

Streszczenie

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są jednym z organizmów modelowych dla badań procesu starzenia. Pomimo wielu specyficznych dla tej grupy cech, jak np. obecność ściany komórkowej, zamknięta mitoz, pączkowanie jako mechanizm cytokinezy, stanowią model dla badania uniwersalnych mechanizmów tego procesu. Jednym z modeli, którym posługuje się gerontologia drożdży jest, tzw. starzenie replikacyjne (RLS- *Replicative Life Span*). Założono, że badając wpływ różnych czynników na wartość RLS można będzie wyjaśnić podstawowe mechanizmy starzenia i długowieczności człowieka i zwierząt. Badanie polega na fizycznym oddzieleniu komórki córki, od komórki "matki", i zliczaniu wytworzonych córek, wykorzystując do tego celu technikę mikromanipulacji. Miarą wieku i długowieczności komórek drożdży jest liczba komórek potomnych jakie jest w stanie wytworzyć komórka "matka" w ciągu swojego życia. Taki sposób wyrażania wieku w ogóle nie uwzględnia czasu życia komórek. Dlatego też w miejsce terminu "replikacyjne starzenie" wprowadzono pojęcie potencjału reprodukcyjny. Termin ten lepiej odzwierciedla istotę badań, jak również dopuszcza inną przyczynę ograniczonej zdolności reprodukcyjnej komórek drożdży niż proces starzenia.

Celem badań była analiza zmian wielkości komórek w czasie reprodukcyjnej fazy życia, analiza potencjału reprodukcyjnego oraz czasu życia komórek wybranych mutantów należących do grupy "długowiecznych". Biorąc pod uwagę, że fenotypowy efekt mutacji często wykazuje zależność od tła genetycznego, do analizy wykorzystano komórki drożdży reprezentujące trzy różne tła genetyczne tj. SP-4, BY4741 i BMA64-1A. Szczepy dzikie reprezentujące poszczególne tła genetyczne różnią się zarówno średnią jak i maksymalną wartością potencjału reprodukcyjnego, co może mieć wpływ na fenotypowe wyrażenie badanych mutacji. Do analizy wybrano trzy geny: *FOBI*, *SCH9*, *RPL20B*, których delecja prowadzi, według danych literaturowych, do zwiększenia potencjału reprodukcyjnego. Dodatkowo użyto mutantu delecyjnego *sfp1Δ*, opisywanego w literaturze jako "krótko żyjący".

Uzyskane wyniki dotyczące potencjału reprodukcyjnego wskazują, że efekt fenotypowy dla większości mutantów nie jest jednakowy i wykazuje ścisłą zależność od tła genetycznego. Jedynym genem, którego *knock - out* wykazał podobny efekt w każdym tle genetycznym był gen *FOBI*. Pozostałe szczepy w różnym stopniu wykazywały zmienność w obrębie tła genetycznego.

Określono również rolę tempa wzrostu wielkości komórek w regulacji potencjału reprodukcyjnego. Uzyskane wyniki wskazują na hipertrofię, jako jeden z możliwych

czynników regulujących potencjał reprodukcyjny komórek. W znakomitej większości przypadków maksymalna objętość jaką uzyskują mutanty o zwiększonym potencjale reprodukcyjnym jest równa objętości szczepu dzikiego. Świadczy to o wolniejszym tempie przyrostu objętości komórki w przeliczeniu na jedną generację. Podobne objętości uzyskują również mutanty o obniżonym potencjale reprodukcyjnym lub takie, które nie mają wpływu na liczbę generacji. Badania wykazały, że niektóre z analizowanych mutacji prowadzą do osiągnięcia przez komórkę wyższych objętości aniżeli szczep dziki, ale zawsze jest to związane ze zwiększeniem potencjału reprodukcyjnego.

Według powszechnie przyjętej interpretacji wyników badań replikacyjnego starzenia drożdży, miarą wieku komórki jest liczba wytworzonych komórek potomnych. W rzeczywistości RLS nie odzwierciedla faktycznej długości życia. Czas życia komórek drożdży to nie tylko czas, w którym wykonuje ona kolejne generacje (faza reprodukcyjna), ale również czas po zakończeniu reprodukcji (faza postreprodukcyjna). Czas trwania reprodukcyjnej fazy życia komórek jest wyznaczony przez dwa parametry: liczbę cykli, tj. potencjał reprodukcyjny oraz czas pojedynczego cyklu. Uzyskane dane wskazują, że oba te parametry mogą działać łącznie bądź też niezależnie, prowadząc do osiągnięcia tego samego efektu, np. mutanty delecyjne *foi1Δ* i *sfp1Δ* w tle genetycznym szczepu BMA64-1A pomimo znacznych różnic w potencjale reprodukcyjnym mają identyczną reprodukcyjną fazę życia. Po zakończeniu ostatniego cyklu komórkowego komórka nie umiera, ale żyje jeszcze przez pewien czas, którego długość zależy między innymi od czasu podwojenia oraz liczby cykli komórkowych wykonanych przez komórkę "matkę". Zwiększenie liczby generacji wykonanych przez komórkę przyczynia się do skrócenia czasu życia po zakończeniu reprodukcji. Może to być związane ze znacznym obciążeniem energetycznym komórki "matki", wynikającym z jednej strony z nakładów ponoszonych na wzrost jej objętości podczas kolejnych cykli, a z drugiej strony z nakładów związanych z reprodukcją, czyli tworzeniem nowych komórek potomnych. Sumując reprodukcyjny i postreprodukcyjny czas życia uzyskujemy wartość całkowitej długości życia, która może być podstawą do stwierdzenia czy mamy do czynienia z długowiecznością, czy też nie. Analiza całkowitej długości życia dostarczyła istotnych danych dotyczących długowieczności, które zmieniają zupełnie wnioski płynące z dotychczasowych badań nad starzeniem z wykorzystaniem drożdży *S. cerevisiae*. Żaden z analizowanych szczepów określanych w literaturze jako "długowieczne" tak naprawdę nie żyje dłużej od szczepu referencyjnego. Jedynie mutant delecyjny *sfp1Δ*, mimo tego, że w literaturze określany jest jako krótko żyjący (na podstawie

liczby generacji), po przeanalizowaniu całkowitej długości życia okazał się być jedynym, spośród analizowanych, szczepem długo żyjącym. Próbą wyjaśnienia mechanizmu prowadzącego do długowieczności mutantu *sfp1Δ* była analiza parametrów dotyczących bioenergetyki komórki: profil polisomów, inkorporacja [³⁵S]-metioniny *in vivo*, mikrokalorymetria izotermiczna, oznaczenie zawartości ATP oraz aktywności metabolicznej za pomocą sondy fluorescencyjnej FUN-1. Biorąc pod uwagę teorię tempa życia Pearla, wyniki dotyczące potencjału reprodukcyjnego analizowanych szczepów, czasu podwojenia, czasu trwania fazy reprodukcyjnej i postreprodukcyjnej można wnioskować, że za długowieczność mutantu *sfp1Δ* może być odpowiedzialne obniżone tempo metabolizmu komórki. Potencjał reprodukcyjny stanowił dotychczas podstawową miarę wieku i długowieczności w badaniach wykorzystujących drożdże jako organizm modelowy gerontologii. Stanowił on również kryterium podziału mutantów na długo i krótko żyjące. Zaprezentowane w tej pracy wyniki przeprowadzonych analiz skłaniają do zmiany sposobu określania długowieczności drożdży, uwzględniając przede wszystkim czas życia, a nie tylko liczbową wartość potencjału reprodukcyjnego komórek.