uwalnianie cyt c do cytoplazmy. Cytochromy b i c1a<sub>1</sub> oraz kompleks ATPazy pozostały niezmiennic. Koekspresja heterogenego Bcl-x<sub>L</sub> całkowicie znosiła efekt wywołany przez Bax.

L u d o v i c o i wsp. [22] odnotowali te same zmiany w mitochondrium komórek *S. cerevisiae* podczas apoptozy indukowanej kwasem octowym.

Rola cyt c w cytoplazmie drożdży, jak dotąd, pozostaje nieznaną. Przez analogię do ssaków, celowe wydaje się zbadanie interakcji między cyt c a Yca1p.

Z drugiej strony uwolnienie cyt c do cytoplazmy wiąże się z jego niedoborem w mitochondrium, co musi mieć swoje konsekwencje w funkcjonowaniu łańcucha oddechowego. Przypuszczalnie, wzmożone wytwarzanie ROS może być, przynajmniej częściowo, wynikiem niedoboru cyt c i zmniejszenia aktywności oksydazy cytochromowej w mitochondrium.

O tym, że mitochondria nie tylko są zaangażowane w proces apoptozy, lecz są niezbędne dla jej efektywnego przebiegu świadczą wyniki badań nad szczepami z mutacjami dotyczącymi mitochondriów. Żaden z trzech szczepów – pozbawiony mitochondrialnego DNA, pozbawiony genu *cyc3* kodującego syntazę cyt c, ani pozbawiony chromosomalnego genu *ATP10* kodującego mitochondrialne białko wchodzące w skład syntazy ATP – nie wykazywał cech śmierci

apoptotycznej w odpowiedzi na działanie kwasu octowego [22]. Przytoczone wyżej wyniki badań mogą świadczyć o istnieniu mitochondrialnego szlaku aktywacji PCD w komórkach drożdży.

Wzmoczone wytwarzanie ROS występuje we wszystkich, jak dotąd zbadanych, przypadkach apoptozy u drożdży (tab. I). Inkubacja szczepów z mutacją w genie *cdc48* i szczepów z ekspresją genu *bax* w warunkach ściśle beztlenowych zapobiega śmierci komórek z cechami apoptozy [25]. Świadczy to o tym, że ROS nie są produktem ubocznym reakcji przebiegających w komórce apoptotycznej, lecz są ważnym czynnikiem aktywnie uczestniczącym w procesie PCD. Co więcej, mogą występować w roli samego induktora apoptozy. Ma d e o i wsp. [25] generowali stres oksydacyjny zewnątrzpochodny, działając różnymi stężeniami  $H_2O_2$  na komórki *S. cerevisiae*, oraz wewnątrzpochodny, przez delecję genu *gsh1* kodującego enzym uczestniczący w syntezie wewnątrzkomórkowego przeciwutleniacza – glutationu (gamma-glutamyl-L-cysteinylglycyna, gsh). Okazało się, że niskie stężenia  $H_2O_2$  (3–5 mM) wywołują śmierć apoptotyczną, podczas gdy wysokie stężenia (180 mM) prowadzą do nekrozy komórek w fazie logarytmicznej wzrostu. Hodowla w stacjonarnej fazie była bardziej oporna na działanie  $H_2O_2$ , dopiero wysokie stężenie (180 mM) wywoływało apoptozę. Szczep *S. cerevisiae*  $\Delta$  *gsh1* wykazywał cechy śmierci apoptotycznej po trzech dniach hodowli bez dodatkowego czynnika indukującego PCD.

Kolejnym dowodem sugerującym wspólne pochodzenie apoptozy drożdży i ssaków jest proapoptotyczne białko o aktywności nukleazowej, AIF (apoptosis inducing factor) [39]. W i s s i n g i wsp. [48] zidentyfikowali homologiczne białko u drożdży i nazwali je Aif1p. Dowiedli podobieństw nie tylko strukturalnych, lecz także funkcjonalnych obydwu białek. Aif1p, podobnie jak AIF, po zadziałaniu czynnika indukującego apoptozę ulega translokacji z mitochondrium do jądra, gdzie prowadzi do lizy chromatyny. Szczep *S. cerevisiae*  $\Delta$  *aif1* poddany działaniu  $H_2O_2$  lub kwasu octowego wykazywał znacznie wyższy współczynnik przeżywalności w porównaniu ze szczepem dzikim. Ponadto, aktywność nukleazowa Aif1p jest zależna od cyklofiliny A (CypA), i tak, jak w przypadku AIF nie ma to związku z domeną izomerazy CypA. Prawdopodobnie CypA posiada także aktywność nukleazową [31]. Proapoptotyczna aktywność Aif1p wydaje się być częściowo zależna od Yca1p, bowiem przeżycie szczepów z nadekspresją Aif1p i poddanych działaniu  $H_2O_2$  wzrosło z 10 do 70%, gdy szczepy były pozbawione genu *ycal1*.

Intensywna fragmentacja mitochondriów jest wczesnym markerem apoptozy zarówno w komórkach ssaków, jak i drożdży. F a n n j i a n g i wsp. [9] wykazali, że trzy białka: Dnm1, Mdv1/Net2, Fis1, odpowiedzialne za fizjologiczną fragmentację mitochondriów u drożdży

wpływają na proces apoptozy. Dnm1, homolog ludzkiego Drp1, oraz Mdv1/Net2 wywołujące wzmoczoną fragmentację mitochondriów pod wpływem czynników indukujących apoptozę, wykazują aktywność proapoptotyczną. Przeciwnie Fis1, działające antagonistycznie do Dnm1, posiada aktywność antyapoptotyczną. Szczep *S. cerevisiae*  $\Delta$  *fis1* wykazywał zdecydowanie niższy współczynnik przeżywalności w porównaniu ze szczepem dzikim, po zadziałaniu czynnika apoptogennego. Fis1 chroni komórki przed śmiercią zależną od Yca1p, bowiem przeżywalność szczepu *S. cerevisiae* z podwójną delecją  $\Delta$  *fis1*/ $\Delta$  *ycal1* w warunkach apoptogennych jest porównywalna do szczepu dzikiego.

Interesujące, że białko Fis1 jest niezbędne dla fizjologicznej fragmentacji mitochondriów w zdrowych komórkach drożdży, podczas gdy po zadziałaniu czynnika apoptogennego dochodzi do masywnej fragmentacji mitochondriów przy całkowitym braku Fis1.

W komórkach ssaków przed fragmentacją i degradacją mitochondriów chroni antyapoptotyczne białko Bcl-2 [43]. Fis1 wyższych organizmów, choć wysoce konserwatywne, nie wykazuje aktywności antyapoptotycznej [7, 40]. Okazało się, że heterologiczne białka Bcl-2 lub Bcl-xL w komórkach drożdży  $\Delta$  *fis1*, w warunkach apoptogennych, w pełni zastępują aktywność Fis1. To odkrycie dało początek podejrzeniom, że drożdżowe białko Fis1 może działać w sposób podobny do Bcl-2/Bcl-xL. Chociaż Fis1 nie należy do rodziny białek Bcl-2 [7, 40], to wykazuje do nich pewne podobieństwa [9]. Jest zakotwiczone hydrofobowym C-końcem w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, po stronie cytoplazmatycznej, tworzy dimery, chroni komórki drożdży przed czynnikami apoptogennymi, przeciwdziała śmierci komórkowej zależnej od Yca1p, lecz nie jest konieczne dla wzrostu komórek w warunkach prawidłowych.

Niewykluczone, że białko drożdży Fis1 skupia w sobie dwie różne aktywności, które w toku ewolucji uległy rozdzielению na dwa odrębne białka – Fis1 i Bcl-2. Możliwe też, że antyapoptotyczne działanie Bcl-2/Bcl-xL w komórkach drożdży jest niezależne od drogi działania Fis1, lub niezależne od wszystkich białek drożdży w ogóle. Niemniej jednak zdolność Fis1, jak i Bcl-2/Bcl-xL, do ochrony komórek drożdży przed śmiercią poprzez hamowanie fragmentacji i degradacji mitochondriów dowodzi istnienia analogicznych szlaków apoptotycznych w komórkach drożdży i ssaków.

## 5. Fizjologiczna rola programowanej śmierci komórkowej u *Saccharomyces cerevisiae*

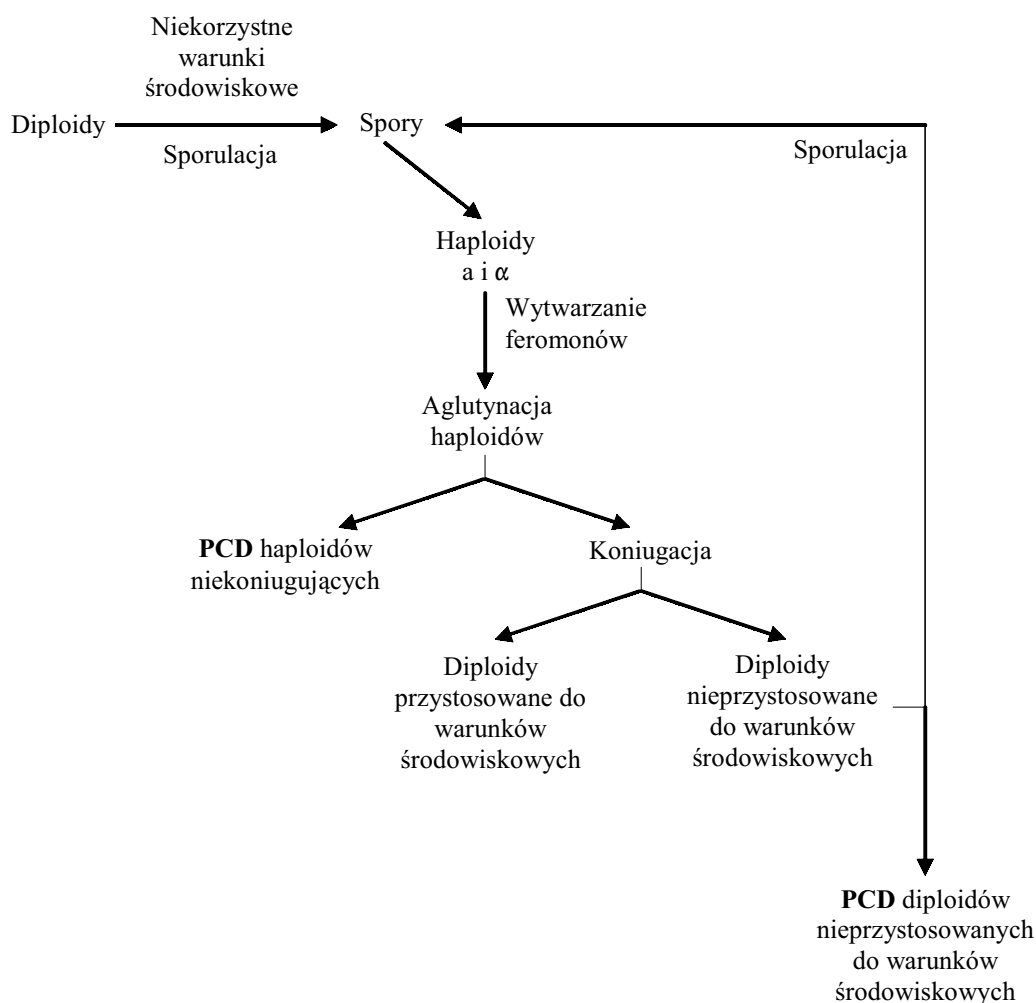
Pomimo wyżej przedstawionych faktów bywa, że istnienie PCD u drożdży jest jeszcze kwestionowane. Wątpliwa pozostaje fizjologiczna rola PCD. Jakże bo-

wiem korzyści mógłby czerpać organizm jednokomórkowy z samobójczej śmierci? W warunkach naturalnych większość mikroorganizmów, w tym drożdże, tworzą skupiska wielu komórek – kolonie i biofilmy [33]. Jeśli potraktuje się komórki drożdży jako elementy wielokomórkowych społeczności, istnieją przynajmniej trzy różne okoliczności, w których samobójcza śmierć komórek może przynieść korzyści całej populacji. Należą do nich: niezdolność do koniugacji [37], zmiana warunków środowiskowych na niekorzystne [17], oraz starzenie się populacji [13, 18].

Należy nadmienić, że *S. cerevisiae* występuje w postaci zarówno haploida, jak i diploida. Obydwie formy rozmnażają się bezpłciowo na drodze pączkowania. Haploidy, które mogą występować jako typ koniugacyjny  $\alpha$  lub  $a$ , są także w stanie koniugować z innymi haploidami przeciwnego typu koniugacyjnego – a tylko z  $\alpha$  i na odwrót. Wynikiem tego procesu jest powstanie diploida. Diploidy, pod wpływem warunków stresowych, jak niedobór pożywienia, mogą przejść podział mejotyczny, którego wynikiem będą cztery haploidalne spory: dwie typu  $a$  i dwie typu  $\alpha$ .

PCD towarzyszy procesowi koniugacji drożdży [37]. Czynnikiem apoptogennym są w tym przypadku feromony, na które komórki prawidłowe reagują wytworzeniem wypustek i fuzją z komórkami przeciwnego typu. Komórki niekoniugujące, pomimo długiego czasu inkubacji z komórkami odmiennego typu, a tym samym – ekspozycji na ich feromony, ulegają programowanej śmierci. Mechanizm PCD pełni tu funkcję oczyszczającą, eliminując z populacji komórki, które z jakichś powodów nie są zdolne do koniugacji.

Jeśli powstałe w wyniku koniugacji diploidy nie są odpowiednio przystosowane do środowiska, przechodzą kolejną mejozę i koniugację, w poszukiwaniu korzystnych cech fenotypowych. Knorre i wsp. [17] wykazali, że w warunkach niekorzystnych, indukujących sporulację, również pewna frakcja komórek ulega programowanej śmierci. Udział PCD w cyklu życiowym *S. cerevisiae* ilustruje rys. 1. W środowisku naturalnym drożdże często napotykać na zmiany w dostępie do substancji odżywczych. PCD może służyć im jako narzędzie adaptacyjne, które eliminując z populacji komórki najsłabsze, zwiększa



Rys. 1. Udział PCD w cyklu życiowym *S. cerevisiae*

szansę na przeżycie pozostałych, a tym samym na przetrwanie szczepu.

U drożdży zdefiniowano dwa rodzaje starzenia się – replikacyjne, tj. komórek dzielących się, oraz chronologiczne – komórek nie dzielących się [wg 2]. Replikacyjna długość życia komórki drożdżowej określana jest przez liczbę wydanych przez nią komórek potomnych – średnio 25–35 (ok. trzy dni). Chronologiczna długość życia drożdży to długość życia komórek pozostających w fazie stacjonarnej, po wyczerpaniu się składników odżywczych. Może trwać wiele tygodni. Obydwu rodzajom starzenia się towarzyszy PCD [13, 18, 21]. Dzięki samobójczej śmierci większości starych komórek wygasające składniki odżywcze zostają zachowane dla przeżywających – młodszych, prawdopodobnie będących w lepszej kondycji, lepiej przystosowanych do panujących warunków środowiskowych. Ponadto, Herker i wsp. [13] dowiedli, że apoptotyczne komórki drożdżowe wydzielają do środowiska niskocząsteczkowe substancje peptydowe, poprawiające przeżycie starzejącej się hodowli.

## 6. Podsumowanie

W ciągu ostatnich kilku lat opisano w komórkach drożdży czynniki homologiczne do uczestniczących w procesie programowanej śmierci u wyższych eukariotów. Nie zidentyfikowano dotąd u drożdży żadnych elementów zewnątrzpochoźnego szlaku PCD. Zatem apoptoza może być filogenetycznie bardzo starym procesem, który w toku ewolucji stawał się coraz bardziej złożony. Receptory śmierci i ich ligandy mogły wykształcić się po rozdzieleniu linii ewolucyjnych grzybów i zwierząt.

Z drugiej strony brak zidentyfikowanych rzeczywistych substratów dla metakaspazy-1 drożdży, brak czynników homologicznych do kluczowych regulatorów PCD, jakimi jest rodzina białek Bcl-2, sprawia, że istnienie mechanizmu programowanej śmierci u drożdży pozostaje dyskusyjne. Jeśli komórki drożdży rzeczywiście posiadają mechanizm samobójczej śmierci, to czynniki regulujące ten proces mogą stanowić potencjalny punkt uchwytu dla przeciwgrzybiczych leków nowej generacji. Jest to jednym z powodów, dla których apoptoza w komórkach drożdży pozostaje tematem nadal aktualnym i stanowi wyzwanie dla wielu zespołów badawczych na świecie.

## Piśmiennictwo

- Balzan R., Sapienza K., Galea D.R., Vassallo N., Frey H., Bannister W.H.: Aspirin commits yeast cells to apoptosis depending on carbon source. *Microbiology*, **150**, 109–115 (2004)
- Bitterman K.J., Medvedik O., Sinclair D.A.: Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 376–399 (2003)
- Botstein D., Chervitz SA, Cherry JM.: Yeast as a model organism. *Science*, **277**, 1259–1260 (1997)
- Bruce A., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walker P.: Podstawy biologii komórki. Przekład pod red. Kmity H. i Wojtaszka P., Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2005
- Cain K., Bratton S.B., Cohen G.M.: The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, **84**, 203–214 (2002)
- Cherry J.M., Adler C., Ball C., Chervitz S.A., Dwight S.S., Hester E.T., Jia Y., Judie G., Roe T., Schroeder M., Weng S., Botstein D.: SGD: *Saccharomyces* Genome Database. *Nucleic Acids Res.* **26**, 73–79 (1998)
- Dohm J.A., Lee S.J., Hardwick J.M., Hill R.B., Gittis A.G.: Cytosolic domain of the human mitochondrial fission protein fis1 adopts a TPR fold. *Proteins*, **54**, 153–156 (2004)
- Fahrenkrog B., Sauder U., Aebi U.: The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. *J. Cell Sci.* **117**, 115–126 (2004)
- Fannjiang Y., Cheng W.C., Lee S.J., Qi B., Pevsner J., McCaffery J.M., Hill R.B., Basañez G., Hardwick J.M.: Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev.* **18**, 2785–2797 (2004)
- Granot D., Levine A., Dor-Hefetz E.: Sugar-induced apoptosis in yeast cells. *FEMS Yeast Res.* **4**, 7–13 (2003)
- Greenhalf W., Stephan C., Chaudhuri B.: Role of mitochondria and C-terminal membrane anchor of Bcl-2 in Bax-induced growth arrest and mortality in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **380**, 169–175 (1996)
- Hanada M., Aimé-Sempe C., Sato T., Reed J.C.: Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J. Biol. Chem.* **270**, 11962–11969 (1995)
- Herker E., Jungwirth H., Lehmann K.A., Maldener C., Fröhlich K.U., Wissing S., Büttner S., Fehr M., Sigrist S., Madeo F.: Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* **164**, 501–507 (2004)
- Ink B., Zörnig M., Baum B., Hajibagheri N., James C., Chittenden T., Evan G.: Human bak induces cell death in *Schizosaccharomyces pombe* with morphological changes similar to those with apoptosis in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **17**, 2468–2474 (1997)
- Jürgensmeier J.M., Krajewski S., Armstrong R.C., Wilson G.M., Oltersdorf T., Fritz L.C., Reed J.C., Otilie S.: Bax and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell.* **8**, 325–339 (1997)
- Kitagaki H., Araki Y., Funato K., Shimoi H.: Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. *FEBS Lett.* **581**, 2935–2942 (2007)
- Knorre D. A., Smirnova E. A., Severin F. F.: Natural conditions inducing programmed cell death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, **70**, 264–266 (2005)
- Laun P., Pichova A., Madeo F., Fuchs J., Ellinger A., Kohlwein S., Dawes I., Fröhlich K.U., Breitenbach M.: Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol.* **39**, 1166–1173 (2001)
- Ligr M., Madeo F., Fröhlich E., Hilt W., Fröhlich K.U., Wolf D.H.: Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Lett.* **438**, 61–65 (1998)

20. Liston P., Fong W.G., Korneluk, R.G. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene*, **22**, 8568–8580 (2003)
21. Longo V.D., Ellerby L.M., Bredesen D.E., Valentine J.S., Gralla E.B.: Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J. Cell Biol.* **137**, 1581–1588 (1997)
22. Ludovico P., Rodrigues F., Almeida A., Silva M.T., Barrientos A., Côrte-Real M.: Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 2598–2606 (2002)
23. Ludovico P., Sousa M.J., Silva M.T., Leao C., Côrte-Real M.: *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*, **147**, 2409–2415 (2001)
24. Madeo F., Fröhlich E., Fröhlich K.U.: A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J. Cell Biol.* **139**, 729–734 (1997)
25. Madeo F., Fröhlich E., Ligr M., Grey M., Sigrist S.J., Wolf D.H., Fröhlich K.U.: Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* **145**, 757–767 (1999)
26. Madeo F., Herker E., Maldener C., Wissing S., Lächelt S., Herlan M., Fehr M., Lauber K., Sigrist S.J., Wesselborg S., Fröhlich K.U.: A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell*, **9**, 911–917 (2002)
27. Mager W.H., Winderickx J.: Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 265–273 (2005)
28. Majno G., Joris I.: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**, 3–15 (1995)
29. Manon S., Chaudhuri B., Guérin M.: Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-x<sub>L</sub>. *FEBS Lett.* **415**, 29–32 (1997)
30. Mitsui K., Nakagawa D., Nakamura M., Okamoto T., Tsurugi K.: Valproic acid induces apoptosis dependent of Yca1p at concentrations that mildly affect the proliferation of yeast. *FEBS Lett.* **579**, 723–727 (2005)
31. Montague J.W., Hughes Jr. F.M., Cidlowski J.A.: Native recombinant cyclophilins A, B, and C degrade DNA independently of peptidylprolyl cis-trans-isomerase activity. Potential roles of cyclophilins in apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 6677–6684 (1997)
32. Narasimhan M.L., Damsz B., Coca M.A., Ibeas J.I., Yun D.J., Pardo J.M., Hasegawa P.M., Bressan R.A.: A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol. Cell*, **8**, 921–930 (2001)
33. Palková Z.: Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. *EMBO Rep.* **5**, 470–476 (2004)
34. Peter M.E., Heufelder A.E., Hengartner M.O.: Advances in apoptosis research. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12736–12737 (1997)
35. Phillips A.J., Sudbery I., Ramsdale M.: Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14327–14332 (2003)
36. Reiter J., Herker E., Madeo F., Schmitt M.J.: Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* **168**, 353–358 (2005)
37. Severin F.F., Hyman A.A.: Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.* **12**, R233–R235 (2002)
38. Silva R.D., Sotoca R., Johansson B., Ludovico P., Sansonetty F., Silva M.T., Peinado J.M., Côrte-Real M.: Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **58**, 824–834 (2005)
39. Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G.: Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441–446 (1999)
40. Suzuki M., Jeong S.Y., Karbowski M., Youle R.J., Tjandra N.: The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J. Mol. Biol.* **334**, 445–458 (2003)
41. Szallies A., Kubata B.K., Duszenko M.: A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **517**, 144–150 (2002)
42. Temme A., Rieger M., Reber F., Lindemann D., Weigle B., Diestelkoetter-Bachert P., Ehninger G., Tatsuka M., Terada Y., Rieber E. P. Localization, dynamics, and function of survivin revealed by expression of functional survivinDsRed fusion proteins in the living cell. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 78–92 (2003)
43. Tolkovsky A.M., Xue L., Fletcher G.C., Porutaite V.: Mitochondrial disappearance from cells: A clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease? *Biochimie*, **84**, 233–240 (2002)
44. Uren A.G., Beilharz T., O’Connell J., Bugg S.J., van Driel R., Vaux D.L., Lithgow T. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10170–10175 (1999)
45. Uren A.G., O’Rourke K., Aravind L.A., Pisabarro M.T., Seshagiri S., Koonin E.V., Dixit V.M. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell*, **6**, 961–967 (2000)
46. Verhagen A.M., Silke J., Ekert P.G., Pakusch M., Kaufmann H., Connolly L.M., Day C.L., Tikoo A., Burke R., Wrobel C., Moritz R. L., Simpson R.J., Vaux D.L.: HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 445–454 (2002)
47. Walter D., Wissing S., Madeo F., Fahrenkrog B.: The inhibitor-of-apoptosis protein Bir1p protects against apoptosis in *S. cerevisiae* and is a substrate for the yeast homologue of Omi/HtrA2. *J. Cell Sci.* **119**, 1843–1851 (2006)
48. Wissing S., Ludovico P., Herker E., Büttner S., Engelhardt S.M., Decker T., Link A., Proksch A., Rodrigues F., Corte-Real M., Fröhlich K.U., Manns J., Candé C., Sigrist S.J., Kroemer G., Madeo F.: An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* **166**, 969–974 (2004)