

BIOLOGIA KOMÓRKI

LABORATORIUM NR 4

BADANIE CYKLU KOMÓRKOWEGO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***I. Cykl komórkowy *Saccharomyces cerevisiae* jako organizmu modelowego**

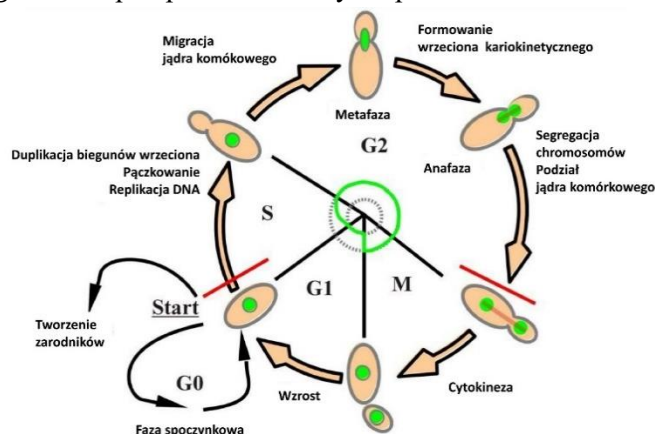
Organizmy modelowe są wykorzystywane w badaniach naukowych, ponieważ: a) mogą pomóc w przezwyciężeniu ograniczeń etycznych i eksperymentalnych, które obowiązują dla docelowego gatunku, b) zapewniają ramy do opracowania i optymalizacji metod analitycznych, które ułatwiają i standaryzują analizę oraz c) są reprezentantem większej klasy żywych organizmów.

Drożdże (*S. cerevisiae*) są jednym z najszerzej stosowanych eukariotycznych organizmów modelowych, wykorzystywanych w badaniach regulacji ekspresji genów, transdukcji sygnałów komórkowych, cyklu komórkowego, metabolizmu, apoptozy czy zaburzeń neurodegeneracyjnych (np. choroba Parkinsona). Genom tego organizmu, o wielkości ok. 12 Mbp (ang. *base pair*, bp), został jako pierwszy wśród klasycznych organizmów modelowych zsekwencjonowany. Nawet do 30% genów związanych z różnymi chorobami człowieka może posiadać ortologi (geny różnych gatunków o wspólnym pochodzeniu ewolucyjnym, zachowujące tę samą funkcję w trakcie ewolucji) w genomie drożdży.

Drożdże są organizmami jednokomórkowymi o kształcie okrągłym, elipsoidalnym, jajowatym lub cylindrycznym. Kształt i wielkość komórki drożdży zależy nie tylko od gatunku, ale również od warunków i wieku hodowli. Komórki drożdży osiągają zwykle rozmiary: 2-7µm szerokości, 3-10µm długości. Optymalne warunki dla ich rozwoju to: 25-30°C, pH 4.0-6.0. Drożdże rozwijając się w warunkach tlenowych asymilują cukry z wytworzeniem CO₂ i H₂O, a w warunkach beztlenowych prowadzą fermentację alkoholową. Komórka drożdży zbudowana jest ze ściany komórkowej, błony cytoplazmatycznej, cytoplazmy, jądra komórkowego, wakuoli i substancji zapasowych. W komórce drożdży wyróżniamy również mitochondria, lizosomy, rybosomy i aparaty Golgiego.

Cykl komórkowy zakończony podziałem mitotycznym (cykl życiowy komórki) to proces prowadzący do powstania dwóch komórek potomnych, będących wiernymi kopiami komórki, z której powstały. Cykl komórkowy można podzielić na dwie fazy – M (mitozę lub mejozę) oraz interfazę, będącą okresem między jednym podziałem komórki a drugim. W trakcie trwania interfazy wyróżnia się 4 fazy: G₀, G₁, S i G₂. Fazy wzrostu (ang. *growth phase*), G₁ oraz G₂, charakteryzują się różną długością trwania, umożliwiają wytworzenie organelli oraz prowadzenie procesów życiowych takich jak wzrost i rozwój. Faza G₁, poprzedzająca rozpoczęcie podziału chromosomalnego DNA, stanowi fazę wzrostu, podczas której komórka musi osiągnąć określony, minimalny rozmiar, zanim rozpocznie się przejście do kolejnych faz cyklu. Komórki potomne, które jeszcze nie uległy podziałowi są mniejsze niż komórki-matki, w związku z czym czas trwania fazy G₁ w ich przypadku jest dłuższy. Wejście komórki w fazę G₁ obliguje ją do przejścia przez kolejne etapy cyklu i w końcu prowadzi do jej podziału. Po osiągnięciu przez komórkę określonej wielkości rozpoczyna się faza syntezy DNA (S), czyli podwojenia ilości materiału genetycznego (replikacja DNA), prowadząc ona do powstania kopii każdego chromosomu. W fazie G₂ komórka „upewnia się”, że replikacja DNA została zakończona i przygotowuje się do podziału, natomiast w fazie mitozy (M) dochodzi do rozdzielenia chromosomów i podziału całej komórki na dwie komórki potomne. Po podziale, komórka potomna znajduje się w fazie G₁. Nie wszystkie komórki, które znajdują się w pierwszej fazie – G₁, automatycznie przechodzą do następnych etapów. Niektóre osiągają stan spoczynku (G₀) – na przykład na skutek niesprzyjających warunków środowiskowych, przy czym po ponownym nastaniu sprzyjających warunków wzrostu mogą znowu powrócić do stanu G₁ i kontynuować cykl podziału.

Komórka drożdżowa po podziale, gdy nie otrzyma sygnałów zewnętrznych o braku składników pokarmowych, wchodzi w następny cykl podziałowy (Rysunek 1). Jeśli jednak otrzyma taki sygnał, to zatrzymuje się pod koniec fazy G1 w punkcie START. Wejście komórki w stan G0 może być również spowodowane przeprowadzeniem wszystkich „zaprogramowanych” dla danej komórki podziałów, czyli naturalnie wyczerpaną zdolnością do dalszej reprodukcji – w tym przypadku jest to przejście nieodwracalne. Długość czasu potrzebnego na odbycie pełnego cyklu rozwoju jest różna dla różnych typów komórek. Większość komórek ssaków potrzebuje na to od 10 do 30 godzin, natomiast drożdże wymagają od 1,5 do 3 godzin na przeprowadzenie cyklu podziału.



Rysunek 1. Pączkowanie komórek drożdży a cykl komórkowy [doi:10.1371/journal.pone.0084645.g001].

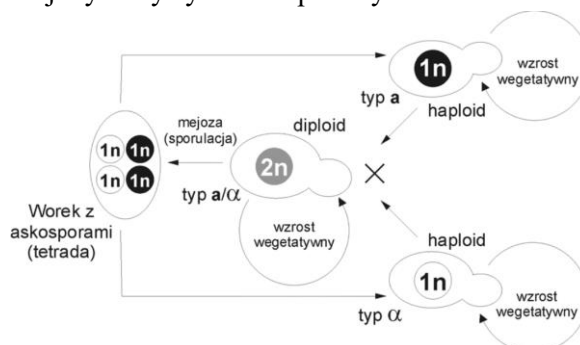
Drożdże z rodzaju *Saccharomyces* mogą rozmnażać się:

1) bezpłciowo:

- a. pączkowanie rozpoczyna się uwypukleniem ściany komórkowej na powierzchni komórki macierzystej. W komórkach o kształcie podłużnym uwypuklenia powstają na końcach, natomiast w komórkach kulistych w dowolnym miejscu na powierzchni. W komórce macierzystej zachodzi mitotyczny podział jądra na dwa potomne. Jedno jądro wraz z częścią cytoplazmy dyfunduje do powstałego uwypuklenia, zwanego pączkiem. Pączek stopniowo powiększa się i zostaje oddzielony od komórki macierzystej ścianą komórkową. W ten sposób wykształca się komórka potomna, która może oddzielić się od komórki macierzystej stanowiąc samodzielny organizm (*Saccharomyces* sp.). W miejscu oddzielenia się pączka na komórce macierzystej i potomnej powstają tzw. blizny. Na powierzchni komórki macierzystej może być ponad 30 blizn. Pączkowanie może być wielobiegunowe – pączki tworzą się na całej powierzchni komórki macierzystej, dwubiegunowe – na przeciwległych biegunach lub jednobiegunowe – na jednym końcu komórki. Komórka potomna jest genetycznie identyczna z macierzystą, jednak charakteryzuje ją mniejszy rozmiar. Pączkowanie drożdży zachodzi przy sprzyjających warunkach środowiskowych, dostępności składników odżywczych, optymalnej temperaturze;
- b. zarodnikowanie – w niesprzyjających warunkach do rozwoju, drożdże mogą się rozmnażać przez zarodnikowanie; powstaje od 4 do 8 zarodników w komórce, a ich kształt jest gatunkową cechą diagnostyczną drożdży;

2) płciowo – w populacji drożdży występuje zjawisko przemiany pokoleń, czyli następowania po sobie pokolenia haploidalnego (o pojedynczym garniturze chromosomów) i pokolenia diploidalnego (Rysunek 2). Rozmnażanie płciowe drożdży polega na zlianiu się (kopulacji) haploidalnych komórek o przeciwnych znakach koniugacyjnych poprzez utworzone wyrostki, w wyniku czego powstaje komórka diploidalna (zygota). Następnie zachodzi podział (mejoza, mitoza). Każdy zarodnik potomny otaczany jest plazmą i błoną. Utworzone w ten sposób

haploidalne zarodniki (4-8 szt.) zamknięte są we wnętrzu komórki tworząc worek (ascus). Ten rodzaj rozmnażania charakterystyczny jest dla drożdży z klasy workowców – Ascomycetes, np. *S. cerevisiae*. Zygota może również rozmnażać się na drodze wegetatywnej (przez podział lub pączkowanie). Komórki *S. cerevisiae* o podwójnej liczbie chromosomów są większe, charakteryzuje je wyższa aktywność fizjologiczna od komórek haploidalnych oraz zdolność do wielokrotnego rozmnażania poprzez pączkowanie. Ze względu na aktywność szczepy diploidalne są częściej wykorzystywane w przemyśle.



Rysunek 2. Sposoby rozmnażania *S. cerevisiae*.

II. Drożdże a genetyka klasyczna

Z punktu widzenia genetyki klasycznej drożdże stanowią idealny organizm badawczy. Są prototrofami wykazującymi wszystkie cechy mikroorganizmów – można je hodować na podłożach płynnych i stałych, kompletnych i minimalnych; na podłożach stałych tworzą kolonie; dają się łatwo hodować w dużych ilościach i stosunkowo krótkim czasie (czas generacji na podłożu pełnym wynosi średnio 80 minut). Dodatkowo, drożdże można łatwo poddawać mutagenzie (np. poprzez naświetlanie UV), a w szczepach haploidalnych stosunkowo prosto uzyskuje się mutanty (np. pokarmowe).

Bez trudu przeprowadza się krzyżowanie szczepów haploidalnych. Wykorzystując metody mikromanipulacji można izolować i analizować pojedyncze haploidalne askospory drożdży powstałe w workach po mejozie komórki diploidalnej. Analiza segregacji markerów genetycznych dla czterech askospor tetrady pozwala na badanie sprzężeń pomiędzy genami.

Dodatkowo drożdże są fakultatywnymi tlenowcami, co oznacza, że mogą żyć bez funkcjonujących mitochondriów, przeprowadzając fermentację, gdy w środowisku obecne jest odpowiednie (fermentowalne) źródło węgla, np. glukoza. Dzięki tej właściwości, można izolować jądrowe i mitochondrialne mutanty związane z procesami oddychania wewnątrzkomórkowego. Podczas selekcji takich mutantów wykorzystuje się ich niezdolność do wzrostu na podłożach zawierających niefermentowalne źródła węgla, np. glicerol czy etanol. Mutanty nie oddychające rosną na pożywce z glukozą wolniej niż szczepy oddychające, tworząc na podłożu stałym mniejsze kolonie.

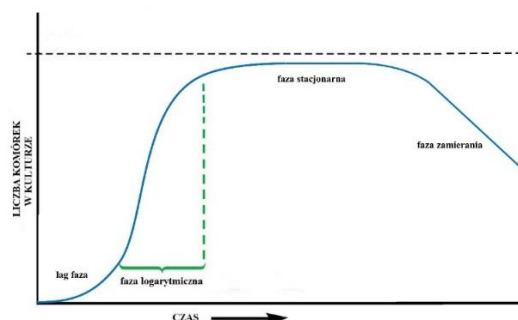
IV. Fazy hodowli mikroorganizmów

W hodowli statycznej komórki na pożywce rosną i rozmnażają się do czasu wyczerpania się składników pokarmowych i/lub nagromadzenia się toksycznych produktów przemiany materii. W tego typu hodowli rozwój populacji przebiega w kilku charakterystycznych fazach (Rysunek 3-4):

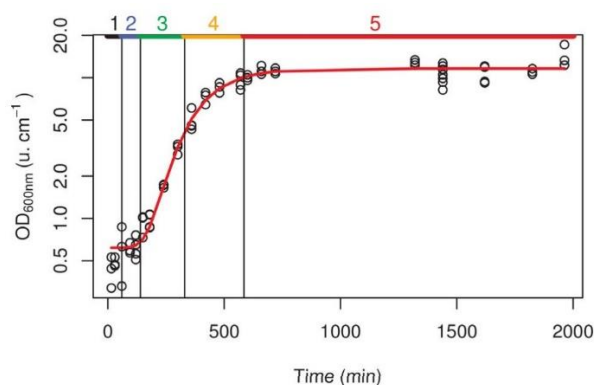
1. faza zastoju (*lag faza*) – po zaszczepieniu podłoża mikroorganizmami, początkowo nie obserwuje się rozmnażania, lecz wzrost wielkości komórek; mała aktywność metaboliczna komórek, duża odporność, przystosowywanie się do nowych warunków środowiskowych,
2. faza wzrostu logarytmicznego (wykładniczego) – komórki zaczynają się dzielić; każda komórka drożdży dzieli się poprzez pączkowanie, a liczbę powstałych komórek (czyli wzrost populacji) określa wzór $2n$, gdzie n – to liczba podziałów, która jest równoznaczna z liczbą pokoleń,

Jeśli liczba komórek w inokulum wynosi N_0 , to powstała liczba komórek N po n pokoleniach wyniesie $N = N_0 \times 2^n$. Liczba drożdży rośnie wykładniczo z upływem czasu. Do czasu hodowli proporcjonalny jest więc logarytm liczby bakterii, a nie sama ich liczba,

3. faza stacjonarna (*plateau*) – w wyniku zużywania składników pokarmowych oraz akumulacji szkodliwych produktów przemiany materii; liczba żywych komórek jest względnie stała, a tempo podziałów i zamierania jest zwolnione,
4. faza zamierania – ostatnia faza w rozwoju populacji; liczba komórek zamierających przewyższa liczbę komórek powstających; podziały komórek są rzadsze i wreszcie ustają.



Rysunek 3. Fazy hodowli mikroorganizmów – schemat.

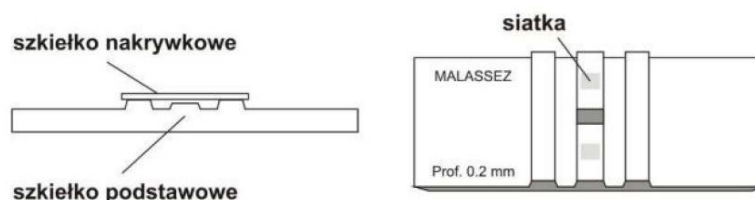


Rysunek 4. Zmiana gęstości komórek i identyfikacja stadiów wzrostu *Saccharomyces cerevisiae*. Pięć etapów wzrostu zdefiniowano zgodnie gęstością optyczną (ang. *Optical Density*, OD) hodowli komórkowej: 1: faza zastoju (kolor czarny), 2-4: faza wzrostu logarytmicznego (kolor, fioletowy, zielony oraz pomarańczowy), 5: faza stacjonarna (kolor czerwony) [doi:10.1371/journal.pone.0084645.g002].

V. Określanie gęstości komórek hodowli za pomocą komór zliczeniowych *Malassez* oraz *Neubauera*

Komory zliczeniowe (Rysunek 5) służą do określania liczby cząstek (np. leukocyty, erytrocyty, trombocyty, bakterie, zarodniki grzybów, pyłki roślin) na jednostkę objętości cieczy.

Zbudowane są z płytki podstawowej z naniesionymi siatkami oraz szkiełka nakrywkowego. Płytkę podstawową wykonana jest ze specjalnego szkła optycznego o wielkości szkiełka podstawowego. Wydrążone rowki dzielą powierzchnię płytki podstawowej na 2 pola szerokie (zewnątrzne) i 3 wąskie paski (wewnętrzne). W pasku środkowym, który stanowi dno komory wygrawerowane są dwie siatki zliczeniowe, oddzielone rowkiem. Dno komory leży zazwyczaj 0,1-0,5 mm (w zależności od rodzaju komory zliczeniowej) niżej od pasków zewnętrznych. Po nałożeniu szkiełka nakrywkowego tworzy się pomiędzy nim, a paskiem środkowym szczelina o szerokości 0,1-0,5 mm.

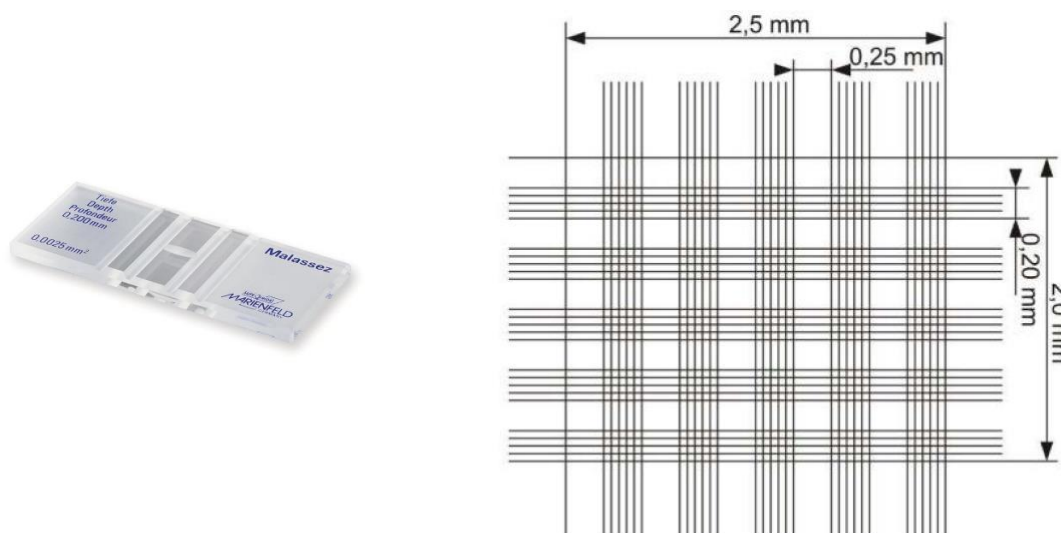


Rysunek 5. Komora zliczeniowa: widok z boku (po lewej) i widok z góry płytki podstawowej (po prawej).

Ogólna formuła obliczania liczby cząstek (komórek) dla komór zliczeniowych:

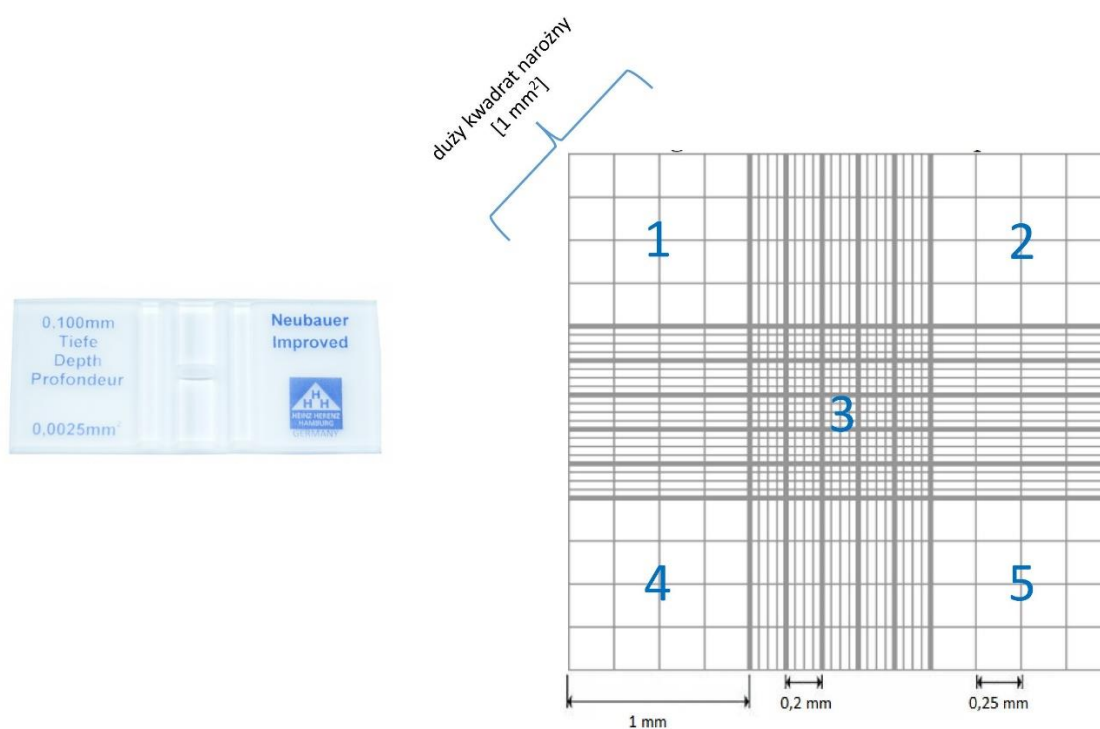
$$\text{Liczba cząstek na } \mu\text{l objętości} = \frac{\text{zliczone cząstki}}{\text{powierzchnia zliczania [mm}^2\text{]} \times \text{głębokość komory [mm]} \times \text{rozcieńczenie}}$$

Komora Malassez (Rysunek 6) stanowi siatka licznika pokrywająca łączną powierzchnię 5 mm^2 ($2 \text{ mm} \times 2,5 \text{ mm}$), podzieloną na 25 dużych prostokątów, gdzie powierzchnia każdego wynosi $0,25 \times 0,20 \text{ mm} = 0,05 \text{ mm}^2$. Głębokość komory wynosi $0,2 \text{ mm}$, zatem objętość cieczy znajdującej się na jednym prostokącie wynosi $0,01 \text{ mm}^3$ ($0,01 \mu\text{L}$). Duże prostokąty są z kolei podzielone są na 20 mini kwadratów o powierzchni $0,05 \times 0,05 \text{ mm} = 0,0025 \text{ mm}^2$ każdy). Komory te służą najczęściej do zliczania ilości komórek w płynie (np. *S. cerevisiae*) oraz nicieni.



Rysunek 6. Komora Malassez: widok rzeczywisty (po lewej) oraz układ siatki pojedynczej komory pomiarowej (po prawej).

Komora Neubauera (Rysunek 7) z podwójną siatką tworzy 9 dużych kwadratów, każdy po 1 mm^2 . Cztery duże narożne kwadraty podzielone są na 16 kwadratów o długości boku wynoszącej $0,25 \text{ mm}$. Wykorzystuje się je do zliczania leukocytów. Duży środkowy kwadrat podzielony jest na 25 kwadratów grupowych o bokach długości $0,2 \text{ mm}$. Każdy kwadrat grupowy podzielony jest na 16 małych kwadratów o długości boku wynoszącej $0,05 \text{ mm}$ i powierzchni równej $0,0025 \text{ mm}^2$. Powierzchnia zliczeniowa grup kwadratów jest oddzielona od zewnętrznych potrójną linią graniczną. Głębokość komory $0,1 \text{ mm}$, zatem objętość cieczy znajdującej się na jednym kwadracie o powierzchni 1 mm^2 wynosi $0,1 \text{ mm}^3$ ($0,1 \mu\text{L}$).



Rysunek 7. Komora Neubauer: widok rzeczywisty (po lewej) oraz układ siatki pojedynczej komory pomiarowej (po prawej).

BADANIE CYKLU KOMÓRKOWEGO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Celem doświadczenia jest badanie wpływu substancji odżywczych w środowisku oraz temperatury na przebieg cyklu komórkowego drożdży.

1. Przygotowanie logarytmicznej hodowli szczepu SP4

Wykonanie (przez prowadzącego zajęcia)

1. Z inokulum szczepu *S. cerevisiae* pobrać ok. 30 μ L zawiesiny i dodać do kolby zawierającej 15 mL płynnej pożywki YPG.
2. Kolbę umieścić na wytrząsarce obrotowej (150 obr/min) w temperaturze 28°C na 12-14 godzin w celu uzyskania hodowli *S. cerevisiae* w fazie logarytmicznej.

2. Przygotowanie rozcieńczenia logarytmicznej hodowli *S. cerevisiae*

Wykonanie: (jedno dla całej grupy)

Przygotować hodowlę o gęstości 10^7 kom/mL z hodowli wyjściowej o gęstości podanej przez prowadzącego zajęcia (rozcieńczenie hodowli wyjściowej przy użyciu pożywki YPG).

3. Przygotowanie zawiesiny komórek w środowiskach o różnej zawartości składników pokarmowych

Wykonanie:

1. Do 3 sterylnych probówek z korkiem przenieść po 1 ml zawiesiny drożdży o gęstości 10^7 kom/mL.
2. Do pierwszej (A) i drugiej (B) probówki dodać 2 mL pożywki YPG.
3. Do trzeciej (C) probówki dodać 2 mL sterylnej wody.
4. Czas rozpoczęcia doświadczenia zanotować jako czas „0”.
5. Z jednej z probówek pobrać 15 μ L zawiesiny i umieścić w komorze Malassez.
6. Probówki A i C umieścić na wytrząsarce obrotowej w temp 28°C, probówkę B umieścić w 4°C.
7. Określić przy użyciu komory Malassez liczbę komórek oraz % komórek pączkujących w czasie „0”:
 - a. na komorę nałożyć szkiełko nakrywkowe, aby ściśle przylegało do komory – pojawienie się barwnych pierścieni Newtona,
 - b. nanieść 15 μ L rozcieńczonej hodowli drożdży o gęstości 10^7 kom/mL,
 - c. w przypadku zbyt dużej ilości komórek wykonać 10-krotne rozcieńczenie zawiesiny,
 - d. obliczyć liczbę komórek w 5 dużych prostokątach oraz obliczyć średnią liczbę wszystkich komórek oraz komórek pączkujących:
8. Obliczyć rzeczywistą gęstość zawiesiny komórek wg poniższego wzoru:

Komora Malassez

$$\begin{array}{l} \text{Gęstość zawiesiny} \\ \text{[liczba komórek/mL]} \end{array} = \text{średnia liczba komórek} * 100 * 1000 * \text{rozcieńczenie}$$

Wyjaśnienie:

We wzorze uwzględnia się przeliczenie objętości na 1 mL – objętość jednego prostokąta zliczeniowego wynosi 0,01 μL , a 1 mL jest równy 1000 μL . Rozcieńczenie uwzględnia się tylko w momencie, gdy zawiesina komórek była rozcieńczana przed wprowadzeniem do komory.

Komora Neubauera

$$\text{Gęstość zawiesiny} = \text{średnia liczba komórek} \cdot 10 \cdot 1000 \cdot \text{rozcieńczenie}$$

[liczba komórek/mL]

Wyjaśnienie:

We wzorze uwzględnia się przeliczenie objętości na 1 mL – objętość jednego prostokąta zliczeniowego wynosi 0,1 μL , a 1 mL jest równy 1000 μL . Rozcieńczenie uwzględnia się tylko w momencie, gdy zawiesina komórek była rozcieńczana przed wprowadzeniem do komory.

9. Po upływie 2 godzin wymieszać dokładnie zawartość probówek na Vortexie i pobrać po 100 μL zawiesiny do probówek typu Eppendorf (oznaczonych jako odpowiednio A, B i C).
10. Umieścić kolejno po 15 μL zawiesiny z probówek A, B i C w komorze Malassez i określić liczbę komórek oraz % komórek pączkujących w komorze Malassez po upływie 2 godzin.

SPRAWOZDANIE

W sprawozdaniu powinny znaleźć się:

1. Strona tytułowa - tytuł ćwiczenia, data, nr grupy, osoby wykonujące ćwiczenie;
2. Wstęp teoretyczny (maksymalnie 1 strona);
3. Wykonanie ćwiczenia;
4. Wyniki:
 - a. Uzupełnić tabelę: Liczba komórek oraz % komórek pączkujących uzyskanych w wyniku przeprowadzenia doświadczenia.

Czas [h]	Liczba komórek			% komórek pączkujących		
	Próba A	Próba B	Próba C	Próba A	Próba B	Próba C
0						
2						

5. Określić, która próba była kontrolną, a które badanymi.
6. Wnioski – omówić uzyskane wyniki **ORAZ** odpowiedzieć na pytanie:
Jaki wpływ na cykl komórkowy drożdży mają niekorzystne warunki środowiska?

Sprawozdanie należy przysłać w formacie ***pdf**. Temat maila oraz nazwa pliku powinny brzmieć: **L1 zespół 2 sprawozdanie Biologia komórki (cykl komórkowy)** (wpisać odpowiednie numery grup).

ODCZYNNIKI:

- *Saccharomyces cerevisiae*
- sterylna pożywka YPG (1% pepton, 1% ekstrakt drożdżowy, 2% glukoza)

Literatura

Smart K.A. 1999. Ageing In brewing yeast. *Brewers, Guardian*, 128, pp. 19-24.

Poreda A., Antkiewicz P., Borla A., Stefaniak B. 2008. Cykl rozwoju komórki drożdżowej mechanizm podziału i starzenia. *Mikrobiologia. Agro Przemysł* 3, str. 47-50.

www.ichip.pw.edu.pl/pilarek/kkitrz

www.brand.de