



**UNIWERSYTET RZESZOWSKI**  
**WYDZIAŁ BIOLOGICZNO-ROLNICZY**

**Roman Maślanka**

**Wpływ glukozy i jej metabolizmu na stan fizjologiczny,  
potencjał reprodukcyjny i długość życia komórek  
drożdży *Saccharomyces cerevisiae***

Praca doktorska przygotowywana  
pod kierunkiem **dr hab. Renaty Zadrąg-Tęcza, prof. UR**

Promotor pomocniczy: **dr Magdalena Kwolek-Mirek**

Obszar wiedzy: nauki przyrodnicze  
Dziedzina nauki: nauki biologiczne  
Dyscyplina naukowa: biologia

**RZESZÓW 2019**

*Niniejszą pracę doktorską dedykuję pamięci  
Profesora dr hab. Tomasza Bilińskiego,*

*który poprzez nasze wspólne rozmowy zaszczepił we mnie potrzebę patrzenia na problemy biologiczne z szerszej perspektywy. Dzięki niemu poznałem również czym powinien charakteryzować się Profesor w starym dobrym stylu a jego tłumaczenie dotyczące kwestii celowości posiadania przez organizm człowieka „pachy” (ang. spandrel) pozostanie na zawsze w mojej pamięci.*

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi*

***Pani dr hab. Renacie Zadrag – Tęcza, prof. UR,***

*za przekazaną wiedzę, poświęcony czas, cierpliwość, cenne wskazówki oraz pomoc w redagowaniu pracy. Szczególnie cenne były dla mnie dyskusje naukowe, które często stawały się inspiracją do badań i w znaczący sposób przyczyniły się do kreatywnego podejścia w poszukiwaniu rozwiązań problemów biologicznych, w tym nie tylko tych ujętych w niniejszej pracy. Poza nieocenioną pomocą merytoryczną udzieloną w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej, pragnę również podziękować Pani Profesor Renacie Zadrag-Tęcza za jej dobroć serca oraz ciepłe słowo, które tak, po ludzku i przyjacielsku były bezcennym wsparciem w trudniejszych momentach.*

*Wyrażam głęboką wdzięczność mojemu Promotorowi Pomocniczemu*

***Pani dr Magdalenie Kwolek-Mirek,***

*bez której moja praca w ramach doktoratu nie byłaby taką sama. Dziękuję za życzliwość, uśmiech, niezastąpioną pomoc w wykonywaniu doświadczeń i wsparcie w trakcie realizacji oraz redagowaniu pracy. Pragnę również podziękować za otwartość na współpracę umożliwiającą realizację obopólnych pomysłów oraz motywację do dalszego rozwoju. Poza pomocą merytoryczną udzieloną w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej, pragnę również podziękować Pani Doktor Magdalenie Kwolek-Mirek za to, że zawsze miała czas aby mnie wysłuchać i służyła radą nie tylko w kwestiach naukowych, ale też tych dotyczących nie mniej ważnej sfery prywatnej.*

*Chciałabym również podziękować*

***pracownikom Zakładu Biochemii i Biologii Komórki, mojej Rodzinie i Bliskim***

*za życzliwość, nieustanne wsparcie oraz motywację.*

*W szczególności dziękuję mojej kochanej żonie Paulinie oraz córeczce Oliwii*

*za radość którą dostarczają mi każdego dnia, nigdy niegasnącą wiarę we mnie, za to, że są zawsze przy mnie i wspierają mnie w dążeniu do osiągnięcia wymarzonych celów.*

## SPIS TREŚCI

<b>I.</b>	<b>DANE PODSTAWOWE</b> .....	<b>5</b>
<b>II.</b>	<b>WYKAZ PRAC NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO</b> .....	<b>6</b>
	<b>WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW</b> .....	<b>7</b>
	<b>STRESZCZENIE</b> .....	<b>8</b>
	<b>SUMMARY</b> .....	<b>10</b>
<b>III.</b>	<b>SYNTEZA NAJWAŻNIEJSZYCH ZAGADNIEŃ PRACY DOKTORSKIEJ</b> .....	<b>12</b>
1.	<b>WPROWADZENIE</b> .....	<b>12</b>
2.	<b>HIPOTEZA I CEL BADAŃ</b> .....	<b>23</b>
3.	<b>MATERIAŁY I METODY BADAŃ</b> .....	<b>24</b>
4.	<b>NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI BADAŃ</b> .....	<b>29</b>
	<i>Znaczenie glukozy dla prawidłowego funkcjonowania komórki i organizmu</i> .....	<b>29</b>
	<i>Produkty metabolizmu glukozy jako prekursorzy endogennych fluoroforów</i> .....	<b>30</b>
	<i>Parametry fizjologiczne komórek drożdży w warunkach różnego stężenia glukozy</i> .....	<b>31</b>
	<i>Poziom i źródło generacji RFT w warunkach różnego stężenia glukozy</i> .....	<b>33</b>
	<i>Zmiany metaboliczne i możliwości biosyntetyczne komórek drożdży w warunkach różnego stężenia glukozy</i> .....	<b>35</b>
	<i>Zdolność reprodukcyjna i długość życia komórek drożdży w warunkach różnego stężenia glukozy</i> .....	<b>38</b>
5.	<b>DYSKUSJA</b> .....	<b>43</b>
6.	<b>PODSUMOWANIE I WNIOSKI</b> .....	<b>55</b>
7.	<b>LITERATURA</b> .....	<b>56</b>
<b>IV.</b>	<b>PERSPEKTYWY</b> .....	<b>63</b>
<b>V.</b>	<b>POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE</b> .....	<b>64</b>
	<b>PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ</b>	
	<b>OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW</b>	

**I. DANE PODSTAWOWE**

**a) Imię i nazwisko**

**Roman Maślanka**

**b) Posiadane dyplomy i stopnie naukowe**

• **Inżynier - technologia żywności i żywienie człowieka**

Tytuł uzyskany na Wydziale Biologiczno – Rolniczym Uniwersytetu Rzeszowskiego dnia 27.03.2014 r.

Temat pracy: *Toksyczność akrylamidu i sposoby jej znoszenia przez składniki żywności o właściwościach antyoksydacyjnych.*

Promotor: dr Magdalena Kwolek-Mirek z Katedry Biochemii i Biologii Komórki Uniwersytetu Rzeszowskiego.

• **Magister – biologia, specjalność: biologia eksperymentalna**

Tytuł uzyskany na Wydziale Biologiczno – Rolniczym Uniwersytetu Rzeszowskiego dnia 28.06.2013 r.

Temat pracy: *Morfologiczne i fizjologiczne efekty mutacji genów kodujących białka rybosomalne.*

Promotor: dr Renata Zadrąg-Tęcza z Katedry Biochemii i Biologii Komórki Uniwersytetu Rzeszowskiego.

• **Licencjat – biologia**

Tytuł uzyskany na Wydziale Biologiczno – Rolniczym Uniwersytetu Rzeszowskiego dnia 15.07.2011 r. na podstawie egzaminu licencjackiego.

**c) Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych**

- **od 02. 2019 r. - do chwili obecnej:** Pracownik naukowo-techniczny w Zakładzie Biochemii i Biologii Komórki na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego

**II. WYKAZ PRAC NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO**

Rozprawa doktorska oparta jest na cyklu **4 publikacji naukowych**, których sumaryczny **IF** (wg roku opublikowania) jest równy **8,233**, natomiast liczba punktów **MNiSW** (zgodnie z danymi podanymi w PBN) wynosi **95**.

Oświadczenia współautorów o udziale własnym w przygotowaniu wymienionych prac stanowiących osiągnięcie naukowe zostały przedstawione w Załączniku.

1. **Masłanka R.**, Zadrag-Tęcza R. (2017) Glukoza - substancja o istotnym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania komórki i organizmu. [W]: *Wybrane substancje o znaczeniu biologicznym. Spojrzenie młodych naukowców. Monografia 2017*, red. Magdalena Kwolek-Mirek, Mateusz Mołoń, Kraków: Creativetime, 108-115. ISBN 978-83-63058-78-4. (autor korespondujący)

IF<sub>2017</sub> – **0**; IF<sub>5-letni</sub> – **0**; liczba punktów MNiSW<sub>2017</sub> – **5**

2. **Masłanka R.**, Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tęcza R. (2017) Consequences of calorie restriction and calorie excess for the physiological parameters of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Research*. 17(8):fox087. (autor korespondujący)

IF<sub>2017</sub> – **2,609**; IF<sub>5-letni</sub> – **3,022**; liczba punktów MNiSW<sub>2017</sub> – **30**

3. **Masłanka R.**, Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tęcza R. (2018) Autofluorescence of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells caused by glucose metabolism products and its methodological implications. *Journal of Microbiological Methods*. 146: 55-60. (autor korespondujący)

IF<sub>2017</sub> – **1,701**; IF<sub>5-letni</sub> – **1,961**; liczba punktów MNiSW<sub>2017</sub> – **25**

4. **Masłanka R.**, Zadrag-Tęcza R. (2019) Less is more or more is less: implications of glucose metabolism in the regulation of the reproductive potential and total lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Journal of Cellular Physiology*. doi: 10.1002/jcp.28386; dostępny on-line: 25 luty 2019.

IF<sub>2017</sub> – **3,923**; IF<sub>5-letni</sub> – **3,830**; liczba punktów MNiSW<sub>2017</sub> – **35**

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

<b>2-NBDG</b>	podlegający hydrolizie fluorescencyjny analog glukozy; 2-(N-(7-nitrobenz-2-oksa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoksyglukoza
<b>6-NBDG</b>	nie ulegający hydrolizie fluorescencyjny analog glukozy; 6-(N-(7-nitrobenz-2-oksa-1,3-diazol-4-yl)amino)-6-deoksyglukoza
<b>6-PGD</b>	dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa (ang. <i>6-phosphogluconate dehydrogenase</i> )
<b>Ad libitum</b>	żywienie do woli, żywienie o nieograniczonym dostępie do pokarmu
<b>ATP</b>	adenozyno-5'-trifosforan (ang. <i>adenosine triphosphate</i> )
<b>cAMP/PKA</b>	szlak sygnałowy zależny od cyklicznego adenozynomonofosforanu ( <b>cAMP</b> – ang. <i>cyclic adenosine monophosphate</i> ) oraz aktywacji kinaz białkowych A ( <b>PKA</b> – ang. <i>protein kinase A</i> )
<b>CE</b>	nadmiar kalorii (ang. <i>Calorie Excess</i> )
<b>CR</b>	restrykcja kaloryczna (ang. <i>Calorie Restriction</i> )
<b>DCF</b>	2',7'-dichlorofluoresceina (ang. <i>2',7'-dichlorofluorescein</i> )
<b>DHET</b>	dihydroetydyna (ang. <i>dihydroethidium</i> )
<b>ER</b>	siateczka śródplazmatyczna (ang. <i>endoplasmic reticulum</i> )
<b>G6PD</b>	dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (ang. <i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i> )
<b>GPCR</b>	receptory sprzężone z białkami G (ang. <i>G Protein-Coupled Receptors</i> )
<b>H<sub>2</sub>DCF</b>	2',7'-dichlorodihydrofluoresceina (ang. <i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein</i> )
<b>H<sub>2</sub>DCF-DA</b>	diocetan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (ang. <i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i> )
<b>IF</b>	okresowe głodzenie (ang. <i>Intermittent Fasting</i> )
<b>NADP(H)</b>	łączna komórkowa pula fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
<b>NADP<sup>+</sup></b>	forma utleniona fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> )
<b>NADPH</b>	forma zredukowana fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> )
<b>OD</b>	gęstość optyczna (ang. <i>Optical Density</i> )
<b>PPP</b>	szlak pentozofosforanowy (ang. <i>Pentose Phosphate Pathway</i> )
<b>rDNA/rRNA</b>	rybosomalny DNA/rybosomalny RNA
<b>RFT</b>	reaktywne formy tlenu
<b>rho<sup>0</sup></b>	komórki drożdży niekompletne oddechowo, pozbawione DNA mitochondrialnego
<b>RLS</b>	replikacyjna długość życia (ang. <i>Replicative Lifespan</i> )
<b>YPD</b>	podłoże do hodowli drożdży zawierające ekstrakt drożdży, pepton i glukozę (ang. <i>Yeast Extract-Peptone-Dextrose</i> )

**STRESZCZENIE**

Glukoza jest nie tylko podstawowym źródłem energii dla komórek większości organizmów, ale także związkami zapewniającym szkielet węglowy wykorzystywany do biosyntezy makromolekuł komórki. Odgrywa więc istotną rolę w metabolizmie i utrzymaniu prawidłowego stanu fizjologicznego komórki, co z kolei determinuje ich sprawność proliferacyjną. Jest to szczególnie widoczne w przypadku organizmów jednokomórkowych, w tym drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, u których zmiana dostępności glukozy w środowisku determinuje sposób w jaki uzyskują one energię. To powoduje, że w ich przypadku wpływ glukozy na stan fizjologiczny komórki ma bardziej bezpośredni charakter niż w przypadku organizmów wielokomórkowych, które wykształciły mechanizmy pozwalające regulować jej stężenie. Obecnie glukoza jest jedną z najintensywniej badanych substancji odżywczych mających wpływ na długość życia szeregu organizmów. Prowadzone w tym zakresie badania koncentrują się głównie wokół zagadnień związanych z ograniczeniem podaży glukozy oraz węglowodanów dla organizmu czyli z tzw. restrykcją kaloryczną. Jej pozytywne aspekty obserwowane są w szerokim zakresie gatunków, w tym także dla komórek drożdży *S. cerevisiae*. Znacząco mniej danych można natomiast znaleźć w odniesieniu do sytuacji przeciwnej czyli nadmiaru kalorii i jej konsekwencji obserwowanych na poziomie komórkowym. A w przypadku badań wykorzystujących jako model badawczy komórki drożdży *S. cerevisiae*, tego typu analizy praktycznie nie są wykonywane. Analiza tego zagadnienia jest szczególnie istotna ze względu na coraz częściej pojawiające się problemy związane z nadmiarem glukozy dostarczanej organizmowi wraz z pożywieniem oraz zaburzeniami jej metabolizmu.

Celem badawczym rozprawy doktorskiej była kompleksowa analiza porównawcza wpływu nadmiaru kalorii i restrykcji kalorycznej, uzyskanych poprzez zastosowanie różnych stężeń glukozy w podłożu hodowlanym, na szeroko pojęty stan fizjologiczny, potencjał reprodukcyjny i długość życia komórek drożdży *S. cerevisiae*. Podjęto także próbę wyjaśnienia zależności występujących między wewnątrzkomórkowymi szlakami metabolizmu glukozy, ze szczególnym uwzględnieniem szlaków odpowiedzialnych za możliwości biosyntetyczne komórki.

Badania przeprowadzono na komórkach drożdży hodowanych na podłożach zawierających różne stężenie glukozy. Do analiz wykorzystano szczep drożdży typu

dzikiego reprezentujący tło genetyczne BY4741 oraz izogeniczne względem niego szczepy pozbawione wybranych genów związanych z metabolizmem glukozy tj. *Δgpa2*, *Δgpr1* i *Δhvk2*. Taki układ eksperymentalny oraz wykonana analiza tempa poboru glukozy przez komórki drożdży umożliwiły testowanie roli zarówno zewnątrzkomórkowego jak i wewnątrzkomórkowego stężenia glukozy w regulacji zmian metabolicznych. Stan fizjologiczny komórek drożdży oceniono określając m.in. tempo wzrostu ich populacji, żywotność, wielkość i biomasę komórek, status funkcjonalny mitochondriów, poziom generacji reaktywnych form tlenu, wewnątrzkomórkowy poziom ATP, NADP(H) oraz aktywność enzymatyczną określonych dehydrogenaz szlaku pentozofosforanowego. Z kolei potencjał reprodukcyjny oraz długość życia komórek drożdży, z podziałem na poszczególne fazy, określono wykorzystując metodę mikromanipulacji.

Stwierdzono występowanie istotnej zależności między stężeniem glukozy, możliwościami biosyntetycznymi i wielkością komórek drożdży a ich potencjałem reprodukcyjnym i całkowitą długością życia. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, iż w komórce istnieje specyficzny kompromis metaboliczny pomiędzy różnymi sposobami wykorzystania glukozy, który może być aktywnie modulowany poziomem glukozy znajdującej się w otoczeniu komórki. Warto jednak podkreślić, że większy wpływ na funkcjonowanie komórki ma wewnątrzkomórkowy poziom glukozy aniżeli jej stężenie zewnątrzkomórkowe, co zostało stwierdzone m.in. na podstawie analizy tempa pobierania glukozy przez komórki drożdży szczepów pozbawionych wybranych genów związanych z metabolizmem glukozy. Wzrost stężenia glukozy w podłożu prowadzi do zwiększenia poziomu generowanych reaktywnych form tlenu w komórkach drożdży, przy czym uzyskane wyniki sugerują, że jest to generacja poza-mitochondrialna. Ponadto wysokie stężenia glukozy odpowiadające warunkom nadmiaru kalorii, zwiększają możliwości biosyntetyczne komórek drożdży. Z jednej strony prowadzi to do wzrostu ich wielkości i biomasy, ale z drugiej strony obniża możliwości reprodukcyjne i skraca całkowitą długość życia komórek drożdży. Uzyskane wyniki zwracają uwagę na wyraźny i w dużej mierze negatywny wpływ nadmiaru kalorii na parametry fizjologiczne komórki, co ze względu na złożoność wewnątrzkomórkowych szlaków metabolicznych i ich wzajemne powiązania sugeruje potrzebę dalszych analiz tego zagadnienia.

---

**SUMMARY**

Glucose is not only the primary source of energy for the cells of most organisms, but also provides carbon skeleton for biosynthesis of many cellular macromolecules. Therefore, glucose plays an important role in the metabolism and maintenance of the proper physiological state of the cell, which in turn determine their proliferative efficiency. This is particularly pronounced in the case of unicellular organisms, including yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in which the changes in the availability of glucose determine the way of obtaining energy. This causes that in the case of yeast the influence of glucose on the physiological state of the cell is more direct than in the case of multicellular organisms, which have developed mechanisms that allow to regulate glucose concentration. Currently, glucose is one of the most intensively studied nutrients which influence on the lifespan of a number of organisms. The studies conducted in this area are mainly focused on the reduction of glucose and carbohydrate supply, i.e. calorie restriction. The positive effect of calorie restriction is observed in a wide range of species, including yeast *S. cerevisiae*. Significantly less data can be found in regard to the calorie excess and its effect at the cellular level. Moreover, this problem is practically not performed in studies using the yeast *S. cerevisiae* cells as a research model. However, the analysis of influence of calorie excess and high glucose concentrations on cell physiology seems to be particularly important due to the problems associated with disorders in glucose metabolism.

The aim of the doctoral dissertation was to make a comprehensive analysis of the impact of calorie excess and calorie restriction, obtained by using different concentration of glucose in the culture medium, on the physiological state, reproductive potential and lifespan of the yeast cells. The studies also tried to explain the relationships between different intracellular pathways of glucose utilisation, with particular emphasis on the pathways responsible for the cellular biosynthetic capabilities.

The research were conducted using yeast cells cultured on media containing different glucose concentrations. The wild-type BY4741 yeast strain and three mutant strains isogenic to BY4741, with deletion of selected genes related to glucose metabolism, i.e.  $\Delta gpa2$ ,  $\Delta gpr1$  and  $\Delta hxk2$ , were used for the analysis. This experimental approach and the analysis of the rate of glucose uptake allowed to test the role of both

---

extracellular and intracellular glucose concentration in the regulation of metabolic changes. The physiological state of the yeast cells was assessed *inter alia* by determination of: growth rate of cell population, cell viability, cell size and cell biomass, functional status of mitochondria, generation of reactive oxygen species, intracellular level of ATP, NADP(H) and enzymatic activity of pentose phosphate pathway enzymes. The reproductive potential and total lifespan of the yeast cells were determined using the micromanipulation method.

It was found that there was a significant relationship between glucose concentration, biosynthetic efficiency, cell size, reproductive potential and total lifespan of the yeast cells. The results indicate that cells possess a specific metabolic trade-off between different pathways of glucose utilisation, which additionally can be actively modulated, among others by the different glucose concentration. However, it is worth emphasizing that intracellular glucose level is more important for cell functionality than its extracellular concentration. This is confirmed by the analysis of the rate of glucose uptake by the yeast cells of strains lacking selected genes related to glucose metabolism. Moreover, it was found that an increase in the glucose concentration in the medium leads to an increase in the level of reactive oxygen species in the yeast cells. However, the obtained results suggest that in this case reactive oxygen species have an extra-mitochondrial source. In addition, high glucose levels corresponding to calorie excess conditions increase the cellular biosynthetic capabilities. On the one hand, this leads to an increase in cell size and cell biomass, but on the other hand, it reduces the reproductive potential and shortens the total lifespan of the yeast cells. The obtained results draw attention to negative impact of calorie excess on the physiological state of the cell, which due to the complexity of intracellular metabolic pathways, need further investigation.

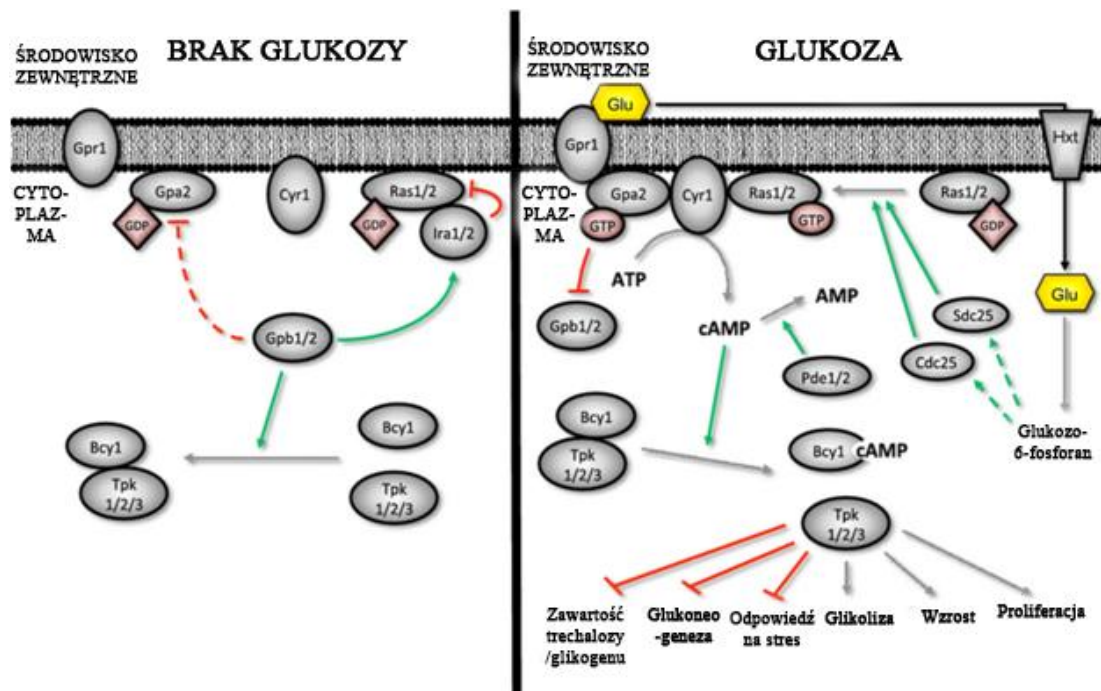
### **III. SYNTEZA NAJWAŻNIEJSZYCH ZAGADNIENÍ PRACY DOKTORSKIEJ**

#### **1. WPROWADZENIE**

Prawidłowe działanie komórek, a przez to również całego organizmu, wymaga stałego dostarczania składników odżywczych. Jednym z dominujących składników występującym w pokarmie są węglowodany, które powszechnie utożsamia się z dostarczaniem energii. Glukozę uważa się za podstawowy substrat energetyczny każdej komórki, bowiem wykorzystanie węglowodanów w wewnątrzkomórkowych procesach metabolicznych musi być poprzedzone ich przekształceniem do cząsteczki glukozy lub jej pochodnych. To z kolei powoduje niezwykłą wrażliwość komórek na wykrywanie glukozy w swoim otoczeniu. Świadczy o tym obecność w komórce szeregu białek spełniających rolę błonowych transporterów glukozy, sensorów glukozy, ale także białek związanych z wewnątrzkomórkową sygnalizacją uwarunkowaną obecnością glukozy (Magier i Jarzyna, 2013; Rødkaer i Faergeman, 2014). Szczególną grupę stanowią transportery glukozy, których izoformy w wyniku niewielkich zmian w łańcuchu polipeptydowym (m.in. poprzez zmiany miejsca glikozylacji) różnią się stopniem powinowactwa do glukozy ( $K_m$  od 1 do ok. 20 mM transportery z rodziny GLUT w komórkach ludzkich;  $K_m$  od 1 do 100 mM transportery z rodziny HXT w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*) (Busti i in., 2010; Magier i Jarzyna, 2013). Transportery glukozy są białkami stosunkowo konserwatywnymi i wykazują szereg podobieństw nawet między komórkami organizmów daleko spokrewnionych jak np. drożdże piekarnicze i człowiek. Tymi podobieństwami są m.in. posiadanie 12 transbłonowych domen czy podział transporterów na grupy o wysokim i niskim powinowactwie (czasem dodatkowo wyróżnia się grupę średniego powinowactwa). Istotną różnicą w przypadku komórek drożdży jest możliwość szybkiej zmiany wykorzystywanej izoformy transportera z rodziny HXT w odpowiedzi na zmianę ilości glukozy i innych cukrów w środowisku. Natomiast w przypadku komórek ludzkich transportery GLUT wykazują specyficzność tkankową, odpowiadającą określone mu zapotrzebowaniu na glukozę (Busti i in., 2010; Magier i Jarzyna, 2013). Przykładowo, transporter GLUT3 o wysokim powinowactwie glukozy ( $K_m$  ok. 1 mM) jest specyficzny dla komórek układu nerwowego, nie tylko dlatego, że wykazują one ciągle i wysokie zapotrzebowanie energetyczne, ale także ze względu na fakt, iż dla tego typu

komórek glukoza stanowi podstawowy substrat energetyczny (Simpson i in., 2008; Magier i Jarzyna, 2013). Z kolei transporter GLUT2 wyróżniający się dużą wartością  $K_m$  dla glukozy (17-20 mM) występuje w komórkach wątroby oraz komórkach  $\beta$ -trzustki, co powoduje pobieranie glukozy przez te komórki tylko wtedy gdy jej ilość w otoczeniu jest duża. To z kolei wpływa na aktywność procesu glikogenogenezy/glikogenolizy oraz sekrecję insuliny, odgrywających kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy glukozy (Newsholme i in., 2007; Magier i Jarzyna, 2013). Utrzymanie tej homeostazy wymaga szeregu mechanizmów odpowiadających za obniżanie lub podwyższanie poziomu glukozy we krwi, ale także, jak pokazują badania prowadzone przez kilka ostatnich lat, uwarunkowane jest obecnością neuropeptydu oreksyny i działalnością układu nerwowego synchronizującego cykliczne wahania stężenia glukozy we krwi z rytmem okołodobowym (Berg i in., 2002; Chrościcki i in., 2013). O tym jak kluczowa dla organizmu człowieka jest ścisła kontrola poziomu glukozy, świadczy stale zwiększający się odsetek osób dotkniętych chorobami metabolicznymi w tym cukrzycą typu 2 i otyłością, których główną przyczyną są przedłużające się stany zaburzenia homeostazy glukozy (Herman i Kahn, 2006). Nieco inaczej reakcja wywołana dostępnością glukozy wygląda w przypadku komórek drożdży *S. cerevisiae*, u których działanie glukozy jest jeszcze bardziej bezpośrednie ze względu na fakt, iż pojedyncza komórka jest jednocześnie odrębnym organizmem. Wyewoluował u nich szereg mechanizmów monitorujących poziom glukozy w środowisku, przez co umożliwiającą szybką odpowiedź na częste zmiany jej dostępności (Busti i in., 2010). Komórki drożdży oprócz wspomnianych wcześniej transporterów glukozy posiadają szereg białek błonowych spełniających rolę sensorów stężenia glukozy. Należą do nich m.in. białka Snf3 i Rgt2, wykrywające odpowiednio niskie i wysokie stężenia glukozy, których aktywność dodatkowo wpływa na indukcję odpowiedniej grupy genów *HXT* (Gancedo, 2008; Rødkaer i Faergeman, 2014). Innym, kluczowym w wykrywaniu i przekazywaniu informacji o zawartości glukozy w podłożu jest transbłonowe białko receptorowe Gpr1 i powiązane z nim wewnątrzkomórkowe białko Gpa2 działające na zasadzie podjednostki  $\alpha$  białka G. Oba białka nazywane czasem łącznie systemem GPCR (ang. *G-protein coupled receptor*) odgrywają istotną rolę w szlaku cAMP/PKA. W komórkach drożdży szlak ten jest głównym szlakiem sygnalizacyjnym dostosowującym metabolizm komórkowy do poziomu dostępnych

składników odżywczych. Szlak cAMP/PKA oprócz metabolizmu zaangażowany jest również w regulację wielu innych procesów jak wzrost, proliferacja czy odpowiedź na stres. Odbywa się to m.in. poprzez zmiany w procesach glikolizy i oddychania tlenowego, zmiany w ekspresji genów związanych z biogenezą rybosomów i możliwościami biosyntetycznymi komórki oraz poprzez zmiany w ekspresji genów związanych z mechanizmem odpowiedzi na stres a pozostających pod kontrolą czynników transkrypcyjnych Msn2 i Msn4 (Busti i in., 2010; Rødkaer i Faergeman, 2014).



Rys. 1. Szlak sygnalizacyjny GPCR – cAMP/PKA (Z: Rødkaer i Faergeman 2014 w tłumaczeniu na język polski).

Poza detekcją zewnątrzkomórkowego stężenia glukozy, równie istotne zdaje się być monitorowanie jej wewnątrzkomórkowego stężenia. Przyjmuje się, że ważną rolę w tym wewnątrzkomórkowym szlaku sygnalizacyjnym odgrywa izoforma heksokinazy – Hxk2. Enzym ten, generalnie odpowiedzialny za pierwszą reakcję glikolizy, czyli fosforylację glukozy do glukozy-6-fosforanu, okazuje się mieć znacznie w zależnej od glukozy represji szeregu genów, w tym uczestniczących w glukoneogenezie czy wykorzystywaniu alternatywnych źródeł węgla (Rolland i in., 2002; Rødkaer i Faergeman, 2014). Niemniej jednak najbardziej znana jest zależna od glukozy represja genów kodujących białka uczestniczące w oddychaniu tlenowym (Rodrigues i in., 2006). Represja ta powoduje, że komórki drożdży *S. cerevisiae* mogące przeprowadzać

zarówno fermentację jak też pełne oddychanie tlenowe, uzyskują energię na drodze fermentacji alkoholowej, nawet w sytuacji pełnej dostępności tlenu w środowisku, co zwane jest *efektem Crabtree* (Rodrigues i in., 2006). Przyczyny tego zjawiska nie są jeszcze w pełni wyjaśnione. Najczęściej wiązane są one z korzyściami ewolucyjnymi i ekologicznymi wynikającymi ze zwiększonej produkcji etanolu (Hagman i in., 2013; Dashko i in., 2014). Jednakże, podobny typ metabolizmu (uzyskiwanie energii na drodze glikolizy w warunkach tlenowych) obserwuje się również w przypadku komórek nowotworowych (Warburg, 1956; Vander Heiden i in., 2009; Diaz-Ruiz i in., 2011) oraz komórek macierzystych (Rafalski i in., 2012; Folmes i Terzic, 2016; Hu i in., 2016), co wskazuje na inne możliwe przyczyny tego zjawiska. Obecnie łączy się wybór tego mniej efektywnego, pod względem liczby wytworzonych cząsteczek ATP, procesu pozyskiwania energii przez intensywnie proliferujące komórki ze swoistą wydajnością energetyczną. Wydajność ta różni się od klasycznych modeli metabolicznych, bowiem nie dotyczy wyłącznie zysków energetycznych komórki, ale także kosztów inwestycji jakie musi ponieść komórka w przypadku danego sposobu uzyskiwania energii (Molenaar i in., 2009; Schuster i in., 2015; Nilsson i Nielsen, 2016). Dodatkowo ta specyficzna ekonomia komórkowa wydaje się być dostosowywana zarówno do warunków zewnątrzkomórkowych jak i aktualnych potrzeb komórki (Molenaar i in., 2009; Vander Heiden i in., 2009). Ten swoisty paradoks energetyczny obserwowany w przypadku intensywnie proliferujących komórek stanowi jeden z ważniejszych problemów badawczych analizowanych w ostatnich kilku latach, a badania bazujące na wykorzystaniu komórek drożdży, mogą okazać się bardzo przydatne dla wyjaśnienia wielu aspektów tego problemu. Koncentrując się na roli glukozy należy również podkreślić, że glukoza jest nie tylko źródłem energii, stanowi bowiem także szkielet węglowy do biosyntezy wielu makromolekuł komórki. W komórce przemiany glukozy w procesie glikolizy, poszczególnych reakcjach cyklu Krebsa oraz szlaku pentozofosforanowym (szlak PPP – ang. *pentose phosphate pathway*) dostarczają metabolitów węglowych niezbędnych do biosyntezy kluczowych składników komórki, w tym nukleotydów, aminokwasów, lipidów i witamin (Vander Heiden i in., 2009; Folmes i Terzic, 2016; Maslanka i in., 2018). Istotną, choć nie do końca docenianą rolę w wykorzystaniu glukozy jako substratu do komórkowych biosyntez pełni szlak PPP. Podstawowym zadaniem tego szlaku jest wytworzenie rybozo-5-fosforanu

---

(niezbędnego do syntezy nukleotydów), NADPH (biorącego udział w syntezie kwasów tłuszczowych i utrzymywaniu komórkowej puli zredukowanego glutationu), a także umożliwienie syntezy aminokwasów aromatycznych (Berg i in., 2002; Rodrigues i in., 2006). Warty podkreślenia jest ścisły związek oraz możliwość wzajemnego oddziaływania między glikolizą a szlakiem PPP. Odbywa się to dzięki przekształceniom pierwszego wewnątrzkomórkowego metabolitu glukozy tj. glukozo-6-fosforanu stanowiącego punkt wspólny obu szlaków. A dodatkowo w zależności od potrzeb komórki oraz wskutek dwukierunkowej działalności enzymów transaldolazy i transketolazy, nadmiar rybozo-5-fosforanu wytworzonego w szlaku PPP może być przekształcony w metabolity pośrednie glikolizy i odwrotnie (Berg i in., 2002; Rodrigues i in., 2006). Glukoza jest też jednym z najintensywniej analizowanych składników odżywczych, mającym wpływ na sprawność fizjologiczną i długość życia szeregu organizmów (Lee i in., 2017). Dostępność składników odżywczych w tym również glukozy ściśle wiąże się z zagadnieniem podaży kalorii i określeniem jego wpływu na stan fizjologiczny organizmu. Badania, których przedmiotem jest glukoza, koncentrują się przede wszystkim na analizie wpływu restrypcji kalorycznej (CR – ang. *calorie restriction*) lub jej wygodniejszej alternatywy tj. okresowego głodzenia (IF – ang. *intermittent fasting*) na stan zdrowia i długość życia organizmów (Roth i Polotsky, 2012; Longo i Mattson, 2014; Fontana i Partridge, 2015). Pozytywne skutki wynikające z ograniczenia kalorii tłumaczone są przez szereg hipotez wskazujących między innymi na: obniżenie tempa metabolizmu, redukcję poziomu generowanych reaktywnych form tlenu (RFT), poprawę wewnątrzkomórkowych mechanizmów kontroli jakości i ilości białek czy zmiany związane z aktywnością sirtuin i stanem redoks komórki (Masoro, 2000; Tavernarakis i Driscoll, 2002; Heilbronn i Ravussin, 2003; Lu i Lin, 2010; Redman i in., 2018). Poszczególne hipotezy traktowane indywidualnie nie wyjaśniają w pełni całego zjawiska, co sugeruje jego kompleksowy charakter oraz możliwość addytywnego działania poszczególnych mechanizmów (Masoro, 2000; Sinclair, 2005). Choć pozytywny wpływ CR na poprawę sprawności fizjologicznej organizmów i zapobieganie chorobom związanym z wiekiem wydaje się być niekwestionowany (Smith i in., 2010; Colman i in., 2014; Fontana i Partridge, 2015; Mattison i in., 2017), to jej wpływ na długość życia organizmów wydaje się być sprawą mniej oczywistą i wciąż stanowiącą przedmiot dyskusji naukowej (Colman i in., 2009; Smith i in., 2010;

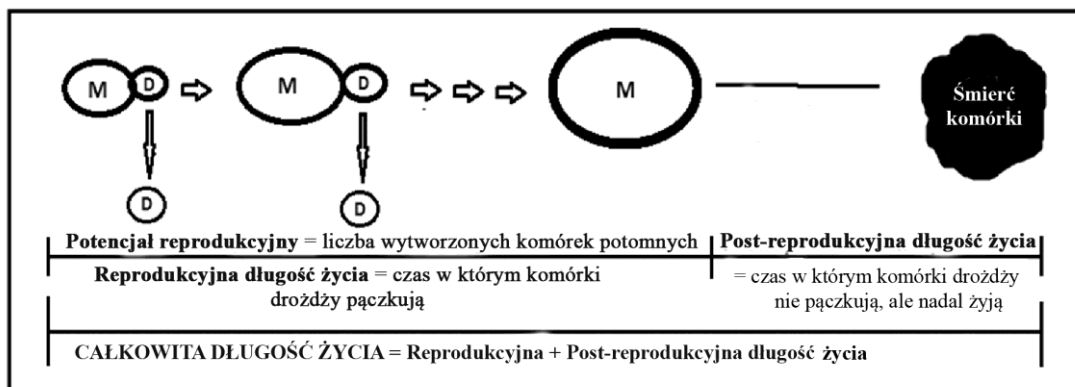
Austad, 2012; Mattison i in., 2012; Biliński i in., 2015). Niezmiernie ważnymi ze względu na możliwość odniesienia uzyskanych wyników do organizmu człowieka są badania analizujące wpływ restrykcji kalorycznej na funkcjonowanie i długość życia małp z rodzaju *Rhesus (Macaca mulatta)* (Colman i in., 2009; Mattison i in., 2012). W badaniach tych prowadzonych przez dwa niezależne ośrodki naukowe (Wisconsin National Primate Research Center i National Institute on Aging, Maryland) w obu przypadkach odnotowano pozytywny wpływ CR na stan fizjologiczny i metaboliczny zwierząt, jednakże zwiększenie długości życia zanotowano tylko w przypadku badań prowadzonych przez grupę z Wisconsin (Colman i in., 2009). Prawdopodobnej przyczyny różnic uzyskanych wyników upatruje się w sposobie podaży składników odżywczych dla grup kontrolnych (Austad, 2012), spośród których jedne były karmione ściśle określoną ilością pokarmu, zgodną z rzeczywistym zapotrzebowaniem energetycznym (Mattison i in., 2012) natomiast drugie na zasadzie *ad libitum* czyli posiadały nieograniczony dostęp do pokarmu (Colman i in., 2009). Sugeruje to, że dostarczanie składników odżywczych na zasadzie *ad libitum* może być rozpatrywane jako stan nadmiaru kalorii (CE – ang. *calorie excess*), w którym ilość dostarczanych składników odżywczych jest wyższa niż wynika to z rzeczywistego zapotrzebowania energetycznego organizmu. Stan taki praktycznie nie występuje naturalnie w przyrodzie, gdzie dostępność składników odżywczych jest ograniczona, a okresy obfitości przeplatane są okresami silnego niedoboru (Zimmet i Thomas, 2003; Biliński i in., 2015). Kwestie nadmiaru kalorii poruszane są głównie w odniesieniu do funkcjonowania całego organizmu, aczkolwiek wieloaspektowa analiza tego zagadnienia, również na poziomie komórkowym, wydaje się być szczególnie ważna w kontekście negatywnych konsekwencji wywołanych otyłością, cukrzycą typu 2 oraz zaburzeniami określanymi wspólnym terminem – zespół metaboliczny. Tym bardziej, że zaburzenia te mają swoją etiologię również w niedostawaniu kształtowanego przez tysiące lat ewolucji łowiecko-zbierackiego genotypu człowieka do nowoczesnego i konsumpcyjnego stylu życia ludzi współczesnych (Zimmet i Thomas, 2003; Biliński i in., 2015; Mathers, 2015). Większość danych dotyczących CR pochodzi z badań prowadzonych z wykorzystaniem organizmów modelowych, w tym również drożdży *S. cerevisiae*, dla których warunki restrykcji kalorycznej uzyskuje się poprzez obniżenie zawartości glukozy w podłożu z 2% używanych standardowo w hodowli do poziomu

0,5% lub niżej. Badania z wykorzystaniem drożdży koncentrują się na analizie wpływu warunków CR na replikacyjną długość życia (długość życia określaną jako liczba komórek potomnych wytworzonych przez pojedynczą komórkę matkę) i sprawność fizjologiczną komórek (Lin i in., 2002; Barros i in., 2004; Kaeberlein i in., 2005; Zuin i in., 2010; Sharma i in., 2011; Schleit i in., 2013; Tahara i in., 2013; Denoth Lippuner i in., 2014; Huberts i in., 2014; Maslanka i in., 2017). Niemniej jednak wyniki prowadzonych badań nie dają jednoznacznych konkluzji. Proponuje się, że CR wydłuża replikacyjną długość życia komórek drożdży poprzez zwiększenie oddychania tlenowego (Lin i in., 2002; Tahara i in., 2013). Taka interpretacja nie broni się jednak w świetle wyników badań dotyczących CR, a prowadzonych z wykorzystaniem komórek niekompletnych oddechowo ( $rho^0$ ), gdzie obserwuje się zwiększenie replikacyjnej długości życia pomimo braku możliwości prowadzenia oddychania tlenowego (Kaeberlein i in., 2005). Ponadto postuluje się, że CR działa poprzez aktywację sirtuin będących  $NAD^+$ -zależnymi deacetylazami przeprowadzającymi reakcję odszczepienia grup acetylowych od różnych klas białek, w tym białek histonowych (Lin i in., 2000; Lin i in., 2004), chociaż istnieją także wyniki przedstawiające niezależne od sirtuin działanie CR (Kaeberlein i in., 2004; Smith i in., 2007). Nie rozstrzygnięta jest również kwestia reaktywnych form tlenu, bowiem istnieją dane prezentujące zarówno spadek (Barros i in., 2004; Maslanka i in., 2017) jak i wzrost (Zuin i in., 2010; Sharma i in., 2011) poziomu generowanych RFT w komórkach drożdży hodowanych w warunkach restrykcji kalorycznej. Z tych względów określenie konsekwencji wynikających ze stosowania restrykcji kalorycznej jest nadal przedmiotem wielu badań prowadzonych z wykorzystaniem komórek drożdży jako modelu badawczego. Tymczasem praktycznie nie analizuje się zmian wywołanych działaniem nadmiaru kalorii (CE), wynikającym (analogicznie do warunków CR) z wysokich stężeń glukozy (Maslanka i in., 2017; Maslanka i Zadrąg-Tecza, 2019). Obecnie istnieją tylko ograniczone dane pokazujące wpływ wysokiego stężenia glukozy na wybrane aspekty fizjologii komórek drożdży (Weinberger i in., 2010; Zuin i in., 2010).

Przyjmuje się, że najbardziej miarodajnym wyrazem sprawności fizjologicznej komórki są jej możliwości proliferacyjne, bowiem biosynteza kluczowych makromolekuł niezbędnych zarówno dla prawidłowego funkcjonowania komórki

---

wyjściowej jak i przekazywanych komórce potomnej wymaga pełnej synchronizacji i znacznych nakładów inwestycyjnych. U człowieka i innych ssaków wraz z wiekiem obserwuje się spadek możliwości regeneracyjnych, co ma związek m.in. ze stopniowym spadkiem zdolności proliferacyjnych poszczególnych typów komórek (Tschen i in., 2009; Gunin i in., 2011). Zjawisko ograniczonej zdolności proliferacyjnej odnotowano również w przypadku komórek drożdży *S. cerevisiae*, bowiem komórka „matka” w ciągu swojego życia może wytworzyć ograniczoną liczbę komórek potomnych (Mortimer i Johnston, 1959). Zjawisko to analizowane jest najczęściej w kontekście procesu starzenia się stąd stosowane określenie - replikacyjna długość życia (ang. *replicative lifespan*; RLS). Replikacyjna długość życia wyrażana jest jako liczba komórek potomnych (pączków) wytwarzanych przez pojedynczą komórkę (komórkę „matkę”) w ciągu jej życia (Sinclair i in. 1998). Biorąc pod uwagę, że taki sposób wyrażania długości życia nie ma charakteru jednostki czasu, liczba komórek potomnych może być traktowana bardziej jako miara potencjału reprodukcyjnego komórki (ang. *reproductive potential*) (Zadrag-Tecza i in., 2013; Zadrag-Tecza i in., 2018). Ponadto odnoszenie RLS jako jednoznacznego wyznacznika długości życia komórek drożdży wiąże się z przyjęciem założenia, że życie komórki kończy się wraz z utratą zdolności do proliferacji. Natomiast, jak pokazują wyniki badań, komórki drożdży po wytworzeniu ostatniej komórki potomnej nie umierają natychmiast, ale żyją jeszcze przez pewien czas (Minois i in., 2005; Zadrag i in., 2008). Powoduje to, że na całkowitą długość życia komórki drożdży (ang. *total lifespan*) składa się czas kiedy komórka wytwarza kolejne komórki potomne (ang. *reproductive lifespan*), jak też czas kiedy komórka już nie pączkuje, ale nadal pozostaje żywa (ang. *postreproductive lifespan*) (Zadrag i in., 2008) (Rys. 2).



Rys. 2 Schemat podziału długości życia pojedynczej komórki drożdży *S. cerevisiae*

Ograniczone możliwości reprodukcyjne komórek drożdży próbuje się tłumaczyć biorąc pod uwagę różnorodne czynniki w tym gromadzenie agregatów białkowych, niestabilność genetyczną i wzrost liczby pozachromosomalnych kóelek rDNA czy akumulację uszkodzonych mitochondriów (Smith i in., 2015). Alternatywne wyjaśnienie ograniczonych możliwości proliferacyjnych komórek drożdży, odnoszące się do relatywnie dużych rozmiarów uzyskiwanych przez komórki, które zakończyły proliferację, dostarcza hipoteza hipertrofii (Zadrag-Tecza i in., 2009; Biliński i in., 2012). Hipoteza ta postuluje istnienie ścisłego związku pomiędzy tempem wzrostu wielkości komórek a ich możliwościami proliferacyjnymi. W przypadku komórek drożdży powszechnie uznana jest ścisła koordynacja między wielkością komórki a reprodukcją, mająca miejsce w końcowej fazie G1 cyklu komórkowego w tzw. punkcie START. Polega ona na konieczności osiągnięcia przez komórkę określonej wielkości progowej umożliwiającej przekroczenie punktu START i rozpoczęcie pączkowania (Hartwell i in., 1974). Z kolei sam mechanizm cytokinezy na drodze pączkowania stanowi wyjaśnienie przyczyny stopniowego wzrostu wielkości komórki i w konsekwencji zatrzymania cyklu komórkowego, co jest podstawą postulowanej hipotezy hipertrofii. Pączkowanie eliminuje bowiem możliwość redukcji wielkości komórki „matki” tym samym przyczyniając się do stopniowego wzrostu jej rozmiarów, zwłaszcza w fazie G1 każdego kolejnego cyklu komórkowego. Skutkuje to osiąganiem przez komórkę po kilkudziesięciu cyklach wielkości (określanej stanem hipertrofii), której konsekwencją jest zablokowanie możliwości dalszej reprodukcji (Zadrag-Tecza i in., 2009; Biliński i in., 2012; Bilinski i Zadrag-Tecza, 2017). Jednakże stan hipertrofii i wynikające z niego ograniczenie możliwości reprodukcyjnych komórki nie powinny być traktowane tylko w kwestiach parametrów fizycznych, tzn. niekorzystnych zmian stosunku powierzchni do objętości komórki wraz ze wzrostem jej rozmiarów. Wielkość komórki ma również istotny wpływ na architekturę wewnątrzkomórkową oraz szereg wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych (Bilinski, 2012; Biliński i in., 2012; Zadrag-Tecza i in., 2018). Wzrost wielkości pociąga bowiem za sobą konieczność dostosowania biosyntezy i dystrybucji poszczególnych składników komórkowych, aby utrzymać ich odpowiednią proporcję względem rozmiarów komórki. Stąd też tempo przyrostu wielkości komórki w czasie pojedynczego cyklu decyduje o potencjalnych możliwościach proliferacyjnych komórki (Zadrag-Tecza i in., 2009; Yang i in., 2011;

Biliński i in., 2012; Wright i in., 2013). Tempo przyrostu wielkości komórki a co za tym idzie szybkość osiągnięcia postulowanego stanu hipertrofii zależy od przebiegu procesów metabolicznych, w tym także procesów warunkujących możliwości biosyntetyczne komórki. Te z kolei mogą być modyfikowane zarówno przez czynniki genetyczne jak też warunki środowiskowe, spośród których szczególnie istotna jest dostępność składników odżywczych. Na uwagę zasługuje fakt, że związek pomiędzy wielkością komórki a jej zdolnością do reprodukcji, obserwowany jest nie tylko w przypadku komórek drożdży, ale także w przypadku komórek ssaczy czy ludzkich hodowanych w warunkach *in vitro*. Dowiedziono m.in. że potencjał reprodukcyjny fibroblastów i komórek nabłonkowych rogówki wykazuje negatywną korelację względem wielkości komórek (Angello i in., 1987; De Paiva i in., 2006). Z kolei w przypadku zaburzeń związanych z cukrzycą i otyłością odnotowano, iż tempo wzrostu wielkości komórek i powiązana z nim wyższa szybkość procesów biosyntetycznych może prowadzić do osiągnięcia przez nie fenotypu hipertrofii i zatrzymania proliferacji (Morocutti i in., 1996; Lumeng i Saltiel, 2011; Liu i in., 2012). Dodatkowo jak pokazują najnowsze wyniki badań wielkość komórek oraz jej wzrost prowadzący do stanu hipertrofii, mogą być również rozpatrywane jako czynniki korelujące z długością życia całego organizmu (Anzi i in., 2018; Patra i Bardeesy, 2018).

Kluczowa, wieloraka a jednocześnie stosunkowo konserwatywna rola glukozy w metabolizmie komórki stała się punktem wyjścia obranej przeze mnie drogi badawczej. Niniejsza praca przedstawia wyniki i wnioski płynące z analizy fizjologicznych i morfologicznych parametrów komórek drożdży *S. cerevisiae* hodowanych na podłożu z różnym stężeniem glukozy. Za wyborem zastosowanego modelu badawczego przemawia m.in. podobieństwo dotyczące szlaków metabolizowania glukozy w komórkach drożdży oraz w komórkach wyższych eukariontów. Dodatkowo niewątpliwą zaletą tego modelu, poza krótkim cyklem życiowym, małymi rozmiarami oraz możliwością prowadzenia szerokiego zakresu manipulacji genetycznych, jest ścisły związek typu metabolizmu, wykorzystywanego do uzyskiwania energii, z dostępnością glukozy. Związek ten jest tak silny, że to właśnie obecność glukozy a nie dostępność tlenu determinuje sposób uzyskiwania energii na drodze fermentacji bądź oddychania tlenowego. Wydaje się, że cecha ta nieco dyskwalifikuje porównanie metabolizmu komórek ludzkich z metabolizmem komórek

---

drożdży, ale jak pokazują dane dotyczące komórek nowotworowych czy komórek macierzystych, uzyskiwanie energii na drodze glikolizy w warunkach tlenowych ma również miejsce w intensywnie proliferujących komórkach ludzkich. Kolejnym atutem, często nieco pomijanym, jest podobieństwo szlaków biosyntetycznych wykorzystujących metabolity glukozy jako źródło szkieletu węglowego zarówno w komórkach drożdży jak i komórkach ludzkich. Stąd też wykorzystując do analiz komórki drożdży podjęto próbę poszerzenia wiedzy na temat kompromisu metabolicznego pomiędzy różnymi, wewnątrzkomórkowymi szlakami przekształcenia glukozy, a także tego czy kompromis ten zmienia się w warunkach różnej dostępności glukozy. To z kolei w istotny sposób może wpływać na tempo wzrostu komórki, co biorąc pod uwagę założenia hipotezy hipertrofii może sugerować, że zmiany metaboliczne wywołane różnymi stężeniami glukozy mogą okazać się ważnymi determinantami możliwości reprodukcyjnych komórek. Dlatego też, badania objęły analizę potencjału reprodukcyjnego, ale także długości życia komórek drożdży hodowanych na podłożach zawierających różne stężenie glukozy. O ile w literaturze dostępne są dane określające wpływ niskich stężeń glukozy tj. warunków restrykcji kalorycznej na wybrane parametry fizjologiczne oraz długość życia (określaną jako RLS) komórek drożdży, o tyle zastosowanie warunków nadmiaru kalorii i analizy prowadzone w warunkach wysokiego stężenia glukozy prezentowane w niniejszej pracy wskazują na nowe podejście badawcze. Zaproponowane warunki nadmiaru kalorii mogą stanowić swoistą analogię do warunków podaży składników odżywczych, odbywających się na zasadzie *ad libitum*, stosowanej w badaniach m.in. z wykorzystaniem naczelnych. Ponadto takie podejście do problemu i porównanie ze sobą różnych warunków podaży kalorii wydaje się być bardzo zasadne w sytuacji, gdy spożywanie nadmiaru kalorii jest powszechne, a ludzkość boryka się z rosnącym problemem otyłości i cukrzycy typu 2. To powoduje, że podejmowanie działań w kierunku pełniejszego zrozumienia mechanizmu zależności między zmianami poziomu glukozy, komórkowymi szlakami metabolicznymi a kontrolą wzrostu wielkości komórki i jej możliwościami proliferacyjnymi, ma szczególnie ważne znaczenie dla rozwoju obecnej wiedzy. W takim też kontekście prowadzono badania, których wyniki przedstawia niniejsza rozprawa doktorska.

## 2. HIPOTEZA I CEL BADAŃ

Główną i nadrzędną hipotezą badawczą przyjętą do weryfikacji w ramach analiz ujętych w niniejszej rozprawie doktorskiej było założenie, iż zmiana stężenia glukozy ma wpływ na stan fizjologicznych komórek, a przez to reguluje możliwości reprodukcyjne i długość życia komórek. Z kolei dodatkową hipotezę oparto na założeniu, że wysokie stężenia glukozy, utożsamiane z warunkami nadmiaru kalorii, negatywnie wpływają na funkcjonowanie komórek drożdży.

Celem badawczym rozprawy doktorskiej opartej na cyklu publikacji naukowych było określenie wpływu glukozy i zmian jej stężenia na szeroko pojęty stan fizjologiczny, metabolizm, potencjał reprodukcyjny i długość życia komórek drożdży *S. cerevisiae*. Aby możliwym było osiągnięcie celu badawczego niniejszej pracy, a uzyskane wyniki mogły posłużyć do wieloaspektowych porównań, na poszczególnych etapach realizacji założeń skupiono się na następujących zagadnieniach:

- ✓ przedstawienie obecnego stanu wiedzy na temat roli glukozy w odniesieniu zarówno do metabolizmu komórki jak i funkcjonowania organizmu człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem zaburzeń homeostazy glukozy i rozwojem chorób metabolicznych
- ✓ sprawdzenie i dostosowanie metod badawczych oraz warunków eksperymentu, w tym używanych stężeń glukozy oraz czasu analiz umożliwiających porównanie komórek drożdży wykazujących zbliżony typ metabolizmu
- ✓ określenie konsekwencji warunków restrykcji kalorycznej i nadmiaru kalorii na wybrane parametry fizjologiczne komórek drożdży, ze szczególnym uwzględnieniem poziomu generacji reaktywnych form tlenu
- ✓ analiza długości życia i zdolności reprodukcyjnych komórek drożdży w warunkach różnego stężenia glukozy
- ✓ określenie i analiza czynników mogących wywierać istotny wpływ na zdolności reprodukcyjne komórek drożdży w warunkach różnego stężenia glukozy, ze szczególnym uwzględnieniem zmian metabolicznych, możliwości biosyntetycznych oraz wielkości komórki
- ✓ zaproponowanie koncepcji wyjaśnienia związku pomiędzy zależnymi od stężenia glukozy zmianami metabolicznymi, wielkością, możliwościami biosyntetycznymi oraz potencjałem reprodukcyjnym komórki

### 3. MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Materiał badawczy stanowiły komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* reprezentujące głównie tło genetyczne BY4741 (szczep dziki) (*MATa his3 leu2 met15 ura3* (EUROSCARF)) oraz izogeniczne względem niego szczepy pozbawione wybranych genów związanych z metabolizmem glukozy, spośród których do szczegółowych analiz ujętych w pracy wybrane zostały  $\Delta gpa2$ ;  $\Delta gpr1$  oraz  $\Delta hxk2$ . Dodatkowo w publikacji nr 3 – [Maslanka i in., 2018](#), w celu porównań wykorzystano również dwa inne szczepy dzikie reprezentujące odrębne tła genetyczne tj. BMA64-1A (*MATa his3-11\_15 leu2-3\_112 ura 3-1 trp1Δ2 ade2-1 can1-100* (EUROSCARF)) i SP4 (*MATa leu1 arg4* (Biliński i in., 1978)).

Jako podłoże hodowlane wykorzystywano standardowe podłoże YPD ze zmiennymi stężeniami glukozy jako kluczowym czynnikiem eksperymentalnym (0,5%; 2%; 4%). Hodowle prowadzono w warunkach kontrolowanej temperatury (28°C) na wytrząsarce obrotowej przy 150 rpm.

W badaniach zastosowano różnorodne układy eksperymentalne, tj. zarówno zmienne genetyczne (zastosowanie szczepów drożdży pozbawionych wybranych genów biorących udział w wykrywaniu i sygnalizacji zależnej od glukozy) jak i zmienne środowiskowe (różne stężenia glukozy w podłożu hodowlanym). Pozwoliło to na wieloaspektową analizę wpływu glukozy na komórkę, z drugiej jednak strony wymagało ścisłego dopracowania i kontrolowania warunków eksperymentalnych. Taka kontrola warunków doświadczalnych była szczególnie ważna, ze względu na komórki hodowane na podłożu o niskim stężeniu glukozy (0,5%), gdzie wyczerpanie glukozy bardzo szybko prowadzi do tzw. przeskoku metabolicznego (ang. *diauxic shift*), całkowicie zmieniającego metabolizm komórki. Stąd też właściwą fazę badań poprzedziły analizy wstępne przy zastosowaniu szeregu stężeń glukozy w środowisku hodowlanym. Uzyskane dzięki nim wyniki pozwoliły na dopracowanie warunków prowadzenia eksperymentów tak, aby w jak największym stopniu wykluczyć porównywanie komórek wyjściowo różniących się typem metabolizmu, bądź też znajdujących się w warunkach, które mogłyby uruchomić odpowiedź na stres. Na bazie wyników przeprowadzonych analiz dokonano wyboru odpowiednich stężeń glukozy w podłożu (0,5% - warunki restrykcji kalorycznej; 2% - warunki optymalne; 4% - warunki nadmiaru kalorii) oraz czasu prowadzenia hodowli na poszczególnych

---

podłożach, co pozwoliło na porównywanie komórek uzyskujących energię w zbliżony sposób tj. dzięki fermentacji. Czas prowadzenia hodowli został wybrany m.in. na podstawie analizy szybkości zużywania glukozy i produkcji etanolu, a komórki we wszystkich eksperymentach były analizowane w chwili gdy w podłożu hodowlanym był obecny etanol przy jednocześnie stosunkowo wysokim poziomie glukozy w porównaniu do jej stężenia początkowego (Publikacja nr 2 – [Maslanka i in., 2017](#), Fig. 2).

Jedną z ważniejszych analiz przeprowadzonych w ustalonych układach eksperymentalnych było określenia tempa pobierania glukozy (Publikacja nr 2 – [Maslanka i in., 2017](#), Fig. 3A; Publikacja nr 4 – [Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019](#), Fig. 1). W tym celu przeprowadzono analizę przy użyciu fluorescencyjnego analogu glukozy 6-NBDG (6-(N-(7-nitrobenz-2-oksa-1,3-diazol-4-yl)amino)-6-deoksyglukoza). Standardowo w badaniach prowadzonych z wykorzystaniem komórek drożdży stosowany jest inny analog glukozy 2-NBDG (2-(N-(7-nitrobenz-2-oksa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoksyglukoza) (Roy i in., 2015; Zhang i in., 2015). Analog ten może być fosforylowany przez heksokinazę i następnie degradowany do produktów nie fluorescencyjnych. Biorąc pod uwagę, że w układzie eksperymentalnym jaki został wykorzystany w tej pracy jednym z analizowanych szczepów był szczep pozbawiony genu kodującego heksokinazę 2 (*HXK2*) a także szczepy z delecją innych genów związanych z metabolizmem glukozy jak *GPA2* i *GPRI*, koniecznym było zastosowanie innego analogu glukozy. Wykorzystano więc nie ulegający hydrolizie analog glukozy 6-NBDG, którego modyfikacja w pozycji C6 uniemożliwia jego fosforylowanie, dzięki czemu jego fluorescencja jest niezależna od aktywności heksokinazy, co jednocześnie prowadzi do jego akumulacji w komórce (proporcjonalnej do szybkości pobierania glukozy). W związku z tym, że według mojej wiedzy było to pierwsze zastosowanie analogu 6-NBDG w przypadku określenia tempa pobierania glukozy w komórkach drożdży, wymagało to dodatkowych etapów sprawdzających poprawność uzyskiwanych tą metoda wyników. Kluczowa okazała się analiza długości fal wzbudzenia i emisji fluorescencji analogu 6-NBDG (odpowiednio  $\lambda_{\text{ex}} = 455 \text{ nm}$  i  $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$ ) oraz określenie poziomu fluorescencji wyjściowej analizowanych próbek (zawiesina komórek drożdży przed podaniem analogu). Analizy te pozwoliły dodatkowo na zobrazowanie i dokładne scharakteryzowanie zjawiska autofluorescencji

---

w komórkach drożdży, co zostało przedstawione w publikacji nr 3 - Maslanka i in., 2018.

Właściwą fazę badań rozpoczęto od scharakteryzowania stanu fizjologicznego oraz parametrów morfologicznych komórek drożdży hodowanych na podłożach zawierających różne stężenie glukozy. W tym celu wykorzystano testy wzrostowe oparte na oznaczeniu wzrostu komórek drożdży na podłożu stałym o różnym stężeniu glukozy oraz pomiary gęstości optycznej (OD) zawiesiny drożdży, na bazie którego wyznaczono krzywe wzrostu populacji komórek drożdży oraz obliczono relatywne tempo wzrostu (ang. *growth rate*). Żywotność i witalność komórek drożdży określono za pomocą pomiarów fluorymetrycznych oraz mikroskopii fluorescencyjnej, bazujących na wykorzystaniu barwienia różnicującego z dioctanem fluoresceiny i jodkiem propidyny oraz użyciu sondy fluorescencyjnej FUN-1. Analizy wykonano biorąc pod uwagę modyfikacje metod opisane w pracy (Kwolek-Mirek i Zadrag-Tecza, 2014). Spośród parametrów morfologicznych określono wielkość komórek drożdży w populacji (zarówno wartość średnią [Publikacja nr 2 - Maslanka i in., 2017, Fig. 4] jak i rozkład wartości tego parametru [Publikacja nr 4 – Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019, Fig.5]). Wielkość określono dzięki pomiarom morfometrycznym komórek z wykorzystaniem programu cellSens Dimension na podstawie zdjęć mikroskopowych wykonanych w technice obserwacji w jasnym polu widzenia i kontrastu Nomarskiego. Ponadto oznaczono biomasę komórek analizując zawartość suchej masy, uzyskanej z wykorzystaniem wagosuszarki (oznaczenie dopracowywane specjalnie na potrzeby niniejszej pracy [Publikacja nr 4 – Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019, Fig.6]) oraz dokonano oceny struktury sieci mitochondrialnej na podstawie obrazowania mikroskopowego z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego Rodaminy B, którego fluorescencja zależy od potencjału błonowego mitochondriów. Dodatkowo status funkcjonalny mitochondriów określono poprzez analizę potencjału błonowego mitochondriów przy zastosowaniu barwnika Rodamina 123 i pomiaru fluorymetrycznego. Wyniki charakteryzujące stan fizjologiczny i parametry morfologiczne analizowanych komórek drożdży zostały w głównej mierze zaprezentowane w publikacji nr 2 - Maslanka i in., 2017, w której prześledzić można wszystkie szczegóły wymienionych wyżej metod badawczych. W pracy tej zaprezentowano również wyniki analiz biochemicznych dotyczących oznaczenia

---

generacji reaktywnych form tlenu. Generację RFT określono mierząc kinetykę przyrostu fluorescencji z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych: dihydroetydyny (DHET) i dioctanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H<sub>2</sub>DCF-DA). DHET jest utleniana wewnątrzkomórkowo głównie przez aniononorodnik ponadtlenkowy do fluorescencyjnej hydroksyetydyny. Z kolei H<sub>2</sub>DCF-DA po wejściu do komórki ulega hydrolizie z uwolnieniem 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H<sub>2</sub>DCF), która jest utleniana między innymi przez nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy i tlen singletowy do fluorescencyjnej 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF). Poziom generacji RFT oznaczono również dla komórek niekompletnych oddechowo ( $\rho^0$ ), uzyskanych w wyniku traktowania komórek kompletnych oddechowo bromkiem etydyny zgodnie z klasyczną metodą opisaną przez (Slonimski i in., 1968).

W kolejnym etapie prac przeanalizowano szereg parametrów biochemicznych związanych z metabolizmem komórki w tym oznaczono poziom ATP, określono wewnątrzkomórkowy poziom oraz całkowitą pulę kofaktorów NADPH oraz NADP<sup>+</sup>, a także oznaczono aktywność enzymatyczną istotnych enzymów szlaku PPP. Poziom ATP oraz wewnątrzkomórkowy poziom NADPH i NADP<sup>+</sup> oznaczono poprzez pomiar luminescencji z wykorzystaniem komercyjnych zestawów odczynników odpowiednio BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay oraz NADP/NADPH-Glo™ Assay zgodnie z instrukcjami producenta i własnymi modyfikacjami. Z kolei aktywność enzymów szlaku PPP tj. dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej oraz dehydrogenazy 6-fosfoglukonianowej określono na zasadzie pomiaru absorbancji zależnej od ilości powstającego NADPH w obecności substratów wykorzystywanych w reakcjach katalizowanych przez te enzymy, zgodnie z metodą opisaną w pracy (Tian i in., 1998).

Ostatnim etapem oznaczeń była analiza potencjału reprodukcyjnego oraz całkowitej długości życia komórek drożdży. W tym celu komórki drożdży pochodzące z hodowli płynnych prowadzonych na podłożach z określonym stężeniem glukozy umieszczano na szalkach z podłożem stałym o takim samym stężeniu glukozy. Potencjał reprodukcyjny określano przy użyciu mikromanipulatora analizując liczbę wytworzonych pączków przez pojedyncze komórki „matki”. Natomiast czas życia komórek drożdży został oznaczony dzięki wprowadzeniu do podłoża przyżyciowego barwnika – floksyny B, zgodnie z metodyką opisaną przez (Minois i in., 2005) z późniejszymi modyfikacjami (Zadrag i in., 2008). Wyniki charakteryzujące parametry

---

biochemiczne, potencjał reprodukcyjny i całkowitą długość życia analizowanych komórek drożdży zostały w głównej mierze zaprezentowane w publikacji nr 4 - Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019, w której prześledzić można wszystkie szczegóły wymienionych wyżej metod badawczych. Wszystkie eksperymenty, których wyniki przedstawia niniejsza rozprawa doktorska wykonano w co najmniej trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych.

Analizy statystyczne wykonano z wykorzystaniem programu STATISTICA 10.0. Istotność statystyczną obserwowanych różnic oceniono przy zastosowaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA) i testów *post-hoc* (testu Dunnetta – porównanie komórek szczepów z delecjami genów względem komórek szczepu dzikiego stanowiącego kontrolę; testu Tukeya – wzajemne porównanie komórek hodowanych na podłożach zawierających różne stężenie glukozy). Korelację między wynikami wybranych parametrów określono poprzez obliczenie współczynnika korelacji Pearsona, a w przypadku wielkości komórek skorzystano również z hierarchicznej analizy skupień. Ponadto względem potencjału reprodukcyjnego i wielkości komórek w populacji wykorzystano metodę histogramu w celu prezentacji rozkładu wartości uzyskanych wyników oraz obliczono współczynniki skośności i kurtozy. Dla uzyskanych wyników przyjęto poziom istotności  $p < 0,05$ .

#### 4. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI BADAŃ

##### *Znaczenie glukozy dla prawidłowego funkcjonowania komórki i organizmu*

Przegląd obecnej wiedzy na temat wieloaspektowej roli glukozy w regulacji parametrów fizjologicznych komórki i organizmu człowieka oraz prezentacja konsekwencji zaburzenia homeostazy glukozy zostały przedstawione w publikacji nr 1–Maślanka i Zadrag-Tęcza, 2017. Praca ta będąca rozdziałem w monografii napisanym w języku polskim, ma charakter przeglądowy, przez co opisuje istotę badań dotyczących metabolizmu glukozy w szerszym kontekście, na co nie ma na ogół miejsca w ściśle sprecyzowanych pracach eksperymentalnych.

Dane literaturowe pokazują, że równoległe z wyjaśnianiem metabolizmu glukozy następował rozwój biochemii, o czym świadczą między innymi odkrycia Pasteura, Büchnerów czy opisanie mechanizmu glikolizy dzięki badaniom Embdena, Meyerhoffa i Parnasa (Berg i in., 2002). Jednak mimo, iż wewnątrzkomórkowe drogi metabolizmu glukozy są dobrze scharakteryzowane to nadal niezbędne jest rozszerzanie informacji na temat możliwych powiązań pomiędzy poszczególnymi szlakami metabolicznymi oraz tego w jaki sposób komórka moduluje aktywność tych szlaków w odpowiedzi na zmiany w otaczającym ją środowisku. Wskazują na to również argumenty przytoczone w opublikowanym rozdziale w monografii. Szczególnie ważne wydaje się poszukiwanie odpowiedzi na temat swoistego paradoksu metabolicznego polegającego na wykorzystywaniu przez intensywnie proliferujące komórki mniej efektywnego, pod względem liczby wytworzonych cząsteczek ATP, procesu tj. fermentacji/glikolizy w warunkach tlenowych. W pracy opisano proponowane w literaturze wyjaśnienia tej kwestii, przy czym zwrócono również uwagę na inną, a często pomijaną rolę glukozy tj. jej wykorzystanie jako szkieletu węglowego do biosyntezy makromolekuł komórki. W takim wykorzystaniu glukozy ważną rolę odgrywa szlak pentozofosforanowy, którego aktywność jest ściśle powiązana ze szlakiem glikolizy. W rozdziale opisano również procesy odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy glukozy w organizmie człowieka. Podkreślono, że homeostaza ta wymaga ścisłej koordynacji pomiędzy szeregiem tkanek i narządów, ze szczególnym uwzględnieniem mózgu, wątroby, trzustki, mięśni szkieletowych i adipocytów budujących tkankę tłuszczową. Za ważne uznano również charakterystykę kluczowych

---

transporterów glukozy z rodziny GLUT, wykazujących odmienne powinowactwo do glukozy i lokalizację tkankową oraz rolę zegara biologicznego i oreksyny w synchronizacji metabolizmu glukozy względem aktualnej pory dnia. Jako ostatnie zagadnienie poruszono kwestie konsekwencji zaburzenia homeostazy glukozy. Zaakcentowano, iż stan utrzymującego się wysokiego stężenia glukozy może doprowadzić do zaburzenia funkcji komórek m.in. wskutek: i) zakłócenia regulacji wzrostu i podziałów komórki, ii) nasilenia zjawiska glikacji białek o długim okresie półtrwania, iii) indukcji stresu oksydacyjnego w następstwie zwiększonej generacji RFT i/lub obniżenia komórkowej puli NADPH czy też iv) nasilonej aktywacji szlaku polioliowego. Jednakże, w głównej mierze w sposób kompleksowy opisano mechanizmy działania i sekrecji insuliny oraz ich zaburzenia wskutek utrzymującego się wysokiego stężenia glukozy, prowadzące ostatecznie do rozwoju cukrzycy typu 2.

#### ***Produkty metabolizmu glukozy jako prekursorzy endogennych fluoroforów***

Status fizjologiczny komórki zależy od ciągłej produkcji i degradacji szeregu komponentów komórkowych. Poza białkami, lipidami i węglowodanami prawidłowe funkcjonowanie komórki wymaga również takich cząsteczek jak witaminy, koenzymy, czy metabolity wtórne. Ich synteza na terenie komórki jest bezpośrednio związana ze szlakami przekształceń glukozy. Taką możliwość zaprezentowano analizując drogi powstawania tryptofanu, pirydoksyny oraz ryboflawiny, których biosynteza oparta jest na intermediatach pochodzących z przekształceń glukozy, głównie w szlaku pentozofosforanowym (Publikacja nr 3 – Maslanka i in., 2018, Fig.2). Związki te mają naturalną właściwość emisji fluorescencji (Publikacja nr 3 – Maslanka i in., 2018, Fig.S1) i w głównej mierze odpowiadają za zjawisko autofluorescencji w komórkach drożdży, co zostało stwierdzone poprzez analizę spektrum emisji fluorescencji dla zawiesiny komórek drożdży i porównanie jej ze spektrami emisji fluorescencji otrzymanymi dla czystych związków (Publikacja nr 3 – Maslanka i in., 2018, Fig. 1 i Fig.S1). Ponadto wykazano, że komórki drożdży reprezentujące różne tła genetyczne mogą znacząco różnić się poziomem autofluorescencji (Publikacja nr 3 – Maslanka i in., 2018, Fig. 1), a poprzez to również poziomem analizowanych endogennych fluoroforów. Związki te poza właściwościami fluorescencyjnymi pełnią ważne role w komórce m.in. wykazują działanie antyoksydacyjne. Stąd też różny poziom

---

endogennych fluoroforów, a co za tym idzie różny poziom autofluorescencji, może dostarczać informacji o stanie fizjologicznym komórek. Jednakże obecność endogennych fluoroforów i występowanie zjawiska autofluorescencji niesie ze sobą istotny problem metodyczny ujawniający się w sytuacji zastosowania metod bazujących na wykorzystaniu egzogennych barwników i sond fluorescencyjnych. Jak wykazano, w trakcie oznaczenia tempa pobierania glukozy z wykorzystaniem fluorescencyjnego analogu glukozy 6-NBDG, zjawisko autofluorescencji może zawyżać wartości fluorescencji wynikającej z zastosowania barwnika egzogenne. Ponadto biorąc pod uwagę fakt, iż komórki mogą różnić się poziomem autofluorescencji, występowanie zjawiska autofluorescencji może w istotny sposób wpływać na uzyskane wyniki (Publikacja nr 3 – Maslanka i in., 2018, Fig. 3). To pokazuje istotę problemu i konieczność każdorazowego kontrolowania poziomu autofluorescencji w próbkach biologicznych.

#### ***Parametry fizjologiczne komórek drożdży w warunkach różnego stężenia glukozy***

Komórki drożdży aby przetrwać zarówno w zmiennych warunkach otoczenia jak i presję ekologicznej konkurencji ze strony szeregu mikroorganizmów zasiedlających tę samą niszę ekologiczną, musiały wytworzyć w toku ewolucji mechanizmy precyzyjnego dostosowywania tempa wzrostu i sprawności fizjologicznej względem dostępności składników odżywczych. Biorąc to pod uwagę, analizy rozpoczęto od porównania wzrostu komórek drożdży wybranych szczepów hodowanych na podłożach zawierających różne stężenie glukozy. Poza odmiennym czasem osiągnięcia poziomu *plateau* krzywych wzrostu dla komórek rosnących na podłożach zawierających 0,5; 2 i 4% stężenie glukozy (odpowiednio po 7, 9-10 i 12 h hodowli) i nieco wyższymi wartościami OD uzyskanymi po czasie 24h dla hodowli prowadzonych w warunkach 2% i 4% glukozy, nie zaobserwowano większych różnic zarówno w kinetyce jak i w obliczonym relatywnym tempie wzrostu populacji komórek drożdży. Nie odnotowano również różnic w tempie wzrostu pomiędzy szczepem dzikim a szczepami pozbawionymi genów związanych z metabolizmem glukozy tj.  $\Delta gpa2$ ;  $\Delta gpr1$  i  $\Delta hxx2$  (Publikacja nr 2 – Maslanka i in., 2017, Fig. 1). Podobny brak różnic odnotowano w przypadku wzrostu komórek drożdży analizowanych szczepów na podłożu stałym zawierającym 0,5; 2 i 4% glukozy (dane nie publikowane). Komórki analizowanych

---

szczepów nie różniły się również znacząco pod względem witalności i żywotności. Wszystkie analizowane komórki bez względu na stężenie glukozy w podłożu wykazały wysoki poziom witalności (określony w artykule jako relatywna aktywność metaboliczna), na co wskazywały wysokie wartości uzyskane w pomiarach fluorometrycznych z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej FUN-1. Jednakże, zaobserwowano niewielką tendencję wzrostową tego parametru wraz ze wzrostem stężenia glukozy w podłożu. Ponadto komórki szczepu  $\Delta h x k 2$  charakteryzowały się niższymi wartościami tego parametru w porównaniu do komórek szczepu dzikiego oraz komórek pozostałych dwóch szczepów z delecją genu *GPA2* czy *GPR1* (Publikacja nr 2 – [Maslanka i in., 2017](#), Fig. 3B). Z kolei dzięki mikroskopowej ocenie żywotności komórek, bazującej na barwieniu różnicującym z diocetanem fluoresceiny i jodkiem propidyny, stwierdzono iż w populacji komórek analizowanych szczepów hodowanych na podłożach zawierających różne stężenie glukozy, śmiertelność komórek była na bardzo niskim poziomie. Na tym tle wyróżniała się jedynie populacja komórek szczepu dzikiego hodowanych na podłożu zawierającym 4% glukozy, gdzie odsetek martwych komórek sięgał 8% (dane niepublikowane). W związku z tym, iż testy wzrostowe dotyczące tempa przyrostu liczby komórek w populacji nie wykazały znaczących różnic zarówno między szczepami jak i podłożami, sprawdzono analogiczne porównanie, ale w odniesieniu do wielkości komórki. Pomiar morfometryczny komórek wykazały, że wraz ze wzrostem stężenia glukozy wzrasta średnia wielkość komórki w populacji. Największe rozmiary miały komórki drożdży hodowane na podłożu zawierającym 4% glukozy, zaś najmniejsze na podłożu zawierającym 0,5% glukozy. Trend taki był najbardziej widoczny dla komórek szczepu dzikiego. Średnia wielkość komórek pozostałych szczepów była istotnie niższa od średniej wielkości komórek szczepu dzikiego a najmniejszymi rozmiarami charakteryzowały się komórki szczepu  $\Delta h x k 2$ , których wielkość oscylowała w granicach 4  $\mu\text{m}$  (Publikacja nr 2 – [Maslanka i in., 2017](#), Fig. 4A). W celu rozszerzenia analiz porównawczych dotyczących wielkości komórek badanych szczepów drożdży niezależnie od użytego stężenia glukozy, przeprowadzono hierarchiczną analizę skupień. Analiza ta wykazała silne podobieństwo między komórkami szczepów  $\Delta g p a 2$  i  $\Delta g p r 1$ , co potwierdza związek funkcjonalny białek *Gpa2* i *Gpr1*. Najniższy poziom podobieństwa i największa odległość w dendrogramie wystąpiła między komórkami szczepu dzikiego a komórkami szczepu  $\Delta h x k 2$

---

(Publikacja nr 2 – Maslanka i in., 2017, Fig. 4B). Z kolei analizując tempo pobierania glukozy, metodą opartą na zastosowaniu analogu 6-NBDG, wykazano, iż tempo to jest znacząco niższe w komórkach szczepów z delecją genów *GPA2*, *GPR1* i *HXX2* w stosunku do komórek szczepu dzikiego (Publikacja nr 2 – Maslanka i in., 2017, Fig. 3A). Na podstawie tego stwierdzono, iż w komórkach szczepów z delecją analizowanych genów również wewnątrzkomórkowy poziom glukozy może być obniżony.

#### ***Poziom i źródło generacji RFT w warunkach różnego stężenia glukozy***

Badania analizujące wpływ wysokich stężeń glukozy na szereg komórek ludzkich pokazują, że często dochodzi w nich do indukcji stresu oksydacyjnego. Obserwacja ta wraz z faktem, iż zastosowanie różnego stężenia glukozy w podłożu hodowlanym może wywołać zmiany metabolizmu komórek drożdży, były przesłankami do przeprowadzenia analizy poziomu generacji RFT. W tym celu zastosowano dwie komplementarne metody oparte na pomiarze przyrostu fluorescencji, z zastosowaniem sond fluorescencyjnych DHET i H<sub>2</sub>DCF-DA. Wykazano, że wzrostowi zewnątrzkomórkowego stężenia glukozy towarzyszy znaczny wzrost poziomu RFT oznaczanych za pomocą DHET. Najniższy poziom RFT wykazano dla komórek hodowanych na podłożu zawierającym 0,5% glukozy, a najwyższy dla komórek hodowanych w pożywce zawierającej 4% glukozy. Zależność taka została stwierdzona dla komórek wszystkich analizowanych szczepów, aczkolwiek była najbardziej wyraźna w przypadku komórek szczepu dzikiego. Porównanie poziomu RFT między analizowanymi szczepami, wykazało że komórki szczepów pozbawionych genów związanych z metabolizmem glukozy, a jednocześnie charakteryzujące się niższym tempem pobierania glukozy, miały niższy poziom RFT oznaczanych za pomocą DHET w porównaniu z komórkami szczepu dzikiego (Publikacja nr 2 – Maslanka i in., 2017, Fig. 5A). W teście wykorzystującym sondę H<sub>2</sub>DCF-DA, w warunkach restrykcji kalorycznej dla wszystkich analizowanych szczepów stwierdzono porównywalny poziom RFT reagujących z tą sondą. Poziom ten w przypadku komórek szczepu dzikiego wzrastał wraz ze wzrostem stężenia glukozy w podłożu hodowlanym, natomiast nie zmienił się znacząco dla komórek szczepów z delecją analizowanych genów. Stąd w warunkach nadmiaru kalorii (4% glukozy) również w przypadku

---

zastosowania tej sondy fluorescencyjnej odnotowano istotnie niższy poziom RFT dla komórek szczepów  $\Delta gpa2$ ,  $\Delta gpr1$  i  $\Delta hxx2$  względem szczepu dzikiego (Publikacja nr 2 – Maslanka i in., 2017, Fig. 5B). Wysoki poziom generacji RFT w komórkach drożdży hodowanych na podłożach zawierających wysokie stężenia glukozy (2% a zwłaszcza 4%) był nieco zaskakujący w kontekście obecnie przyjmowanej wiedzy. Postuluje się bowiem, iż na podłożach z wysoką zawartością glukozy dochodzi do represji glukozowej, przez co komórki drożdży pozyskują energię wyłącznie na drodze fermentacji, a jednocześnie aktywność mitochondriów uważa się za główne źródło RFT w komórce. W związku z tym dodatkowo sprawdzono poziom generacji RFT w warunkach różnego stężenia glukozy z wykorzystaniem komórek drożdży niekompletnych oddechowo ( $rho^0$ ) tj. mogących przeprowadzać tylko proces fermentacji, a także oznaczono status funkcjonalny i strukturę sieci mitochondrialnej w tożsamych warunkach dla komórek kompletnych oddechowo. Poza faktem, iż komórki kompletne oddechowo nawet w warunkach 4% stężenia glukozy utrzymują funkcjonalne mitochondria oraz obserwacją nieco bardziej rozbudowanej sieci mitochondrialnej w komórkach hodowanych na podłożu zawierającym 0,5% glukozy, nie odnotowano większych różnic w stanie funkcjonalnym oraz strukturze sieci mitochondrialnej dla komórek hodowanych na podłożach z różnym stężeniem glukozy (Publikacja nr 2 – Maslanka i in., 2017, Fig. 6A i 6B). Z kolei analizy wykorzystujące komórki  $rho^0$  wykazały, iż poziom generacji RFT jest prawie taki sam dla komórek mających zdolność prowadzenia oddychania tlenowego oraz dla tych, które mogą korzystać wyłącznie z fermentacji (Publikacja nr 2 – Maslanka i in., 2017, Fig. 6A i 6B). Dało to podstawę do wnioskowania, że na terenie komórki drożdży poza mitochondriami istnieją inne ważne źródła generacji RFT. Szczegółowa analiza uzyskanych wyników i wzajemnych zależności między nimi w świetle najnowszych danych literaturowych, stała się podstawą do stworzenia hipotezy, która przynajmniej częściowo może tłumaczyć występowanie poza-mitochondrialnej generacji RFT w komórkach drożdży (Publikacja nr 2 – Maslanka i in., 2017, Fig. 8). Przeprowadzone analizy sugerują, że główną reaktywną formą tlenu generowaną poza-mitochondrialnie jest anionorodnik ponadtlenkowy. Stąd aby określić czy zależność między zwiększoną generacją RFT a stężeniem glukozy utrzymuje się też w układach eksperymentalnych opartych na komórkach pozbawionych genów nie związanych bezpośrednio

---

z metabolizmem glukozy, wykonano dodatkowe oznaczenia na innych szczepach drożdży, ale reprezentujących to samo tło genetyczne – BY4741. Wykorzystano w tym celu szczepy pozbawione genów kodujących dysmutazy ponadtlenkowe czyli enzymy odpowiedzialne za reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego (tj. odpowiednio  $\Delta sod1$  – szczep pozbawiony cytoplazmatycznej, miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej oraz  $\Delta sod2$  – szczep pozbawiony mitochondrialnej, manganowej dysmutazy ponadtlenkowej). Dzięki przeprowadzonym analizom stwierdzono, iż zaobserwowana zależność wzrostu poziomu RFT, zwłaszcza oznaczanych za pomocą DHET (czyli w głównej mierze anionorodnika ponadtlenkowego), wraz ze wzrostem stężenia glukozy jest obserwowana także w przypadku komórek innych szczepów drożdży (dane niepublikowane).

#### ***Zmiany metaboliczne i możliwości biosyntetyczne komórek drożdży w warunkach różnego stężenia glukozy***

Z chwilą gdy glukoza znajdzie się wewnątrz komórki, może być wykorzystana na drodze kilku wzajemnie powiązanych szlaków. Pierwszą i główną drogą wykorzystania glukozy jest glikoliza, która przekształca glukozę do pirogronianu. Następnie, w zależności od dostępności tlenu lub konkretnej strategii metabolicznej (np. *efekt Crabtree* w komórkach drożdży), pirogronian jest przekształcany na drodze fermentacji lub fosforylacji oksydacyjnej. Tym samym komórka uzyskuje różną ilość energii, w postaci liczby cząsteczek ATP produkowanych w przeliczeniu na jedną cząsteczkę glukozy. Ponadto glukoza po przekształceniu do glukozo-6-fosforanu może być wykorzystywana jako źródło szkieletu węglowego dla biosyntezy w wyniku działalności szlaku pentozofosforanowego. W szlaku tym dochodzi również do powstawania NADPH, który wykorzystywany jest jako reduktant w komórkowych reakcjach anabolicznych. Biorąc pod uwagę powyższe, a także różnice w szybkości pobierania glukozy pomiędzy komórkami analizowanych szczepów drożdży, zbadano jaki aspekt metabolizmu komórkowego ulega zmianie wskutek zastosowania różnych stężeń glukozy. Badane parametry obejmowały poziom ATP, poziom aktywności enzymów szlaku PPP oraz ilościowe oznaczenie wewnątrzkomórkowej puli NADP(H). Analizując poziom ATP stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia glukozy w podłożu poziom ATP ulegał obniżeniu, a tendencja ta była najbardziej widoczna dla komórek szczepu

---

---

dzikiego. Najwyższy poziom ATP odnotowano w przypadku komórek rosnących na podłożu zawierającym 0,5% glukozy, co może być tłumaczone uruchamianiem oddychania tlenowego generującego większe ilości ATP w porównaniu do fermentacji. Z kolei najniższy poziom ATP obserwowany w przypadku komórek rosnących na podłożu zawierającym 4% glukozy, stanowił swoisty paradoks względem poziomu ATP notowanego dla komórek rosnących na podłożu zawierającym 2% glukozy, bowiem w obu przypadkach komórki drożdży powinny uzyskiwać energię w ten sam sposób tzn. na drodze fermentacji (Publikacja nr 4 - Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019, Fig. 7B). Tendencja spadkowa w poziomie ATP była utrzymywana nawet przy zastosowaniu wyższych stężeń glukozy, co sprawdzono w dodatkowych testach dla komórek szczepu dzikiego rosnących na podłożach zawierających 8% i 10% glukozy (dane niepublikowane). Zaobserwowano również, że w warunkach 2% i 4% stężenia glukozy, poziom ATP był znacznie wyższy w komórkach szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  w porównaniu ze szczepem dzikim. Zależność tę można tłumaczyć niższym wewnątrzkomórkowym poziomem glukozy wynikającym z obniżonego tempa pobierania glukozy obserwowanego dla tych szczepów (Publikacja nr 4 - Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019, Fig. 7B; Fig. 1). Obserwowane różnice w poziomie ATP mogą wynikać z przesunięcia wykorzystania glukozy na inne szlaki metaboliczne. Jednym z nich jest szlak PPP, a kluczowymi enzymami warunkującymi jego działalność są dehydrogenazy generujące NADPH (dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa - G6PD oraz dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa - 6-PGD). Analiza aktywności obu enzymów wykazała, że komórki szczepu dzikiego, u których tempo pobierania glukozy było najwyższe, charakteryzowały się wyższą aktywnością szlaku PPP w porównaniu do komórek szczepu  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$ . Komórki szczepu dzikiego miały przede wszystkim wyższą aktywność G6PD, co skutkowało również wyższą sumaryczną aktywnością obu dehydrogenaz. Porównanie aktywności enzymatycznej między komórkami rosnącymi na podłożach zawierających różne stężenie glukozy pokazało z kolei inne zależności. W przypadku komórek szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  nie odnotowano różnic w aktywności analizowanych enzymów między podłożami zawierającymi 0,5; 2 i 4% glukozy. Z kolei w przypadku komórek szczepu dzikiego, wykazano zmniejszenie aktywności G6PD wraz ze wzrostem stężenia glukozy w podłożu (Publikacja nr 4 - Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019, Fig. 8A). Tego typu zmiana nie musi odzwierciedlać spadku ogólnej

---

aktywności szlaku PPP, bowiem aktywność G6PD jest silnie modulowana przez zawartość  $\text{NADP}^+$  i  $\text{NADPH}$ . Z kolei wysoka aktywność szlaku PPP prowadzi do wytworzenia  $\text{NADPH}$ , który jest silnym inhibitorem G6PD działającym na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego (Publikacja nr 4 - [Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019](#), Fig. 7A). Z tego też względu oznaczono poziom puli wewnątrzkomórkowego  $\text{NADP(H)}$ . Wyniki przeprowadzonych badań wykazały wyższy poziom zarówno  $\text{NADPH}$  jak i całej komórkowej puli  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  w komórkach hodowanych na podłożu zawierającym 4% glukozy względem komórek hodowanych na podłożu zawierającym 2% glukozy. Poziom  $\text{NADPH}$  w komórkach hodowanych na podłożu z 0,5% stężeniem glukozy był również stosunkowo wysoki natomiast nie może być on bezpośrednio porównywany z warunkami 2 i 4% glukozy, bowiem na poziom ten mogą mieć wpływ źródła, które uruchamiane są wraz z włączeniem oddychania tlenowego. Jednakże, istotne zależności wykazała analiza udziału  $\text{NADPH}$  i  $\text{NADP}^+$  w całkowitej puli  $\text{NADP(H)}$ . Stwierdzono bowiem, że różne stężenia glukozy zasadniczo zmieniają udział  $\text{NADP}^+$  względem całej puli  $\text{NADP(H)}$ . Stwierdzono, wyższy udział  $\text{NADP}^+$  w całkowitej puli  $\text{NADP(H)}$  w komórkach hodowanych na podłożu zawierającym 2 i 4% stężenie glukozy. Taka sytuacja może być konsekwencją zwiększonego poziomu utleniania  $\text{NADPH}$ , co sugeruje większe wykorzystanie  $\text{NADPH}$ , w tym również w procesach biosyntetycznych dostosowanych do aktualnych potrzeb komórki. W komórkach hodowanych na podłożu zawierającym 0,5% stężenie glukozy udział  $\text{NADP}^+$  w całkowitej puli  $\text{NADP(H)}$  był najniższy i podobny w komórkach wszystkich analizowanych szczepów drożdży. Natomiast w przypadku analizy porównawczej w obrębie badanych szczepów, komórki szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  hodowane na podłożach zawierających 2% i 4% stężenie glukozy charakteryzowały się niższym udziałem  $\text{NADP}^+$  w całkowitej puli  $\text{NADP(H)}$  w porównaniu do komórek szczepu dzikiego. To sugeruje mniejsze wykorzystanie  $\text{NADPH}$  przez komórki szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  w porównaniu do komórek szczepu dzikiego (Publikacja nr 4 - [Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019](#), Fig. 7A).

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki dotyczące wpływu stężenia glukozy na tempo wzrostu populacji, wielkość komórek, zmiany poziomu ATP, aktywność szlaku PPP oraz zmiany w wykorzystaniu  $\text{NADPH}$ , istotnym stało się również oznaczenie możliwości biosyntetycznych analizowanych komórek drożdży hodowanych na

---

podłożach zawierających różne stężenie glukozy. Jako parametr wybrano suchą masę komórki, która obrazuje ogólną wydajność biosyntezy komórkowych, bowiem jej wartość jest wypadkową ilości wszystkich makromolekuł komórki, nie tylko tych dominujących jak białko czy rRNA. W warunkach CR sucha masa komórek była najniższa i podobna dla wszystkich analizowanych szczepów. Z kolei wraz ze wzrostem stężenia glukozy w podłożu hodowlanym wartość tego parametru zmieniała się w różny sposób dla komórek analizowanych szczepów. W przypadku komórek szczepu dzikiego zawartość suchej masy wzrastała wraz ze wzrostem stężenia glukozy w podłożu hodowlanym i była najwyższa w warunkach CE. Takiego wzrostu w zawartości suchej masy komórek nie obserwowano dla komórek szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$ , dla których parametr ten był porównywalny we wszystkich analizowanych warunkach tj. dla 0,5%, 2% i 4% stężenia glukozy (Publikacja nr 4 - Masłanka i Zadrag-Tecza, 2019, Fig. 6). Co więcej, zawartość suchej masy komórek była istotnie wyższa dla komórek szczepu dzikiego względem komórek szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$ , które jak już wspomniano wcześniej miały znacznie obniżone tempo pobierania glukozy (Publikacja nr 4 - Masłanka i Zadrag-Tecza, 2019, Fig. 6; Fig. 1).

#### ***Zdolność reprodukcyjna i długość życia komórek drożdży w warunkach różnego stężenia glukozy***

Zdolność reprodukcyjna jest istotną miarą sprawności fizjologicznej komórki, bowiem wyprodukowanie makromolekuł przekazywanych komórce potomnej oraz synchronizacja proliferacji komórki z utrzymaniem jej podstawowych procesów fizjologicznych wymaga ogromnych nakładów inwestycyjnych, a każde nawet niewielkie zaburzenie może doprowadzić do zatrzymania proliferacji. Przeprowadzone analizy zaprezentowały, że komórki szczepu dzikiego wykazują wyraźny spadek potencjału reprodukcyjnego wraz ze wzrostem stężenia glukozy w podłożu. Najwyższe wartości tego parametru stwierdzono dla komórek szczepu dzikiego hodowanych w warunkach restrykcji kalorycznej, natomiast najniższe w warunkach nadmiaru kalorii. Zmiany te były obserwowalne zarówno w przebiegu krzywych prezentujących potencjał reprodukcyjny jak i w wartościach średniej liczby wytworzonych komórek potomnych, które wyniosły odpowiednio 30,5 oraz 21,3. Z kolei dla szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  wykazano, iż były one w stanie wytworzyć więcej komórek potomnych w porównaniu

---

ze szczepem dzikiem, a dodatkowo ich potencjał reprodukcyjny nie ulegał zmianie w zależności od stężenia glukozy i był porównywalny dla obu szczepów. Najniższą różnicę w wartościach potencjału reprodukcyjnego między szczepami  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  a szczepem dzikiem stwierdzono w warunkach CR, gdzie dla wszystkich szczepów średnia wartość tego parametru wynosiła powyżej 30 generacji. Z kolei różnica w potencjale reprodukcyjnym pomiędzy szczepem dzikiem a szczepami  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  w warunkach nadmiaru kalorii była prawie dwukrotna (Publikacja nr 4 - [Maslanka i Zdrag-Tecza, 2019](#), Fig. 2A, Tabela 1). To wskazuje, że zwiększone stężenie glukozy prowadzi do zmniejszenia zdolności reprodukcyjnych komórki, a efektu takiego nie odnotowano dla szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  prawdopodobnie ze względu na niższe tempo pobierania glukozy, a przez to zmniejszenie jej wewnątrzkomórkowego poziomu. Zależność tę potwierdza jednoczesne zestawienie wszystkich otrzymanych wyników dotyczących potencjału reprodukcyjnego. Wykazano w ten sposób, że nie ma różnicy w wartościach tego parametru pomiędzy szczepami  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  we wszystkich analizowanych warunkach. Z kolei w przypadku szczepu dzikiego potwierdzono obserwowany wcześniej znaczący spadek potencjału reprodukcyjnego wraz ze wzrostem stężenia glukozy w podłożu. Przy czym na uwagę zasługują zmiany kształtu krzywych potencjału reprodukcyjnego obserwowane dla tego szczepu. Stwierdzono, że w warunkach CR 90% komórek w populacji wykonuje powyżej 18 cykli reprodukcyjnych, w warunkach optymalnych tj. 2% glukozy 90% komórek wykonuje powyżej 14 cykli reprodukcyjnych, ale już w warunkach CE 90% komórek w populacji jest w stanie wykonać powyżej 7 cykli reprodukcyjnych. Ponadto wykazano, że w warunkach nadmiaru kalorii 7% komórek w populacji wytwarzało mniej niż 5 komórek potomnych, a wśród nich pojawiały się także komórki, które w ogóle nie podejmowały pączkowania bądź przeprowadzały pojedynczy cykl. Zależności takich nie odnotowywano dla komórek hodowanych na podłożach zawierających 0,5 i 2% glukozy. Oznacza to, że w warunkach CE zdolności reprodukcyjne komórek drożdży, rozumiane jako zjawisko w którym więcej niż 90% komórek zachowuje zdolność do reprodukcji, są znacznie obniżone (Publikacja nr 4 - [Maslanka i Zdrag-Tecza, 2019](#), Fig. 3A). Biorąc pod uwagę, że średnia jako wartość statystyczna jest bardzo wrażliwa na ekstremalne wartości, zbadano, czy zwiększenie stężenia glukozy w podłożu zmienia również rozkład wartości potencjału reprodukcyjnego w badanych grupach komórek

---

---

drożdży. Nie stwierdzono różnic w rozkładzie wartości potencjału reprodukcyjnego dla szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  we wszystkich analizowanych warunkach. Z kolei rozkład potencjału reprodukcyjnego dla szczepu dzikiego różnił się znacząco zarówno względem dwóch pozostałych szczepów jak też pomiędzy warunkami różnych stężeń glukozy. W tym drugim przypadku kształt krzywej rozkładu potencjału reprodukcyjnego zmieniał się wraz ze wzrostem stężenia glukozy od względnie płaskiego do zaostrego (co potwierdzają wartości współczynnika kurtozy), a dodatkowo w tym samym czasie centrum krzywej rozkładu wyznaczone przez wartości modalne przesunęło się w kierunku niższych wartości (co z kolei potwierdzają wartości współczynnika skośności). Przedstawione histogramy pokazują, że wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia glukozy wywołany wysokim stężeniem zewnątrzkomórkowym przy nie zaburzonej poborze glukozy, prowadzi do zmniejszenia nie tylko maksymalnych i średnich wartości potencjału reprodukcyjnego, ale także tych najczęściej występujących (Publikacja nr 4 - Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019, Fig. 4). Odnosząc te wyniki do hipotezy hipertrofii wskazującej na wielkość komórki jako jeden z czynników wpływających na potencjał reprodukcyjny drożdży, sprawdzono czy zmiany w potencjale reprodukcyjnym obserwowane w warunkach różnego stężenia glukozy mogą być wywołane zmianami wielkości komórki. W tym celu podobnie jak w przypadku potencjału reprodukcyjnego przeprowadzono analizę rozkładu wielkości komórek badanych szczepów w warunkach różnego stężenia glukozy. Stwierdzono, że komórki szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  wykazują nie tylko podobną średnią wielkość komórki, ale także posiadają porównywalny przebieg rozkładu wielkości komórek w populacji. Co więcej, poza zmianą średniej wielkości jak i rozkładu wielkości komórek między warunkami 0,5% i 2% stężenia glukozy, nie zanotowano u tych szczepów dalszych zmian wraz ze wzrostem stężenia glukozy. Z kolei zarówno rozkład jak i średnia wartość wielkości komórek w szczepie dzikim były znacząco różne w porównaniu do komórek szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$ . Na wszystkich analizowanych podłożach o różnym stężeniu glukozy, komórki szczepu dzikiego były większe w porównaniu z komórkami szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  a centrum krzywej rozkładu wielkości ich komórek było przesunięte w kierunku wyższych wartości. W przypadku tego szczepu występowały również różnice w rozkładzie wielkości komórek pomiędzy warunkami z różnymi stężeniami glukozy. Kształt

---

krzywej rozkładu wielkości komórki zmieniał się wraz ze wzrostem stężenia glukozy od względnie płaskiego do zaostrego (co potwierdzają wartości współczynnika kurtozy), a jednocześnie centrum krzywej rozkładu wyznaczone przez wartości modalne przesunęło się w kierunku wyższych wartości (co potwierdzają wartości współczynnika skośności) (Publikacja nr 4 - Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019, Fig. 5). To wskazuje na istnienie związku między zmianami w rozkładzie wartości potencjału reprodukcyjnego i rozkładzie wartości wielkości komórek. Wzrostowi wielkości komórki towarzyszyło zmniejszenie potencjału reprodukcyjnego i odwrotnie, co potwierdza istnienie związku między rozmiarem komórki a jej zdolnością do reprodukcji. Zależność taka została potwierdzona analizą korelacji Pearsona i wskazała na negatywną korelację między wielkością komórki a potencjałem reprodukcyjnym ( $r = -0,82$ ). W związku z tym, iż wielkość komórki jest bezpośrednio regulowana jej możliwościami biosyntetycznymi, sprawdzono również poziom korelacji między możliwościami biosyntetycznymi komórki wyrażanymi wartością suchej masy komórki a potencjałem reprodukcyjnym. Korelacja ta okazała się być jeszcze bardziej negatywna ( $r = -0,96$ ) aniżeli wcześniejszy związek pomiędzy potencjałem reprodukcyjnym a wielkością komórki.

Poza wpływem glukozy na potencjał reprodukcyjny, szczegółowo przeanalizowano również długość życia komórek drożdży wyrażoną w jednostkach czasu określając reprodukcyjną, post-reprodukcyjną i całkowitą długości życia. W przypadku reprodukcyjnej długości życia odnoszącej się do czasu, w którym komórki wykazują możliwości reprodukcyjne uzyskano podobne zależności, między szczepami jak i podłożami zawierającymi różne stężenie glukozy, co w przypadku potencjału reprodukcyjnego. Jednakże różnice między komórkami analizowanych szczepów były niższe, m.in. nie stwierdzono różnic w reprodukcyjnej długości życia pomiędzy analizowanymi szczepami w warunkach restrykcji kalorycznej. Natomiast podobnie jak w przypadku potencjału reprodukcyjnego, stwierdzono znaczne skrócenie reprodukcyjnej długości życia dla komórek szczepu dzikiego w warunkach nadmiaru kalorii (Publikacja nr 4 - Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019, Fig. 2B, Tabela 1). Analizując post-reprodukcyjną długość życia stwierdzono, że komórki szczepu dzikiego mają dłuższy czas życia post-reprodukcyjnego w porównaniu z komórkami szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$ . W warunkach CR długość post-reprodukcyjnej fazy życia była najdłuższa i najbardziej zbliżona między komórkami analizowanych szczepów.

---

Natomiast sukcesywnie zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia glukozy, szczególnie w przypadku komórek szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  (Publikacja nr 4 - Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019, Fig. 2C, Tabela 1). Z kolei poprzez analizę całkowitej długości życia będącej sumą czasu trwania fazy reprodukcyjnej i post-reprodukcyjnej stwierdzono, iż na ogół całkowita długość życia komórek drożdży jest porównywalna, niezależnie od szczepu drożdży. Jednakże dla komórek szczepu dzikiego w warunkach CE w porównaniu zarówno do komórek dwóch pozostałych szczepów drożdży analizowanych w warunkach CE, jak i względem komórek szczepu dzikiego, ale hodowanych na podłożu zawierającym 0,5% i 2% glukozy, wykazano znaczne skrócenie całkowitej długości życia. Warunki CE powodowały również skrócenie całkowitej długości życia komórek szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$ , ale tylko w porównaniu względem komórek hodowanych w warunkach CR. Z kolei w większości przypadków nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy komórkami analizowanymi w warunkach optymalnych i restrykcji kalorycznej. Podobne maksymalne wartości całkowitej długości życia wykazane w tych warunkach sugerują, że nawet jeżeli warunki CR mogą prowadzić do zwiększenia całkowitej długości życia, taka zmiana wydaje się być nieznaczna (Publikacja nr 4 - Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019, Fig. 2D, Fig. 3B, Tabela 1). Szczegółowa analiza uzyskanych wyników i szeroki przegląd literatury, stały się podstawą do stworzenia modeli prezentujących zmiany metabolizmu komórki w zależności od stężenia glukozy oraz ich wpływ na wielkość i potencjał reprodukcyjny komórek drożdży (Publikacja nr 4 - Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019, Fig. 9).

## 5. DYSKUSJA

Glukoza jest cząsteczką o niezwykle istotnym znaczeniu dla prawidłowej aktywności komórek większości organizmów, przy czym nie jest to związane tylko z jej wykorzystaniem jako podstawowego źródła energii. Wynika z tego duże zainteresowanie badawcze biologiczną rolą glukozy i jej udziałem w regulacji procesów wewnątrzkomórkowych, czy też różnych aspektów funkcjonowania komórki. Badania analizujące wpływ glukozy na wzrost komórek drożdży i tempo ich reprodukcji koncentrują się zwykle na porównaniu komórek hodowanych na podłożach zawierających lub niezawierających glukozy (Alberghina i in., 2004; Tamaki i in., 2005). Ponadto w przypadku komórek drożdży analizuje się również obniżone stężenia glukozy w kontekście warunków restrykcji kalorycznej (Lin i in., 2002; Barros i in., 2004; Kaeberlein i in., 2005; Zuin i in., 2010; Sharma i in., 2011; Schleit i in., 2013; Tahara i in., 2013; Denoth Lippuner i in., 2014; Huberts i in., 2014). W niniejszej pracy zastosowano podejście bardziej kompleksowe, wykorzystując nie tylko warunki restrykcji kalorycznej, ale także wysokie stężenia glukozy jako odpowiednik warunków nadmiaru kalorii. Swoistą inspiracją do badań były rozbieżności między wynikami obrazującymi wpływ restrykcji kalorycznej na długość i jakość życia u małp z rodzaju *Rhesus* (Colman i in., 2009; Mattison i in., 2012) oraz kontrowersje związane ze stosowaniem zasady żywienia *ad libitum* jako kontroli eksperymentu (Austad, 2012; Biliński i in., 2015). Dodatkowo takie kompleksowe podejście i szeroki zakres analiz w odniesieniu do różnych stężeń glukozy wydaje się być istotny chociażby ze względu na to, iż prawie wszystkie znane do tej pory związki będące mimetykami restrykcji kalorycznej działają poprzez zmiany w metabolizmie glukozy (Shintani i in., 2018). Metabolizm komórkowy jest ściśle kontrolowany i stale dostosowywany zarówno do aktualnych potrzeb komórki, jak też do dostępności składników odżywczych w środowisku (Vander Heiden i in., 2009; Nilsson i Nielsen, 2016). Regulacja metabolizmu komórki może zachodzić na kilku różnych poziomach, począwszy od zmian na poziomie ekspresji genów, a skończywszy na zmianie aktywności enzymów już obecnych w komórce. Zazwyczaj szybkie modulowanie metabolizmu komórki odbywa się poprzez allosteryczną regulację aktywności enzymów wywołaną zmianami stężenia określonych metabolitów (Wegner i in., 2015). Wyniki które stanowią podstawę niniejszej pracy wskazują, że nadmiar lub restrykcja dostarczonych kalorii ma

istotny wpływ na funkcjonowanie komórki poprzez zmiany na poziomie metabolicznym. Zmiany te wydają się być podyktowane kosztami i korzyściami wynikającymi z wykorzystania glukozy na drodze różnych szlaków metabolicznych. Stąd, sprawność fizjologiczna komórki zależy od metabolicznego kompromisu między różnymi drogami wykorzystania glukozy (Vander Heiden i in., 2009; Nilsson i Nielsen, 2016). Podstawowymi szlakami wykorzystania glukozy przez komórkę są glikoliza i oddychanie tlenowe, odpowiadające za wytwarzanie niezbędnej energii. Oddychanie tlenowe dostarcza kilkakrotnie więcej cząsteczek ATP w przeliczeniu na mol glukozy w porównaniu z fermentacją alkoholową. Pomimo to, komórki drożdży rosnące w warunkach dostępności tlenu na pożywce zawierającej glukozę, uzyskują energię poprzez fermentację (Rolland i in., 2002; Nilsson i Nielsen, 2016). Przyczyny tego zjawiska nie są jeszcze w pełni zrozumiałe, ale zakłada się, że produkcja etanolu podczas fermentacji jest jedną z głównych przyczyn preferencji tego typu uzyskiwania energii. Jednakże najnowsze wyniki podają inne możliwe i uzupełniające wyjaśnienia tej kwestii. Podkreślają one, że chociaż podczas fermentacji wytwarzana jest stosunkowo niewielką ilość energii, to koszty komórkowe zainwestowane w syntezę enzymów wymaganych dla tego szlaku są niższe w porównaniu z oddychaniem tlenowym. Fosforylacja oksydacyjna wymaga bowiem ściślejszej aktywności kilkudziesięciu białek enzymatycznych, stąd też liczba białek wymaganych do powstania cząsteczki ATP w oddychaniu tlenowym jest znacznie większa niż w glikolizie (Nilsson i Nielsen, 2016). Wsparciem dla takiego wnioskowania są również wyniki uzyskane w badaniach objętych niniejszą rozprawą doktorską. Wyniki prezentujące jednoczesny brak różnic w tempie wzrostu populacji komórek drożdży, zmniejszenie poziomu ATP, a przy tym zwiększenie rozmiarów i biomasy komórek wraz ze wzrastającym w podłożu stężeniem glukozy sugerują, że poziom ATP nie determinuje w sposób bezpośredni możliwości biosyntetycznych, a przez to wielkości komórki i w dalszej konsekwencji jej zdolności reprodukcyjnych (Maslanka i in., 2017; Maslanka i Zadrąg-Tecza, 2019). Wynika z tego, że nawet jeśli fermentacja jest procesem mniej wydajnym energetycznie, pod względem liczby wytworzonych cząsteczek ATP, jest korzystniejsza dla reprodukcji a przez to szybszego wzrostu całej populacji komórek drożdży. Potwierdzają to także dane postulujące, że wysoka produkcja ATP jest kluczowa dla przetrwania komórek w niekorzystnych warunkach,

jednakże nie jest ona czynnikiem limitującym dla proliferacji (Vander Heiden i DeBerardinis, 2017). Gdy składniki odżywcze są ograniczone, komórki dostosowują metabolizm tak, aby uzyskać maksymalną ilość energii i przetrwać w tych warunkach. Z kolei w sytuacji łatwej dostępności składników odżywczych są one efektywnie włączane do produkcji biomasy (Vander Heiden i in., 2009; Folmes i Terzic, 2016). Stąd też, w intensywnie proliferujących komórkach, glukoza i inne składniki odżywcze są wykorzystywane do produkcji komponentów stanowiących podstawowe składniki budulcowe potrzebne do tworzenia nowych komórek (Vander Heiden i in., 2009; Folmes i Terzic, 2016). Ze względu na to, że proliferacja komórek wymaga syntezy dużej ilości nukleotydów, białek, lipidów oraz kofaktorów reakcji metabolicznych, przekształcenie całej dostępnej dla komórki glukozy do dwutlenku węgla na drodze oddychania tlenowego byłoby nieefektywne. Sprawia to, że glikoliza w warunkach tlenowych wydaje się być bardziej efektywnym procesem z biosyntetycznego punktu widzenia. W komórce wykorzystanie glukozy na drodze glikolizy i szlaku PPP zapewnia pośrednie metabolity węglowe wymagane do biosyntezy niezbędnych komponentów komórki, w tym nukleotydów, aminokwasów, lipidów i witamin (Vander Heiden i in., 2009; Folmes i Terzic, 2016; Maslanka i in., 2018). Takie wykorzystanie glukozy przez komórkę oraz fakt, iż niektóre z wytworzonych komponentów komórki mogą posiadać naturalne właściwości fluorescencji, wiążą się ze zjawiskiem autofluorescencji. Rolę fizjologiczną oraz znaczenie metodyczne tego aspektu opisano w publikacji nr 3 ([Maslanka i in., 2018](#)). W przeprowadzonych badaniach pokazano, iż za zjawisko autofluorescencji występujące w komórkach drożdży w głównej mierze odpowiedzialne są tryptofan, ryboflawina i pirydoksyna. Te endogenne fluorofory są bezpośrednio zależne od metabolizmu glukozy, ze względu na pochodzenie ich szkieletu węglowego. To powoduje, że zmiany w jednym ze szlaków wykorzystania glukozy lub zmiany jej dostępności mogą wpływać na różną zawartość tych metabolitów w komórce. Istnienie takiego specyficznego „przepływu szkieletu węglowego” (ang. *carbon flux*) potwierdzają między innymi wyniki badań pokazujące, że nadekspresja genów kodujących białka enzymatyczne zaangażowanych w szlak PPP prowadzi do zwiększenia wewnątrzkomórkowej puli rybulozo-5-fosforanu, przy jednoczesnym zwiększeniu produkcji ryboflawiny (Duan i in., 2010; Wang i in., 2011). Różne stężenia endogennych fluoroforów nie tylko wpływają na poziom

---

autofluorescencji, ale ze względu na ich właściwości mogą także znacząco modyfikować stan fizjologiczny komórek. Przykładowo antyoksydacyjne właściwości pirydoksyny i ryboflawiny oraz ich rola w utrzymywaniu komórkowej puli zredukowanego glutationu (Bilski i in., 2000; Chumnantana i in., 2005; Ashoori i Saedisomeolia, 2014), mogą powodować, że komórki różniące się poziomem autofluorescencji pochodzącym od tych związków będą wykazywać różną wrażliwość na czynniki wywołujące stres oksydacyjny. W rezultacie pomiar autofluorescencji może dostarczać informacji na temat stanu fizjologicznego komórek, a niewątpliwą zaletą technik opartych na pomiarze autofluorescencji jest możliwość wykonywania pomiarów w czasie rzeczywistym w natywnych próbkach biologicznych (Monici, 2005). Z drugiej jednak strony wykrywanie i interpretacja autofluorescencji powoduje pewne trudności. W próbkach biologicznych takie trudności są związane głównie z jednoczesnym występowaniem różnych endogennych fluoroforów i nakładaniem się ich widm wzbudzenia i emisji. Dodatkowo widma wzbudzenia i emisji niektórych egzogennych fluoroforów wykorzystywanych w szeregu oznaczeń biochemicznych mogą pokrywać się z tymi obserwowanymi dla endogennych fluoroforów. To może zmieniać interpretację wyników pomiarów fluorescencji, a przykładem tego jak istotna może być to zmiana mogą być dane uzyskane w trakcie oznaczeń wykorzystujących fluorescencyjny analog glukozy 6-NBDG zaprezentowane w publikacji nr 3 ([Masłanka i in., 2018](#)). W związku z powyższym przedstawione w tej pracy wyniki badań z jednej strony wskazują na możliwe wykorzystanie pomiarów autofluorescencji dla oceny stanu fizjologicznego komórki, a z drugiej zwracają uwagę na konieczność standaryzowania metod opartych na pomiarze fluorescencji, uwzględniając wyjściowy poziom autofluorescencji, który dodatkowo nie jest parametrem stałym i może znacząco różnić się pomiędzy poszczególnymi komórkami.

Warunki restrykcji kalorycznej i nadmiaru kalorii znacząco modyfikują możliwości biosyntetyczne i ogólny status fizjologiczny komórek drożdży. W warunkach restrykcji kalorycznej komórki wykazują niewielkie możliwości biosyntetyczne, co może wynikać z przekierowania metabolicznego (ang. *metabolic flux*) z glikolizy w kierunku oddychania tlenowego, a możliwość taką zdaje się potwierdzać m.in. wyższy poziom ATP notowany w tych warunkach ([Masłanka i Zadrąg-Tecza, 2019](#)). Dane te są zgodne również z wynikami prezentującymi związek

---

pomiędzy zwiększeniem długości życia w warunkach restrykcji kalorycznej a zwiększonym oddychaniem tlenowym (Lin i in., 2002; Tahara i in., 2013). W świetle uzyskanych wyników wydaje się jednak, że zwiększony poziom oddychania tlenowego nie jest przyczyną zwiększenia potencjału reprodukcyjnego a przypadkowym skutkiem przekierowania metabolicznego. To mogłoby wyjaśniać, dlaczego warunki restrykcji kalorycznej mogą również zwiększać długość życia w komórkach drożdży niekompletnych oddechowo ( $\rho^0$ ) (Kaeberlein i in., 2005). Z kolei, gdy glukoza jest w pełni dostępna w środowisku, następuje zwiększenie jej przekierowania metabolicznego w kierunku glikolizy, co zmniejsza poziom ATP, ale jednocześnie zwiększa możliwości biosyntetyczne komórki. Możliwości te są nierozdzielnie związane ze szlakiem PPP, a wyniki badań wskazują na dodatnią korelację między produkcją biomasy a przekierowaniem metabolicznym w stronę szlaku PPP (Nidelet i in., 2016). Sugeruje to, że warunki nadmiaru kalorii promują wyższy poziom biosyntezy komórkowych, prawdopodobnie poprzez przekierowanie metaboliczne w kierunku glikolizy i szlaku PPP. W warunkach tych, gdy ilość glukozy jest wyższa niż faktyczne zapotrzebowanie komórki, nadmiar glukozy zostaje przekierowany do szlaku PPP, co pozwala na zwiększenie tempa biosyntezy. Jakkolwiek, analiza aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, stanowiącej enzym katalizujący pierwszą reakcję w szlaku PPP, w komórkach szczepu dzikiego paradoksalnie wykazała spadek aktywności wraz ze wzrostem stężenia glukozy, nie musi to jednak jednoznacznie oznaczać spadku ogólnej aktywności szlaku PPP. Jest to związane z kilkoma aspektami w tym m.in. z faktem, iż aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej może być silnie hamowana przez powstający NADPH, który na terenie komórki może być tworzony także poza szlakiem PPP. Ponadto NADPH wykorzystywany jest jako kofaktor szeregu enzymów, a przez to uczestniczy w wielu wewnątrzkomórkowych szlakach metabolicznych. Ważnym argumentem na korzyść założenia, iż aktywność szlaku PPP jest związana z możliwościami biosyntetycznymi, są jednak wyniki uzyskane dla komórek szczepów z delecją genów *GPA2* i *GPR1*. Nie wykazywały one bowiem zmian w aktywności enzymów szlaku PPP w zależności od różnego stężenia glukozy w podłożu. Dodatkowo względem komórek szczepu dzikiego charakteryzowały się one niższym tempem pobierania glukozy, znacznie niższą

aktywnością enzymów szlaku PPP, a jednocześnie niższymi możliwościami biosyntetycznymi (Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019).

Różne stężenia glukozy oraz możliwości jej wewnątrzkomórkowych przekształceń niewątpliwie wiążą się ze zmianami metabolicznymi, których powszechnie znanym efektem ubocznym jest generacja RFT. W przypadku badań prowadzonych z wykorzystaniem drożdży wartym podkreślenia jest fakt niejednoznaczności wyników prezentujących poziom generacji RFT w warunkach restrykcji kalorycznej (Barros i in., 2004; Zuin i in., 2010; Sharma i in., 2011). W tej kwestii istotnych wyników dostarczyła analiza generacji RFT zaprezentowana w publikacji nr 2 (Maslanka i in., 2017). Wykazano, że generacja RFT w komórkach drożdży wzrasta wraz ze wzrostem stężenia glukozy w podłożu, przy czym odnotowano również, że zmniejszenie tempa pobierania glukozy może obniżać poziom generacji RFT. Najwyższy i nieco zaskakujący poziom generacji RFT obserwowany w warunkach nadmiaru kalorii, w których komórki drożdży prowadzą metabolizm fermentacyjny, dał podstawę do wnioskowania o obecności poza-mitochondrialnych źródeł RFT. Obecność takich poza-mitochondrialnych źródeł RFT została potwierdzona poprzez analizy stanu funkcjonalnego mitochondriów oraz analizy poziomu generowania RFT w komórkach niekompletnych oddechow. Wyniki te sugerują potrzebę weryfikacji w badaniach drożdżowych dominującego poglądu mówiącego, iż mitochondria są głównym i praktycznie jedynym komórkowym źródłem RFT (Maslanka i in., 2017). Ponadto potwierdzenie obecności poza-mitochondrialnych źródeł generowania RFT w komórkach drożdży może być wzmocnione przez niedawne badania, w których zaobserwowano niezależny od aktywności mitochondriów wzrost poziomu RFT w komórkach drożdży hodowanych w warunkach stresowych wynikających z niedoboru wapnia (Busti i in., 2016). Zwiększona generacja RFT wywołana wysokimi stężeniami glukozy w podłożu, dotyczy przede wszystkim tworzenia anionorodnika ponadtlenkowego. Wynik ten jest zgodny z wynikami badań prowadzonych na różnych komórkach ssaczy oraz nicieniu *Caenorhabditis elegans* prezentujących wzrost poziomu anionorodnika ponadtlenkowego oraz indukcję stresu oksydacyjnego w odpowiedzi na wysokie stężenia glukozy (Schlotterer i in., 2009; Gupte, 2010; Sedeek i in., 2010; Yu i in., 2016; Sedlic i in., 2017). Zwiększony poziom generacji RFT w komórkach drożdży hodowanych na podłożach zawierających wysokie

stężenia glukozy może mieć również związek z wyższą aktywnością szlaku cAMP/PKA. Aktywny szlak cAMP/PKA z jednej strony promuje biosyntezę białka poprzez indukcję biogenezy rybosomów, natomiast z drugiej strony zmniejsza możliwości odpowiedzi na stres poprzez tłumienie ekspresji genów będących pod kontrolą czynników transkrypcyjnych Msn2/4 (Busti i in., 2010). Oba te efekty mogą być połączone z wyższym poziomem RFT obserwowanym dla komórek hodowanych na podłożach zawierających 2 i 4% stężenie glukozy. Wysoki poziom biosyntezy białek wymusza zwiększone tempo ich fałdowania. Proces ten odbywa się na terenie retikulum endoplazmatycznego (ER) a jego produktem ubocznym są RFT (Gross i in., 2006). Na terenie ER zlokalizowane jest również białko Yno1, będące jedyną jak do tej pory odkrytą w komórkach drożdży oksydazą NADPH (Rinnerthaler i in., 2012; Leadsham i in., 2013). Działalność tego enzym prowadzi do generacji anionorodnika ponadtlenkowego w wyniku reakcji jedno-elektronowej redukcji tlenu w sposób zależny od NADPH (Rinnerthaler i in., 2012). Jak pokazują badania prowadzone na komórkach ssaczych aktywność oksydaz NADPH, zależna od dostępności cytozolowego NADPH, uważana jest za ważne poza-mitochondrialne źródło RFT (Furukawa i in., 2004; Gupte i in., 2006; Sedeek i in., 2010). Zwiększony poziom generowania RFT w komórkach drożdży w warunkach nadmiaru kalorii można łączyć również ze zmianami w odpowiedzi komórki na stres. Ekspresja genów kodujących białka antyoksydacyjne lub enzymy zaangażowane w proteolizę jest zależna od czynników transkrypcyjnych Msn2 i Msn4. Czynniki te w obecności glukozy wykazują lokalizację cytoplazmatyczną, co prowadzi do represji genów warunkujących odpowiedź na stres (Boy-Marcotte i in., 1998; Busti i in., 2010).

Wszelkie aspekty energetyczne, metaboliczne czy też związane z odpowiedzią na stres znajdują swoje odzwierciedlenie w sprawności reprodukcyjnej komórki. Jest to ważne zarówno w przypadku organizmów jednokomórkowych, ponieważ warunkuje utrzymanie ich populacji, jak i w przypadku organizmów wielokomórkowych gdzie sprawność proliferacyjna warunkuje wzrost, regenerację czy też ogólnie pojętą homeostazę liczbową komórek. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że potencjał reprodukcyjny komórki drożdży jest zależy od metabolicznego kompromisu między różnymi drogami wykorzystania glukozy, ze szczególnym uwzględnieniem szlaków biosyntetycznych. Analiza potencjału reprodukcyjnego komórek drożdży szczepu

---

dzikiego wykazała, iż komórki hodowane w warunkach restrykcji kalorycznej posiadają wyższy potencjał reprodukcyjny w porównaniu do komórek hodowanych na podłożu zawierającym optymalne (2%) stężenie glukozy (Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019), a wynik ten znajduje swoje potwierdzenie również w danych literaturowych (Huberts i in., 2014). Jednak, co jest ważniejsze i nie było wcześniej prezentowane, wykazano, że nadmiar kalorii znacząco zmniejsza potencjał reprodukcyjny. Istnieje więc ścisła negatywna korelacja między stężeniem glukozy w podłożu hodowlanym a potencjałem reprodukcyjnym. Jedną z możliwości wyjaśnienia tej kwestii jest związana z występowaniem sieci wzajemnych zależności między potencjałem reprodukcyjnym, możliwościami biosyntetycznymi a wielkością komórki. To wytłumaczenie ściśle łączy się z założeniami hipotezy hipertrofii, wskazującej wielkość komórki, a zwłaszcza tempo przyrostu wielkości komórki na generację jako czynniki determinujące potencjał reprodukcyjny komórki drożdży (Biliński i in., 2012; Zadrag-Tecza i in., 2018). Przeprowadzone analizy wykazały, że istnieje silna korelacja między wielkością komórki a jej potencjałem reprodukcyjnym. Komórki o większym rozmiarze obserwowane w warunkach nadmiaru kalorii charakteryzowały się obniżonym potencjałem reprodukcyjnym i odwrotnie komórki hodowane w warunkach restrykcji kalorycznej posiadały mniejszą wielkość komórek, ale jednocześnie wyższy potencjał reprodukcyjny. Jak podają dane literaturowe odwrotna zależność między potencjałem reprodukcyjnym, długością życia i rozmiarem komórki jest obserwowana także w niektórych typach komórek ssaczych i ludzkich (Angello i in., 1987; Demidenko i Błogosłonna, 2009; Anzi i in., 2018). Pośrednio wskazują na to również dane dotyczące komórek u osób borykających się z problemem cukrzycy typu 2 i otyłości, u których obserwowano wynikające z wysokich stężeń glukozy zaburzenia w regulacji wzrostu komórki prowadzące do fenotypu hipertrofii i zatrzymania podziałów komórki (Morocutti i in., 1996; Lumeng i Saltiel, 2011; Liu i in., 2012). Jakkolwiek przyczyny hipertrofii w komórkach drożdży i ssaków mogą być różne m.in. ze względu na preferowany rodzaj metabolizmu w warunkach tlenowych czy istotną rolę jaką w organizmie wielokomórkowym spełniają czynniki wzrostowe, to konsekwencje tego zjawiska mogą być podobne. Związek między wielkością komórki a glukozą opiera się na jej wykorzystaniu w procesach biosyntetycznych. Stąd też większe rozmiary komórek i jednocześnie obniżony potencjał reprodukcyjny w warunkach nadmiaru

kalorii może być wynikiem zwiększonych możliwości biosyntetycznych komórki (Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019). Zwiększone tempo procesów biosyntetycznych i związany z nim wzrost wielkości komórki może prowadzić do szybszego osiągnięcia stanu hipertrofii i ostatecznie utraty możliwości dalszej reprodukcji. Związek między możliwościami biosyntetycznymi a spadkiem wartości potencjału reprodukcyjnego był już pośrednio obserwowany w komórkach drożdży. Wykazano bowiem, że stare pod względem replikacyjnym, komórki drożdży charakteryzowały się zarówno nadprodukcją białek jak i utratą prawidłowych proporcji pomiędzy określonymi białkami tworzącymi kompleksy (Janssens i in., 2015). Ma to związek z faktem, iż ze wszystkich makrocząsteczek komórkowych, produkcja białka jest największym obciążeniem biosyntetycznym dla komórki. Jak pokazują dane literaturowe wymuszona, zwiększona produkcja białek powoduje zwiększenie wielkości komórki, ale jednocześnie zwiększony poziom niepotrzebnych białek zakłóca proliferację (Kafri i in., 2016). Ponadto, ze zmniejszonym obciążeniem biosyntetycznym komórki wydają się wiązać również dane prezentujące zwiększony potencjał reprodukcyjnym wywołany zwiększoną proteostazą i obrotem białek (ang. *protein turnover*) (Tavernarakis i Driscoll, 2002; Steffen i in., 2008; Kruegel i in., 2011; Perić i in., 2017). Takie wytłumaczenie potwierdzają również wyniki dotyczące suchej masy komórek oraz zmian w proporcji kofaktorów  $\text{NADP}^+$  i  $\text{NADPH}$  uzyskane podczas realizacji badań ujętych w niniejszej pracy. Zmiany w zawartości suchej masy komórek wyraźnie korelują z potencjałem reprodukcyjnym i wielkością komórki. Wzrostowi suchej masy komórek towarzyszy wzrost wielkości komórki i równoczesny spadek potencjału reprodukcyjnego komórki i odwrotnie, co sugeruje, że istnieje ścisły związek między wydajnością biosyntetyczną, wielkością komórki a jej potencjałem reprodukcyjnym (Maslanka i Zadrag-Tecza, 2019). Z kolei zmiany w proporcji kofaktorów mogą wynikać z utleniania  $\text{NADPH}$  do  $\text{NADP}^+$  w związku z wymaganiami reakcji anabolicznych. Stąd też obserwowany wzrost udziału  $\text{NADP}^+$  w całkowitej puli  $\text{NADP(H)}$  może być spowodowany zwiększonym zużyciem  $\text{NADPH}$ . Jak prezentują dane literaturowe procesy biosyntetyczne wymagają utlenienia  $\text{NADPH}$  do  $\text{NADP}^+$  w ilości ok. 6,5 mmola na 1 g biomasy (Verduyn i in., 1990). Taką możliwość potwierdzają również badania prowadzone na komórkach ludzkich prezentujące spadek wartości stosunku  $\text{NADPH/NADP}^+$  z równoczesnym wzrostem poziomu  $\text{NADP}^+$

---

w sytuacji zwiększonych potrzeb anabolicznych komórki (Martorana i in., 2018). W komórkach drożdży możliwości biosyntetyczne oraz wielkość komórki są zależne od szlaku cAMP/PKA. Szlak ten dostosowuje metabolizm komórkowy do stanu dostępności składników odżywczych. Gdy glukoza jest dostępna w środowisku następuje aktywacja szlaku cAMP/PKA, co powoduje m.in. stymulację przepływu glikolitycznego (ang. *glycolytic flux*), represję genów metabolizmu oddechowego oraz indukcję biogenezy rybosomów. Zatem aktywacja cAMP/PKA zwiększa szybkość wzrostu i zdolności biosyntetyczne komórki (Rolland i in., 2002; Busti i in., 2010). Na bazie wyników uzyskanych dla szczepu dzikiego założono, że w warunkach nadmiaru kalorii aktywność szlaku cAMP/PKA jest zwiększona, podczas gdy zmniejsza się ona w warunkach restrykcji kalorycznej. W celu sprecyzowania roli szlaku cAMP/PKA w powiązaniu między możliwościami biosyntetycznymi komórki a jej potencjałem reprodukcyjnym zastosowano szczepy  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  o zaburzonej aktywności tego szlaku. Stwierdzono, że w warunkach nadmiaru kalorii potencjał reprodukcyjny komórek ulega obniżeniu na skutek zwiększonych możliwości biosyntetycznych związanych z aktywnością szlaku cAMP/PKA. Potencjał reprodukcyjny komórek szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  hodowanych na podłożu z 2% stężeniem glukozy był wyższy w porównaniu z komórkami szczepu dzikiego, co znajduje swoje potwierdzenie w danych literaturowych (Lin i in., 2000), ale co istotniejsze wartość tego potencjału była podobna dla komórek szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  hodowanych na podłożach zawierających różne stężenie glukozy. Wskazuje to, że poprzez niską aktywność szlaku cAMP/PKA, nawet w sytuacji wysokiego zewnątrzkomórkowego stężenia glukozy, można utrzymać potencjał reprodukcyjny komórki na stosunkowo wysokim poziomie. Co więcej niższe wartości suchej masy komórki, niższa aktywność enzymów szlaku PPP i mniejsze wykorzystanie NADPH w komórkach szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  w porównaniu z komórkami szczepu dzikiego (Maslanka i Zadrąg-Tecza, 2019), a także dane literaturowe pokazujące niższą zawartość białka i obniżone tempo jego syntezy w komórkach szczepów  $\Delta gpa2$  i  $\Delta gpr1$  (Alberghina i in., 2004; Tamaki i in., 2005), wskazują, że szczepy te mają niskie możliwości biosyntetyczne przy jednocześnie dużych możliwościach reprodukcyjnych. Stanowi to dodatkowy dowód na to, że potencjał reprodukcyjny komórki jest związany zarówno z wielkością komórki jak i jej możliwościami biosyntetycznymi, bowiem te

dwa procesy są ściśle ze sobą powiązane. Dodatkowo dzięki zastosowaniu szczepów posiadających delecję wybranych genów stwierdzono, że rozmiar komórki jest ściślej skorelowany z tempem poboru glukozy a przez to z jej wewnątrzkomórkowym poziomem niż ze stężeniem pozakomórkowym. Nawet gdy pozakomórkowy poziom glukozy jest wysoki, mutacje zmniejszające tempo pobierania glukozy (np. na skutek obniżenia aktywności szlaku cAMP/PKA) mogą utrzymać mniejszy rozmiar komórki w porównaniu z komórkami o niezaburzonym poborze glukozy. Sugeruje to, że wewnątrzkomórkowy poziom glukozy i sygnalizacja od niej zależna są ważniejsze niż jej poziom zewnątrzkomórkowy (Maslanka i in., 2017; Maslanka i Zadrąg-Tecza, 2019). Potwierdzają to coraz liczniejsze badania prezentujące, że nie ma prostej zależności między fizjologią komórki, jej tempem wzrostu a wykrywaniem glukozy w podłożu. Ważnym aspektem jest właśnie tempo pobierania glukozy. Istnieją dane sugerujące, że komórki drobnoustrojów zmieniają swój stan fizjologiczny na skutek różnic w przekierowaniu metabolicznym, a nie bezpośrednio w wyniku zmian warunków zewnątrzkomórkowych. Oznacza to, że komórki hodowane na podłożu o takiej samej ilości składników odżywczych, ale różniące się możliwościami ich wychwytu, mogą wykazywać inny stan metaboliczny (Litsios i in., 2018). Warto podkreślić, że indywidualnie ani samo wykrywanie glukozy ani też pobieranie glukozy nie ma decydującego wpływu na fizjologię komórki, bowiem interakcja między nimi determinuje tempo wzrostu i proliferacji komórki. To oznacza, że zarówno zewnątrzkomórkowa jak i wewnątrzkomórkowa sygnalizacja warunkowana glukozą współdziała ze sobą w koordynowaniu wzrostu komórki i postępu cyklu komórkowego (Youk i van Oudenaarden, 2009; Busti i in., 2010).

Powszechnym jest pogląd o pozytywnym wpływie restrykcji kalorycznej na długość życia wielu organizmów, pojawiają się także przesłanki o negatywnym wpływie nadmiaru energii i ilości dostarczanych kalorii na długość życia organizmów. Stąd w badaniach sprawdzono także wpływ różnych stężeń glukozy na długość życia komórek drożdży. Wyniki przeprowadzonych analiz pokazały że post-reprodukcyjna długość życia komórki drożdży jest ujemnie skorelowana z liczbą wyprodukowanych przez nią komórek potomnych, a podobne zależności były notowane już wcześniej (Zadrąg-Tecza i in., 2013). Z kolei analiza całkowitej długości życia komórek drożdży wykazała, że wartość tego parametru jest prawie taka sama między komórkami

---

analizowanych szczepów, pomimo różnic w ich zdolnościach reprodukcyjnych, co także ma swoje poparcie w danych literaturowych (Zadrag-Tecza i in., 2013). Jednakże, porównując całkowitą długość życia nie w obrębie szczepów a w obrębie zastosowanych warunków dotyczących różnych stężeń glukozy, odnotowano nie obserwowane wcześniej zależności. Stwierdzono, iż całkowita długość życia w warunkach restrykcji kalorycznej i w warunkach optymalnych wydaje się być porównywalna, natomiast jest ona wyraźnie skrócona w warunkach nadmiaru kalorii. Sugeruje to, że w komórkach drożdży istnieje pewnego rodzaju limit maksymalnej długości życia. Przy czym warto podkreślić, że możliwość istnienia limitu na poziomie organizmu, jest też podnoszona przez naukowców w odniesieniu do maksymalnej długości życia ludzi (Dong i in., 2016; Le Bourg i Vijg, 2017; Marck i in., 2017). Uzyskane wyniki z jednej strony potwierdzają, że warunki restrykcji kalorycznej mogą poprawiać sprawność fizjologiczną komórek, co przejawia się m.in. przez zmniejszenie generacji RFT oraz zwiększony potencjał reprodukcyjny. Jednakże, wydają się nie zwiększać znacząco ogólnej długości życia komórek drożdży. Z drugiej strony uzyskane wyniki pokazują, że warunki nadmiaru kalorii prowadzą zarówno do zaburzeń w fizjologii komórki (zwiększona generacja RFT, zmniejszony potencjał reprodukcyjny) jak też skrócenia całkowitej długości życia komórek drożdży. Jakkolwiek wyniki i ich objaśnienia ujęte w tej pracy nie mogą być bezpośrednio porównywane z wynikami badań dotyczących restrykcji kalorycznej przeprowadzonych na innych często wielokomórkowych organizmach modelowych, w niektórych obszarach mogą występować między nimi swoiste analogie. Niewątpliwie takimi analogiami są ogólny sposób działania restrykcji kalorycznej a także szkodliwość nadmiarowej podaży składników odżywczych (Austad, 2012; Le Bourg i Vijg, 2017).

## 6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Wyniki uzyskane w toku realizacji pracy doktorskiej pozwoliły na kompleksową analizę konsekwencji nadmiaru i restrykcji kalorycznej dla komórek drożdży *S. cerevisiae*. Z kolei fakt, iż warunki restrykcji kalorycznej oraz nadmiaru kalorii w przypadku komórek drożdży uzyskuje się poprzez zmiany stężenia glukozy w podłożu hodowlanym oraz kluczowa i konserwatywna rola glukozy w metabolizmie każdej komórki, dają podstawę do podjęcia prób wyjaśniania skomplikowanych zależności występujących między wewnątrzkomórkowymi szlakami metabolizmu glukozy. Wskazuje to na aktualność badań podjętych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej a mogących stanowić swoisty wkład w wyjaśnianie ogólnych problemów biologicznych. Wnioski płynące z tej pracy pozwalają na pełniejsze zrozumienie regulacji metabolizmu glukozy na poziomie komórkowym, przez co mogą być pomocne w analizach dotyczących metabolizmu komórek narażonych na wysokie stężenia glukozy, co ma miejsce m.in. w przypadku osób chorych na cukrzycę typu 2.

Do najważniejszych wniosków niniejszej pracy doktorskiej można zaliczyć: (i) wykazanie, że w komórce istnieje specyficzny kompromis metaboliczny pomiędzy różnymi sposobami wykorzystania glukozy, (ii) wewnątrzkomórkowe wykorzystanie glukozy jest zależne od jej stężenia w otoczeniu, (iii) zmiana stężenia glukozy w podłożu wpływa na poziom generowanych reaktywnych form tlenu, wielkość oraz możliwości biosyntetyczne komórek, (iv) istnieje silna zależność między stężeniem glukozy, stanem fizjologicznym oraz potencjałem reprodukcyjnym komórki, (v) możliwości biosyntetyczne poprzez wpływ na wielkość komórki determinują potencjał reprodukcyjny oraz mają wpływ na długość jej życia, (vi) warunki nadmiaru kalorii negatywnie wpływają na sprawność fizjologiczną, potencjał reprodukcyjny a także całkowitą długość życia komórki.

---

## 7. LITERATURA

- Alberghina L, Rossi RL, Querin L, Wanke V, Vanoni M (2004) A cell sizer network involving Cln3 and Far1 controls entrance into S phase in the mitotic cycle of budding yeast. *J Cell Biol* 167: 433-43.
- Angello JC, Pendergrass WR, Norwood TH, Prothero J (1987) Proliferative potential of human fibroblasts: an inverse dependence on cell size. *J Cell Physiol* 132: 125-30.
- Anzi S, Stolovich-Rain M, Klochendler A, Fridlich O, Helman A, i in. (2018) Postnatal Exocrine Pancreas Growth by Cellular Hypertrophy Correlates with a Shorter Lifespan in Mammals. *Dev Cell* 45: 726-737.e3.
- Ashoori M, Saedisomeolia A (2014) Riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) and oxidative stress: a review. *Br J Nutr* 111: 1985-91.
- Austad SN (2012) Ageing: Mixed results for dieting monkeys. *Nature* 489: 210-11.
- Barros MH, Bandy B, Tahara EB, Kowaltowski AJ (2004) Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 49883-8.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) *Biochemistry 5th edition*: New York.
- Bilinski T (2012) Hypertrophy, replicative ageing and the ageing process. *FEMS Yeast Res* 12: 739-40.
- Biliński T, Lukaszewicz J, Sledziewski A (1978) Demonstration of anaerobic catalase synthesis in the cz1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 83: 1225-33.
- Biliński T, Paszkiewicz T, Zadrag-Tecza R (2015) Energy excess is the main cause of accelerated aging of mammals. *Oncotarget* 6: 12909-19.
- Bilinski T, Zadrag-Tecza R (2017) Yeast aging: Reproduction Strategies Determine the Longevity of Budding and Fission Yeasts In Shefferson R, Owen J and R, S.-G. (Eds), *The Evolution of Senescence in the Tree of Life*, Cambridge University Press
- Biliński T, Zadrag-Tecza R, Bartosz G (2012) Hypertrophy hypothesis as an alternative explanation of the phenomenon of replicative aging of yeast. *FEMS Yeast Res* 12: 97-101.
- Bilski P, Li MY, Ehrenshaft M, Daub ME, Chignell CF (2000) Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem Photobiol* 71: 129-34.
- Boy-Marcotte E, Perrot M, Bussereau F, Boucherie H, Jacquet M (1998) Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 180: 1044-52.
- Busti S, Coccetti P, Alberghina L, Vanoni M (2010) Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors (Basel)* 10: 6195-240.
- Busti S, Mapelli V, Tripodi F, Sanvito R, Magni F, i in. (2016) Respiratory metabolism and calorie restriction relieve persistent endoplasmic reticulum stress induced by calcium shortage in yeast. *Sci Rep* 6: 27942.
- Chrościcki P, Usarek M, Bryla J (2013) [The role of biological clock in glucose homeostasis]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 67: 569-83.
- Chumnantana R, Yokochi N, Yagi T (2005) Vitamin B6 compounds prevent the death of yeast cells due to menadione, a reactive oxygen generator. *Biochim Biophys Acta* 1722: 84-91.
-

- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, i in. (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325: 201-4.
- Colman RJ, Beasley TM, Kemnitz JW, Johnson SC, Weindruch R, i in. (2014) Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun* 5: 3557.
- Dashko S, Zhou N, Compagno C, Piškur J (2014) Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res* 14: 826-32.
- De Paiva CS, Pflugfelder SC, Li DQ (2006) Cell size correlates with phenotype and proliferative capacity in human corneal epithelial cells. *Stem Cells* 24: 368-75.
- Demidenko ZN, Blagosklonny MV (2009) Quantifying pharmacologic suppression of cellular senescence: prevention of cellular hypertrophy versus preservation of proliferative potential. *Aging (Albany NY)* 1: 1008-16.
- Denoth Lippuner A, Julou T, Barral Y (2014) Budding yeast as a model organism to study the effects of age. *FEMS Microbiol Rev* 38: 300-25.
- Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A (2011) The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta* 1807: 568-76.
- Dong X, Milholland B, Vijg J (2016) Evidence for a limit to human lifespan. *Nature* 538: 257-259.
- Duan YX, Chen T, Chen X, Zhao XM (2010) Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase enhances riboflavin production in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1907-14.
- Folmes CD, Terzic A (2016) Energy metabolism in the acquisition and maintenance of stemness. *Semin Cell Dev Biol* 52: 68-75.
- Fontana L, Partridge L (2015) Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell* 161: 106-18.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, i in. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114: 1752-61.
- Gancedo JM (2008) The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol Rev* 32: 673-704.
- Gross E, Sevier CS, Heldman N, Vitu E, Bentzur M, i in. (2006) Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 299-304.
- Gunin AG, Kornilova NK, Petrov VV, Vasil'eva OV (2011) [Age-related changes in the number and proliferation of fibroblasts in the human skin]. *Adv Gerontol* 24: 43-7.
- Gupte SA (2010) Targeting the Pentose Phosphate Pathway in Syndrome X-related Cardiovascular Complications. *Drug Dev Res* 71: 161-167.
- Gupte SA, Levine RJ, Gupte RS, Young ME, Lionetti V, i in. (2006) Glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH fuels superoxide production in the failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 41: 340-9.
- Hagman A, Säll T, Compagno C, Piskur J (2013) Yeast "make-accumulate-consume" life strategy evolved as a multi-step process that predates the whole genome duplication. *PLoS One* 8: e68734.
- Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183: 46-51.
-

- Heilbronn LK, Ravussin E (2003) Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 78: 361-9.
- Herman MA, Kahn BB (2006) Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J Clin Invest* 116: 1767-75.
- Hu C, Fan L, Cen P, Chen E, Jiang Z, i in. (2016) Energy Metabolism Plays a Critical Role in Stem Cell Maintenance and Differentiation. *Int J Mol Sci* 17: 253.
- Huberts DH, González J, Lee SS, Litsios A, Hubmann G, i in. (2014) Calorie restriction does not elicit a robust extension of replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 11727-31.
- Janssens GE, Meinema AC, González J, Wolters JC, Schmidt A, i in. (2015) Protein biogenesis machinery is a driver of replicative aging in yeast. *Elife* 4: e08527.
- Kaeberlein M, Hu D, Kerr EO, Tsuchiya M, Westman EA, i in. (2005) Increased life span due to calorie restriction in respiratory-deficient yeast. *PLoS Genet* 1: e69.
- Kaeberlein M, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK (2004) Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *PLoS Biol* 2: E296.
- Kafri M, Metzl-Raz E, Jona G, Barkai N (2016) The Cost of Protein Production. *Cell Rep* 14: 22-31.
- Kruegel U, Robison B, Dange T, Kahlert G, Delaney JR, i in. (2011) Elevated proteasome capacity extends replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* 7: e1002253.
- Kwolek-Mirek M, Zadrag-Tecza R (2014) Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Res* 14: 1068-79.
- Le Bourg E, Vijg J (2017) The Future of Human Longevity: Time for a Reality Check. *Gerontology* 63: 527-528.
- Leadsham JE, Sanders G, Giannaki S, Bastow EL, Hutton R, i in. (2013) Loss of cytochrome c oxidase promotes RAS-dependent ROS production from the ER resident NADPH oxidase, Yno1p, in yeast. *Cell Metab* 18: 279-86.
- Lee D, Son HG, Jung Y, Lee SV (2017) The role of dietary carbohydrates in organismal aging. *Cell Mol Life Sci* 74: 1793-1803.
- Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289: 2126-8.
- Lin SJ, Ford E, Haigis M, Liszt G, Guarente L (2004) Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev* 18: 12-6.
- Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, i in. (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418: 344-8.
- Litsios A, Ortega Á, Wit EC, Heinemann M (2018) Metabolic-flux dependent regulation of microbial physiology. *Curr Opin Microbiol* 42: 71-78.
- Liu L, Hu X, Cai GY, Lv Y, Zhuo L, i in. (2012) High glucose-induced hypertrophy of mesangial cells is reversed by connexin43 overexpression via PTEN/Akt/mTOR signaling. *Nephrol Dial Transplant* 27: 90-100.
- Longo VD, Mattson MP (2014) Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab* 19: 181-92.
- Lu SP, Lin SJ (2010) Regulation of yeast sirtuins by NAD(+) metabolism and calorie restriction. *Biochim Biophys Acta* 1804: 1567-75.
- Lumeng CN, Saltiel AR (2011) Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 121: 2111-7.

- Magier Z, Jarzyna R (2013) [The role of glucose transporters in human metabolic regulation]. *Postepy Biochem* 59: 70-82.
- Marck A, Antero J, Berthelot G, Saulière G, Jancovici JM, i in. (2017) Are We Reaching the Limits of. *Front Physiol* 8: 812.
- Martorana F, Gaglio D, Bianco MR, Aprea F, Virtuoso A, i in. (2018) Differentiation by nerve growth factor (NGF) involves mechanisms of crosstalk between energy homeostasis and mitochondrial remodeling. *Cell Death Dis* 9: 391.
- Maslanka R, Kwolek-Mirek M, Zadrag-Tecza R (2017) Consequences of calorie restriction and calorie excess for the physiological parameters of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Res* 17.
- Maslanka R, Kwolek-Mirek M, Zadrag-Tecza R (2018) Autofluorescence of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells caused by glucose metabolism products and its methodological implications. *J Microbiol Methods* 146: 55-60.
- Maslanka R, Zadrag-Tecza R (2019) Less is more or more is less: Implications of glucose metabolism in the regulation of the reproductive potential and total lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *J Cell Physiol*.
- Masoro EJ (2000) Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 35: 299-305.
- Mathers JC (2015) Impact of nutrition on the ageing process. *Br J Nutr* 113 Suppl: S18-22.
- Mattison JA, Colman RJ, Beasley TM, Allison DB, Kemnitz JW, i in. (2017) Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat Commun* 8: 14063.
- Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, i in. (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 489: 318-21.
- Minois N, Frajnt M, Wilson C, Vaupel JW (2005) Advances in measuring lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 402-6.
- Molenaar D, van Berlo R, de Ridder D, Teusink B (2009) Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. *Mol Syst Biol* 5: 323.
- Monici M (2005) Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev* 11: 227-56.
- Morocutti A, Earle KA, Sethi M, Piras G, Pal K, i in. (1996) Premature senescence of skin fibroblasts from insulin-dependent diabetic patients with kidney disease. *Kidney Int* 50: 250-6.
- Mortimer RK, Johnston JR (1959) Life span of individual yeast cells. *Nature* 183: 1751-2.
- Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, i in. (2007) Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol* 583: 9-24.
- Nidelet T, Brial P, Camarasa C, Dequin S (2016) Diversity of flux distribution in central carbon metabolism of *S. cerevisiae* strains from diverse environments. *Microb Cell Fact* 15: 58.
- Nilsson A, Nielsen J (2016) Metabolic Trade-offs in Yeast are Caused by F1F0-ATP synthase. *Sci Rep* 6: 22264.
- Patra KC, Bardeesy N (2018) A Cell Size Theory of Aging. *Dev Cell* 45: 665-666.
- Perić M, Lovrić A, Šarić A, Musa M, Bou Dib P, i in. (2017) TORC1-mediated sensing of chaperone activity alters glucose metabolism and extends lifespan. *Aging Cell* 16: 994-1005.

- 
- Rafalski VA, Mancini E, Brunet A (2012) Energy metabolism and energy-sensing pathways in mammalian embryonic and adult stem cell fate. *J Cell Sci* 125: 5597-608.
- Redman LM, Smith SR, Burton JH, Martin CK, Il'yasova D, i in. (2018) Metabolic Slowing and Reduced Oxidative Damage with Sustained Caloric Restriction Support the Rate of Living and Oxidative Damage Theories of Aging. *Cell Metab* 27: 805-815.e4.
- Rinnerthaler M, Büttner S, Laun P, Heeren G, Felder TK, i in. (2012) Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 8658-63.
- Rødkaer SV, Faergeman NJ (2014) Glucose- and nitrogen sensing and regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 14: 683-96.
- Rodrigues F, Ludovico P, Leão C (2006) Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism, *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook.*, Springer: Berlin, pp. 101-121.
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM (2002) Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res* 2: 183-201.
- Roth LW, Polotsky AJ (2012) Can we live longer by eating less? A review of caloric restriction and longevity. *Maturitas* 71: 315-9.
- Roy A, Dement AD, Cho KH, Kim J-H (2015) Assessing Glucose Uptake through the Yeast Hexose Transporter 1 (Hxt1). *Plos One* 10.
- Schleit J, Johnson SC, Bennett CF, Simko M, Trongtham N, i in. (2013) Molecular mechanisms underlying genotype-dependent responses to dietary restriction. *Aging Cell* 12: 1050-61.
- Schlotterer A, Kukudov G, Bozorgmehr F, Hutter H, Du X, i in. (2009) *C. elegans* as model for the study of high glucose- mediated life span reduction. *Diabetes* 58: 2450-6.
- Schuster S, Boley D, Möller P, Stark H, Kaleta C (2015) Mathematical models for explaining the Warburg effect: a review focussed on ATP and biomass production. *Biochem Soc Trans* 43: 1187-94.
- Sedeek M, Callera G, Montezano A, Gutsol A, Heitz F, i in. (2010) Critical role of Nox4-based NADPH oxidase in glucose-induced oxidative stress in the kidney: implications in type 2 diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F1348-58.
- Sedlic F, Muravyeva MY, Sepac A, Sedlic M, Williams AM, i in. (2017) Targeted Modification of Mitochondrial ROS Production Converts High Glucose-Induced Cytotoxicity to Cytoprotection: Effects on Anesthetic Preconditioning. *J Cell Physiol* 232: 216-24.
- Sharma PK, Agrawal V, Roy N (2011) Mitochondria-mediated hormetic response in life span extension of calorie-restricted *Saccharomyces cerevisiae*. *Age (Dordr)* 33: 143-54.
- Shintani H, Shintani T, Ashida H, Sato M (2018) Calorie Restriction Mimetics: Upstream-Type Compounds for Modulating Glucose Metabolism. *Nutrients* 10.
- Simpson IA, Dwyer D, Malide D, Moley KH, Travis A, i in. (2008) The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E242-53.
-

- Sinclair DA (2005) Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev* 126: 987-1002.
- Slonimski PP, Perrodin G, Croft JH (1968) Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal "petites". *Biochem Biophys Res Commun* 30: 232-9.
- Smith DL, McClure JM, Maticic M, Smith JS (2007) Calorie restriction extends the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* independently of the Sirtuins. *Aging Cell* 6: 649-62.
- Smith DL, Nagy TR, Allison DB (2010) Calorie restriction: what recent results suggest for the future of ageing research. *Eur J Clin Invest* 40: 440-50.
- Smith J, Wright J, Schneider BL (2015) A budding yeast's perspective on aging: the shape I'm in. *Exp Biol Med (Maywood)* 240: 701-10.
- Steffen KK, MacKay VL, Kerr EO, Tsuchiya M, Hu D, i in. (2008) Yeast life span extension by depletion of 60s ribosomal subunits is mediated by Gcn4. *Cell* 133: 292-302.
- Tahara EB, Cunha FM, Basso TO, Della Bianca BE, Gombert AK, i in. (2013) Calorie restriction hysteretically primes aging *Saccharomyces cerevisiae* toward more effective oxidative metabolism. *PLoS One* 8: e56388.
- Tamaki H, Yun CW, Mizutani T, Tsuzuki T, Takagi Y, i in. (2005) Glucose-dependent cell size is regulated by a G protein-coupled receptor system in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 10: 193-206.
- Tavernarakis N, Driscoll M (2002) Caloric restriction and lifespan: a role for protein turnover? *Mech Ageing Dev* 123: 215-29.
- Tian WN, Braunstein LD, Pang J, Stuhlmeier KM, Xi QC, i in. (1998) Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J Biol Chem* 273: 10609-17.
- Tschen SI, Dhawan S, Gurlo T, Bhushan A (2009) Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. *Diabetes* 58: 1312-20.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324: 1029-33.
- Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ (2017) Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* 168: 657-669.
- Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, van Dijken JP (1990) Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J Gen Microbiol* 136: 395-403.
- Wang Z, Chen T, Ma X, Shen Z, Zhao X (2011) Enhancement of riboflavin production with *Bacillus subtilis* by expression and site-directed mutagenesis of zwf and gnd gene from *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresour Technol* 102: 3934-40.
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309-14.
- Wegner A, Meiser J, Weindl D, Hiller K (2015) How metabolites modulate metabolic flux. *Curr Opin Biotechnol* 34: 16-22.
- Weinberger M, Mesquita A, Carroll T, Marks L, Yang H, i in. (2010) Growth signaling promotes chronological aging in budding yeast by inducing superoxide anions that inhibit quiescence. *Aging (Albany NY)* 2: 709-26.
- Wright J, Dungrawala H, Bright RK, Schneider BL (2013) A growing role for hypertrophy in senescence. *FEMS Yeast Res* 13: 2-6.
-

- Yang J, Dungrawala H, Hua H, Manukyan A, Abraham L, i in. (2011) Cell size and growth rate are major determinants of replicative lifespan. *Cell Cycle* 10: 144-55.
- Youk H, van Oudenaarden A (2009) Growth landscape formed by perception and import of glucose in yeast. *Nature* 462: 875-9.
- Yu J, Wu Y, Yang P (2016) High glucose-induced oxidative stress represses sirtuin deacetylase expression and increases histone acetylation leading to neural tube defects. *J Neurochem* 137: 371-83.
- Zadrag-Tecza R, Kwolek-Mirek M, Alabrudzińska M, Skoneczna A (2018) Cell Size Influences the Reproductive Potential and Total Lifespan of the. *Oxid Med Cell Longev* 2018: 1898421.
- Zadrag-Tecza R, Kwolek-Mirek M, Bartosz G, Bilinski T (2009) Cell volume as a factor limiting the replicative lifespan of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biogerontology* 10: 481-8.
- Zadrag-Tecza R, Molon M, Mamczur J, Bilinski T (2013) Dependence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* post-reproductive lifespan on the reproductive potential. *Acta Biochim Pol* 60: 111-5.
- Zadrag R, Bartosz G, Bilinski T (2008) Is the yeast a relevant model for aging of multicellular organisms? An insight from the total lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Aging Sci* 1: 159-65.
- Zhang W, Cao Y, Gong J, Bao X, Chen G, i in. (2015) Identification of residues important for substrate uptake in a glucose transporter from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Sci Rep* 5: 13829.
- Zimmet P, Thomas CR (2003) Genotype, obesity and cardiovascular disease--has technical and social advancement outstripped evolution? *J Intern Med* 254: 114-25.
- Zuin A, Carmona M, Morales-Ivorra I, Gabrielli N, Vivancos AP, i in. (2010) Lifespan extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway. *EMBO J* 29: 981-91.

**IV. PERSPEKTYWY**

Głównym problemem badawczym poruszonym w artykułach stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu różnych stężeń glukozy na wybrane parametry fizjologiczne, potencjał reprodukcyjny i długość życia komórek drożdży. Analizy włączone do rozprawy doktorskiej wpisują się w główny nurt badań, realizowanych w zespole badawczym, a dotyczą hipotezy hipertrofii i konsekwencji jakie pociąga za sobą zmiana rozmiarów komórki. Niemniej jednak w trakcie badań oraz podczas analizy wyników zwrócono uwagę na kilka interesujących zagadnień stanowiących punkt wyjścia do podjęcia nowych tematów badawczych. Niektóre z zagadnień zostały już częściowo opracowane eksperymentalnie a uzyskane wyniki wstępne zdają się potwierdzać potrzebę pogłębiania wiedzy na temat metabolicznych adaptacji komórki do zmiennych warunków umożliwiających utrzymanie stanu jak najbardziej zbliżonego do homeostazy. Zagadnienia te stanowią pewne grupy tematyczne wśród których można wymienić: i) poszukiwanie procesów oraz czynników warunkujących poza-mitochondrialną generację RFT w komórkach drożdży *S. cerevisiae*; ii) wyjaśnienie przyczyn i mechanizmów leżących u podstawy podobieństwa metabolizmu różnych typów komórek (szczególnie w ujęciu wykorzystywania glikolizy jako głównego typu metabolizmu przez komórki intensywnie proliferujące oraz występowania swoistego paradoksu ATP); iii) określenie relacji między możliwościami biosyntetycznymi a komórkowymi procesami degradacyjnymi, w tym także w aspekcie ich wpływu na zdolności reprodukcyjne komórek; iv) rozszerzenie analiz dotyczących zagadnienia nadmiaru kalorii (CE) jako istotnego determinanta jakości życia organizmów, zwłaszcza w kontekście problemów zdrowotnych współczesnego człowieka.

**V. POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO - BADAWCZE**

Moje zainteresowania naukowe od początku działalności badawczej koncentrują się na problematyce związanej z wpływem różnorodnych czynników zarówno wewnątrzkomórkowych jak i zewnątrzkomórkowych na stan fizjologiczny komórek a przez to mających potencjalny wpływ na zdolności proliferacyjne komórek. Badania realizowane w tym zakresie oparte są na wykorzystaniu komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* stanowiących model badawczy. Szczególnie istotne są dla mnie badania mające na celu określanie wpływu czynników, których działanie nie ma charakteru toksycznego a wręcz odwrotnie są one związkami niezbędnymi do prawidłowego funkcjonowania komórek bądź powstają w trakcie przemian chemicznych, czy to w organizmie czy w procesach środowiskowych. Mając to na względzie, analizy które prowadzę skupiają się na poszukiwaniu zmian wywołanych różnicami w ilości składników, z którymi komórki mają powszechny kontakt. Stąd też obserwowane zmiany, rzadko kiedy mają charakter reakcji stresowych a bardziej dotyczą zmian metabolicznych będących wyrazem adaptacji komórki do bieżącej sytuacji i mających na celu utrzymanie stanu zbliżonego do homeostazy. Nie oznacza to jednak, że zmiany takowe są bez znaczenia dla funkcjonowania komórek a przez to całego organizmu w ujęciu długofalowym. Jednakże uchwycenie poziomu krytycznego, po przekroczeniu, którego działanie danego czynnika przestaje mieć charakter pozytywny bądź neutralny a może przyczyniać się do powstania negatywnych konsekwencji wymaga znacznej uwagi i nieszablonowego myślenia. Jest to zatem dominujący nurt tematyczny większości publikacji i doniesień konferencyjnych, których jestem współautorem oraz realizowanych z moim udziałem projektów badawczych.

Mój dorobek naukowy odzwierciedlający dotychczasową aktywność naukową przedstawiam według podziału na prace naukowe, konferencje naukowe i udział w projektach badawczych.

**Publikacje naukowe nie wchodzące w skład cyklu**

1. **Maślanka R.**, Zadrag-Tęcza R. (2015) Morfologiczne zmiany struktur wewnątrzkomórkowych, jako efekt delecji genów kodujących białka rybosomalne w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. [W]: *Monografia Naukowa: „Wyzwania Naukowców We Współczesnym Świecie”*, s. 42-50. ISBN 978-83-943111-0-0. (liczba punktów MNiSW<sub>2015</sub> – 4)
2. **Maślanka R.**, Zadrag-Tęcza R. (2015) Duplikacja materiału genetycznego – mechanizm rozwoju nowej funkcjonalności genów. *Postępy Biochemii*. 61(4):388-397. (liczba punktów MNiSW<sub>2015</sub> – 5)
3. **Masłanka R.**, Zadrag-Tęcza R., Kwolek K., Kwolek-Mirek M. (2016) The effect of berry juices on the level of oxidative stress in yeast cells exposed to acrylamide. *Journal of Food Biochemistry*, 40:686-695. (IF<sub>2016</sub> – 1; liczba punktów MNiSW<sub>2016</sub> – 20)
4. **Maślanka R.**, Zadrag-Tęcza R. (2016) Niefarmakologiczne metody utrzymywania zdrowia organizmu. *Materiały Pokonferencyjne Spojrzenie Młodych Naukowców na Rozwój Nauk Biologicznych i Chemicznych*, 73-74. ISBN 978-83-63058-66-1. (liczba punktów MNiSW<sub>2016</sub> – 0)
5. Kwolek-Mirek M., **Maślanka R.** (2017) Akrylamid – trucizna XXI wieku [W]: *Wybrane substancje o znaczeniu biologicznym. Spojrzenie młodych naukowców. Monografia 2017*, red. Magdalena Kwolek-Mirek, Mateusz Mołoń, Kraków: Creativetime, 122-128. ISBN 978-83-63058-78-4. (liczba punktów MNiSW<sub>2017</sub> – 5)
6. Zadrag-Tęcza R., **Maślanka R.**, Bednarska S., Kwolek-Mirek M. (2018) Response Mechanisms to Oxidative Stress in Yeast and Filamentous Fungi. [W]: *Stress Response Mechanisms in Fungi: Theoretical and Practical Aspects* / edited by Marek Skoneczny, Springer Nature, 1-34. ISBN: 978-3-030-00682-2. (liczba punktów MNiSW<sub>2018</sub> – 5)
7. Kwolek-Mirek M., **Masłanka R.**, Molon M. (2018) Disorders in NADPH generation via pentose phosphate pathway influence the reproductive potential of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast due to changes in redox status. *Journal of Cellular Biochemistry*, DOI: 10.1002/jcb.28140. (IF<sub>2017</sub> – 2,959; liczba punktów MNiSW<sub>2017</sub> – 30)

**Konferencje naukowe**

## KONFERENCJE MIĘDZYNARODOWE

1. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R., Kwolek-Mirek K. Poster: *The effect of acrylamide on the level of oxidative damage to proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae** // 5<sup>th</sup> International Scientists Conference „Human-Nutrition-Environment” BIOTECHNOLOGY FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT, 24 -25.04.2014 r., Rzeszów, Polska.
2. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R., Biliński T. Poster: *Proliferative capacity and the metabolic rate of the yeast *Saccharomyces cerevisiae** // BIO 2014 CONGRESS 1st Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics, 09-12.09.2014 r., Warszawa, Polska.
3. **Maślanka R.**, Kwolek-Mirek M. Referat: *Toxicity of acrylamide and ways of its abolition in the yeast *Saccharomyces cerevisiae** // International Scientific Conference „Microorganisms in detoxification of heavy metals and xenobiotics”, 28.09-01.10.2014 r., Krasieczyn, Polska.
4. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R. Poster: *Connection between mitochondria and vacuoles is not ATP-depended* // International Student Conference of Cell Biology, 01-02.04.2016 r., Kraków, Polska.
5. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R. Poster: *Autofluorescence in biological samples and its influence on obtained results* // 1<sup>st</sup> Meeting of Young Researchers from V4 Countries, 20.04.2016 r., Rzeszów, Polska.
6. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R. Poster: *Effect of glucose concentration and glucose uptake on the cell metabolism* // 6<sup>th</sup> International Young Scientists Conference HUMAN NUTRITION ENVIRONMENT, 21-22.04.2016 r., Rzeszów, Polska.
7. Zadrąg-Tęcza R., **Maślanka R.** Poster: *Cellular energy metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* grown in conditions of restriction and excess of glucose* // FUTURE OF AGEING CONFERENCE 10<sup>th</sup> European Congress of Biogerontology and 6<sup>th</sup> Biogerontological Meeting at the Nencki Institute, 23-24.09. 2016 r., Warszawa, Polska.
8. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R. Poster: *The cellular proteasomal system activity in condition of restriction or excess of glucose* // FUTURE OF AGEING CONFERENCE 10<sup>th</sup> European Congress of Biogerontology and 6<sup>th</sup> Biogerontological Meeting at the Nencki Institute, 23-24.09.2016 r., Warszawa, Polska.

9. **Maślanka R.**, Kwolek-Mirek M., Zadrąg-Tęcza R. Poster: *Non-mitochondrial sources of reactive oxygen species in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* growing on the fermentation preferable conditions* // III International Scientific Conference Oxygenalia 2016 THE FACES OF OXYGEN, 18-19.11.2016 r., Kraków, Polska.
10. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R. Poster: *Metabolic trade-off between fermentation aerobic respiration and biomass production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae** // III International Conference of Cell Biology, 26-27.05.2017 r., Kraków, Polska.

#### KONFERENCJE KRAJOWE

11. **Maślanka R.**, Kwolek K., Zadrąg-Tęcza R., Kwolek-Mirek K. Poster: *Toksyczność akrylamidu i sposoby jej znoszenia w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae** // Konferencja Młodych Naukowców - Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki, 11.01.2014 r., Kraków, Polska.
12. Zadrąg-Tęcza R., **Maślanka R.**, Żyracka E., Kwolek-Mirek M. Poster: *Uszkodzenia białek powodowane przez akroleinę i akrylamid w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae** // Konferencja szkoleniowo-naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego „Człowiek, żywność, środowisko – problemy współczesnej toksykologii”, 16-19.09.2014 r., Olsztyn, Polska.
13. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R. Referat: *Morfologiczne i fizjologiczne efekty mutacji genów homologicznych kodujących białka rybosomalne w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae** // Ogólnopolska Konferencja Studentów i Doktorantów: Kierunki Przyrodnicze i Medyczne, 22-23.11.2014 r., Lublin, Polska.
14. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R., Kwolek-Mirek M. Referat: *Akrylamid – toksyczny składnik żywności* // Pierwsze Rzeszowskie Spotkanie Naukowe pt. „Spotkanie z toksykologią”, 28.11.2014 r., Rzeszów, Polska.
15. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R. Poster: *Zawartość glukozy w podłożu a tempo metabolizmu i poziom wewnątrzkomórkowych uszkodzeń w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae** // Konferencja Młodych Naukowców: Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki, 06.12.2014 r., Kraków, Polska.
16. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R. Referat: *Delecja genów kodujących białka rybosomalne a wielkość komórki, tempo wzrostu i poziom zużycia glukozy przez komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae** // IV Konferencja Biologii Molekularnej, 26-28.03.2015 r., Łódź, Polska.

17. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R. Referat: *Analiza efektów delekcji paralogów kodujących białka rybosomalne w komórkach drożdży Saccharomyces cerevisiae* // Wyzwania Naukowców We Współczesnym Świecie, 29.06.2015 r., Częstochowa, Polska.
18. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R. Poster: *Odmiennosc paralogów na przykładzie efektów delekcji genów kodujących białka rybosomalne w komórkach drożdży Saccharomyces cerevisiae* // Konferencja Młodych Naukowców: Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki, 05.12.2015 r., Kraków, Polska.
19. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R. Poster: *Fermentacja w obecności tlenu a obecność funkcjonalnych mitochondriów w komórkach drożdży Saccharomyces cerevisiae* // V Konferencja Biologii Molekularnej, 07-09.04.2016 r., Łódź, Polska.
20. **Maślanka R.**, Zadrąg-Tęcza R. Referat: *Glukoza jako regulator metabolizmu komórki – konsekwencje niedoboru i nadmiaru* // Konferencja Młodych Naukowców: Spojrzenie Młodych Naukowców na Rozwój Nauk Biologicznych i Chemicznych, 22.10.2016 r., Kraków, Polska.
21. Kwolek-Mirek M., **Maślanka R.** Referat: *Źródła NADPH w komórkach drożdży Saccharomyces cerevisiae* // Konferencja Młodych Naukowców BIOLOGIA, CHEMIA I ŚRODOWISKO: Spojrzenie Młodych Naukowców na Rozwój Badań, 09.12.2017 r., Kraków, Polska.

#### **Udział w projektach badawczych**

1. Udział w realizacji badań jako wykonawca w ramach grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki o numerze 2013/09/B/NZ3/01352 pt. „Replikacyjne a chronologiczne starzenie się drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”. Kierownik grantu: prof. dr hab. Tomasz Biliński a następnie dr hab. Renata Zadrąg-Tęcza, prof. UR.
2. Realizacja wydziałowego grantu badawczego „Dotacja dla młodych naukowców” przyznanego na rok 2015. Dotacja celowa na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich finansowanych w wewnętrznym trybie konkursowym.
3. Realizacja wydziałowego grantu badawczego „Dotacja dla młodych naukowców” przyznanego na rok 2016. Dotacja celowa na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich finansowanych w wewnętrznym trybie konkursowym.

4. Realizacja wydziałowego grantu badawczego „Dotacja dla młodych naukowców” przyznanego na rok 2017. Dotacja celowa na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich finansowanych w wewnętrznym trybie konkursowym.

**Podsumowanie dorobku naukowego**

- Całkowita liczba publikacji naukowych – **11**
- Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism *impact factor* IF, w których ukazały się wszystkie publikacje doktoranta, zgodnie z rokiem opublikowania – **12,192**
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW – **164**

**PUBLIKACJE WCHODZĄCE**  
**W SKŁAD ROZPRAWY**  
**DOKTORSKIEJ**

**WRAZ Z SUPLEMENTAMI**

# **Wybrane substancje o znaczeniu biologicznym - spojrzenie młodych naukowców**

*Redakcja  
Magdalena Kwolek-Mirek  
Mateusz Mołoń*

**Monografia 2017**

**Wydawca: CREATIVETIME**

**Kraków 2017**

**Redaktorzy opracowania:**

*Dr Magdalena Kwolek-Mirek*

*Dr Mateusz Mołoń*

**Zdjęcia na okładce:**

*Dr Magdalena Kwolek-Mirek*

**Projekt graficzny okładki:**

*Dr inż. Marcin Kuczera*

**Skład tekstów i korekty:**

*Dr Magdalena Kwolek-Mirek, Dr inż. Marcin Kuczera*

**Recenzenci opracowania:**

*Dr hab. Grzegorz Chrzanowski, prof. UPH*

*Dr hab. Roma Durak, prof. UR*

**Recenzenci poszczególnych rozdziałów wydania:**

*Prof. dr hab. Magdalena Bryś; Prof. dr hab. n. med. Wojciech Piekoszewski;*

*Dr hab. Ewelina Hallmann; Dr hab. Katarzyna Szymczyk;*

*Dr hab. Renata Zadrąg-Tęcza; Dr hab. Roma Durak, prof. UR;*

*Dr hab. Tadeusz Librowski, prof. UJ; Dr inż. Alicja Wodnicka;*

*Dr inż. Anita Woźny; Dr inż. Joanna Kisala; Dr inż. Joanna Perłowska;*

*Dr Agnieszka Panek; Dr Alicja Wzorek; Dr n. med. Anna Cioczek-Czuczwar;*

*Dr n. med. Anna Sęk-Martej; Dr Dorota Grabek-Lejko; Dr hab. Alicja Boryło;*

*Dr Kamil Jurowski; Dr n. med. Karolina Szewczyk-Golec;*

*Dr Katarzyna Kowalska; Dr n. farm. Łukasz Szeleszczuk; Dr Sabina Galiniak*

**Monografia zawiera recenzowane prace naukowe młodych naukowców, współpracujących z CreativeTime. Skład wykonano na podstawie dostarczonych przez autorów tekstów. Wszystkie teksty zostały opublikowane na odpowiedzialność ich autorów. Za treść odpowiadają autorzy poszczególnych tekstów.**

**Dziękujemy wszystkim młodym naukowcom za współpracę.**

**Dziękujemy wszystkim opiekunom naukowym (promotorom prac doktorskich) za wsparcie dla młodych naukowców.** Wszyscy młodzi naukowcy i opiekunowie naukowcy, którym dziękujemy wymienieni zostali w poszczególnych rozdziałach niniejszego opracowania.

**Dziękujemy recenzentom prac naukowych** za poświęcenie swojego cennego czasu i wystawienie pozytywnych recenzji.

ISBN 978-83-63058-78-4

Wydawca:

CREATIVETIME, [www.creativetime.pl](http://www.creativetime.pl)

[biuro@creativetime.pl](mailto:biuro@creativetime.pl)

Nakład 70 egzemplarzy (książka drukowana)

**Wydanie I**

## **15. Glukoza – substancja o istotnym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania komórki i organizmu**

*Roman Maślanka, Renata Zadrąg-Tęcza*

### **15.1. Glukoza w ujęciu chemicznym**

Glukoza o wzorze chemicznym  $C_6H_{12}O_6$  jest najszerszej rozpowszechnionym w przyrodzie węglowodanem wyizolowanym po raz pierwszy z rodzynek w 1747 roku przez Andreeasa Marggrafa [Shendurse, Khedkar 2016]. Nazewnictwo węglowodanów, pomimo iż jest powszechnie używane, jest określeniem historycznym odnoszącym się do pierwotnego założenia, iż glukoza uważana była za „hydrat węgla  $C_6(H_2O)_6$ ”. Obecna klasyfikacja chemiczna zalicza glukozę do polihydroksylowanych aldehydów. Dzięki obecności aldehydowej grupy funkcyjnej zaliczana jest do aldoz, natomiast obecność 6 atomów węgla klasyfikuje ją jako heksozę [McMurry 2003]. Specyficzna budowa cząsteczki glukozy wyrażająca się jednoczesną obecnością różnych grup funkcyjnych determinuje jej właściwości fizyko-chemiczne oraz wysoką reaktywność. Istotna jest zwłaszcza wewnątrzcząsteczkowa reakcja pomiędzy grupą aldehydową a grupą hydroksylową prowadząca do powstania pierścieniowej formy glukozy. Powstawanie takiej formy glukozy umożliwia jej łączenie się z kolejnymi cząsteczkami monosacharydów za pomocą wiązań glikozydowych, prowadzące do powstania dwucukrów lub polisacharydów. Przykładami takich polimerów są polisacharydy mające istotne znaczenie dla funkcjonowania organizmów, jak glikogen i skrobia pełniące funkcje zapasowe, bądź celuloza pełniąca funkcje strukturalne [Berg i in. 2002; McMurry 2003]. Warto jednak podkreślić, że glukoza w formie monosacharydu stanowi podstawowy substrat energetyczny oraz źródło szkieletu węglowego do produkcji makromolekuł w każdej żywej komórce. Stąd też wykorzystanie polisacharydów przez organizm musi być poprzedzone ich rozkładem i przekształceniem do cząsteczki glukozy lub jej pochodnych, włączanych do wewnątrzkomórkowych szlaków metabolicznych. Glukoza jest też bardzo dobrze rozpuszczalna w środowisku wodnym, co zawdzięcza atomom tlenu (obecnym w grupach hydroksylowych) oddziałującym z molekułami wody. Cecha ta jest jedną z ważniejszych cech fizycznych glukozy, bowiem biorąc pod uwagę charakter cytoplazmy jako wodnego roztworu, umożliwia jej transport do wnętrza komórek [Berg i in. 2002; Shendurse, Khedkar 2016].

### **15.2. Rola glukozy w metabolizmie komórkowym**

Glukoza stanowi podstawowy substrat energetyczny każdej komórki, przy czym może ona dostarczać różną liczbę cząsteczek ATP, w zależności od typu procesu katabolicznego tj. fermentacji bądź oddychania tlenowego. Jednak niezależnie od tego czy komórka przeprowadza proces fermentacji czy oddychania tlenowego, pierwszym etapem przekształcenia glukozy jest szlak glikolizy. Szlak ten stanowi ciąg 10 reakcji enzymatycznych zachodzących na terenie cytoplazmy wszystkich komórek, zarówno eukariotycznych jak i prokariotycznych. W wyniku glikolizy cząsteczka glukozy zostaje przekształcona do dwóch cząsteczek pirogronianu a zysk energetyczny netto tego procesu wynosi 2 cząsteczki ATP, a ponadto dochodzi także do wytworzenia 2 cząsteczek NADH w wyniku redukcji  $NAD^+$ . Rodzaj przekształceń, którym w dalszych etapach podlega wytworzony w glikolizie pirogronian zależy zarówno od rodzaju komórek, jak i warunków środowiska. Najczęściej w warunkach tlenowych pirogronian zostaje przekształcony do acetylo-CoA, który wykorzystywany jest dalej w cyklu Krebsa do wytworzenia NADH i  $FADH_2$  niezbędnych do syntezy ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej. W wyniku tych przemian sumaryczny zysk energetyczny całkowitego utlenienia jednej cząsteczki

glukozy w warunkach tlenowych wynosi 30 cząsteczek ATP, dzięki czemu oddychanie tlenowe jest procesem o najwyższej wydajności biorąc pod uwagę bilans energetyczny komórki. W warunkach beztlenowych lub w sytuacji ograniczonej ilości tlenu powstały podczas glikolizy NADH musi zostać utleniony do formy  $\text{NAD}^+$ , co warunkuje dalszy przebieg glikolizy. Proces ten nazywany jest fermentacją a utlenieniu NADH towarzyszy redukcja pirogronianu do kwasu mlekowego lub etanolu w zależności od typu fermentacji [Berg i in. 2002]. Szczególny typ fermentacji alkoholowej wykazują drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, u których jest ona głównym sposobem pozyskiwania energii nawet w sytuacji pełnej dostępności tlenu w środowisku. Zjawisko to znane powszechnie jako efekt Crabtree jest uwarunkowane wysokimi stężeniami glukozy w podłożu powodującymi represję genów kodujących białka uczestniczące w oddychaniu tlenowym [Rodrigues i in. 2006; Rodico, Heinisch 2009]. Uzyskiwanie energii głównie na drodze glikolizy w warunkach tlenowych nie jest wyłącznie domeną mikroorganizmów. Podobną sytuację zaobserwowano również w przypadku komórek nowotworowych, które charakteryzuje obniżone tempo fosforylacji oksydacyjnej przy jednocześnie wysokiej produkcji mleczanu, zwiększona aktywność glikolizy i podwyższona ekspresja błonowych transporterów glukozy. Efekt ten zwany od nazwiska jego odkrywcy efektem Warburga wskazuje, iż komórki nowotworowe uzyskują ATP w głównej mierze dzięki fermentacji [Warburg 1956; Diaz-Ruiz i in. 2011]. Wybór procesu mniej efektywnego pod względem liczby wytworzonych cząsteczek ATP wydaje się być paradoksem, szczególnie w przypadku komórek intensywnie proliferujących, mających duże zapotrzebowanie energetyczne wynikające z konieczności powielenia informacji genetycznej oraz syntezy makrocząsteczek. Nie jest to jednak sytuacja wyjątkowa bowiem ostatnie badania prowadzone na komórkach macierzystych wykazały, że metabolizm tych komórek również oparty jest głównie na glikolizie [Rafalski i in. 2012; Hu i in. 2016]. Ten swoisty paradoks stanowi jedną z ważniejszych kwestii metabolicznych poruszanych w ciągu ostatnich kilku lat, a obecnie próbuje się go tłumaczyć na kilka sposobów [Vander Heiden i in. 2009; Nilsson, Nielsen 2016; Hu i in. 2016]. Po pierwsze niedostateczna produkcja ATP jest problemem jedynie w sytuacji obniżonej dostępności składników odżywczych [Vander Heiden i in. 2009]. Co więcej, pomimo niewielkiej ilości ATP generowanej w trakcie glikolizy proces ten może być równie wydajny co oddychanie tlenowe, a to ze względu na znacznie mniejsze „koszty inwestycyjne”, które ponosi komórka dla wygenerowania odpowiedniej ilości energii. Dotyczy to głównie mniejszej liczby białek zaangażowanych w procesie glikolizy w stosunku do liczby białek wymaganych w procesie fosforylacji oksydacyjnej w celu wytworzenia pojedynczej cząsteczki ATP [Nilsson, Nielsen 2016]. Kolejne bardzo istotne wyjaśnienie dotyczy innej, często pomijanej roli glukozy, bowiem może ona stanowić nie tylko źródło energii, ale także składnik zapewniający szkielet węglowy wykorzystywany do biosyntezy wielu makromolekuł komórki [Somsen i in. 2000; Vander Heiden i in. 2009]. Ze względu na to, że proliferacja komórek wymaga syntezy dużej ilości nukleotydów, aminokwasów, lipidów oraz kofaktorów reakcji enzymatycznych, przekształcenie całej dostępnej dla komórki ilości glukozy do dwutlenku węgla na drodze oddychania tlenowego byłoby nieefektywne, biorąc pod uwagę możliwość jej wykorzystania jako substratu dla biosyntezy [Vander Heiden i in. 2009]. Wykorzystanie glukozy jako substratu do biosyntezy makromolekuł zapewnia szlak pentozofosforanowy. Podstawowym zadaniem tego szlaku jest wytworzenie rybozo-5-fosforanu (niezbędnego do syntezy nukleotydów), NADPH (biorącego udział w syntezie kwasów tłuszczowych i utrzymaniu komórkowej puli zredukowanego glutationu), a także umożliwienie syntezy aminokwasów aromatycznych. Szlak ten rozpoczyna się od przekształcenia glukozy-6-fosforanu przez co ściśle wiąże się ze szlakiem glikolizy. Związek między tymi szlakami jeszcze bardziej podkreśla działalność enzymów transaldolazy i transketolazy,

które w zależności od potrzeb metabolicznych komórki przekształcają rybozo-5-fosforan w związki włączane do glikolizy, bądź odwrotnie wykorzystują jako substraty do biosyntezy intermediaty glikolityczne powstałe na dalszych etapach glikolizy [Berg i in. 2002; Rodrigues i in. 2006; Rodico, Heinisch 2009].

### 15.3. Rola glukozy w organizmie człowieka

Prawidłowe działanie komórek a przez to i całego organizmu zależne jest od ich statusu energetycznego, a ten z kolei wymaga dostępności składników odżywczych. Odpowiada za to m.in. układ krążenia, którego jedną z funkcji jest rozprowadzanie glukozy stanowiącej łatwo metabolizowany substrat energetyczny. We krwi zdrowego człowieka stężenie glukozy na czczo waha się w granicach 3,5-5,5 mmol/l [Shendurse, Khedkar 2016]. Za utrzymanie takiego poziomu glukozy we krwi odpowiada szereg procesów metabolicznych, mających szczególne znaczenie zwłaszcza w okresach głodu lub intensywnego wysiłku. Jednym z ważniejszych jest zachodząca w wątrobie glukoneogeneza, podczas której dochodzi do syntezy glukozy z produktów przemian innych szlaków metabolicznych m.in. mleczanu, pirogronianu, glicerolu i pochodnych aminokwasów. Ważną rolę odgrywa także glikogenoliza polegająca na rozpadzie glikogenu, który w sytuacji nadmiaru glukozy gromadzony jest w mięśniach i wątrobie jako rezerwa energetyczna [Berg i in. 2002]. Odpowiedni poziom glukozy we krwi jest szczególnie ważny dla utrzymania prawidłowej aktywności komórek nerwowych. Wynika to z faktu, iż glukoza pomimo tego, że stanowi jedyne źródło energii dla tych komórek nie może być w nich magazynowana. Spośród wszystkich organów mózg wykazuje najwyższe zapotrzebowanie na glukozę, co wymusza konieczność jej ciągłego dostarczania dla utrzymania prawidłowego funkcjonowania tego narządu. Jest to na tyle istotne, że pobieranie glukozy w neuronach odbywa się dzięki transporterom błonowym GLUT3, które wykazują zarówno większe powinowactwo do glukozy, jak też kilkukrotnie wyższą wydajność jej transportu w stosunku do pozostałych transporterów glukozy. Wysoka wydajność transportu glukozy prowadzonego dzięki transporterom GLUT3 tłumaczy także ich obecność w komórkach o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym, m.in. w plemnikach, komórkach embrionalnych i komórkach tworzących łożysko [Simpson i in. 2008; Zoidis, Papamikos 2016]. Warto również wspomnieć, że glukoza w mózgu może ulegać przekształceniu do fruktozy, która z kolei może mieć wpływ na ekspresję genów, w tym genów kontrolujących metabolizm. Tego typu przekształcenie odbywa się na drodze szlaku polioliowego przebiegającego z wytworzeniem sorbitolu jako produktu pośredniego [Hwang i in. 2017]. Istotnym odbiorcą dostępnej puli glukozy w organizmie człowieka są również komórki mięśni szkieletowych, które wychwytyują glukozę dzięki obecności transporterów GLUT4, podobnie jak adipocyty. Aktywność transporterów tego typu jest uzależniona od poziomu insuliny, co powoduje że zarówno komórki mięśni szkieletowych jak i komórki tkanki tłuszczowej mogą aktywnie reagować na zmiany stężenia glukozy w organizmie. W sytuacji nadmiaru energetycznego nadwyżka glukozy jest aktywnie wychwytywana przez komórki mięśni szkieletowych i zamieniana na glicerol, natomiast w adipocytach zużywana do produkcji kwasów tłuszczowych. Co więcej, w komórkach mięśniowych w trakcie intensywnego wysiłku fizycznego, prowadzącego do niedotlenienia, dochodzi do nagromadzenia mleczanu, stanowiącego produkt uboczny regeneracji  $NAD^+$ . Jednakże w oparciu o cykl przemian określanych cyklem Corich powstały mleczan jest transportowany do wątroby gdzie podlega przekształceniu do glukozy, która powracając do krwioobiegu może być wtórnie wykorzystywana [Berg i in. 2002; Herman, Kahn 2006; Zoidis, Papamikos 2016]. Rozpatrując rolę różnych organów w regulacji homeostazy glukozy warto podkreślić także znaczenie wątroby, na które wskazuje fakt, iż 2/3 dostającej się do krwi glukozy jest w niej zatrzymywane.

Glukoza zatrzymana w hepatocytach podlega szybkiemu ufosforylowaniu, głównie dzięki działalności heksokinazy, do glukozy-6-fosforanu, który następnie jest przekształcany do glikogenu, bądź służy do syntezy kwasów tłuszczowych i cholesterolu. Z kolei w sytuacji niedoborów energetycznych, komórki wątroby wyrzucają do krwioobiegu cząsteczki glukozy powstające w skutek glikogenolizy bądź glukoneogenezy [Berg i in. 2002; Zoidis, Papamikos 2016]. Utrzymanie homeostazy glukozy wymaga zarówno komunikacji, jak i współdziałania poszczególnych organów. Istotną rolę w tej komunikacji odgrywają cząsteczki sygnałowe takie jak insulina, adiponektyna i lektyna, a także sama glukoza oraz jej metabolity [Herman, Kahn 2006; Rosen, Spiegelman 2006]. Ponadto homeostaza glukozy zależy także od działania zegara biologicznego zlokalizowanego w obszarze podwzgórza tuż nad skrzyżowaniem nerwów wzrokowych. Dzięki swojej lokalizacji ośrodek ten umożliwia synchronizację metabolizmu względem aktualnej pory dnia za pośrednictwem sygnałów docierających z siatkówki i informujących o ilości światła. Działalność zegara biologicznego koordynuje m.in. występowanie cyklicznych dobowych wahań stężenia glukozy we krwi, w tym występowanie charakterystycznego dla godzin porannych wysokiego stężenia glukozy, któremu nie towarzyszy zwiększenie wydzielania insuliny, co powszechnie nazywane jest „fenomenem świtu”. Przyjmuje się, że za utrzymanie homeostazy glukozy i regulację rytmu okołodobowego odpowiada oreksyna. Działanie tego neuropeptydu stymuluje pobudzanie neuronów układu współczulnego, co zwiększa syntezę glukozy w wątrobie oraz jej pobieranie przez mięśnie. Istnienie zegara biologicznego ma głęboki sens ewolucyjny ponieważ warunkuje wzajemną relację między dostępnością światła, aktywnością fizyczną i pobieraniem pokarmu. Jednakże, panujący obecnie w społeczeństwie konsumpcyjny styl życia, dłuższa aktywność dobową ludzi oraz coraz powszechniejsze zjawisko tzw. „zanieczyszczenia świetlnego” zakłócają funkcjonowanie zegara biologicznego, co w konsekwencji zaburza wiele procesów metabolicznych, w tym utrzymanie homeostazy glukozy [Kalsbeek i in. 2010; Chrościcki i in. 2013].

#### **15.4. Zaburzenia homeostazy glukozy a rozwój chorób metabolicznych**

Zaburzenie homeostazy glukozy następuje w wyniku nieprawidłowej gospodarki energetycznej ustroju. Prowadzi to najczęściej do wzrostu stężenia glukozy we krwi co określane jest mianem hiperglikemii. Utrzymujące się podwyższone stężenie glukozy we krwi prowadzi do zaburzenia funkcji komórek, a także uszkodzenia i niewydolności wielu narządów. Zaobserwowano, że wysokie stężenie glukozy jest przyczyną zaburzenia regulacji wzrostu i podziałów komórek co może prowadzić do hipertrofii, zmiany kształtu i wakuolaryzacji, powodując w konsekwencji zahamowanie ich zdolności do proliferacji [Morocutti i in. 1996; Liu i in. 2012]. Wysokie stężenie glukozy we krwi prowadzi także do nasilenia zjawiska glikacji białek, polegającego na nieenzymatycznej reakcji glukozy z grupami aminowymi białek. Skutkiem tego jest powstawanie stabilnych, końcowych produktów glikacji (AGEs), które ze względu na połączenia krzyżowe występujące między nimi przestają być podatne na degradację proteolityczną. Należy przy tym zaznaczyć, iż proces glikacji jest procesem długotrwałym, stąd też podlegają mu głównie białka o długim okresie półtrwania jak kolagen czy białka soczewki oka [Suji, Sivakami 2004]. Równie powszechną konsekwencją wysokiego poziomu glukozy jest indukcja stresu oksydacyjnego obserwowana w różnego typu komórkach [Gupte 2010; Yu i in. 2016]. Przy czym źródłem reaktywnych form tlenu (RFT) generowanych w odpowiedzi na hiperglikemię jest zarówno ich mitochondrialna produkcja będąca efektem dysfunkcji mitochondriów, jak też pozamitochondrialna generacja związana z aktywnością oksydaz NADPH [Newsholme i in. 2007; Gupte 2010]. Poza zwiększoną generacją RFT, może dochodzić również do zaburzenia stanu redoks komórki m.in. jako efekt zmniejszenia ilości

NADPH. Komórkowa ilość NADPH może być obniżana m.in. poprzez nasiloną aktywację szlaku polioliowego oraz wzmożoną aktywność enzymów wchodzących w skład tego szlaku tj. reduktazy aldozy i dehydrogenazy sorbitolu. Szlak ten odpowiada za przekształcenie glukozy do fruktozy, a wzrost jego aktywności jest obserwowany w warunkach hiperglikemii [Koziańska-Rościszewska 2001; Singleton i in. 2003; Mrowicka 2011]. Prowadzi to do gromadzenia sorbitolu oraz fruktozy, które słabo przenikają przez błony komórkowe, co z kolei może prowadzić do uszkodzenia tkanek. Szczególnie niekorzystne jest odkładanie się produktów tego szlaku w aksonach obwodowego układu nerwowego, doprowadzające do ich demielinizacji i rozwoju neuropatii [Koziańska-Rościszewska 2001; Mrowicka 2011]. Ponadto spowodowany hiperglikemią wzrost stężenia RFT może przyczynić się także do rozwoju chorób kardiowaskularnych i naczyniowych m.in. ze względu na miejscowe uszkodzenia śródbłonna i obniżenie stężenia tlenu azotu, co upośledza prawidłowe rozszerzanie naczyń krwionośnych [Singleton i in. 2003].

Pomimo licznych negatywnych konsekwencji wynikających z nieprawidłowości w utrzymaniu homeostazy glukozy, jej kluczowym efektem jest zaburzenie mechanizmu działania insuliny prowadzące do rozwoju cukrzycy typu 2. Insulina jest białkowym hormonem wydzielanym przez komórki  $\beta$  wysp trzustkowych w odpowiedzi na obecność glukozy, a jej odkrycie stanowi jedno z ważniejszych osiągnięć medycyny XX wieku. Zadaniem insuliny jest utrzymanie właściwego stężenia glukozy we krwi oraz kontrola procesów przemian białek i tłuszczów. Wpływ insuliny na utrzymanie prawidłowego poziomu glukozy we krwi odbywa się głównie poprzez zwiększenie transportu glukozy do wnętrza komórek, gdzie zostaje ona przekształcona do glikogenu lub kwasów tłuszczowych, przy jednoczesnym hamowaniu procesów ich rozpadu i uwalniania do krwiobiegu. Mechanizm sekrecji insuliny indukowany obecnością glukozy jest niezwykle precyzyjny i ma charakter wieloetapowego procesu angażującego kilka szlaków metabolicznych komórki. Po pobraniu glukozy do wnętrza komórek  $\beta$  wysp trzustkowych, dzięki działalności błonowego transportera GLUT2, jest ona fosforylowana w wyniku działania specyficznej glukokinazy. Powoduje to gwałtowny wzrost aktywności szlaku glikolizy, proporcjonalny do zewnątrzkomórkowego stężenia glukozy. Skutkuje to wzrostem produkcji ATP oraz zwiększeniem stosunku ATP/ADP na terenie cytoplazmy. To z kolei prowadzi do zamykania błonowego kanału potasowego regulowanego przez ATP, powodując depolaryzację błony komórkowej i napływ do wnętrza komórki jonów  $Ca^{2+}$ . Ostatecznie wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $Ca^{2+}$  aktywuje kinazy białkowe uczestniczące w sekrecji insuliny [Herman, Kahn 2006; Newsholme i in. 2007]. Jednak, w przypadku rozwoju cukrzycy typu 2, wydzielana w ten sposób insulina nie spełnia swojej podstawowej funkcji polegającej na obniżaniu stężenia glukozy we krwi. Przyczyną tego zaburzenia jest insulinooporność, określaną jako stan, w którym komórki wykazują obniżoną wrażliwość na działanie insuliny i pobierają zbyt małą ilość glukozy z krwi. Powoduje to przedłużające się stany hiperglikemii, co zmusza organizm do wzmożonej produkcji insuliny (hiperinsulinemia). Efekt tego działania jest jednak krótkotrwały, bowiem w dłuższej perspektywie czasu prowadzi do odkładania tłuszczu w adipocytach i komórkach wątroby, zwiększenia ciśnienia krwi, rozwoju miażdżycy i chorób kardiowaskularnych. Ponadto stale zwiększona produkcja insuliny prowadzi z czasem do przeeksplataowania i wyniszczenia komórek trzustki, co w rezultacie powoduje zahamowanie produkcji hormonalnej skutkujące hipoinsulinemią, czyli bardzo niskim stężeniem insuliny we krwi [Kahn 1994]. Według danych epidemiologicznych problem cukrzycy typu 2 jest niezwykle powszechny, bowiem aż 415 mln ludzi w 2015 roku chorowało na cukrzycę, a szacunkowe dane prognostyczne wskazują, że liczba osób chorych może wzrosnąć do ok. 650 mln w roku 2040 [IDF Diabetes Atlas 2015]. Do czynników odpowiedzialnych za pojawienie się cukrzycy należą czynniki genetyczne, brak

snu zaburzający działanie zegara biologicznego oraz postępujące wraz z wiekiem upośledzenie tolerancji glukozy. Jednak nie mniej istotny dla rozwoju tego schorzenia jest także nadmiar substancji energetycznych dostarczanych do organizmu, co może prowadzić również do otyłości. Biorąc pod uwagę powyższe aspekty kluczową rolę dla rozwoju cukrzycy wydaje się odgrywać ilość dostarczanych wraz z pożywieniem węglowodanów. Pośrednio związek ten znajduje potwierdzenie w obserwacji zależności między wzrostem globalnej epidemii otyłości i cukrzycy a stale rosnącą konsumpcją cukrów prostych, w tym także syropu glukozowo-fruktozowego o wysokiej zawartości fruktozy [Bray i in. 2004]. W związku z tym jednym ze sposobów zapobiegania zarówno cukrzycy, jak i zaburzeniom metabolicznym z nią związanych jest stosowanie diety o zredukowanej ilości produktów o wysokim indeksie glikemicznym oraz racjonalne odżywianie, zgodne z indywidualnym zapotrzebowaniem energetycznym. Skuteczność tego typu działań potwierdzają obserwacje i badania dotyczące diety śródziemnomorskiej o udowodnionym prozdrowotnym działaniu, jak i restrykcji kalorycznej, którą powszechnie uważa się za jeden z najskuteczniejszych sposobów prowadzących do wydłużenia i poprawy jakości życia organizmów.

Kluczowe znaczenie glukozy w utrzymaniu potencjału energetycznego i poziomu biosyntezy komórki skłania do podejmowania działań w kierunku pełniejszego zrozumienia mechanizmu zależności między poziomem glukozy, komórkowymi szlakami metabolicznymi a kontrolą wzrostu wielkości komórki. Jest to szczególnie ważne dla rozwoju wiedzy dotyczącej biochemicznych i fizjologicznych podstaw funkcjonowania komórki.

#### Literatura:

- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.** 2002. *Biochemistry*. 5th Edn. W.H. Freeman. New York.
- Bray G.A., Nielsen S.J., Popkin B.M.** 2004. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 79: 537-543.
- Chrościcki P., Usarek M., Bryła J.** 2013. Znaczenie zegara biologicznego w utrzymaniu homeostazy glukozy. *Postepy Hig Med Dosw.* 67: 569-583.
- Diaz-Ruiz R., Rigoulet M., Devin A.** 2011. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta.* 1807: 568-576.
- Gupte S.A.** 2010. Targeting the Pentose Phosphate Pathway in Syndrome X-related Cardiovascular Complications. *Drug Dev Res.* 71: 161-167.
- Herman M.A., Kahn B.B.** 2006. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J Clin Invest.* 116: 1767-1775.
- Hu C., Fan L., Cen P., Chen E., Jiang Z., Li L.** 2016. Energy Metabolism Plays a Critical Role in Stem Cell Maintenance and Differentiation. *Int J Mol Sci.* 17: 253.
- Hwang J.J., Jiang L., Hamza M., Dai F., Belfort-DeAguiar R., Cline G., Rothman D.L., Mason G., Sherwin R.S.** 2017. The human brain produces fructose from glucose. *JCI Insight*, 2: e90508; doi: 10.1172/jci.insight.90508.
- International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas seventh edition.** 2015. Brussels. Available at: <http://www.diabetesatlas.org>
- Kahn C.R.** 1994. Insulin Action, Diabetogenesis, and the Cause of Type II Diabetes. *Diabetes.* 43: 1066-1084.
- Kalsbeek A., Yi C.X., La Fleur S.E., Fliers E.** 2010. The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab,* 21: 402-410.
- Koziarska-Rościszewska M.** 2001. Wczesna diagnostyka neuropatii cukrzycowej i prewencja amputacji kończyn dolnych, u chorych na cukrzycę, w warunkach praktyki

lekarza POZ, ze szczególnym uwzględnieniem monofilamentu nylonowego (Semmes-Weinstein) 5.07/10. *Medycyna Rodzinna*. 3-4: 148-154.

**Liu L., Hu X., Cai G.Y., Lv Y., Zhuo L., Gao J.J., Cui S.Y., Feng Z., Fu B., Chen X.M.** 2012. High glucose-induced hypertrophy of mesangial cells is reversed by connexin43 overexpression via PTEN/Akt/mTOR signaling. *Nephrol Dial Transplant*. 27: 90-100.

**McMurry J.** 2003. *Chemia organiczna*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa. Tom 4, 5. 1015-1059, 1175-1214.

**Morocutti A., Earle K.A., Sethi M., Piras G., Pal K., Richards D., Rodemann P., Viberti G.** 1996. Premature senescence of skin fibroblasts from insulin-dependent diabetic patients with kidney disease. *Kidney Int*. 50: 250-256.

**Mrowicka M.** 2011. Znaczenie zaburzeń układu prooksydacyjno-antyoksydacyjnego dla etiopatologii cukrzycy. *Postepy Hig Med Dosw*. 65: 534-541.

**Newsholme P., Haber E.P., Hirabara S.M., Rebelato E.L.O., Procopio J., Morgan D., Oliveira-Emilio H.C., Carpinelli A.R., Curi R.** 2007. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol*. 583: 9-24.

**Nilsson A., Nielsen J.** 2016. Metabolic Trade-offs in Yeast are Caused by F1F0-ATP synthase. *Sci Rep*. 6: 22264.

**Rafalski V.A., Mancini E., Brunet A.** 2012. Energy metabolism and energy-sensing pathways in mammalian embryonic and adult stem cell fate. *J Cell Sci*. 125: 5597-5608.

**Rodicio R., Heinisch J.J.** 2009. Sugar metabolism by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. [w:] *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. (red.) H. König, G. Uden, J. Fröhlich. Springer. Berlin/Heidelberg. 113-134.

**Rodrigues F., Ludovico P., Leão C.** 2006. Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. [w:] *The Yeast Handbook*. (red.) G. Péter, C. Rosa. Springer. Berlin. 101-121.

**Rosen E.D., Spiegelman B.M.** 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*. 444: 847-853.

**Shendurse A.M., Khedkar C.D.** 2016. Glucose: Properties and Analysis. [w:] *The Encyclopedia of Food and Health* vol. 3, (red.) B. Caballero, P. Finglas, F. Toldrá. Oxford: Academic Press. 239-247.

**Simpson I.A., Dwyer D., Malide D., Moley K.H., Travis A., Vannucci S.J.** 2008. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 295: E242-E253.

**Singleton J.R., Smith A.G., Russell J.W., Eva L., Feldman E.L.** 2003. Microvascular Complications of Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes*. 52: 2867-2873.

**Somsen O.J., Hoeben M.A., Esgalhado E., Snoep J.L., Visser D., van der Heijden R.T., Heijnen J.J., Westerhoff H.V.** 2000. Glucose and the ATP paradox in yeast. *Biochem J*. 352: 593-599.

**Suji G., Sivakami S.** 2004. Glucose, glycation and aging. *Biogerontology*. 5: 365-373.

**Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B.** 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 324: 1029-1033.

**Warburg O.** 1956. On the origin of cancer cells. *Science*. 123: 309-314.

**Yu J., Wu Y., Yang P.** 2016. High glucose-induced oxidative stress represses sirtuin deacetylase expression and increases histone acetylation leading to neural tube defects. *J Neurochem*. 137: 371-383.

**Zoidis E., Papamikos V.** 2016. Glucose: Metabolism and Regulation. [w:] *The Encyclopedia of Food and Health* vol. 3. (red.) Caballero B., Finglas P., Toldrá F. Oxford: Academic Press. 233-239.

**Nazwa instytucji:** Uniwersytet Rzeszowski, Katedra Biochemii i Biologii Komórki

**Opiekun naukowy:** dr Renata Zadrąg-Tęcza

**Adres do korespondencji:** romekmaslanka@gmail.com

## RESEARCH ARTICLE

# Consequences of calorie restriction and calorie excess for the physiological parameters of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells

Roman Maslanka\*, Magdalena Kwolek-Mirek and Renata Zadrag-Tecza

University of Rzeszow, Faculty of Biology and Agriculture, Department of Biochemistry and Cell Biology, Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszow, Poland

\*Corresponding author: Department of Biochemistry and Cell Biology, University of Rzeszow Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszow, Poland.  
Tel. +48177855413; Fax +4817872 12 65; E-mail: [romekmaslanka@gmail.com](mailto:romekmaslanka@gmail.com)

**One sentence summary:** There is a significant relationship between external glucose concentration, cell size and ROS generation. Thus, the glucose metabolism may be considered as an important factor influencing on the cell physiology.

**Editor:** cristina mazzoni

## ABSTRACT

Glucose plays an important role in cell metabolism and has an impact on cellular physiology. Changes in glucose availability may strongly influence growth rate of the cell size, cell metabolism and the rate of generation of cellular by-products, such as reactive oxygen species. The positive effect of low glucose concentration conditions—calorie restriction is observed in a wide range of species, including the *Saccharomyces cerevisiae* yeast, yet little is known about the effect of high glucose concentrations—calorie excess. Such analysis seems to be particularly important due to recently common problem of diabetes and obesity. The effect of glucose on morphological and physiological parameters of the yeast cell was conducted using genetic alteration (disruption of genes involved in glucose signalling) and calorie restriction and calorie excess conditions. The results show a significant relationship among extracellular glucose concentration, cell size and reactive oxygen species generation in yeast cells. Furthermore, the results obtained through the use of mutant strains with disorders in glucose signalling pathways suggest that the intracellular level of glucose is more important than its extracellular concentration. These data also suggest that the calorie excess as a factor, which has a significant impact on cell physiology, requires further comprehensive analyses.

**Keywords:** glucose; calorie excess; calorie restriction; cell size; reactive oxygen species; *Saccharomyces cerevisiae*

## INTRODUCTION

To survive, organisms must constantly adapt to environmental changes, which noticeably influence their growth, metabolism and development. The rate of metabolic processes determines cell growth and proliferation. A strict coordination between these two processes influences the size of the cell. Proper cell size is in turn one of the essential factors enabling cell division (Jorgensen and Tyers 2004; Edgar and Kim 2009). This

phenomenon is even more pronounced for a microorganism such as yeast, in which the single cell is indeed the entire organism. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, coordination of growth and reproduction occurs at the end of the G<sub>1</sub> phase at the START point, because cell must reach threshold size (Hartwell et al. 1974). Recent studies show that cell size, in particular growth rate of the cell size per generation, seems to be an important parameter determining limited proliferation

capacity of the cell (Zadrag-Tecza et al. 2009; Yang et al. 2011; Biliński, Zadrag-Tecza and Bartosz 2012; Wright et al. 2013). According to the hypertrophy hypothesis, limited reproductive potential is a consequence of existence of the maximum cell size threshold, which when obtained prevents further cell cycles. However, the maximum cell size should not be regarded as a physical parameter only because cell size has also an important impact on cellular physiology (Bilinski 2012; Biliński, Zadrag-Tecza and Bartosz 2012). The link between cell size and cell proliferation capacity has been observed not only for yeast cells but also for human cell cultures. Reproductive potential of human fibroblasts and corneal epithelial cells has been reported to be inversely dependent on cell size (Angello et al. 1987; De Paiva, Pflugfelder and Li 2006).

Cell size is significantly modulated by environmental conditions, especially by availability of nutrients. One of them is glucose, which is the primary source of energy for most organisms but also provides carbon skeleton for biosynthesis of many biological molecules. Complete lack of glucose or its different concentrations have a significant influence on cellular physiology by changing the level of intracellular metabolites, stability of mRNAs, enzyme activity and gene transcription (Herman and Kahn 2006; Gancedo 2008). In the *S. cerevisiae*, glucose represses a number of genes encoding enzymes that are key for respiration. This is why yeast uses fermentation to obtain energy even under aerobic conditions—a phenomenon known as the Crabtree effect (Rodicio and Heinisch 2009; Nilsson and Nielsen 2016). A metabolic mode similar to yeast aerobic fermentation, known as a Warburg effect, is also observed in cancer cells (Warburg 1956; Diaz-Ruiz, Rigoulet and Devin 2011). Extracellular glucose uptake across cell membrane and the important role of glucose in many metabolic pathways is the main reason why cells have developed strict methods of detecting changes in the glucose level in the environment. Yeast cells have several genes whose expression results in synthesis of proteins acting as glucose transporters and glucose sensors or those that are involved in glucose metabolism and glucose intracellular signalling (Rolland, Winderickx and Thevelein 2002; Gancedo 2008; Rødkaer and Faergeman 2014). The largest group are genes encoding hexose transporters (HXT genes) (Gancedo 2008). Expression of the selected HXT genes largely depends on other plasma transmembrane proteins, such as Snf3p and Rgt2p. These genes have a similar sequence to hexose transporters but they are unable to transport glucose themselves and play the role of sensors of external glucose concentration (Rolland, Winderickx and Thevelein 2002; Gancedo 2008). Since glucose acts as a metabolism modulating molecule, cells have developed glucose-signalling pathways. One of them is the cAMP/PKA pathway that controls many cellular processes inter alia cell growth, proliferation, glycolysis or stress response. Synthesis of cAMP, which activates protein kinase A (PKA), depends on the activity of plasma membrane protein Gpr1p, coupled with the  $\alpha$ -subunit of G-protein named Gpa2p. The presence of glucose in the environment stimulates Gpr1p, which causes a switch from Gpa2p bound GDP to GTP and subsequent adenylate cyclase activation (Rolland, Winderickx and Thevelein 2002; Rødkaer and Faergeman 2014). Beside extracellular glucose detection, determination of the level of intracellular glucose is also important. It has been shown that hexokinase isoenzyme 2 – Hxk2p plays a key role in this process (Rolland, Winderickx and Thevelein 2002). Hxk2p, which is generally known as a glycolysis enzyme, has other non-metabolic functions and is involved in glucose-mediated repression of several genes (Rødkaer and Faergeman 2014). In the case of

yeast cells, the low glucose concentration in the medium is considered as a condition of calorie restriction (CR). CR is a generally accepted phenomenon that, beside yeast, extends the lifespan and improves the healthspan of organisms across a broad range of species (Colman et al. 2009; Smith, Nagy and Allison 2010; Mattison et al. 2012; Fontana and Partridge 2015). The effect of CR in improving the organism's healthspan is unquestionable and manifested inter alia by prevention of obesity, reduction of diabetes, protection against brain atrophy, cancer and cardiovascular disease (Smith, Nagy and Allison 2010; Fontana and Partridge 2015). There are several hypotheses explaining positive effects of CR, although individually none of them explains fully the entire phenomenon (Masoro 2000). Apart from improving the quality of life, CR is also regarded as a method of increasing the lifespan of organisms. However, this issue is less obvious and is still under academic debate (Colman et al. 2009; Smith, Nagy and Allison 2010; Austad 2012; Mattison et al. 2012). The most problematic in CR studies is using organisms fed ad libitum as controls (Colman et al. 2009; Austad 2012). Ad libitum supply of nutrients usually means more than the organism actually needs, in contrast to the conditions found in the natural environment. Therefore, the concept of calorie excess (CE) as a state in which the amount of nutrients is higher than would result from the actual demand of the metabolic processes seems to be equally important, albeit often overlooked (Biliński, Paszkiewicz and Zadrag-Tecza 2015; Mathers 2015). High glucose concentration in the medium, in the case of yeast cells, means the CE. Therefore, disorders in glucose sensing and its metabolism can lead to abnormalities in coordination between cell size and cell cycle, which is observed in obesity and diabetes (Morocutti et al. 1996; Sedeek et al. 2010; Lumeng and Saltiel 2011).

These studies was designed to evaluate the effect of different glucose concentration, both deficiency and excess, on cell growth, cell size and cellular physiology. These analyses were performed using the *S. cerevisiae* yeast cells, with disruption of genes involved in glucose signalling as a model.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

6-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-6-deoxyglucose (6-NBDG), dihydroethidium (DHET), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA), FUN-1, rhodamine B hexyl ester, rhodamine 123 and Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit were from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Poznan, Poland). Components of culture media were from BD Difco (Becton Dickinson and Company, Spark, USA) except for glucose (POCH, Gliwice, Poland).

### Yeast strains and growth conditions

The following yeast strains were used: wild-type (WT) BY4741 MATa *his3 leu2 met15 ura3* (EUROSCARF) and three mutant strains isogenic to BY4741:  $\Delta gpa2$ ;  $\Delta gpr1$ ;  $\Delta hxk2$  (EUROSCARF). The results presented in Fig. S2 (Supporting Information) were obtained using the following yeast strains: wild-type (WT) SP4 MATa *leu1 arg4* and two mutant strains isogenic to SP4:  $\Delta sod1$ ;  $\Delta ctt1\Delta cta1$ . Yeast was grown in the liquid YP medium (1% Yeast Extract, 1% Yeast Bacto-Peptone) with different glucose concentrations (0.5%, 2% and 4%) on a rotary shaker at 150 rpm, at the temperature of 28°C.

### Isolation of respiratory-deficient cells

To obtain respiratory-deficient cells, respiratory-competent cells of WT,  $\Delta gpa2$ ,  $\Delta gpr1$  and  $\Delta hxx2$  yeast strains were treated with ethidium bromide according to the procedure described by Slonimski, Perrodin and Croft (1968). Briefly, yeast cells from the exponential phase of growth were treated three times with ethidium bromide at the concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$ ; respiratory-deficient cells were then identified by their inability to grow on the non-fermentable carbon source (solid and liquid YP medium with 3% glycerol). To prepare solid medium, 2% agar was added.

### Determination of cell growth

Growth of yeast cells was analysed on the liquid medium. Yeast cultures were cultivated for 24 h in a shaking incubator (Heidolph incubator 1000) at 1200 rpm at 28°C. Growth was monitored turbidimetrically at  $\lambda = 600$  nm using an Anthos 2010 type 17550 microplate reader. Measurements were performed at 1 h intervals for 12 h and after 24 h of cultivation. Growth rate was determined by calculation, on the basis of the linear section of the growth curves according to the method of Widdel (2007).

### Determination of glucose and ethanol concentrations

Yeast cells were grown in proper medium to early exponential phase (12–13 h). Concentrations of both compounds were determined in the culture medium after centrifugation and removal of the yeast cells. Glucose concentration was determined with Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit according to the manufacturer's protocol (Molecular Probes). Fluorescence was measured after 20 min of incubation in the dark, at 28°C, at  $\lambda_{\text{ex}} = 530$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 590$  nm. Ethanol concentration was determined with ALCOTEST (an enzymatic kit containing alcohol oxidase and peroxidase) according to the procedure of Gonchar et al. (2001). The reaction was stopped after 20 min of incubation at room temperature and absorbance was measured at  $\lambda = 450$  nm. Fluorescence and absorbance measurements were performed using a TECAN Infinite 200 microplate reader.

### Measurement of glucose uptake

Glucose uptake rate was determined by using 6-NDBG, a fluorescent non-hydrolysable glucose analogue. Yeast cells from the early exponential phase of growth were washed twice with sterile PBS with pH 7.4 and suspended to final density of  $2 \times 10^8$  cells/ml in the same buffer. After addition of 6-NDBG at the final concentration of 150  $\mu\text{M}$ , cells were incubated at 28°C for 90 min. The concentration of 6-NDBG and incubation time were selected after wide-ranging analyses of these parameters in the range of proposed by the manufacturer (Molecular Probes) and used in another yeast studies based on glucose analogue 2-NDBG (Roy et al. 2015; Zhang et al. 2015). The reaction was stopped by washing the cells twice with PBS. The fluorescence of the cells was recorded using a TECAN Infinite 200 microplate reader at  $\lambda_{\text{ex}} = 455$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 540$  nm. The values were expressed as a percentage compared to the WT strain.

### Measurement of cell metabolic activity

Metabolic activity of yeast cell was determined with FUN-1 according to the manufacturer's protocol (Molecular Probes) with modifications described by Kwolek-Mirek and Zadrag-Tecza (2014). Incubation with 0.5  $\mu\text{M}$  FUN-1 was conducted for 15 min

in the dark at 28°C. The fluorescence of the cell suspension was measured using a TECAN Infinite 200 microplate reader at  $\lambda_{\text{ex}} = 480$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 500$ –650 nm.

### Estimation of cell size

Mean cell size in the population was estimated through analysis of microscopic images captured with an Olympus BX-50 microscope equipped with a Sony SSP-DC50AP digital camera. Diameter of the cell was measured using the MicroImage 3.0 software. Cell diameter was measured in two perpendicular planes for each cell, and the mean value was used for calculations. For each yeast strain cultured in medium with different glucose concentrations, at least 300 cells were counted.

### Determination of reactive oxygen species generation

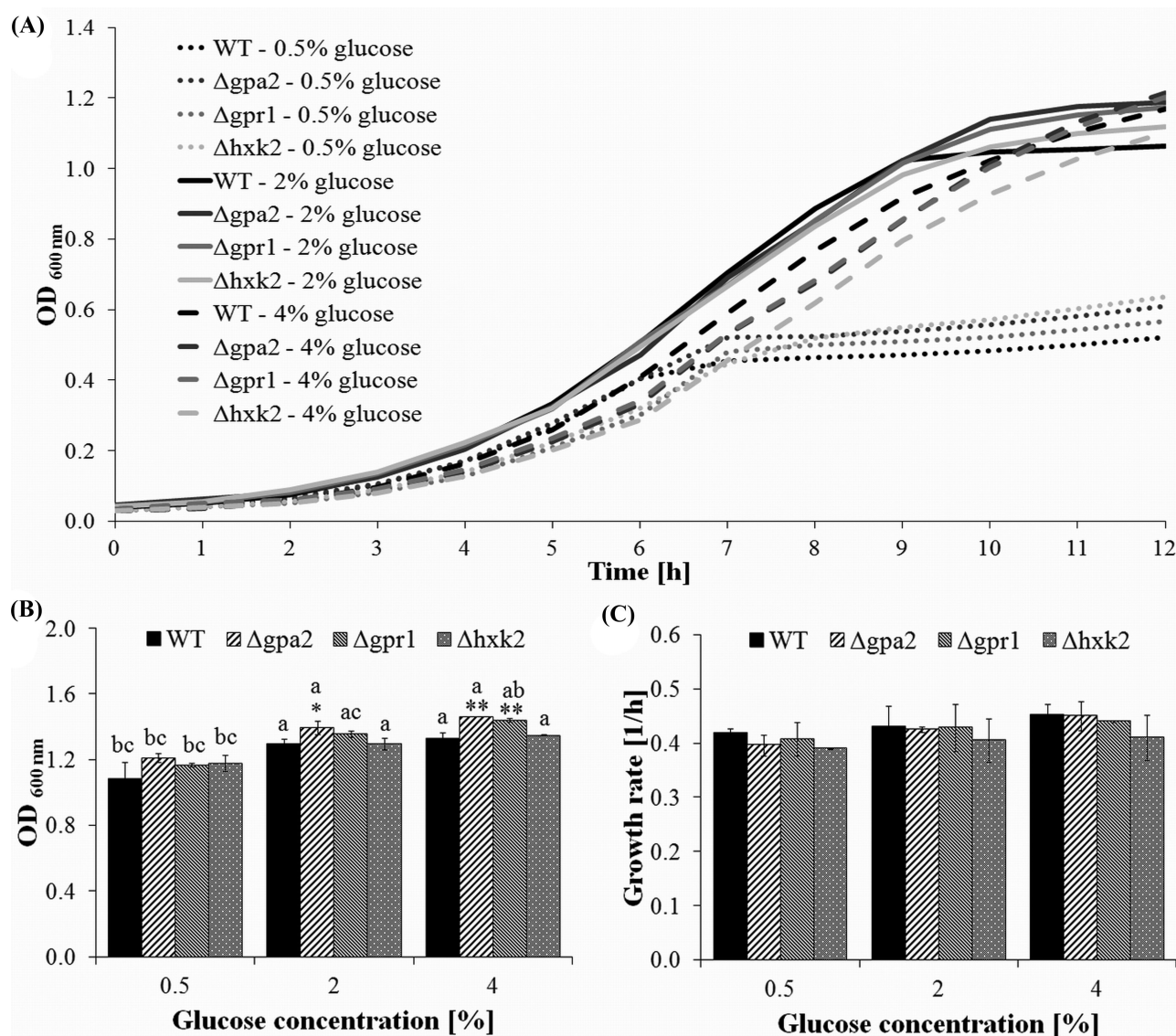
Generation of reactive oxygen species (ROS) was assessed with dihydroethidium (DHET; 10.7  $\mu\text{M}$  final concentration; stock solution in DMSO) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ; 15.8  $\mu\text{M}$  final concentration; stock solution in ethanol). DHET is oxidised mainly by superoxide anion to fluorescent hydroxyethidium; in turn, after entering the cell  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  is hydrolysed with release of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein ( $\text{H}_2\text{DCF}$ ), which is oxidised among others by hydrogen peroxide, hydroxyl radical and singlet oxygen to the fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Yeast cells (both respiratory competent and respiratory deficient) from the early exponential phase of growth were washed twice with sterile water and suspended to a final density of  $10^8$  cells/ml in a 100 mM phosphate buffer with pH 7.0, containing 0.1% glucose and 1 mM EDTA. DHET or  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  was added to 200  $\mu\text{l}$  of cell suspension and immediately the fluorescence measurement was performed. The kinetics of fluorescence increase, due to oxidation of the fluorogenic probes, was measured using a TECAN Infinite 200 microplate reader. Measurements were performed for 30 min at 28°C at  $\lambda_{\text{ex}} = 518$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 605$  nm for DHET and  $\lambda_{\text{ex}} = 495$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 525$  nm for  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ . ROS production was expressed as a relative rate of fluorescence increase.

### Determination of mitochondrial membrane potential

Mitochondrial membrane potential was determined using rhodamine 123 according to the manufacturer's protocol (Molecular Probes). Briefly, yeast cells from early exponential phase culture were washed twice with sterile water and suspended to final density of  $10^7$  cells/ml in 50 mM citrate buffer with pH 5.0, containing 2% glucose. Incubation with 5  $\mu\text{M}$  rhodamine 123 was conducted for 20 min in the dark at 28°C. After incubation, cells were harvested and resuspended in fresh citrate buffer. The fluorescence was measured using a TECAN Infinite 200 microplate reader at  $\lambda_{\text{ex}} = 505$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 534$  nm.

### Estimation of mitochondrial network structure

Structure of the mitochondrial network was determined using rhodamine B hexyl ester whose fluorescence depends on mitochondrial membrane potential. Cells were washed twice with sterile water and suspended in 10 mM HEPES buffer with pH 7.4, containing 5% glucose. Incubation with 100 nM rhodamine B was conducted for 20 min in the dark at 28°C. After incubation, mitochondrial network was visualised by fluorescence microscopy at  $\lambda_{\text{ex}} = 555$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 579$  nm. The microscopic images, which present the typical results of the duplicate



**Figure 1.** The growth of the yeast cell population on liquid medium. Comparison of growth kinetics (A), growth after 24 h of cultivation (B) and the growth rate (C) of WT yeast strain and mutants strains with disruptions of genes associated with glucose signalling, cultivated on the medium with different glucose concentration. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  of significantly different values with respect to the WT strain within the same type of medium. The letters a, b, c indicate the differences between values observed in different medium within the same yeast strain; a—different to medium with 0.5% glucose, b—different to medium with 2% glucose, c—different to medium with 4% glucose, respectively.

experiment, were captured with the Olympus BX-51 microscope equipped with the DP-72 digital camera and cellSens Dimension software.

### Statistical analysis

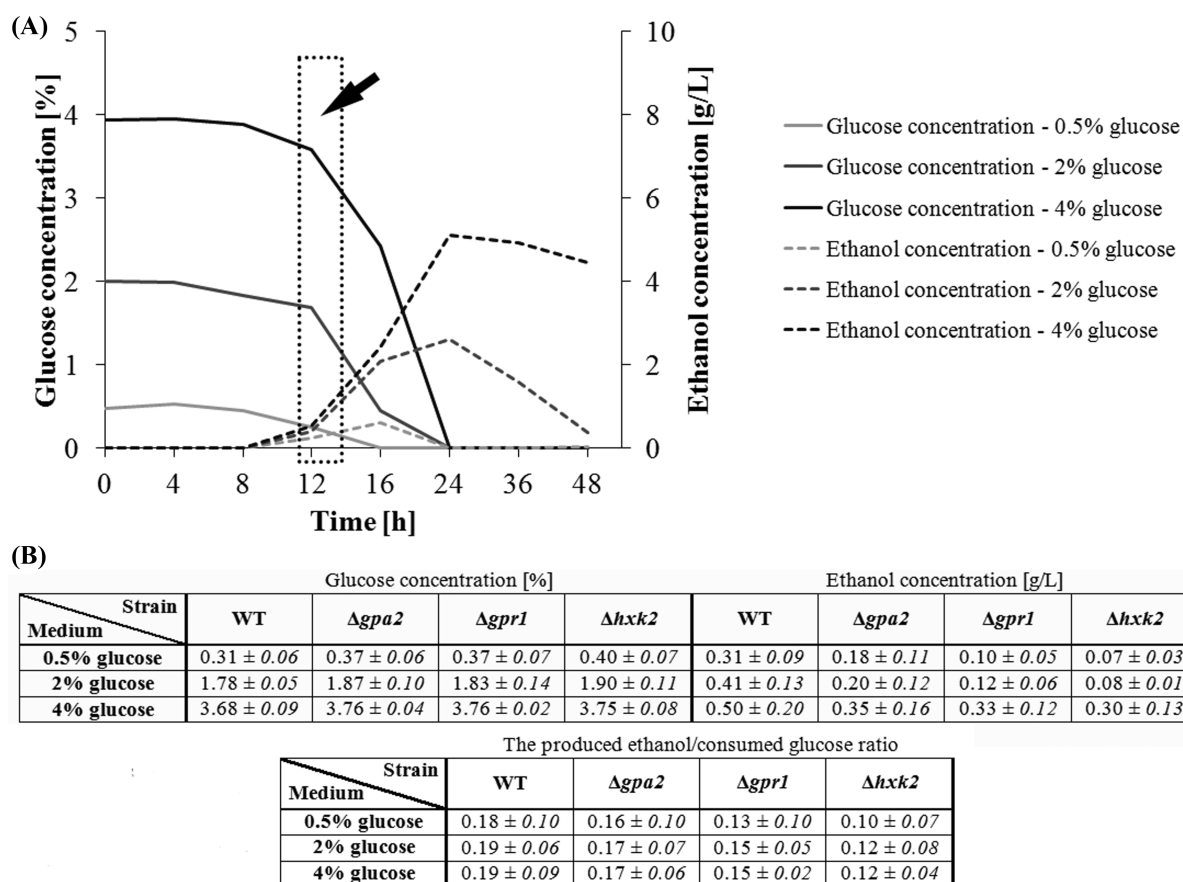
Results are presented as mean  $\pm$  SD from at least three independent experiments. The statistical analysis was performed using the STATISTICA 10.0 software. The statistical significance of the differences between the means obtained from mutant strains in comparison to the WT strain as a control was estimated using one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test. The statistical significance of the differences between means of the three media compared was evaluated using one-way ANOVA with the Tukey post hoc test. The values were considered significant at  $P < 0.05$ . Used designation: differences between strains \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; differences between media a—different

to medium with 0.5% glucose, b—different to medium with 2% glucose, c—different to medium with 4% glucose.

## RESULTS

### Yeast cell population growth

Glucose is regarded as a molecule with a significant influence on cellular physiology. Therefore, different glucose concentrations in the medium or disruptions of genes associated with glucose signalling may change the kinetics of yeast cell growth. Cultivation of yeast cells in media with different glucose concentrations resulted in different time periods for reaching growth curve plateau level (Fig. 1A). Respectively, after 7 h in the medium with 0.5% glucose, 9–10 h in the medium with 2% glucose and about 12 h in the medium with 4% glucose, the shapes of growth curves obtained in media with 2% and 4% glucose



**Figure 2.** Glucose and ethanol concentration in medium. The rate of glucose consumption and ethanol production of WT yeast strain cultivated on the medium with different glucose concentration (A). The graph area marked with an *arrow* indicates the time stage when the morphologic and functional parameters of the cell were analysed. Comparison of glucose and ethanol concentration in medium; the ethanol produced to glucose consumed ratio of WT and mutants strains *Δgpa2*, *Δgpr1* and *Δhvk2* (B). The presence of ethanol with relatively high level of glucose compared to its initial concentration indicates a mostly fermentative metabolism. The ethanol produced to glucose consumed ratio indicates the similar type of cell metabolism.

concentrations were similar. No differences were observed between kinetics of growth in the medium with 4% glucose in comparison to the optimum 2% glucose concentration (Fig. 1A). Moreover, there were no differences between the WT strain and yeast mutant strains devoid of genes required for proper glucose signalling, at any analysed culture conditions (Fig. 1A). The growth rate, determined by calculation of the data obtained from the linear section of the growth curve, did not reveal any differences between the analysed yeast strains and the applied culture conditions (Fig. 1C). The influence of glucose concentration on cell population growth was observed only after 24 h of cultivation (Fig. 1B). Higher OD values were associated with increased glucose concentrations in the medium. This effect was more visible in the case of cells growing in a medium with 0.5% glucose in comparison to the other two types of media (Fig. 1B). The obtained results (Figs 1A–C) did not reveal any clear differences in growth of the yeast cell population, both between cells cultivated in media with different glucose concentration and between the analysed strains.

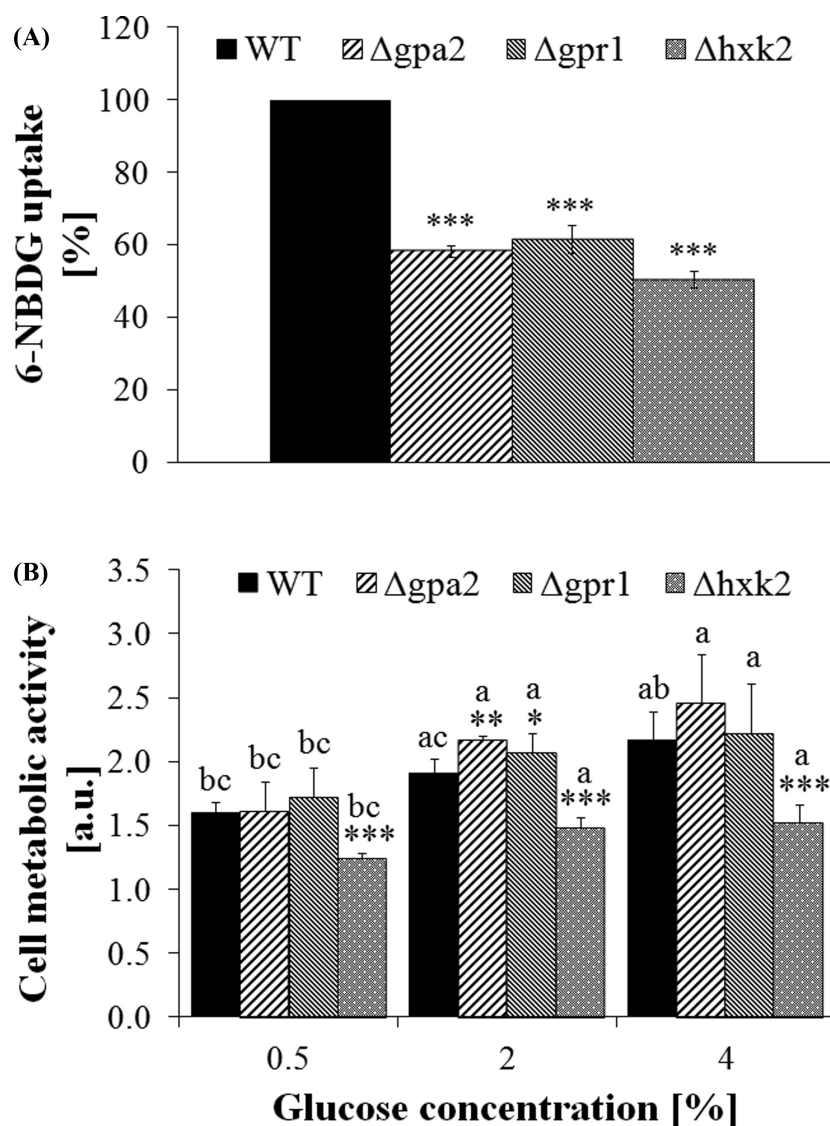
### Ethanol and glucose concentrations in the medium

Yeast cells obtain energy by fermentation or oxidative respiration depending on glucose concentration in the medium. A comparison of physiological parameters of cells is appropriate only when yeast cells have a similar type of metabolism. For this

purpose, both glucose and ethanol concentrations were determined in the culture medium so that regardless of different glucose concentrations used for cultivation, the cells were provided with energy in the same way, i.e. through fermentation. The physiological parameters of the cells were analysed at strictly defined point of cultivation (fermentative metabolism before diauxic shift). This point was selected on the basis of analysis of the rate of glucose consumption and ethanol production performed in WT strain (Fig. 2A). Such control of experimental conditions is particularly important when yeast cells are cultivated in the medium with low glucose concentration, e.g. 0.5%, because exhaustion of glucose leads to the diauxic shift, thereby completely changing cellular metabolism. It was confirmed that yeast strains used in the studies carry out mainly fermentation at assumed experimental conditions, on all types of medium (YP with 0.5%, 2% and 4% glucose concentrations). This was substantiated by the presence of ethanol with relatively high level of glucose compared to its initial concentration (Fig. 2B).

### The glucose uptake

Yeast strains used in this study represented mutants with disruption of genes involved in the intracellular signalling—HVK2 or extracellular glucose signalling performed by the cAMP/PKA pathway—GPA2, GPR1. To evaluate whether these types of disruption in glucose signalling may have an influence on the



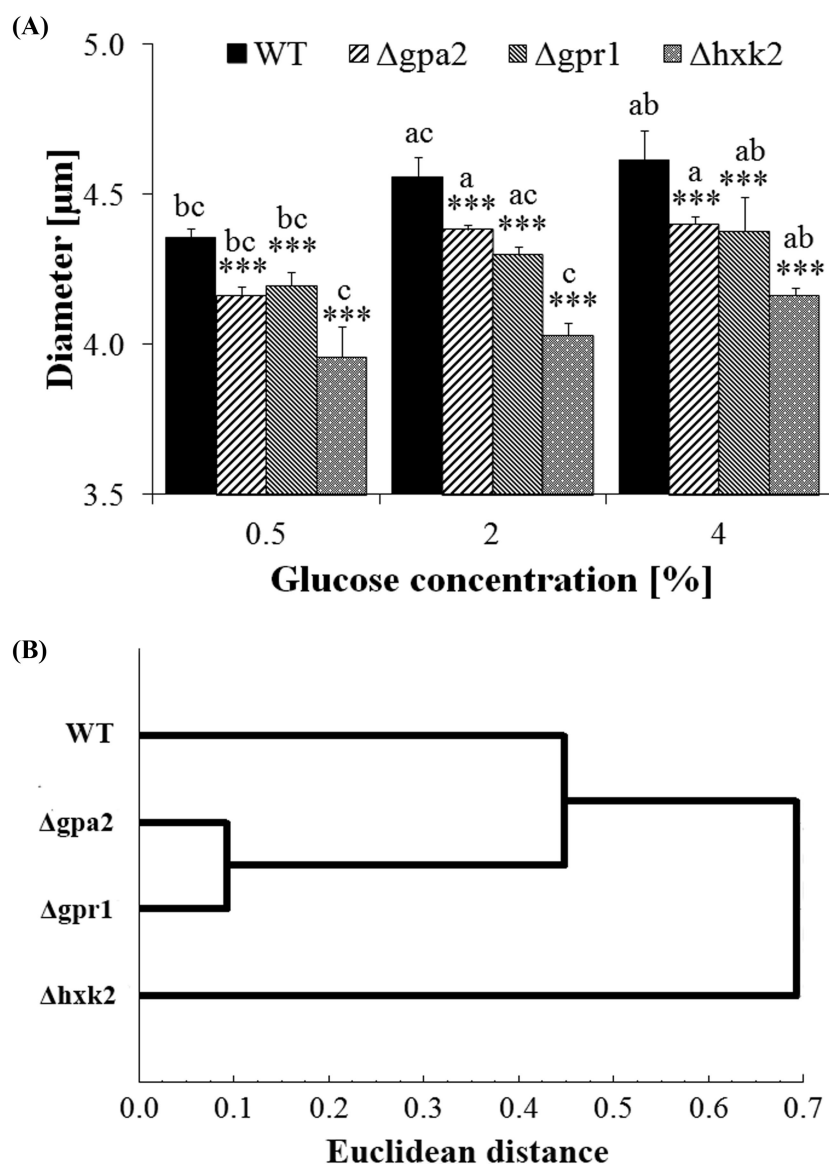
**Figure 3.** The rate of glucose uptake and metabolic activity of yeast cells. The rate of glucose uptake by cultured yeast cells of WT and mutant strains  $\Delta gpa2$ ,  $\Delta gpr1$  and  $\Delta hxk2$  (A). Quantification of relative glucose uptake was performed by measuring the fluorescent signal after a 1.5-h incubation with 6-NBDG. \*\*\*  $P < 0.001$  compared to the WT strain. Metabolic activity of the cell determined with FUN-1 stain (B). The metabolic activity of cells is expressed as a ratio of red ( $\lambda = 575$  nm) to green ( $\lambda = 535$  nm) fluorescence. Error bars indicate SD. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  of significantly different values with respect to the WT strain within the same type of medium. The letters a, b, c indicate the differences between values observed in different medium within the same yeast strain; a—different to medium with 0.5% glucose, b—different to medium with 2% glucose, c—different to medium with 4% glucose, respectively.

rate of glucose uptake, an analysis was performed using the fluorescent non-hydrolysable glucose analogue 6-NBDG. Analysis of glucose uptake in yeast is usually performed by using another glucose analogue 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG) (Roy et al. 2015; Zhang et al. 2015). Considering that one of analysed strains is strain with deletion of gene encoding hexokinase 2 (*HXK2*) and the deletion of the others analysed genes (*GPA2* and *GPR1*) may strongly influence glucose metabolism, 6-NBDG was used in the analysis. The fluorescence of this glucose analogue is independent of hexokinase activity, it cannot be phosphorylated what leads to its accumulation within the cell. The accumulation of 6-NBDG analogue is proportional to the rate of glucose uptake. In our experimental conditions, this is an advantage in relation to 2-NBDG because such modification in C2-position of glucose allows to its phosphorylation by hexokinase and subsequent degra-

degradation to non-fluorescent products. There were no differences between  $\Delta gpa2$ ,  $\Delta gpr1$  and  $\Delta hxk2$  yeast mutant strains although they have a significantly lower glucose uptake rate in comparison to the WT strain (Fig. 3A).

#### The level of cell metabolic activity

As a cellular source of energy, glucose is a major modulator of metabolic processes. Therefore, an analysis of relative metabolic activity (which can be treated as an equivalent of cell viability) of cells growing in media with different glucose concentrations was performed. A slight increase in the values of cell metabolic activity was observed with an increase in the extracellular glucose concentration (Fig. 3B). There were no differences between cell metabolic activity of the  $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$  yeast mutant strains in comparison to the WT strain. These cells



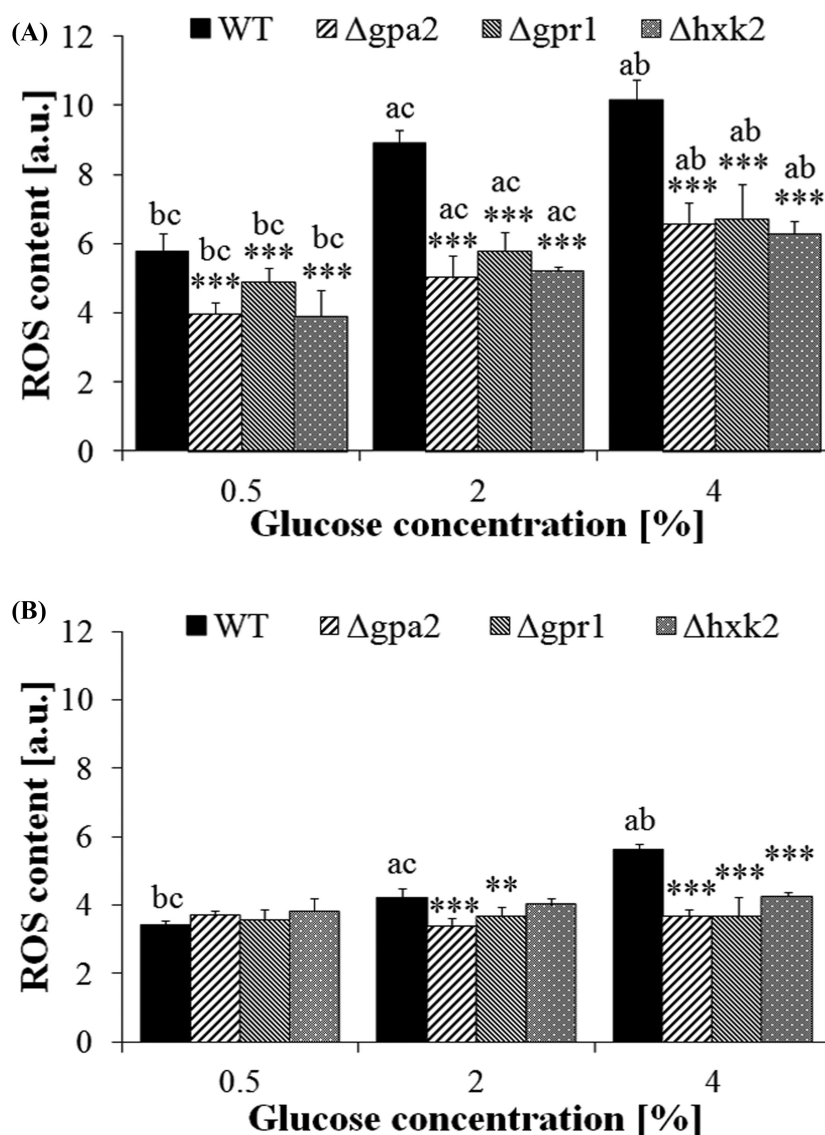
**Figure 4.** The size of the WT and mutants yeast cells cultivated on the medium with different glucose concentration. The cell size of the yeast cells (A). Data are presented as a mean value of cell diameter. Error bars indicate SD. \*\*\*  $P < 0.001$  of significantly different values with respect to the WT strain within the same type of medium. The letters a, b, c indicate the differences between values observed in different medium within the same yeast strain; a—different to medium with 0.5% glucose, b—different to medium with 2% glucose, c—different to medium with 4% glucose, respectively. Dendrogram of clustering groups according to the highest similarity of cell size (B). Data come from hierarchical clustering analysis in which the size of the yeast cells obtained on each of the analysed media with different glucose concentration was taken into account.

showed a similar metabolic activity status. Different findings were recorded in the case of the  $\Delta hvk2$  yeast mutant strain. Its cells showed lower cell metabolic activity in comparison to WT and other two yeast mutant strains (Fig. 3B). However, regardless of the relatively low value of metabolic cell activity observed in the case of  $\Delta hvk2$  yeast mutant strain, it is sufficient to provide proper physiology status of the cell.

### Influence of extracellular glucose concentrations and glucose uptake on the cell size

Glucose is a molecule important for biosynthetic processes and has a significant impact on the mean size of yeast cells in a population. It has been observed that there is a relationship between the mean value of yeast cell size and the extracellular glucose

concentration. Cell size increased with the increasing extracellular glucose concentration (Fig. 4A), and this relationship was most noticeable in the case of the WT strain cells (Fig. 4A). Comparison between mean cell sizes of yeast mutant strains and the WT strain showed that the value of the parameter was lower for the mutant cells. In a medium with the 0.5% glucose concentration, the  $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$  yeast mutant strains showed a decrease in cell size by more than 5% in comparison to the WT strain. The  $\Delta hvk2$  strain showed a greater reduction in the cell size—more than 10% compared to the WT strain (Fig. 4A). A similar relation was observed between the size of the cells of the analysed yeast strains grown on the media with 2% and 4% glucose concentrations. What is worth emphasising is that there is a connection between the mean cell size (Fig. 4A) and the glucose uptake (Fig. 3A). Cells of the yeast mutant strains with lower



**Figure 5.** The ROS generation in the respiratory-competent yeast cells cultivated in the medium with different glucose concentration. The ROS generation in the WT and mutants  $\Delta gpa2$ ,  $\Delta gpr1$  and  $\Delta hvk2$  was estimated with DHET (A) and H<sub>2</sub>DCF-DA (B). Error bars indicate SD. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  of significantly different values with respect to the WT strain within the same type of medium. The letters a, b, c indicate the differences between values observed in different medium within the same yeast strain; a—different to medium with 0.5% glucose, b—different to medium with 2% glucose, c—different to medium with 4% glucose, respectively.

glucose uptake (Fig. 3A) had a significantly lower mean size in comparison to the WT strain cells (Fig. 4A). In all analysed strains, the smallest cell size was noted for the  $\Delta hvk2$  strain (Fig. 4A). In order to extend the level of comparison among cell sizes of the analysed yeast strains and to identify strains with the highest similarity regardless of the extracellular glucose concentration, a hierarchical clustering analysis was performed. The analysis indicated a strong similarity between  $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$  yeast strains. WT and  $\Delta hvk2$  strains showed the lowest level of similarity and the largest distance in the dendrogram among the analysed yeast strains (Fig. 4B).

#### Influence of extracellular glucose concentration and glucose uptake on ROS generation

The level of glucose determines the type of yeast cell metabolism: fermentation, aerobic respiration or a mix of both. Each type of metabolism leads to the generation of ROS at a

different level. ROS are generally regarded as destructive molecules that cause damage to cellular components. Hence, ROS generation levels were measured by using two complementary fluorescence-based methods, i.e. DHET and H<sub>2</sub>DCF-DA assays. The specificity of both probes in ROS determination was identified by using additional yeast strains: (i) devoid of superoxide dismutase 1 ( $\Delta sod1$ ); (ii) devoid of both catalases ( $\Delta ctt1\Delta cta1$ ) whose can be treated as a positive control for that probes (Fig. S2A and B). Analysing the influence of glucose concentration on the intracellular ROS generation, it was observed that an increase in the extracellular glucose concentration caused a significant increase in the ROS content designated with DHET (Fig. 5A). The lowest ROS content was observed for the 0.5% glucose medium and the highest for cells cultivated in the 4% glucose medium. This dependence was observed for cells across all analysed strains, although it was most pronounced for the WT strain. In the WT strain, the differences of ROS content between cells cultured in medium with 0.5% and medium with

4% glucose were almost double. However, a comparison of the differences in ROS generation between strains within the particular medium showed that all mutant strains had lower level of the ROS content designated with DHET compared to the WT strain (Fig. 5A). Differences in ROS generation were also observed in the H<sub>2</sub>DCF-DA assay. In the 0.5% glucose medium, all yeast mutant strains and the WT strain had similar ROS generation levels. However, with increased glucose concentrations in the medium, the differences between the WT and mutants strains became more significant. In the 4% glucose medium, ROS content for mutant strains was ca. 30% lower compared to the WT strain. No significant differences were noticed for cells of mutant strains cultivated in the medium with different glucose concentrations. Such differences were observed only for the WT strain cells (Fig. 5B).

### Structural and functional status of mitochondria

The structural and functional status of mitochondria, which are regarded as main cellular sources of ROS, depends on the type of metabolism of the yeast cell. The structure of mitochondrial network observed in microscopic images was similar for all analysed strains but also for all media with different glucose concentration. Accumulation of the dye depends on mitochondrial membrane potential; therefore, the results show not only the mitochondrial structure but also the fact that mitochondria maintain functional state even in a 4% glucose medium where energy generation by aerobic respiration is unnecessary (Fig. 6A). These results were confirmed by a quantitative analysis of the mitochondrial membrane potential (Fig. 6B). The analysis shows lack of significant differences, both in comparison with the analysed yeast strains and the media used.

### ROS generation rate in respiratory-deficient yeast cells ( $\rho^0$ )

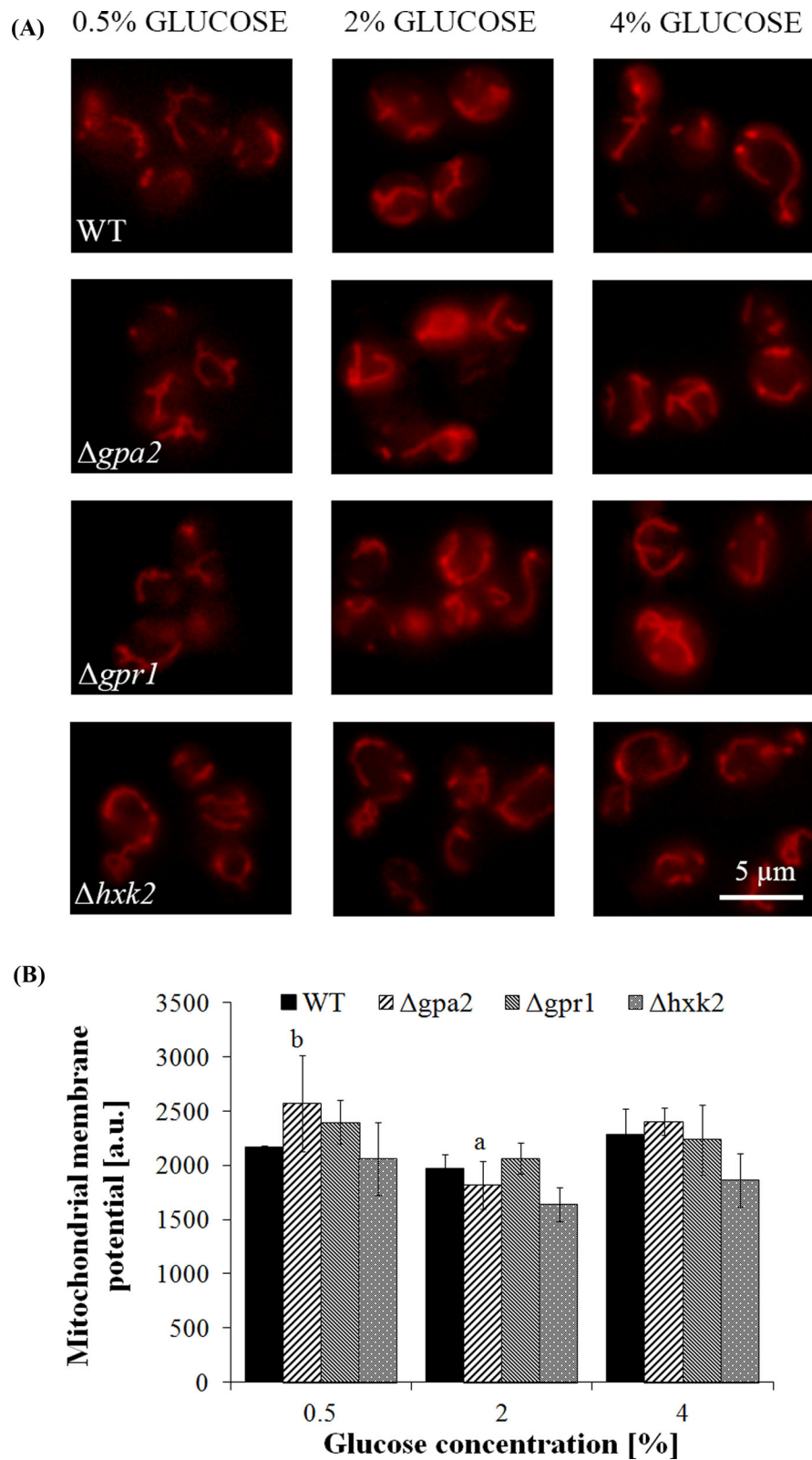
In the case of yeast cells, in order to investigate the importance of mitochondria in cellular metabolism, respiratory-deficient mutant cells may be used. Cells of this type are characterised by their inability to grow on non-fermentable carbon source as they cannot conduct aerobic respiration. In the study in question, the purpose of the use of such cells was to get a wider range of comparisons in order to define the role of mitochondria in glucose-dependent ROS generation. Respiratory-deficient cells of all analysed yeast strains, i.e. WT,  $\Delta gpa2$ ,  $\Delta gpr1$  and  $\Delta hxx2$ , were obtained by a standard method using ethidium bromide. Mutant cells were identified among others by a growth test in the liquid YP medium with 3% glycerol (Fig. S1A, Supporting Information) and by determination with fluorescence dye rhodamine B (Fig. S1B). The analyses confirm the respiratory deficiency of the  $\rho^0$  yeast mutant strains obtained (Fig. S1A and B). Determination of ROS generation in respiratory-deficient yeast cells (Fig. 7A and B) brought comparable results to those observed in respiratory-competent cells (Fig. 5A and B). The lowest ROS content was observed in the medium with 0.5% glucose and the highest for cells cultivated in the 4% glucose medium. A lowered level of ROS designated with DHET was also observed for all yeast mutant strains in all types of media in comparison to the WT strain (Fig. 7A). A similar relationship observed between yeast mutant strains and the WT strain in ROS content obtained with H<sub>2</sub>DCF-DA assay was also noted in the case of medium with 2% and 4% glucose concentration. There were no differences in

the ROS generation between the WT and yeast mutant strains in the 0.5% glucose medium (Fig. 7B).

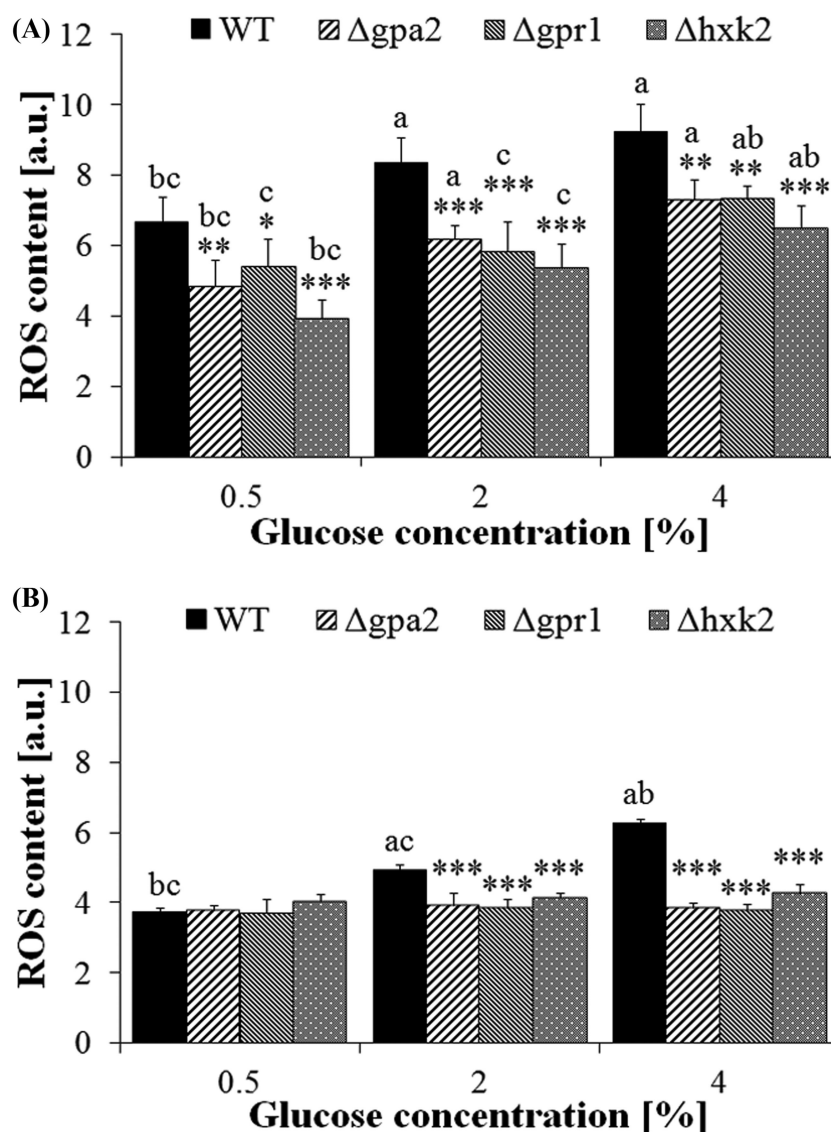
## DISCUSSION

The focus of the present research was to determine the influence of glucose on yeast cell physiology. Studies of glucose impact on cell growth and reproduction rates usually focused on comparing yeast cells cultivated with or without glucose (Alberghina et al. 2004; Tamaki et al. 2005). Therefore, in this work, we applied the comprehensive approach by using not only conventional conditions of CR, but also the high glucose concentration as an equivalent of CE conditions. To provide mainly the fermentative metabolism, the conditions of the research were strictly controlled (Fig. 2A and B). Moreover, different yeast mutant strains, generally regarded as a genetic model that mimics CR— $\Delta hxx2$ ,  $\Delta gpa2$ ,  $\Delta gpr1$  (Lin, Defossez and Guarente 2000)—were also used.

The rate of cell metabolism is coordinated by the status of environmental nutrients. In yeast, type and availability of carbon sources strongly influence cell physiology and proliferation (Gancedo 2008; Nilsson and Nielsen 2016). The precise coordination between yeast cell growth and its reproduction is connected with cell size. Cells need to be equipped with specific control mechanisms to coordinate accumulation of cellular constituents, necessary for proper proliferation and their distribution to the progeny at each cell cycle (Hartwell et al. 1974). In turn, the rate of cell reproduction strongly influences the growth rate of the population. There is no significance correlation between the growth rate and the extracellular glucose level (Fig. 1A and C). As was shown, such correlation can be observed only at a very low glucose levels (below ca. 0.1%) (Youk and van Oudenaarden 2009; Ziv, Siegal and Gresham 2013). Moreover, taking into consideration the growth rate of the cell population, there is no significant differences between the WT strain cells and the yeast mutant strain cells devoid of genes responsible for glucose signalling (Fig. 1A and C), even though these genes are crucial in cellular sensing and signalling pathways (Gancedo 2008; Busti et al. 2010). This observation is consistent with previous studies showing that  $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$  mutants have the duplication time similar to the WT strain in the conditions with or without glucose (Alberghina et al. 2004; Tamaki et al. 2005). The observed lack of differences may be caused by the fact that yeast cells have several mechanisms for monitoring and responding to changes in glucose availability in the environment. Moreover, certain studies underline that the growth rate is not simply dependent on glucose sensing and signalling but also on glucose uptake. Individually, none of these processes have a decisive impact on cell physiology, rather the interaction between them determines the rate of growth and proliferation. Therefore, both extracellular and intracellular glucose signalling cooperate to coordinate cell growth with cell cycle progression (Youk and van Oudenaarden 2009; Busti et al. 2010). Such relationship may be also confirmed by the results presented in this paper (Fig. 3A). In this study, the rate of glucose uptake was determined by using 6-NBDG, a fluorescent glucose analogue typically used in mammalian and human cells, especially brain cells (Barros et al. 2009; Jung et al. 2011; Kim et al. 2012). To our knowledge, it was the first time that 6-NBDG was used for monitoring of the glucose uptake in yeast cells; usually for this model, the 2-NBDG glucose analogue is used (Roy et al. 2015; Zhang et al. 2015). The use of that analogue was based on the fact that 2-NBDG is phosphorylated to the fluorescent form by hexokinase, which in the case of yeast strains



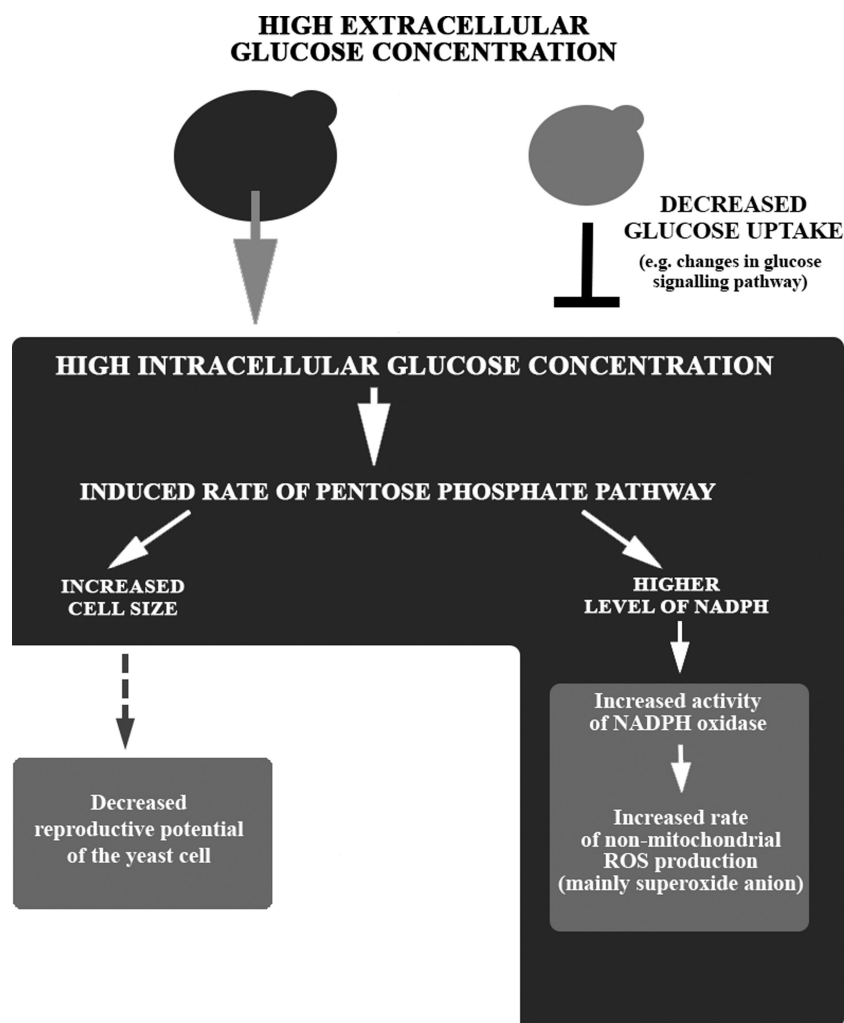
**Figure 6.** Functional state of mitochondria. The structure of the mitochondria network (A) determined with rhodamine B hexyl ester. The microscopic images present the typical results of the duplicate experiment for the yeast cells grown on medium with different glucose concentration. The mitochondrial membrane potential (B) determined with rhodamine 123. Error bars indicate SD. The letters a and b indicate the differences between values observed in different medium within the same yeast strain; a—different to medium with 0.5% glucose, b—different to medium with 2% glucose, respectively. There were no differences between the strains within the same type of medium.



**Figure 7.** The ROS generation in the respiratory-deficient (*rho*<sup>0</sup>) yeast cells cultivated in the medium with different glucose concentration. The ROS generation in the WT and mutants  $\Delta gpa2$ ,  $\Delta gpr1$  and  $\Delta hxx2$  was estimated with DHET (A) and H<sub>2</sub>DCF-DA (B). Error bars indicate SD. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  of significantly different values with respect to the WT strain within the same type of medium. The letters a, b, c indicate the differences between values observed in different medium within the same yeast strain; a—different to medium with 0.5% glucose, b—different to medium with 2% glucose, c—different to medium with 4% glucose, respectively.

used in these studies would impede a correct analysis. The results show that disorders in glucose signalling pathways can decrease the rate of glucose uptake (Fig. 3A). If the rate of glucose uptake can be different between strains, the intracellular glucose levels may markedly differ between yeast cells even when the extracellular glucose concentration is exactly the same. The level of glucose uptake may directly regulate the type of yeast cell metabolism, thus determining a number of physiological parameters. First of all, glucose metabolism may affect the cell size. Cells growing on the medium with a non-fermentable carbon source are generally smaller than the cells that obtain energy by fermentation, although the respiratory pathway provides several times more ATP per mole of glucose than alcoholic fermentation (Rolland, Winderickx and Thevelein 2002; Nilsson and Nielsen 2016). The reasons of this phenomenon are not yet fully understood, but it is assumed that ethanol production during fermentation is one of the main causes. Ethanol may be used as a non-fermentable carbon source; more impor-

tantly, it can inhibit growth of other microorganisms, providing a competitive advantage to yeast cells. However, latest results show another possible explanation. Although fermentation generates a small quantity of energy, the cost of its production is relatively small in comparison to the aerobic respiration. Oxidative phosphorylation requires strict activity of several proteins, mainly enzyme proteins; that is why the number of required proteins per produced ATP is much higher than in glycolysis (Nilsson and Nielsen 2016). This suggests that the cells possess a specific metabolic trade-off. Depending on the glucose concentration, cell metabolism may change smoothly from fermentation through the respiro-fermenting mode to aerobic respiration (Somsen et al. 2000; Hagman and Piškur 2015; Nilsson and Nielsen 2016). It is worth emphasising that apart from being the source of energy, glucose is also a carbon substrate for biosynthesis (Fraenkel 1982; Somsen et al. 2000). In the cell, the biosynthetic route of glucose utilisation is represented by the pentose phosphate pathway (PPP pathway). This pathway



**Figure 8.** The hypothetical relationship between the excess of glucose, ROS production and cell size. The increased intracellular glucose concentration may be metabolised through the pentose phosphate pathway. This might result in increase in the cell size and production of NADPH. High level of NADPH may be used as a fuel in ROS generation in a mitochondrial-independent way (probably carried out by NADPH oxidase).

is generally considered as a source of aromatic amino acids, ribose for nucleotides biosynthesis and NADPH (Fraenkel 1982; Rodicio and Heinisch 2009). The studies showed that the size of the cell (Fig. 4A) is strictly correlated with the level of extracellular glucose concentration, but also, which is more important, with the rate of glucose uptake (Fig. 3A). This can be interpreted that the cell size depends not only on the extracellular but also on intracellular glucose concentration. Even when the extracellular level of glucose is high (e.g. 4%), the mutations that decrease the rate of glucose uptake (e.g. in glucose signalling pathway) may result in a smaller cell size in comparison to the WT cells. These results are consistent with the generally known phenomenon that the size of the cell growing in CR conditions is reduced in comparison to the size of cells growing in optimum conditions (2% glucose). This observation may be explained by the existence of the trade-off between fermentation and aerobic respiration processes. Nevertheless, the observed differences in the cell size between the optimum (2% glucose) and CE conditions (4% glucose) cannot be explained by the same relationship as in both media the cells obtained energy through fermentation. The reasons of these differences can be connected with the PPP pathway as a main cellular biosynthetic route. These observations are consistent with the studies showing a

distinct connection between protein content and cell size. Such relationship was observed in the case of different types of media (the medium with a non-fermentable or fermentable carbon source) and for mutants strains with disorders in the glucose-sensing and signalling pathway ( $\Delta gpa2$ ,  $\Delta gpr1$  and  $\Delta hxk2$ ) (Alberghina et al. 2004; Tamaki et al. 2005; Soma et al. 2014). In conditions when the amount of glucose is higher than the actual energy demand, the excess glucose can be forwarded directly to the biosynthesis of macromolecules. Such utilisation of glucose may be one of the reasons of higher cell vitality (Fig. 3B). Nevertheless, both the increase in cell size and the higher rate of biosynthetic processes may also lead to negative consequences, such as reduction of cell proliferation capacity through faster achievement of the size that prevents further proliferation. This is connected with the hypertrophy hypothesis that proposes an explanation of the limited reproductive capacity of yeast cells (Biliński, Zdraġ-Tęcza and Bartosz 2012). The inverse relationship between proliferation capacity and cell size is also noted in human cell cultures (Angello et al. 1987; De Paiva, Pflugfelder and Li 2006). Moreover, disorders of growth regulation, resulting from high glucose concentration, lead to the hypertrophy phenotype and cell division arrest. Such cell features were observed inter alia in diabetes and obesity (Morocutti et al. 1996; Lumeng and

Saltiel 2011; Liu et al. 2012). However, the reasons for hypertrophy in yeast and in mammalian cells will be partially different, also because of the preferred type of metabolism under aerobic conditions, although the consequences of this phenomenon might be similar. A high extracellular glucose concentration level is also connected with another consequence, such as induction of oxidative stress observed in different types of cells (Gupte 2010; Sedeek et al. 2010; Yu, Wu and Yang 2016; Sedlic et al. 2017). There is a limited number of studies evaluating the influence of high-sugar concentration in the medium on cell physiology in the yeast model (Landolfo et al. 2008; Palabiyik and Jafari Ghods 2015). Therefore, a broader analysis of this issue seems to be particularly important. Hence, we analysed ROS generation in yeast cells (Fig. 5A and B) depending on the extracellular but also intracellular glucose concentrations (Fig. 3A). The results showed that ROS generation in yeast cells increased with the increase in the extracellular glucose concentration (Fig. 5A and B). Moreover, the ROS content in yeast cells may be maintained at a low level by decreasing the rate of glucose uptake (Figs 3A and 5A,B), which adds force to the argument that the intracellular glucose level has a significant impact on cell physiology. The highest ROS content observed under CE conditions (4% glucose) (Fig. 5A and B), in which yeast cells should obtain energy only by fermentation, suggests that mitochondria are not the only cellular source of ROS. At low glucose concentrations, yeast cells obtain energy by oxidative phosphorylation, which is considered a possible cause of higher ROS generation (Zuin et al. 2010). The results presented in this paper show that the level of ROS (both superoxide anion and peroxides) was the lowest in a medium with the 0.5% glucose concentration (CR) (Fig. 5A and B), which is similar to the results obtained in other studies (Barros et al. 2004; Molin et al. 2011). However, there are also results suggesting that CR leads to an increase in ROS, which act as mild stressors and activate stress response processes (Sharma, Agrawal and Roy 2011; Denoth Lippuner, Julou and Barral 2014). Moreover, it is proposed that a low concentration of glucose extends yeast lifespan by metabolic shift from fermentation toward respiration (Lin et al. 2002; Denoth Lippuner, Julou and Barral 2014). This view is inconclusive in the light of the lifespan analysis results obtained for respiratory-deficient yeast cells ( $rho^0$ ), whose lifespans are increased despite the fact that they are only able to perform fermentation (Kaerberlein et al. 2005; Denoth Lippuner, Julou and Barral 2014). ROS generation is strictly connected with the functional status of mitochondria, whose commitment to energy production in yeast cells depends on glucose concentration. The analysis showed no differences in terms of yeast strains and prevailing conditions both for the mitochondrial network (Fig. 6A) and the mitochondrial membrane potential (Fig. 6B). Similar mitochondrial results in yeast cells growing in different types of medium were obtained in the research conducted by Molon et al. (2016). This would suggest that even when yeast cells obtain energy by fermentation, they still possess functional mitochondria as a kind of protection against sudden changes in nutrients availability. Moreover, the rate of ROS generation in respiratory-deficient yeast cells (Fig. 7A and B) was similar to the rate of ROS generation observed in respiratory-competent cells (Fig. 5A and B). It is worth noting that for both type of cells ( $rho^0$  and  $rho^+$ ), ROS content levels correlated with the concentration of glucose in the medium (Fig. 5A,B and 7A,B). The results of ROS content in the analysed yeast cells and the designated functional status of mitochondria (Fig. 6A and B) imply that the glucose-dependent ROS generation may have non-mitochondrial sources. This suggests that beside the mitochondrial source of ROS, there is another source

of ROS in yeast cells, which is probably cytoplasmic. Similar results, presented extramitochondrial source of ROS generation, were reported in the yeast cells cultivated under stress conditions (Busti et al. 2016). The results presenting the existence of NADPH oxidase 1 (Yno1p) in yeast cells provide additional support to this hypothesis (Rinnerthaler et al. 2012). This enzyme is regarded as an orthologue to human NADPH oxidases (NOX enzymes). These enzymes catalyse the production of superoxide anion from oxygen and NADPH (Babior 1999), and are considered as an important non-mitochondrial ROS sources in the cell, connected in particular with diabetes and obesity (Furukawa et al. 2004; Sedeek et al. 2010). Furthermore, activity of NADPH oxidase is directly dependent on the availability of NADPH that is mainly formed in the cell by the PPP pathway. This dependency underlines an important role of the PPP pathway in non-mitochondrial ROS generation (Serpillon et al. 2009; Losser, Damoiseil and Payen 2010). In consideration of these data and results of this paper, we propose possible consequences of the CE condition for cells (Fig. 8).

To conclude, this study provides evidence for a significant relationship between external glucose concentration, cell size and ROS generation. The obtained results show that the intracellular glucose amount is more important than the extracellular level of glucose. Furthermore, non-mitochondrial sources of ROS seem to be important in yeast cells during fermentative metabolism. Thus, the glucose level in the cell and glucose metabolism through different pathways, including the PP pathway, may be considered as another important factor influencing physiology of yeast cells and their reproductive potential. Nevertheless, the results also show that negative consequences of CE are independent from the type of yeast cell metabolism, which is an argument in favour of using the *S. cerevisiae* yeast cells in such studies.

### In memoriam

The authors of the papers express their gratitude to Professor Tomasz Biliński, the head of the project evaluating the influence of cell hypertrophy on the reproductive potential of yeast cells, for his support and helpful discussions. Sadly, Professor Biliński died on November 13, 2016.

### SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at [FEMSRY](https://www.femsyri.com) online.

### Acknowledgement

We are grateful to Dr Grabek-Lejko and Prof. Gonchar for providing the ALCOTEST Kit.

### FUNDING

This work was supported by the Polish National Science Centre, [Grant no. DEC-2013/09/B/NZ3/01352].

**Conflict of interest.** None declared.

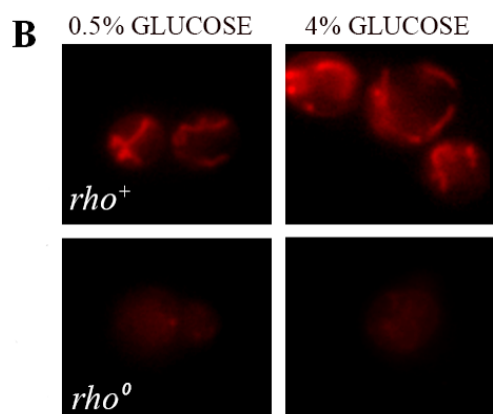
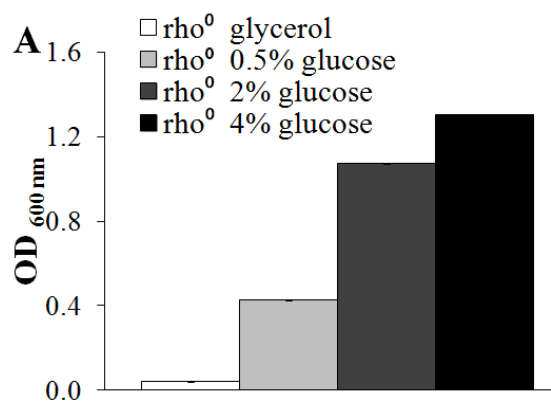
### REFERENCES

Alberghina L, Rossi RL, Querin L et al. A cell sizer network involving Cln3 and Far1 controls entrance into S phase in the mitotic cycle of budding yeast. *J Cell Biol* 2004;167: 433–43.

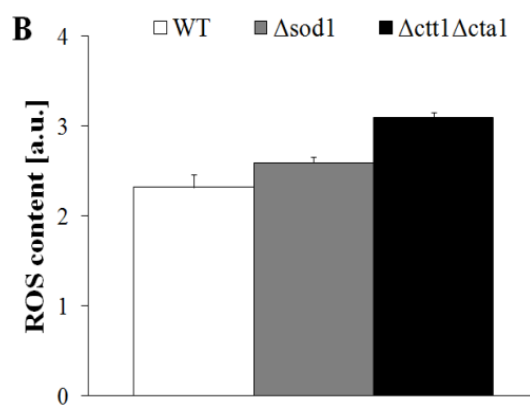
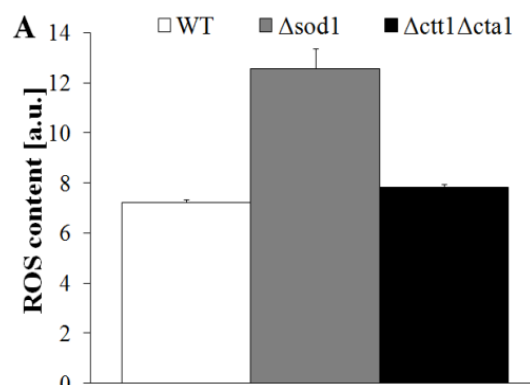
- Angello JC, Pendergrass WR, Norwood TH et al. Proliferative potential of human fibroblasts: an inverse dependence on cell size. *J Cell Physiol* 1987;**132**:125–30.
- Austad SN. Ageing: Mixed results for dieting monkeys. *Nature* 2012;**489**:210–11.
- Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999;**93**:1464–76.
- Barros LF, Bittner CX, Loaiza A et al. Kinetic validation of 6-NBDG as a probe for the glucose transporter GLUT1 in astrocytes. *J Neurochem* 2009;**109**(Suppl 1):94–100.
- Barros MH, Bandy B, Tahara EB et al. Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2004;**279**:49883–8.
- Bilinski T. Hypertrophy, replicative ageing and the ageing process. *FEMS Yeast Res* 2012;**12**:739–40.
- Biliński T, Paszkiewicz T, Zadrag-Tecza R. Energy excess is the main cause of accelerated aging of mammals. *Oncotarget* 2015;**6**:12909–19.
- Biliński T, Zadrag-Tecza R, Bartosz G. Hypertrophy hypothesis as an alternative explanation of the phenomenon of replicative aging of yeast. *FEMS Yeast Res* 2012;**12**:97–101.
- Busti S, Coccetti P, Alberghina L et al. Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors (Basel)* 2010;**10**:6195–240.
- Busti S, Mapelli V, Tripodi F et al. Respiratory metabolism and calorie restriction relieve persistent endoplasmic reticulum stress induced by calcium shortage in yeast. *Sci Rep* 2016;**6**:27942.
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 2009;**325**:201–4.
- De Paiva CS, Pflugfelder SC, Li DQ. Cell size correlates with phenotype and proliferative capacity in human corneal epithelial cells. *Stem Cells* 2006;**24**:368–75.
- Denoth Lippuner A, Julou T, Barral Y. Budding yeast as a model organism to study the effects of age. *FEMS Microbiol Rev* 2014;**38**:300–25.
- Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta* 2011;**1807**:568–76.
- Edgar BA, Kim KJ. Cell biology. Sizing up the cell. *Science* 2009;**325**:158–9.
- Fontana L, Partridge L. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell* 2015;**161**:106–18.
- Fraenkel DG. Carbohydrate metabolism. In: Strathern JN, Jones EW, Broach JR (eds). *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces Metabolism and Gene Expression*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 1–37.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;**114**:1752–61.
- Gancedo JM. The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol Rev* 2008;**32**:673–704.
- Gonchar MV, Maidan MM, Pavlishko HM et al. A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages. *Food Technol Biotech* 2001;**39**:37–42.
- Gupte SA. Targeting the pentose phosphate pathway in syndrome X-related cardiovascular complications. *Drug Dev Res* 2010;**71**:161–7.
- Hagman A, Piškur J. A study on the fundamental mechanism and the evolutionary driving forces behind aerobic fermentation in yeast. *PLoS One* 2015;**10**:e0116942.
- Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR et al. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 1974;**183**:46–51.
- Herman MA, Kahn BB. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J Clin Invest* 2006;**116**:1767–75.
- Jorgensen P, Tyers M. How cells coordinate growth and division. *Curr Biol* 2004;**14**:R1014–27.
- Jung DW, Ha HH, Zheng X et al. Novel use of fluorescent glucose analogues to identify a new class of triazine-based insulin mimetics possessing useful secondary effects. *Mol Biosyst* 2011;**7**:346–58.
- Kaeberlein M, Hu D, Kerr EO et al. Increased life span due to calorie restriction in respiratory-deficient yeast. *PLoS Genet* 2005;**1**:e69.
- Kim WH, Lee J, Jung DW et al. Visualizing sweetness: increasingly diverse applications for fluorescent-tagged glucose bioprobes and their recent structural modifications. *Sensors (Basel)* 2012;**12**:5005–27.
- Kwolek-Mirek M, Zadrag-Tecza R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Res* 2014;**14**:1068–79.
- Landolfo S, Politi H, Angelozzi D et al. ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochim Biophys Acta* 2008;**1780**:892–8.
- Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 2000;**289**:2126–8.
- Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA et al. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 2002;**418**:344–8.
- Liu L, Hu X, Cai GY et al. High glucose-induced hypertrophy of mesangial cells is reversed by connexin43 overexpression via PTEN/Akt/mTOR signaling. *Nephrol Dial Transplant* 2012;**27**:90–100.
- Losser MR, Damoiseil C, Payen D. Bench-to-bedside review: glucose and stress conditions in the intensive care unit. *Crit Care* 2010;**14**:231.
- Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2011;**121**:2111–7.
- Masoro EJ. Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 2000;**35**:299–305.
- Mathers JC. Impact of nutrition on the ageing process. *Brit J Nutr* 2015;**113** (Suppl):S18–22.
- Mattison JA, Roth GS, Beasley TM et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 2012;**489**:318–21.
- Molin M, Yang J, Hanzén S et al. Life span extension and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance elicited by caloric restriction require the peroxiredoxin Tsa1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 2011;**43**:823–33.
- Molon M, Szajwaj M, Tchorzewski M et al. The rate of metabolism as a factor determining longevity of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Age (Dordr)* 2016;**38**:11.
- Morocutti A, Earle KA, Sethi M et al. Premature senescence of skin fibroblasts from insulin-dependent diabetic patients with kidney disease. *Kidney Int* 1996;**50**:250–6.
- Nilsson A, Nielsen J. Metabolic trade-offs in yeast are caused by F1F0-ATP synthase. *Sci Rep* 2016;**6**:22264.
- Palabiyik B, Jafari Ghods F. Role of oxidative stress response and trehalose accumulation in the longevity of fission yeast. *Jundishapur J Microb* 2015;**8**:e16851.
- Rinnerthaler M, Büttner S, Laun P et al. Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial

- reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. *P Natl Acad Sci USA* 2012;**109**:8658–63.
- Rodicio R, Heinisch JJ. Sugar metabolism by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. In: König H, Uden G, Fröhlich J (eds). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer, 2009, 113–34.
- Rødkaer SV, Faergeman NJ. Glucose- and nitrogen sensing and regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 2014;**14**:683–96.
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res* 2002;**2**:183–201.
- Roy A, Dement AD, Cho KH et al. Assessing glucose uptake through the yeast hexose transporter 1 (Hxt1). *Plos One* 2015;**10**:e0121985.
- Sedeek M, Callera G, Montezano A et al. Critical role of Nox4-based NADPH oxidase in glucose-induced oxidative stress in the kidney: implications in type 2 diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal* 2010;**299**:F1348–58.
- Sedlic F, Muravyeva MY, Sepac A et al. Targeted modification of mitochondrial ROS production converts high glucose-induced cytotoxicity to cytoprotection: effects on anesthetic preconditioning. *J Cell Physiol* 2017;**232**:216–24.
- Serpillon S, Floyd BC, Gupte RS et al. Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am J Physiol Heart C* 2009;**297**:H153–62.
- Sharma PK, Agrawal V, Roy N. Mitochondria-mediated hormetic response in life span extension of calorie-restricted *Saccharomyces cerevisiae*. *Age (Dordr)* 2011;**33**:143–54.
- Slonimski PP, Perrodin G, Croft JH. Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal 'petites'. *Biochem Biophys Res Commun* 1968;**30**:232–9.
- Smith DL, Nagy TR, Allison DB. Calorie restriction: what recent results suggest for the future of ageing research. *Eur J Clin Invest* 2010;**40**:440–50.
- Soma S, Yang K, Morales MI et al. Multiple metabolic requirements for size homeostasis and initiation of division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell* 2014;**1**:256–66.
- Somsen OJ, Hoeben MA, Esgalhado E et al. Glucose and the ATP paradox in yeast. *Biochem J* 2000;**352**(Pt 2):593–9.
- Tamaki H, Yun CW, Mizutani T et al. Glucose-dependent cell size is regulated by a G protein-coupled receptor system in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 2005;**10**:193–206.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956;**123**:309–14.
- Widdel F. Theory and measurement of bacterial growth. *Di dalam Grundpraktikum Mikrobiologie* 2007;**4**.
- Wright J, Dungrawala H, Bright RK et al. A growing role for hypertrophy in senescence. *FEMS Yeast Res* 2013;**13**:2–6.
- Yang J, Dungrawala H, Hua H et al. Cell size and growth rate are major determinants of replicative lifespan. *Cell Cycle* 2011;**10**:144–55.
- Youk H, van Oudenaarden A. Growth landscape formed by perception and import of glucose in yeast. *Nature* 2009;**462**:875–9.
- Yu J, Wu Y, Yang P. High glucose-induced oxidative stress represses sirtuin deacetylase expression and increases histone acetylation leading to neural tube defects. *J Neurochem* 2016;**137**:371–83.
- Zadrag-Tecza R, Kwolek-Mirek M, Bartosz G et al. Cell volume as a factor limiting the replicative lifespan of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biogerontology* 2009;**10**:481–8.
- Zhang W, Cao Y, Gong J et al. Identification of residues important for substrate uptake in a glucose transporter from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Sci Rep* 2015;**5**:13829.
- Ziv N, Siegal ML, Gresham D. Genetic and nongenetic determinants of cell growth variation assessed by high-throughput microscopy. *Mol Biol Evol* 2013;**30**:2568–78.
- Zuin A, Carmona M, Morales-Ivorra I et al. Lifespan extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway. *EMBO J* 2010;**29**:981–91.

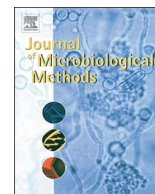
## SUPPLEMENTARY DATA



Supplementary figure 1 (Fig. S1)



Supplementary figure 2 (Fig. S2)



## Autofluorescence of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells caused by glucose metabolism products and its methodological implications



Roman Maslanka\*, Magdalena Kwolek-Mirek, Renata Zadrag-Tecza

University of Rzeszow, Faculty of Biology and Agriculture, Department of Biochemistry and Cell Biology, Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszow, Poland

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Autofluorescence  
Endogenous fluorophores  
Carbon flow  
Glucose analogue  
*Saccharomyces cerevisiae*

### ABSTRACT

Autofluorescence is the natural fluorescence emitted by cellular compounds which have light emission properties. The main examples of these compounds, identified as an endogenous fluorophores, include aromatic amino acids, vitamins, coenzymes and electron acceptors. As many of them play a critical role in cell metabolism, changes in their content may provide important information on the physiological status of the cell. Nevertheless, the simultaneous occurrence of different endogenous fluorophores in cells makes it difficult to interpret the autofluorescence signal. Autofluorescence values may also be imposed on values obtained through exogenous fluorescent dyes. This study evaluates the origin and the methodological implications of autofluorescence observed in yeast cells. The results show that the level of autofluorescence may differ between yeast cells, which are a result of different concentrations of endogenous fluorophores, including tryptophan, pyridoxine and riboflavin. The study also shows an important influence of autofluorescence on the results obtained by methods based on external fluorescent dyes.

### 1. Introduction

Fluorescence is a short-term light emission (lasting not longer than  $10^{-8}$  s after excitation) caused by absorption of electromagnetic radiation of visible, infrared or ultraviolet light. High sensitivity of fluorescence assays is the main reason why fluorescence is so frequently used in analytical methods applied in biochemistry and cell biology. Among these methods the most popular are the quantitative method of fluorescence spectroscopy, and the fluorescence microscopy method, which provides qualitative data. As molecules capable of emitting fluorescence, fluorophores are used for visualisation of non-fluorescent cell compounds or for obtaining information on the physiological status of cells. Therefore, fluorophores have fluorescence properties with a simultaneous affinity to particular cell structures from the outset, or show fluorescence after an appropriate transformation caused by biochemical reactions. The most commonly used fluorophores include 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), fluorescein derivatives, rhodamine derivatives and green fluorescent protein (GFP). However, cells may emit fluorescence also without addition of exogenous fluorescent dyes. This type of light emission, called autofluorescence, is caused by certain cell constituents that act as endogenous fluorophores (Monici, 2005). They include components widely distributed in all types of cells, such as aromatic amino acids (phenylalanine, tryptophan, tyrosine), vitamins (riboflavin, pyridoxine, thiamine), coenzymes and electron acceptors

(flavin adenine dinucleotide or FAD; reduced nicotinamide adenine dinucleotide with its phosphate derivative NAD(P)H) (Andersson et al., 1998; Monici, 2005). In the case of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells, autofluorescence is generally associated with the presence of tryptophan, pyridoxine, flavins and NAD(P)H (Horvath et al., 1993; Podrazký et al., 2003; Siano and Mutharasan, 1989). Autofluorescence may also be derived from compounds accumulated with age or in several disorders, which is especially visible in human cells. Examples include lipofuscin formed as a result of lipid peroxidation and porphyrins accumulated in the case of the impaired function of the enzymes responsible for heme synthesis (Andersson et al., 1998; Monici, 2005). The greatest abundance of autofluorescent molecules is noted for plant cells. Apart from chlorophylls, endogenous fluorophores occurring in plant cells include carotenoids, several cell wall components such as cutin or lignin, and also a large group of secondary metabolites including phenolics, flavonoids, alkaloids, glycosides and terpenoids (Monici, 2005; Talamond et al., 2015).

Cell molecules which exhibit fluorescence play an important role in cell metabolism or have a structural function. Therefore, changes in their amount or physicochemical properties provide information on the physiological status of cells. As a result, determination of autofluorescence can be based on analytical methods. An additional advantage of autofluorescence-based techniques is the possibility to perform measurement in real time in native biological samples because no

\* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Cell Biology, University of Rzeszow, Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszow, Poland.  
E-mail address: [romekmaslanka@gmail.com](mailto:romekmaslanka@gmail.com) (R. Maslanka).

additional steps such as staining or fixation are needed (Monici, 2005). Biosynthesis of most of the endogenous fluorophores e.g. tryptophan, pyridoxine, riboflavin is based on glucose-derived intermediates formed in the pentose phosphate pathway (Cohen, 2011). Thus, measuring autofluorescence can be useful in determination of cell energy metabolism and its changes in stressful conditions (Monici, 2005; Siano and Mutharasan, 1989). Autofluorescence-based techniques are also used in diagnostics and medical applications. These include monitoring of drug uptake and distribution, and discrimination between different types of blood cells or between normal and pathological cells such as cancer cells (Monici, 2005). In the case of microbiological studies tryptophan fluorescence is commonly used as an indicator of cell mass increase in the culture (Horvath et al., 1993; Podrazký et al., 2003). Determination of cell autofluorescence can also be useful for differentiating distinct strains or species of microbial cells (Bhatta and Goldys, 2008; Bhatta et al., 2006).

Detection and interpretation of autofluorescence may also cause certain difficulties. In biological samples such difficulties are mainly associated with simultaneous occurrence of different endogenous fluorophores. This is the reason for spectral complexity arising from the overlapping of individual spectra. Also, a large variety of fluorescent molecules located in the cell makes it difficult to identify which exactly cellular structures are associated with autofluorescence. It is generally considered that autofluorescence comes mainly from mitochondria and lysosomes or vacuoles (in animal or in fungi and plant cells) (Andersson et al., 1998; Monici, 2005). The level of cell autofluorescence also depends on environmental conditions; therefore insufficient standardisation of culture and measurement conditions may lead to additional complications (Monici, 2005). Evaluating the level of cell autofluorescence can be relevant in studies based on measurements of the compounds naturally occurred in biological samples e.g. age-related specific products (Na et al., 2001; Pincus et al., 2016). There are also several fluorophores such as fluorescence dyes, fluorescence proteins or quantum dots whose are used in determination of morphological and physiological parameters of the cells. The excitation and emission spectra of certain exogenous fluorophores may overlaps with the endogenous fluorophores such as coenzymes, flavins and flavoproteins. This overlapping can be particularly important in the case of fluorescence intensity measurements. Taking into consideration the above, autofluorescence phenomenon doesn't preclude using of fluorescence based methods, but makes necessary to apply appropriate controls.

In this report we demonstrate occurrence of and differences in autofluorescence coming from tryptophan, pyridoxine and riboflavin in yeast cells representing different genetic backgrounds. The aim of this study was also to point out the impact of autofluorescence on the results obtained through methods based on external fluorescent dyes. An example of such impact is shown in this paper by using the fluorescent glucose analogue 6-NBDG.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

6-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-6-deoxyglucose (6-NBDG), were from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA). Vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin ≥ 98%), vitamin B<sub>6</sub> hydrochloride (pyridoxine ≥ 99%), L-tryptophan (≥ 98%) were from Fluka – Sigma-Aldrich (Poznan, Poland). Components of culture media were from BD Difco (Becton Dickinson and Company, Spark, USA) except for glucose (POCH, Gliwice, Poland).

### 2.2. Yeast strains and growth conditions

The following yeast strains representing different genetic background were used: BY4741 *MATa his3 leu2 met15 ura3* (EUROSCARF), BMA64-1A *MATa his3-11\_15 leu2-3\_112 ura 3-1 trp1Δ2 ade2-1 can1-100*

(EUROSCARF) and SP4 *MATa leu1 arg4* (Biliński et al., 1978). Yeast was grown in the liquid YPD medium 1% Yeast Extract, 1% Yeast Bacto-Peptone with 2% glucose concentrations on a rotary shaker at 150 rpm, at the temperature of 28 °C.

### 2.3. Determination of fluorescence spectra of tryptophan, pyridoxine and riboflavin

The fluorescence spectra were performed in 1 µg/ml pure aqueous solution of riboflavin, pyridoxine and tryptophan. The fluorescence emission spectra were measured using the microplate reader *TECAN Infinite 200* at  $\lambda_{\text{ex}} = 290$  nm for tryptophan;  $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm for pyridoxine;  $\lambda_{\text{ex}} = 460$  nm for riboflavin. The excitation wavelength for each fluorophore were selected according to literature data (Bilski et al., 2000; Horvath et al., 1993; Wagnières et al., 1998) and on the basis of the level of autofluorescence observed in yeast cells. The values were expressed as a normalized fluorescence.

### 2.4. Estimation of tryptophan, pyridoxine and riboflavin content in the yeast cells

The fluorescence spectra were performed in yeast cells suspension using the same parameters as was used for pure solutions of the compounds. Yeast cells from the exponential phase of growth were washed twice with sterile PBS with pH 7.4 and suspended to final density of  $1 \times 10^8$  cells/ml in the same buffer. Tryptophan, pyridoxine and riboflavin contents were estimated at the wavelengths of  $\lambda_{\text{ex}} = 290$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 325$  nm;  $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 385$  nm;  $\lambda_{\text{ex}} = 460$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 535$  nm, respectively, using a *TECAN Infinite 200* microplate reader. The values were expressed in arbitrary unit.

### 2.5. Measurement of glucose uptake

Glucose uptake rate was determined by using 6-NBDG, a fluorescent non-hydrolysable glucose analogue. Yeast cells from the exponential phase of growth were washed twice with sterile PBS with pH 7.4 and suspended to final density of  $2 \times 10^8$  cells/ml in the same buffer.

The cell suspension was divided into two parts. One was incubated with 6-NBDG at the final concentration of 150 µM, the second one was a control without glucose analogue. Both attends were incubated at 28 °C for 90 min. The concentration of 6-NBDG and incubation time were selected after wide-ranging analyses the range of proposed by manufacturer (Molecular Probes) and used in another yeast studies based on glucose analogues. The reaction was stopped by washing the cells twice with PBS. The fluorescence of the cells was recorded using a *TECAN Infinite 200* microplate reader at  $\lambda_{\text{ex}} = 455$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 540$  nm. The values were expressed in arbitral unit as a total fluorescence intensity derived from cells incubated with 6-NBDG; autofluorescence intensity derived from cells incubated without 6-NBDG; the rate of glucose uptake determined as a fluorescence intensity obtained by subtracting the autofluorescence from value of total fluorescence intensity. The differences between cell incubated with or without 6-NBDG was also visualised by fluorescence microscopy at  $\lambda_{\text{ex}} = 455$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 540$  nm. The microscopic images were captured with the Olympus BX-51 microscope equipped with the DP-72 digital camera and cellSens Dimension software.

### 2.6. Statistical analysis

Results are presented as mean ± SD from at least three independent experiments. The statistical analysis was performed using STATISTICA 10.0 software. The statistical significance of the differences between the means obtained from analysed yeast strains was estimated using one-way ANOVA with the Tukey *post-hoc* test. The values were considered significant at  $p < 0.05$ . Used designation: *a* - different to SP4 strain; *b* - different to BY4741 strain; *c* - different to

BMA64-1A strain.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Autofluorescence and physiological status of the cells

The physiological status of the cell depends on continuous production and degradation of cellular components. Hence, various analytical methods, ranging from simple absorbance measurements to molecular and proteome analysis, are required to obtain information on the physiological state of the cells. Most of the studies are focused on transcriptional and translational regulation, mainly due to its fast rate of response to the changing conditions, or on protein turnover due to its high energy expense. However, proper cell functioning also requires many other equally important intracellular molecules, such as vitamins, coenzymes, ions or secondary metabolites involved in metabolic and structural functions. A lot of them have natural fluorescence emission properties. As a result, determination of autofluorescence may be treated as one of the useful analytical methods. The level of autofluorescence provides information on the physiological status of cells as a consequence of both physicochemical properties and different concentrations of native fluorophores in the cells. The amount of endogenous fluorophores can vary among various cell types, which is useful for distinguishing of the cells. This property is used *inter alia* for differentiation of microbial organisms as well as for strain characterization (Bhatta and Goldys, 2008; Bhatta et al., 2006). It is suggested that cells differing in autofluorescence may exhibit various behaviours in relation to the experimental conditions. In the case of research based on yeast, this may be highly relevant when strains representing different genetic backgrounds are used. It is worth noting that methods based on autofluorescence measurement have certain limitations arising from the fact that biological samples contain a mixture of many native fluorophores and their spectra overlap (Wagnières et al., 1998). Hence, despite the fact that optimum excitation and emission wavelengths are generally known for most of endogenous fluorophores, these parameters should be verified under the applicable environmental conditions. The obtained results refer to autofluorescence of yeast cells representing three different genetic backgrounds: SP4, BY4741, BMA64-1A and to the source of that phenomenon. The autofluorescence spectra were analysed for the most important endogenous fluorophores on the basis of their characteristic fluorescence. It was noted that a large part of autofluorescence signal arises from tryptophan, pyridoxine and flavins, including riboflavin (Figs. 1A–F). Under the prevalent conditions, the optimum excitation and emission wavelengths for tryptophan and riboflavin were the same or very similar to those noted in the literature data (Horvath et al., 1993; Wagnières et al., 1998), i.e. excitation at 290 nm and emission maximum at 325 nm for tryptophan; and excitation at 460 nm and emission maximum at 535 nm for riboflavin (Figs. 1A,E). The excitation wavelength was slightly shifted towards longer wavelengths for pyridoxine and was at 340 nm, while the emission maximum was approximately at 385 nm (Fig. 1C). To verify the origin of autofluorescence of the observed yeast cells, emission spectra were obtained for the solutions of pure compounds (Figs. S1A–C). Emission spectra of yeast cells autofluorescence and pure compounds were almost identical using the same wavelength of excitation (Figs. 1A,C,E; Fig. S1A–C). This confirms that autofluorescence in yeast cells comes *inter alia* from tryptophan, pyridoxine and flavins. Only in the case of emission spectra of tryptophan we observed a shift of emission maximum from 345 nm noted in pure solution to 325 nm reported for the yeast cell (Figs. 1A and S1A). This shift might be due to different chemical properties of tryptophan, which occurs in free state in pure aqueous solution and is incorporated into protein molecules in the cell. The excitation wavelength for pyridoxine was 340 nm, which was close to the excitation maximum for NAD(P)H considered an important source of intracellular autofluorescence. The emission maximum of this major electron acceptor is around

450–460 nm and is separated from emission maximum of pyridoxine (Andersson et al., 1998; Monici, 2005). No separate peak was observed for NAD(P)H fluorescence at 450–460 nm (Fig. 1C). Nevertheless, NAD(P)H fluorescence signal is emitted only from the reduced form sensitive to changes in environmental conditions. The reduced form is maintained under highly alkaline conditions, showing great sensitivity to oxygen concentration and can be degraded by UVA-induced photo-oxidation (Horvath et al., 1993; Monici, 2005). Hence, measurement of NAD(P)H fluorescence should be performed under strictly controlled conditions (temperature, pH and dissolved oxygen). Fluorescence emitted by flavins and aromatic amino acids remains relatively constant and for that reason seems to be more appropriate for determining the differences between cells. In studies performed on yeast, measurement of tryptophan fluorescence is regarded as an indicator of relative protein content of cells and cell mass in the culture (Horvath et al., 1993; Podrazký et al., 2003). It was observed that the level of autofluorescence determined for the wavelength characteristic to tryptophan fluorescence was similar in all used yeast strains representing different genetic backgrounds (Figs. 1A,B). These results may be interpreted as a premise that all used strains have comparable amount of intracellular proteins even though they differ in cell size (data not shown). It is worth underlying that the BMA64-1A yeast strain is not capable of tryptophan biosynthesis, but this disturbance not impair the proper cell growth on the YPD culture medium. However, it may affect cell metabolic pathways. As shown in Fig. 2 all of the noted endogenous fluorophores such as tryptophan, riboflavin and pyridoxine are directly dependent on glucose metabolism because their carbon skeleton comes from the glucose molecule. As a consequence, changes in one of the glucose utilisation pathways or in glucose availability may influence other pathways and result with different content of particular cellular metabolites. It has been observed that there are significant differences between the analysed yeast strains in the level of autofluorescence derived from pyridoxine and riboflavin, which may be linked to different levels of these compounds (Figs. 1C–F). In the case of pyridoxine fluorescence, the highest value observed for the BMA64-1A strain was 3 times higher than the values observed for other analysed strains (Figs. 1C,D). In turn, the lowest value was noted for the SP4 strain (Figs. 1C,D). The level of autofluorescence was also the highest for the BMA64-1A strain in the case of fluorescence derived from riboflavin (Figs. 1E,F). The reported substantial differences in autofluorescence among yeast strains derived from pyridoxine or riboflavin and the pathways of its formation (Fig. 2) may suggest metabolic differences among cells of the analysed yeast strains. Depending on the glucose concentration or actual cell needs, cell metabolism may change smoothly and modify carbon flow through cellular metabolic pathways, including glycolysis, aerobic respiration and pentose phosphate (PP) pathway. This suggests that the cells possess a specific metabolic trade-off. (Nilsson and Nielsen, 2016; Somsen et al., 2000). The existence of such specific carbon flow is supported among others by studies revealing that overexpression of enzymes involved in the PP pathway increases the carbon flux through that biosynthetic pathway, which leads to an increased intracellular pool of ribulose 5-phosphate while simultaneously enhancing riboflavin production (Duan et al., 2010; Wang et al., 2011). In the yeast cells, biosynthesis of pyridoxine may be especially vulnerable to availability of glucose-derived metabolites due to the fact that all carbon atoms in pyridoxine come from the glucose molecule. This has been shown by the studies evaluating the <sup>13</sup>C incorporation of D-glucose from <sup>13</sup>C-labeled samples. It was demonstrated that the five-carbon unit C-2',2,3,4,4' and the three-carbon unit C-6,5,5' of pyridoxine are derived from the C-2,3,4,5,6 and C-4,5,6 fragments of glucose, respectively (Gupta et al., 2001; Zeidler et al., 2003). Different concentrations of pyridoxine and riboflavin not only do influence the autofluorescence signal but their properties may significantly modify the physiological status of cells or cell stress responses. It has been shown that vitamin B<sub>6</sub>, which comprises pyridoxine and its interconvertible forms, exhibits the antioxidant activity. The

antioxidant activity is associated with different mechanisms, such as direct quenching of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion or singlet oxygen, or prevention of lipid peroxidation and inhibition of the glutathione content decrease by stimulating glutathione synthesis (Bilski et al., 2000; Chumnantana et al., 2005). In the latter mechanism, vitamin B<sub>6</sub> plays a vital role as a coenzyme of the two enzymes: cystathionine β-synthase and cystathionine γ-lyase involved in L-cysteine generation (Chumnantana et al., 2005; Wu and Lu, 2012). Additionally, vitamin B<sub>6</sub> also acts as a coenzyme in enzymes enabled in amino acids metabolism (Wu and Lu, 2012). Riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) has similar antioxidant properties to those noted for pyridoxine. Furthermore, riboflavin, in the form of FAD, plays an important role as a coenzyme of glutathione reductase which maintains the proper intracellular level of reduced glutathione (GSH) (Ashoori and Saedisomeolia, 2014). The significant influence of riboflavin on GSH content in the cells is supported by studies showing that disruption in glutathione biosynthesis leads to riboflavin oversynthesis (Blazhenko, 2014). Antioxidant properties of riboflavin are also connected with riboflavin's direct scavenging on ROS (Ashoori and Saedisomeolia, 2014). In addition, pyridoxine and riboflavin are also relevant for cell redox processes, among other things by interacting with iron (Gudipati et al., 2014; Sabirov et al., 1993). Taking the above into account, both the properties and the content of cellular compounds exhibiting fluorescence have influence on physiological parameters of the cells and consequently, their response under the changing conditions e.g.

oxidative stress.

### 3.2. Autofluorescence and methods based on exogenous fluorescent dyes

Most of fluorescence assays are performed on cells with the use of exogenous fluorescent dyes for which optimal excitation and emission wavelengths are generally well known. In such studies autofluorescence is unwanted (albeit often overlooked) because its interference with fluorescence emitted by exogenous dyes may completely impair the results. This problem appeared in the assay with the fluorescent glucose analogue 6-NBDG (Figs. 3A-D). An analysis using 6-NBDG was performed to evaluate the rate of glucose uptake in different yeast cells. According to the manufacturer's information, fluorescence of 6-NBDG displayed excitation and emission maxima at 465 nm and 540 nm, respectively. The analysis of total fluorescence intensity derived from cells incubated with 6-NBDG (Fig. 3A) suggested that yeast strains representing different genetic backgrounds have significantly different glucose uptake rates. The highest rate of glucose uptake was noted for the BMA64-1A strain and the lowest for the BY4741 strain (Fig. 3A). However, the excitation and emission wavelengths of 6-NBDG overlapped with wavelengths corresponding to flavin fluorescence. Hence, the level of autofluorescence of the strains was examined (Fig. 3B). It was observed that the BMA64-1A strain had a significantly higher level of autofluorescence in comparison to the other analysed yeast strains. Therefore, in order to define the adequate rate of glucose uptake, the

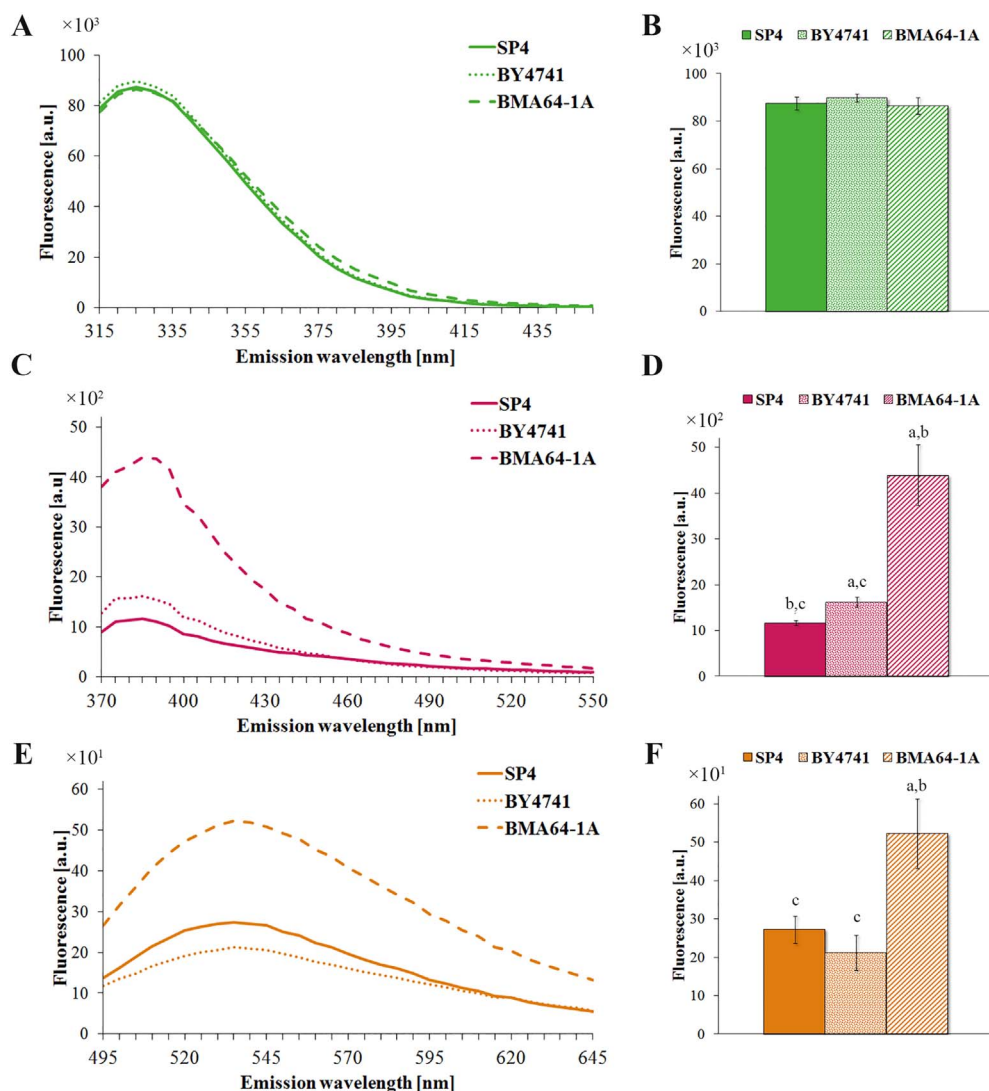


Fig. 1. The autofluorescence of the different wild-type yeast strains cells determined for the wavelength characteristic to particular compound. The emission spectrum corresponding to tryptophan fluorescence (A); the maximum autofluorescence value corresponding to tryptophan fluorescence (B); the emission spectrum corresponding to pyridoxine fluorescence (C); the maximum autofluorescence value corresponding to pyridoxine fluorescence (D); the emission spectrum corresponding to riboflavin fluorescence (E); the maximum autofluorescence value corresponding to riboflavin fluorescence (F). Error bars indicate SD. The letters a, b, c indicate the differences between values observed in different wild-type yeast strains; a – different to SP4 strain, b - different to BY4741 strain, c - different to BMA64-1A strain, respectively.

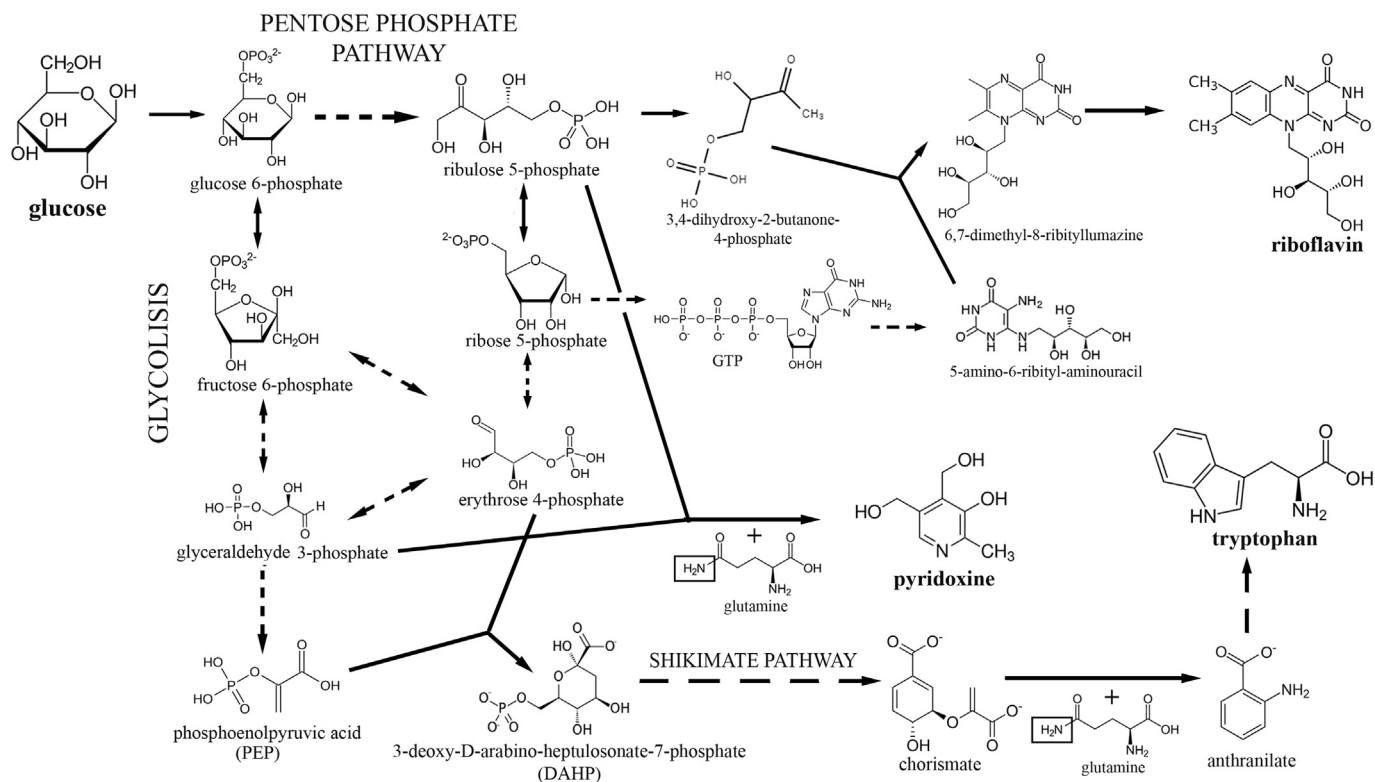


Fig. 2. Facilitated biosynthetic pathways scheme of tryptophan, pyridoxine and riboflavin formation. The biosynthesis of tryptophan, pyridoxine and riboflavin is based on the glucose-derived intermediates mainly formed in the pentose phosphate pathway. Performed on the basis of (Cohen, 2011; Dunn, 2015; Gudipati et al., 2014; Zeidler et al., 2003).

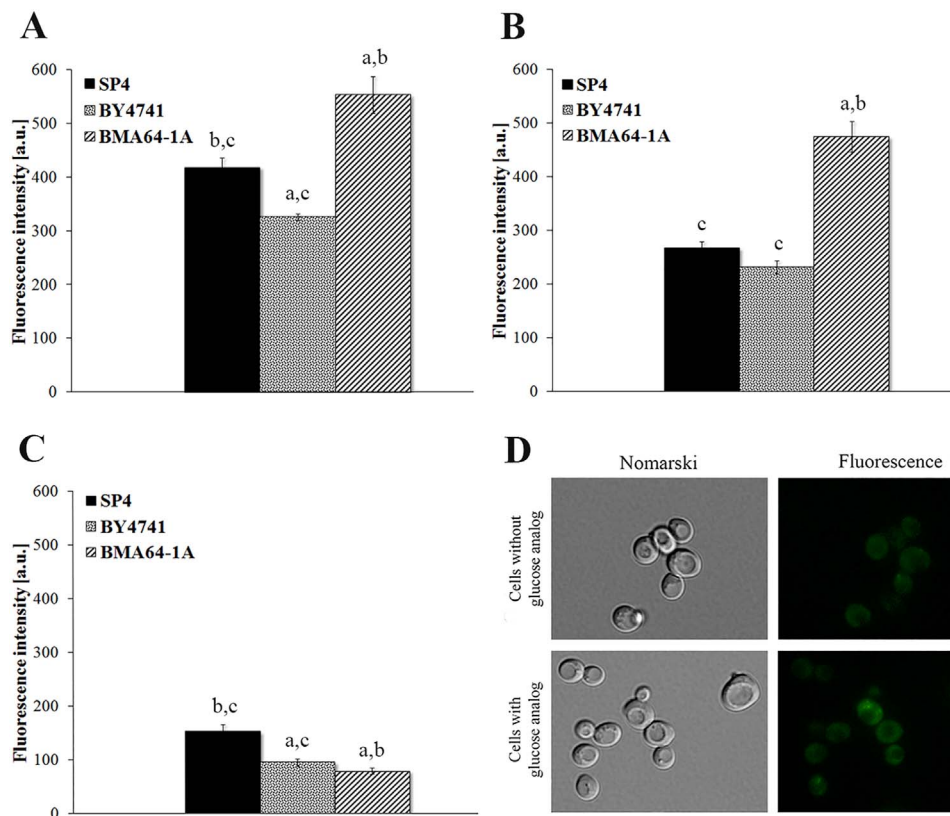


Fig. 3. Fluorescence intensity obtained in the assay using a fluorescent glucose analog (6-NBDG). The total fluorescence intensity (A) derived from cells incubated with 6-NBDG; auto-fluorescence intensity (B) derived from cells incubated without 6-NBDG; the rate of glucose uptake (C) obtained by subtracting the auto-fluorescence from the values of total fluorescence intensity; the microscopic images of yeast cells labeled with 6-NBDG (D). Magnification 1000 ×. Error bars indicate SD. The letters a, b, c indicate the differences between values observed in different wild-type yeast strains; a – different to SP4 strain, b - different to BY4741 strain, c - different to BMA64-1A strain, respectively.

autofluorescence signal was subtracted from the value of total fluorescence intensity. The obtained result (Fig. 3C) showed completely different relationships among the analysed strains in comparison to the total fluorescence intensity results (Fig. 3A). Cells of the yeast strains used in the analysis had different glucose uptake rates, although the highest rate of glucose uptake was noted for the SP4 strain and the lowest for the BMA64-1A strain. To indicate the differences among the cells incubated with or without 6-NBDG, the exemplary cells were visualised under fluorescence microscopy. The differences are shown using microscopic images (Fig. 3D). These relatively simple designations highlight the necessity of monitoring the autofluorescence level in biological samples, especially when exogenous fluorescence dyes are used.

#### 4. Conclusions

The results presented in this report demonstrate that yeast cell autofluorescence varies inter alia for the tryptophan, pyridoxine and riboflavin. Yeast cells representing different genetic backgrounds have significantly different levels of autofluorescence, which is a result of different concentrations of endogenous fluorophores. Different concentrations of pyridoxine and riboflavin, considering their antioxidant properties, may cause different physiological reactions in the analysed yeast strain cells. Furthermore, the study also shows the important influence of autofluorescence on the results obtained by methods based on external fluorescent dyes.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.01.017>.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Polish National Science Centre [Grant no. DEC-2013/09/B/NZ3/01352].

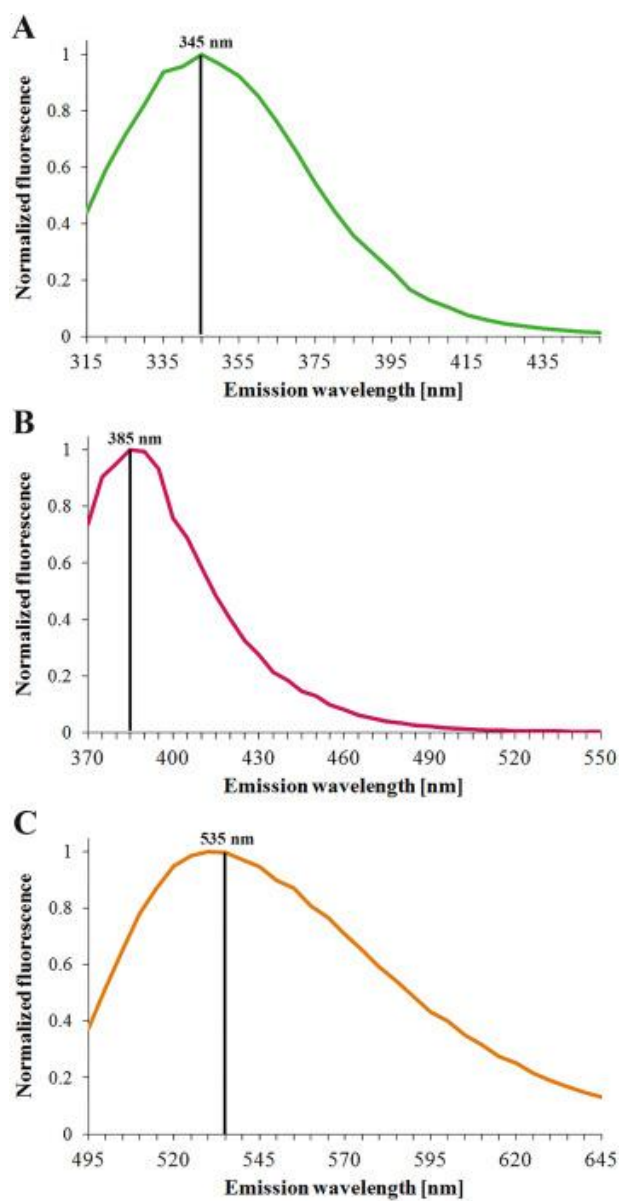
#### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### References

- Andersson, H., Baechi, T., Hoehel, M., Richter, C., 1998. Autofluorescence of living cells. *J. Microsc.* 191, 1–7.
- Ashoori, M., Saedisomeolia, A., 2014. Riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) and oxidative stress: a review. *Br. J. Nutr.* 111, 1985–1991.
- Bhatta, H., Goldys, E.M., 2008. Characterization of yeast strains by fluorescence lifetime imaging microscopy. *FEMS Yeast Res.* 8, 81–87.
- Bhatta, H., Goldys, E.M., Learmonth, R.P., 2006. Use of fluorescence spectroscopy to differentiate yeast and bacterial cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 121–126.
- Biliński, T., Lukaszewicz, J., Sledziewski, A., 1978. Demonstration of anaerobic catalase synthesis in the cz1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 1225–1233.
- Bilski, P., Li, M.Y., Ehrenshaft, M., Daub, M.E., Chignell, C.F., 2000. Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem. Photobiol.* 71, 129–134.
- Blazhenko, O.V., 2014. Glutathione deficiency leads to riboflavin oversynthesis in the yeast *Pichia guilliermondii*. *Curr. Microbiol.* 69, 10–18.
- Chumnantana, R., Yokochi, N., Yagi, T., 2005. Vitamin B6 compounds prevent the death of yeast cells due to menadione, a reactive oxygen generator. *Biochim. Biophys. Acta* 1722, 84–91.
- Cohen, G.N., 2011. *Microbial Biochemistry*. Springer Science+Business Media B.V, London New York.
- Duan, Y.X., Chen, T., Chen, X., Zhao, X.M., 2010. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase enhances riboflavin production in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1907–1914.
- Dunn, M.F., 2015. Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. *Crit. Rev. Microbiol.* 41, 411–451.
- Gudipati, V., Koch, K., Lienhart, W.D., Macheroux, P., 2014. The flavoproteome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1844, 535–544.
- Gupta, R.N., Hemscheidt, T., Sayer, B.G., Spenser, I.D., 2001. Biosynthesis of vitamin B(6) in yeast: incorporation pattern of glucose. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 11353–11359.
- Horvath, J.J., Glazier, S.A., Spangler, C.J., 1993. In situ fluorescence cell mass measurements of *Saccharomyces cerevisiae* using cellular tryptophan. *Biotechnol. Prog.* 9, 666–670.
- Monici, M., 2005. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11, 227–256.
- Na, R., Stender, I.M., Henriksen, M., Wulf, H.C., 2001. Autofluorescence of human skin is age-related after correction for skin pigmentation and redness. *The Journal of investigative dermatology.* 116, 536–540.
- Nilsson, A., Nielsen, J., 2016. Metabolic trade-offs in yeast are caused by F1F0-ATP synthase. *Sci. Rep.* 6, 22264.
- Pincus, Z., Mazer, T.C., Slack, F.J., 2016. Autofluorescence as a measure of senescence in *C. elegans*: look to red, not blue or green. *Aging* 8, 889–898.
- Podrazký, O., Kuncová, G., Krasowska, A., Sigler, K., 2003. Monitoring the growth and stress responses of yeast cells by two-dimensional fluorescence spectroscopy: first results. *Folia Microbiol (Praha).* 48, 189–192.
- Sabirov, V.K., Porai-Koshitz, M.A., Struchkov, Y.T., 1993. Structure of the dimeric complex of iron(III) chloride with pyridoxine. *Acta Crystallographica. C* 49, 1611–1614.
- Siano, S.A., Mutharasan, R., 1989. NADH and flavin fluorescence responses of starved yeast cultures to substrate additions. *Biotechnol. Bioeng.* 34, 660–670.
- Somsen, O.J., Hoebe, M.A., Esgalhad, E., Snoep, J.L., Visser, D., van der Heijden, R.T., Heijnen, J.J., Westerhoff, H.V., 2000. Glucose and the ATP paradox in yeast. *Biochem. J.* 352 (Pt 2), 593–599.
- Talamond, P., Verdeil, J.L., Conéjéro, G., 2015. Secondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells. *Molecules* 20, 5024–5037.
- Wagnières, G.A., Star, W.M., Wilson, B.C., 1998. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem. Photobiol.* 68, 603–632.
- Wang, Z., Chen, T., Ma, X., Shen, Z., Zhao, X., 2011. Enhancement of riboflavin production with *Bacillus subtilis* by expression and site-directed mutagenesis of zwf and gnd gene from *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresour. Technol.* 102, 3934–3940.
- Wu, X.Y., Lu, L., 2012. Vitamin B6 deficiency, genome instability and cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 13, 5333–5338.
- Zeidler, J., Gupta, R.N., Sayer, B.G., Spenser, I.D., 2003. Biosynthesis of vitamin B(6) in yeast. Incorporation pattern of trioses. *J. Organomet. Chem.* 68, 3486–3493.

## SUPPLEMENTARY DATA



**Fig. S1.** Emission spectra of the pure [aqueous solution](#) of particular compounds. Tryptophan (A), pyridoxine (B), riboflavin (C). The *lines* indicate the emission maximum for each compound.

## ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

# Less is more or more is less: Implications of glucose metabolism in the regulation of the reproductive potential and total lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast

Roman Maslanka | Renata Zadrag-Tecza 

Department of Biochemistry and Cell Biology,  
Faculty of Biotechnology, University of  
Rzeszow, Rzeszow, Poland

## Correspondence

Renata Zadrag-Tecza, Department of  
Biochemistry and Cell Biology, Faculty of  
Biotechnology, University of Rzeszow,  
Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszow, Poland.  
Email: retecz@ur.edu.pl

## Funding information

Narodowe Centrum Nauki, Grant/Award  
Number: DEC-2013/09/B/NZ3/01352

## Abstract

Carbohydrates are dietary nutrients that have an influence on cells physiology, cell reproductive capacity and, consequently, the lifespan of organisms. They are used in cellular processes after conversion to glucose, which is the primary source of energy and carbon skeleton for biosynthetic processes. Studies of the influence of glucose on cellular parameters and lifespan of organisms are primarily concerned with the effect of low glucose concentration defined as calorie restriction conditions. However, the effect of high glucose concentration on cell physiology is also very important. Thus, a comparative analysis of the effects of low and high glucose concentration conditions on cell efficiency was proposed with regard to reproductive capacity and total lifespan of the cell. Glucose concentration determines the type of metabolism and biosynthetic capabilities, which in turn, through the regulation on the cell size, may affect the reproductive capacity of cells. This study was conducted on yeast cells of wild-type and mutant strains  $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$  with glucose signalling pathway impairment. Such an experimental model enabled testing both the role of glucose concentration in the regulation of metabolic changes and the extent to which these changes depend on the extracellular or intracellular glucose concentrations. It has been shown here that calorie/glucose excess connected with changes in cell metabolic fluxes increases biosynthetic capabilities of yeast cells. This leads to an increase in cell dry weight accompanied by the increase in cell size and a simultaneous decrease in the reproductive potential and the overall length of cell life.

## KEYWORDS

biosynthesis, calorie excess, calorie restriction, cell size, reproductive potential, total lifespan

## 1 | INTRODUCTION

Calorie restriction (CR) is a well-established phenomenon known to improve the healthspan and functionality of a wide range of organisms (Fontana & Partridge, 2015; Gems & Partridge, 2013). In general, CR stands for reduction of calorie intake (ca. 30%) without malnutrition, although several studies also evaluate the activity of its more convenient substitute that is intermittent fasting (Fontana & Partridge, 2015; Longo & Mattson, 2014). Since

1935, when McCay et al. (1989) presented for the first time the health benefits arising from restricted diets, CR studies have become an important field of physiological and ageing research. There are several hypotheses explaining positive effects of CR such as reduction of metabolic rate, reduction of reactive oxygen species (ROS) generation or improving intracellular protein turnover (Heilbronn & Ravussin, 2003; Masoro, 2000; Redman et al., 2018; Sinclair, 2005; Tavernarakis & Driscoll, 2002). These also include the hypothesis based on the activation of sirtuins that is,

NAD-dependent protein deacetylases. Regulation of the activity of sirtuins is very complex, particularly, because NAD<sup>+</sup> as a cosubstrate for sirtuin activity is connected with a number of metabolic processes, including metabolic redox reactions. CR induces the metabolic changes by transition to respiration, which may result in an increase of the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio (Lu & Lin, 2010). In turn, changes in the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio may induce a broad alteration in cellular metabolism and physiology. However, none of these hypotheses individually explains the entire phenomenon as such, suggesting complexity of the CR mechanism (Masoro, 2000; Sinclair, 2005). The unquestionable benefit of CR is prevention of age-related disturbances and improving the overall functionality of organisms (Colman et al., 2014; Fontana & Partridge, 2015; Mattison et al., 2017; Smith, Nagy, & Allison, 2010). On the other hand, CR's impact on the increase in life expectancy is less obvious and is still a matter of debate (Austad, 2012; Biliński, Paszkiewicz, & Zdrag-Tecza, 2015; Colman et al., 2009, 2014; Mattison et al., 2012, 2017; Smith et al., 2010). It should be pointed out that in most of CR studies the control organisms are fed ad libitum, which in practice means provision of excess calories (Austad, 2012; Colman et al., 2009). This is in contrast to the conditions found in the natural environment, where nutrients are limited and periods of excess are interspersed with periods of scarcity (Biliński et al., 2015; Zimmet & Thomas, 2003). Therefore, it is necessary to introduce the concept of calorie excess (CE) as a state in which the amount of nutrient supply is higher than the actual demand of the metabolic processes (Biliński et al., 2015; Maslanka, Kwolek-Mirek, & Zdrag-Tecza, 2017; Mathers, 2015; Zimmet & Thomas, 2003). Analysing CE influence on the organism physiology seems to be especially important due to the global epidemic of obesity, type 2 diabetes, cardiovascular diseases and metabolic syndrome, which are the results of the hunter-gatherer genotype being undeniably ill-suited to modern lifestyles (Biliński et al., 2015; Brown, 2014; Mathers, 2015; Zimmet & Thomas, 2003).

Carbohydrates are the most intensively studied dietary nutrients that have an influence on physiology and lifespan of many organisms (Lee, Son, Jung, & Lee, 2017). They are used in cellular processes after conversion to glucose, which is the primary source of energy and carbon skeleton for biosynthetic processes. Hence, the influence of different glucose concentrations on physiology and cell lifespan has been studied on several cellular models, including the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. These studies are primarily concerned with the effect of low glucose concentration (regarded as CR conditions) on lifespan and cell physiology (Barros, Bandy, Tahara, & Kowaltowski, 2004; Denoth Lippuner, Julou, & Barral, 2014; Huberts et al., 2014; Kaeberlein et al., 2005; Lin et al., 2002; Maslanka et al., 2017; Schleit et al., 2013; Sharma, Agrawal, & Roy, 2011; Tahara et al., 2013; Zuin, Castellano-Esteve, Ayté, & Hidalgo, 2010). Nevertheless, there is a clear discrepancy between results obtained from different studies. The effect of CR on yeast lifespan seems to be influenced by genetic background (Schleit et al., 2013), it also depends on methodological and control differences

between particular studies (Huberts et al., 2014). It was proposed that CR extends yeast lifespan by increasing respiration (Lin et al., 2002; Tahara et al., 2013), yet the findings confirming that CR increases lifespan in respiratory-deficient yeast cells ( $\rho^0$ ) challenged this point of view (Kaeberlein et al., 2005). Furthermore, it was also postulated that CR works through activation of sirtuins (Lin, Defossez, & Guarente, 2000; Lin, Ford, Haigis, Liszt, & Guarente, 2004), although there are results presenting sirtuin-independent action of CR (Kaeberlein, Kirkland, Fields, & Kennedy, 2004; Smith, McClure, Matecic, & Smith, 2007). It is also unclear whether the generation of ROS is decreased (Barros et al., 2004; Maslanka et al., 2017) or increased (Sharma et al., 2011; Zuin et al., 2010) in yeast cells growing under CR conditions. For this reason, the problem of CR is still the subject of a number of studies. Meanwhile, there are few analyses concerning the mechanism of action of CE. In this case, by analogy with the CR conditions, CE conditions mean higher glucose concentrations (Maslanka et al., 2017). Currently, there are only limited data showing the influence of high glucose concentration on yeast cell physiology (Roux et al., 2009; Weinberger et al., 2010; Zuin et al., 2010).

The impact of CR and CE on the physiology of yeast cells undeniably concerns the cellular metabolism, because availability of glucose determines the type of yeast metabolism that is, fermentation or aerobic respiration (Rolland, Winderickx, & Thevelein, 2002). The particularly strong influence of glucose concentration on the physiology and metabolism of yeast cells is further strengthened by the Crabtree effect relying on fermentative metabolism even under aerobic conditions. The causes of this phenomenon have not been yet fully understood. Generally, preference of less energy efficient fermentative metabolism by yeast cells is partly due to the evolutionary and ecological forces connected with increased production of ethanol (Dashko, Zhou, Compagno, & Piskur, 2014; Hagman, Sall, Compagno, & Piskur, 2013). However, a similar type of metabolism (obtaining energy by glycolysis) observed in other highly proliferating cells, including cancer cells (Diaz-Ruiz, Rigoulet, & Devin, 2011; Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009) and stem cells (Folmes & Terzic, 2016; Hu et al., 2016), indicates other possible explanations of the phenomenon. It has been emphasised that growth strategies are determined by specific cellular economics responding to extracellular conditions and intracellular demands. The metabolic trade-off between different types of glucose utilisation seems to influence the physiological efficiency of the cell (Folmes & Terzic, 2016; Molenaar, van Berlo, de Ridder, & Teusink, 2009; Nilsson & Nielsen, 2016; Vander Heiden et al., 2009).

The aim of this study is to provide a comprehensive analysis of the role of glucose concentration, whether decreased (CR) or increased (CE), in determining the reproductive potential of yeast cells and its impact on the total lifespan of the cells. For that purpose, parameters such as reproductive potential and total lifespan, mean cell size in population and parameters connected with biosynthesis capacity of the cell were analysed. Studies were performed using wild-type (WT) yeast strain and strains with disruption of genes involved in glucose signalling, which enabled a comprehensive analysis of CE influence on cell physiology.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Chemicals

6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-6-deoxyglucose (6-NBDG) were from Molecular Probes (Eugene, OR). BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability and NADP/NADPH-Glo™ Assay Kits were from Promega (Madison, WI). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Poznan, Poland). Components of culture media were from BD Difco (Becton Dickinson and Company, Spark) except for glucose (POCH, Gliwice, Poland).

### 2.2 | Yeast strains and growth conditions

The following yeast strains were used: WT BY4741, *MATa his3 leu2 met15 ura3* and two mutant strains isogenic to BY4741,  $\Delta$ *gpa2* and  $\Delta$ *gpr1* (Euroscarf). Yeast was grown in the liquid yeast extract-peptone (YP) medium (1% yeast extract and 1% yeast bacto-peptone) with different glucose concentrations (0.5%, 2%, and 4%) on a rotary shaker at 150 rpm, at 28°C.

### 2.3 | Measurement of glucose uptake

Glucose uptake rate was determined by using 6-NBDG, a fluorescent nonhydrolysable glucose analogue as described previously (Maslanka et al., 2017). Cells from the early exponential phase of growth were washed and suspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS) with pH 7.4. 6-NBDG was added to the cell suspension at the final concentration of 150  $\mu$ M. Cells were incubated at 28°C for 90 min. After incubation, the reaction was stopped by twice washing the cells with PBS. The fluorescence of the cells was recorded using a Tecan Infinite 200 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria) at  $\lambda_{\text{ex}} = 455$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 540$  nm. The values were expressed as a percentage compared with the WT strain.

### 2.4 | Determining reproductive potential and reproductive, postreproductive and total lifespans

Reproductive potential of yeast cells was determined by a routine procedure (Wawryn, Krzepilko, Myszka, & Bilinski, 1999) on cells placed on agar plates using a micromanipulator. Yeast lifespan (reproductive and postreproductive) was determined as described (Minois, Frajnt, Wilson, & Vaupel, 2005) with modifications described in Zdrag, Bartosz, & Bilinski (2008). One-microliter aliquots of overnight yeast cultures grown on yeast extract-peptone-dextrose (YPD) liquid medium with specified glucose concentration were dropped on YPD plates with solid medium containing specified concentration of glucose (0.5%, 2% and 4%, respectively) and phloxine B at the concentration of 10  $\mu$ g/ml. For each experiment, 40 single cells were micromanipulated to the appointed area. The first daughters were chosen as the starting cells, and their successive buddings were followed to determine the reproductive potential. After the last budding, yeast cells were inspected to determine the moment of cell death and length of their postreproductive lifespan. The total lifespan

was calculated as the sum of the hours which the cell spent in the reproductive and postreproductive phases of its life. During the manipulation, the plates were kept at 28°C for 16 hr and at 4°C during the night. The data represent mean values from two separate experiments. The values of reproductive potential were also presented as a histogram, which is a graphic representation of distribution of that parameter in analysed population of cell.

### 2.5 | Cell size estimation

The mean value of the cell size in the population was estimated through analysis of microscopic images captured with an Olympus BX-50 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a Sony SSP-DC50AP digital camera (Sony, Tokyo, Japan). Diameter of the cell was measured using the MicroImage 3.0 software (Olympus Poland, Warsaw, Poland). Cell diameter was measured in two perpendicular planes for each cell and the mean value was used for calculations. For each yeast strain cultured in medium with different glucose concentrations at least 300 cells were counted. The values were presented as a histogram, a graphic representation of cell size distribution.

### 2.6 | Determining dry weight of yeast cells

Cell biomass was determined through the analysis of cell dry weight using moisture analyser. Samples of cell suspensions were taken from the early exponential phase culture. Cells were centrifuged, washed two times in sterile Milli Q water and suspended to density of  $2 \times 10^9$  cells/ml in sterile Milli Q water. Cell dry weight was determined by drying samples at 105°C in MAC 50/NH Radwag moisture analyser (Radwag, Radom, Poland). The drying programme was set to end when no change in weight (lasting about 60 s) was achieved. The data are expressed as cell dry mass per single cell.

### 2.7 | Assessment of the cellular adenosine triphosphate (ATP) content

The level of ATP in yeast cells was determined with BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay according to the manufacturer's protocol (Promega) with own modifications. Cells from the early exponential phase of growth were suspended in a 100 mM phosphate buffer with pH 7.0, containing 0.1% glucose and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid. A sample of cell suspension with a density of  $10^6$  cells/ml was used for determination purposes. The luminescent signal, proportional to the amount of ATP, was recorded using the Tecan Infinite 200 microplate reader after an appropriate time (until the luminescence signal reached a stable level).

### 2.8 | Pentose phosphate (PP) pathway enzyme activity assays

The total dehydrogenase activity (understood as the sum of both glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD) activities) and separately the 6-PGD activity

were determined spectrophotometrically by measuring the rate of NADP<sup>+</sup> reduction at 340 nm according to the method described by Tian et al. (1998) with own modifications. G6PD activity was calculated by subtracting the activity of 6-PGD from the total enzyme activity. To obtain the total dehydrogenase activity 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.4 mM D-glucose-6-phosphate and 0.4 mM 6-phosphogluconate as reaction substrates were used. The substrates were added to 100 mM Tris-HCl buffer with pH 8.0 containing 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Addition of 5  $\mu$ l cell extract (2 mg/ml) initiated the reaction. In turn, to obtain 6-PGD activity, only 0.2 mM NADP<sup>+</sup> and 0.4 mM 6-phosphogluconate were used as reaction substrates. The kinetics of absorbance increase was recorded for 3 min using Tecan Infinite 200 microplate reader at  $\lambda = 340$  nm. The data were expressed in arbitrary units.

## 2.9 | Determining NADPH, NADP<sup>+</sup> content and NADP(H) pool

NADP<sup>+</sup>, NADPH, contents in yeast cells were assessed with NADP/NADPH-Glo Assay according to the manufacturer's protocols (Promega). Cells from the early exponential phase culture were centrifuged, washed, suspended to density of  $2 \times 10^6$  cells/ml in PBS buffer and used for determination purposes. Luminescence was recorded for 3 hr using the Tecan Infinite 200 microplate reader. The value of the blank was subtracted each time. The results were presented as a share of the NADP<sup>+</sup> cofactor in the total NADP(H) pool.

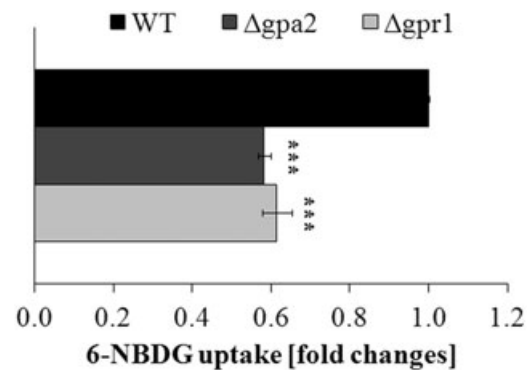
## 2.10 | Statistical analysis

The results are presented as mean  $\pm$  SD from at least three independent experiments (apart from determination of yeast lifespan). The statistical analysis was performed using the STATISTICA 10.0 software (StatSoft Poland, Krakow, Poland). The statistical significance of the differences between the WT strain in comparison to the mutant strains were estimated using one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post-hoc test. The statistical significance of the differences between means of the three media compared was evaluated using one-way ANOVA with the Tukey post-hoc test. Homogeneity of variance was checked using Levene's test. The values were considered significant at  $p < 0.05$ . Explanation of symbols, differences between strains \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; differences between media, (a) different to medium with 0.5% glucose, (b) different to medium with 2% glucose, (c) different to medium with 4% glucose. The relationship between the cell size, reproductive potential and dry biomass was confirmed through calculation of the Pearson correlation coefficient. The correlation coefficient values were considered significant at  $p < 0.05$ .

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Extracellular and intracellular glucose concentrations

As the preferred carbon and energy source, glucose plays an important role in cell metabolism and thus has impact on cellular

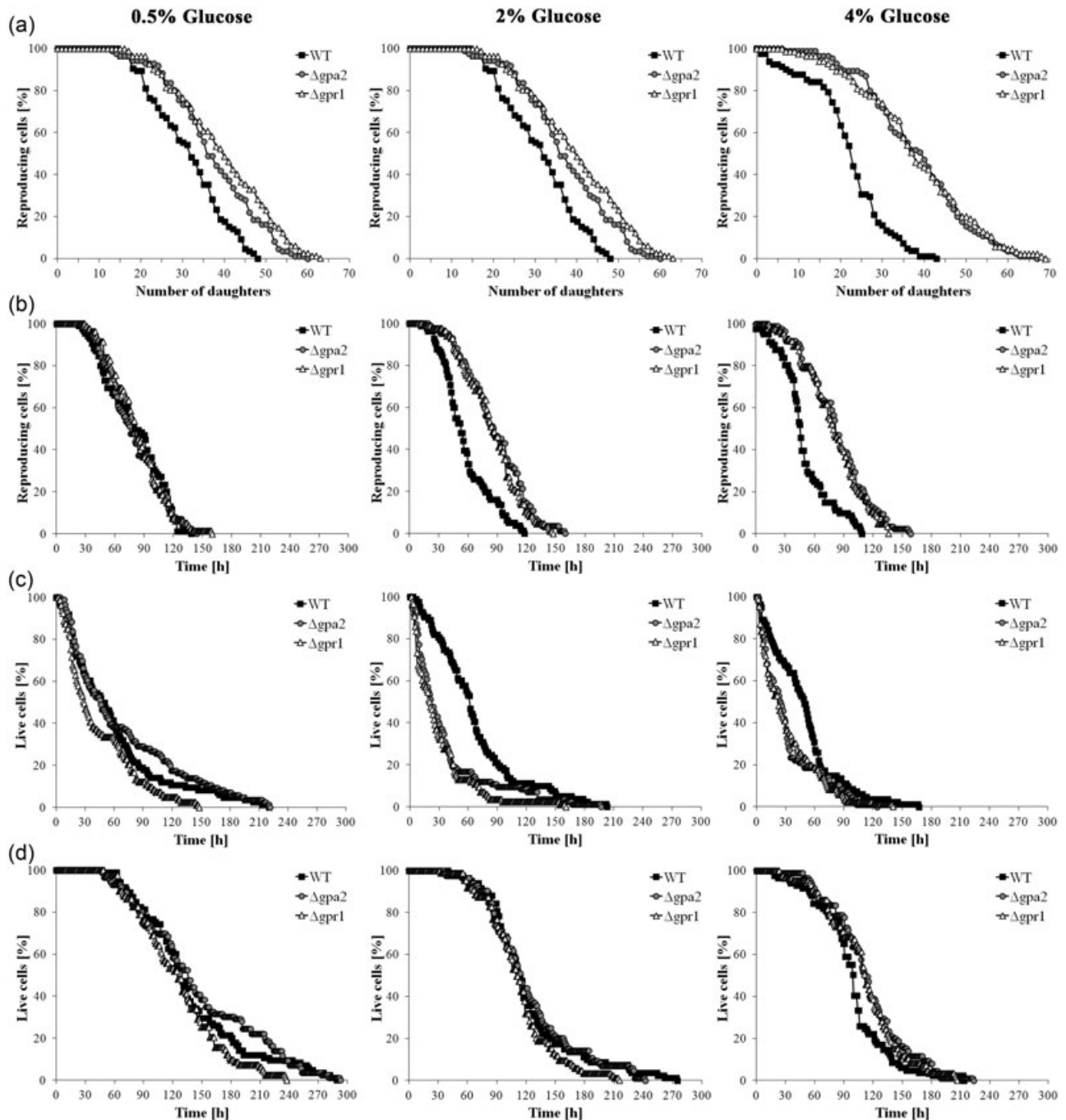


**FIGURE 1** The rate of glucose uptake by cultured yeast cells of WT and mutants strains  $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$ . Quantification of relative glucose uptake was performed by measuring the fluorescent signal after incubation with 6-NBDG. The data are presented as fold of changes in relation to WT strain  $\pm$  SD from three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$  of significantly different values with respect to the WT strain. 6-NBDG: 6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-6-deoxyglucose; WT: wild type

physiology. The level of available glucose is considered to be the main factor determining the type of metabolic changes. In general, the effect of glucose on yeast cells is analysed by subjecting the cells to conditions with or without glucose. However, as indicated by the studies evaluating different concentrations of the glucose component in the medium (Maslanka et al., 2017), a vital role is played not only by the extracellular level but also, and perhaps above all, by the intracellular level of glucose. Therefore, in addition to various glucose concentration conditions in the medium, in these studies yeast mutant strains ( $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$ ) with impaired glucose signalling connected with the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) pathway were used. For the purpose of the analysis of the level of glucose entering the cell, the rate of fluorescent nonhydrolysable glucose analogue (6-NBDG) uptake was determined. The results showed a significant reduction in glucose uptake rate for the  $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$  strains in comparison with the WT strain, while there were no significant changes with regard to the analysed parameter between the mutant strains (Figure 1). The decrease in the rate of glucose uptake in both mutant strains reached approximately 40%. The research material applied made it possible to assess the extent to which regulation of intracellular metabolic changes depends on the intracellular level of glucose because earlier studies and the results of this study both suggest that intracellular glucose level seems to be extremely important for proper cell physiology.

### 3.2 | Glucose has impact on the reproductive potential and total lifespan of the yeast cell

Through physiological changes, glucose may have a distinct effect on other aspects of cell functioning. This applies primarily to reproductive capacity as it depends on the physiological efficiency of the cell. It also applies to total lifespan of the cell, which includes the reproductive and postreproductive phases.



**FIGURE 2** Reproductive potential and time of lifespan of yeast cells cultured in conditions of different glucose concentrations. (a) Budding lifespan, (b) reproductive lifespan, (c) postreproductive lifespan and (d) total lifespan of yeast strains. Yeast cells during the experiments were grown on solid yeast extract-peptone-dextrose medium containing 10  $\mu\text{g/ml}$  phloxine B for cell viability monitoring. The data represent mean values from two independent experiments of 40 cells each. YPD: yeast extract-peptone-dextrose; WT: wild type

Analysis of these parameters was performed using isogenic group of yeast strains consisting of the WT strain and two strains with disruption in glucose signalling pathway ( $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$ ), and also using media with different glucose concentrations, that is 0.5% (CR), 2% (optimum) and 4% (CE). The analysis of the reproductive potential showed that the mutant strains were able to produce more daughter cells in comparison to the WT strain (Figure 2a; Table 1). The smallest difference in the reproductive potential was observed between the mutants and the WT

strain under CR conditions. Under the same conditions, the mean value of the reproductive potential parameter was  $>30$  generations for all strains (Table 1). In turn, the difference in reproductive potential between the WT and mutant strains increased with the increase in glucose concentration (Figure 2a), and the mean value of the reproductive potential under CE conditions observed for the mutant strains was almost twice as high as in the case of the WT strain (Table 1). However, it should be noted that the reproductive potential of mutant strains did not

**TABLE 1** The budding lifespan (number of daughters), reproductive lifespan, postreproductive lifespan and total lifespan of yeast cells cultured in conditions with different glucose concentration

	Strain	Glucose concentration (%)		
		0.5	2	4
Budding lifespan (number of daughters)	WT (BY4741)	30.5 ± 9.1 <sup>b,c</sup>	24.8 ± 8.1 <sup>a,c</sup>	21.3 ± 9.1 <sup>a,b</sup>
	$\Delta gpa2$	36.6 ± 10.7 <sup>***</sup>	37.4 ± 13.0 <sup>***</sup>	37.5 ± 12.4 <sup>***</sup>
	$\Delta gpr1$	38.9 ± 11.6 <sup>***</sup>	38.6 ± 13.1 <sup>***</sup>	37.4 ± 13.7 <sup>***</sup>
Reproductive lifespan, time (h)	WT (BY4741)	78.9 ± 31.3 <sup>b,c</sup>	56.4 ± 25.0 <sup>a</sup>	49.9 ± 25.8 <sup>a</sup>
	$\Delta gpa2$	78.0 ± 29.8	87.0 ± 31.7 <sup>***</sup>	82.2 ± 32.1 <sup>***</sup>
	$\Delta gpr1$	81.9 ± 27.6	83.4 ± 29.4 <sup>***</sup>	79.0 ± 30.1 <sup>***</sup>
Post-reproductive lifespan, time (h)	WT (BY4741)	58.9 ± 51.1	65.4 ± 42.8 <sup>c</sup>	47.8 ± 34.1 <sup>b</sup>
	$\Delta gpa2$	66.9 ± 57.9 <sup>b,c</sup>	35.7 ± 40.7 <sup>***,a</sup>	31.2 ± 29.6 <sup>***,a</sup>
	$\Delta gpr1$	43.4 ± 36.3 <sup>b,c</sup>	27.9 ± 29.8 <sup>***,a</sup>	30.6 ± 29.7 <sup>***,a</sup>
Total lifespan, time (h)	WT (BY4741)	137.8 ± 55.8 <sup>c</sup>	121.8 ± 46.5 <sup>c</sup>	97.6 ± 36.5 <sup>a,b</sup>
	$\Delta gpa2$	144.8 ± 63.1 <sup>b,c</sup>	122.5 ± 45.6 <sup>a</sup>	113.3 ± 38.6 <sup>**a</sup>
	$\Delta gpr1$	125.2 ± 44.0 <sup>c</sup>	111.3 ± 34.9	109.6 ± 38.8 <sup>**a</sup>

Note. Data are presented as mean ± SD from all tested cells during two independent experiments (80 cells).

WT: wild type.

Differences between strains: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ .

Differences between media, <sup>a</sup>different to medium with 0.5% glucose, <sup>b</sup>different to medium with 2% glucose, and <sup>c</sup>different to medium with 4% glucose. The values were considered significant at  $p < 0.05$ .

change between conditions with different glucose amount and was similar for both mutant strains (Figure 2a; Table 1). Hence, the difference between the WT and mutant strains is the result of the decreased reproductive potential observed for the WT strain under higher glucose concentration conditions, in particular under CE conditions (Figure 2a; Table 1). This means that an increased glucose concentration leads to reduction in the reproduction capacity of the cell. This effect is not reported for mutant strains when the glucose uptake is decreased, which in turn results in decreasing intracellular glucose level.

The total lifespan of a cell is defined as the sum of the time spent by the cell in the reproductive and postreproductive phases. Therefore, to assess the impact of the glucose on life expectancy expressed in units of time, analysis of the total lifespan of the cells was performed. When the first phase (the reproductive phase) is expressed in units of time (Figure 2b; Table 1), the differences between cells of the analysed strains are lower than when the reproductive lifespan is expressed as the number of daughters produced by these cells (Figure 2a; Table 1). There were no differences in the reproductive lifespan between analysed strains under CR conditions (Figure 2b; Table 1). In turn, under conditions with higher glucose concentration, especially under CE conditions, a decrease in the WT strain's reproductive lifespan was observed and a similar relationship between the WT and mutant strains was noted as in the case of the reproductive capacity (Figure 2b; Table 1). The situation is different for the postreproductive phase because the WT strain cells have longer postreproductive lifespans in comparison to the mutant strains (Figure 2c; Table 1). Under CR conditions the length of the postreproductive phase of cell life is the longest with the highest similarities across the analysed strains, while the length of that phase decreases with increased glucose concentration, especially in the case of mutant strains (Figure 2c; Table 1). The impact of glucose concentration on the length of the yeast cell's postreproductive phase of life is manifested through a decrease in both the mean and the maximum values of that parameter (Figure 2c;

Table 1). The total lifespan of the yeast cell as the sum of the lengths of the reproductive and postreproductive phases reached similar values for both the WT and mutant strains (Figure 2d; Table 1). The only noted yet important difference between the WT and mutant strains was the decrease in the total lifespan of the WT cells under CE conditions in comparison to the two mutant strains (Table 1). Comparison of the value of this parameter between different glucose concentration conditions showed that for all of the analysed strains CE conditions led to a decrease in the total lifespan of the cell, both in terms of the mean and the maximum values (Figure 2d; Table 1). In turn, in most cases there were no statistically significant differences between cells under CR and optimal conditions (0.5% and 2% glucose; Table 1); rather, they showed similar maximum values suggesting that CR might increase the total lifespan, even if only slightly (Figure 2d).

A simultaneous comparison of the two conditions with different glucose availability and the analysed strains offers a chance for a more comprehensive approach. The results concerning the reproductive potential clearly demonstrated that there was no difference in the value of that parameter between the  $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$  strains in all of the applied conditions. The mean value of the reproductive potential was about 37–38 generations (Figure 3a). In turn, in the case of the WT strain there was a significant reduction in the reproductive potential with the increase of the glucose concentration. The change in the mean value of the reproductive potential in the WT strain between CR and CE conditions reached almost 10 generations. Apart from the values, changes in the shape of the curves of the reproductive potential observed for the WT strain were also extremely important. In the conditions with the increased glucose concentration, a faster collapse of the curve was observed (Figure 3a). In particular, it was observed for the 4% glucose medium, in which the curve dropped down from the beginning. It was noted that approximately 15% of the cells analysed under CE conditions generated <15 buds, while 7% of the cells generated <5 buds.

Comparison between the shapes of the reproductive potential curves for the WT strain showed that 90% of the cells produced more than 18, 14 and 7 generations under the conditions with 0.5%, 2% and 4% glucose, respectively (Figure 3a). This means that in the CE conditions the reproductive capacity of the yeast cells, understood as a phenomenon where more than 90% of cells maintain the ability to reproduce, is significantly lower (upper right corner of Figure 3a). Such differences were not observed in the case of the total lifespan analysis. Analysis of values of the total lifespan (both maximum and mean) suggests that in general the total lengths of cell life for the WT and mutant strains were similar, apart from the total lifespan observed in the CE conditions (Figure 3b; Table 1). The decrease in the values of the total lifespan and changes in the shape of the total lifespan curve noted especially in the case of the WT strain show that the CE conditions lead to reduction of the total lifespan of yeast cells.

The results of the analysis show that glucose availability has the highest influence on the reproductive potential (Figure 2a; Table 1). Given that the mean value is highly sensitive to extreme values, it was examined whether increasing the glucose concentration could alter the distribution of the reproductive potential in the tested yeast cell groups. The differences in the analysed parameters are described *inter alia* by skewness and kurtosis. The shape of the distribution curve coupled with the value of these coefficients allows for a comprehensive interpretation of the changes observed for the reproductive potential or cell size. Under all of the analysed conditions, no differences were observed in the distribution of the reproductive potential between  $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$  (Figure 4). In turn, distribution of the reproductive potential in the WT strain varied significantly in comparison to the mutant strains. The centre of distribution appointed by the modal data was shifted toward lower values (Figure 4). Moreover, in the case of the WT strain differences were noted between the distribution of the reproductive potential values obtained under conditions with different glucose concentrations. The shape of the distribution curve was changed with the increase in glucose concentration from relatively flat to more peaked (changes in the kurtosis value); at the same time, the centre of the distribution curve was shifted toward lower values (changes in the skewness value; Figure 4). The presented histograms show that an increased extracellular glucose concentration when the glucose uptake is not disturbed leads to a reduction not only in the maximum and mean values, but also in the most common values of the reproductive potential.

### 3.3 | Enhanced extracellular glucose concentration increases the size of yeast cells and changes distribution of cell size in the population

According to the hypertrophy hypothesis (Bilinski, Zadrąg-Tecza, & Bartosz, 2012; Zadrąg-Tecza, Kwolek-Mirek, Alabrudzinska, & Skoneczna, 2018), cell size is one of the factors influencing yeast reproductive potential. To examine whether alterations in the reproductive potential observed under different glucose concentration conditions are connected with cell size changes, morphometric measurements of cell diameters in a population were performed. It was noted that  $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$  mutant

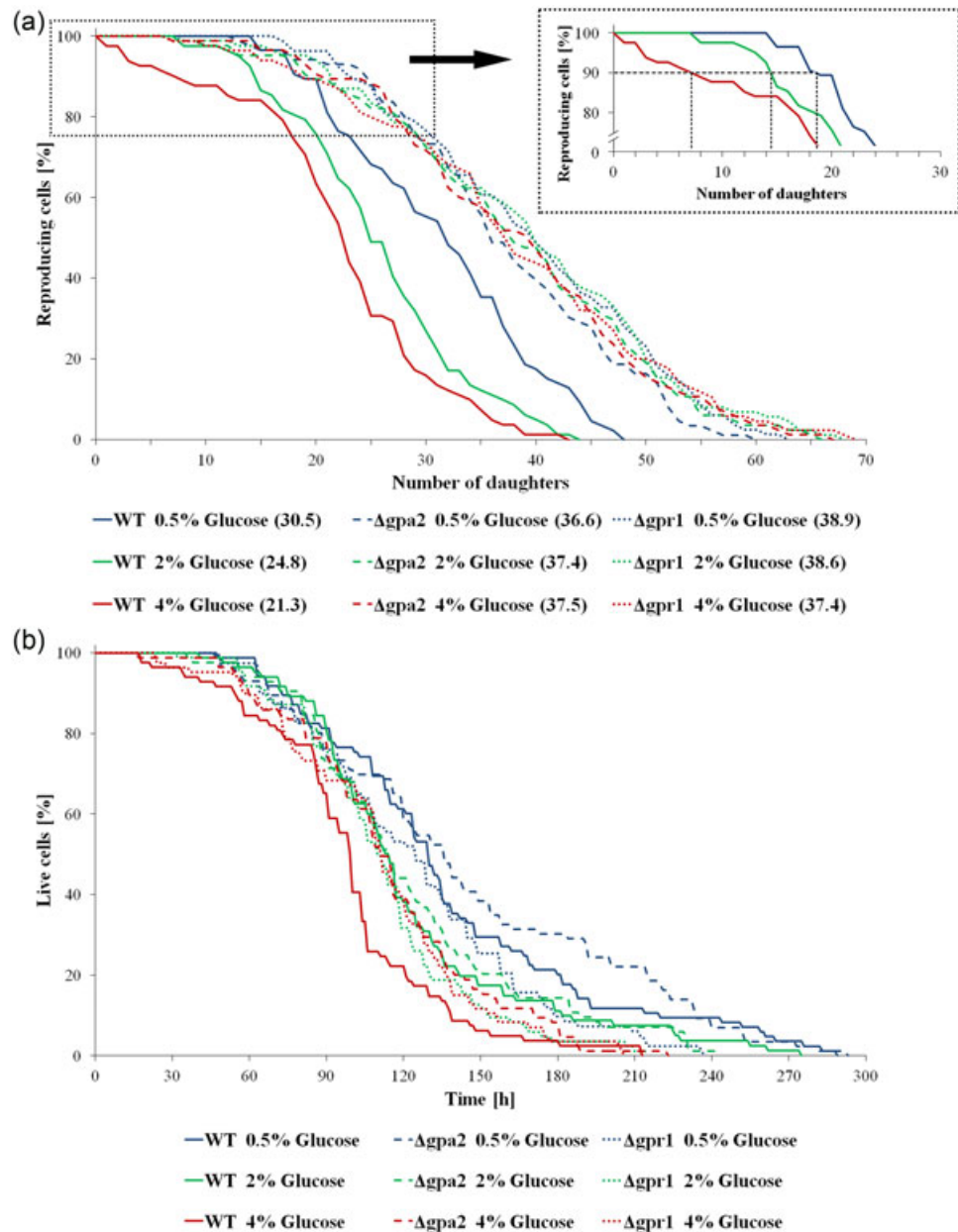
strains show similar cell size presented both as a mean value of the cell size and as a histogram (Figure 5). Cell sizes in these strains growing on the medium with 2% and 4% glucose were comparable, while smaller cell sizes were noted under CR conditions. In turn, the distribution and mean value of cell size in the WT strain were significantly different in comparison to the mutant strains. In all of the analysed conditions, cells of the WT strain were larger in comparison to cells of the mutants and the centre of the cell size distribution curve was shifted toward higher values (Figure 5). In the case of the WT strain, there were also differences between the distribution of cell sizes obtained under conditions with different glucose concentrations. The shape of the distribution curve and the skewness and kurtosis values changed with the increase in glucose concentration. The centre of the distribution curve was shifted toward higher values (Figure 5). Moreover, a relationship between changes in the distribution of the reproductive potential (Figure 4) and the distribution of cell sizes in the population was observed (Figure 5). The changes in the distribution of the analysed parameters point toward opposite directions. The increase in cell size was accompanied by a decrease in cell reproductive potential and vice versa, which suggests a relationship between cell size and cell proliferation capacity, as confirmed by the value of the Pearson correlation coefficient ( $r = -0.82$ ).

### 3.4 | Enhanced extracellular glucose concentrations induce higher rate of biosynthesis resulting in higher cell dry weight

Analysis of cell dry weight was performed to verify a possible connection between the efficiency of biosynthesis and changes in cellular metabolism, physiology and reproductive potential caused by different glucose availability levels. Significant differences in cell dry weight were observed. Under CR conditions cell dry weight was the lowest and similar across the analysed strains (Figure 6). However, in the case of the WT strain cell dry weight increased with the increase in glucose concentration and was the highest under CE conditions. Such an increase in cell dry weight was not observed for the  $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$  strains. For these cells, cell dry weight was significantly lower compared with the WT strain and remained unchanged for conditions with 0.5%, 2% and 4% glucose concentration (Figure 6). Changes in cell dry weight (Figure 6) clearly correlate with the reproductive potential (Figures 2a, 3a, and 4) and cell size results (Figure 5). Increase in cell dry weight is accompanied by the increase in cell size and a simultaneous decrease in the reproductive potential of the cell, and vice versa, which suggests a strict relationship between biosynthesis efficiency, cell size and proliferation capacity of the cell.

### 3.5 | Different glucose concentration conditions change the intracellular trade-off between metabolic pathways

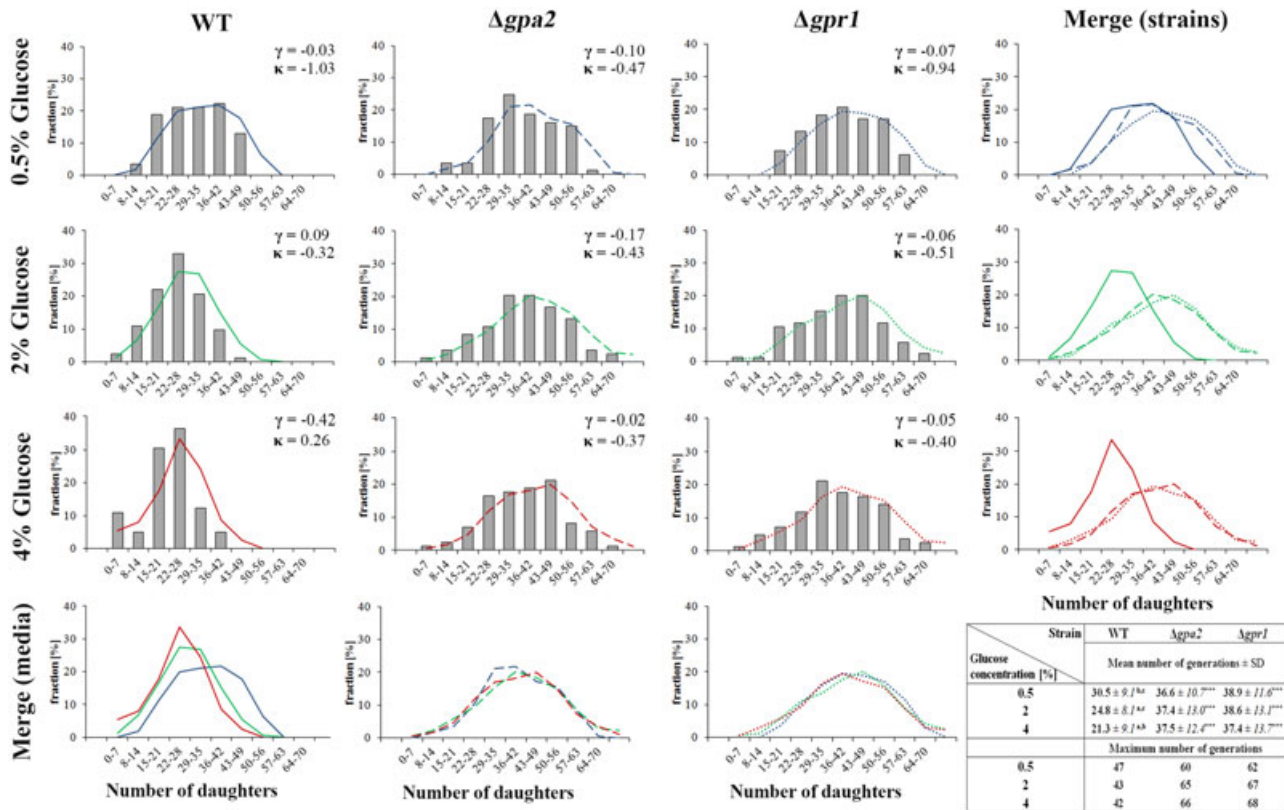
Once glucose enters the cell, it is used by several cross-linking pathways (Figure 7a). The first and main route of glucose utilisation is glycolysis, which converts glucose by several intermediary reactions into pyruvate. Then, depending on availability of oxygen or specific life strategy



**FIGURE 3** Comparison of the reproductive potential and total lifespan of yeast cells cultured in conditions of different glucose concentrations. (a) Budding lifespan and (b) total lifespan of yeast strains. During the experiments, yeast cells were grown on solid yeast extract-peptone-dextrose medium containing 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  phloxine B for cell viability monitoring. The data represent mean values from two independent experiments of 40 cells each. WT: wild type [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

adaptation (such as Crabtree effect in yeast), pyruvate is converted in a fermentation or oxidative phosphorylation pathway. Thereby, the cell obtains different amounts of energy in a different number of ATP molecules generated/one glucose molecule. Apart from energy, glucose also provides the carbon skeleton for biosynthesis of macromolecules. The PP pathway is the pathway in which glucose can be used as a carbon source for biosynthesis. The PP pathway is closely linked to glycolysis; it uses substrate glucose-6-phosphate (as the main product of glucose phosphorylation) or can incorporate further glycolysis intermediates (Figure 7a). Glucose transformation performed in the above pathways determines the existence of a specific metabolic trade-off adapted to the

current energetic and biosynthetic needs of the cells. Considering the above and also taking into account the differences in the rate of glucose uptake between the analysed yeast strains, possible influence of glucose concentration on cell metabolism was examined. The tested parameters included the level of ATP, PP pathway enzymes activity and changes in the NADP(H) pool. The highest level of ATP was noted in the case of cells growing on medium with 0.5% glucose, which suggested that in those conditions cells used respiro-fermentative metabolism (Figure 7b). Cells growing in media with 2% and 4% glucose, in which yeast cells conduct fermentation, had lower level of ATP, although it was significantly higher in both mutant strains in comparison to the WT strain (Figure 7b). This



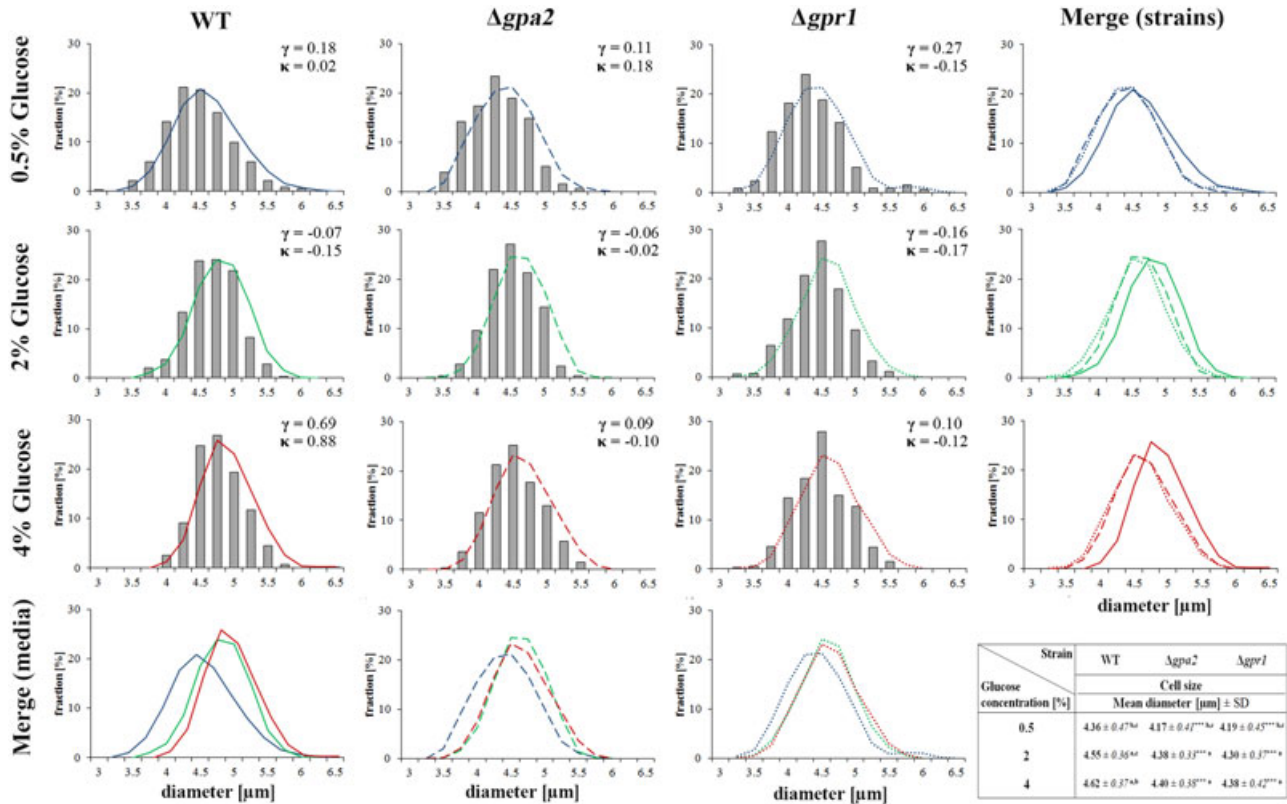
**FIGURE 4** Reproductive potential of yeast cells cultured in conditions of different glucose concentrations. The number of daughters produced was estimated on solid yeast extract-peptone-dextrose medium using the micromanipulation method. The results were presented as a histogram, a graphic representation of distribution the number daughters production by single mother cell. Explanation of symbols placed on graphs:  $\kappa$ - kurtosis;  $\gamma$ - skewness. WT: wild type [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

relationship between strains seems to be connected with lower intracellular glucose level caused by a decreased rate of glucose uptake observed in mutant strains (Figure 1). Analysis of the PP pathway enzyme activity (G6PD and 6-PGD) showed that the PP pathway is more active in the WT strain in comparison to *Δgpa2* and *Δgpr1* strains. The WT strain had higher G6PD activity which resulted in higher total dehydrogenase activity. The activity of 6-PGD was similar across the analysed strains (Figure 8a). Comparison of the enzyme activity between cells growing under different glucose concentration conditions showed other dependencies. There were no differences in the analysed enzymes activity between conditions with 0.5%, 2% and 4% glucose in the case of *Δgpa2* and *Δgpr1* strains. In turn, in the case of the WT strain, although the activity of 6-PGD did not change, a distinct reduction of the G6PD and total dehydrogenase activity was observed with the increased glucose concentration (Figure 8a). Such a change in enzyme activity does not have to represent the decrease in the overall PP pathway activity. It is generally known that the activity of the PP pathway leads to the generation of NADPH, which is a potent feedback inhibitor of the G6PD enzyme (Figure 7a). The analysis of NADPH and NADP<sup>+</sup> level shows that different glucose concentrations substantially change the participation of NADPH and NADP<sup>+</sup> in the total NADP(H) pool (Figure 8b). It was noted that an increased level of NADPH oxidation resulted in a higher NADP<sup>+</sup> proportion in the total NADP(H) pool under conditions with 2% and 4% glucose concentrations (Figure 8b). This suggests a higher usage of

NADPH for cellular demands, including biosynthesis. In turn, under CR conditions the NADP<sup>+</sup> proportion in the total pool was the lowest and similar across all analysed strains (Figure 8b). In the case of conditions with the 2% and 4% glucose concentration, the *Δgpa2* and *Δgpr1* strains have a lower NADP<sup>+</sup> proportion in the total NADP(H) pool in comparison to the WT strain (Figure 8e), suggesting lower usage of NADPH in the mutant strain compared with the WT strain. The results demonstrate that there is a strong relationship between glycolysis, aerobic respiration and biosynthetic PP pathway, and this relationship seems to be determined to a large extent by the intracellular glucose level.

#### 4 | DISCUSSION

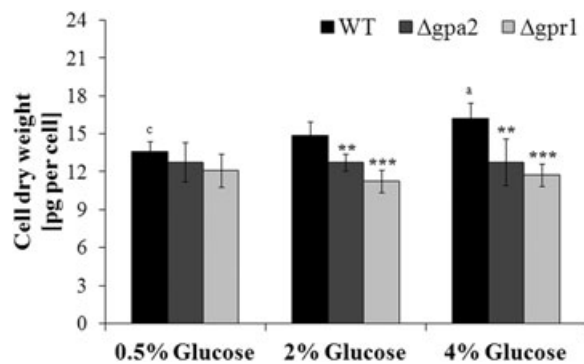
Restriction or excess of the supplied calories is a situation which has an important influence on the functioning of the cell by changes at the metabolic level. Cellular metabolism is tightly controlled and responds to changes in extracellular conditions and intracellular demands. In the case of extracellular conditions, the availability of glucose, which is the primary source of energy and a substrate for biosynthesis, is especially important. Costs and benefits of different pathways of glucose utilisation play a central role in energy metabolism and thus in cell physiology. Hence, physiological efficiency of the cell is derived from metabolic trade-off between different types of glucose utilisation (Molenaar et al., 2009;



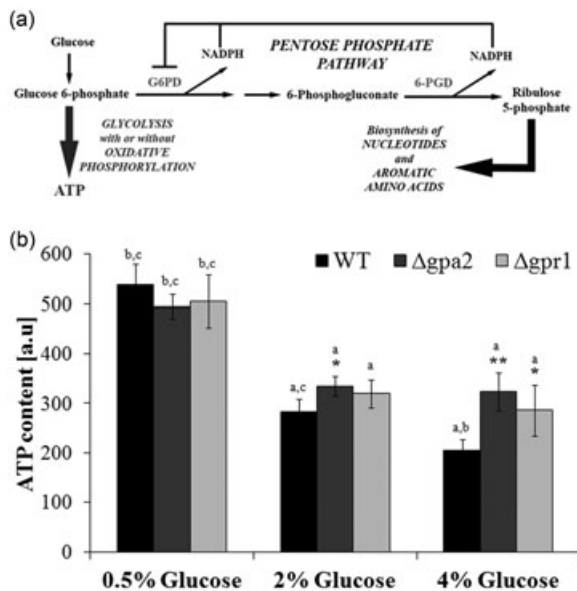
**FIGURE 5** The cell size of yeast cells cultured in conditions of different glucose concentrations. Diameter of the cells was estimated through analysis of microscopic images using the MicroImage 3.0 software. The results were presented as a histogram, a graphic representation of cell size distribution in cell population. The data represent the values from two independent experiments of 150 cells each. Explanation of symbols placed on graphs,  $\kappa$ : kurtosis and  $\gamma$ : skewness. WT: wild type [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

Nilsson & Nielsen, 2016; Vander Heiden et al., 2009). In the case of the *S. cerevisiae* yeast cells the most widely known metabolic phenomenon is the Crabtree effect. Reasons for its occurrence are not predicted by standard metabolic models focusing only on energy yield. Therefore, the current studies have paid more and more attention to existence of specific cellular economics. Although fermentation generates a relatively

small quantity of energy, the cellular costs invested in the synthesis of enzymes required for this pathway are lower in comparison to the aerobic respiration (Molenaar et al., 2009; Nilsson & Nielsen, 2016; Schuster, Boley, Moller, Stark, & Kaleta, 2015). Moreover, aerobic glycolysis seems to be more effective from a biosynthetic point of view. Glucose utilisation through glycolysis and PP pathway provides several carbon intermediates required for biosynthesis of essential cellular compounds, which is especially important for highly proliferating cells (Folmes, Ma, Mitalipov, & Terzic, 2016; Maslanka, Kwolok-Mirek, & Zadrąg-Tecza, 2018; Vander Heiden et al., 2009). Cell proliferation is one of the most important aspects of cell functioning and to a large extent depends on glucose availability and on the method of its utilisation. The experimental data presented in this paper suggest that the reproductive potential of the cell firmly depends on metabolic trade-off between pathways of glucose utilisation, especially biosynthesis pathways. These findings confirm the previous data indicating that yeast cells of the WT strain show an increase of the reproductive potential under CR conditions in comparison to the optimum 2% glucose conditions. Worth underlining is the fact that the mean values of reproductive potential obtained for the WT strain in these studies, both under optimum and CR conditions (Table 1), are identical to the average number of buds determined in the meta-analysis performed by Huberts et al. (2014). However, what is more important and has not been shown previously, the cells of WT strain demonstrate that CE conditions significantly



**FIGURE 6** Cell dry weight determined using moisture analyser. The data are expressed as a cell dry mass/single cell and are presented as mean  $\pm$  SD from three independent experiments where  $2 \times 10^9$  cells each were used.  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  as compared with the WT strain; <sup>a</sup>different to medium with 0.5% glucose, <sup>b</sup>different to medium with 2% glucose, <sup>c</sup>different to medium with 4% glucose. WT: wild type

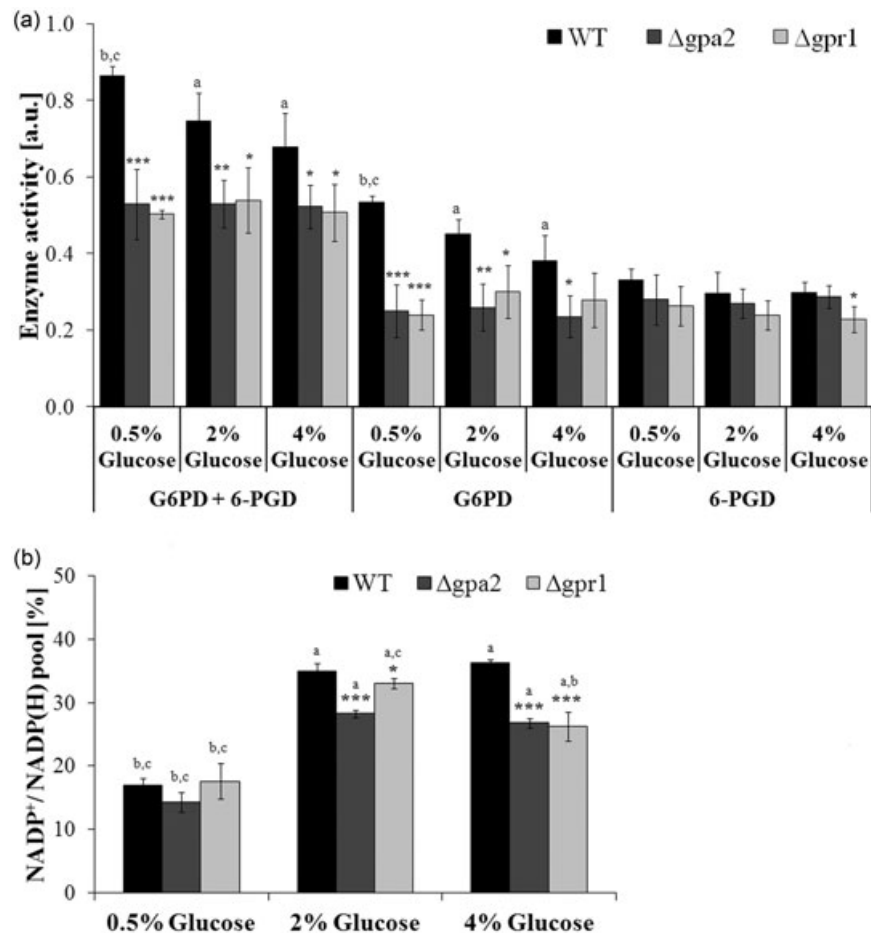


**FIGURE 7** Glucose as a source of energy and carbon skeleton for biosynthetic processes. (a) Possible intracellular pathways of glucose utilisation. (b) ATP content determined with the use of the BactTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay. Luminescence was recorded using the microplate reader. The luminescent signal corresponded to the ATP content, which was directly proportional to the number of cells. The results are presented as mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  as compared with the WT strain; <sup>a</sup>different to medium with 0.5% glucose, <sup>b</sup>different to medium with 2% glucose, <sup>c</sup>different to medium with 4% glucose. ATP: adenosine triphosphate; G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase; 6-PGD: 6-phosphogluconate dehydrogenase; WT: wild type

decrease their reproductive potential (Figure 2a, 3a, and 4; Table 1). Analysis of the distribution of the reproductive potential in the WT strain between different glucose concentration conditions allowed for identification of a strict inverse relationship between glucose concentration and reproductive potential (Figure 3 and 4). The reproductive potential of yeast cells can be regulated by various factors. According to the hypertrophy hypothesis, cell size, and in particular the rate of cell size increase per generation, is one of the important regulators of that parameter (Bilinski et al., 2012; Zadrąg-Tecza et al., 2018; Zadrąg-Tecza, Kwolek-Mirek, Bartosz, & Bilinski, 2009). Therefore, the influence of glucose on the reproductive potential may be connected with cell size changes. The mean value of cell size and distribution of this parameter in the population clearly demonstrate that there is a significant correlation between cell size and reproductive potential (Figures 4 and 5). The cells with higher size observed under CE conditions were characterised by a decrease in the reproductive potential, in contrast to cells undergoing CR which had smaller size but an increased reproductive potential (Figures 4 and 5). The inverse relationship between reproductive potential, lifespan and cell size is also observed for certain types of mammalian and human cells (Angello, Pendergrass, Norwood, & Prothero, 1987; Anzi et al., 2018; de Paiva, Bersusa, & Escuder, 2006; Demidenko & Blagosklonny, 2009; Morocutti et al., 1996). Cell size is directly connected with biosynthesis processes, which may lead to increase in the value of the parameter in enhanced biosynthesis. Such a point of view may be supported by cell dry

weight results obtained in the study (Figure 6) and changes in cofactor proportions in the total NADP(H) pool resulting from cellular anabolic demands which require oxidation of NADPH to NADP<sup>+</sup> (Figure 8b). In turn, the enhanced biosynthesis and the related increase in cell size may lead to faster achievement of the hypertrophy state and result in a loss of the proliferation capacity. Such a possibility seems to be also connected with the hyperfunction theory proposed by Blagosklonny (2006, 2007), which assumes that cell growth and biosynthesis reactions take part in retaining cell proliferation and cell physiology. Connection between biosynthesis and decline in reproductive potential was also observed in the studies of Janssens et al. (2015). It was shown that replicatively aged mother cells displayed overabundance of protein and loss of protein complex stoichiometry (Janssens et al., 2015). This may be connected with the fact that, amongst all cellular macromolecules, protein production is the largest biosynthetic burden. As was shown by Kafri et al. (2016), the primary cell response to enforced protein production is to increase the size of the cell, but at the same time excess levels of unnecessary proteins disturb proliferation. In light of the above arguments the extent of changes in the reproductive potential due to improved protein turnover, regardless of whether it was obtained through (a) elevation of proteasome-mediated protein degradation (Kruegel et al., 2011), (b) decrease in ribosome biogenesis and translation (Steffen et al., 2008), (c) decrease of protein synthesis and the amount of misfolded proteins due to chaperone overexpression (Peric et al., 2017), or (d) operation of CR (Tavernarakis & Driscoll, 2002), is clearly connected with the decrease of cell biosynthetic burden.

Under CE and CR conditions cells show differences in the biosynthesis rate and in general cellular physiology. The reason for these differences seems to be connected with existence of a specific metabolic trade-off and metabolic fluxes adapted to the current nutrient availability conditions and needs of the cells. As soon as glucose enters the cell, it can be used by cross-linking pathways of glycolysis, aerobic respiration and PP pathway (Figure 7a). The analysed conditions with different glucose concentrations differ in carbohydrate flux through the aforementioned metabolic pathways (Figures 7b and 8a). Under CR conditions cells have low biosynthetic capabilities (Figures 5, 6, and 8b) and reroute the metabolic flux from glycolysis to aerobic respiration, which can be observed inter alia through higher levels of ATP production (Figure 7b). This observation is in line with the results presenting the connection between the CR-dependent lifespan increase and enhanced respiration (Lin et al., 2002; Tahara et al., 2013). However, the increase in respiration is hardly the reason for the increase in reproductive potential under CR; instead, it can be a coincidental effect of changes in metabolic flux. This explains why CR can also increase lifespan in respiratory-deficient yeast cells ( $\rho^0$ ; Kaeberlein et al., 2005). Meanwhile, when the glucose is fully available in the medium/environment (2% glucose), glycolytic flux is increased, ATP level decreases (Figure 7b) and biosynthetic capabilities of the cell increase (Figures 5, 6, and 8b). Hence, the reduced ATP level may result both from changes in metabolic flux and its increased consumption due to higher biosynthetic activity. Cellular biosynthesis is inseparably connected with the PP pathway

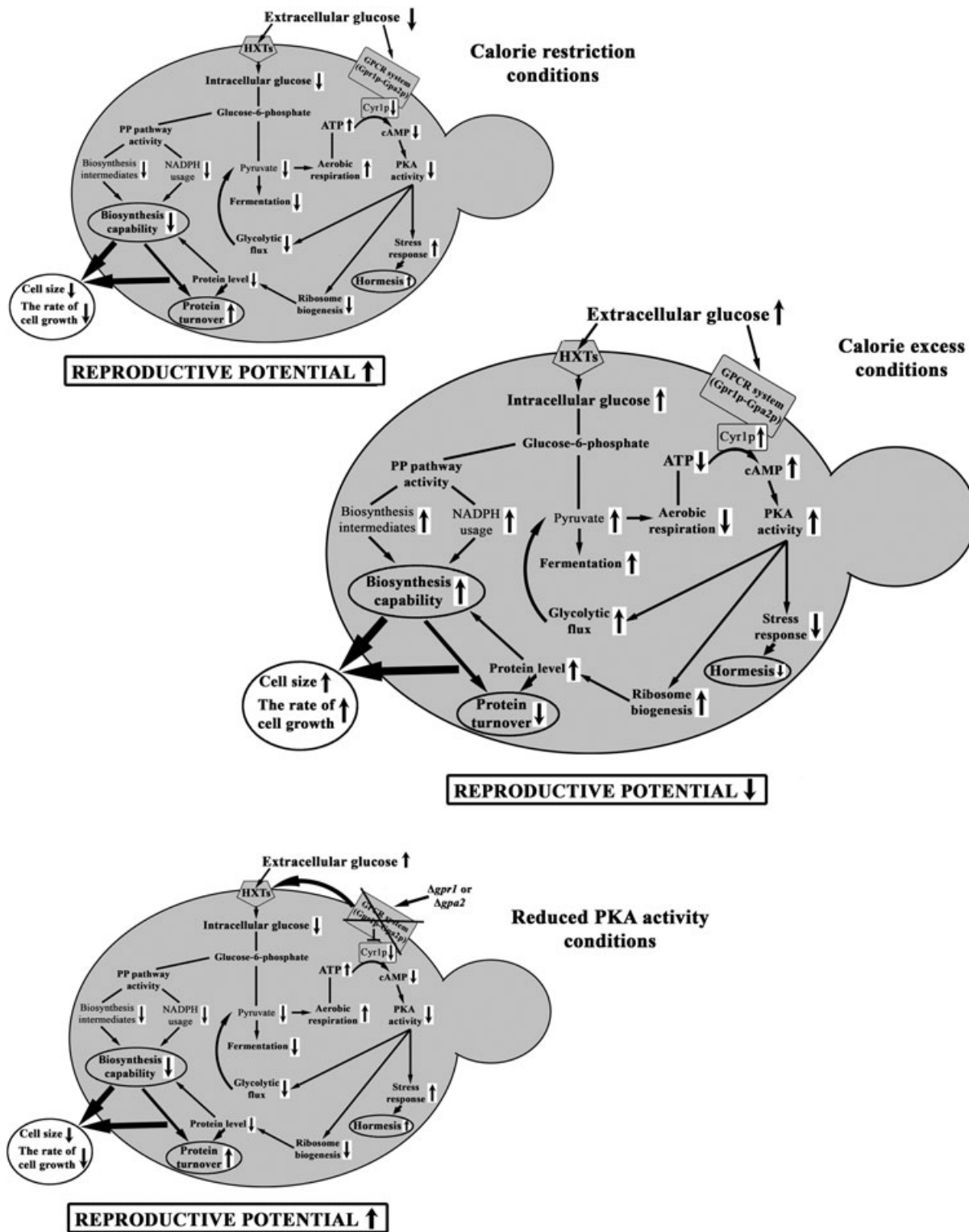


**FIGURE 8** Parameters connected with biosynthetic capabilities of yeast cells cultured in conditions with different glucose concentration. (a) Pentose phosphate pathway enzymes activity: glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD) determined spectrophotometrically by measuring the rate of NADP<sup>+</sup> reduction at 340 nm. The data was expressed in arbitrary units as mean ± SD from three independent experiments. (b) NADP<sup>+</sup> and NADPH contents determined with the use of NADP/NADPH-Glo Assay. Luminescence was recorded using the microplate reader. The results are presented as a share of the NADP<sup>+</sup> cofactor in the total NADP(H) pool. The results are presented as mean ± SD from three independent experiments. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001 as compared with the WT strain; <sup>a</sup>different to medium with 0.5% glucose, <sup>b</sup>different to medium with 2% glucose, <sup>c</sup>different to medium with 4% glucose. G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase; 6-PDG: 6-phosphogluconate dehydrogenase; WT: wild type

and the studies show positive correlation between biomass production and metabolic flux through the PP pathway (Nidelet, Brial, Camarasa, & Dequin, 2016). The PP pathway is closely linked to glycolysis (Figure 7a) and is the most variable flux depending on environmental conditions. The literature data show that there is a link between the lifespan and metabolic changes introduced through the PP pathway. Accumulation of glycolytic metabolites is thought to increase the metabolic flux through the PP pathway (Masumoto & Matsuyama, 2018; Nidelet et al., 2016; Ralser et al., 2007). The aforementioned results suggest that higher biosynthesis observed under CE conditions may be connected with such metabolic changes. Under CE conditions, when the amount of glucose is higher than the actual energy demand, the excess of glucose seems to be redirected to the PP pathway allowing for higher biosynthesis. However, the analysis of the G6PD activity shows an unexpected decrease in its activity with the increase in glucose concentration (Figure 8a). One of the possible reasons for

the situation is that the activity of G6PD, which is the first enzyme of the PP pathway, may be strongly inhibited by NADPH. This phenomenon is further complicated by the fact that NADPH is associated with a number of metabolic pathways inside the cell, generated in several other ways beyond the PP pathway (e.g., by the activity of aldehyde dehydrogenase 6), and used as a cofactor by several metabolic enzymes. Moreover, an important argument is provided by the results obtained for mutant strains with glucose uptake disorder as they show no changes in the activity of the PP pathway enzymes depending on extracellular glucose concentration. By comparison, cells of the WT strain show higher activity of the PP pathway enzymes (Figure 8a) and higher biosynthetic capabilities (Figures 5 and 6).

In yeast, the cAMP/PKA pathway is a major glucose-signalling pathway which adjusts cell metabolism to the nutrient status. When glucose is available, activation of the cAMP/PKA pathway stimulates glycolytic flux, represses expression of respiratory metabolism genes,



**FIGURE 9** Possible types of metabolic trade-off and metabolic fluxes depending on the nutrient availability conditions and their impact on the size and reproductive potential of yeast cells. ATP: adenosine triphosphate; cAMP: cyclic adenosine monophosphate; GPCR: G-protein coupled receptor; HXT: hexose transporter; PP: pentose phosphate; PKA: protein kinase A

induces ribosome biogenesis and suppresses stress response. It may be expected that under CE conditions the cAMP/PKA pathway will be fully active/upregulated, while it will have a reduced activity under CR conditions. Synthesis of cAMP, which activates PKA, depends on

the G-protein coupled receptor (GPCR) system composed of the plasma membrane receptor Gpr1p and its  $\alpha$ -subunit of G-protein Gpa2p (Rolland et al., 2002). Using the  $\Delta gpr1$  and  $\Delta gpa2$  yeast mutant strains with reduced cAMP-PKA activity made it possible to

test whether glucose-derived changes in metabolic fluxes and biosynthetic capabilities influencing the reproductive potential are connected with the activity of the cAMP/PKA pathway. The obtained results support the authors' initial hypothesis that CE reduces reproductive potential due to higher biosynthetic capabilities caused by the activity of the cAMP/PKA pathway. The results (Figure 2a; Table 1) confirm the previously observed findings (Lin et al., 2000) of the increased reproductive potential in the  $\Delta gpr1$  and  $\Delta gpa2$  strains in comparison to the WT strain under 2% glucose conditions; more important, they show that the reproductive potential of those mutant strains was similar for all media with different glucose concentrations (Figures 2a, 3a, and 4; Table 1). This indicates that low activity of the cAMP/PKA pathway even in the presence of high extracellular glucose can maintain the reproductive potential of the cell on a relatively high level. These outcomes, together with the results presenting lower rate of glucose uptake noted for the  $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$  (Figure 1), suggest that the intracellular glucose level and signalling is more important than the extracellular glucose level. The data strengthen the initial assumption that cell size and biosynthesis capability are inversely correlated with the reproductive potential, which is additionally confirmed by the Pearson correlation coefficient values (reproductive potential vs. cell size:  $r = -0.82$  and reproductive potential vs. dry biomass:  $r = -0.96$ ). Distribution of cell size in cell population of the mutant strains was shifted toward lower values in comparison to the WT strain (Figure 5), which is consistent with previous data (Alberghina, Rossi, Querin, Wanke, & Vanoni, 2004; Tamaki et al., 2005). The lower dry cell biomass, the activity of PP pathway enzymes and lower usage of NADPH in mutant strains in comparison to the WT strain (Figures 6-8), along with the data presenting lower protein content and reduced protein synthesis rate in the  $\Delta gpa2$  and  $\Delta gpr1$  strains (Alberghina et al., 2004; Tamaki et al., 2005), indicate that these mutant strains have low biosynthetic capabilities. The results serve as evidence that reproductive potential of the cell is associated with cell size and biosynthetic capability, which depends on the availability of nutrients connected with the activity of the cAMP/PKA pathway (Figure 9). Moreover, the results imply that redirecting of the carbon/metabolic flux is a crucial mechanism of response to changes in nutrient availability.

The impact of glucose concentration is not limited only to determining the reproductive potential of the cell, but may also regulate the postreproductive phase of yeast cell life and, therefore, the total lifespan of cells (Zadrag et al., 2008; Zadrag-Tecza & Skoneczna, 2016; Zadrag-Tecza et al., 2018). The obtained results have shown that in general the length of the postreproductive lifespan is negatively correlated with the number of daughters produced (Figure 2a-c; Table 1). As a consequence, the total lifespan of yeast cells (Figure 2d; Table 1) is almost the same between the WT and mutant strains, despite differences in their reproductive potentials (Figure 2a). These observations are in line with the data previously reported by the authors (Zadrag-Tecza, Molon, Mamczur, & Bilinski, 2013). The lengths of the reproductive, postreproductive and notably the total lifespans of yeast cells obtained under CE conditions, especially in the case of the WT strain, were significantly decreased

(Figure 2; Table 1). Glucose influence on the overall time of the yeast cell life seems to be especially important, which was suggested by the comparison of all values of the total lifespan obtained in this study (Figure 3b). It was demonstrated that the total length of cell life is in general less variable than the reproductive potential of the cell (Figure 3). Moreover, the results show that the total cell lifespan may not really be extended and even if CR can slightly increase the lifespan, the change seems irrelevant; on the other hand, CE conditions may lead to a significant reduction in the length of yeast cell life (Figure 3b). Thus, it may be concluded that CR may improve cellular physiology efficiency, which is manifested inter alia by reduced ROS generation (Maslanka et al., 2017) and increased reproductive potential (this study); it does not, however, increase the overall yeast cell lifespan in a significant way. On the other hand, CE conditions lead both to disorders in cellular physiology (increased ROS generation, reduced reproductive potential) and a decrease in the total cell lifespan (this study; Maslanka et al., 2017).

Studies concerning the influence of CR on the lifespan are based on several experimental models. Although the results and explanations of those studies are not mutually transferrable, some analogies may be drawn in certain areas. Results of CR studies performed on primates show that CR improves the organism's healthspan, but seems to fail to increase its lifespan (Austad, 2012; Colman et al., 2009; Le Bourg & Vijg, 2017; Mattison et al., 2012, 2017). Moreover, it has been stressed that CR increases the lifespan of rhesus monkeys only if the control group is fed ad libitum and has a short lifespan (Austad, 2012; Biliński et al., 2015; Le Bourg & Vijg, 2017). The results presented in this study suggest some analogies of the influence of CR, harmfulness of CE and necessity of using a proper control group in experimental research, including in cellular studies (Figure 3b). Furthermore, the results suggest existence of a certain yeast lifespan cap. The idea that there is an inevitable limit to the length of life has also been raised by many scientists analysing human lifespan (Dong, Milholland, & Vijg, 2016; Le Bourg & Vijg, 2017; Marck et al., 2017; Vijg & Le Bourg, 2017).

To summarise, this study provides evidence that calorie/glucose excess connected with changes in cell metabolic fluxes increases the biosynthetic capabilities of yeast cells. However, this leads to an increase in cell size and a decrease in both the reproductive potential of the cell and the overall length of cell life. The results presented in this paper provide arguments that cell physiology and lifespan can be manifestly disturbed, for instance by CE. In turn, diet-related interventions such as CR undoubtedly improve cellular physiology efficiency, which seems to affect, to a limited extent, the lifespan of cells. Further comprehensive analysis in the field of calorie/energy excess and its prevention seems to be of extreme importance due to recent common problems of diabetes and obesity.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr Magdalena Kwolek-Mirek for helpful discussions. This study was supported by the Polish National Science Centre (Grant No.: DEC-2013/09/B/NZ3/01352).

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflict of interests.

## ORCID

Renata Zadrag-Tecza  <http://orcid.org/0000-0001-5073-9274>

## REFERENCES

- Alberghina, L., Rossi, R. L., Querin, L., Wanke, V., & Vanoni, M. (2004). A cell sizer network involving Cln3 and Far1 controls entrance into S phase in the mitotic cycle of budding yeast. *Journal of Cell Biology*, 167(3), 433–443.
- Angello, J. C., Pendergrass, W. R., Norwood, T. H., & Prothero, J. (1987). Proliferative potential of human fibroblasts: An inverse dependence on cell size. *Journal of Cellular Physiology*, 132(1), 125–130.
- Anzi, S., Stolovich-Rain, M., Klochendler, A., Fridlich, O., Helman, A., Paz-Sonnenfeld, A., ... Dor, Y. (2018). Postnatal exocrine pancreas growth by cellular hypertrophy correlates with a shorter lifespan in mammals. *Developmental Cell*, 45(6), 726–737.
- Austad, S. N. (2012). Ageing: Mixed results for dieting monkeys. *Nature*, 489(7415), 210–211.
- Barros, M. H., Bandy, B., Tahara, E. B., & Kowaltowski, A. J. (2004). Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 49883–49888.
- Biliński, T., Paszkiewicz, T., & Zadrag-Tecza, R. (2015). Energy excess is the main cause of accelerated aging of mammals. *Oncotarget*, 6(15), 12909–12919.
- Biliński, T., Zadrag-Tecza, R., & Bartosz, G. (2012). Hypertrophy hypothesis as an alternative explanation of the phenomenon of replicative aging of yeast. *FEMS Yeast Research*, 12(1), 97–101.
- Blagosklonny, M. V. (2006). Cell senescence: Hypertrophic arrest beyond the restriction point. *Journal of Cellular Physiology*, 209(3), 592–597.
- Blagosklonny, M. V. (2007). Paradoxes of aging. *Cell Cycle*, 6(24), 2997–3003.
- Le Bourg, E., & Vijg, J. (2017). The future of human longevity: Time for a reality check. *Gerontology*, 63(6), 527–528.
- Brown, J. E. (2014). Can restricting calories help you to live longer? *Post Reproductive Health*, 20(1), 16–18.
- Colman, R. J., Anderson, R. M., Johnson, S. C., Kastman, E. K., Kosmatka, K. J., Beasley, T. M., ... Weindruch, R. (2009). Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 325(5937), 201–204.
- Colman, R. J., Beasley, T. M., Kemnitz, J. W., Johnson, S. C., Weindruch, R., & Anderson, R. M. (2014). Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nature Communications*, 5, 3557.
- Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., & Piškur, J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, 14(6), 826–832.
- Demidenko, Z. N., & Blagosklonny, M. V. (2009). Quantifying pharmacologic suppression of cellular senescence: Prevention of cellular hypertrophy versus preservation of proliferative potential. *Aging*, 1(12), 1008–1016.
- Denoth Lippuner, A., Julou, T., & Barral, Y. (2014). Budding yeast as a model organism to study the effects of age. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2), 300–325.
- Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., & Devin, A. (2011). The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(6), 568–576.
- Dong, X., Milholland, B., & Vijg, J. (2016). Evidence for a limit to human lifespan. *Nature*, 538(7624), 257–259.
- Folmes, C. D., Ma, H., Mitalipov, S., & Terzic, A. (2016). Mitochondria in pluripotent stem cells: Stemness regulators and disease targets. *Current Opinion in Genetics and Development*, 38, 1–7.
- Folmes, C. D. L., & Terzic, A. (2016). Energy metabolism in the acquisition and maintenance of stemness. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 52, 68–75.
- Fontana, L., & Partridge, L. (2015). Promoting health and longevity through diet: From model organisms to humans. *Cell*, 161(1), 106–118.
- Gems, D., & Partridge, L. (2013). Genetics of longevity in model organisms: Debates and paradigm shifts. *Annual Review of Physiology*, 75, 621–644.
- Hagman, A., Säll, T., Compagno, C., & Piskur, J. (2013). Yeast “make-accumulate-consume” life strategy evolved as a multi-step process that predates the whole genome duplication. *PLoS One*, 8(7), e68734.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033.
- Heilbronn, L. K., & Ravussin, E. (2003). Calorie restriction and aging: Review of the literature and implications for studies in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 361–369.
- Hu, C., Fan, L., Cen, P., Chen, E., Jiang, Z., & Li, L. (2016). Energy metabolism plays a critical role in stem cell maintenance and differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 253.
- Huberts, D. H. E. W., Gonzalez, J., Lee, S. S., Litsios, A., Hubmann, G., Wit, E. C., & Heinemann, M. (2014). Calorie restriction does not elicit a robust extension of replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(32), 11727–11731.
- Janssens, G. E., Meinema, A. C., González, J., Wolters, J. C., Schmidt, A., Guryev, V., ... Heinemann, M. (2015). Protein biogenesis machinery is a driver of replicative aging in yeast. *eLife*, 4, e08527.
- Kaeberlein, M., Hu, D., Kerr, E. O., Tsuchiya, M., Westman, E. A., Dang, N., ... Kennedy, B. K. (2005). Increased life span due to calorie restriction in respiratory-deficient yeast. *PLOS Genetics*, 1(5), e69.
- Kaeberlein, M., Kirkland, K. T., Fields, S., & Kennedy, B. K. (2004). Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *PLOS Biology*, 2(9), E296.
- Kafri, M., Metzl-Raz, E., Jona, G., & Barkai, N. (2016). The cost of Protein Production. *Cell Reports*, 14(1), 22–31.
- Kruegel, U., Robison, B., Dange, T., Kahlert, G., Delaney, J. R., Kotireddy, S., ... Schmidt, M. (2011). Elevated proteasome capacity extends replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genetics*, 7(9), e1002253.
- Lee, D., Son, H. G., Jung, Y., & Lee, S. J. V. (2017). The role of dietary carbohydrates in organismal aging. *Cellular and Molecular Life Science*, 74(10), 1793–1803.
- Lin, S. J., Defossez, P. A., & Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 289(5487), 2126–2128.
- Lin, S. J., Ford, E., Haigis, M., Liszt, G., & Guarente, L. (2004). Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes and Development*, 18(1), 12–16.
- Lin, S. J., Kaeberlein, M., Andalis, A. A., Sturtz, L. A., Defossez, P. A., Culotta, V. C., ... Guarente, L. (2002). Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*, 418(6895), 344–348.
- Longo, V. D., & Mattson, M. P. (2014). Fasting: Molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metabolism*, 19(2), 181–192.
- Lu, S. P., & Lin, S. J. (2010). Regulation of yeast sirtuins by NAD(+) metabolism and calorie restriction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(8), 1567–1575.

- Marck, A., Antero, J., Berthelot, G., Saulière, G., Jancovici, J. M., Masson-Delmotte, V., ... Toussaint, J. F. (2017). Are we reaching the limits of *Homo sapiens*? *Frontiers in Physiology*, 8, 812.
- Maslanka, R., Kwolek-Mirek, M., & Zdrag-Tecza, R. (2017). Consequences of calorie restriction and calorie excess for the physiological parameters of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Research*, 17(8), 1–15.
- Maslanka, R., Kwolek-Mirek, M., & Zdrag-Tecza, R. (2018). Autofluorescence of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells caused by glucose metabolism products and its methodological implications. *Journal of Microbiological Methods*, 146, 55–60.
- Masoro, E. J. (2000). Caloric restriction and aging: An update. *Experimental Gerontology*, 35(3), 299–305.
- Masumoto, H., & Matsuyama, S. (2018). The combination of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase gene deletion and the interruption of gluconeogenesis causes increased glucose metabolism in budding yeast. *PLOS One*, 13(3), e0194942.
- Mathers, J. C. (2015). Impact of nutrition on the ageing process. *British Journal of Nutrition*, 113(Suppl.), S18–S22.
- Mattison, J. A., Colman, R. J., Beasley, T. M., Allison, D. B., Kemnitz, J. W., Roth, G. S., ... Anderson, R. M. (2017). Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nature Communications*, 8, 14063.
- Mattison, J. A., Roth, G. S., Beasley, T. M., Tilmont, E. M., Handy, A. M., Herbert, R. L., ... de Cabo, R. (2012). Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature*, 489(7415), 318–321.
- McCay, C. M., Crowell, M. F., & Maynard, L. A. (1989). The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition*, 5(3), 155–171.
- Minois, N., Frajnt, M., Wilson, C., & Vaupel, J. W. (2005). Advances in measuring lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(2), 402–406.
- Molenaar, D., van Berlo, R., de Ridder, D., & Teusink, B. (2009). Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. *Molecular Systems Biology*, 5, 323.
- Morocutti, A., Earle, K. A., Sethi, M., Piras, G., Pal, K., Richards, D., ... Viberti, G. (1996). Premature senescence of skin fibroblasts from insulin-dependent diabetic patients with kidney disease. *Kidney International*, 50(1), 250–256.
- Nidelet, T., Brial, P., Camarasa, C., & Dequin, S. (2016). Diversity of flux distribution in central carbon metabolism of *S. cerevisiae* strains from diverse environments. *Microbial Cell Factories*, 15, 58.
- Nilsson, A., & Nielsen, J. (2016). Metabolic trade-offs in yeast are caused by F1FO-ATP synthase. *Scientific Reports*, 6, 22264.
- de Paiva, D. C., Bersusa, A. A., & Escuder, M. M. (2006). [Healthcare assessment for patients with diabetes and/or hypertension under the Family Health Program in Francisco Morato, Sao Paulo, Brazil]. *Cadernos de Saúde Pública*, 22(2), 377–385.
- Perić, M., Lovrić, A., Šarić, A., Musa, M., Bou Dib, P., Rudan, M., ... Kriško, A. (2017). TORC1-mediated sensing of chaperone activity alters glucose metabolism and extends lifespan. *Ageing cell*, 16(5), 994–1005.
- Ralser, M., Wamelink, M. M., Kowald, A., Gerisch, B., Heeren, G., Struys, E. A., ... Krobitsch, S. (2007). Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of Biology*, 6(4), 10.
- Redman, L. M., Smith, S. R., Burton, J. H., Martin, C. K., Il'yasova, D., & Ravussin, E. (2018). Metabolic slowing and reduced oxidative damage with sustained caloric restriction support the rate of living and oxidative damage theories of aging. *Cell Metabolism*, 27(4), 805–815.
- Rolland, F., Winderickx, J., & Thevelein, J. M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*, 2(2), 183–201.
- Roux, A. E., Leroux, A., Alaamery, M. A., Hoffman, C. S., Chartrand, P., Ferbeyre, G., & Rokeach, L. A. (2009). Pro-aging effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast. *PLOS Genetics*, 5(3), e1000408.
- Schleit, J., Johnson, S. C., Bennett, C. F., Simko, M., Trongtham, N., Castanza, A., ... Kaeberlein, M. (2013). Molecular mechanisms underlying genotype-dependent responses to dietary restriction. *Ageing cell*, 12(6), 1050–1061.
- Schuster, S., Boley, D., Moller, P., Stark, H., & Kaleta, C. (2015). Mathematical models for explaining the Warburg effect: A review focussed on ATP and biomass production. *Biochemical Society Transactions*, 43(6), 1187–1194.
- Sharma, P. K., Agrawal, V., & Roy, N. (2011). Mitochondria-mediated hormetic response in life span extension of calorie-restricted *Saccharomyces cerevisiae*. *Age (Dordr)*, 33(2), 143–154.
- Sinclair, D. A. (2005). Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(9), 987–1002.
- Smith, D. L., Nagy, T. R., & Allison, D. B. (2010). Calorie restriction: What recent results suggest for the future of ageing research. *European Journal of Clinical Investigation*, 40(5), 440–450.
- Smith, jr, D. L., McClure, J. M., Matecic, M., & Smith, J. S. (2007). Calorie restriction extends the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* independently of the Sirtuins. *Ageing cell*, 6(5), 649–662.
- Steffen, K. K., MacKay, V. L., Kerr, E. O., Tsuchiya, M., Hu, D., Fox, L. A., ... Kaeberlein, M. (2008). Yeast life span extension by depletion of 60s ribosomal subunits is mediated by Gcn4. *Cell*, 133(2), 292–302.
- Tahara, E. B., Cunha, F. M., Basso, T. O., Della Bianca, B. E., Gombert, A. K., & Kowaltowski, A. J. (2013). Calorie restriction hysteretically primes aging *Saccharomyces cerevisiae* toward more effective oxidative metabolism. *PLOS One*, 8(2), e56388.
- Tamaki, H., Yun, C. W., Mizutani, T., Tsuzuki, T., Takagi, Y., Shinozaki, M., ... Kumagai, H. (2005). Glucose-dependent cell size is regulated by a G protein-coupled receptor system in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells*, 10(3), 193–206.
- Tavernarakis, N., & Driscoll, M. (2002). Caloric restriction and lifespan: A role for protein turnover? *Mechanisms of Ageing and Development*, 123(2–3), 215–229.
- Tian, W. N., Braunstein, L. D., Pang, J., Stuhlmeier, K. M., Xi, Q. C., Tian, X., & Stanton, R. C. (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10609–10617.
- Vijg, J., & Le Bourg, E. (2017). Aging and the inevitable limit to human life span. *Gerontology*, 63(5), 432–434.
- Wawryn, J., Krzepińko, A., Myszk, A., & Biliński, T. (1999). Deficiency in superoxide dismutases shortens life span of yeast cells. *Acta Biochimica Polonica*, 46(2), 249–253.
- Weinberger, M., Mesquita, A., Carroll, T., Marks, L., Yang, H., Zhang, Z., ... Burhans, W. C. (2010). Growth signaling promotes chronological aging in budding yeast by inducing superoxide anions that inhibit quiescence. *Ageing*, 2(10), 709–726.
- Zdrag, R., Bartosz, G., & Bilinski, T. (2008). Is the yeast a relevant model for aging of multicellular organisms? An insight from the total lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Aging Science*, 1(3), 159–165.
- Zdrag-Tecza, R., Kwolek-Mirek, M., Alabrudzińska, M., & Skoneczna, A. (2018). Cell Size influences the reproductive potential and total lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast as revealed by the analysis of polyploid strains. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1898421–17.
- Zdrag-Tecza, R., Kwolek-Mirek, M., Bartosz, G., & Bilinski, T. (2009). Cell volume as a factor limiting the replicative lifespan of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biogerontology*, 10(4), 481–488.

- Zadrag-Tecza, R., Molon, M., Mamczur, J., & Bilinski, T. (2013). Dependence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* post-reproductive lifespan on the reproductive potential. *Acta Biochimica Polonica*, 60(1), 111–115.
- Zadrag-Tecza, R., & Skoneczna, A. (2016). Reproductive potential and instability of the rDNA region of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast: Common or separate mechanisms of regulation? *Experimental Gerontology*, 84, 29–39.
- Zimmet, P., & Thomas, C. R. (2003). Genotype, obesity and cardiovascular disease--has technical and social advancement outstripped evolution? *Journal of Internal Medicine*, 254(2), 114–125.
- Zuin, A., Castellano-Esteve, D., Ayté, J., & Hidalgo, E. (2010). Living on the edge: Stress and activation of stress responses promote lifespan extension. *Aging*, 2(4), 231–237.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**How to cite this article:** Maslanka R, Zadrag-Tecza R. Less is more or more is less: Implications of glucose metabolism in the regulation of the reproductive potential and total lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *J Cell Physiol*. 2019; 1–17. <https://doi.org/10.1002/jcp.28386>

**OŚWIADCZENIA**  
**WSPÓŁAUTORÓW**

Rzeszów, dnia 01.03.2019 r.

mgr inż. Roman Maślanka  
Zakład Biochemii i Biologii Komórki  
Uniwersytet Rzeszowski, Wydział Biotechnologii  
Promotor: dr hab. Renata Zadrag-Tęcza, prof. UR  
Promotor pomocniczy: dr Magdalena Kwolek-Mirek

## OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, na co zezwala Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003, art. 13.1 (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.), Ustawa z dnia 27 lipca 2005 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz.U. Nr 164, poz. 1365, z późn. zm.), Rozporządzenie MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. 2018 r., poz. 261) oraz przyjęta na mocy uchwały Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego z dnia 10.07.2014 rekomendacja w tej sprawie, będąca uszczegółowieniem pkt. 21 Regulaminu Postępowania w Przewodach Doktorskich na Wydziale Biologiczno-Rolniczym UR przyjętego na posiedzeniu Rady Wydziału w dniu 24.01.2013, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej, a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższych artykułów, które zamierzam przedstawić jako własną dysertację doktorską jest następujący:

1. **Maślanka R., Zadrag-Tęcza R.** (2017) Glukoza - substancja o istotnym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania komórki i organizmu. [W]: *Wybrane substancje o znaczeniu biologicznym. Spojrzenie młodych naukowców. Monografia 2017*, red. Magdalena Kwolek-Mirek, Mateusz Mołoń, Kraków: Creativetime, 108-115. ISBN 978-83-63058-78-4.

Ogólny wkład mojej pracy naukowej wynosi **80%**

- koncepcja pracy: 90% - określenie znaczenia problemu badawczego
- metodyka: nie dotyczy
- praca terenowa: nie dotyczy
- praca laboratoryjna: nie dotyczy
- analiza i dyskusja danych literaturowych: 70%
- prace nad manuskrytem (draft, wersja końcowa): 80%
- analiza bibliograficzna: 80%
- proces publikacji: 80% - korekta tekstu po recenzji, autor korespondujący

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Pana mgr inż. Romana Maślankę udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jego dysertacji doktorskiej:

1. dr hab. Renata Zadrag-Tęcza, prof. UR .....



2. **Maslanka R.**, Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tecza R. (2017) Consequences of calorie restriction and calorie excess for the physiological parameters of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Research*. 17(8): fox087.

Ogólny wkład mojej pracy naukowej wynosi **65%**

- koncepcja badań: 35% - określenie znaczenia problemu badawczego
- metodyka: 50% - opracowanie metodyki oznaczania tempa pobierania glukozy, określenie warunków przeprowadzonych oznaczeń, zaadaptowanie metod statystycznych do analizy uzyskanych danych
- praca terenowa: nie dotyczy
- praca laboratoryjna: 90% - wykonanie oznaczeń
- analiza i zestawienie wyników: 80%
- interpretacja wyników i dyskusja: 65%
- prace nad manuskrytem (draft, wersja końcowa): 60%
- analiza bibliograficzna: 85%
- proces publikacji: 55% - korekta tekstu po recenzji, autor korespondujący

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Pana mgr inż. Romana Maślankę udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jego dysertacji doktorskiej:

1. dr Magdalena Kwolek-Mirek ..... *Magdalena Kwolek-Mirek* .....
2. dr hab. Renata Zadrag-Tęcza, prof. UR ..... *R. Tecza* .....

3. **Maslanka R.**, Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tecza R. (2018) Autofluorescence of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells caused by glucose metabolism products and its methodological implications. *Journal of Microbiological Methods*. 146: 55-60.

Ogólny wkład mojej pracy naukowej wynosi **75%**

- koncepcja badań: 50% - określenie znaczenia problemu badawczego
- metodyka: 90% - opracowanie metodyki i warunków użycia fluorescencyjnego analogu glukozy
- praca terenowa: nie dotyczy
- praca laboratoryjna: 100% - wykonanie oznaczeń
- analiza i zestawienie wyników: 80%
- interpretacja wyników i dyskusja: 70%
- prace nad manuskrytem (draft, wersja końcowa): 70%
- analiza bibliograficzna: 80%
- proces publikacji: 60% - korekta tekstu po recenzji, autor korespondujący

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Pana mgr inż. Romana Maślankę udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jego dysertacji doktorskiej:

1. dr Magdalena Kwolek-Mirek ..... *Magdalena Kwolek-Mirek* .....
2. dr hab. Renata Zadrag-Tęcza, prof. UR ..... *R. Tecza* .....

4. **Masłanka R., Zadrag-Tecza R.** (2019) Less is more or more is less: implications of glucose metabolism in the regulation of the reproductive potential and total lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Journal of Cellular Physiology*. doi: 10.1002/jcp.28386 dostępny on-line: 25 luty 2019.

Ogólny wkład mojej pracy naukowej wynosi **60%**

- koncepcja badań: 40% - określenie znaczenia problemu badawczego
- metodyka: 50% - adaptacja metodyki przeprowadzonych oznaczeń na potrzeby analiz wykonywanych z użyciem komórek drożdży, zaadaptowanie metod statystycznych do analizy uzyskanych danych
- praca terenowa: nie dotyczy
- praca laboratoryjna: 85% - wykonanie oznaczeń
- analiza i zestawienie wyników: 80%
- interpretacja wyników i dyskusja: 70%
- prace nad manuskrytem (draft, wersja końcowa): 50%
- analiza bibliograficzna: 85%
- proces publikacji: 20% - korekta tekstu po recenzji

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Pana mgr inż. Romana Maślankę udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jego dysertacji doktorskiej:

1. dr hab. Renata Zadrag-Tęcza, prof. UR ..... 