



UNIWERSYTET RZESZOWSKI
KOLEGIUM NAUK PRZYRODNICZYCH

mgr Karolina Stępień

**Zaburzenia inicjacji replikacji genomowego DNA jako czynnik
regulujący długość życia drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
w modelu chronologicznego i replikacyjnego starzenia**

Instytut Biologii

Promotor: dr hab. Mateusz Moloń, prof. UR

Dziedzina nauki: nauki ścisłe i przyrodnicze
Dyscyplina naukowa: nauki biologiczne

Rzeszów, 2024

*Pragnę podziękować mojemu promotorowi,
dr hab. Mateuszowi Mołoniowi, prof. UR
za cenne wskazówki i wsparcie
na każdym etapie mojej naukowej drogi.*

*Dziękuję także Rodzicom za cierpliwość
oraz Przyjaciółom, a zwłaszcza Bartkowi
za duchowy doping.*

Spis treści

1. Streszczenie	5
2. Abstract.....	7
3. Wprowadzenie	9
4. Cele pracy	18
5. Hipotezy	19
6. Materiały i metody	20
6.1. Szczepy użyte w badaniach.....	20
6.2. Warunki wzrostu	23
6.3. Analiza kinetyki wzrostu komórek	23
6.4. Określenie średniego czasu podwojenia	23
6.5. Test wydajności sporulacji.....	24
6.6. Pomiar aktywności metabolicznej komórek	24
6.7. Analiza cyklu komórkowego i zawartości DNA metodą cytometrii przełykowej.....	25
6.8. Barwienie mitochondrialnego DNA za pomocą DAPI w teście in vivo.....	26
6.9. Izolacja RNA i analiza RT-qPCR	26
6.10. Oznaczanie częstotliwości ognisk Rad52 i Rfa1 metodą mikroskopii fluorescencyjnej	28
6.11. Analizy starzenia replikacyjnego	30
6.11.1. Określenie potencjału reprodukcyjnego komórek	30
6.11.2. Określenie całkowitej długości życia	30
6.12. Analizy chronologicznej długości życia	30
6.13. Spektroskopia Ramana.....	31
6.14. Analiza wrażliwości komórek drożdży wobec wybranych czynników stresowych przy użyciu testu kropelkowego.....	32
6.15. Analiza statystyczna.....	32
7. Wyniki	33

7.1. Wpływ delekcji pojedynczej kopii genów zaangażowanych w inicjację replikacji DNA na tempo wzrostu, częstotliwość sporulacji oraz aktywność metaboliczną	33
7.2. Wpływ zaburzeń inicjacji replikacji DNA na cykl komórkowy	38
7.3. Analiza zawartości mtDNA w szczepach lowPICC	41
7.4. Analiza profilu ekspresji genów zaangażowanych w inicjację replikacji DNA w heterozygotycznych szczepach drożdży.....	43
7.5. Częstość występowania ognisk Rad52-YFP oraz Rfa1-YFP.....	45
7.6. Wpływ zaburzeń inicjacji replikacji DNA na starzenie komórek aktywnych mitotycznie (starzenie replikacyjne)	49
7.7. Wpływ zaburzeń inicjacji replikacji DNA na tempo starzenia się komórek post-mitotycznych (starzenie chronologiczne)	54
7.8. Wpływ zaburzeń inicjacji replikacji DNA na profil biochemiczny komórki ..	61
8. Dyskusja	71
9. Wnioski.....	82
10. Literatura	83
11. Zbiór publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej	95
11.1. Depletion of the Origin Recognition Complex Subunits Delays Aging in Budding Yeast.....	96
11.2. Disorders in the CMG helicase complex increase the proliferative capacity and delay chronological aging of budding yeast.....	117
11.3. Restricting the level of the proteins essential for the regulation of the initiation step of replication extends the chronological lifespan and reproductive potential in budding yeast	132
12. Oświadczenia.....	158

1. Streszczenie

Precyzyjna replikacja DNA ma kluczowe znaczenie dla zapewnienia dokładnego dziedziczenia informacji genetycznej. Mechanizm replikacji DNA jest wysoce zakonserwowany ewolucyjnie, począwszy od prostych organizmów jednokomórkowych, takich jak drożdże, po komórki ludzkie. Za postęp oraz regulację kolejnych etapów procesu replikacji DNA odpowiedzialnych jest wiele pojedynczych białek oraz kompleksów białkowych. Replikacja DNA u eukariontów rozpoczyna się od związania kompleksu ORC z miejscami początków replikacji na nici DNA. Kolejnym krokiem jest stworzenie replisomu, czyli molekularnej maszyny zdolnej do rozpoczęcia i kontynuacji replikacji DNA. Kluczowym składnikiem replisomu jest kompleks helikazy CMG (Cdc45-MCM-GINS), który rozwija dwuniciowy DNA oraz koordynuje pracę innych składników replisomu, w tym polimeraz DNA. Grupa białek replikacyjnych takich jak Cdc6, Dbf4, Sld3, Sld7, Sld2 i Mcm10 bierze udział w regulacji etapów składania replisomu. Niemal wszystkie komórki w trakcie swojego życia przechodzą ograniczoną liczbę rund replikacyjnych, co oznacza, że ich potencjał podziałowy jest także ograniczony. Po jego wyczerpaniu komórki z reguły nie umierają od razu lecz wchodzą w fazę starzenia, w której trwają aż do śmierci. Starzenie się definiujemy zatem jako postępujący spadek integralności fizjologicznej, prowadzący do upośledzenia funkcji biologicznych, w tym płodności i rosnącej podatności na śmierć. Zaburzenia replikacji DNA często prowadzą do stresu replikacyjnego i są identyfikowane jako jeden z potencjalnych czynników determinujących tempo starzenia. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było sprawdzenie, w jaki sposób brak jednej kopii genów zaangażowanych w inicjację replikacji DNA, w heterozygotycznych komórkach *Saccharomyces cerevisiae*, wpływa na fizjologię i starzenie się komórek. Jako materiał badawczy wykorzystano szczepy drożdży pozbawione jednej kopii genów kompleksu ORC, określone jako *ORC/orcΔ*, szczepy pozbawione jednej kopii genów kompleksu CMG, określone jako *CMG/cmɡΔ* oraz szczepy posiadające tylko jedną funkcjonalną kopię genów kodujących niezbędne białka replikacyjne, takie jak Cdc6, Dbf4, Sld3, Sld7, Sld2 i Mcm10, określone jako lowPICC. Na podstawie zrealizowanych badań wykazano, że komórki posiadające tylko jedną kopię genów zaangażowanych w inicjację replikacji DNA, czyli *ORC/orcΔ*, *CMG/cmɡΔ* oraz grupa szczepów lowPICC w większości wykazywały znaczny spadek poziomu ich transkryptów mRNA, zaburzenia cyklu komórkowego i wydłużony czas podwojenia oraz cechowały się zmianami w profilu biochemicznym. Wykazano również, że obniżenie ekspresji genów zaangażowanych

w inicjację replikacji znacząco wpływa na potencjał reprodukcyjny komórek, z wyjątkiem *ORC6/orc6Δ* i *MCM2/mcm2Δ*. Co ciekawe w odniesieniu do mutantów *ORC/orcΔ* i *CMG/cmglΔ* nie zaobserwowano różnic w całkowitym czasie przeżycia komórek aktywnych mitotycznie (model replikacyjnego starzenia). W przeciwieństwie do tego, heterozygoty lowPICC charakteryzowało skrócenie całkowitego czasu życia w tym modelu, czyli do pojawienia się fenotypu przyspieszonego starzenia. Wykazano także, że zaburzenia inicjacji replikacji DNA mają również wpływ na tempo starzenia komórek post-mitotycznych (chronologiczną długość życia) w każdym z badanych szczepów. Dodatkowo zaobserwowano korelację między poziomem RNA i polisacharydów w drożdżach, a ich potencjałem reprodukcyjnym, a także korelację między poziomem kwasów tłuszczowych, a czasem podwojenia komórek w heterozygotach *CMG/cmglΔ*. Ponadto zmniejszona ekspresja genów lowPICC doprowadziła do nieprawidłowej odpowiedzi na uszkodzenie DNA oraz wpłynęła na zawartość komórkowego i mitochondrialnego DNA. Co ważne, wykazano również silnie ujemną korelację pomiędzy zawartością makrocząsteczek komórkowych (RNA, białek, lipidów, polisacharydów), a procesem starzenia w tej grupie. Zaprezentowane w ramach rozprawy doktorskiej dane rzucają również nowe światło na potencjalną użyteczność drożdży w badaniu możliwych celów terapeutycznych w leczeniu raka.

2. Abstract

Precise DNA replication is crucial to ensuring accurate inheritance of genetic information. The mechanism of DNA replication is highly evolutionarily conserved: from simple single-cell organisms such as yeast to human cells. Many individual proteins and protein complexes are responsible for the progress and regulation of subsequent stages of the DNA replication process. DNA replication in eukaryotes begins with the binding of the ORC complex to replication origins on the DNA strand. The next step is to form a replisome - molecular machine which is able to start and continue DNA replication. The key component of the replisome is the CMG helicase complex (Cdc45-MCM-GINS), which unwinds double-stranded DNA and coordinates the work of other components of the replisome, including DNA polymerases. A group of replication proteins such as Cdc6, Dbf4, Sld3, Sld7, Sld2 and Mcm10 are involved in the regulation of replisome assembly steps. Almost all cells do a limited number of replication rounds during their lifetimes, which means that their division potential is also limited. Upon its depletion, cells typically do not die immediately but enter the aging phase, which lasts until death. Aging is defined as a progressive decline in physiological integrity, leading to impaired biological functions, including fertility and increasing susceptibility to death. DNA replication disorders often lead to replication stress and are identified as one of the potential factors determining the rate of aging. The aim of this doctoral dissertation was to examine how the lack of one copy of genes involved in the initiation of DNA replication in heterozygous *Saccharomyces cerevisiae* cells affects cell physiology and aging. The research material used was yeast strains lacking one copy of the ORC complex genes, referred to as *ORC/orcΔ*, strains lacking one copy of the CMG complex genes, referred to as *CMG/cmɡΔ*, and strains having only one functional copy of genes encoding essential replication proteins, such as Cdc6, Dbf4, Sld3, Sld7, Sld2 and Mcm10, referred to as lowPICC. Based on the conducted research, it was shown that cells with only one copy of the genes involved in the initiation of DNA replication, *ORC/orcΔ*, *CMG/cmɡΔ*, and lowPICC strains mostly showed a significant decrease in the level of their mRNA transcripts, cell cycle disorders and prolonged doubling time, and were characterized by changes in the biochemical profile. It has also been shown that reducing the expression of genes involved in the initiation of replication significantly affects the reproductive potential of cells, with the exception of *ORC6/orc6Δ* and *MCM2/mcm2Δ*. Interestingly, in relation to the *ORC/orcΔ* and *CMG/cmɡΔ* mutants, no differences were observed in the overall survival of mitotically active cells (replicative aging model). In contrast,

lowPICC heterozygotes were characterized by a shortened overall lifespan in this model, i.e. until the appearance of an accelerated aging phenotype. It has also been shown that disturbances in the initiation of DNA replication also influence the rate of aging of post-mitotic cells (chronological lifespan) in each of the tested strains. Additionally, we observed a correlation between RNA level and polysaccharides in yeast and their reproductive potential, as well as a correlation between the level of fatty acids and the cell doubling time in *CMG/cmgΔ* heterozygotes. Moreover, reduced expression of lowPICC genes led to an abnormal response to DNA damage and affected cellular and mitochondrial DNA content. Importantly, a strong negative correlation was also demonstrated between the content of cellular macromolecules (RNA, proteins, lipids, polysaccharides) and the aging process in this group. The data presented as part of the doctoral dissertation also shed new light on the potential usefulness of yeast in the study of potential therapeutic targets in the treatment of cancer.

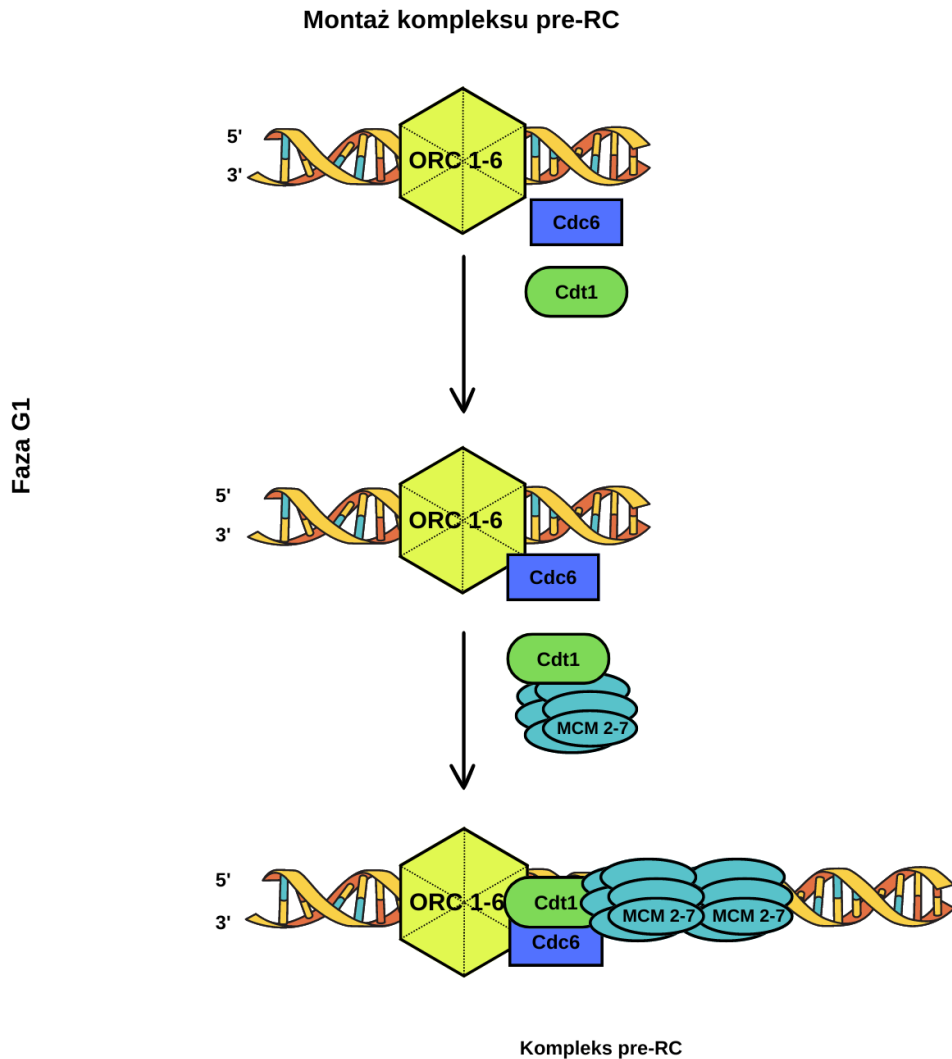
3. Wprowadzenie

Proces replikacji genomowego DNA zachodzi w fazie S cyklu komórkowego i polega na precyzyjnym skopiowaniu podwójnej nici DNA. Określa się go jako semikonserwatywny, co oznacza, że każda z nowo powstałych cząsteczek DNA zawiera jedną nić macierzystą i jedną potomną. Powielenie DNA jest etapem koniecznym przed podziałem komórki i warunkuje przekazanie pełnej i wiernej informacji genetycznej komórkom potomnym. Replikacja chromosomalnego DNA jest silnie zakonserwowana ewolucyjnie u wszystkich eukariontów. Jest procesem złożonym, w którym bierze udział wiele komponentów białkowych, a precyzyjne i wydajne powielanie informacji genetycznej wymaga ściśle regulowanej i skoordynowanej współpracy między nimi. Umownie replikację DNA dzieli się na trzy etapy: inicjację, elongację oraz terminację [O'Donnell i in. 2013].

Szczegóły molekularne zdarzeń zachodzących w trakcie inicjacji replikacji DNA najszerszej zostały zbadane w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*. Replikacja DNA rozpoczyna się zawsze w ściśle określonych miejscach zwanych miejscami inicjacji replikacji, lub miejscami *ori* (ang. *origin*). To w ich obrębie dochodzi do przyłączania się kolejnych komponentów białkowych, umożliwiających inicjację replikacji, a także regulujących ten proces [Diffley 2011; O'Donnell i in. 2013]. Kompleks rozpoznający miejsce inicjacji replikacji ORC (ang. *origin recognition complex*) jako pierwszy rozpoznaje i wiąże się w obrębie miejsc *ori* [Bell i in. 1992; Bell i in. 1995; Matsuda i in. 2007]. Kompleks ORC składa się z sześciu białek Orc1-6 i jest kompleksem wiążącym DNA zależnym od ATP [Chesnokov 2007]. Pierwszym organizmem, u którego zidentyfikowano ten heteroheksameryczny kompleks były drożdże *S. cerevisiae* [Bell i in. 1992]. Jednakże ortologi *ORC1-5* zidentyfikowano w różnych organizmach, od muszki owocowej po ludzi, co w znacznym stopniu sugerowało, że geny te były silnie konserwowane ewolucyjnie [Gossen i in. 1995; Dhar i in. 2000]. Z kolei gen *ORC6* nie wykazywał podobieństwa strukturalnego do innych białek Orc i był słabo konserwowany ewolucyjnie między *S. cerevisiae* a innymi eukariontami [Dhar i in. 2000]. Rolą kompleksu ORC jest tworzenie rusztowania dla wielu dodatkowych czynników replikacyjnych, w tym Cdc6, Cdt1 i Mcm2-7, które razem tworzą kompleks przedreplikacyjny (pre-RC) [Bell i in. 1992; Rao i in. 1995; Bell i in. 2002; Speck i in. 2005; Randell i in. 2006]. ORC pozostaje związany z chromatyną od początku replikacji przez cały cykl komórkowy [Matsuda i in. 2007], ale jest aktywny jedynie w późnej

mitozie i wczesnej fazie G1 cyklu komórkowego. Zarówno Orc1, jak i Orc5 wiążą ATP, chociaż tylko Orc1 ma aktywność ATPazy [Klemm i in. 1997]. Orc5 i Orc6 są z kolei kluczowe dla stabilności całego kompleksu ORC [Semple i in. 2006].

Podstawowa część systemu kontroli replikacji DNA ma na celu zapewnienie, że genom jest replikowany dokładnie raz na cykl komórkowy. Diffley i in. badając przebieg replikacji w modelu drożdży *S. cerevisiae* wykazali, że miejsca *ori* w fazie G1 cyklu komórkowego wykazują wzór „przedreplikacyjny”. W przeciwieństwie do tego, od momentu inicjacji replikacji do przejścia przez mitozę, miejsce *ori* znajduje się w stanie „post-replikacyjnym” [Diffley i in. 1994]. Jak zatem można scharakteryzować te dwa etapy? Licencjonowanie odpowiada ładowaniu nieaktywnych prekursorów helikazy Mcm2–7 na podwójnej helisie DNA, w miejscu początku replikacji. Sekwencja miejsca *ori* jest rozpoznawana przez kompleks rozpoznający ORC i w jego obrębie dochodzi do przyłączenia tego kompleksu. Następnie kompleks ORC rekrutuje białka Cdc6 i Cdt1. Razem te trzy czynniki licencyjne, tj. Cdc6, Cdt1 oraz kompleks ORC kierują ładowaniem helikazy Mcm2-7 wokół dsDNA. Podczas późnej fazy M, Cdc6 wiąże się z ORC, przekształcając go w aktywny kompleks zdolny do załadowania dwóch heksamerów Mcm 2-7 za pomocą białka Cdt1. W trakcie ładowania każdego z heksamerów Mcm 2-7, białka te tworzą przejściowy kompleks OCCM (ORC-Cdc6-Cdt1-Mcm2-7). Po hydrolizie ATP, Cdc6 i Cdt1 są uwalniane z OCCM, a w miejscu *ori* z pomocą kolejnych Cdc6 i Cdt1 przyłączany jest drugi heksamer Mcm2-7. Tak załadowany kompleks MCM jest topologicznie połączony z DNA i tworzy podwójny heksamer. Ta forma nieaktywnej helikazy jest również określana jako kompleks przedreplikacyjny (pre-RC). Uproszczony schemat etapów montażu kompleksu pre-RC został przedstawiony na Rycinie 1. Podczas fazy G1 białko Cdc6 jest niestabilne, a dalsze etapy formowania pre-RC regulowane są przez kolejne komponenty białkowe [Remus i in. 2009; Evrin i in. 2009; Bruck i Kaplan 2015; Ticaú i in. 2015; Yuan i in. 2020].



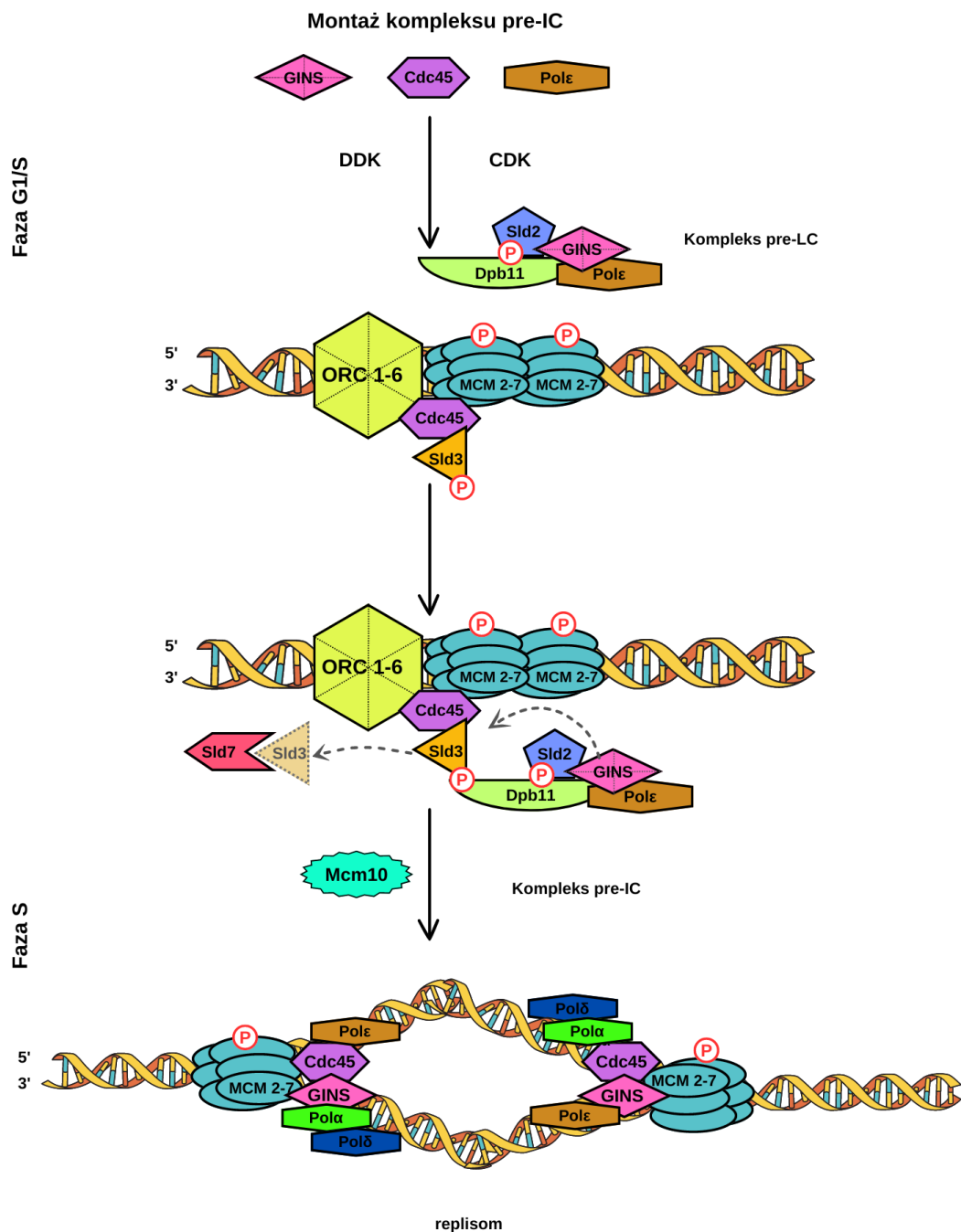
Ryc. 1. Uproszczony schemat etapów montażu kompleksu pre-RC w trakcie inicjacji replikacji DNA. [Schemat wykonano na podstawie Symeonidou i in. 2012, przy użyciu aplikacji Canva pro].

Podczas fazy S nieaktywny pre-RC jest przekształcany w aktywną helikazę, która rozwija dsDNA, umożliwiając w ten sposób polimerazom DNA dostęp i kopiowanie dwóch nici matrycowych. Kompleks CMG, nazwany od jego składników: Cdc45, kompleksu helikazy Mcm2-7 i kompleksu GINS (składającego się z 4 białek: Sld5, Psf1, Psf2 i Psf3), jest składany w fazie S w sposób zależny od dwóch kinaz: kinazy Dbf4-Cdc7 (DDK) i kinazy zależnej od cykliny fazy S (CDK). Białko Dbf4 to regulatorowa podjednostka kompleksu kinazy Cdc7-Dbf4 niezbędna dla aktywności kinazy Cdc7 i inicjacji replikacji [Moyer i in. 2006; Zegerman i Diffley 2007; Aparicio i in. 2009]. Podczas stresu replikacyjnego w punkcie kontrolnym fazy S dochodzi do hamowania aktywacji kinazy zależnej od Dbf4 (DDK) oraz kinazy zależnej od cyklin (CDK),

co powoduje późny początek replikacji DNA. Kinaza Rad53 jest głównym efektem punktu kontrolnego replikacji: wiąże i fosforyluje białko Dbf4, aby zapobiec uruchomieniu replikacji z miejsc *ori* [Bruck i Kaplan 2015; Chen i in. 2013]. W proces uruchamiania (aktywacji) miejsc *ori* (*origin firing*) zaangażowane są podjednostki pomocnicze helikazy: Cdc45 i GINS, czynniki regulujące takie jak Sld2, Sld3, Sld7 i Dpb11, a także polimeraza DNA ϵ i Mcm10 [Masumoto i in. 2000; Miyazawa-Onami i in. 2017; Douglas i in. 2018].

Odpowiednio, Sld3, Sld7 i Cdc45 są rekrutowane do pre-RC i składane w kompleks Cdc45-MCM-Sld3 ze zwiększonymi poziomami kinazy zależnej od Dbf4 [Heller i in. 2011]. Następnie kinazy zależne od cyklin fazy S fosforylują Sld3 i Sld2, aby promować ich wiązanie z Dbp11, co jest niezbędne do tworzenia kompleksu przedinicjacyjnego (pre-IC) [Muramatsu i in. 2010]. Uproszczony schemat etapów montażu kompleksu pre-IC został przedstawiony na Rycinie 2. Tworzenie kompleksu pre-IC obejmuje rekrutację kilku dodatkowych białek lub kompleksów (tzw. czynników uruchamiających) i uważa się, że umożliwia rozdzielenie podwójnego kompleksu MCM na pojedyncze heksamery [Miyazawa-Onami i in. 2017]. Fosforylacja DDK napędza rekrutację Cdc45 i Sld3 do podwójnego heksameru Mcm2-7. Sld3 wiąże się z fosforylowanymi peptydami w Mcm4 i Mcm6, co wskazuje, że Sld3 rekrutuje Cdc45 do fosforylowanego podwójnego heksameru Mcm2-7. Sld7 wiąże i stabilizuje Sld3 i zmniejsza jego powinowactwo do białka Cdc45 (Ryc. 2.) [Tanaka i in. 2011; McGuffee i in. 2013]. Kiedy Sld3 zostaje zastąpiony przez kompleks GINS (Sld5-Psf1-Psf2-Psf3), powstaje kompleks helikazy CMG (Cdc45-MCM-GINS) [Sheu i in. 2016]. Białka Sld2, Sld3 i Dpb11 są wymagane do rozpoczęcia replikacji DNA, ale nie przemieszczają się wraz z widełkami replikacyjnymi. Sld3 i Cdc45 wiążą się we wczesnej fazie inicjacji replikacji podczas fazy G1 cyklu komórkowego, natomiast Sld2, GINS, polimeraza ϵ i Dpb11 tworzą kompleks przejściowy na początku fazy S [Ogiwara i in. 2006; Mantiero i in. 2011; Dhingra i in. 2015;]. Samo utworzenie kompleksu CMG nie jest jednak wystarczające do zainicjowania odwijania helisy DNA w miejscu *ori*. Do aktywacji CMG niezbędne jest również białko Mcm10. Białko Mcm10 aktywuje kompleks CMG, stymulując odwijanie DNA i wiązanie RPA (kompleksu białka replikacyjnego A) z otrzymanym ssDNA, umożliwiając tym samym przejście z fazy inicjacji do fazy elongacji replikacji DNA [Ricke i Bielinsky 2004; van Deursen i in. 2012; Watase i in. 2012; Lõoke i in. 2017]. Aktywna helikaza CMG jest następnie sprzęgana z polimerazą DNA, Pol ϵ dla nici wiodącej lub Pol δ dla nici opóźnionej (Ryc. 2) [Kunkel i Burgers 2008; Douglas i Diffley

2016]. Dzięki aktywności białek Sld2, Sld3, Sld7, Dpb11 oraz Mcm10 przyłączenie i aktywowanie poszczególnych elementów maszynarii replikacyjnej zachodzi w ściśle określonej kolejności. Czynniki te określają także, które miejsca inicjacji są uruchamiane w danej rundzie replikacyjnej [Ilves i in. 2010].



Ryc. 2. Uproszczony schemat etapów montażu kompleksu pre-IC i obraz replisomu w trakcie inicjacji replikacji DNA. [Schemat wykonano na podstawie Symeonidou i in. 2012, przy użyciu aplikacji Canva pro].

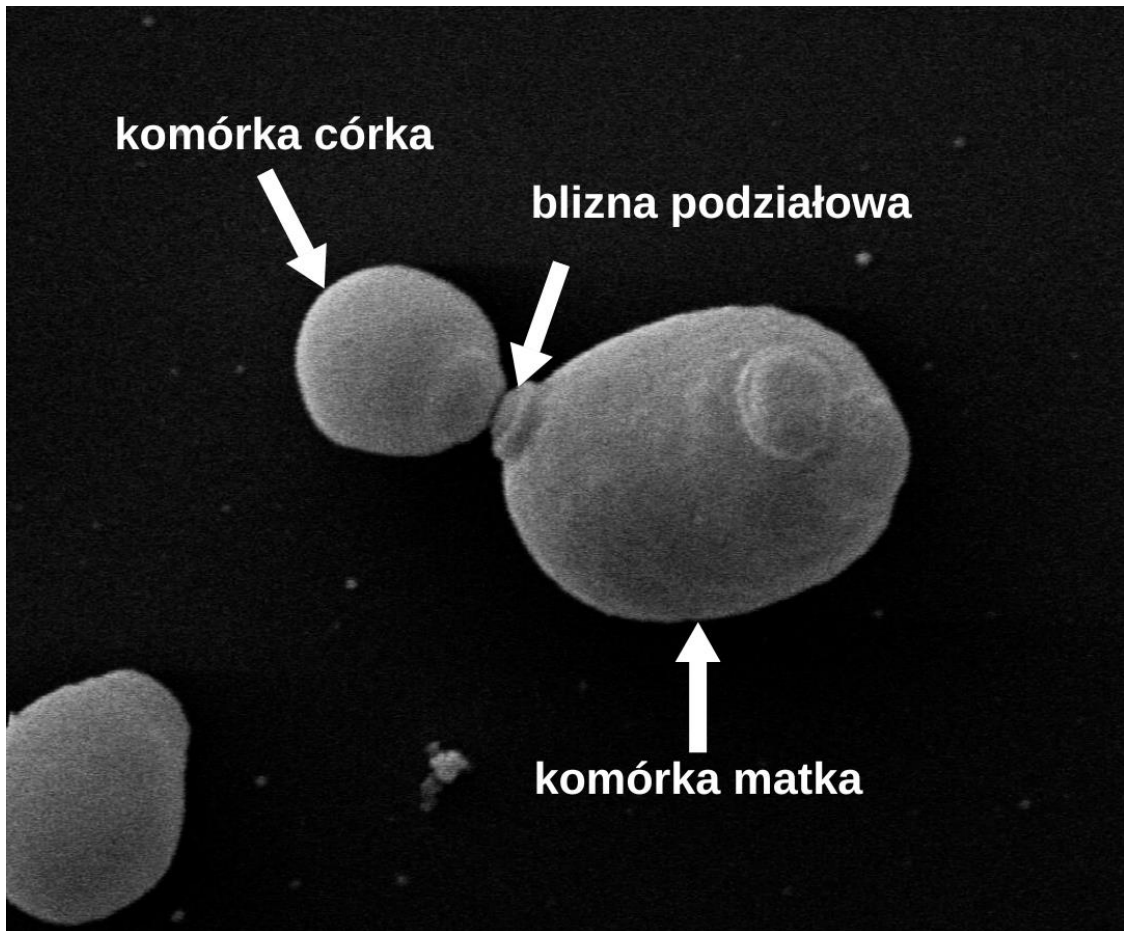
Drożdże pączkujące *Saccharomyces cerevisiae* od wielu lat stanowią jeden z podstawowych organizmów modelowych wykorzystywanych powszechnie w wielu

dziedzinach nauki. Ten jednokomórkowy grzyb jest dobrym układem eksperymentalnym z kilku powodów. Drożdże *S. cerevisiae* są łatwe i tanie w hodowli, szybko rozmnażają się bezpłciowo przez pączkowanie, a ich obserwacja nie jest skomplikowana. Jednocześnie badania prowadzone z wykorzystaniem *S. cerevisiae* są bezpieczne i nieszkodliwe dla środowiska oraz nie budzą dylematów moralno-etycznych. Ponadto genom *S. cerevisiae* został w pełni zsekwencjonowany, a wiele genów tego jednokomórkowca posiada swojego homologa w komórkach wyższych organizmów eukariotycznych, w tym i człowieka. Dodatkowo drożdże można łatwo poddać mutagenzie ukierunkowanej, transformacji a następnie selekcji mutantów z zastosowaniem markerów auksotroficznych lub innych markerów selekcyjnych, np. oporności na genetycyne. Dzięki temu istnieje możliwość wprowadzania mutacji punktowych, czy też dysrupcji całych genów, co pozwala na badanie roli tych genów lub ich braku w komórce [Karathia i in. 2011]. Z powyższych względów drożdże *S. cerevisiae* stanowią prosty i użyteczny model do badania przebiegu procesów fizjologicznych komórki, w tym i starzenia.

Starzenie się jest definiowane jako złożony, wieloczynnikowy proces biologiczny, który dotyczy wszystkich żywych organizmów. Jest to również proces, z którego nie ma wyjścia i kończy się śmiercią [López-Otín i in. 2013]. W wyniku starzenia, wraz z upływem czasu, dochodzi do nagromadzenia się wewnątrzkomórkowych uszkodzeń, upośledzenia funkcji tkanek i narządów, a w konsekwencji do śmierci organizmu. Tempo starzenia się jest pod pewną kontrolą genetyczną: zakres fenotypu starzenia się oraz długość życia jest różna u różnych gatunków, w tym także u człowieka. Ponadto tempo procesu starzenia podlega także wpływom czynników środowiskowych. Jak do tej pory powstało wiele hipotez i teorii, które próbują wyjaśnić przebieg oraz przyczyny starzenia [Harman 1981; López-Otín i in. 2013; de Cabo i in. 2014]. Istotą procesu starzenia się jest akumulacja uszkodzeń makrocząstek komórkowych przez całe życie. Integralność i stabilność DNA jest stale narażona na działanie egzogennych czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych, a także na endogenne zagrożenia takie jak błędy replikacji DNA, spontaniczne reakcje hydrolityczne i reaktywne formy tlenu. Zmiany genetyczne wynikające z zewnętrznych lub wewnętrznych uszkodzeń są bardzo zróżnicowane i obejmują mutacje punktowe, translokacje, aberracje chromosomowe, skracanie telomerów, a także zaburzenia genetyczne spowodowane integracją wirusów lub transpozonów. W celu zminimalizowania tych zmian, organizmy żywe posiadają złożoną

sieć mechanizmów reparacji DNA, które łącznie są w stanie poradzić sobie z większością powstałych uszkodzeń DNA [López-Otín i in. 2013].

Drożdże piekarnicze są uważane także za ważny układ modelowy, za pomocą którego z powodzeniem można badać procesy starzenia i pozwalają na odrębne analizy zarówno starzenia komórek aktywnych mitotycznie jak i komórek będących w fazie post-mitotycznej. W oparciu o układ modelowy drożdży pączkujących opracowano dwa główne modele starzenia: model replikacyjnego starzenia oraz model chronologicznego starzenia [Longo i in. 2012]. Model replikacyjnego starzenia (RLS – *replicative life span*) odwzorowuje procesy starzenia się komórek aktywnych mitotycznie. W modelu tym, według standardowego podejścia, starzenie określone jest przez liczbę komórek potomnych jaką komórka matka jest w stanie wyprodukować w trakcie swojego życia przed nieodwracalnym zatrzymaniem cyklu komórkowego. W rzeczywistości to standardowe podejście nie odzwierciedla jednak czasu życia komórki, lecz jej potencjał reprodukcyjny. Analizę potencjału reprodukcyjnego wykonuje się poprzez fizyczne odseparowanie komórek potomnych (córek), od komórki matki z wykorzystaniem mikroskopu wyposażonego w mikromanipulator. To co kluczowe, w przypadku analiz komórek aktywnych mitotycznie, analizuje się pojedyncze komórki, a nie populację komórek drożdży.



Ryc. 3. Pączkująca komórka drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (szczep BY4743). Zdjęcie SEM; pow. 10 000x [fot. M. Mołoń].

Późniejsze analizy i metody pozwoliły na dokładne określenie czasu życia komórek aktywnych mitotycznie i zaproponowano wprowadzenie parametru całkowitej długości życia komórki (TLS - *total life span*). Definiowana jest ona jako suma czasu, w którym komórka zachowuje zdolność do pączkowania (reprodukcyjna długość życia) i czasu, w którym przeżywa od ostatniego podwojenia, aż do śmierci (po reprodukcyjna długość życia) [Minois i in. 2005]. Zakłada się, że badania nad starzeniem replikacyjnym pozwalają na poznanie mechanizmów starzenia komórek aktywnych mitotycznie [Steinkraus i in. 2008]. Z kolei model chronologicznego starzenia (CLS - *chronological life span*) przybliży wiedzę na temat regulacji długości życia komórek, które nie mają aktywności mitotycznej. W modelu tym długość życia określa się na podstawie przeżywalności populacji komórek, które pozostają w fazie post-mitotycznej (fazie stacjonarnej). Podczas analiz CLS hodowle prowadzone są z wykorzystaniem płynnych podłoży syntetycznych suplementowanych odpowiednimi aminokwasami lub zasadami azotowymi i źródłem węgla (najczęściej glukozą). Zatrzymanie cyklu komórkowego jest

możliwe po wyczerpaniu źródła węgla. Następnie monitoruje się przeżywalność komórek na podstawie ich zdolności do wznowienia podziałów mitotycznych (zdolność do tworzenia kolonii) w świeżej pożywce YPD [Fabrizio i Longo 2003]. Wiadomo, że na starzenie się drożdży wpływa wiele czynników, w tym między innymi ograniczenie kalorii [Kaeberlein i in. 2005], związki przeciwstarzeniowe [Stępień i in. 2020; Czachor i in. 2020; Kwong i in. 2021], zaburzenia biogenezy rybosomów [Steffen i in. 2008; Borkiewicz i in. 2019; Mołoń i in. 2020], dysfunkcja mitochondriów [Delaney i in. 2013], czy zwiększony poziom reaktywnych form tlenu, prowadzący do uszkodzeń oksydacyjnych [Ludovico i Burhans 2014] lub tworzenia się pozachromosomalnych kółek rDNA (ERCs) [Sinclair i in. 1997; Mołoń i in. 2018].

Zaburzenia na poziomie replikacji DNA są także często wymieniane jako potencjalne czynniki determinujące proces starzenia. Jednak wciąż niewiele wiadomo na temat bezpośredniego związku między inicjacją replikacji a starzeniem. Dlatego głównym celem niniejszej pracy była analiza wpływu redukcji liczby kopii genów kodujących białka zaangażowane w proces inicjacji replikacji DNA na procesy starzenia w modelu replikacyjnego oraz chronologicznego starzenia drożdży *S. cerevisiae*.

W badaniach wykorzystano heterozygotyczne mutanty w tle genetycznym szczepu referencyjnego BY4743. Wybór układu heterozygotycznego podyktowany był faktem, że wszystkie z analizowanych genów są niezbędne do przeżycia (*essential genes*), a zatem delecja obu ich kopii jest letalna. Na potrzeby niniejszej pracy szczepy heterozygotyczne dla kompleksu ORC oznaczono jako *ORC/orcΔ*, dla kompleksu CMG jako *CMG/cmGΔ*, natomiast heterozygoty posiadające tylko jedną funkcjonalną kopię genów kodujących niezbędne białka replikacyjne, takie jak Cdc6, Dbf4, Sld3, Sld7, Sld2 i Mcm10 jako szczepy lowPICC (szczepy z niższą kontrolą pre-IC).

4. Cele pracy

Celem pracy wykonanej w ramach przygotowania rozprawy doktorskiej było:

- Określenie wpływu zaburzeń inicjacji replikacji DNA na starzenie heterozygotycznych mutantów drożdży *S. cerevisiae* w modelu replikacyjnego oraz chronologicznego starzenia.
- Określenie poziomu transkryptów mRNA genów zaangażowanych w inicjację replikacji DNA u heterozygot *ORC/orcΔ*, *CMG/cmglΔ* oraz *lowPICC*.
- Weryfikacja wpływu zaburzeń inicjacji replikacji DNA na tempo wzrostu oraz cykl komórkowy u analizowanych heterozygot.
- Określenie wpływu zaburzeń inicjacji replikacji DNA na skład biochemiczny komórki (biochemiczny odcisk palca) w zakresie polisacharydów, białek, lipidów oraz kwasów nukleinowych, jak również ich korelacji z parametrami starzeniowymi.

5. Hipotezy

- Zaburzenia inicjacji replikacji DNA mają istotny wpływ na starzenie replikacyjne i chronologiczne drożdży *S. cerevisiae*.
- Obniżenie liczby kopii genów zaangażowanych w inicjację replikacji DNA ma kluczowy wpływ na potencjał reprodukcyjny komórki.
- Zaburzenia inicjacji replikacji DNA powodują wydłużenie tempa wzrostu i zmiany na poziomie cyklu komórkowego.
- Zaburzenia inicjacji replikacji DNA mają wpływ na skład makrocząsteczek komórki w zakresie polisacharydów, białek, lipidów oraz kwasów nukleinowych.

6. Materiały i metody

6.1. Szczepy użyte w badaniach

Do badań wykorzystano heterozygotyczne komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w tle genetycznym szeroko wykorzystywanego szczepu referencyjnego BY4743. Wybór takiego układu był podyktowany faktem, że delecja obu kopii genu jest letalna w przypadku wszystkich analizowanych genów zaangażowanych w proces inicjacji replikacji.

Tab. 1 Szczepy drożdży wykorzystane w pracy

Szczep	Genotyp	Źródło
BY4743 a/α Typ dziki	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Open Biosystems
<i>ORC1/orc1</i> YML065W	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YML065w::kanMX4/YML065w</i>	Open Biosystems
<i>ORC2/orc2</i> YBR060C	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YBR060c::kanMX4/YBR060c</i>	Open Biosystems
<i>ORC3/orc3</i> YLL004W	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YLL004w::kanMX4/YLL004w</i>	Open Biosystems
<i>ORC4/orc4</i> YPR162C	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YPR162c::kanMX4/YPR162c</i>	Open Biosystems
<i>ORC5/orc5</i> YNL261W	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YNL261w::kanMX4/YNL261w</i>	Open Biosystems
<i>ORC6/orc6</i> YHR118C	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YHR118c::kanMX4/YHR118c</i>	Open Biosystems
<i>CDC45/cdc45</i> YLR103C	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YLR103c::kanMX4/YLR103c</i>	Open Biosystems
<i>MCM2/mcm2</i> YBL023C	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YBL023c::kanMX4/YBL023c</i>	Open Biosystems
<i>MCM3/mcm3</i> YEL032W	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YEL032w::kanMX4/YEL032w</i>	Open Biosystems
<i>MCM4/mcm4</i> YPR019W	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YPR019w::kanMX4/YPR019w</i>	Open Biosystems

<i>MCM5/mcm5</i> YLR274W	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YLR274w::kanMX4/YLR274w</i>	Open Biosystems
<i>MCM6/mcm6</i> YGL201C	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YGL201c::kanMX4/YGL201c</i>	Open Biosystems
<i>MCM7/mcm7</i> YBR202W	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YBR202w::kanMX4/YBR202w</i>	Open Biosystems
<i>PSF1/psf1</i> YDR013W	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YDR013w::kanMX4/YDR013w</i>	Open Biosystems
<i>PSF2/psf2</i> YJL072C	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YJL072c::kanMX4/YJL072c</i>	Open Biosystems
<i>PSF3/psf3</i> YOL146W	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YOL146w::kanMX4/YOL146w</i>	Open Biosystems
<i>SLD5/sld5</i> YDR489W	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YDR489w::kanMX4/YDR489w</i>	Open Biosystems
<i>CDC6/cdc6</i> YJL194W	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YJL194w::kanMX4/YJL194w</i>	Open Biosystems
<i>DBF4/dbf4</i> YDR052C	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YDR052c::kanMX4/YDR052c</i>	Open Biosystems
<i>SLD3/sld3</i> YGL113W	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δeu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YGL113w::kanMX4/YGL113w</i>	Open Biosystems
<i>SLD7/sld7</i> YOR060C	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2D0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YOR060c::kanMX4/YOR060c</i>	Open Biosystems
<i>SLD2/sld2</i> YKL108W	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YKL108w::kanMX4/YKL108w</i>	Open Biosystems
<i>MCM10/mcm10</i> YIL150C	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YIL150c::kanMX4/YIL150c</i>	Open Biosystems
BY4743 <i>a/α</i> pWJ1344	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0 [RAD52-YFP, LEU2]</i>	Stępień i in. 2020; Stępień i in. 2024b
<i>ORC1/orc1</i> YML065W pWJ1344	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YML065w::kanMX4/YML065w [RAD52-YFP, LEU2]</i>	Stępień i in. 2020
<i>ORC2/orc2</i> YBR060C pWJ1344	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YBR060c::kanMX4/YBR060c [RAD52-YFP, LEU2]</i>	Stępień i in. 2020

<i>ORC3/orc3</i> YLL004W pWJ1344	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YLL004w::kanMX4/YLL004w [RAD52-YFP, LEU2]</i>	Stępień i in. 2020
<i>ORC4/orc4</i> YPR162C pWJ1344	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YPR162c::kanMX4/YPR162c [RAD52-YFP, LEU2]</i>	Stępień i in. 2020
<i>ORC5/orc5</i> YNL261W pWJ1344	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YNL261w::kanMX4/YNL261w [RAD52-YFP, LEU2]</i>	Stępień i in. 2020
<i>ORC6/orc6</i> YHR118C pWJ1344	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YHR118c::kanMX4/YHR118c [RAD52-YFP, LEU2]</i>	Stępień i in. 2020
<i>CDC6/cdc6</i> YJL194W pWJ1344	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YJL194w::kanMX4/YJL194w [RAD52-YFP, LEU2]</i>	Stępień i in. 2024b
<i>DBF4/dbf4</i> YDR052C pWJ1344	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YDR052c::kanMX4/YDR052c [RAD52-YFP, LEU2]</i>	Stępień i in. 2024b
<i>SLD3/sld3</i> YGL113 pWJ1344W	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δeu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YGL113w::kanMX4/YGL113w [RAD52-YFP, LEU2]</i>	Stępień i in. 2024b
<i>SLD7/sld7</i> YOR06 pWJ13440C	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2D0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YOR060c::kanMX4/YOR060c [RAD52-YFP, LEU2]</i>	Stępień i in. 2024b
<i>SLD2/sld2</i> YKL108W pWJ1344	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YKL108w::kanMX4/YKL108w [RAD52-YFP, LEU2]</i>	Stępień i in. 2024b
<i>MCM10/mcm10</i> YIL150C pWJ1344	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YIL150c::kanMX4/YIL150c [RAD52-YFP, LEU2]</i>	Stępień i in. 2024b
BY4743 a/α YTE32	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0 RFA1/RFA1-YFP::LEU2</i>	Stępień i in. 2024b
<i>CDC6/cdc6</i> YJL194W YTE33	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YJL194w::kanMX4/YJL194w RFA1/RFA1-YFP::LEU2</i>	Stępień i in. 2024b
<i>DBF4/dbf4</i> YDR052C YTE34	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YDR052c::kanMX4/YDR052c RFA1/RFA1-YFP::LEU2</i>	Stępień i in. 2024b
<i>SLD3/sld3</i> YGL113W YTE37	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δeu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YGL113w::kanMX4/YGL113w RFA1/RFA1-YFP::LEU2</i>	Stępień i in. 2024b
<i>SLD7/sld7</i> YOR060C YTE38	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2D0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YOR060c::kanMX4/YOR060c RFA1/RFA1-YFP::LEU2</i>	Stępień i in. 2024b

<i>SLD2/sld2</i> YKL108W YTE36	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YKL108w::kanMX4/YKL108w RFA1/RFA1-YFP::LEU2</i>	Stępień i in. 2024b
<i>MCM10/mcm10</i> YIL150C YTE35	BY4743; <i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YIL150c::kanMX4/YIL150c RFA1/RFA1-YFP::LEU2</i>	Stępień i in. 2024b
<i>ndt80Δ/ndt80Δ</i>	<i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; yhr124w:: kanMX4/ yhr124w:: kanMX4</i>	Open Biosystems

6.2. Warunki wzrostu

Komórki drożdży hodowano w standardowym, bogatym podłożu YPD (1 % ekstrakt drożdżowy, 1 % pepton, 2 % glukoza) przy użyciu wytrząsarki obrotowej (150 obr./min.) lub na stałej pożywce YPD wzbogaconej 2% agarem. Doświadczenia przeprowadzono w temperaturze 28°C.

Do analizy chronologicznej długości życia (CLS) zastosowano pożywkę SDC (*synthetic complete dextrose*), która składała się z 0,67% YNB (*yeast nitrogen base*) (bez aminokwasów) i 2% glukozy. Podłoże zostało dodatkowo suplementowane L-histydyną (60 mg/L), L-leucyną (180 mg/L) i uracylem (60 mg/L) zgodnie z wymaganiami auksotroficznymi analizowanego tła genetycznego BY4743.

6.3. Analiza kinetyki wzrostu komórek

Testy wzrostu przeprowadzono w płynnym podłożu. Zawiesiny komórek drożdży inkubowano w temperaturze 28°C przez 12 godzin z ciągłym wytrząsaniem (przy użyciu inkubatora Heidolph 1000 przy 1200 obr./min). Kinetykę wzrostu oceniano mierząc absorbancję przy $\lambda = 600$ nm przy użyciu czytnika mikroplętek Anthos 2010 typ 17550 w odstępach 2-godzinnych przez okres 12 godzin. W drugim podejściu określano gęstość komórek na mL hemocytometrycznie przy użyciu komory Malassez (Carl Roth, Lauda-Königshofen, Niemcy).

6.4. Określenie średniego czasu podwojenia

Dla każdego analizowanego szczepu obliczono średni czas podwojenia, zgodnie z wcześniej opisaną metodyką [Mołoń i in. 2016]. Czas podwojenia określono podczas rutynowej analizy potencjału reprodukcyjnego komórek. Nie uwzględniono czasów dwóch pierwszych cykli reprodukcyjnych (czasy pierwszego i drugiego podwojenia

są znacznie dłuższe niż w przypadku starszych komórek). Dane reprezentują średnie wartości z dwóch niezależnych eksperymentów (w każdym eksperymencie wykorzystano 45 komórek) wraz z odchyleniem standardowym (SD). Wartości uznano za istotne statystycznie przy $p < 0,001$, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem post hoc wielokrotnego porównania (test Dunnetta).

6.5. Test wydajności sporulacji

Heterozygotyczne komórki analizowanych szczepów hodowano w podłożu YPD, opłukano dwukrotnie w sterylnym buforze PBS, a następnie umieszczono w pożywce do sporulacji zawierającej 0,1% ekstraktu drożdżowego, 1% octanu potasu, 0,05% glukozy, 2% agaru na 14 dni w temperaturze 28°C [Krol i in. 2018]. Komórki następnie zawieszono w sterylnej wodzie. Komórki oraz spory zliczano hemocytometrycznie przy użyciu komory Malassez (co najmniej 300 na próbkę). Średnią i SD obliczono z danych dla co najmniej trzech niezależnych hodowli każdego z analizowanych szczepów. Wydajność sporulacji analizowanych heterozygot wyrażono procentowo w porównaniu z wydajnością sporulacji szczepu referencyjnego BY4743.

6.6. Pomiar aktywności metabolicznej komórek

Aktywność metaboliczną komórek drożdży oznaczono za pomocą markera fluorescencyjnego FUN-1 zgodnie z protokołem producenta (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) z niewielkimi modyfikacjami [Kwolek-Mirek i Zadrąg-Tęcza 2014]. Fluorescencję zawiesiny komórek mierzono po 15 minutach inkubacji w ciemności i w temperaturze 28°C przy użyciu czytnika mikropłytek TECAN Infinite 200 (Grodig, Austria) przy $\lambda_{ex} = 480$ nm i $\lambda_{em} = 520$ nm. Aktywność metaboliczną komórek wyrażono jako zmianę stosunku fluorescencji czerwonej ($\lambda = 575$ nm) do zielonej fluorescencji ($\lambda = 535$ nm). Średnią i SD obliczono na podstawie danych z co najmniej czterech niezależnych eksperymentów dla każdego szczepu.

Sonda FUN1 wnika do komórki barwiąc jej cytoplazmę, co jest obserwowane jako zielona fluorescencja. Żywe komórki metabolizują barwnik, co powoduje powstawanie struktur w ich wakuolach, obserwowanych jako fluorescencja czerwona, i jednocześnie prowadzi do zmniejszenia sygnału zielonej fluorescencji z cytoplazmy. Zatem czym wyższa aktywność metaboliczna komórki, tym większe przesunięcie fluorescencji

w kierunku widma czerwonego. Komórki martwe nie wykazują struktur o czerwonej fluorescencji.

6.7. Analiza cyklu komórkowego i zawartości DNA metodą cytometrii przepływowej

Komórki hodowano do OD_{600nm} 0,3–0,5 i 1 mL hodowli zebrano przez odwirowanie, przemyto wodą, a następnie utrwalono schłodzonym (-20°C) 70% etanolem (Polmos, Warszawa, Polska) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Utrwalone komórki następnie przemyto dwukrotnie buforem FACS 0,2 MTris-HCl (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA), pH 7,4, 20 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Niemcy) i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C w buforze FACS z dodatkiem 1 mg/mL RNazy A (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) w celu wyeliminowania RNA. Komórki następnie przemyto solą fizjologiczną buforowaną fosforanami (PBS) i barwiono przez noc w temperaturze 4°C w ciemności przy użyciu 100 µL roztworu jodku propidyny (50 µg/mL w PBS; Calbiochem, San Diego, Kalifornia, USA). Po dodaniu 900 µL PBS komórki sonikowano trzy razy (po 10 s) w łaźni ultradźwiękowej Branson 2800 (Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT, USA), przed analizą zawartości DNA FACS. Analizę przeprowadzono przy użyciu analizatora FACS Calibur (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). W pojedynczym teście zliczono ogółem 10 000 komórek.

Analizę FACS wykorzystano w dwóch testach. Pierwszy do oceny zmian na poziomie cyklu komórkowego analizowanych heterozygot oraz do analizy zmian zawartości DNA podczas analiz starzenia chronologicznego. W każdym przypadku przeprowadzono co najmniej trzy niezależne powtórzenia biologiczne dla każdego szczepu i w wybranych punktach czasowych podczas testu CLS. Komórki analizowano pod kątem zawartości DNA i wielkości komórek, wykorzystując odpowiednio kanały FL2 i FSC. Reprezentatywne histogramy zostały zaprezentowane w pracy.

Obliczono średni procent komórek w fazach G1, S i G2 cyklu komórkowego z co najmniej trzech niezależnych powtórzeń biologicznych i obliczono również odchylenie standardowe (SD). Zastosowanie dwóch szczepów kontrolnych, haploidalnego i diploidalnego, umożliwiło bramkowanie komórek w odpowiedniej fazie cyklu komórkowego.

6.8. Barwienie mitochondrialnego DNA za pomocą DAPI w teście in vivo

Komórki z wczesnej fazy wykładniczej hodowano w ciemności przez dodatkową 1 godzinę w temperaturze 28°C z wytrząsaniem z dodatkiem 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (DAPI; Invitrogen) do końcowego stężenia 1 µg/mL. Następnie komórki odwirowano (800 g), przemyto dwukrotnie PBS, zawieszono w 50 µL PBS i umieszczono na szkiełku mikroskopowym. Obrazowanie przeprowadzono przy użyciu aparatu cyfrowego Zeiss AxioCam 807c (Zeiss, Oberkochen, Niemcy), zamontowanego na mikroskopie fluorescencyjnym Zeiss Axio Imager.M2 obsługiwanym przez oprogramowanie Zeiss ZEN, stosując DIC (dla jasnego pola) oraz filtr Zeiss 49 (dla DAPI).

Analizę sygnałów fluorescencyjnych mtDNA przeprowadzono podobnie do analizy ognisk Rfa1 opisanej poniżej. Przygotowano maski binarne dla komórek i sygnałów mtDNA (po wcześniejszej dekonwolucji) i wykorzystano je do segmentacji. Intensywność sygnałów fluorescencyjnych obliczono poprzez konwersję masek binarnych mtDNA na obszary zainteresowania w oprogramowaniu Fidzi i obliczenie średniej wartości zintegrowanej gęstości (suma intensywności pikseli na danym obszarze) dla każdego zestawu surowych obrazów. W każdym z trzech powtórzeń biologicznych analizowano co najmniej 200 komórek, zaś średnio na każdy szczep przeanalizowano około 900 komórek. Dla każdego szczepu zliczano dane dotyczące całego mtDNA. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu t Welcha.

6.9. Izolacja RNA i analiza RT-qPCR

Do ekstrakcji mRNA użyto zestawu do izolacji RNA z drożdży RiboPure RNA Purification Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA; AM1926) zgodnie z instrukcjami producenta. Do ekstrakcji mRNA z całonocnych hodowli zebrano 2 x 10⁷ komórek. Jakość i wydajność RNA sprawdzano za pomocą czytnika TECAN Infinite 200. Próbkę przechowywano w stężeniu 300 µg/µL w porcjach po 5 mg w temperaturze -80°C.

Jakość próbek określono analizując stężenie RNA (260 nm) i jego czystość (280/230 nm) w 20-krotnie rozcieńczonym roztworze każdej próbki w wodzie wolnej od nukleaz na spektrometrze UV-1800 (Shimadzu, Tokio, Japonia). Aby usunąć resztkowe kompleksy dsDNA, ssDNA i RNA–DNA, próbki inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C (TBD-100, Biosan, Ryga, Łotwa) z 50 U DNAazy wolnej od RNazy (10 U/µL, A&A Biotechnology, Gdynia, Polska) w buforze zawierającym 50 mM

Tris-HCl (pH = 8,0) i 5 mM MgCl₂. Po 5 minutach inkubacji reakcję zatrzymano przez ogrzewanie w temperaturze 75°C, a następnie ochłodzenie do 4°C.

Odwrotną transkrypcję przeprowadzono w dwóch etapach. Syntezę pierwszej nici przeprowadzono przy użyciu zestawu TranScriba Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska) w termocyklerze MasterCycler® (Eppendorf, Hamburg, Niemcy) w następujący sposób: średnio 1026 µg ($\sigma = 0,015$) RNA z każdej próbki inkubowano z 1 µL startera oligo(dT)₁₈ w 65°C przez 5 min w łącznej objętości 9,5 µL (woda wolna od nukleaz), a następnie schłodzono do temperatury 4°C. Po dodaniu mieszaniny reakcyjnej składającej się z 4 µL 5× buforu reakcyjnego, 0,5 µL inhibitora RNazy (40 U/µL), 2 µL dNTP (10 mM) i 4 µL rekombinowanej odwrotnej transkryptazy MMLV (20 U/µL) całość uzupełniono sterylną wodą do 20 µL, reakcję prowadzono w temperaturze 42°C przez 60 min, następnie zatrzymano w 70°C na 5 min, a otrzymany cDNA przechowywano w -20°C do dalszej analizy. W drugim etapie zmierzono względną liczbę transkryptów za pomocą ilościowej reakcji PCR w aparacie Light Cycler® 96 (Roche, Bazylea, Szwajcaria). Mieszanina reakcyjna składała się z: 7,5 µL RT PCR Mix SYBR® A (Taq 0,1 U/µL, MgCl₂ 4 mM, 0,5 mM każdego dNTP w 2 x buforze reakcyjnym zawierającym SYBR® Green, A&A Biotechnology, Gdynia, Polska), 0,56 µL każdego startera (10 mM, Genomed, Warszawa, Polska, Tab. 2), 0,75 µL cDNA (wcześniej rozcieńczonego w stosunku 1:5 w sterylnej wodzie), całość uzupełniono do 15 µL sterylną wodą. Reakcję przeprowadzono przy następującym profilu termicznym: wstępna denaturacja przez 180 s w temperaturze 95°C, następnie 40 cykli obejmujących denaturację w temperaturze 95°C przez 30 s, przyłączanie starterów w temperaturze 55°C przez 30 s i wydłużanie starterów w temperaturze 72°C. °C przez 30 s przy pojedynczym pomiarze. Każdą reakcję zakończono poprzez analizę topnienia produktów o następującym profilu termicznym: 95°C przez 10 s, 65°C przez 60 s, następnie do 97°C z 5 odczytami/°C. Każdą próbkę poddano obróbce w co najmniej dwóch powtórzeniach biologicznych i trzech powtórzeniach technicznych, a reakcje PCR przeprowadzono w obecności kontroli negatywnej z odczynnikami i kontroli pozytywnej z DNA drożdży. Potencjalne zanieczyszczenie izolatów RNA DNA wykluczono poprzez wstępną reakcję PCR ze starterami ACT1, które następnie rozdzielono metodą poziomej elektroforezy żelowej. Całość analizy przeprowadzono zgodnie z zasadami dobrej praktyki postępowania z RNA.

Tab. 2 Startery wykorzystane w analizie RT-qPCR

Nazwa genu	Starter 5' -> 3' (F)	Starter 5' -> 3' (R)
<i>ACT1</i>	AAGCTTTGTTCCATCCTTCT	GTACCACCGGACATAACG
<i>ORC1</i>	TGGGTATACGCACGAAGAGC	TCTCACGTCTTCAGGCAAC
<i>ORC2</i>	ATTACGCTCCGCTCCTCTG	CTTCAGCACCCTGCTGGTA
<i>ORC3</i>	ACTGAGCAGATGTCCTACATTCA	GCCCGTTAATCGGGTTCTCT
<i>ORC4</i>	AGCTCGTCTATCACCGCAAG	CCAGGGTCGCTGTCTTTACA
<i>ORC5</i>	GGATTCTCACGAAGTGCAGA	GGTAGAGCTGCTTATGGACG
<i>ORC6</i>	AACCAGGAAACGACGGTTTG	TTGTTTCGTTCTCCCCGCTTC
<i>CDC45</i>	TAAATTGCTTGAACGGACG	TCATCTTCGTCTTCTTCGTC
<i>MCM2</i>	GCAAAGACGAAGAAGGAGAA	ATTCCGAGTAACTGTTAGCC
<i>MCM3</i>	CTTGGAAGCTTTCGTTCAA	GTGGACAGATCTGATAAGCT
<i>MCM4</i>	GTACCAACGTCAGTATCCAG	GTATAGTTCTTCGTCGGTAGT
<i>MCM5</i>	TTTGGATTCTGAACACGTCT	TGTTGTGTGTCTGCAATTC
<i>MCM6</i>	CATGAGAGAAAATGGTGCTC	ACCTTCGGATCTCTTCAATG
<i>MCM7</i>	GGAGACTGAGGAATGAGAGA	TCAGTTTCATCCTCGACAAC
<i>PSF1</i>	TTTATCCGGCTCTTTAGTGC	ATCAGACTGCCTTACGAAAA
<i>PSF2</i>	GGTCTTTGGATCGCTCTAT	CGGCAACTCACTAAACCTAT
<i>PSF3</i>	AGAACCTGTACCTTTGTGG	TGGCTAGACTGAAGAAATGC
<i>SLD5</i>	GCCTATGCCTAACGAATCTA	ATTGGCGCAAATAAAGTGAG
<i>CDC6</i>	TTTGTCTGTTTGAATTGC	TTTATTTGCAATGTTGGGCC
<i>DBF4</i>	AAGCGTCATGAGTAAGAACA	CTGTGTCTATTTTCCTTTGATGT
<i>SLD3</i>	CAGACCCTAAAGAGTACATAGAA	TTTGTAACCTGCACTTCCGT
<i>SLD7</i>	ACAACAATCTCAACAAAGGAAG	GGAGGCCACCCAAAATTAG
<i>SLD2</i>	GTGAAACGCCAATTAACCTTC	GTGGAGGATTAATAGTTGGACT
<i>MCM10</i>	CCGATAATCACAAACGAATTAGA	TAGGTGGGCGAATTTTACG

6.10. Oznaczanie częstotliwości ognisk Rad52 i Rfa1 metodą mikroskopii fluorescencyjnej

Test tworzenia ognisk Rad52-YFP przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisaną metodą w [Krol i in. 2018] z drobnymi modyfikacjami. Badane szczepy transformowano plazmidem pWJ1344 niosącym fuzję RAD52::YFP [Torres-Rosell i in. 2007]. Transformanty hodowano do fazy wykładniczej (około 7×10^6 kom./mL) w płynnej pożywce YPD w temperaturze 28°C z wytrząsaniem. Pobrano porcję 1,5 mL każdej hodowli, odwirowano (1000 x g) i ponownie zawieszono w 30 μ L 1 x PBS, a 3,5 μ L zawiesiny komórek umieszczono na szkiełkach mikroskopowych w celu oceny odsetka komórek spontanicznie tworzących ogniska Rad52-YFP. Do pozostałej hodowli dodano H₂O₂ do końcowego stężenia 1mM lub zeocynę do końcowego stężenia 100 μ g/mL i komórki inkubowano przez dodatkową godzinę w tych samych warunkach. Następnie zebrano porcję szczepów traktowanych H₂O₂ lub zeocyną w celu zbadania odsetka

komórek tworzących ogniska Rad52-YFP wywołane stresem. Obrazowanie przeprowadzono przy 100-krotnym powiększeniu w kanałach DIC i YFP mikroskopu fluorescencyjnego Olympus BX-51 obsługiwane przez oprogramowanie cellSens Dimension i udokumentowano przy użyciu kamery DP-72. Zliczono liczbę komórek i ognisk Rad52 w komórkach, a średni procent komórek z ogniskami Rad52 obliczono po przeszukaniu co najmniej 300 komórek w każdym z trzech powtórzeń biologicznych, co dało łączną liczbę co najmniej 900 komórek. Wyniki przedstawiono jako kwartyły danych, ze średnią, medianą, SD i wartościami p obliczonymi przy użyciu testu t Welcha dla dwóch próbek.

Ogniska Rfa1-YFP analizowano przy użyciu podobnego schematu eksperymentalnego, jak opisano powyżej, z tą różnicą, że zastosowano szczepy z fuzją RFA1-YFP::LEU2 w locus genomowym RFA1. Obrazowanie przeprowadzono przy użyciu aparatu cyfrowego Zeiss AxioCam MRc5 (Zeiss, Oberkochen, Niemcy), zamontowanego na mikroskopie fluorescencyjnym Zeiss Axio Imager.M2 obsługiwany przez oprogramowanie Zeiss Axio Vision 4.8, przy użyciu DIC (dla jasnego pola) i filtru 38HE (dla YFP).

Ponieważ w przeciwieństwie do ognisk Rad52-YFP, ogniska Rfa1-YFP rzadko występują pojedynczo na komórkę, przyjęliśmy półautomatyczne zliczanie ich liczby zgodnie z metodologią zastosowaną dla innego ogniska naprawczego Rad51-YFP i opisaną w [Antoniuk-Majchrzak i in. 2023]. W skrócie, liczbę ognisk Rfa1-YFP policzono za pomocą kilku programów do przetwarzania obrazu w następujący sposób: (1) maski binarne komórek uzyskano za pomocą oprogramowania Cellpose (RRID:SCR_021716, [Stringer i in. 2021]); (2) maski binarne ognisk Rfa1 wykonano poprzez wstępne przetwarzanie obrazu w Fiji (ImageJ 2) ((RRID:SCR_002285, [Schindelin i in. 2012]) z wtyczką MorphoLibJ [Legland i in. 2016]); (3) powstałe obrazy wykorzystano w celu wygenerowania masek prawdopodobieństwa za pomocą segmentacji semantycznej w ilastik [Berg i in. 2019] (4), następnie zliczono wystąpienia odpowiednich ognisk w obszarach poszczególnych komórek za pomocą programu CellProfiler [Stirling i in. 2021]. Komórki analizowano w każdym z trzech powtórzeń biologicznych. Wyniki przedstawiono jako kwartyły danych, z zaznaczoną średnią, medianą i SD. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu t Welcha.

6.11. Analizy starzenia replikacyjnego

Eksperyment prowadzono zgodnie z procedura opisaną w [Mołoń i Żebrowski 2017]. Drożdże hodowano w bogatej pożywce YPD do fazy logarytmicznej. Następnie 10 μ L każdej hodowli pipetowano na oddzielne szalki z podłożem YPD z dodatkiem barwnika floksyny B w stężeniu 10 μ g/mL. Dla każdej próby poddano mikromanipulacji 45 pojedynczych komórek. Analiza została określona przez mikromanipulację za pomocą mikroskopu optycznego Nikon Eclipse E200 z dołączonym mikromanipulatorem.

6.11.1. Określenie potencjału reprodukcyjnego komórek

Liczba pączków utworzonych przez każdą komórkę została wykorzystana do określenia jej potencjału reprodukcyjnego. Wyniki prezentują pomiary wykonane dla co najmniej 90 analizowanych komórek, w dwóch niezależnych powtórzeniach biologicznych.

6.11.2. Określenie całkowitej długości życia

Całkowita długość życia to długość życia pojedynczej komórki drożdży wyrażona w jednostkach czasu i została obliczona jako suma długości życia reprodukcyjnego (czas między pierwszym a ostatnim pączkowaniem) i długości życia po reprodukcyjnego (czas od ostatniego pączkowania do śmierci). Floksyna B wybarwiała komórki martwe na kolor różowy, co pozwoliło na określenie całkowitego czasu życia analizowanych komórek. Podczas mikromanipulacji szalki utrzymywano w temperaturze 28°C przez 15 godzin i w temperaturze 4°C w nocy. Eksperyment prowadzono do momentu śmierci ostatniej analizowanej komórki. Wyniki prezentują pomiary wykonane dla co najmniej 90 analizowanych komórek, w dwóch niezależnych powtórzeniach biologicznych.

6.12. Analizy chronologicznej długości życia

Chronologiczną długość życia komórek inkubowanych w pożywce minimalnej (SDC) mierzono w sposób opisany wcześniej [Czachor i in. 2020]. Drożdże hodowano w SDC zawierającej 0,67% YNB (Bacto) (bez aminokwasów) i 2% (w / v) glukozy, uzupełnionej L-histydyną (60 mg/L), L-leucyną (180 mg/L) i uracylem (60 mg/L). Chronologiczną długość życia monitorowano w pożywce SDC mierząc żywotność po 2, 4, 7, 14, 21 i 28 dniach hodowli. Do ilościowego pomiaru przeżycia zastosowano barwienie jodkiem propidyny. Komórki zawieszano w PBS i barwiono fluorescencyjnie

za pomocą 5 $\mu\text{g/mL}$ jodku propidyny (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) przez 15 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Zdjęcia sygnałów fluorescencyjnych wykonano za pomocą mikroskopu Olympus BX-51 (Olympus, Tokio, Japonia) wyposażonego w aparat cyfrowy DP-72 i oprogramowanie cellSens Dimension v1.0. Martwe komórki były widoczne w czerwonym kanale fluorescencji ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$). Dane reprezentują średnie wartości z trzech niezależnych eksperymentów. Do analizy klonogenności (CFU) we wskazanych punktach czasowych (dzień 2, 7, 14, 21 i 28) komórki pobrano z hodowli wyjściowej, zliczono hemocytometrycznie przy użyciu komory Malassez, przemyto, rozcieńczono i wysiano na szalkach z podłożem bogatym YPD wzbogaconym 2% agarem. Szalki inkubowano 48 godzin w 28°C , po czym zliczono CFU/mL.

6.13. Spektroskopia Ramana

Do pomiarów spektroskopii Ramana wykorzystano spektrometr Nicolet NXR 9650 FT-Raman Spectrometer wyposażony w laser Nd:YAG (1064 nm) i detektor InGaAs. Próbkę drożdży liofilizowano. Widma Ramana mierzono przy mocy lasera 0,5 W w zakresie od 250 cm^{-1} do 2000 cm^{-1} ; otrzymane widma uśredniono z 64 skanów. Średnica zastosowanej wiązki laserowej wynosiła 50 μm , a rozdzielczość widmowa 8 cm^{-1} . Widma Ramana przetwarzano za pomocą oprogramowania Omnic/Thermo Scientific i programów OriginLab.

W celu wykazania podobieństwa szczepów heterozygotycznych do analizy hierarchicznej skupień drożdży typu dzikiego (HCA) i analizowanych heterozygot zastosowano metodę skupień Warda. Metody te zastosowano w zakresach Ramana dla polisacharydów, lipidów, białek, RNA i kwasów nukleinowych. Do przeprowadzenia analizy i sporządzenia wykresów wykorzystano program OriginLab.

Do zilustrowania korelacji pomiędzy składem chemicznym w poszczególnych analizowanych szczepach drożdży zastosowano analizę głównych składników (PCA). PCA to technika nieparametryczna stosowana do wydobywania informacji dotyczących podobieństw i różnic między próbkami. Metody te zastosowano w zakresach widm Ramana odpowiadających polisacharydom, lipidom, białkom i RNA. Analizę i generację wykresów przeprowadzono przy użyciu oprogramowania OriginLab.

6.14. Analiza wrażliwości komórek drożdży wobec wybranych czynników stresowych przy użyciu testu kropelkowego

Szczepy hodowane w płynnej pożywce YPD nanoszono na szalki z pożywką YPD zawierające wskazane stężenia analizowanych stresorów, tj. Calcofluor White, Congo Red, SDS, chlorku sodu (NaCl), zeocyny lub kamptotecyny, a następnie inkubowano przez 2 dni w temperaturze 28°C. Szok cieplny zastosowano poprzez ekspozycję komórek na temperaturę 46°C przez 20 minut. Wzrost na szalkach z pożywką YPD bez stresorów służył jako kontrola. Pokazano reprezentatywne wyniki z dwóch niezależnych eksperymentów. Kolory reprezentują zdolność komórek analizowanych heterozygot do wzrostu w danych warunkach. Każdy „+” odzwierciedla wzrost kolonii w miejscu, w którym umieszczono krople zawierające odpowiednio 50 000, 5000, 500 i 50 komórek.

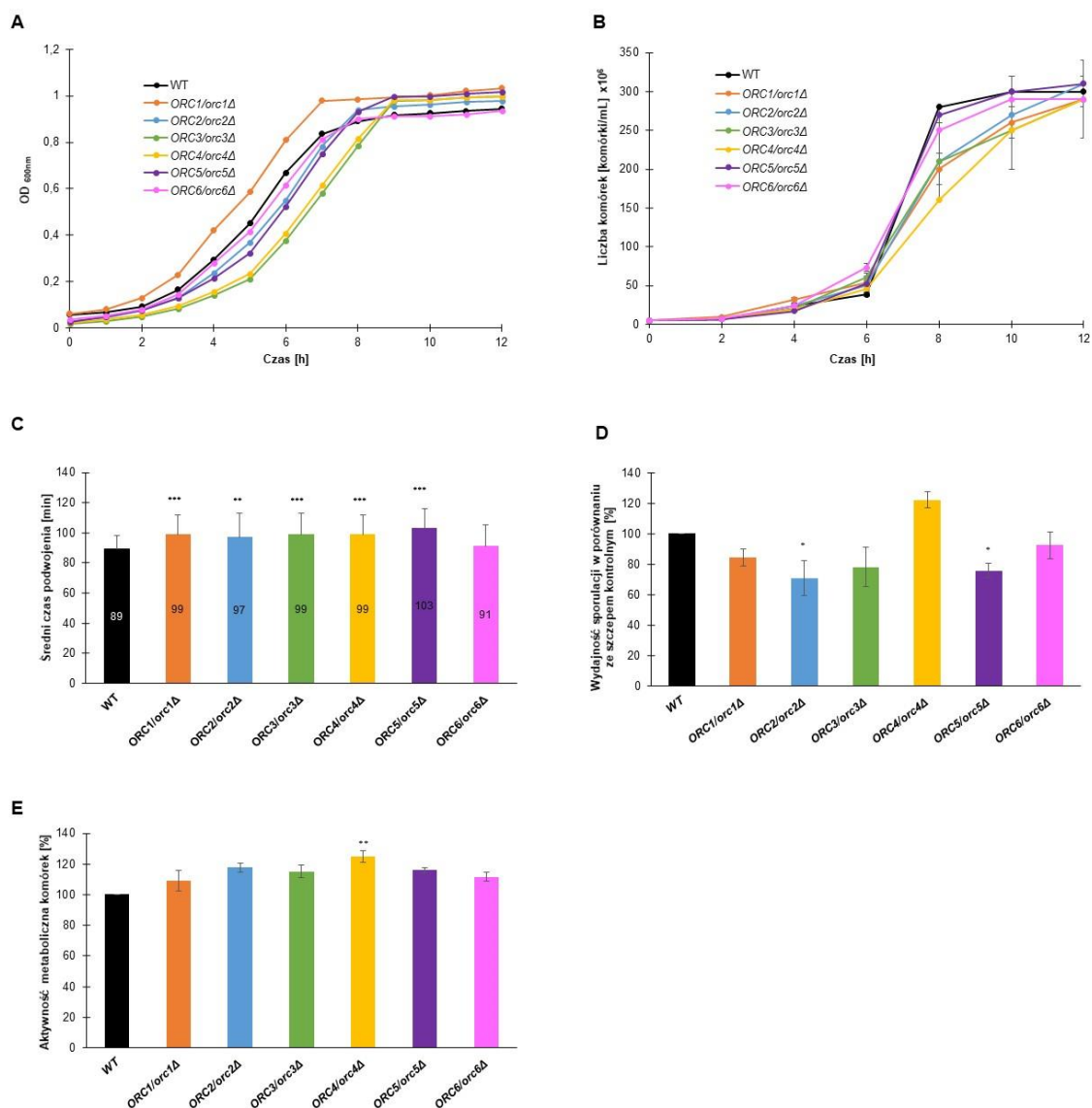
6.15. Analiza statystyczna

Wyniki reprezentują średnie wartości \pm SD dla wszystkich badanych próbek z co najmniej dwóch niezależnych eksperymentów. Różnice między WT a heterozygotycznymi szczepami diploidalnymi oszacowano za pomocą jednoczynnikowej analizy ANOVA i testów post hoc Dunnetta,. Wartości uznano za istotne, gdy $p < 0,05$. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 10.0, dla analiz tempa wzrostu, czasu podwojenia, wydajności sporulacji, aktywności metabolicznej, parametrów mierzonych w starzeniu drożdży, RT-qPCR. Dla oceny korelacji pomiędzy parametrami starzenia w modelu replikacyjnego starzenia drożdży, a zawartością lipidów, białek, kwasów nukleinowych i polisacharydów wykorzystano współczynnik korelacji Pearsona. Analizę przeprowadzono przy użyciu programu Excel 2016. Dla spektroskopii Ramana przeprowadzono analizy HCA i PCA przy użyciu oprogramowania PAST 3.0 i Origin 2018. Dla analiz cyklu komórkowego, zawartości mtDNA oraz częstości występowania ognisk Rad52-YFP i Rfa1-YFP do oceny statystycznej wykorzystano oprogramowanie OriginPro. W tym przypadku różnice między WT, a heterozygotycznymi szczepami diploidalnymi oszacowano za pomocą testów t-Studenta i t-Welcha.

7. Wyniki

7.1. Wpływ delecji pojedynczej kopii genów zaangażowanych w inicjację replikacji DNA na tempo wzrostu, częstotliwość sporulacji oraz aktywność metaboliczną

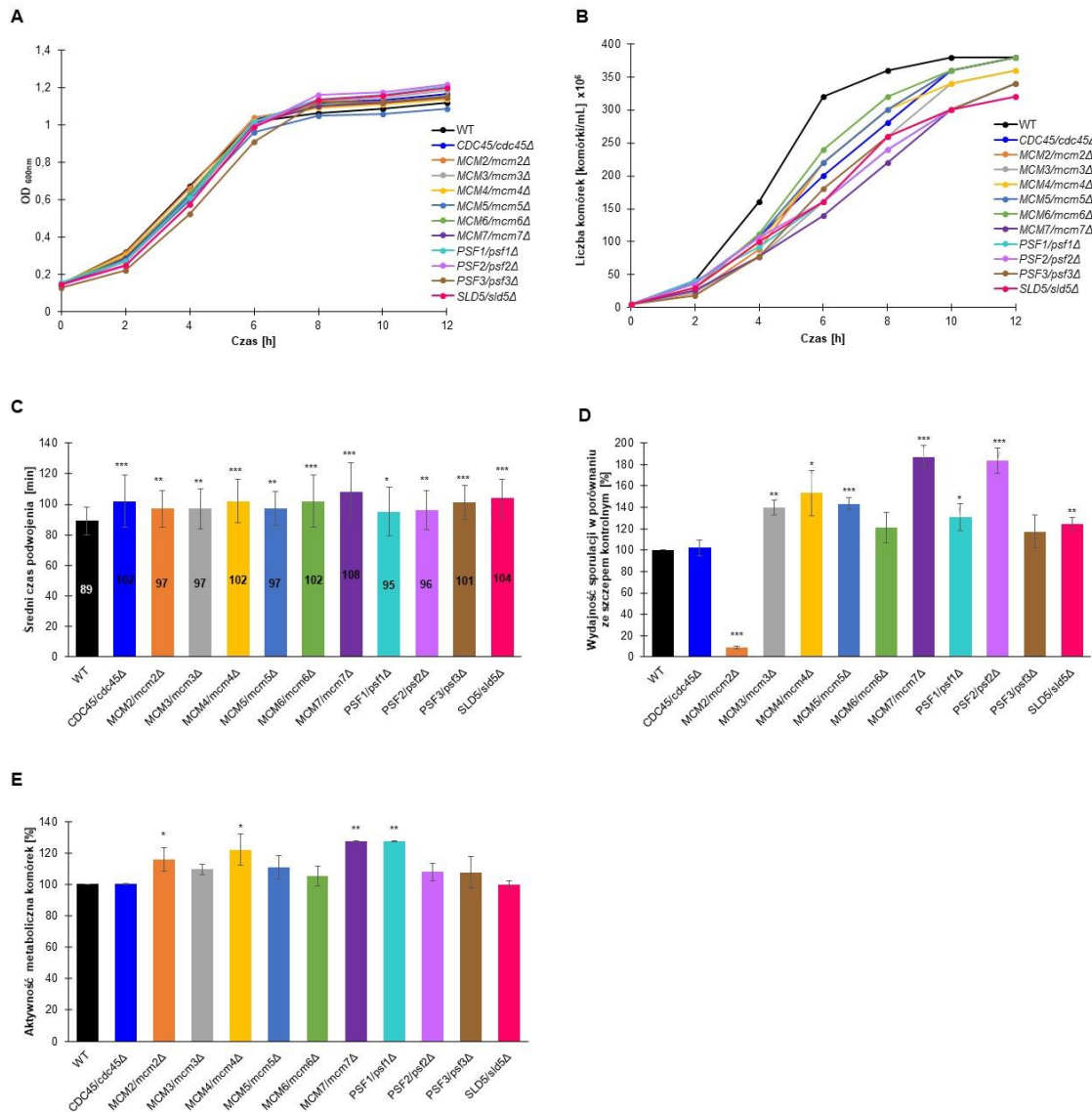
Pierwszym etapem badań w ramach realizowanego projektu badawczego było porównanie kinetyki tempa wzrostu i średniego czasu podwojenia komórek szczepów heterozygotycznych pozbawionych jednej kopii genów kodujących białka zaangażowane w proces inicjacji replikacji DNA. Oprócz rzeczywistej liczby komórek w hodowli płynnej, standardowe wyniki pomiarów gęstości optycznej (OD) zależą również od morfologii komórek, tj. ich wielkości, przezroczystości, ziarnistości, czy grubości ściany komórkowej. Dlatego w analizie kinetyki tempa wzrostu zastosowano dwa podejścia. Pierwsze z nich opiera się na pomiarach zmian gęstości optycznej hodowli w czasie (Ryc. 4A, 5A i 6A). Z kolei druga metoda polegała na manualnym zliczaniu gęstości analizowanych hodowli w wybranych punktach czasowych z wykorzystaniem technik hemocytometrycznych (Ryc. 4B, 5B i 6B). Jak pokazano na rycinach 4A i B, 5A i B oraz 6A i B, prawie wszystkie analizowane heterozygoty wykazują wolniejsze tempo wzrostu w porównaniu ze szczepem referencyjnym niezależnie od zastosowanej metody.



Ryc. 4. Kinetyka wzrostu, częstotliwość sporulacji oraz aktywność metaboliczna heterozygotycznych szczepów pozbawionych jednej kopii genu kodującego podjednostkę kompleksu ORC. Porównanie krzywych wzrostu dla odpowiednich szczepów heterozygotycznych i kontroli WT (BY4743). Gęstość hodowli określono mierząc gęstość optyczną przy $\lambda = 600$ nm (A) lub liczbę komórek na mL (B). Średni czas podwojenia dla tych samych szczepów co w (A) w okresie reprodukcji. Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe (SD) z dwóch niezależnych eksperymentów (C). Częstotliwość sporulacji heterozygotycznych szczepów drożdży pod względem genów kodujących podjednostki kompleksu ORC i WT (BY4743) (D). Aktywność metaboliczną komórek oszacowano za pomocą barwienia FUN-1. Dane wyrażono jako średnią \pm SD z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Słupki wskazują SD (E). Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu ANOVA i testu post hoc Dunnetta (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) w porównaniu z WT.

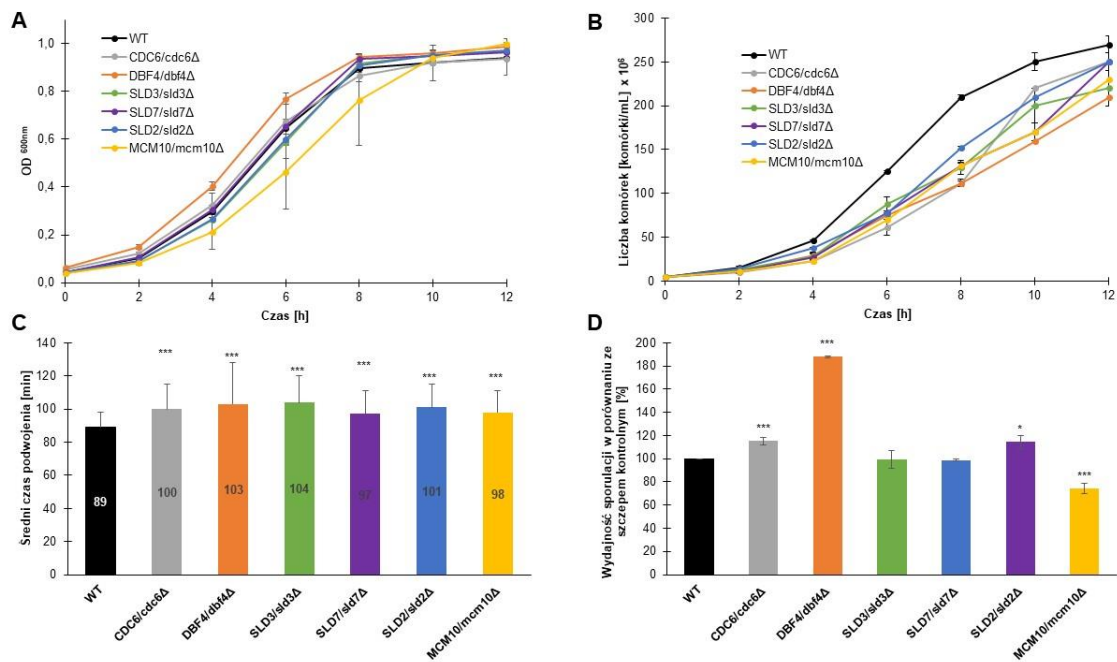
Powyższe dane potwierdzają analizy czasu podwojenia. Jak pokazano na Ryc. 4C, 5C i 6C średni czas podwojenia analizowanych komórek był istotnie statystycznie dłuższy dla prawie wszystkich szczepów w porównaniu z typem dzikim (WT). Wyjątek stanowił czas podwojenia szczepu *ORC6/orc6Δ*, który był podobny do czasu podwojenia szczepu typu dzikiego.

Sporulacja jest kluczowym procesem niezbędnym do przetrwania drożdży w warunkach naturalnych. Dlatego następnie zbadano wpływ zmniejszenia poziomu białek zaangażowanych w inicjację replikacji DNA na częstotliwość sporulacji. Jak pokazano na Ryc. 4D, 5D oraz 6D prawie wszystkie testowane szczepy wykazały zmienioną wydajność sporulacji; jednakże tendencja tych zmian nie była taka sama w przypadku wszystkich heterozygot. Szczepy *ORC2/orc2Δ*, *ORC5/orc5Δ* oraz *MCM10/mcm10Δ* miały niższą wydajność sporulacji w porównaniu ze szczepem kontrolnym (Ryc. 4D i 6D). Brak pojedynczej kopii genu w *ORC3* i *ORC6* również prowadził do zmniejszenia zdolności drożdży do sporulacji, ale wynik ten nie był istotny statystycznie. Natomiast znaczące zmniejszenie, około 90%, wydajności sporulacji zaobserwowano wyłącznie w szczepie *MCM2/mcm2Δ*. Co ciekawe, szczepy *MCM7/mcm7Δ*, *PSF2/psf2Δ* oraz *DBF4/dbf4Δ* wykazały około 80% wzrost wydajności sporulacji (Ryc. 5D i 6D). W przypadku innych szczepów, tj. *ORC4/orc4Δ*, *MCM3/mcm3Δ*, *MCM4/mcm4Δ*, *MCM5/mcm5Δ*, *MCM6/mcm6Δ*, *PSF1/psf1Δ*, *PSF3/psf3Δ*, *SLD5/sld5Δ*, *CDC6/cdc6Δ* i *SLD2/sld2Δ* odnotowano łagodną poprawę wydajności sporulacji. Z kolei szczepy *CDC45/cdc45Δ*, *SLD3/sld3Δ* oraz *SLD7/sld7Δ* charakteryzowały się wydajnością sporulacji na poziomie WT (Ryc. 6D). Podczas analiz wydajności sporulacji wykonano również dysekcję tetrad. Jak pokazano w publikacjach realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej, w przypadku wszystkich analizowanych heterozygot, po dysekcji tetrad rosły jedynie dwie spory, co potwierdza, że geny zaangażowane w inicjację replikacji są niezbędne do życia (dane nie zostały umieszczone w autoreferacie).



Ryc. 5. Kinetyka wzrostu, częstotliwość sporulacji oraz aktywność metaboliczna heterozygotycznych szczepów pozbawionych jednej kopii genu kodującego podjednostkę kompleksu helikazy CMG. Porównanie krzywych wzrostu dla odpowiednich szczepów heterozygotycznych i kontroli WT (BY4743). Gęstość hodowli określono mierząc gęstość optyczną przy $\lambda = 600$ nm (A) lub liczbę komórek na mL (B). Średni czas podwojenia dla tych samych szczepów co w (A) w okresie reprodukcji. Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe (SD) z dwóch niezależnych eksperymentów (C). Częstotliwość sporulacji heterozygotycznych szczepów drożdży pod względem genów kodujących podjednostki kompleksu CMG i WT (BY4743) (D). Aktywność metaboliczną komórek oszacowano za pomocą barwienia FUN-1. Dane wyrażono jako średnią \pm SD z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Słupki wskazują SD (E). Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu ANOVA i testu post hoc Dunnetta (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) w porównaniu z WT.

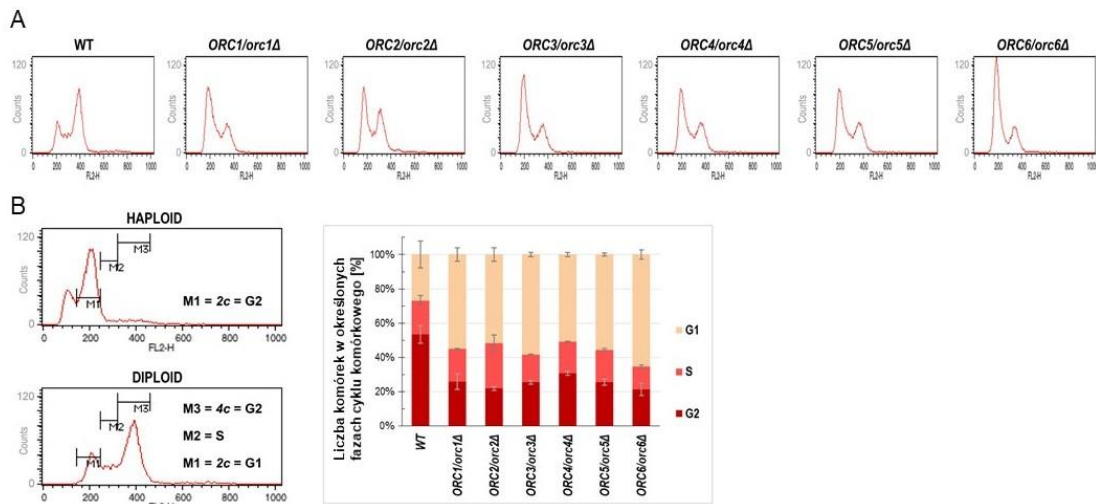
Dodatkowo w przypadku białek kodujących składniki kompleksów *ORC* oraz *CMG* wykonano analizę aktywności metabolicznej. Do oceny aktywności metabolicznej badanych, heterozygotycznych szczepów użyto barwnika FUN-1. Aktywność metaboliczną komórek wyrażono jako zmianę stosunku fluorescencji czerwonej ($\lambda = 575$ nm) do zielonej ($\lambda = 535$ nm). Im wyższy był stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej, tym większą aktywność metaboliczną wykazywały badane komórki. Komórki większości badanych szczepów wykazywały tendencję do wyższej aktywności metabolicznej w porównaniu do WT. Jednakże wyniki te były istotne statystycznie jedynie dla szczepów *ORC4/orc4 Δ* , *MCM2/mcm2 Δ* i *MCM4/mcm4 Δ* ($p < 0,05$) oraz szczepów *MCM7/mcm7 Δ* i *PSF1/psf1 Δ* ($p < 0,01$) (Ryc. 4E i 5E). W związku z tym, że komórki kompleksu lowPICC nie wykazały istotnych statystycznie zmian aktywności metabolicznej, wyniki nie zostały zamieszczone w publikacji Stępień i in. 2024b.



Ryc. 6. Kinetyka wzrostu, częstotliwość sporulacji oraz aktywność metaboliczna heterozygotycznych szczepów pozbawionych jednej kopii genu kodującego czynniki białkowe zaangażowane w proces inicjacji replikacji DNA (lowPICC). Porównanie krzywych wzrostu dla odpowiednich szczepów heterozygotycznych i kontroli WT (BY4743). Gęstość hodowli określono mierząc gęstość optyczną przy $\lambda = 600$ nm (A) lub liczbę komórek na mL (B). Średni czas podwojenia dla tych samych szczepów co w (A) w okresie reprodukcji. Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe z dwóch niezależnych eksperymentów (C). Wydajność sporulacji heterozygotycznych szczepów drożdży pod względem genów kodujących czynniki lowPICC i WT (BY4743) (D). Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu ANOVA i testu post hoc Dunnetta (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) w porównaniu z WT.

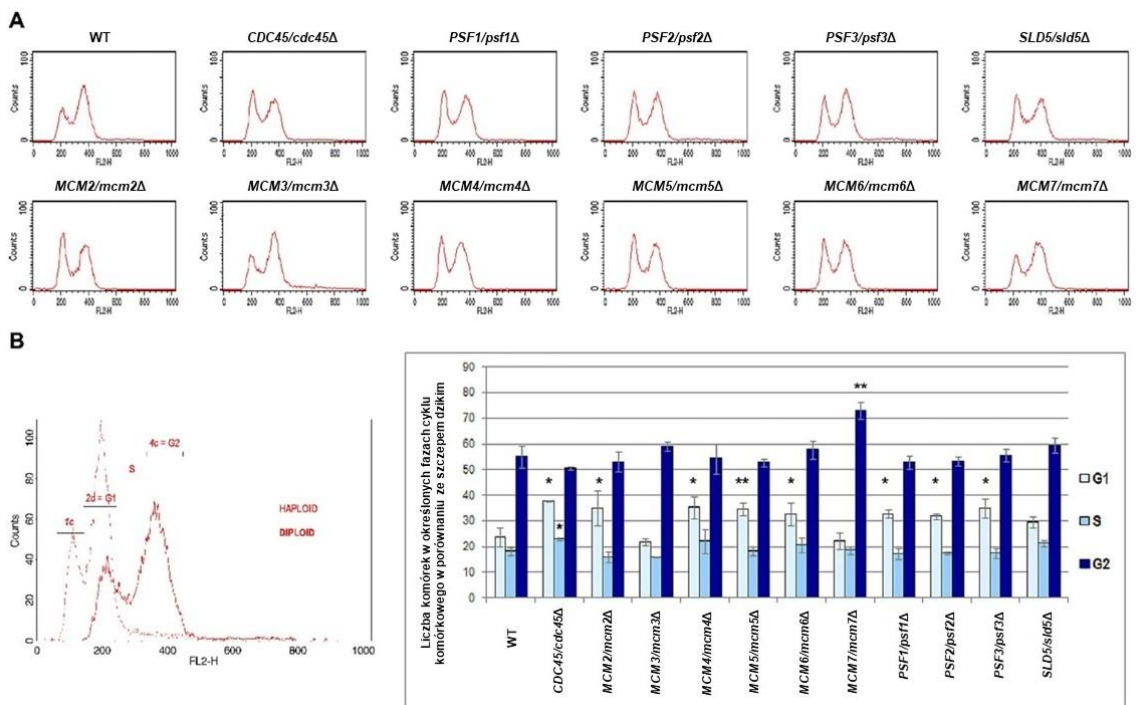
7.2. Wpływ zaburzeń inicjacji replikacji DNA na cykl komórkowy

Następnie skierowaliśmy pytanie, czy brak jednej kopii genów zaangażowanych w inicjację replikacji ma wpływ na cykl komórkowy. Przeprowadzono analizy metodą cytometrii przepływowej dla kompleksów ORC, CMG oraz lowPICC. Wiadomo, że podjednostki kompleksu ORC tworzą kompleks przed replikacją, dlatego spodziewano się, że brak jednej kopii genu *ORC* może wpływać na cykl komórkowy. Analiza zawartości DNA przeprowadzona metodą cytometrii przepływowej wykazała zaburzenia cyklu komórkowego u wszystkich analizowanych szczepów z grupy *ORC/orcΔ*. Zmiany te były głównie związane z wydłużeniem fazy G1 cyklu komórkowego. W konsekwencji liczba komórek zatrzymanych w fazie G2 cyklu była istotnie zmniejszona u wszystkich szczepów tej grupy w porównaniu z kontrolą (Ryc. 7A i B).



Ryc. 7. Analiza cyklu komórkowego diploidalnego szczepu drożdży typu dzikiego BY4743 i izogenicznych szczepów heterozygotycznych *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ* i *ORC6/orc6Δ*. Komórki pozbawione jednej kopii genu *ORC* wykazywały opóźnienie przejścia G1/S (A). (B) Po lewej stronie warunki bramkowania stosowane do obliczenia liczby komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Po prawej wynik kwantyfikacji trzech powtórzeń biologicznych.

W przypadku grupy szczepów *CMG/cmgΔ* najbardziej zauważalną zmianę zaobserwowano również w fazie G1 cyklu komórkowego. Komórki były zatrzymane w tej fazie we wszystkich szczepach z wyjątkiem *SLD5/sld5Δ* i *MCM3/mcm3Δ*. Jednakże szczep *CDC45/cdc45Δ* charakteryzował się także wydłużeniem fazy S, a szczep *MCM7/mcm7Δ* wydłużeniem fazy G2 (Ryc. 8A i B).



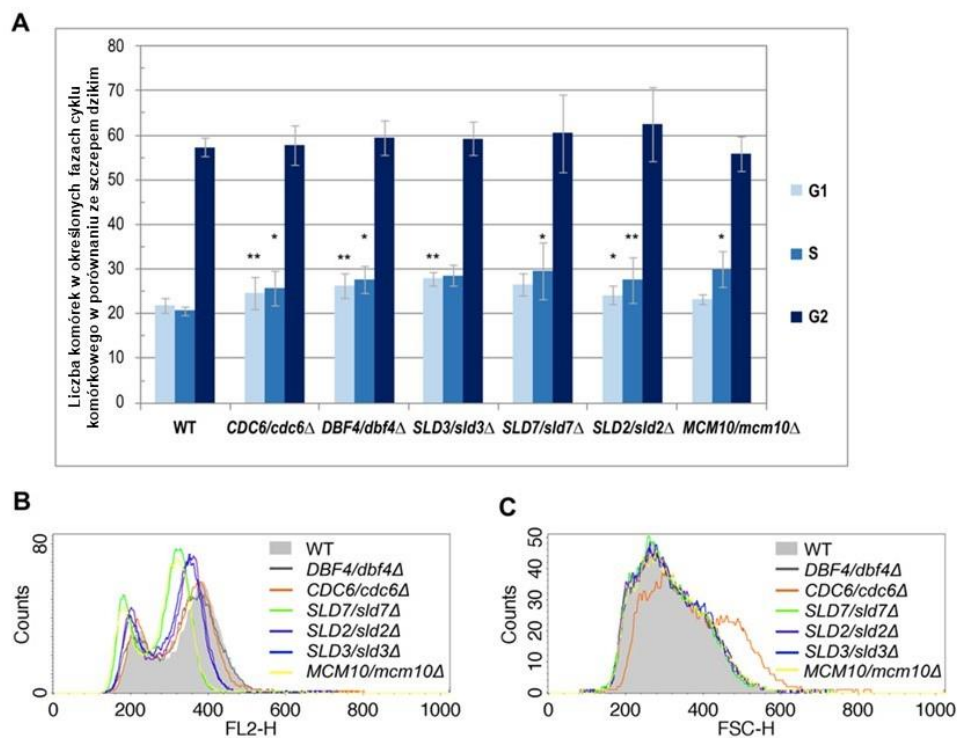
Ryc. 8. Analiza cyklu komórkowego diploidalnego szczepu WT (BY4743) i izogenicznych heterozygotycznych szczepów *CDC45/cdc45Δ*, *MCM2/mcm2Δ*, *MCM3/mcm3Δ*, *MCM4/mcm4Δ*, *MCM5/mcm5Δ*, *MCM6/mcm6Δ*, *MCM7/mcm7Δ*, *PSF1/psf1Δ*, *PSF2/psf2Δ*, *PSF3/psf3Δ* i *SLD5/sld5Δ*. Komórki pozbawione jednej kopii genów kodujących podjednostki helikazy CMG wykazywały niewielkie opóźnienie w przejściu G1/S. (A) Przedstawiono reprezentatywne histogramy z trzech powtórzeń biologicznych. (B) Kwantyfikacja analizy cyklu komórkowego. Po lewej stronie histogramy szczepów kontrolnych, BY4741 (haploidalny) i BY4743 (diploidalny), z warunkami bramkowania zastosowanymi do obliczenia liczby komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Wykres po prawej stronie przedstawia kwantyfikację wyników analizy cyklu komórkowego. Obliczono procent komórek w określonej fazie cyklu komórkowego, biorąc pod uwagę czas generacji szczepów i przedstawiono w odniesieniu do WT. Pokazano wartość średnią z pięciu powtórzeń biologicznych. Słupki wskazują SD. Istotność statystyczną w odniesieniu do fazy cyklu komórkowego kontroli WT oceniano za pomocą testu t-Studenta (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Inicjacja replikacji musi być ściśle kontrolowana, aby zapewnić precyzyjną duplikację całego genomu w każdym cyklu komórkowym. Realizowane jest to głównie poprzez koordynację pierwszych etapów replikacji DNA: rozpoznania ARS (*autonomously replicating sequence* – sekwencja replikująca się autonomicznie), sukcesywnego budowania pre-IC i aktywacji replikacyjnej helikazy DNA. Dlatego kolejnym krokiem pracy była próba odpowiedzi na pytanie, czy i jak zmienia się cykl komórkowy w komórkach szczepów, z tzw. grupy lowPICC. Jak pokazano na Rycinie 9A,

u większości testowanych szczepów wykryto niewielkie zatrzymanie komórek analizowanych heterozygot w fazach G1 i S cyklu komórkowego. Obie fazy cyklu komórkowego były wydłużone w szczepach *CDC6/cdc6Δ*, *DBF4/dbf4Δ* i *SLD2/sld2Δ*. Z kolei w komórkach szczepu *SLD3/sld3Δ* faza G1 uległa istotnemu wydłużeniu (o 27%), natomiast faza S była najbardziej wydłużona w szczepach *SLD7/sld7Δ* i *MCM10/mcm10Δ* odpowiednio o 43% i 45%.

Co ciekawe, jak pokazano na Rycinie 9B. analiza cytometrii przepływowej wykazała również różnice w zawartości DNA pomiędzy testowanymi szczepami, czego nie obserwowano podczas analiz kompleksu ORC i CMG. Zaobserwowano także znaczny wzrost wielkości komórek w populacji szczepu *CDC6/cdc6Δ* (Ryc. 9C).

Dane te sugerują, że różnice w tempie wzrostu analizowanych szczepów (Ryc. 4A i B, 5A i B, 6A i B) nie wynikają po prostu ze zmian długości cyklu komórkowego, ale mogą mieć na to wpływ inne czynniki. Zaobserwowano następującą regułę: faza G1 była najbardziej wydłużona w przypadku obniżenia ekspresji genów podjednostek ORC; mniejszy efekt zaobserwowano w heterozygotach ze zmniejszoną ekspresją podjednostek kompleksu helikazy CMG, a jeszcze mniejszy, ale bardziej zróżnicowany (dotyczący zarówno fazy G1, jak i S cyklu komórkowego) efekt zaobserwowano dla szczepów z grupy lowPICC.

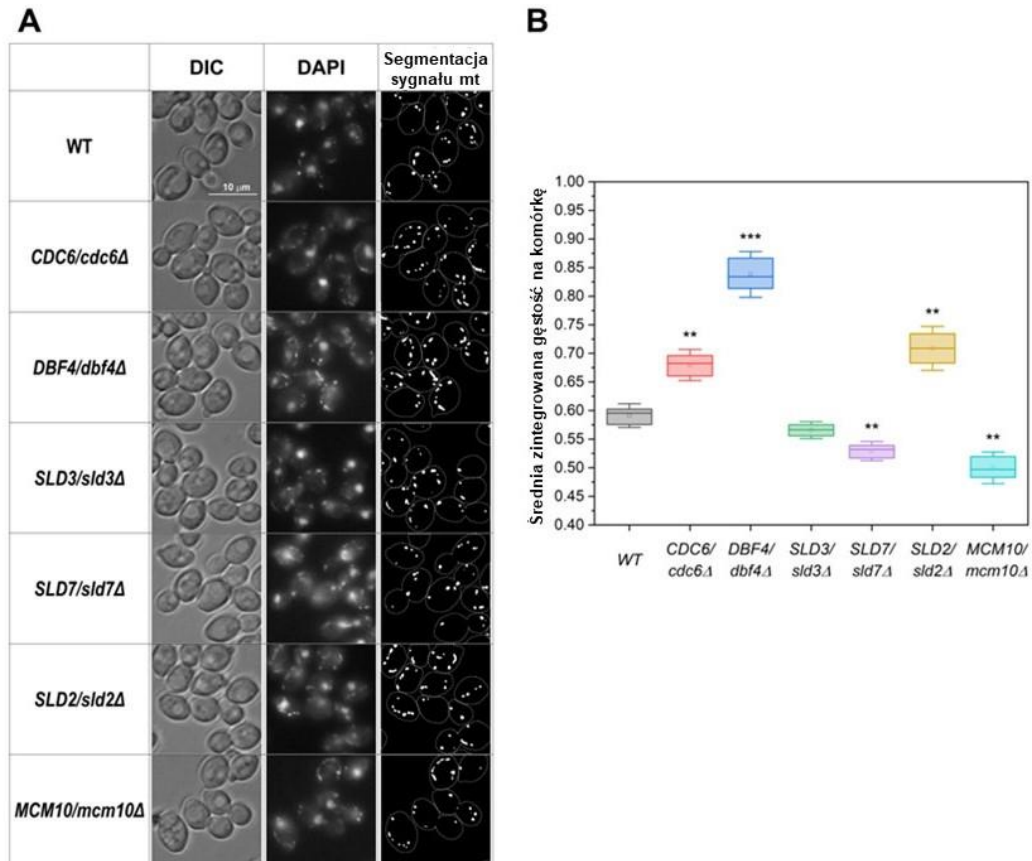


Ryc. 9. Analiza cyklu komórkowego dla heterozygotycznych mutantów lowPICC. Komórki WT (BY4743) oraz izogeniczne heterozygotyczne szczepy *DBF4/dbf4Δ*, *CDC6/cdc6Δ*, *SLD7/sld7Δ*, *SLD2/sld2Δ*, *SLD3/sld3Δ* i *MCM10/mcm10Δ* hodowano w temperaturze 28°C w pożywce YPD do fazy wykładniczej, następnie znakowano jodkiem propidyny, a zawartość DNA badano metodą cytometrii przepływowej. (A) Kwantyfikacja wyników analizy cyklu komórkowego. Obliczono procent komórek w określonej fazie cyklu komórkowego, biorąc pod uwagę czas generacji szczepów i przedstawiono w odniesieniu do WT. Pokazano średnią z trzech powtórzeń biologicznych. Słupki wskazują odchylenia standardowe. Istotność statystyczną w odniesieniu do fazy cyklu komórkowego kontroli WT oceniano za pomocą testu t-Studenta (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Pokazano zawartość DNA (B) i wielkości komórek (C) (średnia z trzech powtórzeń biologicznych) szczepów lowPICC w porównaniu z WT.

7.3. Analiza zawartości mtDNA w szczepach lowPICC

Jak pokazano na Rycinie 9, podczas analiz z wykorzystaniem technik cytometrii przepływowej w szczepach lowPICC wykazano różnice w zawartości DNA. Powszechnie wiadomo, że poziom mtDNA może również wpływać na całkowitą zawartość komórkowego DNA. Dlatego następnie postanowiono sprawdzić, czy przyczyną tego fenotypu (różnic w ogólnej zawartości DNA) są różnice w zawartości mtDNA. Jak zobrazowano na Rycinie 10, jedynie komórki szczepu *SLD3/sld3Δ* wykazywały zawartość mtDNA zbliżoną do obserwowanej w szczepie kontrolnym. Z kolei szczepy *DBF4/dbf4Δ*, *SLD2/sld2Δ* i *CDC6/cdc6Δ* wykazały akumulację mtDNA.

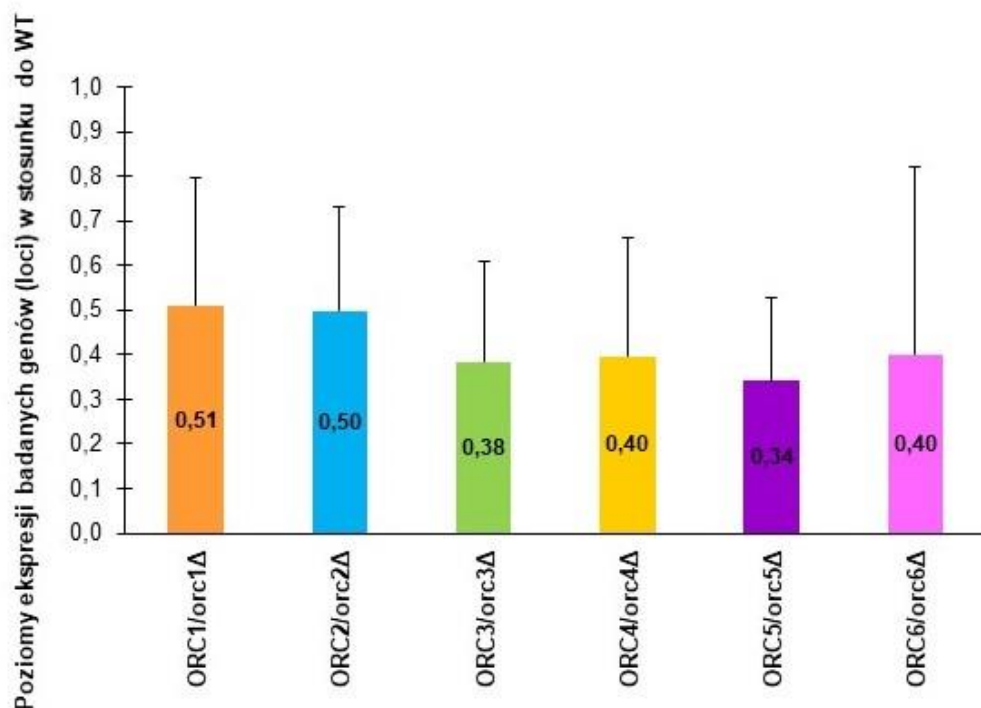
Co ciekawe, w szczepie *DBF4/dbf4Δ* zawartość mtDNA wzrosła o 40%, a dla *SLD2/sld2Δ* i *CDC6/cdc6Δ* odpowiednio o 22% i 13,5% (Ryc. 10A, B). W szczepach *MCM10/mcm10Δ* i *SLD7/sld7Δ* zaobserwowano odwrotny efekt; zawartość mtDNA spadła odpowiednio o 17% i 11%.



Ryc. 10. Zmiany w zawartości mtDNA w komórkach szczepów lowPICC. Kontrolę WT i heterozygotyczne szczepy *DBF4/dbf4Δ*, *CDC6/cdc6Δ*, *SLD7/sld7Δ*, *SLD2/sld2Δ*, *SLD3/sld3Δ*, *MCM10/mcm10Δ* hodowano do fazy wykładniczej i barwiono DAPI in vivo. Sygnał DAPI dokumentowano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Następnie przeprowadzono segmentację komórek i sygnałów mtDNA na uzyskanych zdjęciach oraz zmierzono zintegrowaną gęstość sygnałów mtDNA na komórkę. (A) Reprezentatywna ilustracja wyników barwienia DAPI heterozygot lowPICC i przykład segmentacji zarówno komórek jak i sygnału mtDNA. (B) Wykres przedstawiający ilościowe wyniki intensywności sygnału fluorescencyjnego mtDNA wyświetlane jako średnia zintegrowana gęstość segmentowanego sygnału mtDNA na komórkę (tj. suma wartości pikseli w obszarze segmentowanego mtDNA). Analizowano co najmniej 300 komórek na każde z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Ramki reprezentują kwartyle danych. Poziome linie w ramkach przedstawiają wartości mediany. Kropka oznacza wartość średnią. Wąsy reprezentują odchylenie standardowe ze współczynnikiem = 1,5. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu t Welcha. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

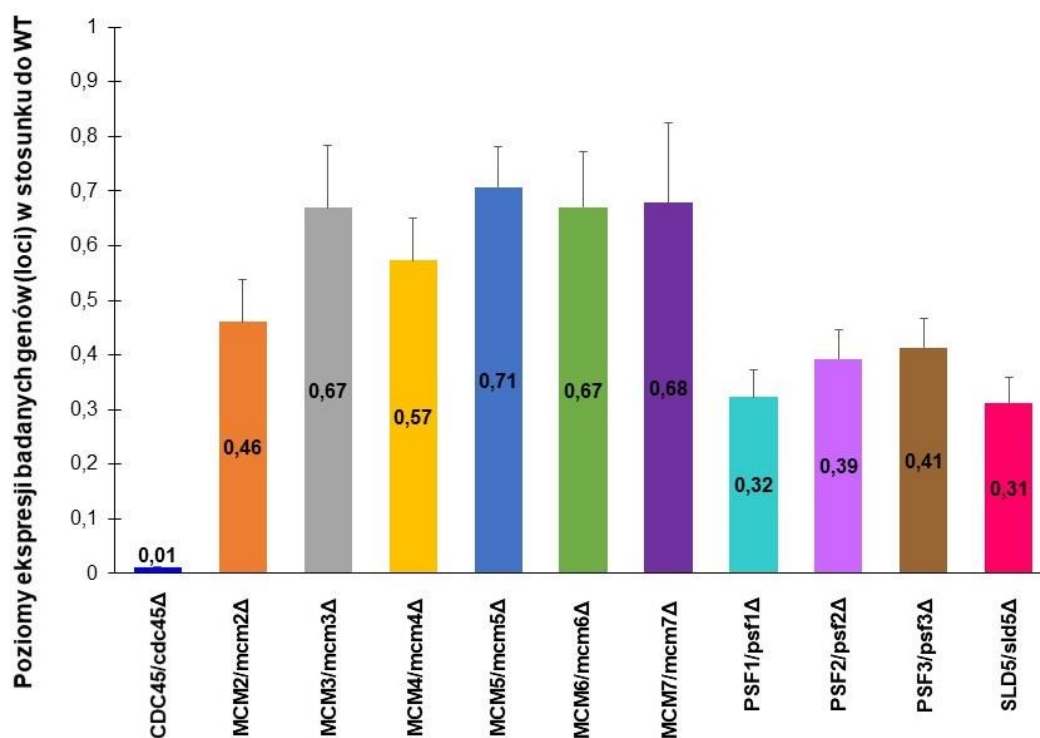
7.4. Analiza profilu ekspresji genów zaangażowanych w inicjację replikacji DNA w heterozygotycznych szczepach drożdży

W związku z brakiem jednej kopii genów zaangażowanych w inicjację replikacji DNA skierowano pytanie dotyczące realnego poziomu ekspresji tych genów w heterozygotach. W idealnym świecie teoretycznie powinien on wynosić 50%. Dlatego następnie oceniono poziom ekspresji genów kodujących komponenty białkowe zaangażowane w inicjację replikacji DNA w heterozygotycznych szczepach. W tym celu przeprowadzono analizę PCR w czasie rzeczywistym. Jak pokazano na Rycinie 11 brak jednej kopii genów *ORC1-6* doprowadził do istotnego zmniejszenia ich ekspresji ($p < 0,05$). Poziom ekspresji wszystkich analizowanych genów *ORC* został obniżony średnio o ponad 50%. Przy czym największe zmiany zaobserwowano w szczepach *ORC3/orc3Δ* i *ORC5/orc5Δ*, gdzie ekspresja odpowiedniego genu *ORC* została zmniejszona o niemal 70% w porównaniu z WT.



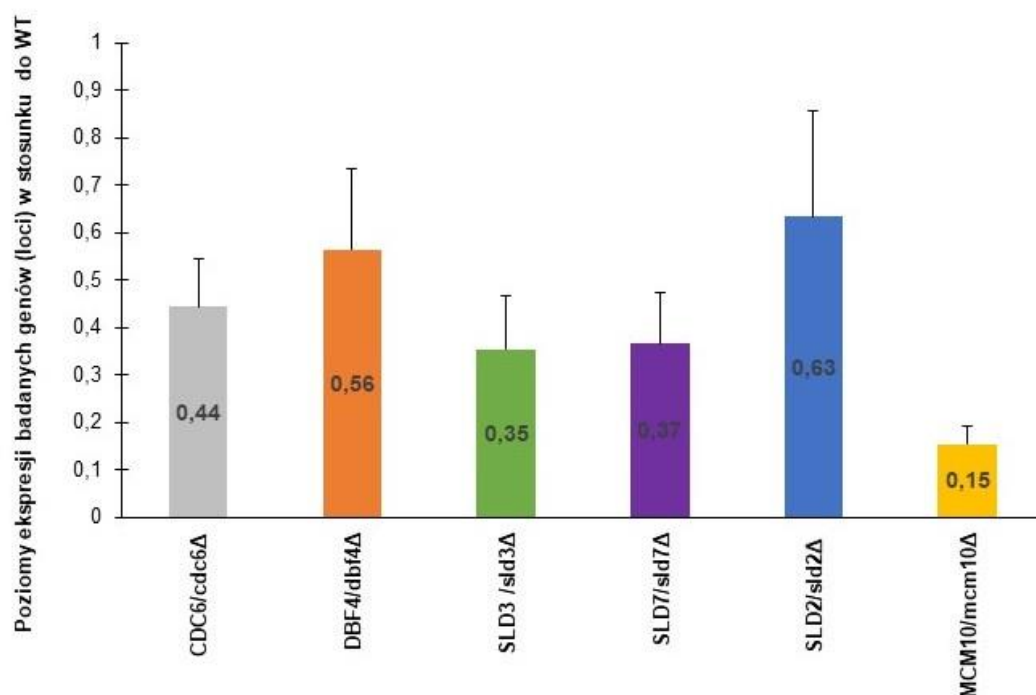
Ryc. 11. Analiza RT-qPCR wykazała spadek ekspresji genów *ORC* w heterozygotycznych szczepach *ORC/orcΔ*. Względny stosunek ekspresji *ORC1*, *ORC2*, *ORC3*, *ORC4*, *ORC5* i *ORC6* znormalizowany do *ACT1* i poziomu ekspresji w WT w odpowiednich szczepach heterozygotycznych obliczono dla co najmniej dwóch powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych. Wszystkie wyniki były istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Eksperyment wykazał również istotne statystycznie obniżenie ($p < 0,05$) ekspresji wszystkich badanych genów kodujących białka kompleksu CMG, w porównaniu z typem dzikim, co zostało pokazane na Rycinie 12. Najistotniejsze obniżenie ekspresji zaobserwowano w genach odpowiedzialnych za kodowanie podjednostek kompleksu *GINS* oraz w genie *MCM2*, który wykazał obniżenie ekspresji o ponad 50% w porównaniu z WT.



Ryc. 12. Analiza RT-qPCR wykazała spadek ekspresji genów kodujących składniki kompleksu *CMG* w odpowiednich szczepach *CMG/cmgΔ*. Względny stosunek ekspresji *CDC45*, *MCM2*, *MCM3*, *MCM4*, *MCM5*, *MCM6*, *PSF1*, *PSF2*, *PSF3*, *SLD5* znormalizowany do *ACT1* i poziomu ekspresji w WT w odpowiednich szczepach heterozygotycznych obliczono dla co najmniej dwóch powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych. Wszystkie wyniki były istotne statystycznie, $p < 0,05$.

Określono także poziomy ekspresji odpowiednich genów we wszystkich heterozygotycznych szczepach lowPICC w porównaniu z ich ekspresją w szczepie referencyjnym (BY4743). Jak zostało zaprezentowane na Rycinie 13 wykazano istotne statystycznie obniżenie ($p < 0,05$) ekspresji wszystkich testowanych genów w odpowiednim szczepie grupy lowPICC w porównaniu z poziomem ekspresji tego samego genu w szczepie WT. Najbardziej wyraźne obniżenie ekspresji zaobserwowano dla genu *MCM10* w szczepie *MCM10/mcm10Δ*.

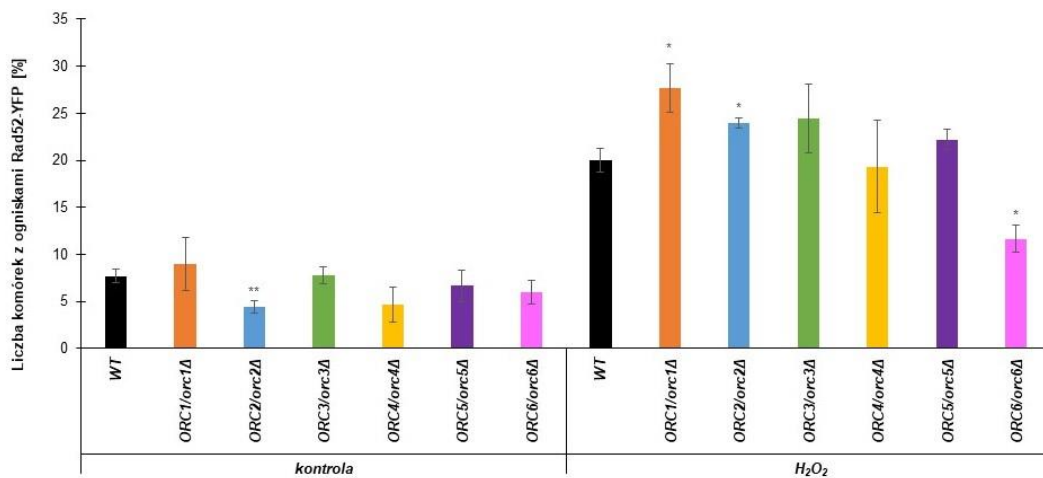


Ryc. 13. Analiza RT-qPCR wykazała spadek ekspresji genów kodujących białka lowPICC w odpowiednich szczepach lowPICC. Względny stosunek ekspresji *CDC6*, *DBF4*, *SLD3*, *SLD7*, *SLD2* i *MCM10* znormalizowany do *ACT1* i poziomu ekspresji w WT w odpowiednich szczepach heterozygotycznych obliczono dla co najmniej dwóch powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych. Wszystkie wyniki były istotne statystycznie, $p < 0,05$.

7.5. Częstość występowania ognisk Rad52-YFP oraz Rfa1-YFP

Inicjacja replikacji jest kluczowym krokiem w życiu proliferujących komórek. Ze względu na to, że we wcześniejszych analizach wykazano istotne opóźnienie przejścia pomiędzy fazami G1/S w heterozygotycznych szczepach *ORC/orcΔ*, co było prawdopodobnie spowodowane ograniczonym dostępem do komponentów ORC, postanowiono odpowiedzieć na pytanie - czy zmniejszona dostępność składników ORC może prowadzić do zwiększonych uszkodzeń DNA, gdy komórki są narażone na stres oksydacyjny? W tym przypadku, jako marker uszkodzeń DNA, wykorzystano białko fuzyjne Rad52-YFP. Rekombinaza Rad52 jest rekrutowana do miejsc uszkodzeń DNA, odgrywając kluczową rolę podczas procesów obejmujących rekombinację homologiczną, takich jak naprawa dwuniciowych pęknięć DNA, wiązanie jednoniciowych przerw w DNA powstałych po replikacji, czy rekombinację meiotyczną [Mortensen i in. 2009]. Sprawdzone częstość powstawania ognisk Rad52-YFP w szczepach *ORC/orcΔ*

w warunkach kontrolnych (bez stresora) i po jednogodzinnym traktowaniu 1mM H₂O₂, jako induktora stresu oksydacyjnego. Co ciekawe, w warunkach kontrolnych zaobserwowano istotnie statystycznie zmniejszoną liczbę komórek z ogniskami Rad52-YFP w szczepie *ORC2/orc2Δ* ($p < 0.001$) w porównaniu do WT (Ryc. 14). Po indukcji stresu oksydacyjnego liczba komórek z ogniskami Rad52-YFP była istotnie zwiększona w szczepach *ORC1/orc1Δ* i *ORC2/orc2Δ* ($p < 0.05$), ale zmniejszona w szczepie *ORC6/orc6Δ* ($p < 0.05$) w porównaniu do WT (Ryc. 14).

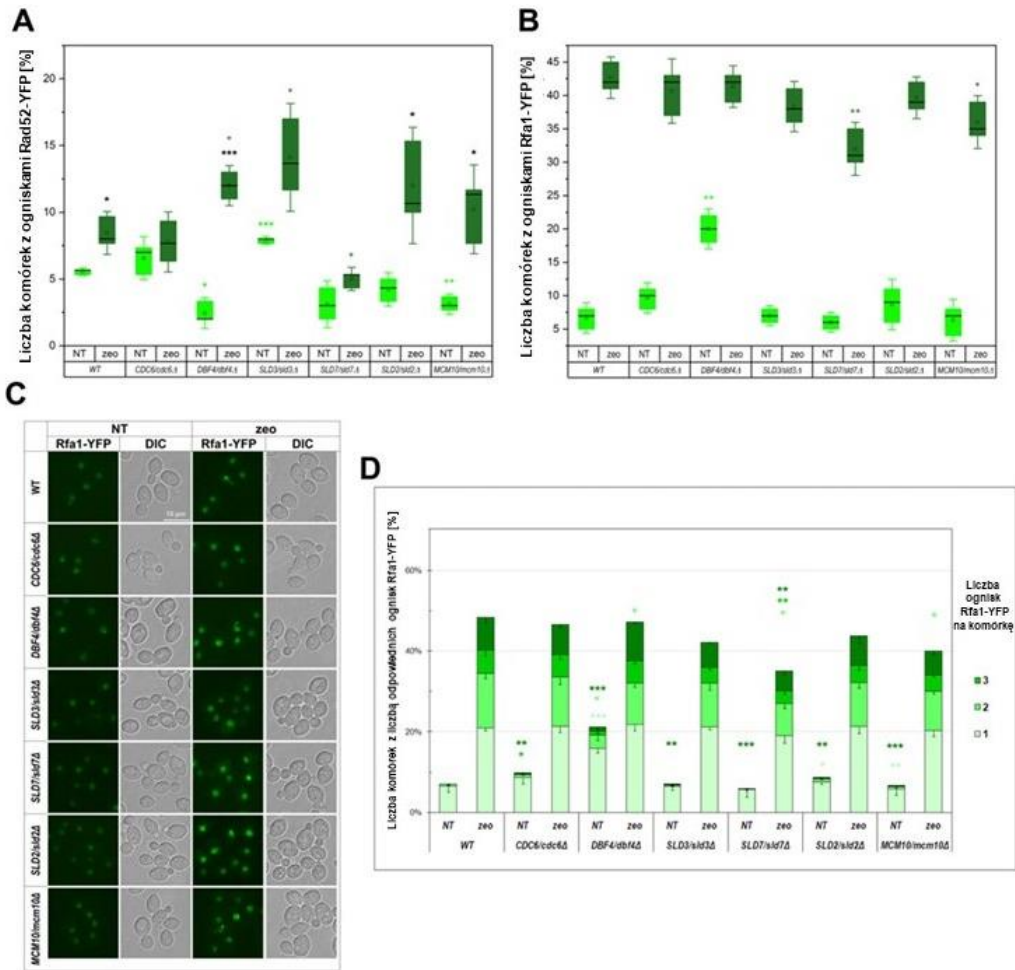


Ryc. 14. Częstość tworzenia ognisk Rad52-YFP w heterozygotach *ORC/orcΔ*. Szczep kontrolny BY4743 i szczepy izogeniczne *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ* i *ORC6/orc6Δ* sprawdzano pod kątem tworzenia ognisk Rad52-YFP w co najmniej 900 komórkach na każdy szczep. Zliczano liczbę ognisk obserwowanych przed i po jednogodzinnym traktowaniu 1mM H₂O₂ i obliczano średnią liczbę ognisk na komórkę. Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu ANOVA i testu post hoc Dunnetta (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Skierowano również pytanie, czy podobny fenotyp utrzymuje się w grupie szczepów lowPICC. W tym przypadku rozszerzono analizy o akumulację uszkodzeń regionów ssDNA. W analizie wykorzystano białka fuzyjne Rad52-YFP i Rfa1-YFP. Funkcja białka Rad52 została opisana powyżej, natomiast białko Rfa1 jest częścią kompleksu RPA (białko replikacyjne A), które wiąże jednoniciowy DNA (ssDNA) i ma kluczowe znaczenie w przebiegu replikacji, naprawie i utrzymaniu telomerów [Barbour i Wuttke 2023]. Dlatego w celu identyfikacji jednoniciowych uszkodzeń DNA zastosowano białko fuzyjne Rfa1-YFP.

Jak zostało pokazane na Rycinie 15A, liczba komórek ze spontanicznie utworzonymi ogniskami Rad52-YFP istotnie wzrosła w szczepie *SLD3/sld3Δ*, natomiast znacząco spadła w szczepach *DBF4/dbf4Δ* i *MCM10/mcm10Δ* (wzrost bez stresora). W celu indukcji stresu genotoksycznego wykorzystano zeocynę (fleomycyna D1). Zeocyna jest stresorem powodującym dwuniciowe pęknięcia nici DNA. Traktowanie zeocyną zwykle powoduje wzrost odsetka komórek z ogniskami Rad52-YFP, ponieważ rekombinaza Rad52 jest rekrutowana do miejsca uszkodzenia, gdzie następuje naprawa DNA. Fenotyp zwiększenia liczby ognisk Rad52-YFP zaobserwowano w przypadku szczepu kontrolnego, jak również w analizowanych heterozygotach, ale z pewnymi wyjątkami. Ogólnie zaobserwowane fenotypy były bardzo zmienne. Szczep *CDC6/cdc6Δ* prawie nie reagował na zeocynę. W szczepie *SLD7/sld7Δ* wzrost liczby komórek z ogniskami Rad52-YFP powstałymi po traktowaniu zeocyną był nieistotny statystycznie, ale na uwagę zasługuje fakt, że liczba komórek z ogniskami wywołanymi stresem genotoksycznym w tym szczepie była istotnie obniżona w porównaniu z WT traktowanym zeocyną. Z kolei, w szczepach *DBF7/dbf4Δ* i *SLD3/sld3Δ* liczba ognisk Rad52-YFP wywołanych stresem wzrosła istotnie w porównaniu z kontrolą traktowaną zeocyną. Jednocześnie odsetek komórek samoistnie tworzących ogniska Rad52-YFP w szczepie *SLD3/sld3Δ* był niemal czterokrotnie wyższy niż w *DBF7/dbf4Δ*. W pozostałych dwóch szczepach, *SLD2/sld2Δ* i *MCM10/mcm10Δ*, odsetek ognisk Rad52-YFP wywołanych stresem wzrósł istotnie w porównaniu z nietraktowaną kontrolą dla odpowiednich szczepów, ale zakres wzrostu był różny (odpowiednio około dwu- i czterokrotny).

Następnie skoncentrowano się na analizie liczby ognisk białka fuzyjnego Rfa1-YFP. Jak pokazano na Rycinach 15B, C i D w warunkach kontrolnych liczba komórek z ogniskami Rfa1-YFP była znacząco zwiększona w szczepie *DBF4/dbf4Δ* w porównaniu z WT. Co więcej, w populacji komórek zawierających ogniska Rfa1-YFP występowało więcej komórek zawierających po kilka ognisk na komórkę (w przeciwieństwie do ognisk Rad52-YFP, które przeważnie występują pojedynczo, a rzadko jako dwa lub więcej na komórkę). Taki fenotyp często towarzyszy zwiększonemu uszkodzeniu DNA (Ryc. 15D) lub nagromadzeniu jednoniciowych przerw w DNA. Co ciekawe, nawet jeśli częstość występowania komórek z ogniskami Rfa1-YFP była na poziomie WT, wszystkie szczepy lowPICC wykazały zwiększoną liczbę komórek z dużą liczbą (więcej niż trzy) ognisk Rfa1-YFP na komórkę, czego nie zaobserwowano w szczepie kontrolnym. Traktowanie zeocyną spowodowało znaczny wzrost populacji komórek zawierających



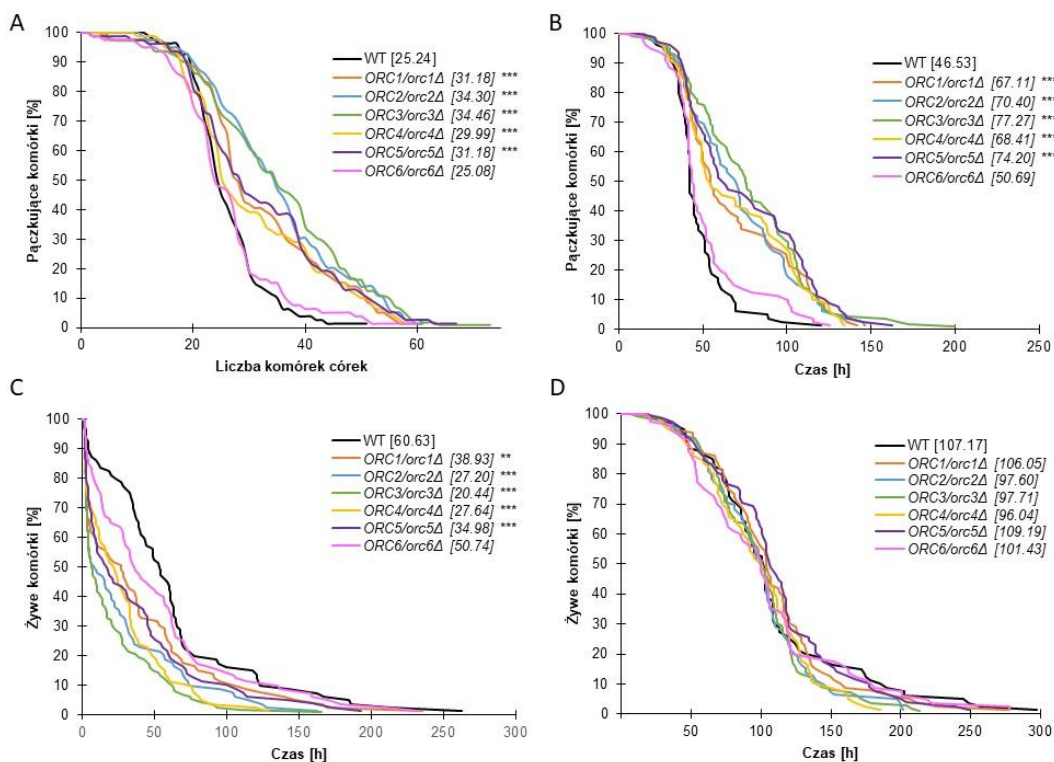
Ryc. 15. Analiza częstości pęknięć dwuniciowych DNA i regionu ssDNA w szczepach lowPICC. Kwantyfikacja częstotliwości ognisk Rad52-YFP (A) i Rfa1-YFP (B). Wykonano trzy powtórzenia biologiczne. Zliczono co najmniej 300 komórek (dla Rad52-YFP) lub 600 komórek (dla Rfa1-YFP) dla każdego szczepu przed i po traktowaniu zeocyną. Ramki reprezentują kwartyle danych. Poziome linie w ramkach przedstawiają wartości mediany. Kwadrat reprezentuje wartość średnią. Wąsy reprezentują odchylenie standardowe ze współczynnikiem = 1,5. Testowanie hipotez statystycznych przeprowadzono za pomocą testu t Welcha dla dwóch prób. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Jasnozielone gwiazdki wskazują istotność statystyczną w porównaniu do nietraktowanego szczepu kontrolnego, ciemnozielone gwiazdki wskazują istotność statystyczną w odniesieniu do szczepu kontrolnego traktowanego zeocyną, a czarne gwiazdki odzwierciedlają zmiany istotne statystycznie dla szczepu pomiędzy warunkami kontrolnymi i traktowaniem zeocyną. Dla zachowania przejrzystości, na wykresie pominięto statystycznie istotną różnicę ($p < 0,001$) w liczbie ognisk Rfa1 pomiędzy komórkami nietraktowanymi i traktowanymi zeocyną (B). (C) Ogniska Rfa1-YFP zobrazowane w szczepach lowPICC. (D) Wykres pokazuje ilościowe określenie liczby komórek z odpowiednią liczbą ognisk Rfa1-YFP na komórkę. Średnią (\pm SD) odsetka komórek z jednym, dwoma, trzema lub większą liczbą ognisk Rfa1-YFP w komórkach zliczano w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych. Istotne statystycznie różnice pomiędzy WT a danym szczepem lowPICC pokazano powyżej wyniku dla tego szczepu w warunkach kontrolnych. Podobnie postąpiono z wynikami uzyskanymi dla szczepów traktowanych zeocyną. Różnica w odsetku komórek z określoną liczbą ognisk Rfa1-YFP na komórkę pomiędzy szczepami nietraktowanymi i traktowanymi zeocyną była

istotna statystycznie ($p < 0,01$) dla każdego szczepu i dlatego została pominięta na wykresie. Gwiazdki reprezentujące istotność statystyczną wyników dla określonej subpopulacji komórek są pokazane w tym samym kolorze co ta populacja.

ogniska Rfa1-YFP, w tym wzrost liczby ognisk na komórkę. Ponadto liczba komórek zawierających ogniska Rfa1-YFP po indukcji zeocyną znacząco spadła w szczepach *SLD7/sld7Δ* i *MCM10/mcm10Δ*, głównie tych z wieloma ogniskami (Ryc. 15B).

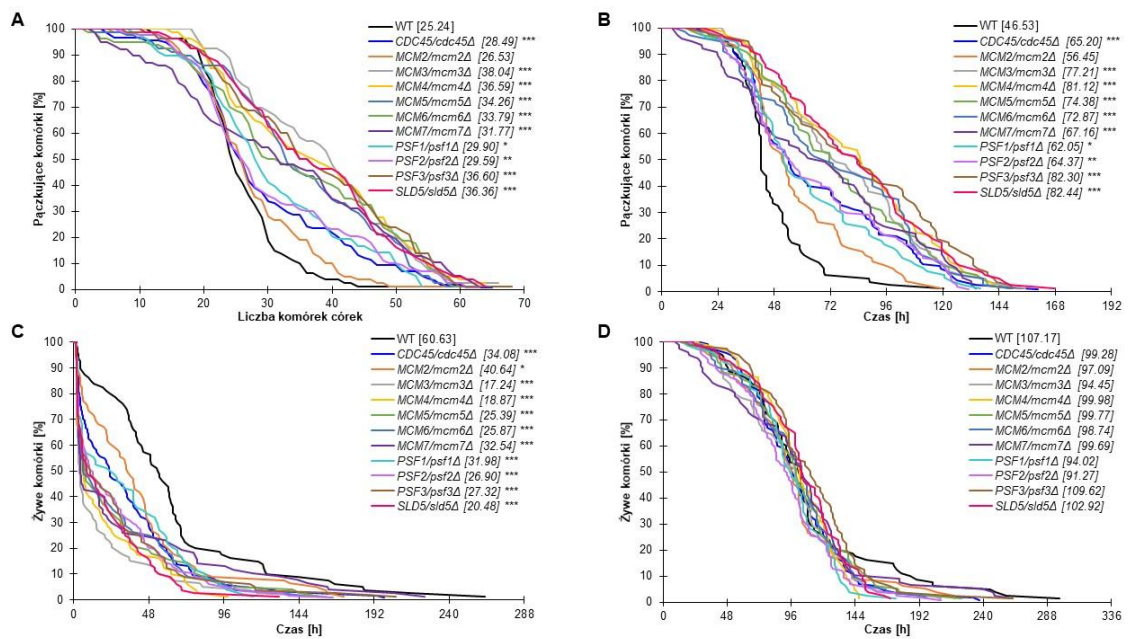
7.6. Wpływ zaburzeń inicjacji replikacji DNA na starzenie komórek aktywnych mitotycznie (starzenie replikacyjne)

Tempo starzenia się komórek stanowi kluczowy wyznacznik oceny ich stanu fizjologicznego. Zdecydowana większość komórek przechodzi w swoim życiu określoną liczbę podwojeń. Warto zaznaczyć w tym miejscu, że w przypadku drożdży *S. cerevisiae* nie możemy powiedzieć, że komórki dzielą się. Jest to związane z wyбором sposobu rozmnażania bezpłciowego przez pączkowanie. W związku z tym komórki drożdży *S. cerevisiae* pączkują. Starzenie na poziomie komórkowym wiąże się zatem z utratą przez komórkę zdolności proliferacyjnych, czy jak w przypadku drożdży pączkujących do pączkowania. Do takiego stanu może doprowadzić nie tylko wyczerpanie potencjału reprodukcyjnego danej komórki, ale także stres komórkowy, m.in. stres oksydacyjny, osmotyczny, czy działanie związków uszkodzających DNA. W związku z tym kolejnym krokiem realizowanego projektu w ramach rozprawy doktorskiej była próba odpowiedzi na pytania: czy w komórkach drożdży o obniżonej ekspresji kluczowych genów kodujących białka zaangażowane w proces inicjacji replikacji DNA uległy zmianie: potencjał reprodukcyjny, czas życia reprodukcyjnego, czas życia po reprodukcji i całkowita długość życia. W celu oceny tempa starzenia się komórek aktywnych mitotycznie, zastosowano model replikacyjnego starzenia. Potencjał reprodukcyjny heterozygotycznych komórek drożdży oceniono wykorzystując standardową metodę polegającą na określeniu liczby komórek potomnych (córek) wytworzonych przez pojedynczą komórkę - matkę. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu techniki mikromanipulacji oraz dzięki utrzymaniu asymetrii pomiędzy komórką matką i córką (Ryc. 3). Ponadto dzięki zastosowaniu w analizach floksyny B (marker wykorzystywany do barwienia martwych komórek) była możliwość określenia parametrów czasowych, tj. czas reprodukcji, czasu po reprodukcji oraz całkowitej długości życia komórek.



Ryc. 16. Fenotypy starzenia się komórek z obniżoną ekspresją genów kodujących podjednostki kompleksu ORC. Porównanie potencjału rozrodczego (A), długości życia reprodukcyjnego (B), długości życia po reprodukcyjnym (C) i całkowitej długości życia (D) diploidalnego referencyjnego szczepu drożdży BY4743 (WT) i izogenicznych szczepów heterozygotycznych. Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu ANOVA i testu post hoc Dunnetta (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). W nawiasach podano średnią wartość dla łącznie 90 komórek z dwóch niezależnych eksperymentów.

Jak pokazano na Rycinie 16A, 17A i 18A, prawie wszystkie analizowane heterozygoty wykazywały zwiększoną zdolność do reprodukcji w porównaniu z WT. Jedynie w przypadku szczepów *ORC6/orc6Δ* i *MCM2/mcm2Δ* zaobserwowane zmiany nie były istotne statystycznie. W prawie wszystkich przypadkach średni potencjał reprodukcyjny przekraczał 30 podwojeń wykonanych przez pojedynczą komórkę matkę, co stanowiło statystycznie istotny wzrost w porównaniu z kontrolą ($p < 0,001$). Co ciekawe, szczepy *MCM3/mcm3Δ*, *MCM4/mcm4Δ*, *PSF3/psf3Δ*, *SLD5/sld5Δ*, *SLD3/sld3Δ*, *SLD7/sld7Δ* i *MCM10/mcm10Δ* wykazywały najbardziej znaczący wzrost potencjału reprodukcyjnego, prawie 50% wyższy niż WT. W związku z tym, dane pochodzące z analizy potencjału reprodukcyjnego jednoznacznie pokazują, że obniżenie poziomu ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w proces inicjacji replikacji DNA odgrywa kluczową rolę w zdolności reprodukcyjnej komórek.



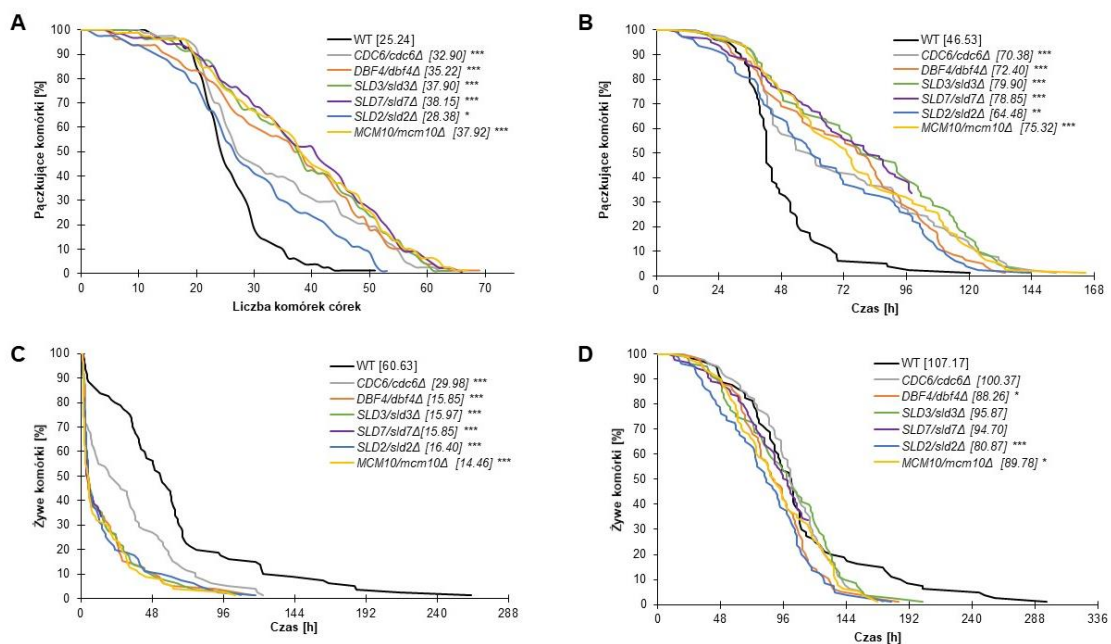
Ryc. 17. Fenotypy starzenia się komórek z obniżoną ekspresją genów kodujących podjednostki kompleksu CMG. Porównanie potencjału rozrodczego (A), długości życia reprodukcyjnego (B), długości życia po reprodukcyjnego (C) i całkowitej długości życia (D) diploidalnego referencyjnego szczepu drożdży BY4743 (WT) i izogenicznych szczepów heterozygotycznych. Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu ANOVA i testu post hoc Dunnetta (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). W nawiasach podano średnią wartość dla łącznie 90 komórek z dwóch niezależnych eksperymentów.

Jak wspomniano wcześniej, ustalono również parametry czasowe dla komórek podczas rutynowej analizy starzenia replikacyjnego: czas reprodukcji, czas po reprodukcji oraz sumę tych dwóch czasów, czyli całkowitą długość życia. Dodatkowe wydłużenie czasu podwojenia komórek (Ryc. 4C, 5C i 6C) doprowadziło do statystycznie istotnego wzrostu długości życia reprodukcyjnego komórek (Ryc. 16B, 17B, 18B), we wszystkich badanych szczepach z wyjątkiem *ORC6/orc6Δ* i *MCM2/mcm2Δ*.

Standardowe podejście do analiz starzenia komórek aktywnych mitotycznych zakłada jedynie analizę potencjału reprodukcyjnego (*replicative lifespan*). Do dnia dzisiejszego jest to jedyne podejście eksperymentalne w najlepszych laboratoriach na świecie wykorzystujących drożdże jako model eksperymentalny w badaniach nad starzeniem. Jednak komórki drożdży nie umierają bezpośrednio po ostatnim pączkowaniu. W związku z tym brak parametru czasu życia komórek pozostawia co najmniej niedosyt, kiedy chcemy odnieść wyniki z modelu drożdżowego do innych układów eukariotycznych, w tym i ludzi. Po zaprzestaniu reprodukcji komórki drożdży żyją jeszcze przez określony czas, zwany życiem po reprodukcyjnym lub

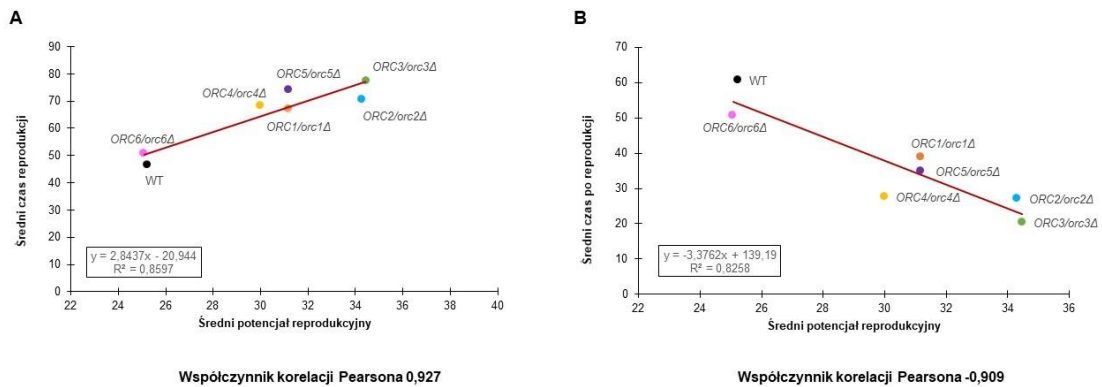
post-reprodukcyjnym. Czas trwania tego okresu życia komórek zależy od wielu czynników i często determinuje długowieczność komórek. Dlatego też dla badanych heterozygot określono także czas życia po reprodukcji. Jak pokazano na Rycinie 16C, 17C i 18C wszystkie analizowane szczepy, z wyjątkiem *ORC6/orc6Δ*, cechowały się istotnym skróceniem czasu życia po reprodukcji. Co ciekawe, szczep *MCM2/mcm2Δ*, którego potencjał reprodukcyjny i reprodukcyjny czas życia był podobny do WT, wykazał istotną różnicę w skróceniu czasu życia po reprodukcji ($p < 0,05$).

Określono także całkowitą długość życia komórek aktywnych mitotycznie, która jest sumą czasu życia reprodukcyjnego i po reprodukcji (Ryc. 16D, 17D i 18D). Nasze badania pokazują, że wśród całego zestawu analizowanych szczepów fenotyp przyspieszonego starzenia zaobserwowano jedynie w heterozygotach *DBF4/dbf4Δ*, *MCM10/mcm10Δ* ($p < 0,05$) oraz *SLD2/sld2Δ* ($p < 0,001$) (Ryc. 17D). Co ciekawe, choć w większości badanych szczepów nie wykazano istotnych statystycznie różnic w zakresie całkowitej długości życia, to przeciętnie jest ono nieco krótsze w porównaniu z grupą kontrolną.

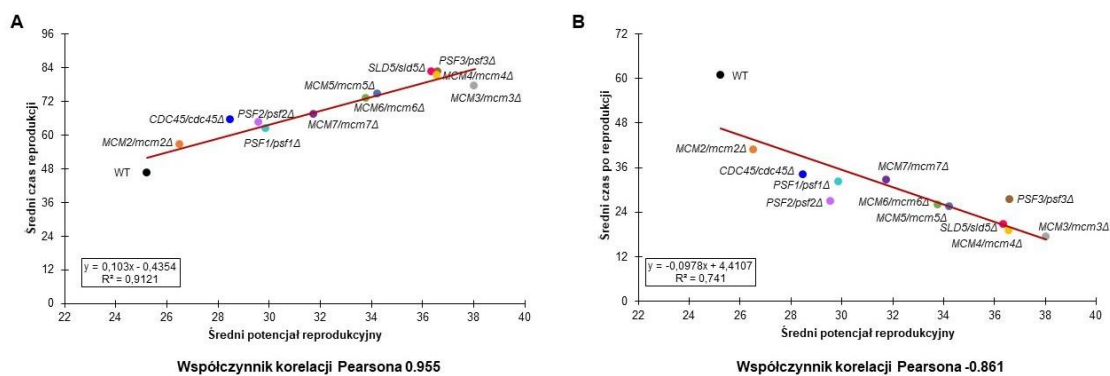


Ryc. 18. Fenotypy starzenia się komórek z obniżoną ekspresją genów kodujących białka lowPICC. Porównanie potencjału rozrodczego (A), długości życia reprodukcyjnego (B), długości życia po reprodukcyjnego (C) i całkowitej długości życia (D) diploidalnego referencyjnego szczepu drożdży BY4743 (WT) i izogenicznych szczepów heterozygotycznych. Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu ANOVA i testu post hoc Dunnetta (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). W nawiasach podano średnią wartość dla łącznie 90 komórek z dwóch niezależnych eksperymentów.

Skorelowano także długość życia reprodukcyjnego i po reprodukcyjnego z potencjałem reprodukcyjnym w badanych grupach heterozygotycznych szczepach, tj. *ORC/orcΔ*, *CMG/cmɡΔ* oraz lowPICC. We wszystkich grupach zaobserwowano silnie dodatnią korelację między długością życia reprodukcyjnego, a potencjałem reprodukcyjnym oraz silnie ujemną korelację między długością życia po reprodukcyjnego, a potencjałem reprodukcyjnym.



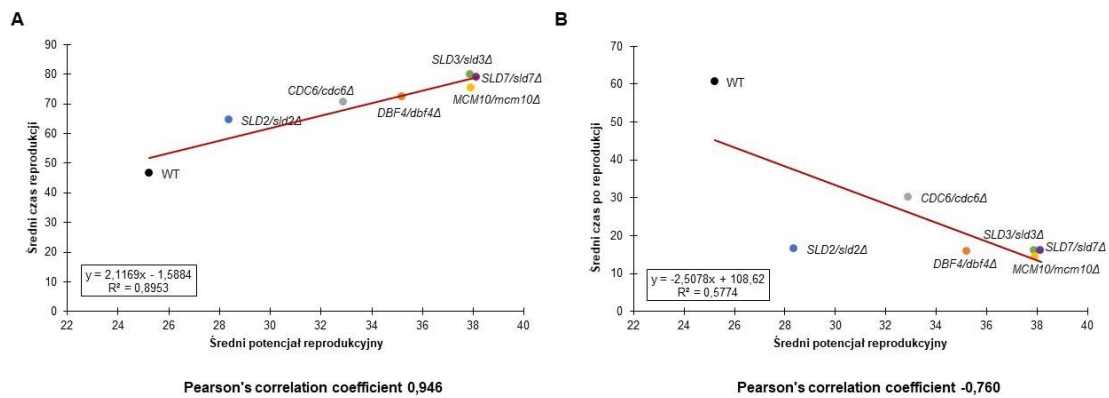
Ryc. 19. Korelacja pomiędzy potencjałem reprodukcyjnym, a długością życia reprodukcyjnego (A) oraz pomiędzy potencjałem reprodukcyjnym a długością życia po reprodukcyjnego (B) szczepu typu dzikiego (BY4743) i izogenicznych heterozygotycznych szczepów *ORC/orcΔ*.



Ryc. 20. Korelacja pomiędzy potencjałem reprodukcyjnym a długością życia reprodukcyjnego (A) oraz pomiędzy potencjałem reprodukcyjnym a długością życia po reprodukcyjnego (B) szczepu typu dzikiego (BY4743) i izogenicznych heterozygotycznych szczepów *CMG/cmɡΔ*.

Wartość współczynnika korelacji Pearsona dla korelacji pomiędzy długością życia reprodukcyjnego, a potencjałem reprodukcyjnym wyniosła odpowiednio 0,927 dla grupy szczepów *ORC/orcΔ* (Ryc. 19A), 0,955 dla grupy *CMG/cmɡΔ* (Ryc. 20A) oraz 0,946 dla grupy lowPICC (Ryc. 21A). Z kolei w przypadku korelacji między długością życia po

reprodukcyjnego, a potencjałem reprodukcyjnym współczynnik korelacji Pearsona wyniósł odpowiednio -0,909 dla grupy szczepów *ORC/orcΔ*, (Ryc. 19B), -0, 861 dla grupy *CMG/cmGΔ* (Ryc. 20B) oraz -0,760 dla grupy lowPICC (Ryc. 21B).



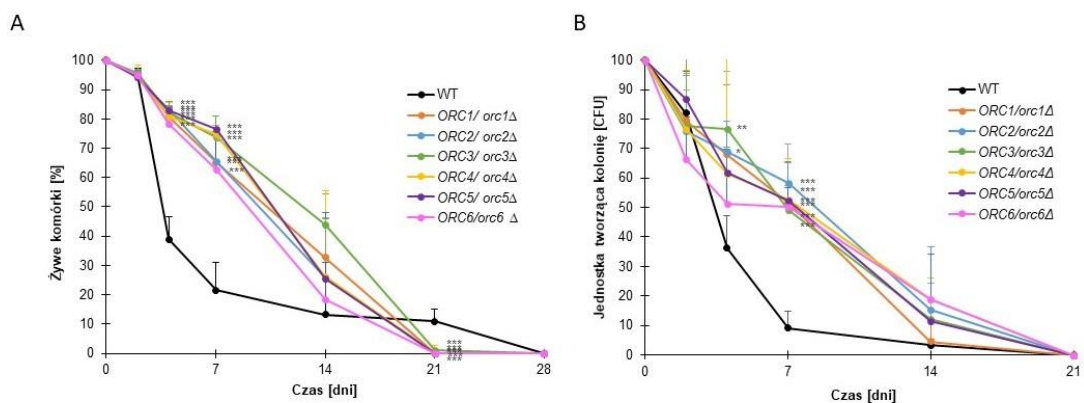
Ryc. 21. Korelacja pomiędzy potencjałem reprodukcyjnym a długością życia reprodukcyjnego (A) oraz pomiędzy potencjałem reprodukcyjnym a długością życia po reprodukcyjnego (B) szczepu typu dzikiego (BY4743) i izogenicznych heterozygotycznych szczepów *CDC6/cdc6Δ*, *DBF4/dbf4Δ*, *SLD3/sld3Δ*, *SLD7/sld7Δ*, *SLD2/sld2Δ* oraz *MCM10/mcm10Δ*.

7.7. Wpływ zaburzeń inicjacji replikacji DNA na tempo starzenia się komórek post-mitotycznych (starzenie chronologiczne)

W biogerontologii drożdży wykorzystuje się również, tzw. model starzenia chronologicznego. Jest to model starzenia populacji komórek znajdujących się w fazie post-mitotycznej. W praktyce chronologiczna długość życia (*chronological life span* - CLS) jest miarą przeżycia populacji drożdży w fazie stacjonarnej. Służy zatem do oceny przeżycia komórek niepączkujących, co czyni go odpowiednim modelem starzenia się post-mitotycznych komórek ssaków, w tym ludzi. Monitorowanie przeżywalności komórek w fazie stacjonarnej jest stosunkowo prostą metodą, która nie wymaga mikromanipulacji, ułatwiając w ten sposób badania przesiewowe nad długowiecznością. Do analizy CLS komórki hodowano na podłożu syntetycznym uzupełnionym glukozą i niezbędnymi markerami aukstotroficznymi. W tych warunkach, po wyczerpaniu źródła węgla (glukozy) komórki zaprzestają proliferacji i rozpoczyna się proces starzenia.

W odniesieniu do szczepów pozbawionych jednej kopii genu kodującego podjednostki kompleksów białkowych ORC oraz CMG zastosowano dwa podejścia do analizy CLS: znakowanie fluorescencyjne martwych komórek jodkiem propidyny oraz standardową metodę oceny przeżycia poprzez zliczanie jednostek tworzących kolonie (*colony forming unit* - CFU). Jak pokazano na Rycinie 22A, wszystkie analizowane heterozygotyczne

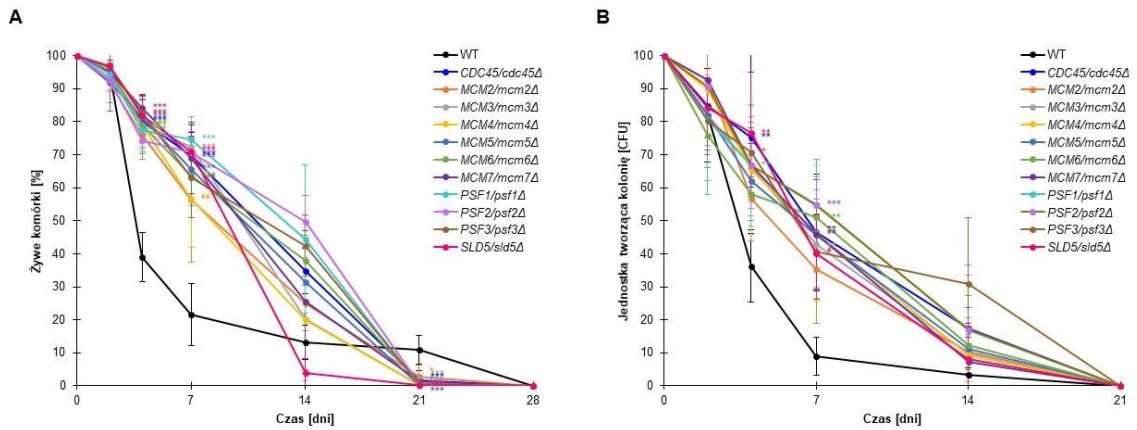
szczerpy *ORC/orcΔ* znacząco zwiększyły przeżywalność aż do 7. dnia, w porównaniu ze szczepem typu dzikiego BY4743 ($p < 0,001$). W 14. dniu eksperymentu, chociaż przeżywalność wszystkich analizowanych szczepów była średnio wyższa niż w WT, istotność statystyczną wykazano jedynie dla *ORC3/orc3Δ* i *ORC4/orc4Δ*. Pomimo wysokiego wskaźnika przeżycia w 14. dniu (barwienie fluorescencyjne), mniej niż 20% komórek analizowanych heterozygot miało zdolność do tworzenia kolonii (Ryc. 22B). W 21. dniu doświadczenia komórki szczepów *ORC/orcΔ* wykazały 100% śmiertelność, co oznaczało, że szczep WT charakteryzuje się maksymalnie dłuższym CLS w porównaniu z heterozygotami *ORC/orcΔ*. Co ciekawe, pomimo niewielkiego odsetka żywych komórek w populacji WT, komórki te nie wykazały zdolności do tworzenia kolonii (Ryc. 22B). W związku z powyższym nasze badania dają podstawę twierdzić, że standardowo wykorzystywany test CFU w przypadku analiz starzenia chronologicznego nie jest wystarczający i nie odzwierciedla w pełni tempa starzenia komórek nieaktywnych mitotycznie. Dlatego uzupełnienie tych wyników o analizy przeżywalności innymi metodami wydają się być kluczowe.



Ryc. 22. Chronologiczna długość życia diploidalnego szczepu drożdży typu dzikiego BY4743 i izogenicznych szczepów *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ* i *ORC6/orc6Δ*. Przeżycie określono poprzez barwienie jodkiem propidyny (A). Klonogenność określono na podstawie jednostki tworzącej kolonię (CFU) (B). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu ANOVA i testu post hoc Dunnetta (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

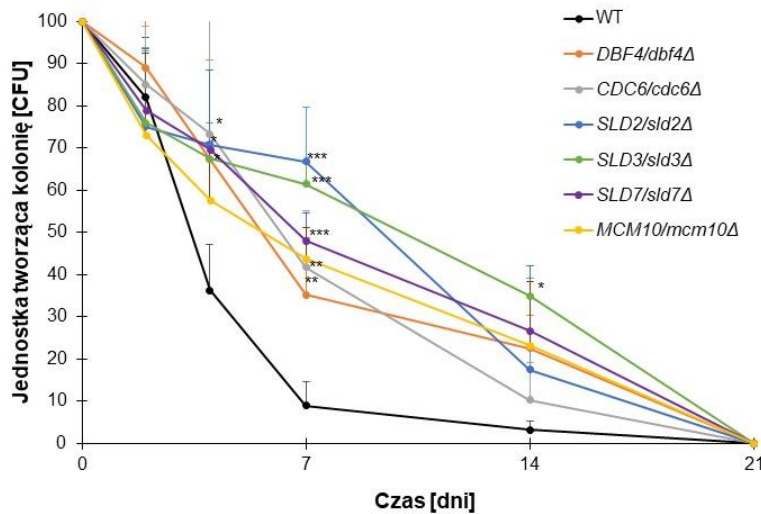
Jak pokazano na Rycinie 23A również komórki wszystkich heterozygot kompleksu *CMG/cmgΔ* wykazały fenotyp opóźnionego starzenia podczas pierwszych 14. dni doświadczenia, z wyjątkiem *SLD5/sld5Δ*. Co ciekawe, żaden ze szczepów nie był zdolny

do tworzenia kolonii po upływie 21. dni eksperymentu CLS (w tym WT), podczas gdy około 15% komórek w populacji szczepu WT zachowało swoją żywotność, co stanowi statystycznie istotną różnicę w porównaniu z heterozygotami *CMG/cmgΔ* ($p < 0,001$).



Ryc. 23. Chronologiczna długość życia diploidalnego szczepu WT (BY4743) i izogenicznych heterozygotycznych szczepów *CDC45/cdc45Δ*, *MCM2/mcm2Δ*, *MCM3/mcm3Δ*, *MCM4/mcm4Δ*, *MCM5/mcm5Δ*, *MCM6/mcm6Δ*, *MCM7/mcm7Δ*, *PSF1/psf1Δ*, *PSF2/psf2Δ*, *PSF3/psf3Δ* i *SLD5/sld5Δ*. Przeżycie określono za pomocą barwienia jodkiem propidyny (A). Klonogenność określono na podstawie jednostki tworzącej kolonię (CFU) (B). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu ANOVA i testu post hoc Dunnetta (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Dla grupy mutantów lowPICC zastosowano standardowe podejście do CLS, opierające się na ocenie przeżycia komórek poprzez zliczanie jednostek tworzących kolonie (CFU). Te wyniki znajdują się w suplemencie elektronicznym publikacji [Stepien i in. 2024b]. Jak pokazano na Rycinie 24 w 4. dniu eksperymentu komórki szczepu *CDC6/cdc6Δ*, *SLD7/sld7Δ* oraz *SLD2/sld2Δ* wykazały istotną statystycznie wyższą klonogenność w porównaniu ze szczepem kontrolnym. W 7. dniu eksperymentu komórki wszystkich analizowanych heterozygot charakteryzowały się wyższą zdolnością do tworzenia kolonii, jednakże w przypadku *DBF4/dbf4Δ* wartość ta nie była istotna statystycznie. W 14. dniu eksperymentu, istotny statystycznie wzrost klonogenności ($p < 0,05$) zaobserwowano wyłącznie dla szczepu *SLD3/sld3Δ*. W 21. dniu eksperymentu komórki żadnego z analizowanych szczepów, w tym WT nie miały zdolności tworzenia kolonii.

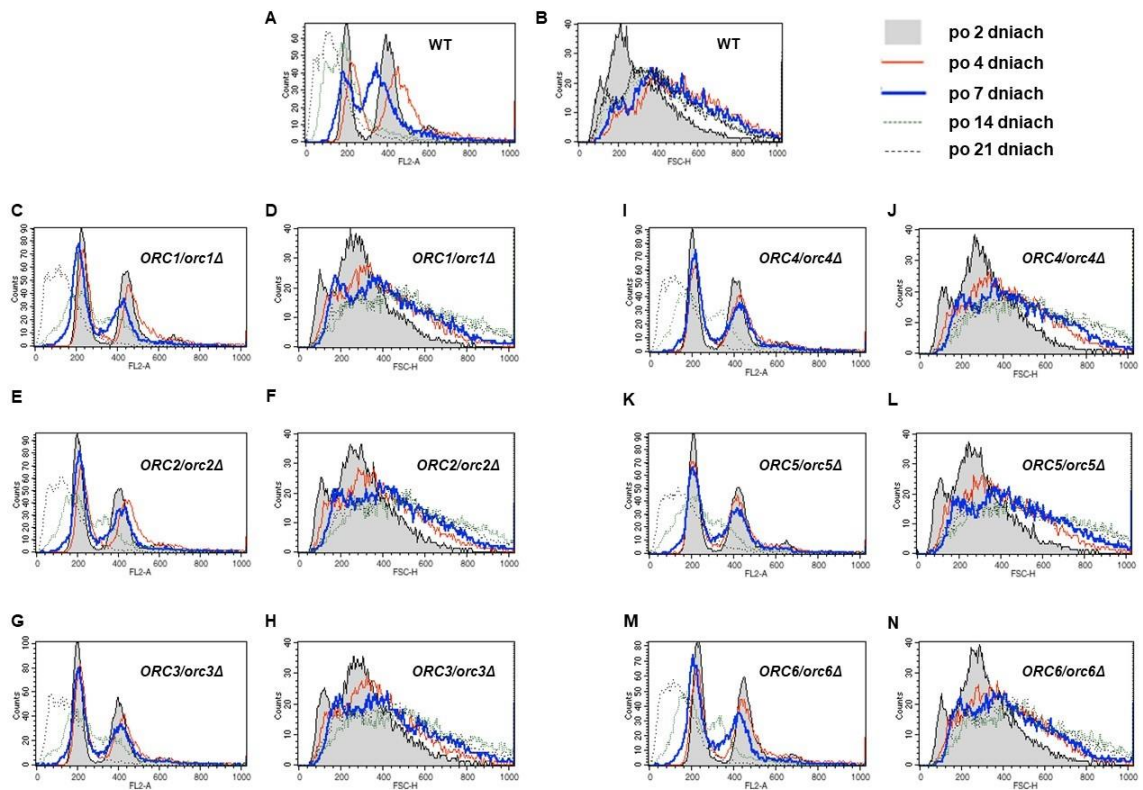


Ryc. 24. Chronologiczna długość życia diploidalnego szczepu WT (BY4743) i izogenicznych heterozygotycznych szczepów *DBF4/dbf4Δ*, *CDC6/cdc6Δ*, *SLD2/sld2Δ*, *SLD3/sld3Δ*, *SLD7/sld7Δ* i *MCM10/mcm10Δ*. Klonogenność określono na podstawie jednostki tworzącej kolonię (CFU). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu ANOVA i testu post hoc Dunnetta (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

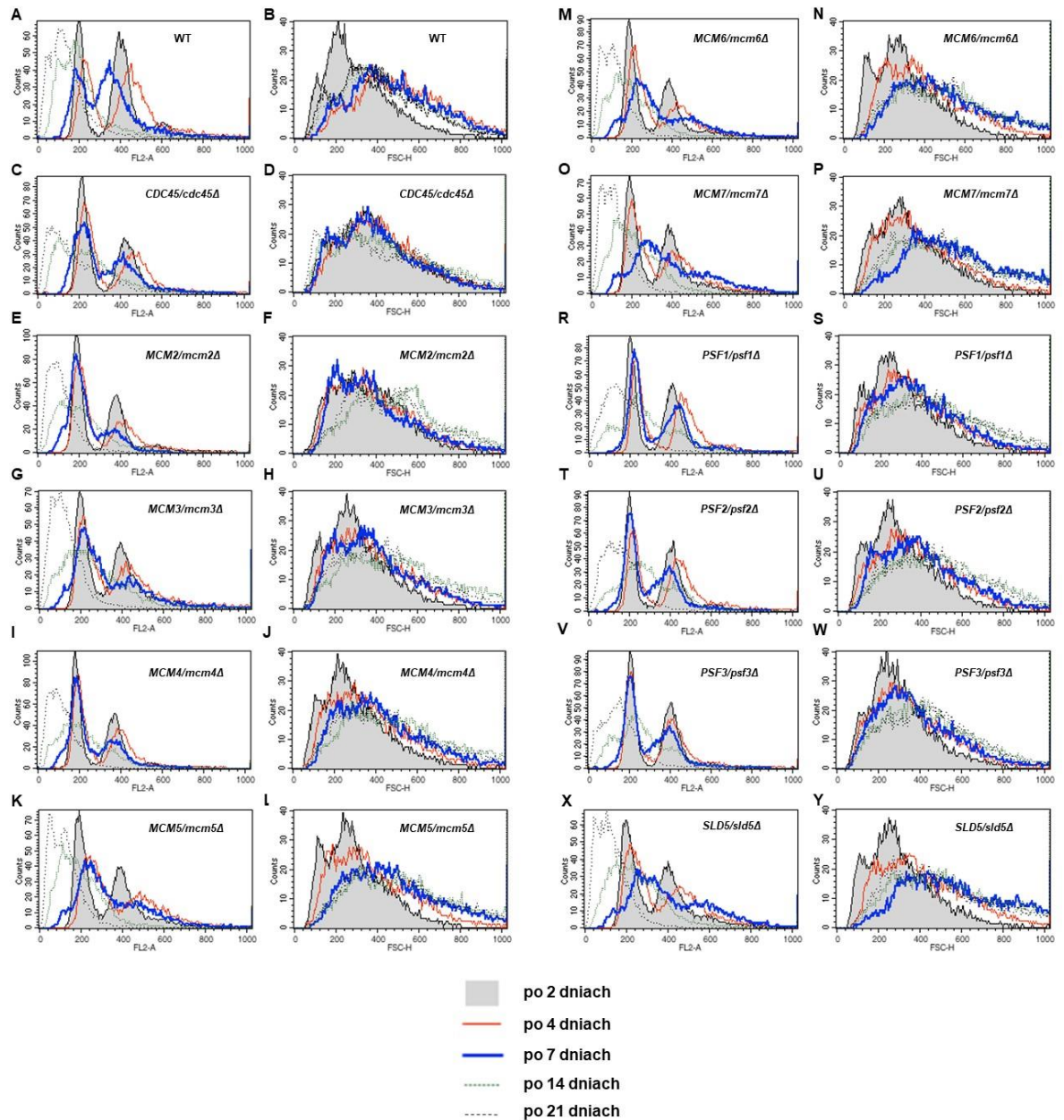
Nasze obserwacje mikroskopowe wykazały, że komórki drożdży wraz z wiekiem zwiększały swoje rozmiary. Ponieważ wiadomo, że wielkość komórki pozytywnie koreluje z ploidią, w trakcie analizy CLS przeprowadzono także testy mające na celu ocenę zmiany wielkości komórek oraz zawartości DNA w komórkach metodą cytometrii przepływowej. Ryciny 25A, C, E, G, I, K, M; 26A, C, E, G, I, K, M, O, R, T, V, X i 27A, C, E, G, I, K, M, przedstawiają analizę zawartości DNA w heterozygotycznych komórkach drożdży. Nasze badania wykazały, że podczas starzenia chronologicznego, prawdopodobnie na skutek głodzenia komórek (brak źródła węgla jest czynnikiem zatrzymującym cykl komórkowy), nastąpiła zmiana w zawartości DNA, objawiająca się redukcją ploidi. Fenotyp ten zaobserwowano u wszystkich badanych szczepów, w tym typu dzikiego, co sugeruje, że zjawisko to jest powszechne. W tym miejscu należy wspomnieć, że przeprowadzając analizę zawartości DNA, nie można rozróżnić profili FACS komórek żywych i martwych w analizowanej populacji. Jedną z możliwych hipotez pojawienia się komórek haploidalnych w populacji drożdży poddawanych eksperymentowi CLS jest sporulacja. Teoretycznie warunki mogłyby sprzyjać sporulacji ze względu na głodzenie i przebywanie komórek w środowisku kwaśnym przez kilka

tygodni. W celu zweryfikowania tej hipotezy, wykorzystano homozygotyczny szczep z delecją genu *NDT80* *ndt80Δ/ndt80Δ*. Białko Ndt80 jest kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym dla pomyślnego zakończenia mejozy i tworzenia spor. Dlatego homozygoty *ndt80Δ/ndt80Δ* nie mają zdolności do sporulacji i posłużyły jako szczep kontrolny. Wykluczono sporulację jako źródło zmian ploidii (dane w suplemencie elektronicznym publikacji – Stępień i in. 2024a), ponieważ komórki szczepu *ndt80Δ/ndt80Δ* również wykazywały fenotyp zmiany ploidii, a jak już wspomniano wcześniej nie mają zdolności do sporulacji. Intrygujące zjawisko redukcji ploidii podczas eksperymentu CLS zostało szczegółowo zbadane i omówione w osobnym, współautorskim manuskrypcie, w którym wykazano potencjalne powiązanie między szlakami autofagii, a spadkiem zawartości DNA obserwowanym w komórkach starzejących się chronologicznie [Enkhbaatar i in. 2023].

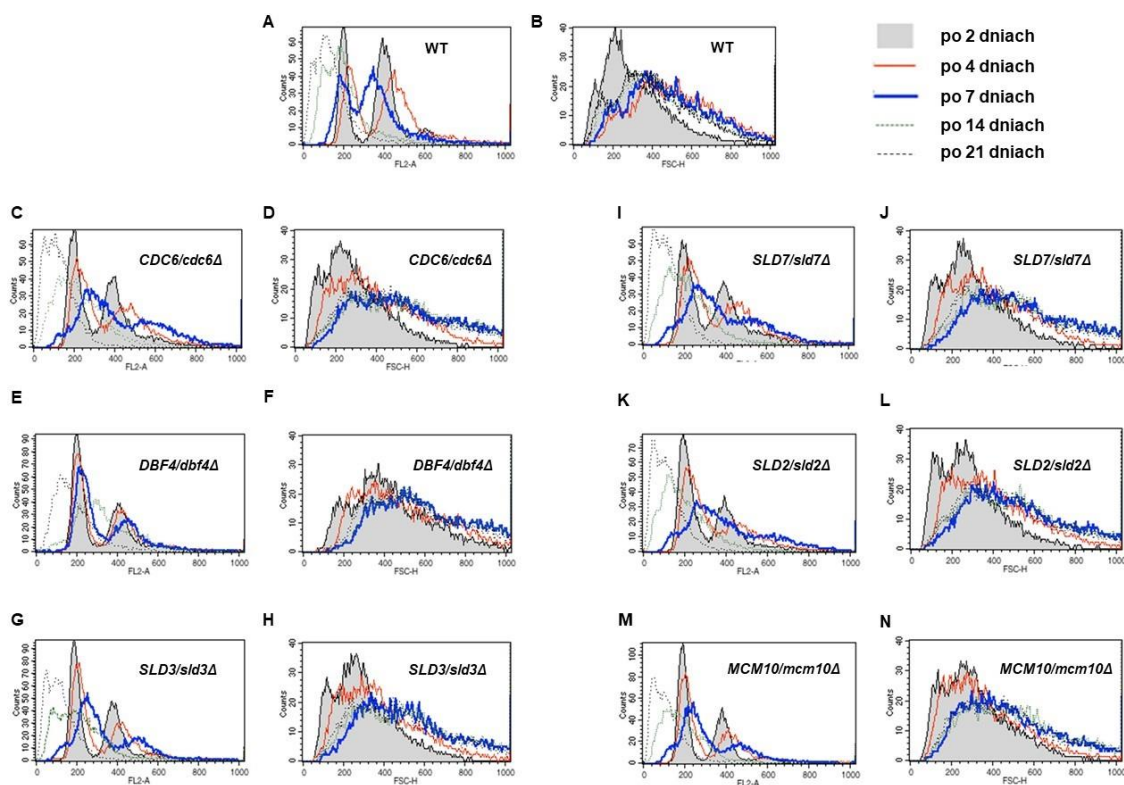
W odniesieniu do rozmiaru komórki, analiza wykazała systematyczny wzrost wielkości komórek w całym eksperymencie, z wyjątkiem szczepów *MCM2/mcm2Δ* i *CDC45/cdc45Δ*, które wykazywały większe rozmiary komórek już na początku eksperymentu CLS (Ryc. 25B, D, F, H, J, L, N; 26B, D, F, H, J, L, N, P, S, U, W, Y i 27B, D, F, H, J, L, N). Warto zauważyć, że najmniejsze komórki obserwowano na początku doświadczenia (2 dni), natomiast największe udokumentowano w 14. i 21. dniu badania.



Ryc. 25. Analiza zawartości DNA metodą cytometrii przepływowej podczas chronologicznego starzenia w wybranych punktach czasowych (A, C, E, G, I, K, M). Pokazane są reprezentatywne histogramy. Dla każdego ze szczepów przeprowadzono trzy niezależne eksperymenty. Wielkość komórek diploidalnego szczepu BY4743 oraz szczepów izogenicznych *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ* i *ORC6/orc6Δ* podczas chronologicznej analizy długości życia w wybranych punktach czasowych (B, D, F, H, J, L, N). Rozmiar komórki mierzony metodą rozproszenia czołowego (histogram FSC odzwierciedla wielkość komórek w populacji). Przebadano 10 000 komórek na próbkę.



Ryc. 26. Analiza zawartości DNA metodą cytometrii przepływowej podczas chronologicznego starzenia w wybranych punktach czasowych (A, C, E, G, I, K, M, O, R, T, V, X). Pokazane są reprezentatywne histogramy. Dla każdego ze szczepów przeprowadzono trzy niezależne eksperymenty. Wielkość komórek diploidalnego szczepu BY4743 oraz szczepów izogenicznych *CD45/Cdc45Δ*, *MCM2/MCM2Δ*, *MCM3/MCM3Δ*, *MCM4/MCM4Δ*, *MCM5/MCM5Δ*, *MCM6/MCM6Δ*, *MCM7/PSF1Δ*, *PSF2/PSF2Δ*, *PSF3/psf3Δ* i *SLD5/sld5Δ* podczas chronologicznej analizy długości życia w wybranych punktach czasowych (B, D, F, H, J, L, N, P, S, U, W, Y). Rozmiar komórki mierzony metodą rozproszenia czołowego (histogram FSC odzwierciedla wielkość komórek w populacji). Przebadano 10 000 komórek na próbkę.

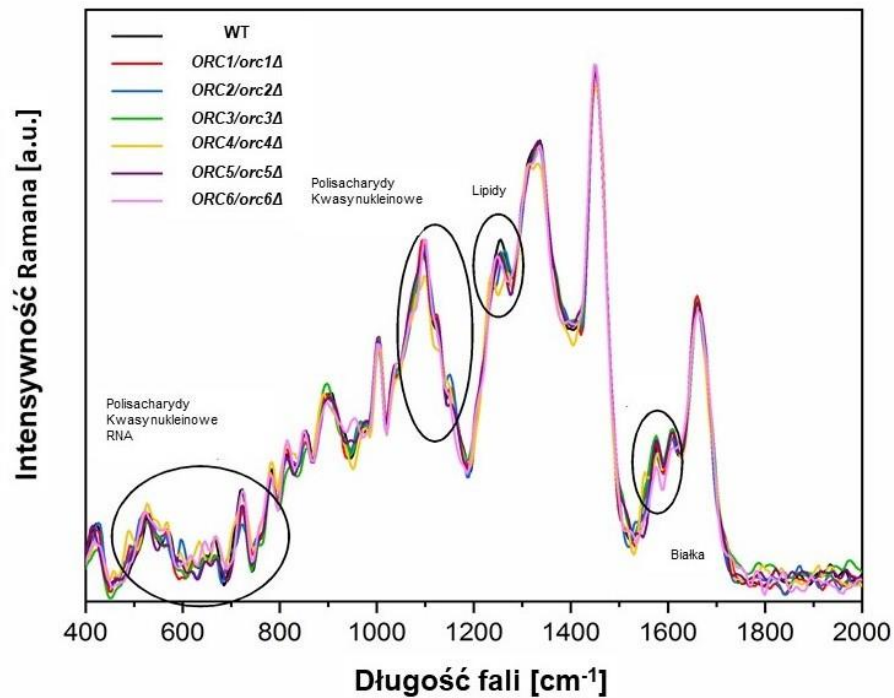


Ryc. 27. Analiza zawartości DNA metodą cytometrii przepływowej podczas chronologicznego starzenia w wybranych punktach czasowych (A, C, E, G, I, K, M). Pokazane są reprezentatywne histogramy. Dla każdego ze szczepów przeprowadzono trzy niezależne eksperymenty. Wielkość komórek diploidalnego szczepu BY4743 oraz szczepów izogenicznych *CDC6/cdc6Δ*, *DBF4/dbf4Δ*, *SLD3/sld3Δ*, *SLD7/sld7Δ*, *SLD2/sld2Δ* i *MCM10/mcm10Δ* podczas chronologicznej analizy długości życia w wybranych punktach czasowych (B, D, F, H, J, L, N). Rozmiar komórki mierzony metodą rozproszenia czołowego (histogram FSC odzwierciedla wielkość komórek w populacji). Przebadano 10 000 komórek na próbkę.

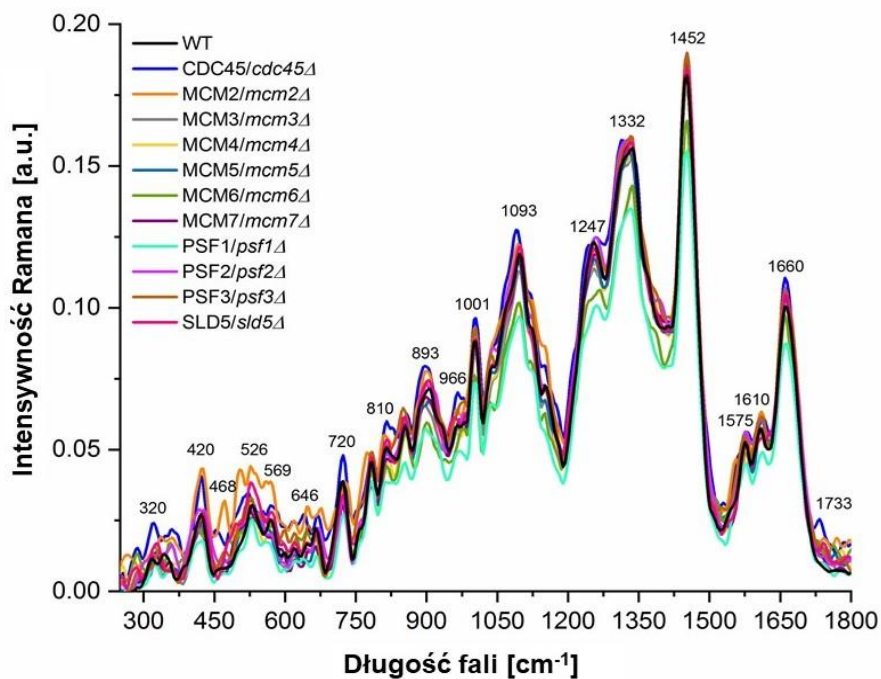
7.8. Wpływ zaburzeń inicjacji replikacji DNA na profil biochemiczny komórki

Jak wykazano wcześniej, pewne zmiany w długości życia drożdży korelują ze zmienionym składem chemicznym komórki [Mołoń i Żebrowski 2017; Mołoń i in. 2020]. Dlatego kolejnym etapem projektu była analiza składu chemicznego badanego materiału z wykorzystaniem metody spektroskopii Ramana. Widma wszystkich analizowanych szczepów i kontroli (BY4743) przedstawiono na Rycinach 28, 29 i 30 z zaznaczonymi pozycjami pików (przesunięcie Ramana) i ich odpowiednimi intensywnościami. W widmach Ramana piki analizowano w obszarach odpowiadających białkom ($850, 1004, 1035, 1280, 1453, 1610 \text{ cm}^{-1}$), lipidom ($1254, 1662, 1775 \text{ cm}^{-1}$), polisacharydom ($420, 520, 890, 960, 1090 \text{ cm}^{-1}$) i RNA ($400\text{--}800, 1330, 1390, 1575 \text{ cm}^{-1}$) [Rosch i in. 2005; Chan i in. 2007; De Gelder i in. 2007; Lemma i in. 2019]. Przesunięcia pozycji pików o kilka nanometrów lub pojawienie się dodatkowych pików

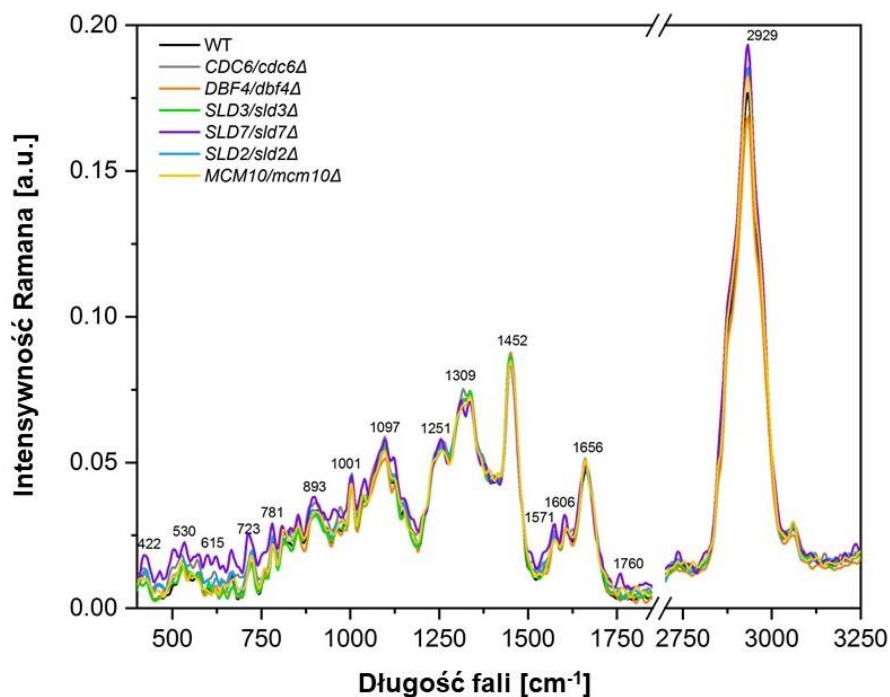
mogą oznaczać zmiany w składzie chemicznym i strukturze tych grup funkcyjnych. Te różnice w widmach Ramana mogą odzwierciedlać różnice w aktywności metabolicznej badanych szczepów drożdży. W rezultacie w uzyskanych widmach Ramana można dostrzec zauważalne zmiany w pasmach specyficznych dla lipidów, białek, RNA i polisacharydów.



Ryc. 28. Widma ramanowskie szczepu dzikiego (WT) i heterozygotycznych szczepów *ORC/orcΔ* z regionami odpowiadającymi wibracjom grup funkcyjnych RNA, kwasów nukleinowych, polisacharydów, białek i lipidów.



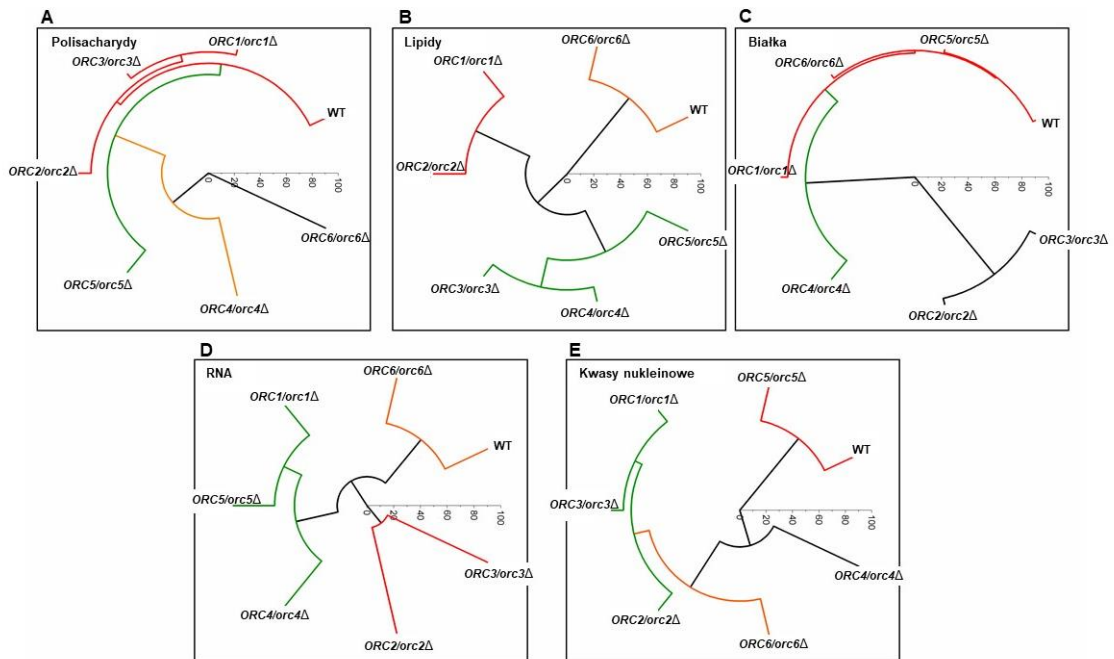
Ryc. 29. Widma ramanowskie szczepu dzikiego (WT) i heterozygotycznych szczepów *CMG/cmgΔ* z regionami odpowiadającymi wibracjom grup funkcyjnych RNA, kwasów nukleinowych, polisacharydów, białek i lipidów.



Ryc. 30. Widma ramanowskie szczepu dzikiego (WT) i heterozygotycznych szczepów *lowPICC* z regionami odpowiadającymi wibracjom grup funkcyjnych RNA, kwasów nukleinowych, polisacharydów, białek i lipidów.

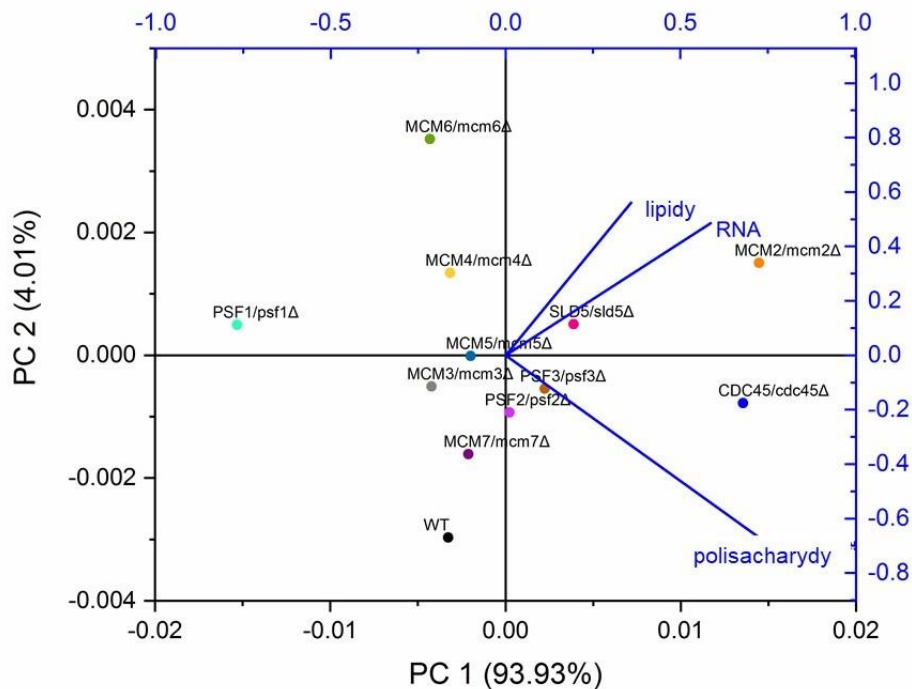
W odniesieniu do heterozygotycznych szczepów *ORC/orcΔ* wydaje się, że zmiany w ich potencjale rozrodczym wiążą się ze znacząco obniżoną ekspresją genów *ORC* i wynikającymi z tego zmianami w przebiegu cyklu komórkowego, co w konsekwencji zmniejsza zużycie energii i prowadzi do wzrostu liczby wyprodukowanych komórek potomnych. Jednakże nie ma jednoznacznych dowodów na to, dlaczego pomimo zmniejszonej ekspresji *ORC6* w przypadku tego heterozygotycznego szczepu (*ORC6/orc6Δ*) nie zaobserwowano podobnego fenotypu. Dlatego aby spróbować wyjaśnić ten fenomen na podstawie uzyskanych danych ze spektroskopii Ramana wykonano hierarchiczną analizę skupień identyfikując różnice w składzie chemicznym polisacharydów, lipidów, białek, RNA i kwasów nukleinowych pomiędzy mutantami *ORC/orcΔ*, a WT. Jak pokazano na Rycinie 31A w przypadku składu polisacharydów tylko trzy heterozygoty (*ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ* i *ORC3/orc3Δ*) były podobne do WT. Komórki pozostałych szczepów tworzyły odrębne grupy, dla których skład polisacharydów różnił się istotnie w porównaniu z WT. Również porównanie składu lipidów pozwoliło wyróżnić trzy grupy o podobnym składzie: (1) WT i *ORC6/orc6Δ*, (2) *ORC1/orc1Δ* i *ORC2/orc2Δ* oraz (3) *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ* i *ORC5/orc5Δ* (Ryc. 31B). Z kolei, główne podobieństwo w składzie białek występowało pomiędzy szczepami WT i *ORC1/orc1Δ*, *ORC5/orc5Δ* i *ORC6/orc6Δ*, podczas gdy pozostałe heterozygoty wykazywały znaczącą różnicę w składzie białek w porównaniu z WT. Pod kątem przesunięcia Ramana charakterystycznego dla białek komórki *ORC4/orc4Δ* wykazywały największe zróżnicowanie i tworzyły osobną grupę (Ryc. 31C). Interesujące dane uzyskano również dla piku charakterystycznego dla RNA. W tym przypadku intensywność sygnału odpowiadającemu RNA ze szczepu *ORC6/orc6Δ* był podobny do WT. Pozostałe analizowane szczepy miały inny poziom RNA w porównaniu z WT i tworzyły dwie odrębne grupy (Ryc. 31D). W odniesieniu do składu kwasów nukleinowych ogólnie *ORC5/orc5Δ* wykazał duże podobieństwo z WT. Szczepy *ORC4/orc4Δ* i *ORC6/orc6Δ* utworzyły drugą grupę o podobnym składzie kwasów nukleinowych, które różniły się od WT. Trzecią grupę, różniącą się od WT, tworzyły heterozygoty *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ* i *ORC3/orc3Δ* (Ryc. 31E). Na podstawie powyższych wyników sugerujemy, że brak zmian w widmie RNA i lipidów może determinować podobieństwo między potencjałem reprodukcyjnym, a krzywą wzrostu między WT a *ORC6/orc6Δ*. Uzyskane dane wskazują, że wykorzystanie technik spektroskopii ramanowskiej może być w przyszłości przydatnym narzędziem

do wykonywania szybkich badań przesiewowych w kierunku poszukiwania potencjalnych szczepów lub czynników, które mogą prowadzić do długowieczności.



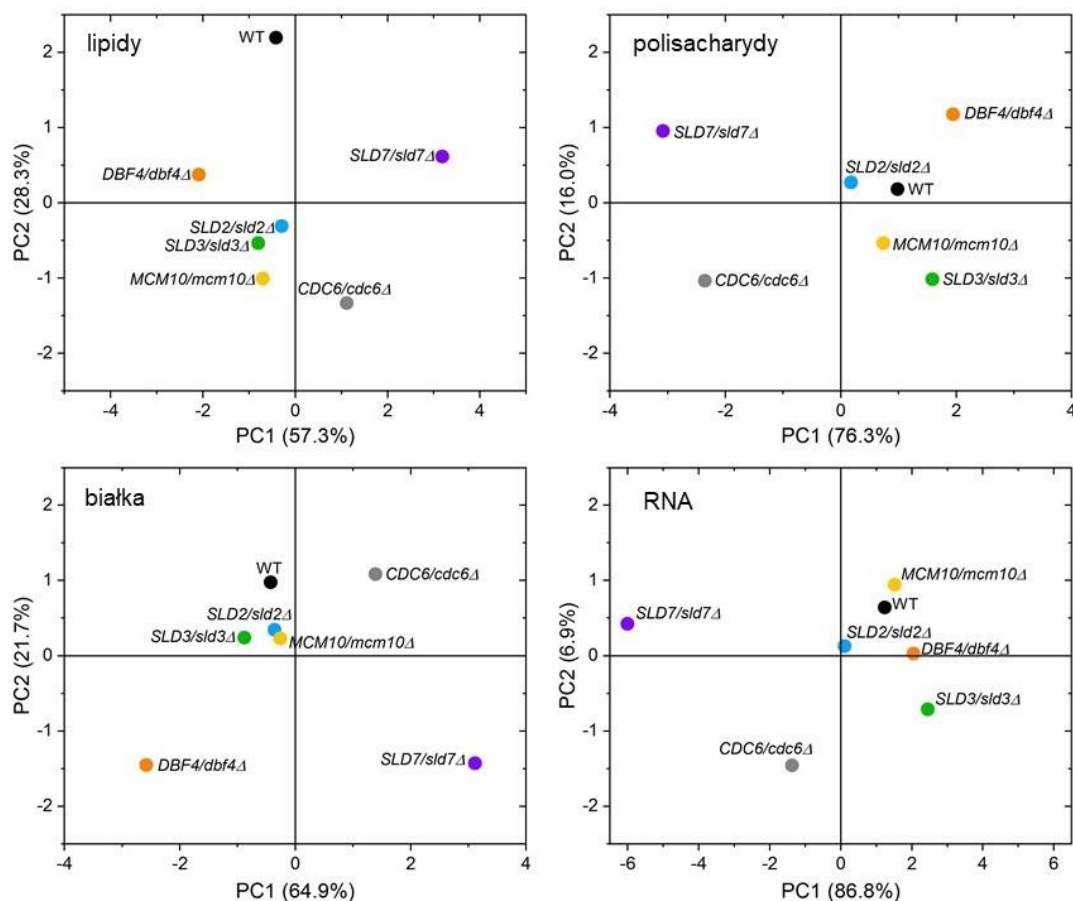
Ryc. 31. Hierarchiczna analiza skupień (HCA) szczepu kontrolnego (BY4743) i szczepów heterozygotycznych *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ* i *ORC6/orc6Δ* uzyskanych ze spektroskopii Ramana różnych widmowych grup funkcyjnych: (A)-polisacharydy; (B)-lipidy; (C)-białka; (D)-RNA; (E)-kwasy nukleinowe.

Dla grupy szczepów związanych z kompleksem *CMG/cmGΔ* i szczepu dzikiego uzyskane z pomiarów widma Ramana poddano analizie głównych składowych (PCA). Wykazano dodatnią korelację pomiędzy zawartością lipidów i RNA oraz silnie ujemną korelację dotyczącą zawartości polisacharydów w badanym materiale (Ryc. 32). W tej analizie wyróżniono sześć szczepów, które wykazują odmienny ogólny skład chemiczny w całej badanej grupie: WT, *CDC45/cdc45Δ*, *MCM2/mcm2Δ*, *MCM4/mcm4Δ*, *MCM6/mcm6Δ* i *PSF1/psf1Δ*. Wykazano wysoką zawartość polisacharydów w szczepach WT, *CDC45/cdc45Δ* oraz *MCM2/mcm2Δ* i niską w szczepach *MCM4/mcm4Δ*, *MCM6/mcm6Δ* i *PSF1/psf1Δ*. Najwyższą zawartością lipidów i RNA charakteryzował się szczep *MCM2/mcm2Δ*, natomiast najmniejszą zawartość wykazały szczepy WT oraz *PSF1/psf1Δ*.



Ryc. 32. Analizy głównych składowych (PCA) heterozygot *CMG/cmgΔ* oraz kontroli (WT) metodą spektroskopii Ramana. PCA przedstawia zależności pomiędzy szczepami drożdży (szczep WT i *CMG/cmgΔ*) a ich składem lipidów, polisacharydów, i RNA.

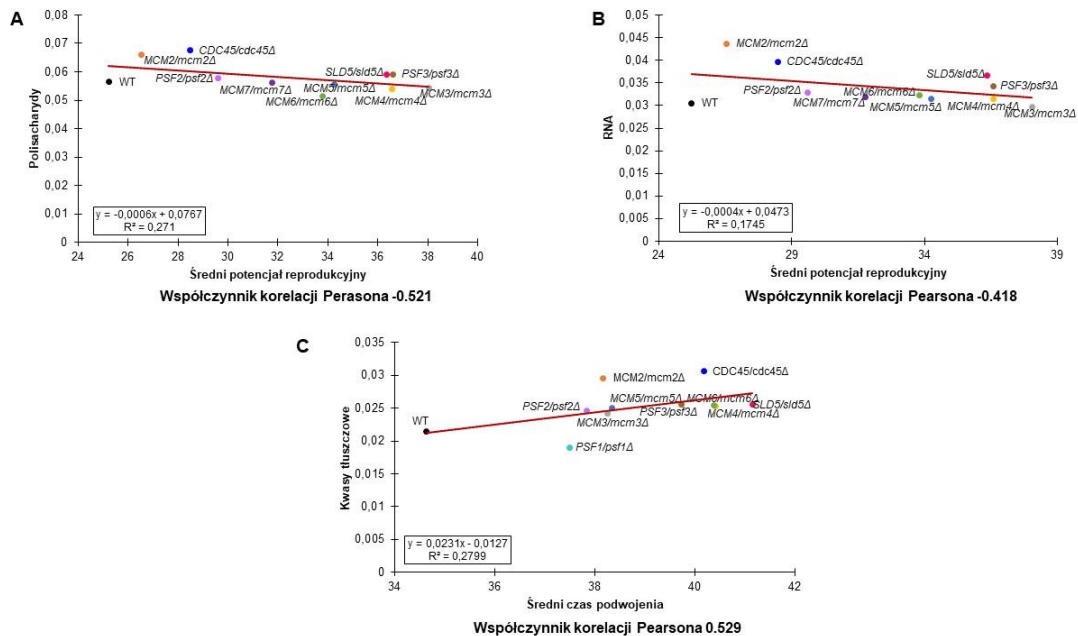
Analizę PCA wykonano także dla grupy szczepów lowPICC. Wykazano różnice pomiędzy analizowanymi szczepami w obrębie badanych grup funkcjonalnych (lipidy, polisacharydy, białka i RNA). Wyniki przedstawiono na Rycinie 33. Dwa heterozygotyczne szczepy drożdży (*SLD7/sld7Δ* i *CDC6/cdc6Δ*) istotnie różniły się składem chemicznym od pozostałych szczepów. W analizie PCA wyróżniono je jako odrębne punkty we wszystkich badanych grupach funkcjonalnych. W przypadku białek trzy szczepy (*SLD7/sld7Δ*, *CDC6/cdc6Δ* i *DBF4/dbf4Δ*) wyróżniały się na tle pozostałych analizowanych heterozygot. Co ciekawe, brak jednej kopii genu *SLD7* w istotny sposób wpływał na metabolizm komórek *SLD7/sld7Δ*, odróżniając je od innych szczepów lowPICC i WT. Wskazały na to zarówno otrzymane widma Ramana (Ryc. 30), jak i analiza PCA (Ryc. 33).



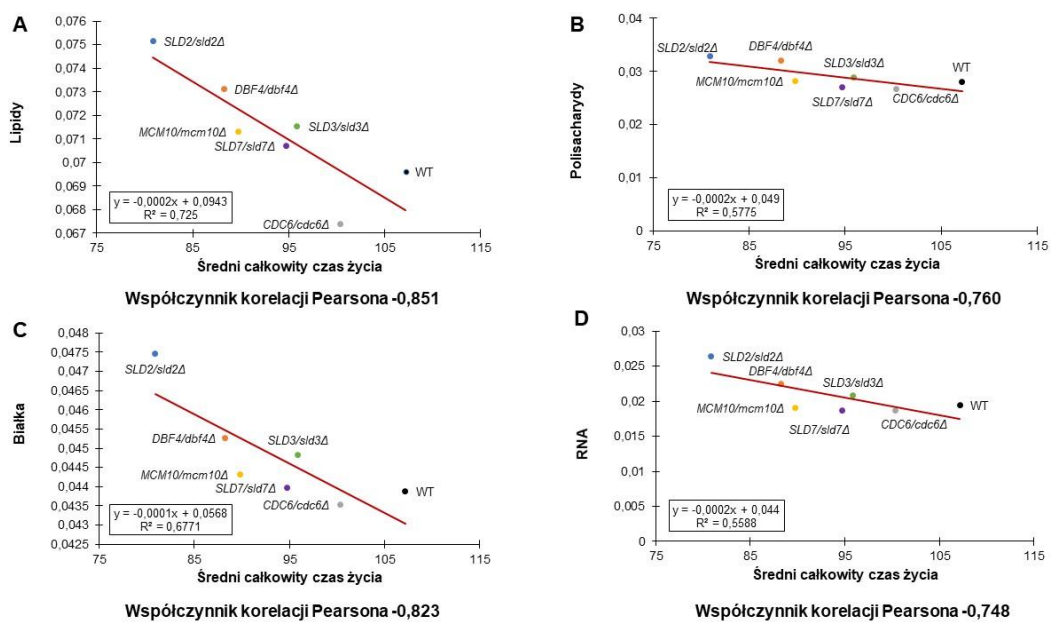
Ryc. 33. Analizy głównych składowych (PCA) heterozygot lowPICC oraz kontroli (WT) metodą spektroskopii Ramana. PCA przedstawia zależności pomiędzy szczepami drożdży (szczep WT i lowPICC) a ich składem lipidów, polisacharydów, białek i RNA

Z poznawczego punktu widzenia interesujące wydają się również korelacje pomiędzy zawartością makrocząsteczek w komórkach, a parametrami starzenia. Dlatego następnie zbadano związek między parametrami starzenia replikacyjnego, a poziomem lipidów, polisacharydów, białek i RNA. Wyniki przedstawiono na Rycinach 34 i 35. Wykazano, że w grupie szczepów *CMG/cmg* Δ istnieje silnie ujemna korelacja pomiędzy poziomami polisacharydów i potencjałem reprodukcyjnym (Ryc. 34A). Zaobserwowano także umiarkowaną, ujemną korelację pomiędzy potencjałem reprodukcyjnym a poziomami RNA (Ryc. 34B). Co więcej, po raz pierwszy odkryto także istotną korelację między podwyższonym poziomem kwasów tłuszczowych, a czasem podwojenia (Ryc. 34C). Odkryto także silnie ujemną korelację pomiędzy zawartością lipidów, białek, RNA i polisacharydów, a długością życia komórek dla szczepów lowPICC (Ryc. 35A, B, C, D). W związku z tym, wydaje się że utrzymanie zawartości tych makrocząsteczek w komórce na stosunkowo niskim poziomie zapewnia utrzymanie tempa starzenia

na poziomie szczepu WT. Z drugiej strony akumulacja tych makrocząsteczek w komórce, lub zwiększona ich synteza prowadzi do przyspieszonego starzenia i śmierci komórki, co zaobserwowano chociażby w heterozygotach *SLD2/sld2Δ* i *DBF4/dbf4Δ*.



Ryc. 34. Zależność pomiędzy potencjałem reprodukcyjnym, a poziomem polisacharydów (A), potencjałem reprodukcyjnym, a poziomem RNA (B) oraz czasem podwojenia i poziomem kwasów tłuszczowych (C) szczepów WT i izogenicznych szczepów *CMG/cmGΔ*.



Ryc. 35. Zależność pomiędzy całkowitą długością życia, a zawartością lipidów (A), polisacharydów (B), białek (C) i RNA (D) szczepu WT (BY4743) i izogenicznych heterozygotycznych szczepów lowPICC.

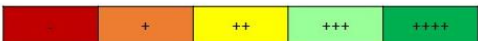
Jako ostatni etap charakterystyki fenotypowej każdego ze szczepów, sprawdzono wrażliwość analizowanych heterozygot na wybrane stresory, wykorzystując technikę testów kropelkowych. Zestawione wyniki dla wszystkich analizowanych kompleksów przedstawiono na Rycinach 36, 37 oraz 38. Co ciekawe, wszystkie analizowane mutanty okazały się być mniej wrażliwe na działanie Calcofluor white i/lub Congo red, będących związkami toksycznymi względem ściany komórkowej. W obecności detergentu SDS, wywołującego nie tylko stres ściany komórkowej, lecz także stres oksydacyjny szczepy *ORC6/orc6Δ*, *CDC45/cdc45Δ*, *SLD7/sld7Δ* oraz *SLD2/sld2Δ* okazały się być mniej wrażliwe. Jako jedyny w tej próbie, wrażliwy okazał się szczep *DBF4/dbf4Δ*. Wykazano ponadto, że heterozygoty *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ*, *MCM2/mcm2Δ*, *MCM4/mcm4Δ*, *MCM6/mcm6Δ*, *SLD5/sld5Δ*, *SLD3/sld3Δ* oraz *MCM10/mcm10Δ* są bardziej wrażliwe na stres osmotyczny indukowany obecnością 1M NaCl, z kolei heterozygoty *ORC1/orc1Δ*, *CDC45/cdc45Δ* i *MCM7/mcm7Δ*, *CDC6/cdc6Δ*, *DBF4/dbf4Δ* oraz *SLD7/sld7Δ* okazały się być mniej wrażliwe wobec działania 1M NaCl, w porównaniu ze szczepem kontrolnym. Odkryto również, że szczep *MCM2/mcm2Δ* był wrażliwy na szok cieplny i induktory stresu genotoksycznego, takie jak zeocyna i kamptotecyna. W związku z tym, nasze badania wskazują jednoznacznie, że obniżenie poziomu białek zaangażowanych w inicjację replikacji DNA ma szeroki wpływ na reakcje odpowiedzi komórki na stres środowiskowy.

	Kontrola	Calcofluor white 10 µg/mL	Calcofluor white 50 µg/mL	Congo red 50 µg/mL	Congo red 100 µg/mL	Congo red 150 µg/mL	NaCl 500 mM	NaCl 1 M	SDS 0.03%
WT	++++	++++	+	++++	++++	++	++++	+++	+++
<i>ORC1/orc1Δ</i>	++++	++++	+++	++++	++++	+++	++++	++++	+++
<i>ORC2/orc2Δ</i>	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++	+++
<i>ORC3/orc3Δ</i>	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++	+++
<i>ORC4/orc4Δ</i>	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++	+++
<i>ORC5/orc5Δ</i>	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++	+++
<i>ORC6/orc6Δ</i>	++++	++++	++	++++	+++	+++	++++	+++	++++



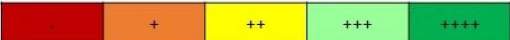
Ryc. 36. Mapa ciepła przedstawiająca fenotyp wzrostu heterozygotycznych szczepów drożdży *ORC/orcΔ* narażonych na różne stresory.

	Kontrola	Calcofluor white 50 µg/mL	Calcofluor white 100 µg/mL	Congo red 150 µg/mL	NaCl 1 M	SDS 0.03%	Szok cieplny (46°C 20min)	Kamptotecyna 10 µg/mL	Zeocyna 2,5 µg/mL
WT	++++	+	-	++	+++	+++	++++	++++	++++
<i>CDC45/cdc45Δ</i>	++++	++++	+++	++	++++	++++	++++	++++	++++
<i>MCM2/mcm2Δ</i>	++++	++++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++
<i>MCM3/mcm3Δ</i>	++++	++	+	+++	+++	+++	++++	++++	++++
<i>MCM4/mcm4Δ</i>	++++	++++	+++	+++	+	+++	++++	++++	++++
<i>MCM5/mcm5Δ</i>	++++	++	+	+++	+++	+++	+++	++++	++++
<i>MCM6/mcm6Δ</i>	++++	++++	+++	+++	++	+++	++++	++++	++++
<i>MCM7/mcm7Δ</i>	++++	++	+	++	++++	+++	++++	++++	++++
<i>PSF1/psf1Δ</i>	++++	++++	+	+++	+++	+++	++++	++++	++++
<i>PSF2/psf2Δ</i>	++++	++++	++	+++	+++	+++	++++	++++	++++
<i>PSF3/psf3Δ</i>	++++	++++	+	+++	+++	+++	++++	++++	++++
<i>SLD5/sld5Δ</i>	++++	++++	+++	++++	++	+++	++++	++++	++++

brak wzrostu  pełny wzrost

Ryc. 37. Mapa cieplna przedstawiająca fenotyp wzrostu heterozygotycznych szczepów drożdży *CMG/cmgΔ* narażonych na różne stresory.

	Kontrola	Calcofluor white 50 µg/mL	Calcofluor white 100 µg/mL	Congo red 50 µg/mL	Congo red 100 µg/mL	Congo red 150 µg/mL	NaCl 500 mM	NaCl 1 M	SDS 0.03%
WT	++++	+	-	++++	++++	++	++++	+++	+++
<i>CDC6/cdc6Δ</i>	++++	+++	+	++++	+++	+++	++++	++++	+++
<i>DBF4/dbf4Δ</i>	++++	++++	++	+++	++	++	++++	++++	++
<i>SLD3/sld3Δ</i>	++++	++++	++	++++	++++	+++	++++	++	+++
<i>SLD7/sld7Δ</i>	++++	++++	++	++++	++++	+++	++++	++++	++++
<i>SLD2/sld2Δ</i>	++++	++++	++	++++	++++	+++	++++	+++	++++
<i>MCM10/mcm10Δ</i>	++++	++	+	++++	++++	++++	++++	++	+++

brak wzrostu  pełny wzrost

Ryc. 38. Mapa cieplna przedstawiająca fenotyp wzrostu heterozygotycznych szczepów drożdży *lowPICC* narażonych na różne stresory.

8. Dyskusja

Molekularne podstawy inicjacji replikacji u eukariontów są dość dobrze poznane i rzetelnie opisane. Jednakże dotychczas nie ma danych na temat wpływu obniżenia poziomu niezbędnych białek biorących udział w inicjacji replikacji na fizjologię i starzenie się komórki. Dlatego wydaje się, że zrozumienie mechanizmów kontrolujących inicjację replikacji może być pomocne w przyszłości w terapiach spowalniających proces starzenia się i zapewniających ochronę przed nowotworami. Starzenie jest wieloczynnikowym procesem biologicznym dotyczącym wszystkich organizmów żywych. W trakcie starzenia wraz z upływem czasu dochodzi do upośledzenia funkcji komórek i tkanek, a w rezultacie do śmierci [López-Otín i in. 2013]. Z kolei starzenie komórkowe (tzw. senescencja) jest związane z zatrzymaniem cyklu komórkowego, które można indukować w komórkach w odpowiedzi na różne czynniki wewnętrzne i zewnętrzne, a także sygnały rozwojowe [Garcia-Prat i in. 2016]. Podczas starzenia wywołanego onkogenem aktywacja onkogenu powoduje hiperproliferaację, która z kolei indukuje starzenie się komórek. Sygnały mitotyczne zwiększają wykorzystanie miejsc startu replikacji, co powoduje zatrzymanie replikacji i akumulację uszkodzeń DNA, ostatecznie aktywując ścieżki odpowiedzi na uszkodzenie DNA [Bartkova i in. 2006; Gorgoulis i Halazonetis 2010].

U eukariontów replikacja chromosomów rozpoczyna się w wielu miejscach startu replikacji (*ori*), które są aktywowane w różnych punktach czasowych fazy S i kończy się, gdy podążające w przeciwnych kierunkach widełki replikacyjne spotykają się [Hyrien i Goldar 2010]. Choć wiadomo, że pewne miejsca *ori* aktywowane są wcześniej, a inne później, to zasady regulujące licencjonowanie i uruchamianie konkretnych miejsc *ori* wciąż nie są dokładnie poznane. Warto zauważyć, że lokalizacja miejsca startu replikacji na chromosomie, aktywna transkrypcja lub wystąpienie uszkodzenia DNA mogą mieć wpływ na jego wykorzystanie podczas replikacji [Zappulla i in. 2002; Early i in. 2004; Legouras i in. 2006; Eshaghi i in. 2007;]. Kompleks ORC (*origin recognition complex*), którego zadaniem jest rozpoznanie miejsca inicjacji replikacji, oraz czynniki licencyjne, takie jak Cdc6 i Cdt1, wspólnie promują ładowanie kompleksu helikazy MCM [Sugimoto i Fujita 2017; Bleichert 2019]. Wiązanie ORC z określonymi miejscami DNA jest zależne od ATP. W kompleksie ORC białka Orc1-5 zawierają domenę AAA+ (ATPazy związane z różnorodnymi aktywnościami komórkowymi) i są niezbędne do wiązania się z DNA. Co ciekawe, tylko Orc1, Orc2, Orc4 i Orc5 mają bezpośredni kontakt z DNA [Lee i Bell

1997; Clarey i in. 2006], natomiast Orc3 jest łącznikiem podjednostek mających kontakt z DNA, co stabilizuje cały kompleks. Z kolei podjednostka Orc6 nie zawiera domeny AAA+ i nie wiąże się z DNA, lecz rekrutuje białko Cdt1 i rdzeń helikazy replikacyjnej – kompleks Mcm2-Mcm7 (Mcm2-7) [Asano i in. 2007; Takara i Bell 2011]. Podczas fazy S aktywowane kinazy zależne od cyklin (CDK) i kinazy zależne od Dbf4 (DDK) wyzwalają inicjację replikacji DNA. Fosforylacja MCM przez CDK (*cyclin dependent kinase*) i Dbf4 jest konieczna do uruchomienia miejsca startu replikacji. Z kolei ORC oraz Cdc6 i Cdt1 są regulowane w dół przez fosforylację, aby zapobiec rekrutacji MCM [Hills i Diffley 2014]. Kompleks MCM, składający się z sześciu homologicznych białek Mcm2-7, tworzy pierścień helikazy. Kompleks ten jednak by mógł być aktywny wymaga dołączenia pięciu czynników pomocniczych, a mianowicie Cdc45 i czterobiałkowego kompleksu GINS, co ostatecznie prowadzi do powstania 11-podjednostkowego kompleksu CMG (Cdc45, MCM, GINS) [Ilves i in. 2010]. Istotna rola kompleksu GINS w utrzymaniu wierności replikacji u drożdży pączkujących została udowodniona. Zaburzenia w działaniu kompleksu GINS prowadzą do wzrostu częstości mutacji spontanicznych i niestabilności sekwencji powtarzalnych [Grabowska i in. 2014; Jędrychowska i in. 2019]. Kompleks GINS odgrywa kluczową rolę w inicjacji replikacji DNA, gdyż jest częścią przejściowych kompleksów białkowych, które łączą się podczas wczesnych etapów replikacji, poprzedzających utworzenie aktywnego kompleksu helikazy CMG [MacNeill 2010].

Wykazano, że szczepy z niskim poziomem Orc1-5 mają znacznie wydłużony czas podwojenia. Ten spowolniony wzrost odpowiada opóźnieniu cyklu komórkowego w przejściu pomiędzy fazami G1/S, jednak bez istotnego wpływu na aktywność metaboliczną mierzoną z wykorzystaniem barwika fluorescencyjnego FUN-1. Co ciekawe, w przypadku heterozygoty *ORC6/orc6Δ* pomimo zaburzeń cyklu komórkowego, nie zaobserwowano zmian w kinetyce wzrostu. Ponadto wykazano, że komórki heterozygotyczne zmniejszyły ilość mRNA *ORC1-6* w porównaniu z kontrolą, w tym mRNA *ORC6*. Sugeruje to, że raczej obecność domeny AAA+, a nie zaburzenia cyklu komórkowego, mogą odgrywać nadrzędną rolę w obserwowanym fenotypie, przynajmniej w przypadku komórek drożdży kompleksu ORC. Białka kompleksu ORC wiążą się bezpośrednio z DNA w miejscu rozpoczęcia replikacji w trakcie całego cyklu komórkowego i dlatego odgrywają kluczową rolę podczas replikacji DNA eukariotycznego [Matsuda i in. 2007]. Stanowi to również podstawę do złożenia kompleksu przedreplikacyjnego w fazie G1. Analiza cyklu komórkowego

wykazała, że wszystkie heterozygotyczne szczepy *ORC/orcΔ* miały wydłużoną fazę G1 cyklu komórkowego w porównaniu ze szczepem referencyjnym. Wydłużony czas podwojenia oraz zaburzenia cyklu komórkowego zaobserwowano również dla szczepów *CMG/cmɡΔ*. Wcześniejsze badania wykazały, że odpowiedź na punkt kontrolny fazy S może spowolnić lub zatrzymać progresję widełek replikacyjnych, jednocześnie stabilizując zwiążanie kompleksu MCM z widełkami replikacyjnymi podczas reparacji DNA po uszkodzeniu [Kamimura i in. 2001]. W przeprowadzonych eksperymentach zaobserwowano, że komórki drożdży o obniżonej ekspresji genów kodujących podjednostki helikazy CMG wykazały niewielkie opóźnienie przejścia pomiędzy fazami G1/S, z kolei heterozygoty *MCM7/mcm7Δ* i *MCM3/mcm3Δ* charakteryzowały się zwiększoną populacją komórek w fazie G2. Komórki zestawu szczepów lowPICC także charakteryzowały się wydłużonym czasem podwojenia oraz zaburzeniami w cyklu komórkowym. W przypadku analizowanego zbioru szczepów lowPICC zmiany czasu podwojenia wiążą się z niewielkimi zaburzeniami cyklu komórkowego. Należy jednak podkreślić, że w większości z nich było to związane ze zmianami fazy G1 i S cyklu komórkowego. Różnice w czasach podwojenia i zaburzenia cyklu komórkowego analizowanych szczepów heterozygotycznych zaangażowanych w inicjację replikacji mogą wynikać ze zmienionego wzorca stosowanych miejsc startu replikacji. Poprzednie badania wykazały, że niektóre czynniki biorące udział w inicjacji replikacji DNA u drożdży są również odpowiedzialne za regulację zarówno wybranych miejsc *ori*, jak i czasu ich aktywacji w danej rundzie replikacji [Mantiero i in. 2011]. Dlatego uruchamianie miejsca *ori* drożdży jest ważną częścią regulacji cyklu komórkowego i jak wykazano, prawidłowe zaprogramowanie jego uruchamiania zapobiega nieprawidłowej aktywacji punktu kontrolnego i reguluje długość fazy S u drożdży [Mantiero i in. 2011]. Skuteczność aktywacji miejsc startu replikacji wzrosła w całym genomie, gdy białka Sld2 i Dbf4 ulegały nadekspresji jednocześnie z białkami Cdc45 i Sld7 [McGuffee i in. 2013]. Dodatkowo Tanaka i in. odkryli, że nadekspresja tylko Sld3, Sld7 i Cdc45 może przyspieszyć czas aktywacji miejsc *ori*, które zwykle byłyby uruchamiane jako ostatnie [Tanaka i in. 2011]. Zaburzone tempo wzrostu może być również związane z zaburzeniami w obrębie poziomu obciążenia helikazy MCM spowodowane spadkiem poziomu, np. Cdc6 czy ORC, co utrudnia licencjonowanie [Kotsantis i in. 2018]. Odkrycie, że niektóre specyficzne czynniki inicjacji replikacji, np. Sld2, Sld3 i Sld7 ulegają ekspresji na poziomach znacznie niższych niż składniki pre-RC i replisomu, sugeruje, że są one kluczowe dla aktywacji początku replikacji

i pomyślnej inicjacji replikacji [Mantiero i in. 2011]. Wyniki te są poparte obserwacją podobnych efektów dla różnych delecji lub mutantów warunkowych w tych genach. Wydłużenie faz G1 i/lub S zaobserwowano, m.in. w *mcm10ΔC* [Douglas i Diffley 2016], *sld7Δ* [Tanaka i in. 2011], *sld3-5* [Kamimura i in. 2001], *sld2-5td* oraz *sld3-2A* [Tanaka i in. 2007], *cdc6K114A* [Weinreich i in. 1999] oraz w szczepie niosącym TetO7-DBF4 w warunkach odcięcia dla promotora TetO [Yu i in. 2006].

Dodatkowo analiza metodą cytometrii przepływową dostarczyła interesujących danych dotyczących zawartości DNA pomiędzy niektórymi szczepami lowPICC i WT. Widoczne były tu dwie grupy o zawartości DNA niższej niż kontrola WT: szczepy *SLD2/sld2Δ* i *SLD3/sld3Δ* wykazały niewielkie przesunięcia, natomiast heterozygoty *SLD7/sld7Δ* i *MCM10/mcm10Δ* wykazały bardziej znaczące przesunięcie na osi FL2-H w lewo, co sugeruje spadek intensywności fluorescencji barwnika interkalującego do DNA, czyli jodku propidyny. Takie przesunięcie jest zwykle interpretowane jako zmniejszenie zawartości DNA, np. na skutek zwiększonego uszkodzenia DNA, błędnej naprawy DNA prowadzącej do przegrupowania DNA, co skutkuje utratą części lub nawet całych chromosomów. Jednakże można to również przypisać wyższej kondensacji DNA lub akumulacji jednoniciowych regionów DNA, które ograniczają interkalację barwnika fluorescencyjnego do DNA. Innym hipotetycznym źródłem zmiany zawartości DNA może być obniżona liczba mitochondrialnego DNA (mtDNA). Wykonane dodatkowe analizy pomogły zrozumieć możliwe źródła zmian zawartości DNA zaobserwowanych u części testowanych szczepów z grupy lowPICC. Nasze badania wykazały akumulację ognisk białka fuzyjnego Rad52-YFP w szczepie *SLD3/sld3Δ*, co sugeruje częstsze uszkodzenia DNA w tych komórkach i związane z tym większe wymagania dotyczące rekombinacji homologicznej. Białko Rfa1 będące częścią kompleksu białka replikacyjnego A ma zdolność wiązania jednoniciowego DNA. W związku z tym odgrywa istotną rolę w wielu procesach związanych z DNA, takich jak replikacja i naprawa DNA [Barbour i Wuttke 2023]. Ponieważ w tym szczepie (*SLD3/sld3Δ*) nie gromadziły się ogniska Rfa1-YFP, można założyć, że w tych komórkach aktywowany jest szlak naprawy pęknięć dwuniciowych. W szczepach o zwiększonej liczbie pęknięć podwójnej nici (DSB) wzrasta ryzyko utraty części powtarzalnej sekwencji. Jedną z naturalnie występujących sekwencji powtarzalnych w genomie jest region kodujący rRNA, który u drożdży zlokalizowany jest na ramieniu chromosomu XII. W przypadku długich, powtarzalnych sekwencji, takich jak powtórzenia rDNA, utrata ich części może być wykryta nawet w analizie zawartości DNA. Szczepy różnią się liczbą

powtórzeń, a jak pokazują wcześniejsze badania, mniejsza długość rDNA powoduje wydłużenie czasu podwojenia komórki [Lynch i in. 2019]. W naszym badaniu wykazaliśmy, że szczep *SLD3/sld3Δ* ma wydłużony czas generacji, wysoką częstotliwość rekrutacji rekombinazy Rad52 do miejsc uszkodzenia DNA, oraz że zawartość DNA w tym szczepie spadła. Wyniki te są zgodne z danymi przedstawionymi przez Lynch i in. pokazującymi związek zmniejszenia poziomu Sld3 z niestabilnością chromosomu XII. Ci sami autorzy zaobserwowali również podobną korelację związaną ze zmniejszeniem poziomu Sld2 [Lynch i in. 2019]. W naszych badaniach zaobserwowaliśmy wydłużenie czasu podwojenia i wyższy odsetek komórek heterozygoty *SLD2/sld2Δ* z ogniskami Rad52-YFP po traktowaniu zeocyną, jednak w przeciwieństwie do *SLD3/sld3Δ*, liczba spontanicznie tworzących się ognisk Rad52-YFP nie wzrosła w heterozygotie *SLD2/sld2Δ*. Dlatego też związek w tym przypadku nie jest tak oczywisty i wymagałby dalszych badań w celu ujawnienia mechanizmu niestabilności układu rDNA w tym szczepie. Należy jednak wspomnieć, że poprzednie badania wykazały, że szczepy drożdży zawierające allele o obniżonej funkcji genów *SLD2* i *MCM10*, *SLD3*, *DBF4* i *CDC6* wykazywały fenotypy niestabilności chromosomowej (*chromosome instability phenotypes* - CIN) [Stirling i in. 2011]. Wykazano również zwiększoną częstotliwość dużych rearanżacji chromosomalnych (GRC) dla pierwszych czterech szczepów, a zwiększoną wierność transmisji chromosomów (CTF) wykazano dla *cdc6-1*. Ponadto do szczepów o silnym fenotypie CIN zakwalifikowano szczep o obniżonym poziomie *SLD2* oraz mutantą *mcm10-1* [Stirling i in. 2011].

Istotne są także zmiany w mtDNA wykryte w szczepach lowPICC. Dane literaturowe wskazują na związek pomiędzy poziomem mtDNA, a różnymi procesami biologicznymi wpływającymi na stabilność genomu. Na przykład poziom mtDNA wzrasta w szczepach, które aktywowały odpowiedź na uszkodzenie DNA i gromadzą dNTP. Utratę mtDNA korelowano również z aneuploidią [Puddu i in 2019]. Może to wyjaśniać uzyskane przez nas wyniki, takie jak przesunięcia w histogramach zawartości DNA. Szczepy o najniższej zawartości DNA, czyli *SLD7/sld7Δ* oraz *MCM10/mcm10Δ* mają także najniższą zawartość mtDNA. Wyższa zawartość mtDNA maskuje w pewnym stopniu aberracje zawartości komórkowego DNA wynikające, np. z dużej częstotliwości regionów ssDNA w komórkach szczepu *DBF4/dbf4Δ* lub dużej liczby uszkodzeń DNA, które mogą prowadzić do rearanżacji DNA lub utraty DNA w komórkach szczepu *SLD2/sld2Δ*

Co ciekawe, uzyskane wyniki wykazały, że redukcja poziomów ekspresji genów zaangażowanych w inicjację replikacji DNA miała również wpływ na przebieg mejozy i wydajność sporulacji w badanych heterozygotycznych szczepach. Odkrycie to może mieć znaczenie przy ekstrapolacji tych danych w kontekście gametogenezy u wyższych eukariontów. Te analizy były jedynie testami charakteryzującymi szczepy heterozygotyczne, dlatego nie rozszerzaliśmy tego tematu, a jedynie sygnalizujemy fenotyp.

Przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej eksperymenty wykazały znaczny wzrost potencjału reprodukcyjnego dla niemal wszystkich badanych heterozygot, z wyjątkiem *ORC6/orc6Δ* oraz *MCM2/mcm2Δ*. Co więcej, dla szczepów należących do kompleksów *ORC/orcΔ* oraz *CMG/cmγΔ* zwiększenie potencjału reprodukcyjnego nie miało wpływu na średnią długość życia. Sugeruje to potencjalne podobieństwo do komórek ludzkich, gdzie wykryty w fibroblastach obniżony poziom podjednostek MCM może pochodzić ze źródeł innych niż transkrypcja [Suzuki i in. 2019]. Geny kodujące białka biorące udział w inicjacji replikacji są nie tylko niezbędne do wzrostu, ale także wymagają precyzyjnej regulacji w kontekście replikacji i starzenia. Co ciekawe, w przeciwieństwie do wyników uzyskanych dla heterozygotycznych szczepów *ORC/orcΔ* oraz *CMG/cmγΔ*, w przypadku obniżenia poziomów ekspresji czynników regulujących inicjację replikacji DNA (lowPICC), tylko jedna kopia odpowiedniego genu w szczepach lowPICC prowadziła do zmniejszenia całkowitej długości życia wszystkich analizowanych szczepów w porównaniu z WT, w modelu replikacyjnego starzenia. Co więcej, wszystkie badane heterozygoty lowPICC miały również krótszą maksymalną długość życia (około 100 godzin) w porównaniu z WT. Z ewolucyjnego punktu widzenia zdolność populacji komórek do osiągnięcia wydajnej syntezy DNA i szybkiego czasu podwojenia ma kluczowe znaczenie, zapewniając przewagę konkurencyjną w rywalizacji o zasoby środowiskowe. Udowodniono, że gdy ekspresja genów kodujących komponenty białkowe zaangażowane w proces inicjacji replikacji DNA jest zmniejszona, komórki wykazują znaczny wzrost potencjału reprodukcyjnego w porównaniu ze szczepem WT, jednocześnie wydłużając czas podwojenia. Fenotyp ten jest podobny do komórek nowotworowych [Macheret i Halazonetis 2015]. Zaburzenia replikacji DNA coraz częściej uznawane są także za krytyczny czynnik niestabilności genomu podczas rozwoju nowotworów [Hills i Diffley 2014; Macheret i Halazonetis; 2015; Kotsantis i in. 2018]. Ostatnie badania podkreśliły znaczenie białek MCM dla zdrowia i dobrego samopoczucia wyższych eukariontów. Na przykład myszy z niższymi poziomami ekspresji *MCM2*

wykazywały krótszą średnią długość życia ze względu na większą częstość występowania nowotworów, głównie chłoniaków [Pruitt i in. 2007]. Zmniejszoną ekspresję *MCM2* powiązano także ze zwiększonym poziomem indukowanej fosforylacją Ser139 ognisk histonu H2AX w komórkach mięśniowych, który służy jako marker pęknięć dwuniciowego DNA [Yu i in. 2020]. Z drugiej strony istnieją dane wiążące nowotwory ze wzrostem ekspresji genów zaangażowanych w proces inicjacji replikacji DNA. Na przykład zaobserwowano, że poziomy ekspresji *MCM* dodatnio korelują ze złośliwością nowotworu w kilku nowotworach związanych z *MCM*, w tym raku płaskonabłonkowym płuc, raku nerki, raku prostaty, raku piersi, nowotworach przewodu pokarmowego, guzach mózgu i chłoniakach [Yu i in. 2020]. Co więcej, zasugerowano, że poziomy ekspresji *MCM2–MCM7* mogą służyć jako markery prognostyczne przeżycia u pacjentów z różnymi typami nowotworów [Schimmack i in. 2016]. Także w przypadku kompleksu GINS zaobserwowano silną korelację pomiędzy ekspresją *GINS2* (ludzkiego odpowiednika *PSF2* drożdży), a nowotworzeniem. Warto zauważyć, że znaczny wzrost ekspresji *GINS2* odnotowano w różnych typach nowotworów, w tym w raku szyjki macicy [Ouyang i in. 2017], raku piersi [Peng i in. 2016], glejaku [Shen i in. 2019], raku trzustki [Bu i in. 2020] i niedrobnokomórkowym raku płuc [Chi i in. 2020]. Zwiększona ekspresja *GINS2* sprzyja rozwojowi nowotworu poprzez zwiększenie proliferacji komórek nowotworowych i hamowanie apoptozy komórek [Ye i in. 2019; Bu i in. 2020]. Niedawne odkrycia sugerują, że kompleks CMG może być obiecującym celem terapeutycznym w leczeniu raka. Ponadto zidentyfikowano drobnocząsteczkowe inhibitory helikazy CMG, takie jak genisteina, metformina i brewiskapina, jako potencjalne związki przeciwnowotworowe [Majid i in. 2010; Kim i in. 2017; Guan i in. 2017]. Warto jednak podkreślić, że poziomy ekspresji genów zaangażowanych w inicjację replikacji DNA były mierzone w tych przypadkach w komórkach nowotworowych, w związku z czym nie do końca jest jasne, czy kancerogeneza była skutkiem, czy przyczyną tych zmian ekspresji. Pomimo licznych badań aspekt wpływu obniżenia jednej kopii genów (w odniesieniu do genów zaangażowanych w proces inicjacji replikacji DNA) na starzenie i potencjał proliferacyjny komórek nadal pozostaje niejasny. Nasze badania, są nowatorskim podejściem, które rzuca nowe światło na ten problem.

W analizie procesów starzenia dla badanych szczepów heterozygotycznych *ORC/orcΔ*, *CMG/cmGΔ* oraz *lowPICC* skupiono się również na określeniu chronologicznej długości życia (CLS). Pomimo odkrycia wielu szlaków metabolicznych

zaangażowanych w CLS, wciąż niewiele wiadomo na temat wpływu zaburzeń inicjacji replikacji na długość życia komórek drożdży mierzoną w tym modelu starzenia. Teoretycznie zaburzenia inicjacji replikacji nie powinny mieć wpływu na starzenie się komórek drożdży niezdolnych do pączkowania, ponieważ analizę CLS rozpoczyna się od wejścia komórek w fazę stacjonarną. Co ciekawe, zaobserwowano jednak istotne opóźnienie starzenia chronologicznego we wszystkich analizowanych szczepach w porównaniu z WT. W tym miejscu potwierdzono, że oba modele starzenia się, tj. starzenie replikacyjne i starzenie chronologiczne, są uzupełniającymi się metodami, a analizowane czynniki nie zawsze mają podobny wpływ na mechanizm starzenia w obu modelach. Nasze badania są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami. Podobne obserwacje odnotowano z wykorzystaniem innych zestawów szczepów. Dla przykładu, Fabrizio i in. wykazali, że nadekspresja genów *SOD1* i *SOD2*, zaangażowanych w obronę antyoksydacyjną komórki, zmniejsza potencjał reprodukcyjny oraz spowalnia starzenie się chronologiczne [Fabrizio i in. 2004]. Z kolei inne badania wykazały, że wzmożone oddychanie u mutantu *sch9Δ* było wymagane do zwiększenia CLS, ale nie miało wpływu na potencjał reprodukcyjny [Lavoie i Whiteway 2008].

Brak zmian fenotypu starzenia heterozygoty *ORC6/orc6Δ* w modelu starzenia replikacyjnego, a także brak zauważalnego fenotypu szczepu *MCM2/mcm2Δ* dotyczącego potencjału reprodukcyjnego oraz znaczące zmiany w odpowiedzi heterozygot *ORC6/orc6Δ* oraz *MCM2/mcm2Δ* na warunki stresowe podczas CLS, takie jak głód lub zakwaszenie pożywki można wyjaśnić także zjawiskiem haploinsuficjencji. Haploinsuficjencja to dominujący fenotyp wywołany heterozygotyczną mutacją powodującą utratę funkcji. Ostatnie badania wykazały, że ponad połowa z genów drożdży niezbędnych do życia (*essential genes*) wykazywała fenotypy haploinsuficjencji w optymalnych warunkach. Ponadto, około 40% niezbędnych genów, które nie wykazywały wyraźnych fenotypów w optymalnych warunkach wzrostu, wykazywało haploinsuficjencję w warunkach stresowych [Ohnuki i Ohya 2018]. Dlatego należy podkreślić, że fenotypowanie pojedynczych komórek jest skutecznym podejściem, nawet w warunkach heterozygotycznych.

Podczas analizy CLS zaobserwowano w populacji komórki o powiększonych objętościach, a fenotyp ten jest zgodny z wcześniejszymi obserwacjami [Stępień i in. 2020]. Co więcej, analizy metodą cytometrii przepływowej potwierdziły obserwacje mikroskopowe i wykazały, że podczas CLS populacja komórek wraz z wiekiem

powiększa swoje rozmiary, niezależnie od szczepu. Analiza zawartości DNA w komórkach wykazała zmiany ploidalności podczas starzenia chronologicznego, wykazując wyraźnie przesunięcie ploidalności w kierunku haploidalności. CLS można postrzegać jako odpowiedź komórek na warunki stresowe, obejmujące przede wszystkim głód i zakwaszenie środowiska. W komórkach drożdży haploidyżacja może być indukowana przez różne czynniki, w tym delecje pojedynczych genów obejmujących ważne czynniki stabilności genomu, takie jak rekombinaza Rad52 lub czynnik inicjacji replikacji Ctf18 [Song i Petes 2012; Krol i in. 2015], przedłużona hodowla [Gerstein i in. 2008; Song i Petes 2012] lub głód. U ludzi obserwuje się również zmiany ploidalności, szczególnie podczas stresu związanego z uszkodzeniem DNA. Nieprawidłowo naprawione uszkodzenia DNA mogą prowadzić do aneuploidii, co ostatecznie prowadzi do katastrofy mitotycznej podczas późniejszego podziału komórki [Vitale i in. 2011]. Błędna segregacja chromosomów prowadząca do aneuploidii jest często powiązana z nowotworami i prawdopodobnie przyczynia się do utraty genów supresorowych nowotworu i nabywania dodatkowych kopii onkogenów, wspierając w ten sposób karcynogenezę. Badania wykazały, że około 68% guzów litych to guzy aneuploidalne [Duijf i in. 2013]. Warto jednak podkreślić, że częściej obserwuje się utratę chromosomów niż ich przyrost, a mniejsze chromosomy są tracone częściej niż większe [Duijf i in. 2013]. Dodatkowo zasugerowano, że redukcja ploidalności może być wczesnym etapem rozwoju hepatokarcynogenezy z poliploidalnych hepatocytów [Matsumoto i in. 2021]. W związku z tym przesunięcie ploidalności opisane w tej rozprawie wydaje się być zjawiskiem uniwersalnym i powiązaniem z warunkami stresu, późniejszymi uszkodzeniami endogennymi i adaptacją komórek do takich warunków. Wniosek ten potwierdzają wyniki Ravichandran i in., którzy aby zbadać, w jaki sposób komórki drożdży przystosowują się do niestabilności chromosomów w czasie, indukowali wysoki wskaźnik nieprawidłowej segregacji chromosomów [Ravichandran i in. 2018]. Adaptacja do niestabilności chromosomów zachodzi poprzez indywidualne aneuploidie chromosomów, w wyniku czego powstają przystosowane szczepy o złożonych kariotypach, charakteryzujących się specyficznymi kombinacjami korzystnych chromosomów. We współautorskiej pracy Enkhbaatar i in. skupiono się szczegółowo na wyjaśnieniu przyczyny uraty DNA w trakcie starzenia chronologicznego drożdży, pokazując, że to autofagia jest kluczowym czynnikiem determinującym redukcję ploidalności chronologicznie starzejących się komórek drożdży [Enkhbaatar i in. 2023].

Analizy molekularne nie dały jednoznacznej odpowiedzi, dlaczego heterozygota *ORC6/orc6Δ*, pomimo zaburzeń w cyklu komórkowym i niższego poziomu mRNA w komórce, nie wykazała różnic w replikacyjnym starzeniu i tempie wzrostu. By wyjaśnić tę kwestię użyto analiz spektroskopii Ramana dla oceny biochemicznego odcisku palca grupy szczepów *ORC/orcΔ*. Uzyskane wyniki pokazują, że komórki w fazie wykładniczej, a więc porównywalne z tymi w analizie starzenia replikacyjnego, mają podobne widma RNA i lipidów. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze dane sugerujące, że status biochemiczny (odcisk metabolomiczny) komórek może być w pewnym stopniu powiązany z długowiecznością drożdży [Yoshida i in. 2010]. Profile metaboliczne zostały także określone dla szczepów *CMG/cmGΔ* oraz *lowPIC*. Co ciekawe, w przypadku analizowanego kompleksu *CMG/cmGΔ* zidentyfikowano ujemną korelację pomiędzy poziomem polisacharydów oraz RNA, a potencjałem reprodukcyjnym badanych szczepów. Ponadto stwierdzono istotną korelację pomiędzy czasem podwojenia, a poziomem kwasów tłuszczowych. Z kolei dla szczepów *lowPIC* wykazano silną ujemną korelację pomiędzy zawartością lipidów, białek, RNA i polisacharydów, a długością życia komórek. Są to pierwsze dane wskazujące na kluczowe znaczenie zawartości białek, lipidów, polisacharydów i RNA na proces starzenia w aktywnych mitotycznie komórkach drożdży. Wyniki te podkreślają również, że utrzymanie właściwej równowagi makrocząsteczek w komórce jest niezbędne do utrzymania długowieczności. W ramach pracy wykonano również analizy fenotypowe metodą kropelkową. Zaobserwowano ciekawe fenotypy analizowanych szczepów. Wykazano między innymi zwiększoną oporność na inhibitory ściany komórkowej. Wskazuje to, że białka biorące udział w inicjacji replikacji DNA odgrywają również istotną rolę w biogenezie ściany komórkowej i adaptacji komórek drożdży do zmieniających się warunków środowiskowych, w tym stresu.

Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze dane podkreślające znaczenie metabolizmu lipidów i homeostazy w procesie starzenia [Mołoń i Żebrowski 2017]. Lipidy odgrywają także znaczącą rolę w procesie starzenia się komórek drożdży [Beach i in. 2013]. Związek lipidów ze śmiercią komórki jest złożony i jak dotąd słabo poznany. Dlatego wydaje się, że dla zrozumienia biochemicznych podstaw starzenia się drożdży kluczowej roli należy poszukiwać również w metabolizmie i homeostazie lipidów [Petschnigg i in. 2009]. Lipidy pełnią szeroki zakres funkcji biologicznych, od utrzymywania strukturalnie nienaruszonych błon po zapewnianie magazynowania energii i sygnalizacji. Badania z wykorzystaniem drożdży jako modelu

eksperymentalnego ujawniły różne aspekty lipotoksyczności, w tym toksyczność wolnych kwasów tłuszczowych, śmierć komórek modulowaną przez sfingolipidy, a także udział peroksydacji lipidów w mitochondrialnych szlakach apoptozy [Eisenberg i Büttner 2014]. Ostatnie badania wykazały, że regulacja określonych grup lipidów odgrywa ważną rolę w procesie starzenia się człowieka. Wykazano również, że starzejące się komórki gromadzą więcej kropeł lipidów niż komórki proliferujące. Dlatego w starzejących się komórkach rozregulowana akumulacja lipidów może być wynikiem zwiększonego wychwytu lipidów, wzrostu szlaków biosyntezy lipidów lub deregulacji szlaków rozkładu lipidów [Flor i in. 2017; Chee i in. 2021].

Podsumowując, niniejsza rozprawa doktorska jednoznacznie wskazuje, że zmniejszenie liczby kopii genów kodujących białka biorące udział w regulacji i/lub inicjacji replikacji DNA ma wpływ na starzenie aktywnych mitotycznie i post-mitotycznych komórek drożdży. Niemal wszystkie analizowane szczepy wykazują znacząco wyższy potencjał reprodukcyjny, co można wiązać z zaburzeniami cyklu komórkowego i wydłużeniem czasu podwojenia. Wykazano także korelacje pomiędzy zawartością makrocząsteczek komórkowych takich jak RNA, białka, lipidy i polisacharydy, a procesem starzenia. Uzyskane dane pokazują, że zaburzenia w inicjacji genomowego DNA wpływają nie tylko na cykl komórkowy, czy czas podwojenia komórki, ale także na cały profil biochemiczny komórki.

9. Wnioski

- Zaburzenia inicjacji replikacji DNA na poziomie kompleksów ORC, CMG oraz białek lowPICC prowadzą do wzrostu potencjału reprodukcyjnego komórek, z wyjątkiem szczepów *ORC6/orc6Δ* oraz *MCM2/mcm2Δ*.
- Zaburzenia inicjacji replikacji DNA prowadzą do wydłużenia czasu podwojenia oraz zaburzeń cyklu komórkowego u badanych heterozygot.
- Zaburzenia inicjacji replikacji DNA na poziomie kompleksów ORC i CMG nie mają wpływu na całkowitą długość życia komórek w modelu replikacyjnego starzenia, natomiast zaburzenia inicjacji replikacji DNA na poziomie białek lowPICC prowadzą do skrócenia całkowitego czasu życia aktywnych mitotycznie komórek.
- Zaburzenia inicjacji replikacji DNA na poziomie kompleksów ORC, CMG oraz białek regulujących lowPICC prowadzą do opóźnienia starzenia chronologicznego.
- Delecji jednej kopii genu prowadzi do obniżenia poziomu transkryptów tego genu w badanych heterozygotycznych mutantach *S. cerevisiae*.
- Zaburzenia inicjacji replikacji DNA na poziomie kompleksów ORC, CMG oraz białek regulujących lowPICC determinują skład chemiczny komórki w zakresie polisacharydów, białek, lipidów oraz kwasów nukleinowych.
- Podczas starzenia chronologicznego dochodzi do haploidyzacji komórek drożdży *S. cerevisiae* niezależnie od szczepu.

10. Literatura

1. Antoniuk-Majchrzak J., Enkhbaatar T., Długajczyk A., Kaminska J., Skoneczny M., Klionsky D.J., Skoneczna A. Stability of Rad51 recombinase and persistence of Rad51 DNA repair foci depends on post-translational modifiers, ubiquitin and SUMO. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2023, v. 1870.
2. Aparicio T, Guillou E, Coloma J, Montoya G, Mendez J 2009. The human GINS complex associates with Cdc45 and MCM and is essential for DNA replication. *Nucleic Acids Res* 37: 2087–2095.
3. Asano T., Makise M., Takehara M., Mizushima T. Interaction between ORC and Cdt1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Yeast Res.* 2007;7:1256–1262.
4. Barbour A. T., Wuttke D.S., 2023, RPA-like single-stranded DNA-binding protein complexes including CST serve as specialized processivity factors for polymerases: *Current Opinion in Structural Biology*, v. 81.
5. Bartkova J., Rezaei N., Lontos M., Karakaidos P., Kletsas D., Issaeva N., Vassiliou L.V.F., Kolettas E., Niforou K., Zoumpourlis V.C., et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006;444:633–637.
6. Beach A., Richard V.R., Leonov A., Burstein M.T., Bourque S.D., Koupaki O., Juneau M., Feldman R., Iouk T., Titorenko V.I. Mitochondrial membrane lipidome defines yeast longevity. *Aging-U.S.*, 2013, v. 5, p. 551-574.
7. Bell S.P. The origin recognition complex: From simple origins to complex functions. *Genes Dev.* 2002;16:659–672.
8. Bell S.P., Mitchell J., Leber J., Kobayashi R., Stillman B. The multidomain structure of *orc1p* reveals similarity to regulators of dna-replication and transcriptional silencing. *Cell*. 1995;83:563–568.
9. Bell S.P., Stillman B. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of dna-replication by a multiprotein complex. *Nature*. 1992;357:128–134.
10. Berg S., Kutra D., Kroeger T., Straehle C.N., Kausler B.X., Haubold C., Schiegg M., Ales J., Beier T., Rudy M., Eren K., Cervantes J.I., Xu B.T., Beuttenmueller F., Wolny A., Zhang C., Koethe U., Hamprecht F.A., Kreshuk A. *ilastik*: interactive machine learning for (bio) image analysis. *Nature Methods*, 2019, v. 16, p. 1226-1232.
11. Bleichert F. Mechanisms of replication origin licensing: A structural perspective. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2019;59:195–204.

12. Borkiewicz L., Molon M., Molestak E., Grela P., Horbowicz-Drozdal P., Wawiora L., Tchorzewski M. Functional Analysis of the Ribosomal uL6 Protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cells*. 2019;8:718.
13. Bruck I., Kaplan D.L. The Dbf4-Cdc7 Kinase Promotes Mcm2-7 Ring Opening to Allow for Single-stranded DNA Extrusion and Helicase Assembly. *J Biol Chem*. 2015 Jan 9; 290(2): 1210–1221.
14. Bu F., Zhu X., Yi X., Luo C., Lin K., Zhu J., Hu C., Liu Z., Zhao J., Huang C., Zhang W., Huang J. Expression Profile of GINS Complex Predicts the Prognosis of Pancreatic Cancer Patients. *Onco Targets Ther*. 2020; 13: 11433–11444.
15. Chan J.W., Winhold H., Corzett M.H., Ulloa J.M., Cosman M., Balhorn R., Huser T. Monitoring dynamic protein expression in living E-coli. Bacterial cells by laser tweezers Raman spectroscopy. *Cytometry Part A*, 71A (7) (2007), pp. 468-474.
16. Chee W.Y., Kurahashi Y., Kim J., Miura K., Okuzaki D., Ishitani T., Kajiwara K., Nada S., Okano H., Okada M. β -catenin-promoted cholesterol metabolism protects against cellular senescence in naked mole-rat cells. *Communications Biology*, 2021, v. 4.
17. Chen Y., Jessica Kenworthy J., Gabrielse C., Hänni C., Philip Zegerman P., Michael Weinreich M. DNA Replication Checkpoint Signaling Depends on a Rad53–Dbf4 N-Terminal Interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2013 Jun; 194(2): 389–401.
18. Chesnokov I.N. Multiple functions of the origin recognition complex. *Int. Rev. Cytol*. 2007;256:69–109.
19. Chi F., Wang Z., Li Y., Chang N. Knockdown of GINS2 inhibits proliferation and promotes apoptosis through the p53/GADD45A pathway in non-small-cell lung cancer. *Biosci Rep*. 2020 Apr 30;40(4):BSR20193949.
20. Clarey M.G., Erzberger J.P., Grob P., Leschziner A.E., Berger J.M., Nogales E., Botchan M. Nucleotide-dependent conformational changes in the DnaA-like core of the origin recognition complex. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2006;13:684–690.
21. Czachor J., Milek M., Galiniak S., Stepień K., Dzugan M., Molon M. Coffee Extends Yeast Chronological Lifespan through Antioxidant Properties. *Int. J. Mol. Sci*. 2020;21:9510.
22. de Cabo R., Didac Carmona-Gutierrez D., Michel Bernier M., Michael N. Hall M. N., Madeo F. The search for anti-aging interventions: From elixirs to fasting regimens. *Cell*. 2014 Jun 19; 157(7): 1515–1526.

23. De Gelder J., De Gussem k., Vandenabeele P., Moens L. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *J. Raman Spectrosc.*, 38 (9) (2007), pp. 1133-1147.
24. Delaney J.R., Murakami C., Chou A., Carr D., Schleit J., Sutphin G.L., An E.H., Castanza A.S., Fletcher M., Goswami S., et al. Dietary restriction and mitochondrial function link replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Gerontol.* 2013;48:1006–1013.
25. Dhar S.K., Dutta A. Identification and characterization of the human ORC6 homolog. *J. Biol. Chem.* 2000;275:34983–34988.
26. Dhingra N., Bruck I., Smith S., Ning B., Kaplan D.L. Dpb11 protein helps control assembly of the Cdc45·Mcm2-7·GINS replication fork helicase. *J Biol Chem.* 2015 Mar 20;290(12):7586-601.
27. Diffley J.F.X. Quality control in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* 2011;366:3545–3553.
28. Diffley, J., Cocker, J., Dowell, SJ, Rowley, A Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo. *Cell* 1994;78:303–316.
29. Douglas M. E., Diffley F. X. Recruitment of Mcm10 to Sites of Replication Initiation Requires Direct Binding to the Minichromosome Maintenance (MCM) Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, v. 291, p. 5879-5888.
30. Douglas M.E., Ali F.A., Costa A., Diffley J.F.X. The mechanism of eukaryotic CMG helicase activation. *Nature.* 2018;555:265–268.
31. Duijf P. H. G., Schultz N., Benezra R. Cancer cells preferentially lose small chromosomes. *Int. J. Cancer*, 132 (10) (2013), pp. 2316-2326.
32. Early A., Drury L.S., Diffley F.X. Mechanisms involved in regulating DNA replication origins during the cell cycle and in response to DNA damage. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2004, v. 359, p. 31-38.
33. Eisenberg T., Büttner S. Lipids and cell death in yeast. *Fems Yeast Research*, 2014, v. 14, p. 179-197.
34. Enkhbaatar T., Skoneczny M., KStępień K., Mołoń M., Skoneczna A. Live while the DNA lasts. The role of autophagy in DNA loss and survival of diploid yeast cells during chronological aging. *Aging (Albany NY)* 2023 Oct 9;15(19):9965-9983.
35. Eshaghi M., Karuturi R.K.M., Li J.T., Chu Z.Q., Liu E.T., Liu J.H. Global Profiling of DNA Replication Timing and Efficiency Reveals that Efficient

- Replication/Firing Occurs Late during S-Phase in *S. pombe* Plos One, 2007, v. 2.
36. Evrin C., Clarke P., Zech J., Lurz R., Sun J., Uhle S., Li H., Stillman B., Speck C. A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009;106:20240–20245.
 37. Fabrizio P., Longo V.D., The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*, Aging Cell, 2, (2003), 73-81.
 38. Fabrizio P., Pletcher S.D., Minois N., Vaupel J.W., Longo V.D. Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 2004;557:136–142.
 39. Flor A.C., Wolfgeher D., Wu D., Kron S.J. A signature of enhanced lipid metabolism, lipid peroxidation and aldehyde stress in therapy-induced senescence. Cell Death Discovery, 2017, v. 3.
 40. Garcia-Prat L., Martinez-Vicente M., Perdiguero E., Ortet L., Rodriguez-Ubreva J., Rebollo E., Ruiz-Bonilla V., Gutarra S., Ballestar E., Serrano A.L., et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. Nature. 2016;529:37–42.
 41. Gerstein A.C., R.M. McBride R.M., Otto S.P. Ploidy reduction in *Saccharomyces cerevisiae*. Biol. Lett., 4 (1) (2008), pp. 91-94.
 42. Gorgoulis V. G., Halazonetis T. D. Oncogene-induced senescence: The bright and dark side of the response. Curr. Opin. Cell Biol. 2010;22:816–827.
 43. Gossen M., Pak D.T.S., Hansen S.K., Acharya J.K., Botchan M.R. A *Drosophila* homolog of the yeast origin recognition complex. Science. 1995;270:1674–1677.
 44. Grabowska E., Wrońska U., Denkiewicz M., Jaszczur M., Respondek A., Alabrudzińska M., Suski C., Makiela-Dzbenka K., Jończyk P., Fijałkowska I.J. Proper functioning of the GINS complex is important for the fidelity of DNA replication in yeast. Mol. Microbiol., 92 (4) (2014), pp. 659-680.
 45. Guan Y. B., Yang D. R., Nong S. J., Ni J., Hu C. H., Li J., Zhu J., Shan Y. X. Breviscapine (BVP) inhibits prostate cancer progression through damaging DNA by minichromosome maintenance protein-7 (MCM-7) modulation. Biomed Pharmacother. 2017 Sep;93:103-116.
 46. Harman D. The aging proces. Proc. Nati Acad. Sci. USA Vol. 78, 1981, No. 11:7124-7128.

47. Heller R. C., Kang S., Lam W.M., Chen S., Chan C.S., Bell S.P., 2011, Eukaryotic Origin-Dependent DNA Replication In Vitro Reveals Sequential Action of DDK and S-CDK Kinases: *Cell*, v. 146, p. 80-91.
48. Hills S.A., Diffley J.F.X. DNA Replication and Oncogene-Induced Replicative Stress. *Curr. Biol.* 2014;24:R435–R444.
49. Hyrien O., Goldar A. Mathematical modelling of eukaryotic DNA replication. *Chromosome Research*, 2010, v. 18, p. 147-161.
50. Ilves I., Petojevic T., Pesavento J. J., Botchan M. R. Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol Cell.* 2010 Jan 29;37(2):247-58.
51. Jędrychowska M., Denkiewicz-Kruk M., Alabrudzińska M., Skoneczna A., Jończyk P., Dmowski M., Fijałkowska I.J. Defects in the GINS complex increase the instability of repetitive sequences via a recombination-dependent mechanism. *PLoS Genet.*, 15 (12) (2019).
52. Kaeberlein M., Hu D., Kerr E.O., Tsuchiya M., Westman E.A., Dang N., Fields S., Kennedy B.K. Increased life span due to calorie restriction in respiratory-deficient yeast. *PLoS Genet.* 2005;1:614–621.
53. Kamimura Y., Tak Y.S., Sugino A., Araki H. Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 20 (8) (2001), pp. 2097-2107.
54. Karathia H., Vilaprinyo E., Sorribas A., Alves R. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16015.
55. Kim S. H., Kim S. C., Ku J. L. Metformin increases chemo-sensitivity via gene downregulation encoding DNA replication proteins in 5-Fu resistant colorectal cancer cells. *Oncotarget.* 2017 May 11;8(34):56546-56557.
56. Klemm R.D., Austin R.J., Bell S.P. Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex. *Cell.* 1997;88:493–502.
57. Kotsantis P., Petermann E., Boulton S.J. Mechanisms of Oncogene-Induced Replication Stress: Jigsaw Falling into Place. *Cancer Discovery*, 2018, v. 8, p. 537-555.
58. Krol K., Antoniuk-Majchrzak J., Skoneczny M., Sienko M., Jendrysek J., Rumieniczuk I., Halas A., Kurlandzka A., Skoneczna A. Lack of G1/S control destabilizes the yeast genome via replication stress-induced DSBs and illegitimate recombination. *J. Cell Sci.* 2018;131:jcs226480.

59. Krol K., Brozda I., Skoneczny M., Bretne M., Skoneczna A. A genomic screen revealing the importance of vesicular trafficking pathways in genome maintenance and protection against genotoxic stress in diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. *PloS One*, 10 (3) (2015).
60. Kunkel T. A., Burgers P. M. Dividing the workload at a eukaryotic replication fork. *Trends Cell Biol* 2008, 18: 521–527.
61. Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tecza R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *Fems Yeast Res.* 2014;14:1068–1079.
62. Kwong M.M.Y., Lee J.W., Samian M.R., Wahab H.A., Watanabe N., Ong E.B.B. Identification of Tropical Plant Extracts That Extend Yeast Chronological Life Span. *Cells.* 2021;10:2718.
63. Lavoie H., Whiteway M. Increased respiration in the *sch9* Delta mutant is required for increasing chronological life span but not replicative life span. *Eukaryot. Cell.* 2008;7:1127–1135.
64. Lee D.G., Bell S.P. Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17:7159–7168.
65. Legland D., Arganda-Carreras I., Andrey P. MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics*, 2016, v. 32, p. 3532-3534.
66. Legouras I., Xouri G., Dimopoulos S., Lygeros J., Lygerou Z. DNA replication in the fission yeast: robustness in the face of uncertainty. *Yeast*, 2006, v. 23, p. 951-962.
67. Lemma T., Wang J., Arstila K., Hytonen V.P., Toppari J.J. Identifying yeasts using surface enhanced Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 218 (2019), pp. 299-307.
68. Longo V.D., Shadel G.S., Kaeberlein M., Kennedy B., Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell Metabolism*, 16, (2012), 18-31.
69. Lõoke M., Maloney M. F., Bell S. P. Mcm10 regulates DNA replication elongation by stimulating the CMG replicative helicase. *Genes Dev.* 2017 Feb 1; 31(3): 291–305.
70. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell.* 2013 Jun 6; 153(6): 1194–1217.
71. Ludovico P., Burhans W. C. Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police. *Fems Yeast Res.* 2014;14:33–39.

72. Lynch K. L., Alvino G.M., Kwan E.X., Brewer B.J., Raghuraman M.K. The effects of manipulating levels of replication initiation factors on origin firing efficiency in yeast. *Plos Genetics*, 2019, v. 15.
73. Macheret, M., Halazonetis T. D., DNA Replication Stress as a Hallmark of Cancer: Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, Vol 10 (2015), v. 10, p. 425-448.
74. MacNeill S.A. Structure and function of the GINS complex, a key component of the eukaryotic replisome. *Biochem. J.*, 425 (2010), pp. 489-500.
75. Majid S., Dar A. A., Saini S., Chen Y., Shahryari V., Liu J., Zaman M.S., Hirata H., Yamamura S., Ueno K., Tanaka Y., Dahiya R. Regulation of minichromosome maintenance gene family by microRNA-1296 and genistein in prostate cancer. *Cancer Res.* 2010 Apr 1;70(7):2809-18.
76. Mantiero D., Mackenzie A., Donaldson A., Zegerman P. Limiting replication initiation factors execute the temporal programme of origin firing in budding yeast. *EMBO J.* 2011 Nov 11;30(23):4805-14.
77. Masumoto H., Sugino A., Araki H. Dpb11 controls the association between DNA polymerases alpha and epsilon and the autonomously replicating sequence region of budding yeast. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20:2809–2817.
78. Matsuda K., Makise M., Sueyasu Y., Takehara M., Asano T., Mizushima T. Yeast two-hybrid analysis of the origin recognition complex of *Saccharomyces cerevisiae*: Interaction between subunits and identification of binding proteins. *Fems Yeast Res.* 2007;7:1263–1269.
79. Matsumoto T., Wakefield L., Peters A., Peto M., Spellman P., Grompe M. Proliferative polyploid cells give rise to tumors via ploidy reduction. *Nat. Commun.*, 12 (1) (2021).
80. McGuffee S. R., Smith D. J., Whitehouse I. Quantitative, genome-wide analysis of eukaryotic replication initiation and termination. *Mol Cell.* 2013 Apr 11;50(1):123-35.
81. Minois N., Frajnt M., Wilson C., Vaupel J.W. Advances in measuring lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 11;102(2):402-6.
82. Miyazawa-Onami M., Araki H., Tanaka S. Pre-initiation complex assembly functions as a molecular switch that splits the Mcm2-7 double hexamer. *EMBO Rep.* 2017;18:1752–1761.

83. Molon M., Molestak E., Kula-Maximenko M., Grela P., Tchorzewski M. Ribosomal Protein uL11 as a Regulator of Metabolic Circuits Related to Aging and Cell Cycle. *Cells*. 2020;9:1745.
84. Molon M., Panek A., Molestak E., Skoneczny M., Tchorzewski M., Wnuk M. Daughters of the budding yeast from old mothers have shorter replicative lifespans but not total lifespans. Are DNA damage and rDNA instability the factors that determine longevity? *Cell Cycle*. 2018;17:1173–1187.
85. Molon M., Szajwaj M., Tchorzewski M., Skoczowski A., Niewiadomska E., Zadrag-Tecza R. The rate of metabolism as a factor determining longevity of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Age*. 2016;38:11.
86. Molon M., Zebrowski J. Phylogenetic relationship and Fourier-transform infrared spectroscopy-derived lipid determinants of lifespan parameters in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *FEMS Yeast Res*. 2017;17:fox031.
87. Mortensen U. H., Lisby M., Rothstein R., Rad52: *Current Biology*, 2009, v. 19, p. R676-R677.
88. Moyer S. E., Lewis P. W., Botchan M. R. Isolation of the Cdc45/Mcm2–7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc Natl Acad Sci* 2006,103: 10236–10241.
89. Muramatsu S., Hirai K., Tak Y. S., Kamimura Y., Araki H., CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol epsilon, and GINS in budding yeast: *Genes & Development*, 2010, v. 24, p. 602-612.
90. O'Donnell M., Langston L., Stillman B. Principles and Concepts of DNA Replication in Bacteria, Archaea, and Eukarya, *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Jul; 5(7): a010108.
91. Ogiwara H., Ui A., Onoda F., Tada S., Enomoto T., Seki M. Dpb11, the budding yeast homolog of TopBP1, functions with the checkpoint clamp in recombination repair. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jul 13;34(11):3389-98.
92. Ohnuki S., Ohya Y. High-dimensional single-cell phenotyping reveals extensive haploinsufficiency. *PLoS Biol*. 2018;16:e2005130.
93. Ouyang F., Liu J., Xia M., Lin C., Wu X., Ye L., Song L., Li J., Wang J., Guo P., He M. GINS2 is a novel prognostic biomarker and promotes tumor progression in early-stage cervical cancer. *Oncol Rep*. 2017 May;37(5):2652-2662.

94. Peng L., Song Z., Chen D., Linghu R., Wang Y., Zhang X., Kou X., Yang J., Jiao S. GINS2 regulates matrix metalloproteinase 9 expression and cancer stem cell property in human triple negative Breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 2016 Dec;84:1568-1574.
95. Petschnigg J., Wolinski H., Kolb D., Zellnig G., Kurat C.F., Natter K., Kohlwein S.D. Good Fat, Essential Cellular Requirements for Triacylglycerol Synthesis to Maintain Membrane Homeostasis in Yeast. *J. Biol. Chem.* 2009;284:30981–30993.
96. Pruitt S.C., Bailey K. J., Freeland A. Reduced Mcm2 expression results in severe stem/progenitor cell deficiency and cancer. *Stem Cells.* 2007 Dec;25(12):3121-32.
97. Puddu F., Herzog M., Selivanova A., Wang S.Y., Zhu J., Klein-Lavi S., Gordon M., Meirman R., Millan-Zambrano G., Ayestaran I., Salguero I., Sharan R., Li R., Kupiec M., Jackson S.P. Genome architecture and stability in the *Saccharomyces cerevisiae* knockout collection. *Nature*, 2019, v. 573, p. 416-+.
98. Randell J.C.W., Bowers J.L., Rodriguez H.K., Bell S.P. Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Mol. Cell.* 2006;21:29–39.
99. Rao H., Stillman B. The origin recognition complex interacts with a bipartite dna-binding site within yeast replicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995;92:2224–2228.
100. Ravichandran M.C., Fink S., Clarke M.N., Hofer F.C., Campbell C.S. Genetic interactions between specific chromosome copy number alterations dictate complex aneuploidy patterns. *Genes Dev.*, 32 (23–24) (2018), pp. 1485-1498.
101. Remus D., Beuron F., Tolun G., Griffith J.D., Morris E.P., Diffley J.F.X. Concerted Loading of Mcm2-7 Double Hexamers Around DNA during DNA Replication Origin Licensing. *Cell.* 2009 Nov 13; 139(4): 719–730.
102. Ricke R. M., Bielinsky A. K. Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase-alpha. *Mol Cell.* 2004 Oct 22;16(2):173-85.
103. Rosch P., Harz M., Schmitt M., Popp J. Raman spectroscopic identification of single yeast cells. *Journal of Raman Spectroscopy*, 36 (5) (2005), pp. 377-379.
104. Schimmack S., Lawrence B., Kenney B., Schmitz-Winnenthal H., Modlin I. M., Kidd M. Minichromosome Maintenance Expression Defines Slow-Growing Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Transl Oncol.* 2016 Oct; 9(5): 411–418.
105. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V.,

- Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 2012, v. 9, p. 676-682.
106. Semple J.W., Da-Silva L.F., Jervis E.J., Ah-Kee J., Al-Attar H., Kummer L., Heikkila J.J., Pasero P., Duncker B.P. An essential role for Orc6 in DNA replication through maintenance of pre-replicative complexes. *Embo J.* 2006;25:5150–5158.
107. Shen Y. L., Li H. Z., Hu Y. W., Zheng L., Wang Q. Loss of GINS2 inhibits cell proliferation and tumorigenesis in human gliomas. *CNS Neurosci Ther.* 2019 Feb; 25(2): 273–287.
108. Sheu Y. J., Kinney J.B., Stillman B., 2016, Concerted activities of Mcm4, Sld3, and Dbf4 in control of origin activation and DNA replication fork progression: *Genome Research*, v. 26, p. 315-330.
109. Sinclair D.A., Guarente L. Extrachromosomal rDNA circles—A cause of aging in yeast. *Cell.* 1997;91:1033–1042.
110. Song W., Petes T.D. Haploidization in *Saccharomyces cerevisiae* induced by a deficiency in homologous recombination. *Genetics*, 191 (1) (2012), pp. 279-284.
111. Speck C., Chen Z.Q., Li H.L., Stillman B. ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005;12:965–971.
112. Steffen K.K., MacKay V.L., Kerr E.O., Tsuchiya M., Hu D., Fox L.A., Dang N., Johnston E.D., Oakes J.A., Tchao B.N., et al. Yeast life span extension by depletion of 60S ribosomal subunits is mediated by Gcn4. *Cell.* 2008;133:292–302.
113. Steinkraus KA., Kaeberlein M., Kennedy BK., Replicative aging in yeast: the means to the end, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24, (2008), 29-54.
114. Stępień K., Enkhbaatar T., Kula-Maximenko M., Jurczyk Ł., Skoneczna A., Mołoń M. Restricting the level of the proteins essential for the regulation of the initiation step of replication extends the chronological lifespan and reproductive potential in budding yeast. *Biogerontology*. 2024b Jun 6.
115. Stępień K., Skoneczna A., Kula-Maximenko M., Jurczyk Ł., Mołoń M. Depletion of the Origin Recognition Complex Subunits Delays Aging in Budding Yeast. *Cells*. 2022 Apr; 11(8): 1252.
116. Stępień K., Skoneczna A., Kula-Maximenko M., Jurczyk Ł., Mołoń M. Disorders in the CMG helicase complex increase the proliferative capacity and delay chronological aging of budding yeast. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2024a Jan;1871(1):119621.

117. Stepien K., Wojdyla D., Nowak K., Molon M. Impact of curcumin on replicative and chronological aging in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Biogerontology*. 2020;21:109–123.
118. Stirling D.R., Swain-Bowden M.J., Lucas A.M., Carpenter A.E., Cimini B.A., Goodman A. CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability. *Bmc Bioinformatics*, 2021, v. 22.
119. Stirling P.C., Bloom M.S., Solanki-Patil T., Smith S., Sipahimalani P., Li Z.J., Kofoed M., Ben-Aroya S., Myung K., Hieter P. The Complete Spectrum of Yeast Chromosome Instability Genes Identifies Candidate CIN Cancer Genes and Functional Roles for ASTRA Complex Components. *Plos Genetics*, 2011, v. 7.
120. Stringer C., Wang T., Michaelos M., Pachitariu M. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nature Methods*, 2021, v. 18, p. 100-+.
121. Sugimoto N., Fujita M. Molecular Mechanism for Chromatin Regulation During MCM Loading in Mammalian Cells. *DNA Replication: Old Princ. New Discov.* 2017;1042:61–78.
122. Suzuki Y., Yamaguchi Y., Hanada H., Ishimi Y. Changes in MCM2-7 proteins at senescence. *Genes Genet. Syst.*, 94 (3) (2019), pp. 123-132.
123. Symeonidou I. E., Taraviras S., Lygerou Z. Control over DNA replication in time and space. *FEBS Lett.* 2012 Aug 31;586(18):2803-12.
124. Takara T.J., Bell S.P. Multiple Cdt1 molecules act at each origin to load replication-competent Mcm2-7 helicases. *Embo J.* 2011;30:4885–4896.
125. Tanaka S., Nakato R., Katou Y., Shirahige K., Araki H. Origin association of Sld3, Sld7, and Cdc45 proteins is a key step for determination of origin-firing timing. *Curr Biol.* 2011 Dec 20;21(24):2055-63.
126. Tanaka S., Umemori T., Hirai K., Muramatsu S., Kamimura Y., Araki H. CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature.* 2007 Jan 18;445(7125):328-32.
127. Ticaú S.,¹ Friedman L.J., Ivica N.A., Gelles J., Bell S.P. Single-molecule Studies of Origin Licensing Reveal Mechanisms Ensuring Bidirectional Helicase Loading. *Cell.* 2015 Apr 23; 161(3): 513–525.
128. Torres-Rosell J., Sunjevaric I., De Piccoli G., Sacher M., Eckert-Boulet N., Reid R., Jentsch S., Rothstein R., Aragon L., Lisby M. The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nat. Cell Biol.* 2007;9:U923–U972.

129. van Deursen F., Sengupta S., De Piccoli G., Sanchez-Diaz A., Labib K. Mcm10 associates with the loaded DNA helicase at replication origins and defines a novel step in its activation. *EMBO J.* 2012 May 2;31(9):2195-206.
130. Vitale I., Galluzzi L., Castedo M., Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12 (6) (2011), pp. 384-391.
131. Watase G., Takisawa H., Kanemaki M.T. Mcm10 plays a role in functioning of the eukaryotic replicative DNA helicase, Cdc45-Mcm-GINS. *Curr Biol.* 2012 Feb 21;22(4):343-9.
132. Weinreich M., Liang C., Stillman B. The Cdc6p nucleotide-binding motif is required for loading Mcm proteins onto chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, v. 96, p. 441-446.
133. Ye Y., Song Y. N., He S. F., Zhuang J. H., Wang G. Y., Xia W. GINS2 promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis in thyroid cancer by regulating CITED2 and LOXL2. *Cancer Gene Ther.*, 26 (3–4) (2019), pp. 103-113.
134. Yoshida R., Tamura T., Takaoka C., Harada K., Kobayashi A., Mukai Y., Fukusaki E. Metabolomics-based systematic prediction of yeast lifespan and its application for semi-rational screening of ageing-related mutants. *Aging Cell.* 2010;9:616–625.
135. Yu S., Wang G., Shi Y., Xu H., Zheng Y., Chen Y. MCMs in Cancer: Prognostic Potential and Mechanisms. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2020; 2020: 3750294.
136. Yu, L., Castillo L.P., Mnaimneh S., Hughes T.R., Brown G.W. A survey of essential gene function in the yeast cell division cycle: *Molecular Biology of the Cell*, 2006, v. 17, p. 4736-4747.
137. Yuan Z., Schneider S., Dodd T., Riera A., Bai L., Yan C., Magdalou I., Ivanov I., Stillman B., Li H., Speck C. Structural mechanism of helicase loading onto replication origin DNA by ORC-Cdc6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Jul 28; 117(30): 17747–17756.
138. Zappulla D. C., Sternglanz R., Leatherwood J. Control of replication timing by a transcriptional silencer. *Current Biology*, 2002, v. 12, p. 869-875.
139. Zegerman P., Diffley J.F. Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature.* 2007 Jan 18;445(7125):281-5.

11. Zbiór publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej

Stępień K., Skoneczna A., Kula-Maximenko M., Jurczyk Ł., Mołoń M. Depletion of the Origin Recognition Complex Subunits Delays Aging in Budding Yeast. *Cells*. 2022 Apr; 11(8): 1252. doi: 10.3390/cells11081252.

IF₂₀₂₂ = 6,0

MNiSW = 140

Stępień K., Skoneczna A., Kula-Maximenko M., Jurczyk Ł., Mołoń M. Disorders in the CMG helicase complex increase the proliferative capacity and delay chronological aging of budding yeast. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2024 Jan;1871(1):119621. doi: 10.1016/j.bbamcr.2023.119621.

IF₂₀₂₃ = 4,6

MNiSW = 140

Stępień K., Enkhbaatar T., Kula-Maximenko M., Jurczyk Ł., Skoneczna A., Mołoń M. Restricting the level of the proteins essential for the regulation of the initiation step of replication extends the chronological lifespan and reproductive potential in budding yeast. *Biogerontology*. 2024 Jun 6. doi: 10.1007/s10522-024-10113-x.

IF₂₀₂₃ = 4,4

MNiSW = 100

11.1. Depletion of the Origin Recognition Complex Subunits Delays Aging in Budding Yeast



Article

Depletion of the Origin Recognition Complex Subunits Delays Aging in Budding Yeast

Karolina Stępień¹, Adrianna Skoneczna^{2,*}, Monika Kula-Maximenko³, Łukasz Jurczyk⁴ and Mateusz Mołoń^{1,*}

¹ Department of Biology, Institute of Biology and Biotechnology, University of Rzeszów, 35-601 Rzeszów, Poland; karolina.stepien89@interia.pl

² Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, 02-106 Warsaw, Poland

³ The Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, 30-239 Krakow, Poland; m.kula@ifr-pan.edu.pl

⁴ Institute of Agricultural Sciences, Land Management and Environmental Protection, University of Rzeszów, 35-601 Rzeszów, Poland; ljurczyk@ur.edu.pl

* Correspondence: ada@bb.waw.pl (A.S.); mmolon@ur.edu.pl (M.M.); Tel.: +48-22-659-70-72 (A.S.); +48-17-785-54-07 (M.M.)

Abstract: Precise DNA replication is pivotal for ensuring the accurate inheritance of genetic information. To avoid genetic instability, each DNA fragment needs to be amplified only once per cell cycle. DNA replication in eukaryotes starts with the binding of the origin recognition complex (ORC) to the origins of DNA replication. The genes encoding ORC subunits have been conserved across eukaryotic evolution and are essential for the initiation of DNA replication. In this study, we conducted an extensive physiological and aging-dependent analysis of heterozygous cells lacking one copy of *ORC* genes in the BY4743 background. Cells with only one copy of the *ORC* genes showed a significant decrease in the level of *ORC* mRNA, a delay in the G1 phase of the cell cycle, and an extended doubling time. Here, we also show that the reducing the levels of Orc1-6 proteins significantly extends both the budding and average chronological lifespans. Heterozygous *ORC/orcΔ* and wild-type diploid cells easily undergo haploidization during chronological aging. This ploidy shift might be related to nutrient starvation or the inability to survive under stress conditions. A Raman spectroscopy analysis helped us to strengthen the hypothesis of the importance of lipid metabolism and homeostasis in aging.

Keywords: aging; cell cycle; lifespan; ORC; replication; yeast



Citation: Stępień, K.; Skoneczna, A.; Kula-Maximenko, M.; Jurczyk, Ł.; Mołoń, M. Depletion of the Origin Recognition Complex Subunits Delays Aging in Budding Yeast. *Cells* **2022**, *11*, 1252. <https://doi.org/10.3390/cells11081252>

Academic Editor: Milena Georgieva

Received: 2 March 2022

Accepted: 5 April 2022

Published: 7 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Replication is a cellular metabolic process in which a cell duplicates one or more DNA molecules. DNA replication begins when the origins of replication are recognized and bound by initiation proteins and is a tightly regulated process ensuring that genetic information is inherited. DNA replication initiation is stringently regulated and involves multiple layers of backup mechanisms [1]. Replication is initiated from the origins of replication recognized and bound by the origin recognition complex (ORC) [2–4]. The ORC is a six-subunit ATP-dependent DNA-binding protein encoded by *ORC1-6* [5]. The first origin recognition complex proteins were identified in budding yeast as a heterohexameric complex that specifically bound to the origins of DNA replication [2]. Orthologs of *ORC1-5* were identified in divergent organisms from fruit flies to humans, which greatly suggested that these genes were strongly evolutionarily conserved [6,7]. In turn, *ORC6* genes showed no structural similarity to the other ORC proteins, and were poorly conserved between budding yeast and other eukaryotic species [7]. The role of the ORC is to form a scaffold for a number of additional replication factors in the G1 phase of the cell cycle, including Cdc6, Cdt1 and Mcm2-7, which together form a pre-replication complex [2,8–11]. The ORC

remains bound to chromatin at replication origins throughout the cell cycle [4], but is only active in the late mitosis and early G1 phase of the cell cycle. Both Orc1p and Orc5p bind ATP, though only Orc1p has ATPase activity [12]. The Orc5p and Orc6p are crucial for the stability of ORC as the whole structure/complex [13]. Yeast ORC is a human ORC orthologue; therefore, yeast may serve as a model in aging research and during studies of humanized yeast used to reveal the mechanism leading to human diseases, to which defects in ORC functioning contribute. So far, the mutations in inter alia *ORC1*, *ORC4* and *ORC6* were linked to dwarfism, also known as Meier-Gorlin syndrome [14]. In this paper, we focused on the effect of reducing the levels of Orc1-6 proteins on cellular aging. In general, aging is defined as a multifactorial process leading to the loss of function of cells, tissues and organs. Yeast has been frequently and successfully used in aging research for both aspects of this process, in both mitotically active [15] and post-mitotic cells [16]. There are two main approaches to aging used in the studies employing yeast as the model system. The classical approach to replication aging examines the proliferative potential of cells, expressed as the ability of the yeast mother cell to produce daughter cells [17]. This method was later enhanced by the cell's or organism's lifetime parameters (as in other models) [18] and is a model for studying active mitotic cells in higher eukaryotes [19]. In the second approach, the so-called chronological aging is used as a model for studying post-mitotic cells of higher eukaryotes, including humans [16,20]. Many factors are known to influence the aging of yeast, including caloric restriction [21], anti-aging compounds [22–24], ribosome biogenesis disorders [25–27], mitochondrial dysfunction [28], and an increased level of reactive oxygen species, leading to oxidative damage [29] or extrachromosomal rDNA circles (ERCs) formation [30,31]. However, despite extensive research on aging, little is known about the possible linkage between replication initiation and aging. This is hardly strange considering that most of the factors involved in this process are essential for cell viability. In our studies, we took advantage of the Orc1-6 protein level difference between cells that were homozygous or heterozygous with regard to ORC genes. We asked if decreased levels of proteins, which were necessary for replication to start, e.g., Orc1-6 proteins, would affect the aging process of these cells. We showed that a lowered level of any of the Orc1-6 proteins resulted in a significant increase in the budding lifespan and delayed the average chronological aging, likely due to the delay in the cell cycle and subsequent extension of the doubling time.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and Growth Conditions

All yeast strains used in this study are listed in Table 1.

Table 1. Strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
BY4743 a/ α	Mat a/ α ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Open Biosystems
<i>ORC1/orc1Δ</i>	Mat a/ α ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>ymf065w::kanMX4/YML065w</i>	Open Biosystems
<i>ORC2/orc2Δ</i>	Mat a/ α ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>ybr060c::kanMX4/YBR060c</i>	Open Biosystems
<i>ORC3/orc3Δ</i>	Mat a/ α ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>yll004w::kanMX4/YLL004w</i>	Open Biosystems
<i>ORC4/orc4Δ</i>	Mat a/ α ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>ypr162c::kanMX4/YPR162c</i>	Open Biosystems
<i>ORC5/orc5Δ</i>	Mat a/ α ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>ymf261w::kanMX4/YML261w</i>	Open Biosystems
<i>ORC6/orc6Δ</i>	Mat a/ α ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>yhr118c::kanMX4/YHR118c</i>	Open Biosystems

Yeast cells were grown in a standard liquid-rich YPD medium (1% Difco Yeast Extract, 1% Yeast Bacto-Peptone, and 2% glucose) on a rotary shaker at 150 rpm or on solid rich YPD medium containing 2% agar. The experiments were performed at 28 °C.

2.2. Determination of the Growth Rate

The growth assays were carried out on liquid medium as described above. The yeast cell suspension was incubated for 12 h with shaking at 28 °C (Heidolph Incubator 1000 at 1200 rpm). The growth was monitored in the Anthos 2010 type 17,550 microplate reader at 600 nm by measurements at 2 h intervals for 12 h. In the second approach, the number of cells per ml in each culture was counted using a Malassez chamber (Carl Roth, Lauda-Konigshofen, Germany).

2.3. Determination of the Mean Doubling Time

The mean doubling time was calculated for each analyzed strain as described previously [32]. The doubling time was calculated during the routine determination of the budding lifespan. The times of the first two reproductive cycles were not taken into account (the first and second doubling times are longer than those of older cells). The data represents mean values from three independent experiments (with 45 cells used in each experiment) with a mean standard deviation (SD). Statistically significant differences were taken at a *p*-value of < 0.001 using the one-way ANOVA.

2.4. Cell Cycle Analysis

The cells were grown to OD₆₀₀ 0.3–0.5, and 1 mL of cell culture was harvested by centrifugation, and then washed with water fixed with a chilled (−20 °C) 70% ethanol (Polmos, Warsaw, Poland) for 2 h at room temperature. The fixed cells were then washed twice in FACS buffer (0.2 M Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA), pH 7.4, 20 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Germany), and incubated for 2 h at 37 °C in FACS buffer with 1 mg per ml RNase A (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) to eliminate RNA. The cells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS) and stained overnight at 4 °C in the dark with 100 µL of propidium iodide solution (50 µg per ml in PBS; Calbiochem, San Diego, CA, USA). After the addition of 900 µL PBS, the cells were sonicated three times per 10 s in an ultrasonic bath, Branson 2800 (Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT, USA), prior to FACS analysis of the DNA content. Analysis was performed using a FACS Calibur analyzer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). A total of 10,000 cells were counted in a single assay. The mean percent of cells in G1, S, and G2 phases of the cell cycle was counted from three independent biological replicates. The standard deviation was also calculated. The usage of two control strains, haploid and diploid, enabled the gating of cells in the respective cell cycle phase.

2.5. Measurement of Cell Metabolic Activity

Metabolic activity of yeast cells was determined with FUN-1 according to the manufacturer's protocol (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) with small modifications described in [33]. The fluorescence of the cell suspension was measured after 15 min incubation in the dark and at 28 °C using the TECAN Infinite 200 microplate reader (Grodig, Austria) at $\lambda_{\text{ex}} = 480$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 500$ –650 nm. The metabolic activity of cells was expressed as a change in ratio of red ($\lambda = 575$ nm) to green fluorescence ($\lambda = 535$ nm). The mean and SD were calculated from the data of at least four cultures for each strain.

2.6. Detection of Rad52-YFP Foci via Fluorescence Microscopy

To determine the number of Rad52-YFP foci, *ORC* deletion strains and BY4743 wild type were used. The yeast strains were transformed with the plasmid pWJ1344 carrying a RAD52-YFP fusion [34]. The transformants were grown in SC-Leu medium at 28 °C with shaking until the exponential phase. An aliquot of each culture was collected for microscopic analysis, which allowed the frequency of the spontaneous formation of Rad52 foci to be assessed. The remaining culture was treated with 1 mM H₂O₂ for one hour, then aliquots of cell suspensions were taken for a microscopic analysis of a further quantification of the frequency of oxidative stress-induced Rad52 foci. The cells were examined under a fluorescence microscope (Olympus BX51, Tokyo, Germany). The number of cells and

Rad52-YFP foci in the cells were counted, and the percentage of cells with Rad52-YFP foci and the average number of Rad52-YFP foci per cell were calculated after screening of at least 500 cells.

2.7. Sporulation Efficiency Assay

Diploid strains pre-grown in rich YPD medium were placed onto sporulation medium containing 0.1% yeast extract, 1% potassium acetate, 0.05% glucose, 2% agar for 14 days at 28 °C, as previously described [35]. Cells were then suspended in water. Cells and asci were counted in a cell-counting chamber Malassez (at least 300 cells per probe), and the frequency of asci among the total cells was expressed as a percentage of asci relative to all cells counted and WT. The mean and SD were calculated from the data for at least three cultures of each strain.

2.8. Tetrad Dissection

Tetrad dissection was performed as previously described [35]. Cells were placed onto sporulation medium containing 0.1% yeast extract, 1% potassium acetate, 0.05% glucose, and 2% agar for 14 days at 28 °C. Then, cells were suspended in 0.5 mg/mL Zymolyase 100T solution in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, and incubated for 10 min at 37 °C. Tetrads were dissected using a Nikon Eclipse E200 optical microscope with an attached micromanipulator on rich YPD plates. Spores were grown for three days at 23 °C.

2.9. RNA Isolation and RT-qPCR

For the extraction of mRNA, the yeast RiboPure RNA Purification Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA; AM1926) was used in accordance with the manufacturer's instructions. For mRNA extraction, 2×10^7 cells were collected from overnight cultures. The quality and yield of the RNA were checked using the TECAN Infinite 200 microplate reader. The samples were stored at a concentration of 300 µg/µL in 5 mg aliquots at −80 °C.

The quality of samples was determined by analyzing the RNA concentration (260 nm) and its purity (280/230 nm) in a 20-fold diluted solution of each sample in nuclease-free water on a UV-1800 spectrometer (Shimadzu, Tokyo, Japan). The isolates had an average concentration of 918.933 ng/mL ($\sigma = 167.178$). To remove residual dsDNA, ssDNA and RNA–DNA complexes, samples were incubated for 30 min at 37 °C (TBD-100, Biosan, Riga, Latvia) with 50 U RNase-free DNAase (10 U/µL, A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) in buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH = 8.0) and 5 mM MgCl₂. After 5 min incubation, the reaction was stopped by heating at 75 °C, followed by cooling to 4 °C.

The reverse transcription was performed in two steps. The synthesis of first strand was performed using the TranScriba Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) in MasterCycler[®] thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) as follows: an average of 1026 µg ($\sigma = 0.015$) of each RNA sample was incubated with 1 µL of oligo(dT)18 primer at 65 °C for 5 min. in the total volume of 9.5 µL (nuclease-free water), then chilled down to 4 °C. After adding a reaction mixture consisting of 4 µL of 5× reaction buffer, 0.5 µL of RNase inhibitor (40 U/µL), 2 µL of dNTP (10 mM) and 4 µL of recombinant reverse transcriptase MMLV (20 U/µL) filled with sterile water up to 20 µL, the reaction was conducted at 42 °C for 60 min, then stopped at 70 °C for 5 min, and the resulting cDNA were stored at −20 °C until further analysis. In the second step, the relative number of transcripts was measured by quantitative PCR in Light Cycler[®] 96 instrument (Roche, Basel, Switzerland). The reaction mixture consisted of: 7.5 µL RT PCR Mix SYBR[®] A (Taq 0.1 U/µL, MgCl₂ 4 mM, 0.5 mM of each dNTP in 2× reaction buffer containing SYBR[®] Green, A&A Biotechnology, Gdynia, Poland), 0.56 µL of each primer (*ORC* and *ACT1* to normalize the data; 10 mM, Genomed, Warsaw, Poland, for details see Table 2), 0.75 µL of cDNA (previously diluted 1:5 in sterile water), all filled up to 15 µL with sterile water. The reaction was carried out with the following thermal profile: 180 s of pre-denaturation at 95 °C, followed by 40 cycles comprising denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and an extension at 72 °C for 30 s with a single acquisition. Each reaction was completed via a melting analysis

of the products with the following thermal profile: 95 °C for 10 s, 65 °C for 60 s, then up to 97 °C with 5 readings/°C. Each sample was processed in at least two biological and three technical replicates, and PCR reactions were conducted in the presence of a negative reagent control and a positive control with yeast DNA. Potential contamination of RNA isolates by DNA was excluded by preliminary PCR with ACT1 primers, which was then separated on horizontal gel electrophoresis. The entire analysis was carried out in accordance with the principles of good practice in RNA handling.

Table 2. Primers used for RT-qPCR gene expression analysis.

Gene Name	Forward Primer 5'->3'	Reverse Primer 5'->3'	Source
ACT1	GTAAGGAATTATACGGTAACATC	TAGATGGACCACITTCGTCG	<i>in this study</i>
ORC1	TGGGTATACGCACGAAGAGC	TCCTCACGTCTCAGGCAAC	<i>in this study</i>
ORC2	ATTACGCTCCGCTCTCTG	CTTCAGCACCACTGCTGGTA	<i>in this study</i>
ORC3	ACTGAGCAGATGCTTACATCA	GCCCGTTAATCGGGTCTCT	<i>in this study</i>
ORC4	AGCTCGTCTATCACCGCAAG	CCAGGGTCGCTGCTTTACA	<i>in this study</i>
ORC5	GGATTCCTCACGAAGTGCAGA	GGTAGAGCTGCTTATGGACG	<i>in this study</i>
ORC6	AACCAGGAAACGACGGTTTG	TGTTCGTTCTCCCGCTTC	<i>in this study</i>

2.10. Determination of Budding Lifespan

After overnight growth, the cells were arrayed on a YPD plate using a micromanipulator. The budding lifespan was microscopically determined by a routine procedure with the use of a micromanipulator, as described previously [36]. The number of buds formed by each mother cell reflected its reproductive potential (budding lifespan). In each experiment, 45 single cells were analyzed. The results represented measurements for at least 90 cells analyzed in two independent experiments. The analysis was performed by micromanipulation using the Nikon Eclipse E200 optical microscope (Nikon, Amsterdam, Netherlands) with an attached micromanipulator.

2.11. Determination of the Total Lifespan

The total lifespan is the length of life of a single mother yeast cell expressed in units of time and was calculated as the sum of reproductive (time between the first and the last budding) and post-reproductive lifespans (time from the last budding until cell death). The total lifespan of the *S. cerevisiae* yeast was determined as previously described in [18] with small modifications from [36]. Ten-microliter aliquots of a fresh exponential culture of yeast were collected and transferred on YPD plates with solid medium containing Phloxine B (10 µg/mL). In each experiment, 45 single cells were analyzed. During manipulation, the plates were kept at 28 °C for 15 h and at 4 °C during the night. The results represent measurements for at least 90 cells analyzed in at least two independent experiments. The analysis was performed by micromanipulation using a Nikon Eclipse E200 optical microscope with an attached micromanipulator.

2.12. Chronological Lifespan (CLS) Assays

Chronological lifespan of cells incubated in minimal medium (SDC) was measured as previously described [23]. Briefly, yeast was grown in SDC containing 0.67% Bacto-yeast nitrogen base (without amino acids) and 2% (*w/v*) glucose, supplemented with L-histidine (60 mg/L), L-leucine (180 mg/L) and uracil (60 mg/L). Chronological lifespan was monitored in SDC medium by measuring viability after 2, 4, 7, 14, 21 and 28 days of cultivation. For the quantitative measurement of survival, staining with propidium iodide was used. The data represent the mean values from at least three independent experiments.

2.13. Cell Viability

To determine cell death, propidium iodide was used for cell staining. Cells were suspended in PBS and stained with 5 µg/mL propidium iodide (Sigma-Aldrich, Burlington,

MA, USA) for 15 min in the dark at room temperature as previously described. The heat-shocked cells were used here as a positive control (the cells from overnight growth culture were placed in 60 °C for 15 min). Photos of fluorescence signals were taken with Olympus BX-51 (Olympus, Tokyo, Japan) microscope equipped with a DP-72 digital camera and cellSens Dimension v1.0 software. Dead cells were visible in the red fluorescence channel ($\lambda_{ex} = 480 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$). The data represent the mean values from three independent experiments.

2.14. Raman Spectroscopy

For the Raman spectroscopic measurements, a Nicolet NXR 9650 FT-Raman Spectrometer equipped with an Nd:YAG laser (1064 nm) and an InGaAs detector was used. Samples of yeast were lyophilized. FT-Raman spectra were measured at a laser power of 0.5 W in a range from 400 cm^{-1} to 2000 cm^{-1} ; the resulting spectra were averaged from 64 scans. The diameter of the used laser beam was 50 μm , and the spectral resolution was 8 cm^{-1} . Raman spectra were processed by the Omnic/Thermo Scientific software and OriginLab programs.

To indicate the similarity between the heterozygous strains and wild-type yeast hierarchical clustering analysis (HCA), the Ward cluster method was used in the studied groups of chemical compounds. These methods were applied in the Raman ranges for polysaccharides, lipids, proteins, RNA, and nucleic acid. OriginLab software was used to perform the analysis and to draw the charts.

2.15. Statistical Analysis

The results represent the mean \pm SD values for all cells tested in two independent experiments. The differences between the wild-type and isogenic heterozygous strains were estimated using one-way ANOVA and Dunnett's post hoc tests. The values were considered significant when $p < 0.05$. The statistical analysis was performed using the Statistica 10.0 software, and statistical and multidimensional analysis was conducted using PAST 3.0 and Origin 2018 software (Raman spectroscopy).

3. Results

3.1. *ORC/orc* Δ Heterozygous Strains Grow Slowly Due to a Delay in G1/S Transition in the Cell Cycle

We compared the growth rate and the average doubling time of heterozygous strains, lacking one copy of genes encoding subunits of the ORC complex, on a rich medium with addition of 2% glucose. As seen in Figure 1A,B, almost all of the strains show a slower growth rate. Two approaches to estimating the growth rate are shown here. The first approach is based on changes in the optical density (OD_{600}) in time (Figure 1A). The other approach showed changes in the density of cultures (number of cells per mL) during the cultivation period (Figure 1B). We showed results of both measurements because, from our previous experience, we learned that the growth curve obtained by OD_{600} measurements might be misleading. Aside from cell culture density, the results of OD_{600} measurements also depend on the morphology of the cells (their size, transparency, granularity, thickness of their cell wall, etc.). For example, the curves representing the *ORC1/orc1* Δ strain growth differ in Figure 1A,B. Our observations during the routine budding lifespan analysis did not match with the fast growth seen for this strain in Figure 1A but were in accordance with the growth curve visible in Figure 1B.

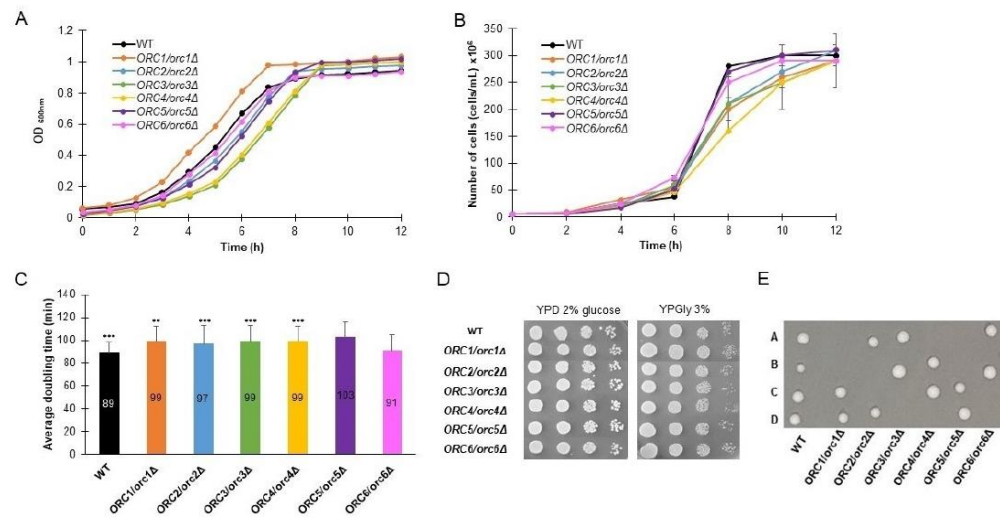


Figure 1. Growth phenotypes of heterozygous strains lacking one copy of genes encoding ORC complex subunits. Growth curves of heterozygous *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ*, and *ORC6/orc6Δ* strains and the WT control (BY4743). The density of the culture was expressed by OD_{600} (A) or number of cells per mL (B). Average doubling time of the same strains, as in (A), during the reproducing period. Error bars represent standard deviations obtained from three independent experiments. Statistical significance was assessed using ANOVA and Dunnett's post hoc test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (C) Growth of the strains on solid YPD or YPGly media. Drops of serial diluted cell cultures (the same strains as in (A)) were placed on appropriate media, allowed to grow at 28 °C and photographed after 48 h (D). Growth of spores from tetrad dissection of BY4743 and *ORC/orcΔ* heterozygous diploids. Spores were dissected onto YPD plates and grown at 23 °C for 72 h (E).

Almost all heterozygous *ORC/orcΔ* strains, except *ORC6/orc6Δ*, showed a statistically significant increase in the mean cell doubling time, measured during the budding lifespan analyses (Figure 1C). The doubling time of the *ORC6/orc6Δ* strain is similar to the wild-type strain. The ability of all strains to grow on a fermentable and non-fermentable carbon source was also confirmed (Figure 1D). Here, we also found that typically no more than two spores from each tetrad were viable, which implied that *ORC1-6* were essential genes (Figure 1E).

Since the ORC complex subunits are known to form a pre-replication complex during the G1 phase of the cell cycle, we expected that a lack of one copy of the *ORC* gene might affect the cell cycle. The DNA content analysis, performed using flow cytometry, showed cell cycle anomalies in all analyzed strains. These changes were mainly related to the accumulation of cells in the G1 phase of the cell cycle (Figure 2A,B).

Consequently, the number of cells in the G2 phase of the cycle was significantly reduced in all strains compared to the control (Figure 2A,B).

Since the G1 phase of the cell cycle was prolonged in all *ORC/orcΔ* strains, we posed a question on how the copy number of *ORC* genes influenced their expression.

As shown in Figure 3, reducing the levels of Orc1-6 proteins led to a significant reduction in their expression ($p < 0.05$). The expression level of all analyzed *ORC* genes was reduced by more than 50% on average. The most remarkable changes were observed

in the *ORC3/orc3Δ* and *ORC5/orc5Δ* strains, where expression of the respective *ORC* gene was reduced by more than 70% compared to the WT.

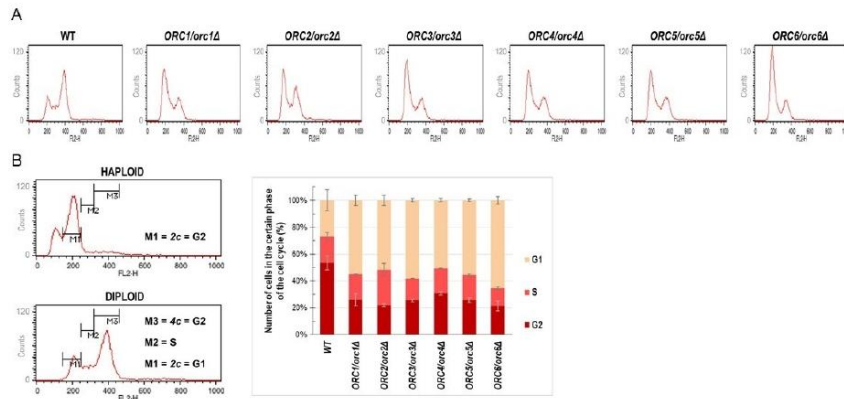


Figure 2. Cells lacking one copy of the *ORC* gene showed a delay in G1/S transition (A) Flow cytometry analysis of the diploid wild-type yeast strain BY4743 and the isogenic heterozygous strains *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ*, and *ORC6/orc6Δ*. Quantitation of the cell cycle analysis. (B) On the left, gating conditions used to calculate the number of cells in the individual cell cycle phases. On the right, the result of quantification of three biological repetitions.

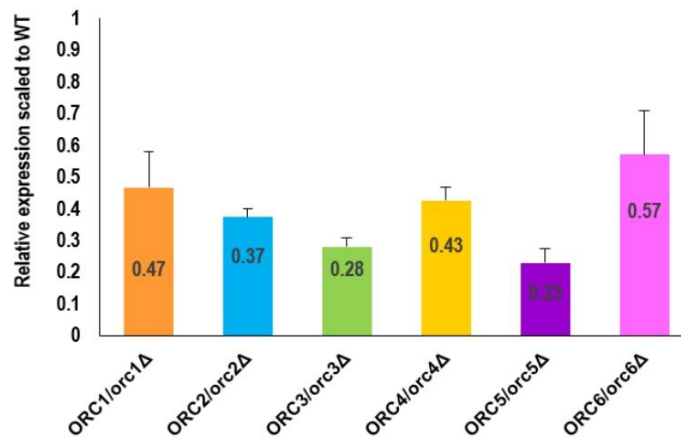


Figure 3. RT-PCR analysis showed a decrease in the *ORC* genes expression in the heterozygous *ORC/orcΔ* strains. The relative expression ratio between the WT and the *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ*, and *ORC6/orc6Δ* heterozygous strains (normalized by *ACT1*), respectively, was quantified from five independent repetitions. Standard deviation was also counted. All results were statistically significant, with $p < 0.05$.

3.2. The Metabolic Activity, Sporulation Efficiency and Response to Oxidative Stress Are Changed in *ORC/orcΔ* Strains

We performed a further analysis of the physiological parameters of the cells to indicate the possible influence of the diminished expression of *ORC* genes in cell phenotypes. First,

we characterized the metabolic activity of *ORC/orcΔ* heterozygous strains using the FUN-1 dye, a two-color fluorescent viability probe. Cell metabolic activity was expressed as the change in the ratio of red ($\lambda = 575$ nm) to green ($\lambda = 535$ nm) fluorescence. The higher the red/green fluorescence ratio, the higher metabolic activity was shown by the cells tested. As shown in Figure 4A, all analyzed strains showed a slight increase in metabolic activity compared to the WT; however, this increase was statistically significant only for the *ORC4/orc4Δ* strain.

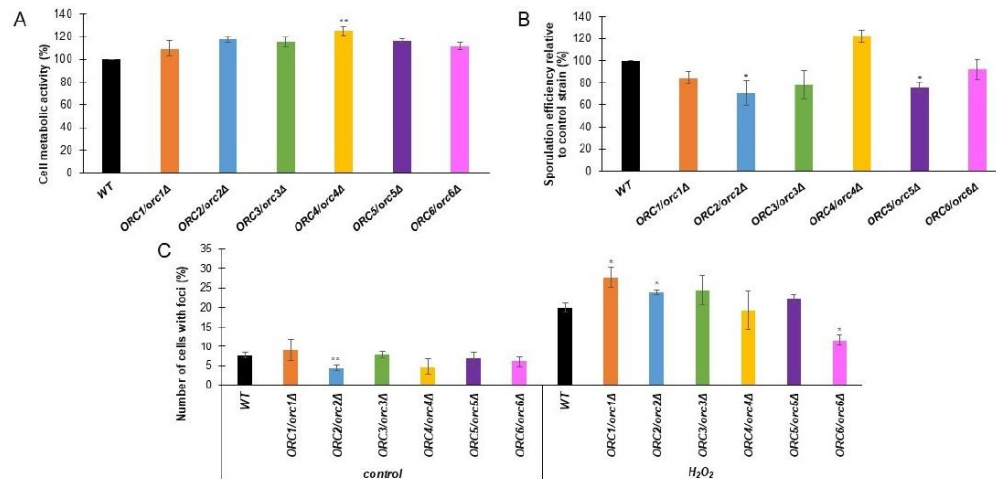


Figure 4. (A)—Metabolic activity of the cells (red/green fluorescence ratio) was estimated with FUN-1 stain for the diploid wild-type yeast strain BY4743 and the isogenic strains *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ*, and *ORC6/orc6Δ*. Data are expressed as the ratio of red ($\lambda = 575$ nm) to green ($\lambda = 535$ nm) fluorescence and presented as mean \pm SD from three independent experiments. Bars indicate SD. Statistical significance was assessed using ANOVA and Dunnett's post hoc test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) compared to the control (wild-type strains) (B)—Sporulation frequency of the BY4743 control and the isogenic heterozygous strains *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ*, and *ORC6/orc6Δ*. Error bars represent standard deviations obtained from three independent experiments. Statistical significance was assessed using ANOVA and Dunnett's post hoc test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (C)—Quantification of Rad52 foci frequency. The control strain BY4743 and the isogenic strains *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ*, and *ORC6/orc6Δ* were inspected for Rad52 foci formation in at least 900 cells per each strain. The number of foci observed before and after H_2O_2 treatment was counted, and the average number of foci per cell was calculated. Error bars represent standard deviations obtained from three independent experiments. Statistical significance was assessed using ANOVA and Dunnett's post hoc test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Sporulation is a key process necessary for yeast to survive in natural conditions. Therefore, we investigated the effect of reducing the levels of Orc1-6 proteins on the frequency of sporulation. We showed that the *ORC2/orc2Δ* and *ORC5/orc5Δ* strains had a lower sporulation frequency compared to the control strain (Figure 4B). The lack of a single copy of the gene in *ORC3* and *ORC6* also decreases the ability of yeast to sporulate, but this result is not statistically significant. Interestingly, for the *ORC5/orc5Δ* strain we saw an increase in the sporulation frequency. Therefore, it seems that ORC subunits, besides their role in replication, are involved in other biological processes, such as meiosis, or the cell's

response to adverse environmental conditions. This result suggests that ORC subunits belong to a class of the so-called moonlighting proteins.

The initiation of replication is an essential step in the life of proliferating cells. We previously showed the delay in the G1/S transition in the heterozygous *ORC/orcΔ* strains (Figure 2), which was likely due to a diminished access to ORC components. We asked whether decreased ORC components accessibility might lead to increased DNA damage when cells were exposed to oxidative stress. As a DNA damage marker, we used the Rad52-YFP fusion protein, which is known to be recruited to the site of damage. We checked the frequency of Rad52-YFP foci formation in *ORC/orcΔ* strains under normal conditions and after a one-hour treatment with oxidative stress inductor H₂O₂. Under control conditions (growth on YPD medium), we observed a decreased number of cells with Rad52-YFP foci in the *ORC2/orc2Δ* strain compared to the WT (Figure 4C). After oxidative stress, the number of cells with the Rad52-YFP foci was significantly increased in the *ORC1/orc1Δ* and *ORC2/orc2Δ* strains but reduced in the *ORC6/orc6Δ* strain compared to the WT (Figure 4C).

3.3. Strains with Reduced Expression of ORC Subunits Have Extended Budding and Chronological Lifespans

Aging analysis was crucial for this study. To achieve access to yeast aging phenotypes, we used two main approaches. The replicative aging model studies aging in mitotically active cells in higher eukaryotes, including humans. The standard approach is to count the number of daughter cells that a yeast mother cell is able to produce during its lifetime (budding lifespan). Since the yeast cell does not simply die after the completion of budding, we could determine not only the budding lifespan, but also in the cell's lifespan during replication and lifespan after replication (time period from the last bud detachment to death), which sums up to the cell's total lifespan. The experiments were performed using a single-cell analysis system. The second aging model used in this study, the chronological aging model, was applied to measure the aging of post-mitotic cells.

Our data clearly showed that *ORC/orcΔ* heterozygous strains delayed aging in both aging models. As shown in Figure 5A, all strains, except *ORC6/orc6Δ*, had significantly extended budding lifespans. In almost all cases, the mean budding lifespan exceeded 30 doublings performed by a single yeast mother cell, which was a statistically significant increase compared to BY4743 ($p < 0.001$). One of the consequences of the increase in the budding lifespan was an increase in the reproductive time. The additional increase in the doubling time (as was shown in Figure 1C) led to a statistically significant increase in the reproductive lifespan of the *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ* and *ORC5/orc5Δ* strains compared to the WT ($p < 0.001$) (Figure 5B).

The *ORC6/orc6Δ* strain also had a slightly increased reproductive lifespan, but this change was not statistically significant. The cells do not die after producing their last bud. The last period of a cell's life is defined as the post-reproductive lifespan. Its duration depends on many factors and often determines longevity expressed in time units. Here, we showed a significant decrease in the post-reproductive lifespan of *ORC1/orc1Δ* ($p < 0.01$) and the *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ* and *ORC5/orc5Δ* ($p < 0.001$) strains (Figure 5C). Interestingly, as shown in Figure 5D, only one copy of the ORC genes had no effect on the total lifespan. As shown in Figure 5D, the heterozygous *ORC/orcΔ* strains' total lifespan was similar to that of the WT control. Although the decreased expression of the ORC genes, whose products are involved in the initiation of replication, has a significant impact on several aging parameters and the doubling time, it has no effect on the lifetime of mitotically active cells, which is a novelty in aging research.

Figure 6A presents the data on the post-reproductive lifespan (PRLS) of all tested strains. A negative correlation between PRLS and the budding lifespan is evident. The trend line suggests a strong negative correlation between these parameters. The value of the Pearson correlation coefficient is -0.91 . The study also showed a strong positive correlation between the reproductive lifespan and the budding lifespan. The value of the Pearson correlation coefficient is 0.93 (Figure 6B).

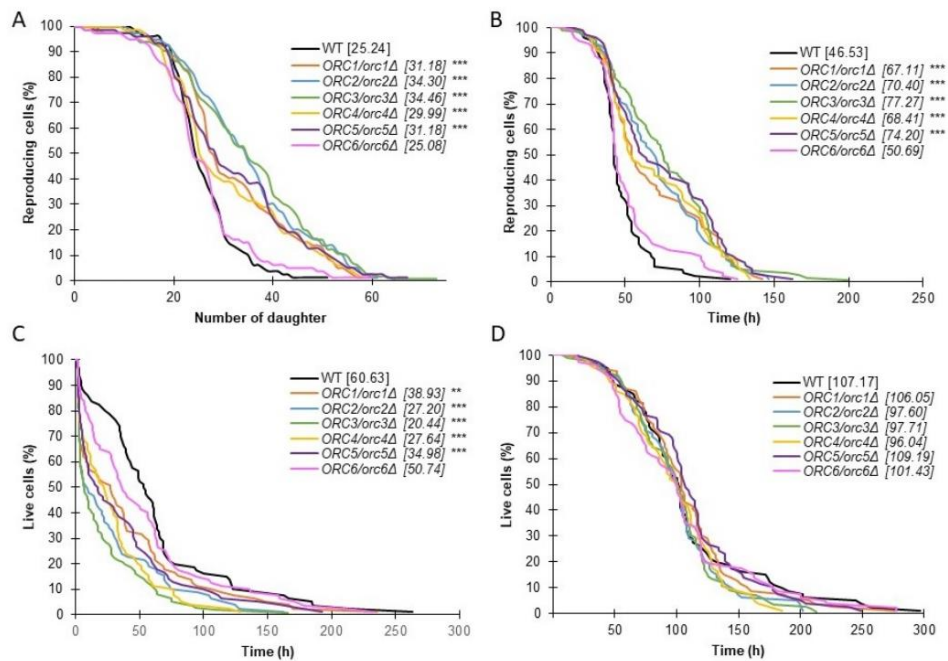


Figure 5. Aging phenotypes of the *ORC/orcΔ* heterozygous strains. Comparison of the budding lifespan (A), reproductive lifespan (B), post-reproductive lifespan (C) and total lifespan (D), of the diploid wild-type yeast strain BY4743 and the isogenic heterozygous strains *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ* and *ORC6/orc6Δ*. Statistical significances were assessed using ANOVA and Dunnett’s post hoc test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). The mean value for total 80 cells from two independent experiments is shown in parentheses.

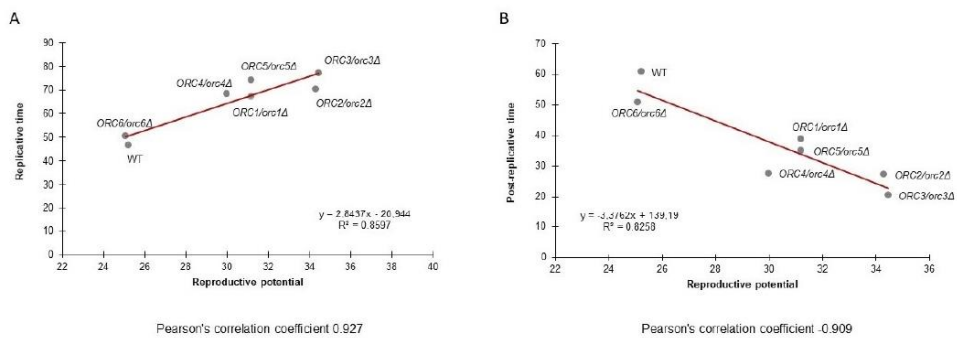


Figure 6. Pearson’s correlation coefficient between the budding lifespan and reproductive lifespan (A) and between the budding lifespan and post-reproductive lifespan (B) of the wild-type strain (BY4743) and the isogenic strains *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ*, and *ORC6/orc6Δ*.

Chronological lifespan (CLS) is a measure of the survival of a yeast population during the stationary phase. For CLS analysis, cells were cultured using a synthetic medium supplemented with glucose and the necessary amino acids. Under these conditions, upon completion of the logarithmic growth phase, the carbon source in the medium was depleted, and cells ceased to grow. We asked whether the CLS of heterozygous *ORC/orcΔ* strains might be affected. We used two approaches to measure cells' survival: propidium iodide dyeing and the ability to form a colony (expressed in CFU) (Figure 7A,B).

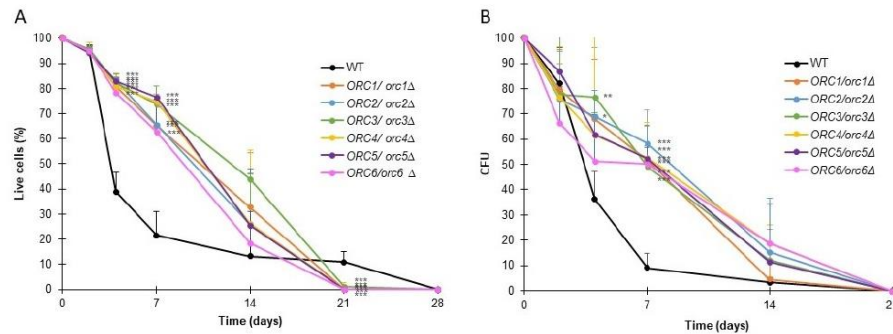


Figure 7. The chronological lifespan of the heterozygous *ORC/orcΔ* strains was extended. Chronological lifespan of the diploid wild-type yeast strain BY4743 and the isogenic strains *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ*, and *ORC6/orc6Δ*. Survival was determined by propidium iodide staining (A). Clonogenicity was determined by colony-forming unit (CFU) (B). Error bars represent standard deviations obtained from three independent experiments. Statistical significance was assessed using ANOVA and Dunnett's post hoc test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

As shown in Figure 7, all the analyzed *ORC/orcΔ* heterozygous strains had significantly augmented survival up until day 7 compared to the BY4743 wild-type strain ($p < 0.001$). On day 14, although the survival of all analyzed strains was on average higher than the WT, statistical significance was demonstrated only for *ORC3/orc3Δ* and *ORC4/orc4Δ*. Despite the high survival rate at day 14, less than 20% of cells from all strains had the ability to form colonies. On day 21 of the experiment, all the *ORC/orcΔ* strains were dead, which meant that the WT strain lived longer (survival approx. 15%). Aside from the small percentage of living cells from the wild-type strain population, the cells did not have the ability to form colonies (Figure 7B). The results showed the importance of presenting CLS results using several methods, not just one.

The microscopic analysis showed that cells in the post-mitotic growth phase increased in size during the CLS experiment. Therefore, cell size and DNA content changes during chronological aging were examined. As shown in Figure 8 (right panel), cell size increased successively until the end of the experiment, indicating a strong correlation between cell size and survival. The smallest cells were observed at the start of the experiment (2 days) and the largest cells were observed on days 14 and 21. Interesting results were also provided by the analysis of the DNA content in cells (Figure 8, left panel). The results showed that, during chronological aging, probably due to starvation condition, a change in the DNA content occurred seen as ploidy reduction. This phenotype was observed in all of the studied strains, including wild type. It should be mentioned here that when performing DNA content analysis, we cannot distinguish between living and dead cells' FACS profiles in the analyzed population. All cells are subject to permeabilization, which allows for an effective PI entrance into the cells and subsequent DNA intercalation. We observed both decreases in the viability of cells in the population and ploidy reduction over time. At the

moment, we cannot conclude how these phenotypes are linked. Haploidization might be the cause of cell death, or it might be a way for cells to escape death or at least to prolong life for some time.

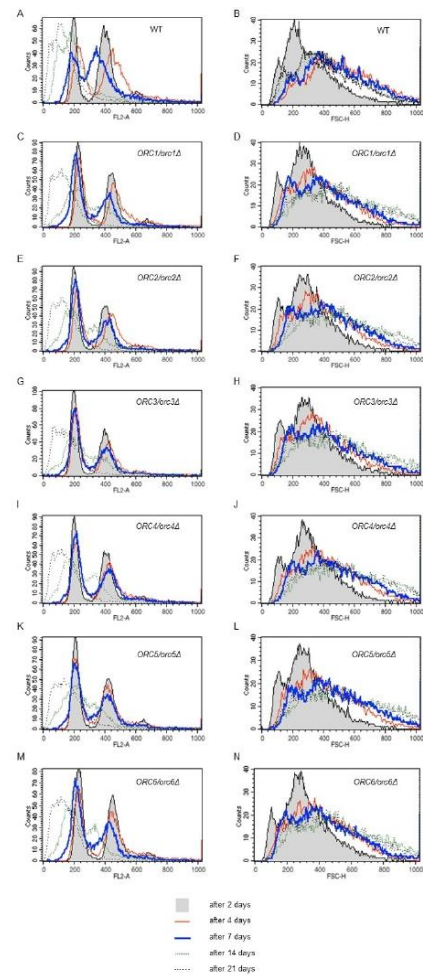


Figure 8. Ploidy reduction and cell size increase accompanies chronological aging. Results of the DNA content analysis via flow cytometry during the chronological lifespan analysis at selected time points (A,C,E,G,I,K,M). For the DNA content analysis yeast cells were stained with propidium iodide. The representative histograms are shown. Three independent experiments were performed. Cell size of the diploid BY4743 strain and the isogenic strains *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ*, and *ORC6/orc6Δ* during the chronological lifespan analysis in selected time points (B,D,F,H,J,L,N). Cell size as measured by forward scatter (FSC histogram reflects the cells size in the population). The cells were analyzed via flow cytometry as described in the Materials and Methods section. As many as 10,000 cells per sample were assayed.

3.4. Reducing the Levels of Orc1-6 Proteins Influences the Chemical Composition of the Cells

It seems that the changes in the reproductive potential of heterozygous *ORC1-5/orc1-5Δ* strains are associated with significantly reduced gene expression of the *ORC* genes and the resulting changes in the cell cycle pattern, subsequently reducing energy consumption and leading to an increase in the number of daughter cells produced. However, there is no clear evidence as to why, despite the reduced expression of *ORC6*, we did not observe a similar phenotype to that in the *ORC6/orc6Δ* heterozygous strain. As already shown, certain changes in the budding lifespan correlate with altered cell chemistry composition [27,36]. Thus, differences in the chemical composition of the wild-type (WT) and *ORC/orcΔ* heterozygous strains were shown by the analysis of the Raman spectra, which are presented in Figure 9.

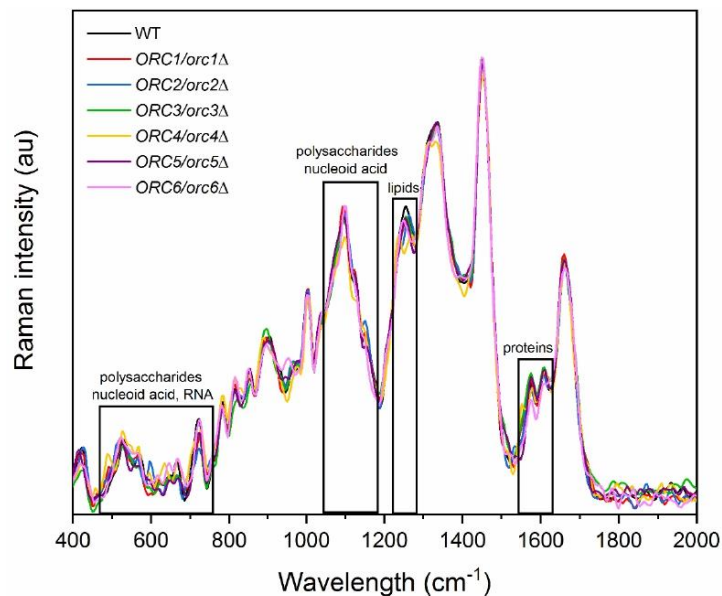


Figure 9. Raman spectra of the wild-type (WT) and heterozygous strains *ORC/orcΔ* 1–6 of yeast with the regions corresponding to vibrations of functional groups for RNA, nucleic acid, polysaccharides, proteins, and lipids.

For all investigated samples, the peaks in the Raman spectra correspond to vibrations of functional groups in proteins (1550–1610 cm^{-1}) [37,38], lipids (1250 cm^{-1}) [37,39], polysaccharides (487, 528, 1150 cm^{-1}) [37,39], nucleic acids (660, 1092 cm^{-1}) [39], and RNA (530, 720 cm^{-1}) [37,40].

An HCA analysis made it possible to identify differences in the chemical composition of polysaccharides, lipids, proteins, RNA, and nucleic acid between the mutants and the WT yeast (Figure 10). In the case of the polysaccharide composition, only three yeast mutants (*ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, and *ORC3/orc3Δ*) were similar to the WT. Other mutants formed separate groups, for which the composition of polysaccharides was significantly different in comparison to the WT (Figure 10A). A comparison of the lipids composition helped distinguish three groups with a similar composition: (1) WT and *ORC6/orc6Δ*, (2) *ORC1/orc1Δ* and *ORC2/orc2Δ*, and (3) *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ* and *ORC5/orc5Δ* (Figure 10B). The main similarity in the protein composition was between the WT and *ORC1/orc1Δ*, *ORC5/orc5Δ*

and *ORC6/orc6Δ* strains, whereas the other mutants showed a significant difference in the protein composition compared to the WT. The *ORC4/orc4Δ* strain sample was the most different and formed a separate group (Figure 10C). The chemical composition of RNA from the *ORC6/orc6Δ* strain was similar to the WT. The rest of analyzed strains had a different RNA composition than the WT and formed two separate groups (Figure 10D). The WT shared similarities with the *ORC5/orc5Δ* strain in the nucleic acid composition. The *ORC4/orc4Δ* and *ORC6/orc6Δ* strains formed a second group with a similar composition of nucleic acids, which were different from the WT. The third group, which differed from the WT, was formed by the *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ* and *ORC3/orc3Δ* strains (Figure 10E). Therefore, we believe that the lack of changes in the RNA spectrum and lipids may determine the similarity between the budding lifespan and the *ORC6/orc6Δ* growth curve. Interestingly, strains bearing one copy of *ORC1-5* genes are resistant to calcofluor white (50 μg/mL), and *ORC6/orc6Δ* sensitivity is similar to that of the wild type (data not shown). This observation suggests that ORC subunits may play an important role in cell wall remodeling, cell wall synthesis or the response to environmental stress.

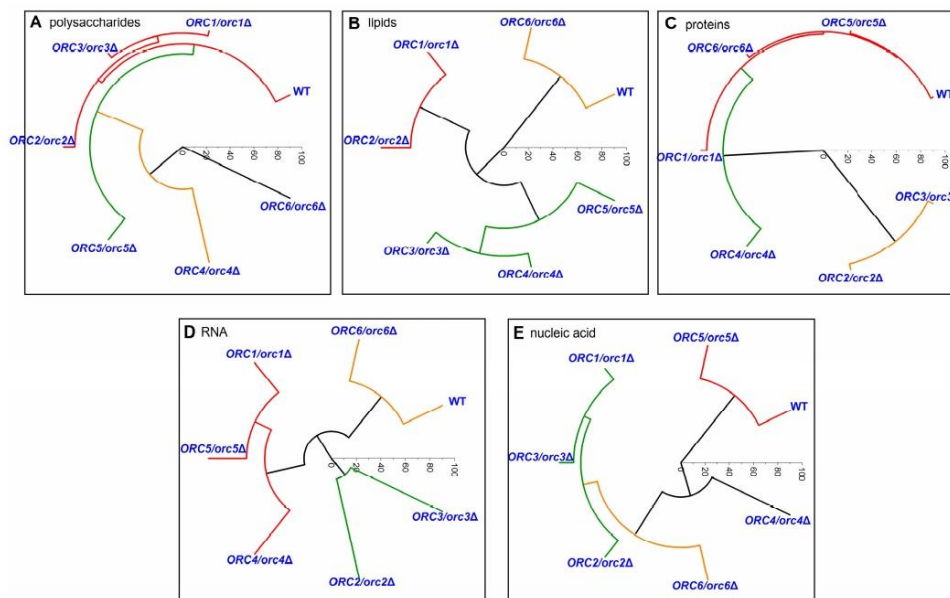


Figure 10. Hierarchical clustering analysis (HCA) of the control strain (BY4743) and the heterozygous strains *ORC1/orc1Δ*, *ORC2/orc2Δ*, *ORC3/orc3Δ*, *ORC4/orc4Δ*, *ORC5/orc5Δ*, and *ORC6/orc6Δ* obtained from Raman spectroscopy of different spectral functional groups: (A)—polysaccharides; (B)—lipids; (C)—proteins; (D)—RNA; (E)—nucleic acid.

4. Discussion

In general, DNA replication requires at least one origin and a protein complex in all three domains of life: archaea, bacteria and eukaryote. There is one origin of replication in prokaryotic cells [41], while in eukaryotes, especially higher eukaryotes, there may be tens of thousands of origins of replication [42]. In eukaryotes, protein factors bind to the replication origin, the most important of which is the origin recognition complex, to which other factors that initiate replication attach to establish a pre-replicative complex [8,41–44]. The ORC forms a heterohexamers consisting of the Orcl, Orc2, Orc3, Orc4, Orc5 and Orc6

proteins, forming stable binds to all of the origins of replication DNA [45]. The binding of the ORC to specific DNA sites is ATP-dependent. In the ORC, Orc1-5 proteins contain an AAA+ domain (ATPases associated with diverse cellular activities) and are required for binding to DNA. Interestingly, only Orc1, Orc2, Orc4, and Orc5 have direct contact with DNA [46,47], while Orc3 is a linker of the subunits that are in contact with DNA, which stabilizes the entire complex. In turn, the Orc6 subunit does not contain an AAA+ domain and does not bind to DNA, but it recruits Cdt1 and the replicative helicase core—the Mcm2-7 complex [48,49].

The molecular basis for the initiation of replication in eukaryotes seems to be fairly well-understood and reliably described. However, so far there have been no data on the effect of the reducing the level of essential proteins involved in the recognition of the replication origin on cell physiology and aging. There are strong similarities between senescence of mammalian cells and the budding yeast lifespan. Therefore, a good understanding of the mechanisms controlling the initiation of replication can be helpful in slowing aging and providing protection against cancer. Cellular senescence is a cell-cycle arrest that can be induced in cells in response to various internal and external factors, as well as developmental signals [50]. During oncogene induced senescence, oncogene activation causes hyperproliferation, which induces cellular senescence. Mitotic signals increase the usage of origins of replication resulting in the arrest of replication and accumulation of DNA damage, eventually activating the DNA damage response [51,52]. The ORC as a key player during the initiation of replication and the licensing factors, such as Cdc6 and Cdt1, cooperatively promotes the loading of the helicase core MCM complex (minichromosome-maintenance) [53,54]. During the S phase, the activated cyclin-dependent kinases and Dbf4-dependent kinase trigger the initiation of DNA replication. The phosphorylation of MCM by CDK and Dbf4 is necessary for origin firing. In turn, the ORC and Cdc6 and Cdt1 are downregulated by phosphorylation to prevent MCM recruiting [55]. Recent studies show an interesting link between the ORC and telomers [56]. In general, to achieve the efficient duplication of telomeric DNA regions, a complex protein network is necessary. It is suggested that, in mammalian cells, a crucial role in this process is played by TRF2, which is involved in both ORC and MCM loading at telomeres. The TRF2 directly binds to ORC through the Orc1 subunit; it is suggested that replication origins are assembled at telomeres through the TRF2–ORC interaction [57] and plays a key role in maintaining telomere stability through the formation of dormant telomeric origins [56]. However, the answer to the question of whether telomere replication is actually impaired due to the defects in ORC recruitment remains elusive. Our data clearly show that strains with low levels of Orc1-5 have significantly prolonged doubling times. This slowed growth corresponds to the cell-cycle delay in the G1/S transition, yet without influencing metabolism measured by the FUN-1 dye. Interestingly, no changes in growth kinetics in the *ORC6/orc6Δ* strain were observed despite the cell cycle anomalies. In addition, we found that heterozygous cells decreased the amount of ORC mRNA compared to the control, including *ORC6* mRNA. This suggests that the AAA+ domain, not cell cycle anomalies, may play a superior role in the observed phenotype, at least in the case of the yeast ORC. The ORC binds directly to DNA at replication origins throughout the cell cycle, and therefore plays a crucial role during eukaryotic DNA replication [4]. This also constitutes a foundation for the assembly of the pre-replicative complex during the G1 phase. A cell cycle analysis clearly showed that all of the heterozygous strains in question had an extended cell cycle G1 phase compared to the reference strain. Recently, we showed that some parameters of cell chemistry may correlate with each other and may account for the phenotype of mutants [27,36]. Molecular analyses have not provided clear answers to why the *ORC6* level, despite disturbances in the cell cycle and lower mRNA in the cell, does not have an altered budding lifespan and growth rate. This is why we used the Raman spectrometry here. The results of our analyses show that cells in the exponential phase, and thus comparable to those in the budding lifespan analysis, have similar RNA and lipids spectra. These results support previous findings suggesting that the biochemical status (metabonomic

fingerprint) of cells may be associated, to some extent, with yeast longevity [58]. Our results also support previous data highlighting the significance of lipid metabolism and homeostasis in aging [36]. Therefore, it seems that, for the understanding of biochemical fundamentals of aging in yeast, pivotal roles must be assigned to lipid metabolism and lipid homeostasis [59]. The role of triacylglycerols was particularly evident in chronological aging. However, this relationship is less clear for the budding lifespan. To achieve a full budding lifespan, only TAG synthesis capability is needed [60].

In our extensive functional analysis of the ORC, we also focused on determining chronological lifespan (CLS). CLS is the length of time that non-budding yeast cells are able to survive. By providing a model for the aging of nondividing cells of higher organisms, the yeast CLS assay is suggested as a complement to the budding lifespan assay [61,62]. Despite the discovery of many metabolic pathways involved in CLS, our knowledge of replication initiation disorders of nonbudding cells is elusive. Theoretically, disturbances in replication initiation should not affect aging of yeast cells in the post-mitotic phase. It is worth noting that the CLS analysis begins with the entry of cells into the stationary phase. It has been proposed that, during CLS, two main pathways are activated: the Tor/S6K pathway [63] and the Ras/adenylate cyclase/PKA pathway [64]. Interestingly, all of the studied strains showed a longevity comparable to that of the WT. Here, we also confirm that both aging models, i.e., RLS and CLS, are not always similarly affected. Previous studies found that overexpression of the *SOD1* and *SOD2* genes decreased budding lifespan, but also slows down chronological aging [20]. In turn, other studies showed that increased respiration in the *sch9Δ* mutant was required for increasing CLS but not RLS [65]. It was recently shown that haploinsufficiency, i.e., a dominant phenotype caused by a heterozygous loss-of-function mutation, is rare. Interestingly, for yeast haploinsufficiency, phenotypes were observed for more than a half of the essential genes under optimal growth conditions. Moreover, 40% of the essential genes without noticeable phenotypes under optimal growth conditions exhibited haploinsufficiency under extreme growth conditions [66]. This may explain the absence of a direct *ORC6/orc6Δ* phenotype in the replication aging model and significant alterations in the cell response to cell stress conditions during CLS, for instance, starvation or acidification of the medium. Therefore, we strongly support the suggestion that single-cell phenotyping is a powerful approach, even in heterozygous conditions. In general, our data suggest that the ORC may have a prompting role in both budding and average chronological aging. During the CLS analysis, we observed cells with enlarged volumes appearing in the population, which confirms our previous data [22]. Our flow cytometry analyses confirmed the microscopic observations and clearly showed that, during CLS, the population of enlarged cells grows with age regardless of the strain. Furthermore, analysis of the DNA content of the cells showed ploidy changes during the chronological aging, explicitly, the ploidy shift toward the haploid. The phenomenon of ploidy loss was discovered for tetraploid strains of *Candida albicans* [67] but was shown for budding yeast [68,69]. Moreover, haploidization was also proved, among other processes, for strains lacking proteins involved in the initiation of replication, e.g., Ctf18 [69]. Changes in ploidy in yeast cells may be caused by several mechanisms such as condensation defects in the incompletely replicated or unrepaired damaged DNA, disturbances in the control of proper chromosome divisions, defects in the interaction between DNA microtubules, kinetochore and spindle, and disturbances in their organization, and may also result from external factors, such as radiation or heat shock [70]. The previous data show that ploidy reduction occurs in strains lacking *LAS21*, *GGA2* or *VPS1* genes, indicating that genomic changes, such as a ploidy shift, may be caused by a single-gene deletion [68]. Additionally, the long cultivation of diploid cells (about several hundred generations) could result in ploidy reduction [71,72]. In human cells, a ploidy shift is also observed, where a prolonged replication block, or DNA damage that causes mitotic catastrophe, leads to abnormal cell division, aneuploidization or polyploidization through the failure of cytokinesis or mitotic slippage [73].

To conclude, securing the ORC function by maintaining the proper Orc1-6 subunits level in yeast is crucial in aging. Our data clearly show that an increase in the budding lifespan is strongly correlated with a lowered expression of ORC genes. The ORC subunits (Orc1-Orc5), which contain the AAA+ domain, seem to be especially important to the aging phenotypes. The ORC proteins containing the AAA+ domain also have a significant influence on cell metabolism, including cell wall modeling. We hypothesize that the lack of an effect of Orc6 dysfunction on replicative aging is related either to the auxiliary function of this protein in the activity of the complex and/or lack of changes in the lipid shift metabolic trace and similarity to the WT. The reduced expression level of ORC genes has no effect on the lifetime of mitotically active cells but significantly delays average chronological aging. On this occasion, we were able to show, for the first time, that diploid cells reduce their genomes during chronological aging. This phenomenon might be related to the exposure of cells to stressful conditions arising with time, such as starvation or other endogenous and exogenous stresses, which accompany prolonged growth in an unfavorable environment (e.g., oxidative stress, proteotoxic stress, quorum sensing signals, etc.). At the moment, the mechanism of strain haploidization has not been revealed; however, we cannot exclude any scenario. There are several different working hypotheses. One hypothesis states that the appearance of haploid cells in the yeast culture during the chronological lifespan experiment is due to sporulation. However, several arguments stand against this hypothesis. Firstly, we did not notice tetrads during the microscopic analysis of strain culture samples during the chronological lifespan assay. Secondly, the spores should not germinate when the environment is poor and nutrients are inaccessible. The second hypothesis states that what we observed reflects DNA degradation in the dead cell fraction. However, the question remains of why such degradation is limited to a single set of chromosomes. The third hypothesis states that we observed the gradual loss of one copy of the genome. Song and Petes [71] described this phenomenon for the *rad52Δ/rad52Δ* strain. This strain, lacking the Rad52 recombinase required for homologous recombination, has a very high rate of chromosome loss; thus, all chromosomes are lost with some frequency, leading to haploid cell formation. We think that this could be the case because we see the gradual shift of DNA profiles toward the left part of the graph in the DNA content histograms, which reflects a diminishing DNA content (Figure 8). This change was visible for the cells after the 17th day of cultivation and escalated after 21 days. Moreover, we noticed that the average cell size had not changed much between the 7th and 21st days of cultivation. Thus, the cells do not resemble the typical haploid cell, at least not by their size (Figure 8). The fourth hypothesis states that during chronological aging, the genomic DNA undergoes condensation over time, which makes intercalation of the fluorescent dye difficult. Subsequently, DNA content analysis by flow cytometry will artificially show the ploidy shift. Whichever of the described hypotheses will turn out to be true, our research enabled us to show the existence of yet another mechanism contributing to cellular aging.

Author Contributions: Conceptualization, M.M.; methodology, M.M., A.S., L.J., M.K.-M.; validation, M.M.; formal analysis, M.M.; investigation, K.S., A.S., L.J., M.K.-M., M.M.; resources, M.M., A.S., L.J., M.K.-M.; data curation, K.S., A.S., L.J., M.K.-M., M.M.; writing—original draft preparation, M.M., A.S.; writing—review and editing, M.M., A.S., K.S.; visualization, K.S., A.S., M.K.-M., L.J.; supervision, M.M.; project administration, M.M.; and funding acquisition, M.M., A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank Michael Lisby for kindly providing the pWJ1344 (Rad52-YFP) plasmid and for helpful suggestions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

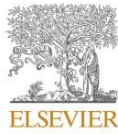
- Diffley, J.F.X. Quality control in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* **2011**, *366*, 3545–3553. [\[CrossRef\]](#)
- Bell, S.P.; Stillman, B. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of dna-replication by a multiprotein complex. *Nature* **1992**, *357*, 128–134. [\[CrossRef\]](#)
- Bell, S.P.; Mitchell, J.; Leber, J.; Kobayashi, R.; Stillman, B. The multidomain structure of *orc1p* reveals similarity to regulators of dna-replication and transcriptional silencing. *Cell* **1995**, *83*, 563–568. [\[CrossRef\]](#)
- Matsuda, K.; Makise, M.; Sueyasu, Y.; Takehara, M.; Asano, T.; Mizushima, T. Yeast two-hybrid analysis of the origin recognition complex of *Saccharomyces cerevisiae*: Interaction between subunits and identification of binding proteins. *Fems Yeast Res.* **2007**, *7*, 1263–1269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chesnokov, I.N. Multiple functions of the origin recognition complex. *Int. Rev. Cytol.* **2007**, *256*, 69–109. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gossen, M.; Pak, D.T.S.; Hansen, S.K.; Acharya, J.K.; Botchan, M.R. A *Drosophila* homolog of the yeast origin recognition complex. *Science* **1995**, *270*, 1674–1677. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Dhar, S.K.; Dutta, A. Identification and characterization of the human ORC6 homolog. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34983–34988. [\[CrossRef\]](#)
- Bell, S.P. The origin recognition complex: From simple origins to complex functions. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 659–672. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Speck, C.; Chen, Z.Q.; Li, H.L.; Stillman, B. ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 965–971. [\[CrossRef\]](#)
- Rao, H.; Stillman, B. The origin recognition complex interacts with a bipartite dna-binding site within yeast replicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 2224–2228. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Randell, J.C.W.; Bowers, J.L.; Rodriguez, H.K.; Bell, S.P. Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Mol. Cell* **2006**, *21*, 29–39. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Klemm, R.D.; Austin, R.J.; Bell, S.P. Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex. *Cell* **1997**, *88*, 493–502. [\[CrossRef\]](#)
- Semple, J.W.; Da-Silva, L.F.; Jervis, E.J.; Ah-Kee, J.; Al-Attar, H.; Kummer, L.; Heikkila, J.J.; Pasero, P.; Duncker, B.P. An essential role for Orc6 in DNA replication through maintenance of pre-replicative complexes. *Embo J.* **2006**, *25*, 5150–5158. [\[CrossRef\]](#)
- Sanchez, J.C.; Kwan, E.X.; Pohl, T.J.; Amemiya, H.M.; Raghuraman, M.K.; Brewer, B.J. Defective replication initiation results in locus specific chromosome breakage and a ribosomal RNA deficiency in yeast. *PLoS Genet.* **2017**, *13*, e1007041. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Molon, M.; Zdrag-Tecza, R.; Bilinski, T. The longevity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A comparison of two approaches for assessment the lifespan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *460*, 651–656. [\[CrossRef\]](#)
- Fabrizio, P.; Longo, V.D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* **2003**, *2*, 73–81. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mortimer, R.K.; Johnston, J.R. Life span of individual yeast cells. *Nature* **1959**, *183*, 1751–1752. [\[CrossRef\]](#)
- Minois, N.; Frajnt, M.; Wilson, C.; Vaupel, J.W. Advances in measuring lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 402–406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kaerberlein, M. Lessons on longevity from budding yeast. *Nature* **2010**, *464*, 513–519. [\[CrossRef\]](#)
- Fabrizio, P.; Pletcher, S.D.; Minois, N.; Vaupel, J.W.; Longo, V.D. Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **2004**, *557*, 136–142. [\[CrossRef\]](#)
- Kaerberlein, M.; Hu, D.; Kerr, E.O.; Tsuchiya, M.; Westman, E.A.; Dang, N.; Fields, S.; Kennedy, B.K. Increased life span due to calorie restriction in respiratory-deficient yeast. *PLoS Genet.* **2005**, *1*, 614–621. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Stepien, K.; Wojdyla, D.; Nowak, K.; Molon, M. Impact of curcumin on replicative and chronological aging in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Biogerontology* **2020**, *21*, 109–123. [\[CrossRef\]](#)
- Czachor, J.; Milek, M.; Galiniak, S.; Stepien, K.; Dzugan, M.; Molon, M. Coffee Extends Yeast Chronological Lifespan through Antioxidant Properties. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9510. [\[CrossRef\]](#)
- Kwong, M.M.Y.; Lee, J.W.; Samian, M.R.; Wahab, H.A.; Watanabe, N.; Ong, E.B.B. Identification of Tropical Plant Extracts That Extend Yeast Chronological Life Span. *Cells* **2021**, *10*, 2718. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Steffen, K.K.; MacKay, V.L.; Kerr, E.O.; Tsuchiya, M.; Hu, D.; Fox, L.A.; Dang, N.; Johnston, E.D.; Oakes, J.A.; Tchao, B.N.; et al. Yeast life span extension by depletion of 60S ribosomal subunits is mediated by Gcn4. *Cell* **2008**, *133*, 292–302. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Borkiewicz, L.; Molon, M.; Molestak, E.; Grela, P.; Horbowicz-Drozdal, P.; Wawiora, L.; Tchorzewski, M. Functional Analysis of the Ribosomal uL6 Protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cells* **2019**, *8*, 718. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Molon, M.; Molestak, E.; Kula-Maximenko, M.; Grela, P.; Tchorzewski, M. Ribosomal Protein uL11 as a Regulator of Metabolic Circuits Related to Aging and Cell Cycle. *Cells* **2020**, *9*, 1745. [\[CrossRef\]](#)
- Delaney, J.R.; Murakami, C.; Chou, A.; Carr, D.; Schleit, J.; Sutphin, G.L.; An, E.H.; Castanza, A.S.; Fletcher, M.; Goswami, S.; et al. Dietary restriction and mitochondrial function link replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Gerontol.* **2013**, *48*, 1006–1013. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

29. Ludovico, P.; Burhans, W.C. Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police. *Fems Yeast Res.* **2014**, *14*, 33–39. [[CrossRef](#)]
30. Sinclair, D.A.; Guarente, L. Extrachromosomal rDNA circles—A cause of aging in yeast. *Cell* **1997**, *91*, 1033–1042. [[CrossRef](#)]
31. Molon, M.; Panek, A.; Molestak, E.; Skoneczny, M.; Tchorzewski, M.; Wnuk, M. Daughters of the budding yeast from old mothers have shorter replicative lifespans but not total lifespans. Are DNA damage and rDNA instability the factors that determine longevity? *Cell Cycle* **2018**, *17*, 1173–1187. [[CrossRef](#)]
32. Molon, M.; Szajwaj, M.; Tchorzewski, M.; Skoczowski, A.; Niewiadomska, E.; Zadrąg-Tecza, R. The rate of metabolism as a factor determining longevity of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Age* **2016**, *38*, 11. [[CrossRef](#)]
33. Kwolek-Mirek, M.; Zadrąg-Tecza, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *Fems Yeast Res.* **2014**, *14*, 1068–1079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Torres-Rosell, J.; Sunjevaric, I.; De Piccoli, G.; Sacher, M.; Eckert-Boulet, N.; Reid, R.; Jentsch, S.; Rothstein, R.; Aragon, L.; Lisby, M. The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, U923–U972. [[CrossRef](#)]
35. Krol, K.; Antoniuk-Majchrzak, J.; Skoneczny, M.; Sienko, M.; Jendrysek, J.; Rumienczyk, I.; Halas, A.; Kurlandzka, A.; Skoneczna, A. Lack of G1/S control destabilizes the yeast genome via replication stress-induced DSBs and illegitimate recombination. *J. Cell Sci.* **2018**, *131*, jcs226480. [[CrossRef](#)]
36. Molon, M.; Zebrowski, J. Phylogenetic relationship and Fourier-transform infrared spectroscopy-derived lipid determinants of lifespan parameters in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *FEMS Yeast Res.* **2017**, *17*, fox031. [[CrossRef](#)]
37. Rosch, P.; Harz, M.; Schmitt, M.; Popp, J. Raman spectroscopic identification of single yeast cells. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 377–379. [[CrossRef](#)]
38. Chan, J.W.; Winhold, H.; Corzett, M.H.; Ulloa, J.M.; Cosman, M.; Balhorn, R.; Huser, T. Monitoring dynamic protein expression in living *E. coli*. Bacterial cells by laser tweezers raman spectroscopy. *Cytom. Part A* **2007**, *71A*, 468–474. [[CrossRef](#)]
39. Lemma, T.; Wang, J.; Arstila, K.; Hytonen, V.P.; Toppari, J.J. Identifying yeasts using surface enhanced Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part A-Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, *218*, 299–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. De Gelder, J.; De Gussem, K.; Vandenaabeele, P.; Moens, L. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, *38*, 1133–1147. [[CrossRef](#)]
41. Kawakami, H.; Katayama, T. DnaA, ORC, and Cdc6: Similarity beyond the domains of life and diversity. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Et Biol. Cell.* **2010**, *88*, 49–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bell, S.P.; Dutta, A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 333–374. [[CrossRef](#)]
43. Scholefield, G.; Veening, J.W.; Murray, H. DnaA and ORC: More than DNA replication initiators. *Trends Cell Biol.* **2011**, *21*, 188–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Dutta, A.; Bell, S.P. Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 293–332. [[CrossRef](#)]
45. Gibson, D.G.; Bell, S.P.; Aparicio, O.M. Cell cycle execution point analysis of ORC function and characterization of the checkpoint response to ORC inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* **2006**, *11*, 557–573. [[CrossRef](#)]
46. Clarey, M.G.; Erzberger, J.P.; Grob, P.; Leschziner, A.E.; Berger, J.M.; Nogales, E.; Botchan, M. Nucleotide-dependent conformational changes in the DnaA-like core of the origin recognition complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 684–690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Lee, D.G.; Bell, S.P. Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol. Cell Biol.* **1997**, *17*, 7159–7168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Asano, T.; Makise, M.; Takehara, M.; Mizushima, T. Interaction between ORC and Cdt1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Yeast Res.* **2007**, *7*, 1256–1262. [[CrossRef](#)]
49. Takara, T.J.; Bell, S.P. Multiple Cdt1 molecules act at each origin to load replication-competent Mcm2-7 helicases. *Embo J.* **2011**, *30*, 4885–4896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Garcia-Prat, L.; Martinez-Vicente, M.; Perdiguero, E.; Ortet, L.; Rodriguez-Ubreva, J.; Rebollo, E.; Ruiz-Bonilla, V.; Gutarra, S.; Ballestar, E.; Serrano, A.L.; et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature* **2016**, *529*, 37–42. [[CrossRef](#)]
51. Bartkova, J.; Rezaei, N.; Liontos, M.; Karakaidos, P.; Kletsas, D.; Issaeva, N.; Vassiliou, L.V.F.; Kolettas, E.; Niforou, K.; Zoumpourlis, V.C.; et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **2006**, *444*, 633–637. [[CrossRef](#)]
52. Gorgoulis, V.G.; Halazonetis, T.D. Oncogene-induced senescence: The bright and dark side of the response. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2010**, *22*, 816–827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Bleichert, F. Mechanisms of replication origin licensing: A structural perspective. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2019**, *59*, 195–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sugimoto, N.; Fujita, M. Molecular Mechanism for Chromatin Regulation During MCM Loading in Mammalian Cells. *DNA Replication: Old Princ. New Discov.* **2017**, *1042*, 61–78. [[CrossRef](#)]
55. Hills, S.A.; Diffley, J.F.X. DNA Replication and Oncogene-Induced Replicative Stress. *Curr. Biol.* **2014**, *24*, R435–R444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Higa, M.; Matsuda, Y.; Fujii, J.; Sugimoto, N.; Yoshida, K.; Fujita, M. TRF2-mediated ORC recruitment underlies telomere stability upon DNA replication stress. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 12234–12251. [[CrossRef](#)]
57. Tatsumi, Y.; Ezura, K.; Yoshida, K.; Yugawa, T.; Narisawa-Saito, M.; Kiyono, T.; Ohta, S.; Obuse, C.; Fujita, M. Involvement of human ORC and TRF2 in pre-replication complex assembly at telomeres. *Genes Cells* **2008**, *13*, 1045–1059. [[CrossRef](#)]

58. Yoshida, R.; Tamura, T.; Takaoka, C.; Harada, K.; Kobayashi, A.; Mukai, Y.; Fukusaki, E. Metabolomics-based systematic prediction of yeast lifespan and its application for semi-rational screening of ageing-related mutants. *Aging Cell* **2010**, *9*, 616–625. [[CrossRef](#)]
59. Petschnigg, J.; Wolinski, H.; Kolb, D.; Zellnig, G.; Kurat, C.F.; Natter, K.; Kohlwein, S.D. Good Fat, Essential Cellular Requirements for Triacylglycerol Synthesis to Maintain Membrane Homeostasis in Yeast. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 30981–30993. [[CrossRef](#)]
60. Handee, W.; Li, X.B.; Hall, K.W.; Deng, X.X.; Li, P.; Benning, C.; Williams, B.L.; Kuo, M.H. An Energy-Independent Pro-longevity Function of Triacylglycerol in Yeast. *PLoS Genet.* **2016**, *12*, e1005878. [[CrossRef](#)]
61. Longo, V.D.; Shadel, G.S.; Kaeberlein, M.; Kennedy, B. Replicative and Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab.* **2012**, *16*, 18–31. [[CrossRef](#)]
62. Longo, V.D.; Gralla, E.B.; Valentine, J.S. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*—Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12275–12280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Fabrizio, P.; Pozza, F.; Pletcher, S.D.; Gendron, C.M.; Longo, V.D. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* **2001**, *292*, 288–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Fabrizio, P.; Liou, L.L.; Moy, V.N.; Diaspro, A.; SelverstoneValentine, J.; Gralla, E.B.; Longo, V.D. SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics* **2003**, *163*, 35–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Lavoie, H.; Whiteway, M. Increased respiration in the sch9 Delta mutant is required for increasing chronological life span but not replicative life span. *Eukaryot. Cell* **2008**, *7*, 1127–1135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Ohnuki, S.; Ohya, Y. High-dimensional single-cell phenotyping reveals extensive haploinsufficiency. *PLoS Biol.* **2018**, *16*, e2005130. [[CrossRef](#)]
67. Legrand, M.; Lephart, P.; Forche, A.; Mueller, F.M.C.; Walsh, T.; Magee, P.T.; Magee, B.B. Homozygosity at the MTL locus in clinical strains of *Candida albicans*: Karyotypic rearrangements and tetraploid formation. *Mol. Microbiol.* **2004**, *52*, 1451–1462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Krol, K.; Brozda, I.; Skoneczny, M.; Bretne, M.; Skoneczna, A. A Genomic Screen Revealing the Importance of Vesicular Trafficking Pathways in Genome Maintenance and Protection against Genotoxic Stress in Diploid *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120702. [[CrossRef](#)]
69. Alabrudzinska, M.; Skoneczny, M.; Skoneczna, A. Diploid-Specific Genome Stability Genes of *S. cerevisiae*: Genomic Screen Reveals Haploidization as an Escape from Persisting DNA Rearrangement Stress. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21124. [[CrossRef](#)]
70. Skoneczna, A.; Kaniak, A.; Skoneczny, M. Genetic instability in budding and fission yeast—sources and mechanisms. *Fems Microbiol. Rev.* **2015**, *39*, 917–967. [[CrossRef](#)]
71. Song, W.; Petes, T.D. Haploidization in *Saccharomyces cerevisiae* Induced by a Deficiency in Homologous Recombination. *Genetics* **2012**, *191*, 279–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Gerstein, A.C.; McBride, R.M.; Otto, S.P. Ploidy reduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Lett.* **2008**, *4*, 91–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Vitale, I.; Galluzzi, L.; Castedo, M.; Kroemer, G. Mitotic catastrophe: A mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 384–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11.2. Disorders in the CMG helicase complex increase the proliferative capacity and delay chronological aging of budding yeast

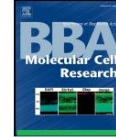
BBA - Molecular Cell Research 1871 (2024) 119621



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular Cell Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr



Research paper

Disorders in the CMG helicase complex increase the proliferative capacity and delay chronological aging of budding yeast



Karolina Stępień^a, Adrianna Skoneczna^{b,*}, Monika Kula-Maximenko^c, Łukasz Jurczyk^d, Mateusz Mołoń^{e,*}

^a Institute of Medical Sciences, Rzeszów University, 35-959 Rzeszów, Poland

^b Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, 02-106 Warsaw, Poland

^c The Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, 30-239 Kraków, Poland

^d Institute of Agricultural Sciences, Rzeszów University, 35-601 Rzeszów, Poland

^e Institute of Biology, Rzeszów University, 35-601 Rzeszów, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Aging
Cell cycle
CDC45
CMG helicase
GINS complex
MCM complex

ABSTRACT

The replication of DNA requires specialized and intricate machinery. This machinery is known as a replisome and is highly evolutionarily conserved, from simple unicellular organisms such as yeast to human cells. The replisome comprises multiple protein complexes responsible for various steps in the replication process. One crucial component of the replisome is the Cdc45-MCM-GINS (CMG) helicase complex, which unwinds double-stranded DNA and coordinates the assembly and function of other replisome components, including DNA polymerases. The genes encoding the CMG helicase components are essential for initiating DNA replication. In this study, we aimed to investigate how the absence of one copy of the CMG complex genes in heterozygous *Saccharomyces cerevisiae* cells impacts the cells' physiology and aging. Our data revealed that these cells exhibited a significant reduction in transcript levels for the respective CMG helicase complex proteins, as well as disruptions in the cell cycle, extended doubling times, and alterations in their biochemical profile. Notably, this study provided the first demonstration that cells heterozygous for genes encoding subunits of the CMG helicase exhibited a significantly increased reproductive potential and delayed chronological aging. Additionally, we observed a noteworthy correlation between RNA and polysaccharide levels in yeast and their reproductive potential, as well as a correlation between fatty acid levels and cell doubling times. Our findings also shed new light on the potential utility of yeast in investigating potential therapeutic targets for cancer treatment.

1. Introduction

The process of chromosomal DNA replication is conserved across all eukaryotes. DNA replication is a complex process that involves multiple proteins to ensure its accuracy. A highly regulated and coordinated collaboration among DNA replication factors is required for the precise and efficient duplication of genetic information. The DNA replication machinery plays a pivotal role in cell proliferation. One of the essential replication enzymes is DNA helicase, an enzyme responsible for unwinding double-stranded DNA before replicon assembly [1]. The replication helicase consists of three components: the catalytic core, which is the heterohexameric Mcm2-Mcm7 minichromosome maintenance (MCM) complex; the tetrameric Psf1-Psf2-Psf3-Sld5 (GINS) complex, which forms accessory proteins; and the Cdc45 protein, which serves as

the DNA replication initiation factor. Together, these components form the CMG (Cdc45, MCM, GINS) helicase complex [2,3]. Given that the replication machinery is comprised of a variety of proteins and regulatory factors, any malfunction in these proteins can lead to a reduction in replication efficiency, resulting in replication stress. Replication stress caused by imbalances in replication factors makes cells more susceptible to damage. For instance, both excessive CMG helicase activity and delays in its functioning can lead to DNA damage. Excessive activity exposes single-stranded DNA regions to damaging factors, while delays create DNA strand tension that may result in DNA breakage and, ultimately, cell death [4–6]. Therefore, disrupting the replication machinery or its dysregulation could be used as a strategy for creating drugs that induce replication stress, particularly in cancer cells [7]. Additionally, inhibiting helicase activity in pathogens could prove crucial in

* Corresponding authors.

E-mail addresses: ada@ibb.waw.pl (A. Skoneczna), mmolon@ur.edu.pl (M. Mołoń).

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2023.119621>

Received 10 May 2023; Received in revised form 8 October 2023; Accepted 22 October 2023

Available online 29 October 2023

0167-4889/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

the fight against various infectious diseases. Overall, helicase has become an attractive therapeutic target for the treatment of bacterial and viral infections, autoimmune disorders, and cancers. Proteins associated with the CMG helicase complex are vital for cell cycle progression, as well as for both the initiation and elongation steps during DNA replication. However, it remains unclear whether disturbances in pre-replication complex formation affect cell physiology and aging. In eukaryotes, the pre-replication complex typically consists of six subunits of the ORC complex (Orc1-Orc6), Cdc6, Cdt1, and a heterohexameric MCM complex (Mcm2-Mcm7). Recent research has shown that reduced expression of *ORC1-ORC6* genes, which encode subunits of the origin recognition complex (ORC), significantly extends both budding and average chronological lifespans. The ORC complex is yet another replication initiation factor that initiates DNA replication in eukaryotes by binding to DNA replication origins [8].

Aging is a complex process characterized by the loss of the ability to regain homeostasis following stress, ultimately leading to increased mortality and morbidity. It is also defined as a progressive decline in physiological integrity accompanied by decreasing fertility and an increased risk of mortality with age [9,10]. Two primary approaches are employed to study yeast aging. Replicative lifespan is defined as the number of buds produced before cell death. It has been suggested that yeast replicative aging is analogous to aging observed in stem cells of higher eukaryotes [11]. A cell's chronological lifespan is determined based on the time it survives in a non-budding state, and survival is measured by its ability to form colonies (in a stationary phase culture, survival decreases over time). Chronological aging in yeast is akin to aging in non-dividing cells [12]. Despite extensive research on this topic, the links between replication initiation and aging remain largely unknown.

Our study aims to investigate the impact of a reduction in the copy number of genes encoding the subunits of the CMG complex on diploid cell proliferation, their cell cycle, aging, and biochemical profile. The strong amino acid sequence homology between yeast and human components of CMG complexes suggests the potential extrapolation of our findings to human cells. Our results demonstrate that a decrease in the mRNA levels of any of the CMG helicase subunits leads to a significant increase in budding lifespan and delays the average chronological aging, likely attributable to a cell cycle delay. Additionally, we have reaffirmed previous findings regarding the reduction in DNA content during the chronological aging of diploid cells. Using Raman spectrometry techniques, we have also established a robust negative correlation between the level of polysaccharides and cell reproductive potential, as well as a strong correlation between cell doubling time and fatty acid levels.

2. Materials and methods

2.1. Strains and growth conditions

All yeast strains used in this study are listed in Table 1.

Yeast cells were cultured in a standard rich liquid YPD medium (1 % Difco Yeast Extract, 1 % Yeast Bacto-Peptone, 2 % (w/v) glucose) using a rotary shaker set at 150 rpm or on solid YPD medium containing 2 % agar. The experiments were conducted at a temperature of 28 °C.

For the CLS assay, the SDC medium was employed, which consisted of 0.67 % Bacto-yeast nitrogen base (without amino acids) and 2 % (w/v) glucose. It was further supplemented with L-histidine (60 mg/L), L-leucine (180 mg/L), and uracil (60 mg/L).

2.2. Growth rate determination

The growth assays were conducted in a liquid medium. Yeast cell suspensions were incubated at 28 °C for 12 h with continuous shaking (using a Heidolph Incubator 1000 at 1200 rpm). Growth was assessed by measuring the absorbance at 600 nm using an Anthos 2010 type 17,550 microplate reader at 2-h intervals over a 12-h period. In the second

Table 1
Strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
BY4743 a/α	<i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Open Biosystems
CDC45/ <i>cdc45Δ</i>	<i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; ylr103c::kanMX4/YLR103c</i>	Open Biosystems
MCM2/ <i>mcm2Δ</i>	<i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; ypl023c::kanMX4/YBL023c</i>	Open Biosystems
MCM3/ <i>mcm3Δ</i>	<i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; yel032w::kanMX4/YEL032w</i>	Open Biosystems
MCM4/ <i>mcm4Δ</i>	<i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; ypr019w::kanMX4/YPR019w</i>	Open Biosystems
MCM5/ <i>mcm5Δ</i>	<i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; ylr274w::kanMX4/YLR274w</i>	Open Biosystems
MCM6/ <i>mcm6Δ</i>	<i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; ygl201c::kanMX4/YGL201c</i>	Open Biosystems
MCM7/ <i>mcm7Δ</i>	<i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; ybr202w::kanMX4/YBR202w</i>	Open Biosystems
PSF1/ <i>psf1Δ</i>	<i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; ydr013w::kanMX4/YDR013w</i>	Open Biosystems
PSF2/ <i>psf2Δ</i>	<i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; yjl072c::kanMX4/YJL072c</i>	Open Biosystems
PSF3/ <i>psf3Δ</i>	<i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; yol146w::kanMX4/YOL146w</i>	Open Biosystems
SLD5/ <i>sls5Δ</i>	<i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; ydr489w::kanMX4/YDR489w</i>	Open Biosystems
<i>ndt80Δ</i> / <i>ndt80Δ</i>	<i>Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; yhr124w::kanMX4/yhr124w::kanMX4</i>	Open Biosystems

approach, cell counts per mL were determined for each culture using a Malassez chamber (Carl Roth, Lauda-Königshofen, Germany).

2.3. Calculation of the mean doubling time

The mean doubling time was computed for each analyzed strain following the method outlined in a previous study [13]. Doubling times were calculated as part of the regular budding lifespan determination. To account for the initial delay and longer doubling times during the first two reproductive cycles on a new medium, we excluded these cycles from our calculations. A minimum of 90 cells were examined in two independent experiments, with 45 cells included in each experiment, and the results were reported as mean values with standard deviations (SD). Statistical significance was determined by a *p*-value of <0.001 using one-way ANOVA.

2.4. Measurement of cell metabolic activity

FUN-1 was employed to measure yeast metabolic activity following the manufacturer's instructions (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), with minor modifications as detailed in [14]. The fluorescence of the cell suspension was assessed using a TECAN Infinite 200 microplate reader after a 15-min incubation at 28 °C in the dark (Grodig, Austria). Cell metabolic activity was quantified by calculating the change in the ratio of red to green fluorescence.

As per the protocol, the FUN1 stain permeates the cell and initially stains the cytoplasm with green fluorescence. Subsequent processing of the dye by live cells leads to the formation of red vacuolar structures, often taking on a stick-like shape, concurrent with a decrease in green

cytoplasmic fluorescence (deceased cells exhibit no red structures). The development of these intravacuolar structures necessitates both intact plasma membrane integrity and metabolic functionality. Mean values and standard deviations (SD) were computed from data obtained from at least five cultures for each strain.

2.5. Sporulation efficiency assay

Following pre-growth in rich YPD medium, diploid strains were cultivated for 14 days at 28 °C on sporulation medium, which consisted of 0.1 % yeast extract, 1 % potassium acetate, 0.05 % glucose, and 2 % agar, as previously outlined [15]. Subsequently, cells were resuspended in water. Both cells and asci were quantified using a cell-counting chamber (Malassez), with a minimum of 300 cells counted per sample.

The sporulation frequency was expressed as a percentage of the ascus count relative to the total cell count, normalized to the wild-type (WT) strain. Mean values and standard deviations (SD) were computed from data collected from at least three cultures for each strain.

2.6. Flow cytometry analysis

Samples for cytometric analysis were prepared following the protocol outlined in the reference [15]. In brief, cells were harvested, washed with water, and subsequently fixed with chilled (−20 °C) 70 % ethanol (Polmos, Warsaw, Poland) for 2 h at room temperature. Following fixation, cells were washed with FACS buffer (0.2 M Tris-HCl, pH 7.4, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA, and 20 mM EDTA, Merck, Darmstadt, Germany) and then incubated for 2 h at 37 °C in FACS buffer containing 1 mg per ml RNase A (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) to digest any RNA present in the samples. After another wash with phosphate-buffered saline (PBS), cells were stained with 100 µL of propidium iodide solution (50 µg per ml in PBS; Calbiochem, San Diego, CA, USA) overnight at 4 °C in the dark.

Subsequently, 900 µL of PBS was added, and the cells underwent three rounds of sonication, each lasting 10 s, in an ultrasonic bath (Branson 2800, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT, USA) before FACS analysis to assess DNA content. The analysis was carried out using a FACS Calibur analyzer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), with a total of 10,000 cells counted in a single assay. At least three independent experiments were conducted for each strain and at selected time points during the CLS assay. Cells were analyzed with regard to DNA content and cell size, utilizing FL2 and FSC channels, respectively. The representative histograms are presented.

Cell cycle analysis was conducted on exponentially growing cells, utilizing two control strains - one haploid and one diploid - to facilitate the identification of cells in their respective cell cycle phases. The mean percentage of cells in the G1, S, and G2 phases of the cell cycle was determined based on data obtained from five independent biological replicates for each strain, including the wild-type (WT) control, with consideration given to the generation time. Standard deviations were also computed. To assess the statistical significance of differences between the CMG/cmg strain and the control in each cell cycle phase, a Student's *t*-test was employed.

2.7. Determination of budding lifespan

Cells were arranged on a YPD medium plate following an overnight growth period, employing a micromanipulator. The budding lifespan was assessed under microscopic examination, following the procedure outlined in reference [16]. The count of buds formed by each individual mother cell served as an indicator of its reproductive potential or budding lifespan. A minimum of 90 cells were meticulously examined across two independent experiments. The analysis was conducted utilizing a Nikon Eclipse E200 optical microscope (Nikon, Amsterdam, Netherlands) equipped with an attached micromanipulator.

2.8. Determination of the total lifespan

The total lifespan of a single mother yeast cell is defined as its duration of life, expressed in units of time. It is determined by summing the reproductive lifespan (the time between the first and last budding) and the post-reproductive lifespan (the time between the last budding and cell death). The assessment of the total lifespan in *S. cerevisiae* yeast followed the procedure described in [17], with slight modifications from [16]. Exponentially growing yeast cultures were sampled in 10-µl aliquots and transferred onto YPD plates with a solid medium containing Phloxine B (10 µg/mL). In each experimental run, 45 individual cells were subjected to analysis. Throughout the manipulation, the plates were maintained at 28 °C for 15 h and subsequently at 4 °C during the night. The results are based on measurements obtained from a minimum of 90 cells, which were analyzed in at least two independent experiments. The analysis was conducted via micromanipulation, utilizing a Nikon Eclipse E200 optical microscope equipped with a micromanipulator.

2.9. Chronological lifespan (CLS) assays

The chronological lifespan of cells incubated in a minimal medium (SDC) was determined following the method outlined in the reference [18]. In essence, yeast was cultured in an SDC medium supplemented with essential amino acids and 2 % (*w/v*) glucose. The assessment of chronological lifespan took place within the SDC medium, involving the measurement of cell viability at intervals of 2, 4, 7, 14, 21, and 28 days of cultivation. Propidium iodide staining was employed for quantitative survival assessment. The data presented here are the average values derived from a minimum of three independent experiments.

2.10. RNA isolation, reverse transcription and RT-qPCR

RNA extraction, reverse transcription, and RT-qPCR procedures were conducted following the methods previously outlined [8]. The primers employed for quantitative Real-Time PCR can be found in Table 2.

2.11. Raman spectroscopy

Raman spectroscopy was employed to analyze the chemical composition of yeast. The measurements were conducted using a Nicolet NXR 9650 FT-Raman Spectrometer equipped with an Nd:YAG laser (1064 nm) and an InGaAs detector. Samples of yeast were subjected to lyophilization prior to analysis. During the FT-Raman spectra measurements, the laser power was set at 0.5 W, with a laser beam diameter of 50 µm and a spectral resolution of 8 cm⁻¹. Spectra were recorded within the range of 250 to 1800 cm⁻¹, representing an average of 64 scans. Subsequent processing of Raman spectra was carried out using the Omnic/Thermo Scientific software and OriginLab programs.

Principal Component Analysis (PCA) was employed to illustrate the correlation between the chemical composition and the yeast lines. PCA is a non-parametric technique used to extract information regarding similarities and differences among samples. These methods were applied within the Raman spectral ranges corresponding to polysaccharides, lipids, and RNA. The analysis and chart generation were conducted using OriginLab software.

2.12. Statistical analysis

The presented results are expressed as mean ± SD values obtained from all tested samples across two independent experiments. To assess differences between the WT and isogenic heterozygous diploid strains, one-way ANOVA and Dunnett's post hoc tests were employed. Statistical significance was considered when *p* < 0.05. The statistical analysis was carried out using Statistica 10.0 software, while statistical and multi-dimensional analysis for the Raman spectroscopy data was performed

Table 2
Primers used for RT-qPCR gene expression analysis.

Gene name	Forward Primer 5' -> 3'	Reverse Primer 5' -> 3'	Source
<i>ACT1</i>	AAGCTTGTTCATCCTCT	GTACCAACGGACATAAAG	<i>in this study</i>
<i>CDC45</i>	TAAATTGCTTGAACGGAGC	TCATCTCGTCTTCTCGTC	<i>in this study</i>
<i>MCM2</i>	GCAAAGACGAAAGAGAGAA	ATTCGGAGTAACCTGTTAGCC	<i>in this study</i>
<i>MCM3</i>	CTTGAAGCTTTCGTTCAAA	GTGGACAGATCGATAAGCT	<i>in this study</i>
<i>MCM4</i>	GTACCAACGTCAGTATCCAG	GTATAGTTCTCGTGGTAGT	<i>in this study</i>
<i>MCM5</i>	TTTGATTCTGAACACGCTCT	TGTTGTGTCTGCAATTC	<i>in this study</i>
<i>MCM6</i>	CATGAGAGAAAATGGTCTC	ACCTTCGGATCTTCAATG	<i>in this study</i>
<i>MCM7</i>	GGAGACTGAGGAATGAGAGA	TCAGTTTATCCTCGACAAA	<i>in this study</i>
<i>PSF1</i>	TTTATCCGGCTCTTAACTGC	ATCAGACTGCCTACGAAAA	<i>in this study</i>
<i>PSF2</i>	GGTCTTTGGATGGCTCTAT	CGGCAACTCACTAAACCTAT	<i>in this study</i>
<i>PSF3</i>	AGAACCTGTAACCTTTGTGG	TGGTAGACTGAAGAAATGC	<i>in this study</i>
<i>SLD5</i>	GCCTATGCCTAACGAATCTA	ATTGGCGCAAATAAAGTAGG	<i>in this study</i>

using PAST 3.0 and Origin 2018 software.

3. Results

3.1. Heterozygosity in any gene encoding subunit of the CMG helicase in the diploid cell leads to growth rate disorders likely resulting from the delay in G1/S transition during the cell cycle

The CMG helicase is comprised of 11 proteins, specifically: Cdc45, Mcm2-Mcm7 (forming the MCM complex), Psf1-Psf3, and Sld5 (part of the GINS complex). Given the essential nature of these proteins for cell growth, our study employed heterozygous yeast strains in diploid organisms with respect to the genes encoding the CMG helicase subunits. For simplicity, we will refer to these strains as CMG/cmg strains. These strains were sourced from the yeast knockout collection (Table 1), with BY4743 serving as the control. These strains facilitated a series of experiments aimed at elucidating the role of the CMG helicase in chronological aging.

Firstly, we conducted a comparison of the growth rate and average doubling time of CMG/cmg strains on YPD medium containing 2 % glucose. Figs. 1a and b clearly demonstrate that nearly all of the analyzed strains exhibited a slower growth rate. To estimate the growth rate, we employed two different approaches: changes in optical density and changes in the number of cells per mL of culture. We have presented the results of both measurements because the analysis of doubling time revealed a statistically significant extension of the cell cycle, a phenomenon not observed in the growth rate analysis (Fig. 1a). This phenotype might be associated with alterations in various cellular characteristics, including cell size, transparency, granularity, and cell wall thickness among the analyzed strains. Consequently, we observed that all analyzed CMG/cmg strains exhibited cell cycle defects (Fig. 1b).

As demonstrated in Fig. 1c, the mean cell doubling time increased significantly for all assayed strains when compared to the wild type (WT). The calculation of the average doubling time of a single cell was performed during the budding lifespan analysis. This method represents the most precise means of estimating doubling time since it is applied to individual cells rather than the entire population. Several factors contribute to the estimation of doubling time-based on the growth curve, including the size of individual cells in the population and the initial doubling of virgin cells.

Next, we investigated whether sporulation efficiency was affected in the CMG/cmg strains. As depicted in Fig. 1d, nearly all the tested strains displayed altered sporulation efficiency; however, not all strains exhibited changes in the same direction. A significant reduction, approximately 90 %, in sporulation efficiency was observed exclusively in the *MCM2/mcm2Δ* strain. In contrast, the *MCM7/mcm7Δ* and *PSF2/psf2Δ* strains demonstrated an approximately 80 % increase in sporulation efficiency. For other strains, mild improvements in sporulation efficiency were noted, with the *CDC45/cdc45Δ* strain behaving identically to the WT. These data suggest that the copy number of genes encoding subunits of the CMG complex has an impact on meiosis.

Furthermore, it is worth noting that no more than two spores from each tetrad in any of the CMG/cmg strains were viable, confirming the essentiality of CMG helicase subunits (data not shown).

We also assessed whether the CMG/cmg strains exhibited differences from the WT strains in terms of other phenotypes. To evaluate yeast vitality, we employed FUN-1 staining, which measures the metabolic activity of the strains under examination. Cellular metabolic activity is indicated by a shift in the red ($\lambda = 575$ nm) to green ($\lambda = 535$ nm) fluorescence ratio. Higher red/green fluorescence ratios indicate increased metabolic activity in the cells. Most of the strains displayed a tendency toward higher metabolic activity compared to the WT. However, this tendency became statistically significant for the *MCM2/mcm2Δ* and *MCM4/mcm4Δ* strains ($p < 0.05$) and the *MCM7/mcm7Δ* and *PSF1/psf1Δ* strains ($p < 0.01$) (Fig. 1e).

Considering our anticipation of potential replication disruptions in the CMG/cmg strains due to potentially reduced levels of proteins involved in this process, we conducted a flow cytometry analysis of propidium iodide-stained cells to investigate any cell cycle abnormalities (Fig. 2a). When the generation times of the analyzed strains are similar, changes in the percentage of cells in a specific cell cycle phase in asynchronously growing cells are typically indicative of the duration of that phase. However, when generation times vary, these differences must be taken into account when analyzing the experimental data [19]. On average, the generation times of the tested strains differed by approximately 10 %, with the *MCM7/mcm7Δ* strain being the exception, displaying a 21 % longer generation time compared to the WT. We factored in these differences and calculated the mean number of cells in specific cell cycle phases for all tested strains relative to the WT.

In the asynchronous culture of exponentially growing yeast populations, most of the analyzed strains exhibited changes in the percentage of cells within various cell cycle phases (Fig. 2b). The most noticeable alteration was observed in the number of G1 phase cells, which accumulated in all strains except for *SLD5/sld5Δ* and *MCM3/mcm3Δ*. Additionally, the *CDC45/cdc45Δ* strain displayed an increased accumulation of S phase cells, while the *MCM7/mcm7Δ* strain showed a significant increase in the number of G2 phase cells.

To address the question regarding the expression levels of genes encoding CMG helicase components in heterozygous CMG/cmg strains, we conducted a real-time PCR analysis. The experiment revealed a noteworthy reduction ($p < 0.05$) in the expression of all the examined genes in comparison to the wild type (WT), as depicted in Fig. 3. The most significant decrease was observed in the genes responsible for encoding the GINS complex subunits and the *MCM2* gene, which exhibited a reduction of over 50 % when compared to the WT.

3.2. Reduced expression of genes encoding the CMG complex components prolongs the reproductive potential and chronological lifespan

The rate of cellular aging constitutes a pivotal determinant in assessing the physiological condition of cells. Consequently, we inquired whether the reproductive potential, total lifespan, and chronological

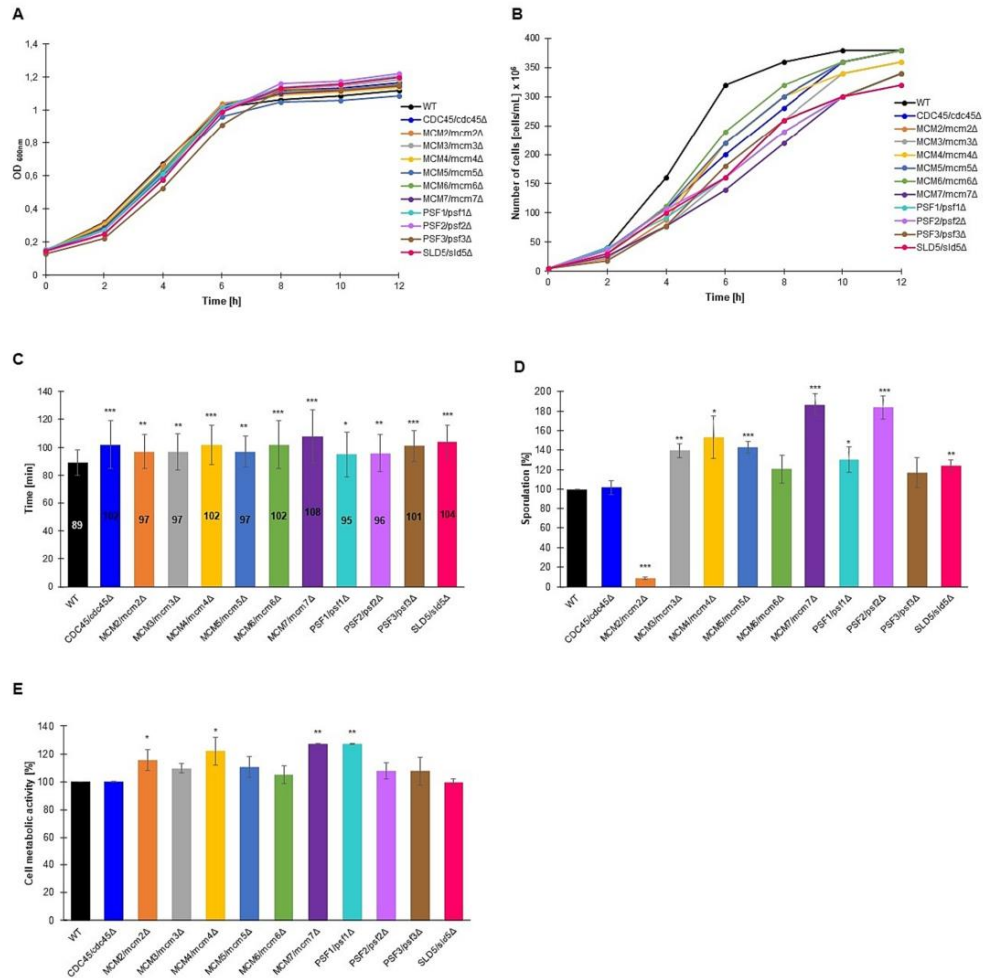


Fig. 1. Growth and metabolic phenotypes of heterozygous strains lacking one copy of the gene encoding a subunit of the CMG helicase. Comparison of growth curves for respective heterozygous strains and WT controls (BY4743). The density of the culture was determined by measuring the optical density at 600 nm (A) or the number of cells per mL (B). An average doubling time for the same strains as in (A) during the reproducing period. The error bars indicate standard deviations from two independent experiments (C). Sporulation frequency of the yeast strains heterozygous with respect to the CMG complex subunits encoding genes and the diploid control (BY4743) (D). Metabolic activity of the cells was estimated with FUN-1 stain for respective heterozygous strains and WT. Data are expressed as mean \pm SD from three independent experiments. Bars indicate SD (E). Statistical significance was assessed using ANOVA and Dunnett's post hoc test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) compared to WT.

aging were altered in the CMG/cmg strains. To gauge the age of mitotically active yeast cells, we employed the number of daughter cells produced by the mother cell, a conventional method. The total lifespan is the sum of the time a yeast cell spends reproducing and its post-daughter-production survival time.

To investigate the aging of mitotically active cells, we adopted a single-cell analysis approach. As illustrated in Fig. 4a, all the examined heterozygous strains displayed an enhanced capacity for reproduction

compared to the wild type (WT). Only in the case of the *MCM2/mcm2Δ* heterozygous strain did the observed changes lack statistical significance. Remarkably, the *MCM3/mcm3Δ*, *MCM4/mcm4Δ*, *PSF3/psf3Δ*, and *SLD5/sld5Δ* strains exhibited the most substantial increases in reproductive potential, nearly 50 % higher than WT ($p < 0.001$). The data derived from the analysis of reproductive potential unequivocally demonstrate that the downregulation of genes encoding the CMG helicase components plays a pivotal role in cellular reproductive capacity.

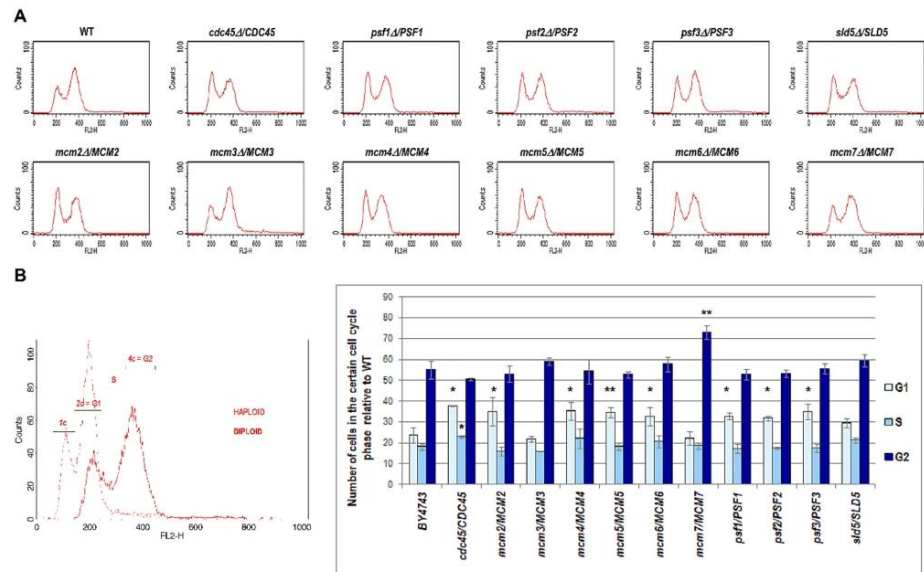


Fig. 2. Cells lacking one copy of the genes encoding subunits of the CMG helicase showed a slight delay in G1/S transition. (A) Flow cytometry analysis of the diploid WT strain (BY4743) and the isogenic heterozygous strains *CDC45/cdc45Δ*, *MCM2/mcm2Δ*, *MCM3/mcm3Δ*, *MCM4/mcm4Δ*, *MCM5/mcm5Δ*, *MCM6/mcm6Δ*, *MCM7/mcm7Δ*, *PSF1/psf1Δ*, *PSF2/psf2Δ*, *PSF3/psf3Δ*, and *SLD5/sld5Δ*. The representative histograms from three biological repetitions are presented. (B) Quantification of the cell cycle analysis. On the left, histograms for control strains, BY4741 (haploid) and BY4743 (diploid), with the gating conditions used to calculate the number of cells in the individual cell cycle phases. The graph on the right shows the quantification of the cell cycle analysis results. The percentage of cells in the specific cell cycle phase was calculated considering the strains' generation time and shown with respect to WT. The mean of five biological replicates is shown. Bars indicate standard deviations. Statistical significance with respect to the cell cycle phase of the WT control was assessed using Student's t-test (* p-val < 0.05; ** p-val < 0.01; *** p-val < 0.001).

As previously mentioned, we also ascertained the time parameters during replicative aging. Given the impact of reproductive potential, cell cycle irregularities, and increased doubling time (Fig. 1b) on reproductive lifespan, we anticipated that the studied CMG/cmg strains would exhibit an extended replicative lifespan (the duration of single-cell reproduction). Indeed, as depicted in Fig. 4b, all the scrutinized heterozygous strains displayed significantly prolonged replicative lifespans. However, for the *MCM2/mcm2Δ* strain, this extension lacked statistical significance.

Yeast cells don't undergo cell death immediately after reproduction; instead, they continue to exist for a specific duration known as the post-reproductive lifespan. As vividly illustrated in Fig. 4c, it becomes evident that the post-reproductive lifespans of the CMG/cmg strains experience a significant reduction. When assessing the post-reproductive lifespan, it's notable that the *MCM3/mcm3Δ* strain exhibited the briefest period following reproduction among all the strains tested. Conversely, the *MCM2/mcm2Δ* strain, which displayed a reproductive potential similar to that of the WT, demonstrated the longest post-reproduction lifespan.

We also determined the total lifespan of mitotically active cells. Interestingly, although there are no statistically significant differences in terms of total lifespan, it is slightly shorter on average compared to the control (Fig. 4d). Additionally, the results regarding the maximum survival time are quite intriguing. A notable difference was observed in the maximum survival time of heterozygous cells when compared to WT. As depicted in Fig. 4d, the WT strains exhibited the longest survival (297 h), followed by *MCM7/mcm7Δ* and *PSF3/psf3Δ* (262 h). In contrast, *MCM4/mcm4Δ* (147 h) and *PSF1/psf1Δ* (174 h) displayed shorter

lifespans.

Lastly, we demonstrated a correlation between reproductive or post-reproductive lifespan and reproductive potential. The trend line in Fig. 5a reveals a strong positive correlation between the average reproductive lifespan and average reproductive potential, with a Pearson correlation coefficient of 0.955. Furthermore, we observed a negative correlation between post-reproductive lifespan and reproductive potential, with a Pearson correlation coefficient of -0.86 (Fig. 5b).

The second aging model employed in this study, referred to as the chronological aging model, enables us to assess the aging of post-mitotic cells within the analyzed population. One significant advantage of utilizing the CLS parameter is its ability to gauge the survival of non-budding cells, making it a suitable model for aging in post-mitotic mammalian cells, including humans. Monitoring CLS is a straightforward method that does not necessitate micromanipulation, as it relies on the cultivation of large populations of yeast cells, thereby facilitating longevity screening.

We employed two approaches for CLS analysis: fluorescent labeling of deceased cells and the conventional method of assessing survival by counting colony-forming units. As depicted in Fig. 6a and b, all CMG/cmg strains exhibited delayed senescence during the initial 14 days of the experiment, with the exception of *SLD5/sld5Δ*. Intriguingly, none of the strains were capable of forming colonies beyond the 21-day mark in the CLS experiment, whereas the WT strain remained viable. Approximately 15 % of cells within the WT strain population retained their viability, a statistically significant difference when compared to the CMG/cmg strains ($p < 0.001$) (Fig. 6a).

A standard microscopic analysis revealed a progressive increase in

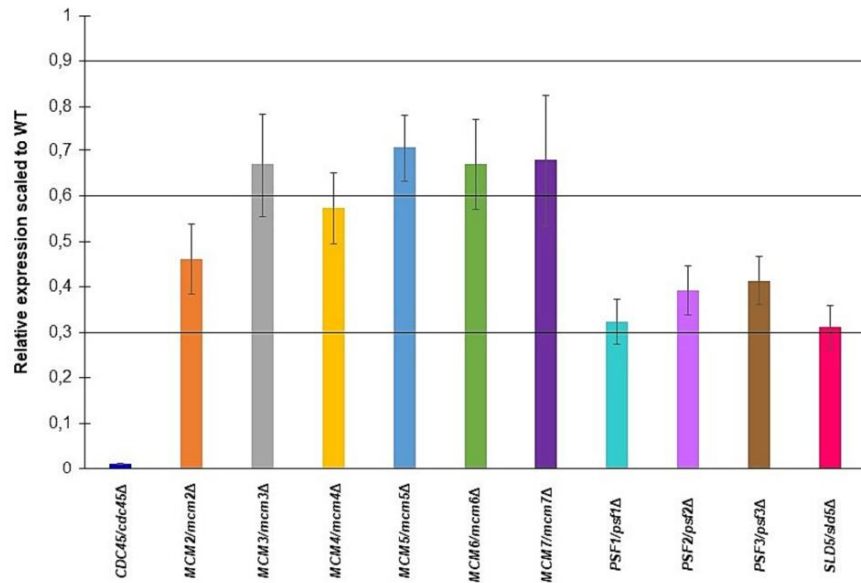


Fig. 3. Real-time-PCR analysis showed a decrease in the expression of genes encoding the CMG complex components in the respective CMG/cmg strains. The relative expression ratio of *CDC45*, *MCM2*, *MCM3*, *MCM4*, *MCM5*, *MCM6*, *PSF1*, *PSF2*, *PSF3*, *SLD5* normalized to *ACT1*, and to the expression level in WT in the *CDC45/cdc45Δ*, *MCM2/mcm2Δ*, *MCM3/mcm3Δ*, *MCM4/mcm4Δ*, *MCM5/mcm5Δ*, *MCM6/mcm6Δ*, *MCM7/mcm7Δ*, *PSF1/psf1Δ*, *PSF2/psf2Δ*, *PSF3/psf3Δ*, and *SLD5/sld5Δ* strains, respectively, was calculated from five independent repetitions. Standard deviation was also counted. All results were statistically significant, with $p < 0.05$.

cell size throughout the CLS experiment. To thoroughly assess the extent of this phenotype, we conducted a flow cytometry analysis. Our data clearly demonstrated a successive increase in cell size throughout the experiment, except for *MCM2/mcm2Δ* and *CDC45/cdc45Δ* strains, which exhibited larger cell sizes from the outset of the CLS experiment (Fig. 7). Notably, the smallest cells were observed at the experiment's commencement (2 days), while the largest ones were documented on days 14 and 21 of the study.

As cell size is known to positively correlate with ploidy, we also conducted tests to assess the DNA content of the cells, considering that replication stress can lead to abnormalities in DNA content. Remarkably, we observed a decline in viability and a reduction in ploidy levels over time in all CMG/cmg strains and the WT control (Fig. 7). This phenomenon mirrors findings reported recently in the chronological aging of diploid yeast cells with reduced expression of *ORC1-ORC6* genes, suggesting its widespread occurrence. One possible explanation for the emergence of haploid cells within the yeast population undergoing the chronological lifespan experiment is sporulation. To investigate this hypothesis, we employed the sporulation-deficient strain *ndt80Δ/ndt80Δ*. *Ndt80* is a transcription factor crucial for the successful completion of meiosis and spore formation. Our CLS experiment, however, ruled out sporulation as the source of ploidy changes (refer to Supplementary data, Fig. 1). The intriguing phenomenon of ploidy reduction over time during the CLS experiment is further elaborated upon in a separate manuscript (currently in press [61]). Our data suggest potential connections between autophagy pathways and the decline in DNA content observed in chronological aging cells.

3.3. Decreased expression of the genes encoding the CMG helicase components causes a change in the biochemical fingerprint

The spectra for all analyzed CMG/cmg strains and the control (BY4743) are presented in Fig. 8, with marked peak positions (Raman shift) and their respective intensities. In the Raman spectra, peaks are observed in regions corresponding to proteins (850, 1004, 1035, 1280, 1453, 1610 cm^{-1}), lipids (1254, 1662, 1775 cm^{-1}), polysaccharides (420, 520, 890, 960, 1090 cm^{-1}), and RNA (400–800, 1330, 1390, 1575 cm^{-1}) [20–23].

Shifts in peak positions by a few nanometers or the emergence of additional peaks may signify alterations in the chemical composition and structure of these functional groups (Fig. 8). These variations in the Raman spectra may reflect differences in the metabolic activity of the examined yeast strains. Consequently, observable changes can be discerned in the bands specific to lipids, RNA, and polysaccharides within the provided Raman spectra.

The principal component analysis (PCA) demonstrates a positive correlation between the content of lipids and RNA, while it exhibits a strong negative correlation with the content of polysaccharides within the investigated yeast (Fig. 9). This analysis distinguishes six strains that exhibit distinct chemical compositions compared to other mutants: WT, *CDC45/cdc45Δ*, *MCM2/mcm2Δ*, *MCM4/mcm4Δ*, *MCM6/mcm6Δ*, and *PSF1/psf1Δ*. The polysaccharide content is high in the WT, *CDC45/cdc45Δ*, and *MCM2/mcm2Δ* strains and low in the *MCM4/mcm4Δ*, *MCM6/mcm6Δ*, and *PSF1/psf1Δ* strains. The *MCM2/mcm2Δ* strain is distinguished by the highest content of lipids and RNA, while the lowest content is found in the WT and *PSF1/psf1Δ* strains.

Next, we investigated the association between replicative aging parameters and the levels of lipids, polysaccharides, or RNA. As depicted in

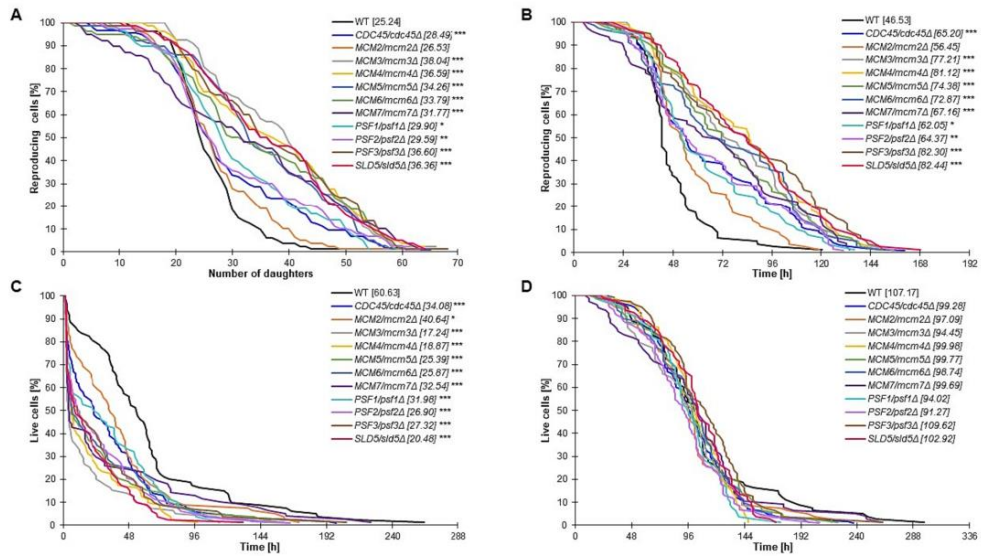


Fig. 4. Aging phenotypes of the cells with lowered expression of genes encoding the CMG complex subunits. Comparison of the reproductive potential (A), reproductive lifespan (B), post-reproductive lifespan (C) and total lifespan (D) of the diploid reference yeast strain BY4743 (WT) and isogenic heterozygous strains. Statistical significances were assessed using ANOVA and Dunnett's post hoc test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). The mean value for a total of 90 cells from two independent experiments is shown in parentheses.

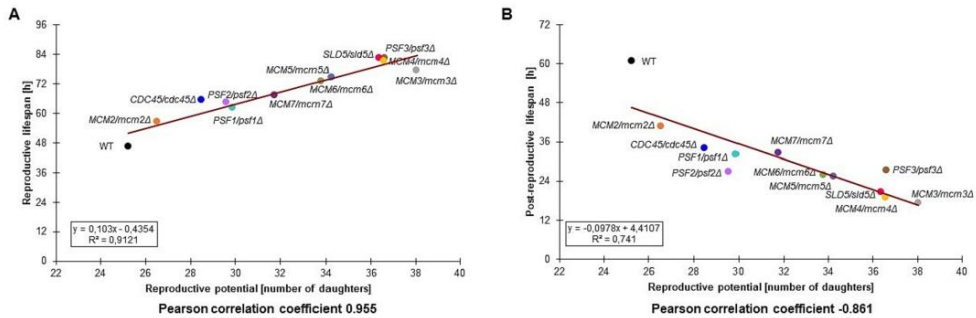


Fig. 5. Relationship between the average reproductive potential and average reproductive lifespan according to Pearson's correlation coefficient (A) and between the average reproductive potential and average post-reproductive lifespan (B) of the WT strain (BY4743) and the isogenic heterozygous CMG/cmg strains.

Fig. 10, a robust negative correlation exists between the levels of polysaccharides and reproductive potential (Fig. 10a), along with a moderate correlation between reproductive potential and RNA levels (Fig. 10b). Furthermore, our study marks the pioneering discovery of a substantial correlation between doubling time and elevated fatty acid levels (Fig. 10c).

In the final stage of our study, we conducted comprehensive metabolic analyses of the CMG/cmg strains under varying environmental conditions. Various metabolic conditions were employed to assess the phenotypes of the yeast mutants (Fig. 11). Notably, all strains displayed heightened resistance to cell wall stress induced by Calcofluor white and Congo red, as depicted in Fig. 11. Furthermore, the *CDC45/cdc45Δ* and

MCM7/mcm7Δ cells were highly resistant to osmotic stress (treatment with 1 M NaCl), while *MCM2/mcm2Δ*, *MCM4/mcm4Δ*, *MCM6/mcm6Δ*, and *SLD5/sld5Δ* strains exhibited a greater sensitivity to osmotic stress than the WT control. Interestingly, we also found that the *MCM2/mcm2Δ* strain was sensitive to heat shock and genotoxic stress inducers such as zeocin and camptothecin.

4. Discussion

DNA replication is a fundamental and indispensable process within a cell, ensuring the accurate duplication of the genome (as reviewed in [24–27]).

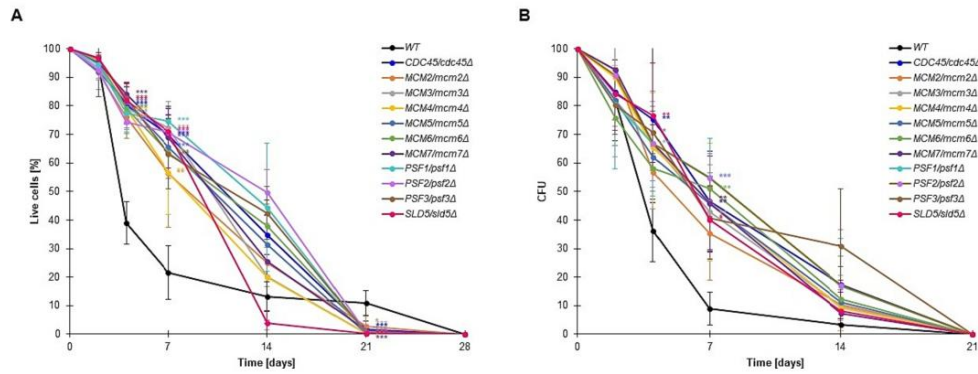


Fig. 6. The decreased expression of genes encoding the CMG helicase subunits determines yeast's chronological aging. Chronological lifespan of the diploid WT (BY4743) and the isogenic heterozygous strains *CDC45/cdc45Δ*, *MCM2/mcm2Δ*, *MCM3/mcm3Δ*, *MCM4/mcm4Δ*, *MCM5/mcm5Δ*, *MCM6/mcm6Δ*, *MCM7/mcm7Δ*, *PSF1/psf1Δ*, *PSF2/psf2Δ*, *PSF3/psf3Δ*, and *SLD5/sld5Δ*. Survival was determined by propidium iodide staining (A) and by the clonogenicity assay (expressed in colony-forming units, CFU) (B). Error bars represent standard deviations obtained from three independent experiments. Statistical significance was assessed using ANOVA and Dunnett's post hoc test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

In eukaryotes, the MCM complex, composed of six homologous Mcm2-Mcm7 proteins, forms a helicase ring. This complex becomes activated through the involvement of five auxiliary factors, namely Cdc45 and GINS tetramers, ultimately resulting in the formation of the 11-subunit CMG complex (Cdc45, MCM, GINS) [28]. The vital role of the GINS complex in maintaining replication fidelity in budding yeast has been extensively documented. Disruption of the GINS complex leads to an increase in the spontaneous mutation rate and instability in repetitive sequences [29,30]. The GINS complex plays a crucial role in the initiation of DNA replication, as it is part of transient protein complexes that assemble during the early stages of replication, preceding the formation of the active CMG helicase complex [31].

During the G/S transition, cyclin-dependent kinases (CDKs) and Dbf4-dependent kinases (DDK) activate the pre-replication complex (pre-RC), facilitating DNA unwinding [32]. Upon entering the S phase, both kinases play pivotal roles in promoting the assembly of replication forks. Additional pre-RC formation is inhibited, allowing for subsequent DNA polymerase loading and the initiation of bidirectional DNA replication.

It has been demonstrated that the S-phase checkpoint response can decelerate or halt fork progression, concurrently stabilizing the association of the MCM complex with the replication fork during DNA repair following DNA damage [33]. In our experiments, we observed that yeast cells with reduced expression of genes encoding CMG helicase subunits experienced alterations in their cell cycle. Most of the analyzed CMG/cmg strains exhibited a slight delay in G1/S transition. Notably, the *MCM7/mcm7Δ* and *MCM3/mcm3Δ* strains displayed an increased accumulation of cells in the G2 phase.

In our previous research, we demonstrated that heterozygous strains with decreased expression of genes encoding ORC complex subunits had significantly prolonged G1 phases in the cell cycle, resulting in a noteworthy increase in cell doubling time during subsequent budding [8]. A similar effect was anticipated for CMG/cmg strains, and our observations indeed confirmed this hypothesis. Interestingly, our results indicated that meiosis in CMG/cmg heterozygous strains was also affected. This finding holds significance when extrapolating these data to the context of gametogenesis in higher eukaryotes.

It has been demonstrated in human fibroblasts that the levels of Mcm2-Mcm7 proteins decrease in senescent cells [34,35]. We sought to determine whether a reduction in the expression of MCM complex

subunits or other components of the CMG helicase would induce premature aging in a yeast aging model. Two primary approaches are commonly used to study yeast aging:

Replicative Lifespan: This refers to the number of buds produced by mother cells before their demise. Replicative lifespan is assessed at the single-cell level by counting the doublings performed by a mother cell, as its buds are removed individually through micromanipulation. This methodology takes advantage of the asymmetrical division of mother and daughter cells during budding. Therefore, yeast replicative aging mirrors the aging process in asymmetrically dividing cells, such as stem cells in higher eukaryotes.

Chronological Aging: This metric calculates the time during which cells remain non-dividing while retaining the ability to form a colony. Chronological aging is analogous to the aging process in non-dividing cells like neurons [12].

Our study revealed a significant increase in reproductive potential in CMG/cmg strains without any adverse effects on the overall lifespan. This suggests a potential parallel in human cells, where the reduced levels of MCM subunits detected in fibroblasts [34] may originate from sources other than transcription levels, such as changes in the half-life of MCM subunits in senescent cells, possibly influenced by post-translational modifications.

Intriguingly, we also observed a substantial delay in chronological aging in the CMG/cmg strains. This implies a connection between the CMG helicase and post-mitotic growth metabolism or the activation of molecular pathways involved in responding to environmental stressors like acetic acid or pH fluctuations.

Our current findings align with previous reports regarding *ORC/orcΔ* heterozygous strains showing delayed aging in both aging models [8]. Thus, it appears that decreased expression levels of genes associated with replication initiation, including subunits of ORC and CMG complexes, play a pivotal role in aging. These genes are not only vital for growth but also require precise regulation in the context of both replication and aging.

From an evolutionary perspective, a cell population's ability to achieve efficient DNA synthesis and rapid doubling times is crucial, providing a competitive advantage in the competition for environmental resources. Here, we reported that when the expression of genes encoding CMG helicase subunits is reduced, the cells exhibit a significant increase in reproductive potential compared to the WT strain while

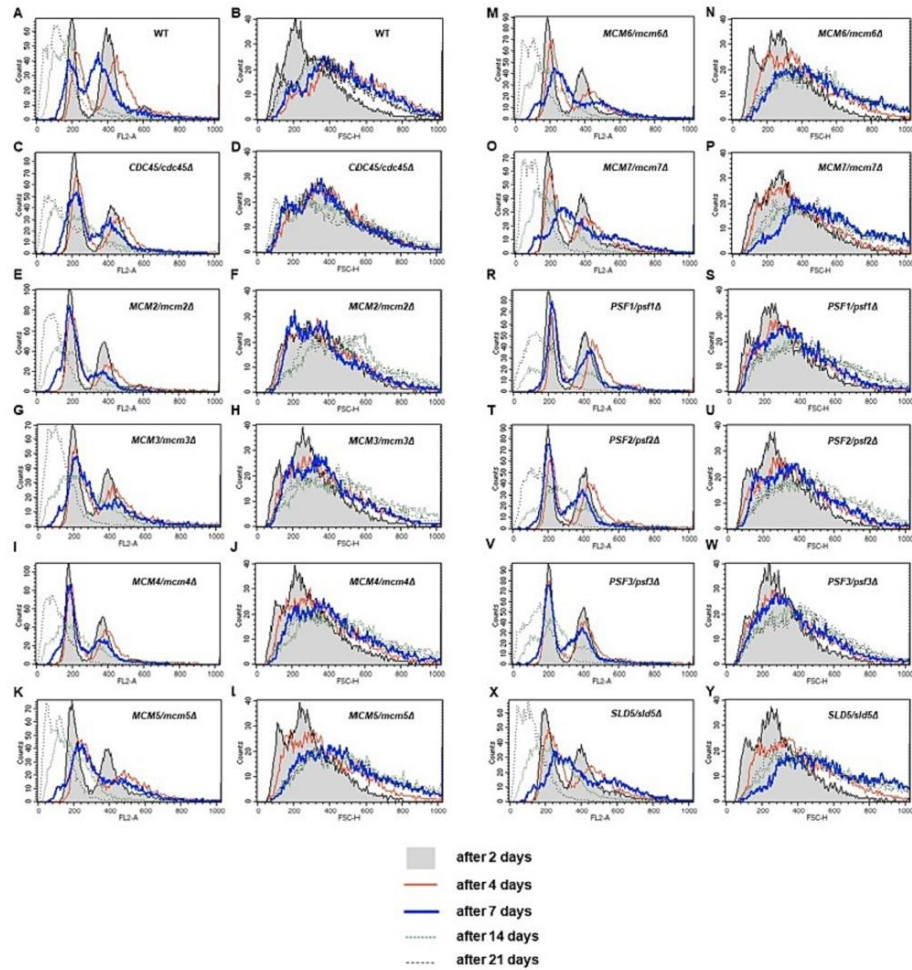


Fig. 7. Ploidy reduction and cell size increase accompany chronological aging. Results of the DNA content analysis by flow cytometry during the chronological aging at 2, 4, 7, 14, and 21 days (A, C, E, G, I, K, M). For the DNA content analysis, yeast cells were stained with propidium iodide (see the Material and Methods section for details). The representative histograms are shown from three independent experiments. Cell size of the diploid control (BY4743) and the isogenic heterozygous strains *CDC45/cdc45Δ*, *MCM2/mcm2Δ*, *MCM3/mcm3Δ*, *MCM4/mcm4Δ*, *MCM5/mcm5Δ*, *MCM6/mcm6Δ*, *MCM7/mcm7Δ*, *PSF1/psf1Δ*, *PSF2/psf2Δ*, *PSF3/psf3Δ*, and *SLD5/sld5Δ* during the chronological aging analysis in selected time points (B, D, F, H, J, L, N). The forward scatter (FSC) histograms reflect cell size in the population. Cells were analyzed via flow cytometry as described in the Materials and Methods section. Ten thousand cells per sample were assayed.

simultaneously extending the doubling time. This phenotype bears a resemblance to that of cancer cells.

Among factors contributing to aging, one of the most significant is cell energy metabolism. In our study, we demonstrated that variations in gene copy numbers influence the speed of aging. This is consistent with our previous findings indicating that the overexpression of ribosomal paralogs *uL6A* or *uL6B* accelerates aging in budding yeast [36]. Despite the discovery of many cellular pathways involved in chronological lifespan (CLS) regulation, our understanding of replication initiation

during aging remains elusive [8,16].

Intuitively, disturbances in the expression levels of CMG helicase components should not impact post-mitotic aging because chronological aging analysis typically begins at the stationary phase. However, a recent study revealed that over half of the essential yeast genes displayed haploinsufficiency phenotypes under optimal conditions. Furthermore, around 40 % of essential genes, which showed no detectable phenotypes under optimal growth conditions, exhibited haploinsufficiency under stressful conditions [37]. This may explain the

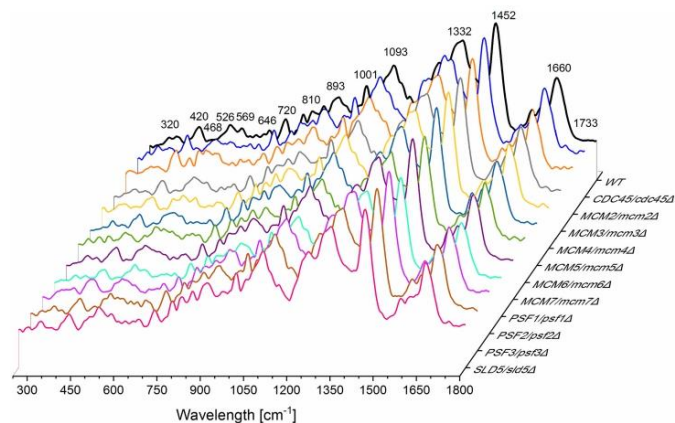


Fig. 8. Raman spectra of the WT control (BY4743) and isogenic heterozygous CMG/cmg strains with marked regions corresponding to vibrations of functional groups for RNA, polysaccharides, proteins, and lipids.

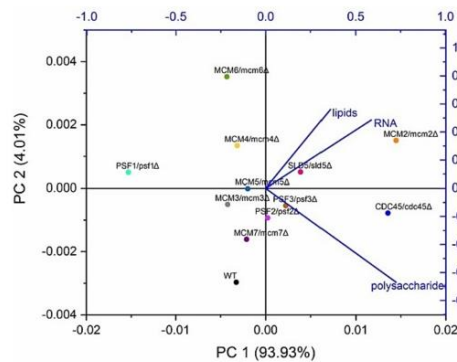


Fig. 9. Results of principal component analysis (PCA) for yeast strains from Raman spectroscopy. PCA presents the relationships between the yeast strains (WT and CMG/cmg strains) and their composition of lipids, polysaccharides, and RNA.

absence of a noticeable phenotype in the *MCM2/mcm2Δ* strain concerning reproductive potential and the significant delay in chronological aging observed in all analyzed heterozygous CMG/cmg strains.

In this regard, CLS can be viewed as a cellular response to stressful conditions, primarily including starvation and acidification of the environment. Our chronological aging analysis confirmed our earlier findings that cells that survive aging increase in size over time [38]. DNA content analysis of chronological aging diploid cells also confirmed previously discovered ploidy changes toward the haploid [8]. In yeast cells, changes in ploidy toward haploidy can be induced by various factors, including single-gene deletions involving important genome stability factors like Rad52 recombinase or replication initiation factor Ctf18 [39,40], extended cultivation [40,41], or starvation [8]. In humans, ploidy shifts are also observed, particularly during DNA damage stress. Improperly repaired DNA damage can lead to aneuploidy, eventually resulting in mitotic catastrophe during subsequent cell

division [42]. Chromosome missegregation leading to aneuploidy is often correlated with tumors and likely provides a mechanism for the loss of tumor suppressor genes and the acquisition of extra copies of oncogenes, thus supporting carcinogenesis. It has been reported that approximately 68 % of solid tumors are aneuploid. Notably, chromosome loss is more frequently observed than gain, and smaller chromosomes are lost more frequently than larger ones [43]. Additionally, it has been suggested that ploidy reduction may be an early step in the development of hepatocarcinogenesis from polyploid hepatocytes [44]. Consequently, the ploidy shift reported in this study appears to be a universal phenomenon linked to stressful conditions, subsequent endogenous damage, and cell adaptation to such conditions.

This conclusion is supported by the results of Ravichandran et al., who induced high rates of chromosome missegregation to investigate how yeast cells adapt to chromosome instability over time [45]. Adaptation to chromosome instability occurs through individual chromosomal aneuploidies, resulting in adapted strains with complex karyotypes featuring specific combinations of beneficial chromosomes.

Metabolomics data published by Yosida et al. [46] have suggested a potential association between the biochemical state of yeast cells and their longevity to some extent. In the context of yeast aging, lipid metabolism and homeostasis have been assigned crucial roles [8,16,47]. In our current study, we aimed to investigate whether metabolomic profiles differed between the heterozygous CMG/cmg strains and the WT control.

The data indicated a positive correlation between the content of lipids and RNA, while a strong negative correlation was observed between these components and the content of polysaccharides in the tested strains. Additionally, a robust negative correlation between polysaccharide levels and the reproductive potential of the tested strains was identified. A moderate correlation between RNA levels and the strains' reproductive potential was also evident. Furthermore, we established a significant correlation between the doubling time and the level of fatty acids.

The findings from this study clearly underscore the critical role of the expression levels of genes encoding the CMG complex subunits in yeast metabolism and aging. It is important to note, however, that these observations primarily pertain to replicative aging. So far, our understanding of biochemical changes during chronological aging has been limited. Previous research has indicated that the metabolic profiles of cells lacking Sch9, the major TORC1 effector, differed significantly from

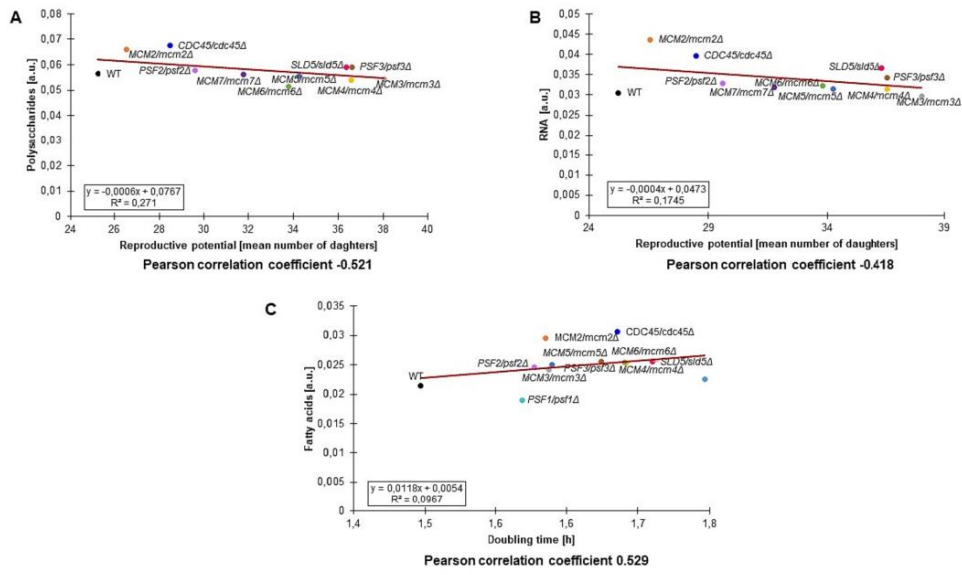


Fig. 10. Relationship between reproductive potential and the polysaccharides level (A), reproductive potential and the RNA level (B) and the doubling time and fatty acids level according to Pearson's correlation coefficient of the WT and the isogenic CMG/cmg strains.

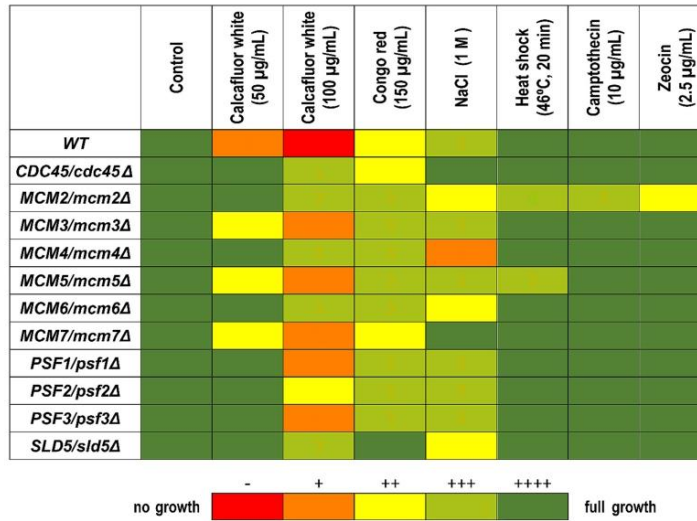


Fig. 11. Heat map representing growth phenotype of heterozygous CMG/cmg yeast strains exposed to different environmental stresses. Strains grown in YPD liquid medium were spotted on YPD medium plates containing the indicated amounts of Calcofluor white, Congo red, sodium chloride (NaCl), zeocin, or camptothecin, then incubated for 2 days at 28 °C. Heat stress was applied by exposition of cells to 46 °C for 20 min. Growth on YPD medium plates served as control. Representative results from two independent experiments are shown. Colors represent the strains' ability to grow in a given condition. Every "+" reflects the growth of colonies on the spot where drops containing 50,000, 5000, 500, and 50 cells, respectively, were placed.

those of wild-type and TOR1-deficient cells. Several antiaging biomarkers have been identified, including intracellular levels of pyruvate, glucose, ribose/deoxyribose-associated compounds, and the presence of specific protein conformational structures. Interestingly, glycogen content increased in the *sch9Δ* strain as aging progressed, whereas it decreased in the wild-type and *tor1Δ* strains [48].

In humans, changes in gene expression, particularly in genes whose products are involved in replication initiation, have been discovered to be associated with various diseases, making them potential targets for treatment. A strong correlation has been observed between the expression of GINS2 (the human equivalent of yeasts' PSF2) and cancer. Notably, a significant increase in GINS2 expression has been reported in various types of cancer, including cervical cancer [49], breast cancer [50], glioma [51], pancreatic cancer [52], and non-small-cell lung cancer [53]. Upregulated GINS2 expression promotes tumor development by enhancing tumor cell proliferation and inhibiting cell apoptosis [52,54]. Recent research has indicated that the CMG complex could be a promising therapeutic target for cancer treatment. Furthermore, small molecule inhibitors of the CMG helicase, such as genistein, metformin, and breviscapine, have been identified as potential anticancer compounds [55–57].

Recent studies have underscored the significance of MCM proteins in the health and well-being of higher eukaryotes. For instance, mice with lower *MCM2* expression levels exhibited a shorter average lifespan due to a higher incidence of cancer, primarily T-cell and B-cell lymphomas [58]. Reduced *MCM2* expression has also been linked to increased levels of Ser139-phosphorylation-induced foci of histone H2AX in muscle cells, which serves as a marker for double-strand DNA breaks. Additionally, MCM expression levels positively correlate with cancer malignancy in several MCM-related cancers, including lung squamous cell carcinoma, renal cell carcinoma, prostate cancer, breast cancer, gastrointestinal tract tumors, brain tumors, and lymphomas (as reviewed in [59]). Furthermore, it has been suggested that *MCM2–MCM7* expression levels could serve as prognostic markers for survival in patients with various types of cancer [60].

In conclusion, the progression of the cell cycle is contingent upon the expression levels of essential genes encoding the subunits of the CMG helicase complex. A notable increase in reproductive potential is strongly associated with a reduction in the expression of these genes. However, this reduced gene expression does not impact the overall lifespan of mitotically active cells but rather delays chronological aging. We have also presented additional evidence indicating that diploid cells experience a reduction in ploidy during chronological aging. We postulate that this phenomenon may be linked to the exposure of cells to increasingly stressful conditions over time. Nevertheless, further research is necessary to precisely elucidate the novel mechanism behind this ploidy shift.

Furthermore, our study has revealed a correlation between the levels of RNA or polysaccharides in yeast and their reproductive potential, as well as a relationship between the levels of fatty acids and the doubling time of cells. We have demonstrated that even slight alterations in cell cycle progression resulting from reduced expression of CMG helicase components lead to differences in the biochemical profile of the cells. Importantly, our research sheds new light on the potential use of yeast in investigating potential therapeutic targets for cancer treatment.

CRedit authorship contribution statement

Conceptualization: Mateusz Moloń, Adrianna Skoneczna.
Methodology: Mateusz Moloń, Adrianna Skoneczna, Łukasz Jurczyk, Monika Kula-Maximenko
Statistical analysis: Karolina Stepień, Mateusz Moloń.

Investigation: Karolina Stepień, Adrianna Skoneczna, Łukasz Jurczyk, Monika Kula-Maximenko, Mateusz Moloń.

Writing: Mateusz Moloń, Karolina Stepień, Adrianna Skoneczna.
Supervision: Mateusz Moloń.

All authors read and approved the final manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

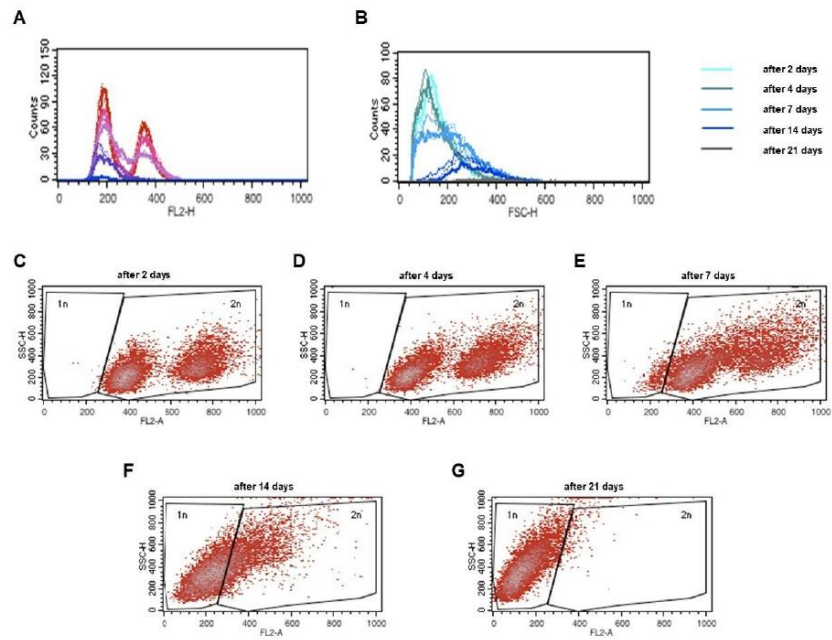
References

- [1] N. Sakakibara, L.M. Kelman, Z. Kelman, Unwinding the structure and function of the archaeal MCM helicase, *Mol. Microbiol.* 72 (2) (2009) 286–296.
- [2] S. Ogasari, S.A. MacNeill, Structure and evolutionary origins of the CMG complex, *Chromosoma* 122 (1–2) (2013) 47–53.
- [3] M.E. O'Donnell, H.L. Li, The ring-shaped hexameric helicases that function at DNA replication forks, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25 (2) (2018) 122–130.
- [4] D.R. Reed, M.G. Alexandrow, Myc and the replicative CMG helicase: the creation and destruction of Cancer Myc over-activation of CMG helicases drives tumorigenesis and creates a vulnerability in CMGs for therapeutic intervention, *Bioessays* 42 (4) (2020).
- [5] H. Sedlackova, M.B. Rask, R. Gupta, C. Choudhary, K. Sonoyajit, J. Lukas, Equilibrium between nascent and parental MCM proteins protects replicating genomes, *Nature* 587 (7833) (2020), 297–+.
- [6] L. Costantino, S.K. Sotiriou, J.K. Rantala, S. Magin, E. Mladenov, T. Helleday, J. E. Haber, G. Iliakis, O.P. Kallionemi, T.D. Halazonetis, Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells, *Science* 343 (6166) (2014) 88–91.
- [7] J.V. Forment, M.J. O'Connor, Targeting the replication stress response in cancer, *Pharmacology & Therapeutics* 188 (2018) 155–167.
- [8] K. Stepień, A. Skoneczna, M. Kula-Maximenko, L. Jurczyk, M. Molon, Depletion of the origin recognition complex subunits delays aging in budding yeast, *Cells* 11 (8) (2022).
- [9] T.B.L. Kirkwood, S.N. Austad, Why do we age? *Nature* 408 (6809) (2000) 233–238.
- [10] C. Lopez-Otin, M.A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer, The hallmarks of aging, *Cell* 153 (6) (2013) 1194–1217.
- [11] K.A. Steinkraus, M. Kaerberlein, B.K. Kennedy, Replicative aging in yeast: the means to the end, annual review of cell and developmental biology, annual reviews, Palo Alto (2008) 29–54.
- [12] V.D. Longo, G.S. Shadel, M. Kaerberlein, B. Kennedy, Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell Metab.* 16 (1) (2012) 18–31.
- [13] M. Molon, M. Szajwaj, M. Tchorzewski, A. Skoczowski, E. Niewiadomska, R. Zadrag-Tezca, The rate of metabolism as a factor determining longevity of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast, *Age* 38 (1) (2016).
- [14] M. Kwolek-Mirek, R. Zadrag-Tezca, Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells, *FEMS Yeast Res.* 14 (7) (2014) 1068–1079.
- [15] K. Krol, J. Antoniak-Majchrzak, M. Skoneczny, M. Siemko, J. Jendrysek, I. Rumienczyk, A. Halas, A. Kurlandzka, A. Skoneczna, Lack of G1/S control destabilizes the yeast genome via replication stress-induced DSBs and illegitimate recombination, *J. Cell Sci.* 131 (24) (2018).
- [16] M. Molon, J. Zebrowski, Phylogenetic relationship and Fourier-transform infrared spectroscopy-derived lipid determinants of lifespan parameters in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast, *FEMS Yeast Res.* 17 (4) (2017).
- [17] N. Minola, M. Frajnt, C. Wilson, J.W. Vaupel, Advances in measuring lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2) (2005) 402–406.
- [18] J. Czachor, M. Milek, S. Galiniak, K. Stepień, M. Dzugan, M. Molon, Coffee extends yeast chronological lifespan through antioxidant properties, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (24) (2020).
- [19] A.E. Eastman, S.Q. Guo, The palette of techniques for cell cycle analysis, *FEBS Lett.* 594 (13) (2020) 2084–2098.
- [20] P. Rosch, M. Harz, M. Schmitt, J. Popp, Raman spectroscopic identification of single yeast cells, *Journal of Raman Spectroscopy* 36 (5) (2005) 377–379.
- [21] J.W. Chan, H. Winhold, M.H. Corzett, J.M. Ulloa, M. Cosman, R. Balhorn, T. Huser, Monitoring dynamic protein expression in living E-coli. Bacterial cells by laser tweezers Raman spectroscopy, *Cytometry Part A* 71A (7) (2007) 468–474.
- [22] J. De Gelder, K. De Gussem, P. Vandenebeele, L. Moens, Reference database of Raman spectra of biological molecules, *J. Raman Spectrosc.* 38 (9) (2007) 1133–1147.
- [23] T. Lemma, J. Wang, K. Arstik, V.P. Hytonen, J.J. Toppari, Identifying yeasts using surface enhanced Raman spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 218 (2019) 299–307.
- [24] S.P. Bell, K. Labib, Chromosome duplication in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 203 (3) (2016) 1027–1067.
- [25] L. Bai, Z.N. Yuan, J.C. Sun, R. Georgescu, M.E. O'Donnell, H.L. Li, Architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* replisome, DNA replication: from old principles to new discoveries 1042 (2017) 207–228.
- [26] T.D. Deegan, J.F.X. Diffley, MCM: one ring to rule them all, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 37 (2016) 145–151.

- [27] P.M.J. Burgers, T.A. Kunkel, Eukaryotic DNA replication fork, *Annual Review of Biochemistry* 86 (86) (2017) 417–438.
- [28] I. Ilves, T. Petojevic, J.J. Pesavento, M.R. Botchan, Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins, *Mol. Cell* 37 (2) (2010) 247–258.
- [29] E. Grabowska, U. Wronska, M. Denkwicz, M. Jaszczur, A. Respondek, M. Alabrudzinska, C. Suski, K. Makiela-Dzbenska, P. Jonczyk, I.J. Fijalkowska, Proper functioning of the GINS complex is important for the fidelity of DNA replication in yeast, *Mol. Microbiol.* 92 (4) (2014) 659–680.
- [30] M. Jedrychowska, M. Denkwicz-Kruk, M. Alabrudzinska, A. Skoneczna, P. Jonczyk, M. Dmowski, I.J. Fijalkowska, Defects in the GINS complex increase the instability of repetitive sequences via a recombination-dependent mechanism, *PLoS Genet.* 15 (12) (2019).
- [31] S.A. MacNeill, Structure and function of the GINS complex, a key component of the eukaryotic replisome, *Biochem. J.* 425 (2010) 489–500.
- [32] P. Zegermann, Evolutionary conservation of the CDK targets in eukaryotic DNA replication initiation, *Chromosoma* 124 (3) (2015) 309–321.
- [33] Y. Kanimura, Y.S. Tak, A. Sugino, H. Araki, Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.* 20 (8) (2001) 2097–2107.
- [34] Y. Suzuki, Y. Yamaguchi, H. Hanada, Y. Ishimi, Changes in MCM2-7 proteins at senescence, *Genes Genet. Syst.* 94 (3) (2019) 123–132.
- [35] J. Flach, S.T. Bakker, M. Mohrin, P.C. Conroy, E.M. Pietras, D. Reynaud, S. Alvarez, M.E. Diolaiti, F. Ugarte, E.C. Forsberg, M.M. Le Beau, B.A. Stohr, J. Mendez, C. G. Morrison, E. Passague, Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells, *Nature* 512 (7513) (2014), 198–.
- [36] M. Molon, M. Zaciara, D. Wojdyła, E. Molestak, Increasing the number of ribosomal uL6 mRNA copies accelerates aging of the budding yeast, *Mol. Biol. Rep.* 37 (5) (2016).
- [37] S. Ohnuki, Y. Ohya, High-dimensional single-cell phenotyping reveals extensive haploinsufficiency, *PLoS Biol.* 16 (5) (2018).
- [38] K. Stepień, D. Wojdyła, K. Nowak, M. Molon, Impact of curcumin on replicative and chronological aging in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast, *Biogerontology* 21 (1) (2020) 109–123.
- [39] K. Krol, I. Brozda, M. Skoneczny, M. Bretne, A. Skoneczna, A genomic screen revealing the importance of vesicular trafficking pathways in genome maintenance and protection against genotoxic stress in diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells, *PLoS One* 10 (3) (2015).
- [40] W. Song, T.D. Petes, Haploidization in *Saccharomyces cerevisiae* induced by a deficiency in homologous recombination, *Genetics* 191 (1) (2012) 279–284.
- [41] A.C. Gerstein, R.M. McBride, S.P. Otto, Ploidy reduction in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biol. Lett.* 4 (1) (2008) 91–94.
- [42] I. Vitale, L. Galluzzi, M. Castedo, G. Kroemer, Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (6) (2011) 384–391.
- [43] P.H.G. Duijff, N. Schultz, R. Benezra, Cancer cells preferentially lose small chromosomes, *Int. J. Cancer* 132 (10) (2013) 2316–2326.
- [44] T. Matsumoto, L. Wakefield, A. Peters, M. Peto, P. Spellman, M. Grompe, Proliferative polyploid cells give rise to tumors via ploidy reduction, *Nat. Commun.* 12 (1) (2021).
- [45] M.C. Ravichandran, S. Fink, M.N. Clarke, F.C. Hofer, C.S. Campbell, Genetic interactions between specific chromosome copy number alterations dictate complex aneuploidy patterns, *Genes Dev.* 32 (23–24) (2018) 1485–1498.
- [46] R. Yoshida, T. Tamura, C. Takaoka, K. Harada, A. Kobayashi, Y. Mukai, E. Fukusaki, Metabolomics-based systematic prediction of yeast lifespan and its application for semi-rational screening of ageing-related mutants, *Aging Cell* 9 (4) (2010) 616–625.
- [47] J. Petschnigg, H. Wolinski, D. Kolb, G. Zellnig, C.F. Kurat, K. Natter, S.D. Kohlwein, Good fat, essential cellular requirements for triacylglycerol synthesis to maintain membrane homeostasis in yeast, *Journal of Biological Chemistry* 284 (45) (2009) 30981–30993.
- [48] M. Bermudez-Moretti, J.F. Gullas, J. Valencia-Guillen, S.A. Munoz, I. Forfar, S. Correa-Garcia, Monitoring changes in the cellular content of biomolecules during ageing with FTIR spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy* 105 (2019).
- [49] F. Ouyang, J.L. Liu, M. Xia, C.Y. Lin, X.Q. Wu, L.P. Ye, L.B. Song, J. Li, J. Wang, P. Guo, M. He, GINS2 is a novel prognostic biomarker and promotes tumor progression in early-stage cervical cancer (vol 37, pg 2652, 2017), *Oncol. Rep.* 45 (5) (2021).
- [50] P. Liang, Z.G. Song, D.M. Chen, R.X. Linghu, Y.Z. Wang, X.Y. Zhang, X.X. Kou, J. L. Yang, S.C. Jiao, GINS2 regulates matrix metalloproteinase 9 expression and cancer stem cell property in human triple negative breast cancer, *Biomed. Pharmacother.* 84 (2016) 1568–1574.
- [51] Y.L. Shen, H.Z. Li, Y.W. Hu, L. Zheng, Q. Wang, Loss of GINS2 inhibits cell proliferation and tumorigenesis in human gliomas, *CNS Neurosci. Ther.* 25 (2) (2019) 273–287.
- [52] F.Q. Bu, X.J. Zhu, X. Yi, C. Luo, K. Lin, J.F. Zhu, C.G. Hu, Z.T. Liu, J.F. Zhao, C. Huang, W.J. Zhang, J. Huang, Expression profile of GINS complex predicts the prognosis of pancreatic cancer patients, *Oncol. Targets. Ther.* 13 (2020) 11433–11444.
- [53] F. Chi, Z. Wang, Y.Z. Li, N. Chang, Knockdown of GINS2 inhibits proliferation and promotes apoptosis through the p53/GADD45A pathway in non-small-cell lung cancer, *Bioscience Reports* 40 (2020).
- [54] Y. Ye, Y.N. Song, S.F. He, J.H. Zhuang, G.Y. Wang, W. Xia, GINS2 promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis in thyroid cancer by regulating CITED2 and LOXL2, *Cancer Gene Ther.* 26 (3–4) (2019) 103–113.
- [55] S. Majid, A.A. Dar, S. Saini, Y. Chen, V. Shahyari, J. Liu, M.S. Zaman, H. Hirata, S. Yamamura, K. Ueno, Y. Tanaka, R. Dahiya, Regulation of Minichromosome maintenance gene family by MicroRNA-1296 and Genistein in prostate Cancer, *Cancer Res.* 70 (7) (2010) 2809–2818.
- [56] H.H. Kim, S.C. Kim, J.L. Ku, Metformin increases chemo-sensitivity via gene downregulation encoding DNA replication proteins in 5-Fu resistant colorectal cancer cells, *Oncotarget* 8 (34) (2017) 56546–56557.
- [57] Y.B. Guan, D.R. Yang, S.J. Nong, J. Ni, C.H. Hu, J. Li, J. Zhu, Y.X. Shan, Breviscapine (BVP) inhibits prostate cancer progression through damaging DNA by minichromosome maintenance protein-7 (MCM-7) modulation, *Biomed. Pharmacother.* 93 (2017) 103–116.
- [58] S.C. Pruitt, K.J. Bailey, A. Freeland, Reduced Mcm2 expression results in severe stem/progenitor cell deficiency and cancer, *Stem Cells* 25 (12) (2007) 3121–3132.
- [59] S. Yu, G.Q. Wang, Y. Shi, H.F. Xu, Y.C. Zheng, Y. Chen, MCMs in cancer: prognostic potential and mechanisms, *Analytical Cellular Pathology* 2020 (2020).
- [60] S. Schimmack, B. Lawrence, B. Kenney, H. Schmitz-Winnenthal, I.M. Modlin, M. Kidd, Minichromosome maintenance expression defines slow-growing Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms, *Transl. Oncol.* 9 (5) (2016) 411–418.
- [61] T. Enkhbaatar, M. Skoneczny, K. Stepień, M. Molon, A. Skoneczna, Live while the DNA lasts. The role of autophagy in DNA loss and survival of diploid yeast cells during chronological aging *Aging (Albany NY)*. 15: doi:10.18632/aging.205102.

Supplementary data 1

Ploidy reduction and cell size increase accompany chronological aging. Results of the DNA content analysis by flow cytometry during the chronological aging at 2, 4, 7, 14, and 21 days (A). For the DNA content analysis, yeast cells were stained with propidium iodide (see Material and Methods section for details). Cell size of the diploid *ndt80Δ/ndt80Δ* during the chronological aging analysis in selected time points (B). The forward scatter (FSC) histograms reflect cell size in the population. Raw data showing ploidy changes during the chronological aging at 2, 4, 7, 14, and 21 days (C, D, E, F, G). The cells were analyzed via flow cytometry as described in the Materials and Methods section. The 10,000 cells per sample were assayed.



11.3.Restricting the level of the proteins essential for the regulation of the initiation step of replication extends the chronological lifespan and reproductive potential in budding yeast

Biogerontology
https://doi.org/10.1007/s10522-024-10113-x

RESEARCH ARTICLE



Restricting the level of the proteins essential for the regulation of the initiation step of replication extends the chronological lifespan and reproductive potential in budding yeast

Karolina Stępień · Tuguldur Enkhbaatar · Monika Kula-Maximenko ·
Łukasz Jurczyk · Adrianna Skoneczna · Mateusz Mołoń

Received: 22 March 2024 / Accepted: 29 May 2024
© The Author(s) 2024

Abstract Aging is defined as a progressive decline in physiological integrity, leading to impaired biological function, including fertility, and rising vulnerability to death. Disorders of DNA replication often lead to replication stress and are identified as factors influencing the aging rate. In this study, we aimed to reveal how the cells that lost strict control of the formation of crucial for replication initiation a pre-initiation complex impact the cells' physiology and aging.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10522-024-10113-x>.

K. Stępień
Institute of Medical Sciences, Rzeszów University,
35-959 Rzeszów, Poland

T. Enkhbaatar · A. Skoneczna (✉)
Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy
of Sciences, 02-106 Warsaw, Poland
e-mail: ada@ibb.waw.pl

M. Kula-Maximenko
The Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Polish
Academy of Sciences, 30-239 Krakow, Poland

E. Jurczyk
Institute of Agricultural Sciences, Rzeszów University,
35-601 Rzeszów, Poland

M. Mołoń (✉)
Institute of Biology, Rzeszów University, 35-601 Rzeszów,
Poland
e-mail: mmolon@ur.edu.pl

As strains with the lower pre-IC control (lowPICC) we used, *Saccharomyces cerevisiae* heterozygous strains having only one functional copy of genes, encoding essential replication proteins such as Cdc6, Dbf4, Sld3, Sld7, Sld2, and Mcm10. The lowPICC strains exhibited a significant reduction in the respective genes' mRNA levels, causing cell cycle aberrations and doubling time extensions. Additionally, the reduced expression of the lowPICC genes led to an aberrant DNA damage response, affected cellular and mitochondrial DNA content, extended the lifespan of post-mitotic cells, and increased the yeast's reproductive potential. Importantly, we also demonstrated a strong negative correlation between the content of cellular macromolecules (RNA, proteins, lipids, polysaccharides) and aging. The data presented here will likely contribute to the future development of therapies for treating various human diseases.

Keywords Aging · Cell cycle · Lifespan · Replication

Introduction

Replication consists of three main stages: initiation, elongation, and termination. The first stage is to recognize the start site. DNA replication initiates from specific regions on the chromosomes, known as origins of replication (an autonomously replicating sequence (ARS) in *Saccharomyces cerevisiae*)

Published online: 06 June 2024

Springer

(Rao and Stillman 1995). Replication origins are recognized by the Origin Recognition Complex (ORC) (Li et al. 2018). Not all ARS are used during unperturbed replication; those used are selected by the licensing and activation processes (Remus et al. 2009). One of the factors determining the ARS usage is the formation of the pre-replication complex (pre-RC), i.e., the loading of two MCM complexes onto DNA (Coster and Diffley 2017), an active process that requires ATP hydrolysis and depends on several factors, including the ORC complex and loading factors Cdc6 and Cdt1 (Lewis et al. 2022; Randell et al. 2006). The DNA strand separation needs a DNA helicase activity, which by attaching to ARS and breaking the hydrogen bonds between the bases belonging to two DNA strands, will liberate two strands. However, building the appropriate complex with such a molecular activity requires several additional steps. The activation of the MCM complex's molecular role occurs in the early S-phase and depends on its assisting proteins and kinases associated with the cell cycle (Bell and Labib 2016; Lewis et al. 2022). Accordingly, Sld3, Sld7 and Cdc45 are recruited to the pre-RC and assembled into the Cdc45-MCM-Sld3 complex with increased levels of Dbf4-dependent kinase (Heller et al. 2011). Next, the S-phase cyclin-dependent kinases phosphorylate Sld3 and Sld2 to promote their binding with Dbp11, which is essential to the formation of the pre-initiation (pre-IC) complex (Muramatsu et al. 2010). The pre-IC complex formation involves the recruitment of several more proteins or complexes (so-called firing factors) and is believed to allow double MCM complex to be separated into single hexamers, as in the active DNA helicase, i.e., is required as switch-on mechanism (Miyazawa-Onami et al. 2017). When the Sld3 is displaced by a GINS complex (Sld5-Psf1-Psf2-Psf3), the CMG (Cdc45-MCM-GINS) helicase complex is formed (Sheu et al. 2016). However, the formation of pre-IC also requires DNA polymerase ϵ (E) and CDK kinase activity. ADP release and binding of new ATP by MCM leads to CMGE assembly. At the final step, one of the firing factors required for the starting of DNA unwinding, the Mcm10 protein, triggers ATP hydrolysis by CMGE, changing inactive CMG complex into an active DNA helicase resulting in helicase bypass and

establishment of replication forks. (Douglas et al. 2018; Lewis et al. 2022).

Thus, through the activity of various essential proteins, among them Sld2, Sld3, Sld7, Dbp11, and Mcm10, the attachment and activation of crucial elements of the replication machinery occur in a strictly depicted order. These factors also determine which initiation sites are fired in a given round of replication (Ilves et al. 2010). As the key component of all replisomes is the major replication DNA helicase, the loading and activating of this helicase by proteins involved in the replication initiation step plays a crucial role in this process (Costa and Diffley 2022).

Disturbances at the different steps of DNA replication and replication stress are often noted as essential factors influencing the aging process. Aging is defined as the gradual deterioration of cellular and organismal functions over time, which increases the risk of improper response to stress and disease susceptibility. A significant overlap exists between the cellular pathways that influence aging and those that contribute to, e.g., neurodegeneration, or metabolic syndrome (de Cabo et al. 2014). DNA replication disorders are also increasingly recognized as a critical factor of genome instability during cancer development (Hills and Diffley 2014; Kotsantis et al. 2018; Macheret and Halazonetis 2015). Obviously, the connections between DNA metabolism and genome maintenance processes, including replication, were also subject of interest for researchers exploring aging mechanisms. However, some processes are difficult to resolve due to the fact that the proteins involved in these processes are essential for life. Approaches that were undertaken mostly rely on mutated alleles of essential genes, which by definition cannot reflect the normal aging process but rather an aging of cells marked by disease. In our study, we asked about the connection between control of the replication initiation process and aging. With time, also during aging, the expression of many genes changes (Frenk and Houseley 2018).

Moreover, it is common knowledge that aging is accompanied by lower proliferating potential. Thus, as a working model, we used the cells with heterozygous loci of essential genes, encoding proteins involved in the initiation of replication (i.e., conditions when expression of these genes is limited). The effect of lowered expression of genes involved in initiating replication on aging is still to

be uncovered. Here, we demonstrate that reducing the number of copies of the genes encoding proteins involved in the different steps of initiation of replication, namely *CDC6*, *DBF4*, *SLD3*, *SLD7*, *SLD2*,

and *MCM10*, influenced not only respective transcript levels but also the DNA content and integrity of the cell, as well as the proliferative potential and aging of both mitotically active and post-mitotic yeast cells.

Table 1 Strains were used in this study

Strain	Genotype	Source
BY4743	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0</i>	Euroscarf
<i>CDC6/cdc6Δ</i>	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 CDC6/cdc6Δ::kanMX4</i>	Open Biosystems
<i>DBF4/dbf4Δ</i>	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 DBF4/dbf4Δ::kanMX4</i>	Open Biosystems
<i>MCM10/mcm10Δ</i>	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 MCM10/mcm10Δ::kanMX4</i>	Open Biosystems
<i>SLD2/sld2Δ</i>	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 SLD2/sld2Δ::kanMX4</i>	Open Biosystems
<i>SLD3/sld3Δ</i>	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 SLD3/sld3Δ::kanMX4</i>	Open Biosystems
<i>SLD7/sld7Δ</i>	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 SLD7/sld7Δ::kanMX4</i>	Open Biosystems
BY4743 pWJ1344	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 [RAD52-YFP, LEU2]</i>	This work
<i>CDC6/cdc6Δ</i> pWJ1344	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 CDC6/cdc6Δ::kanMX4 [RAD52-YFP, LEU2]</i>	This work
<i>DBF4/dbf4Δ</i> pWJ1344	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 DBF4/dbf4Δ::kanMX4 [RAD52-YFP, LEU2]</i>	This work
<i>MCM10/mcm10Δ</i> pWJ1344	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 MCM10/mcm10Δ::kanMX4 [RAD52-YFP, LEU2]</i>	This work
<i>SLD2/sld2Δ</i> pWJ1344	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 SLD2/sld2Δ::kanMX4 [RAD52-YFP, LEU2]</i>	This work
<i>SLD3/sld3Δ</i> pWJ1344	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 SLD3/sld3Δ::kanMX4 [RAD52-YFP, LEU2]</i>	This work
<i>SLD7/sld7Δ</i> pWJ1344	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 SLD7/sld7Δ::kanMX4 [RAD52-YFP, LEU2]</i>	This work
YTE32	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 RFA1/RFA1-YFP::LEU2</i>	This work
YTE33	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 CDC6/cdc6Δ::kanMX4 RFA1/RFA1-YFP::LEU2</i>	This work
YTE34	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 DBF4/dbf4Δ::kanMX4 RFA1/RFA1-YFP::LEU2</i>	This work
YTE35	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 MCM10/mcm10Δ::kanMX4 RFA1/RFA1-YFP::LEU2</i>	This work
YTE36	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 SLD2/sld2Δ::kanMX4 RFA1/RFA1-YFP::LEU2</i>	This work
YTE37	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 SLD3/sld3Δ::kanMX4 RFA1/RFA1-YFP::LEU2</i>	This work
YTE38	<i>MATa/MATα HIS3/his3Δ1 LEU2/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 MET15/met15Δ0 URA3/ura3Δ0 SLD7/sld7Δ::kanMX4 RFA1/RFA1-YFP::LEU2</i>	This work

Materials and methods

Strains and growth conditions

All yeast strains used in this study are in the BY4743 background and are listed in Table 1. The heterozygous strains lacking one functional allele of a given essential gene came from a yeast knock-out collection (Open Biosystems).

The *RFA1-YFP* fusion was introduced by yeast transformation with the *RFA1::YFP::LEU2* cassette amplified from the plasmid pRYL24 (Jedrychowska et al. 2019) using primers RFA7317F and RFA6231R (Table 2). The cassette was introduced into one of the *RFA1* loci in the genome of wild-type (WT) (BY4743), *CDC6/cdc6Δ*, *DBF4/dbf4Δ*, *MCM10/mcm10Δ*, *SLD2/sld2Δ*, *SLD3/sld3Δ*, and *SLD7/sld7Δ* strains, respectively. The constructions' correctness was verified by PCR, using YFP9451R and RFA7367F primers (Table 2).

Cells were grown in standard YPD containing 1% Difco Yeast Extract, 2% Yeast Bacto-Peptone, and 2% (w/v) glucose on a rotary shaker at 150 rpm or on a solid YPD medium containing 2% agar. For

strain selection, the SC-Leu medium was used (0.67% Bacto-yeast nitrogen base, 2% (w/v) glucose, supplemented with adenine and uracil, and all amino acids except leucine). The experiments were carried out at a temperature of 28 °C. Used in chronological lifespan assay, SDC medium contained 0.67% Bacto-yeast nitrogen base (without amino acids) and 2% (w/v) glucose, supplemented with L-histidine (60 mg/l), L-leucine (180 mg/l) and uracil (60 mg/l).

Growth rate determination

The growth assays were performed in a liquid medium. Yeast cell suspensions were incubated at 28 °C for 12 h with shaking (Heidolph Incubator 1000 at 1200 rpm). Growth was monitored at 600 nm using the Anthos 2010 type 17,550 microplate reader for 12 at 2 h intervals. In the approach involving counting cells per mL in each culture, a Malassez chamber was used (Carl Roth, Lauda-Konigshofen, Germany).

Calculation of the mean doubling time

The mean doubling time was calculated for each analyzed strain as described previously (Molon et al. 2016).

Sporulation efficiency assay

After pre-growing in rich YPD medium, diploid yeast strains were grown for two weeks at 28 °C on sporulation medium (0.1% yeast extract, 1% potassium acetate, 0.05% glucose, 2% agar), as described previously (Krol et al. 2018).

Flow cytometry analysis

Samples for cytometric analysis were prepared as in (Krol et al. 2018). Briefly, cells were harvested, washed with water, and fixed with a chilled (−20 °C) 70% ethanol (Polmos, Warsaw, Poland) for 2 h at room temperature. After twice washing with FACS buffer (0.2 M Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA), pH 7.4, 20 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Germany)), cells were incubated for 2 h at 37 °C in FACS buffer containing 1 mg/ml RNase A (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) to digest RNA present in the samples. After washing with phosphate-buffered saline (PBS), cells were stained

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5' → 3')
Primers used during strain constructions	
RFA7317F	CAATCGGCTGCTAGCTTAAC
RFA6231R	ACGGTTCACAATCCCTACAG
RFA7367F	GCCGCAACGCAAATTCATC
YFP9451R	CTTCGGGCATGGCACTTTG
Primers used for RT-qPCR gene expression analysis	
<i>ACT1_fw</i>	AAGCTTTGTTCATCCTTCT
<i>ACT1_rev</i>	GTACCACGGACATAACG
<i>DBF4_fw</i>	AAGCGTCATGAGTAAGAACA
<i>DBF4_rev</i>	CTGTGCTATTTTCTTTGATGT
<i>CDC6_fw</i>	TTTGTCTGGTTTGAATTGC
<i>CDC6_rev</i>	TTTATTTGCAATGTTGGGCC
<i>SLD2_fw</i>	GTGAAACGCCAATTAACCTTC
<i>SLD2_rev</i>	GTGGAGGATTAATAGTTGGACT
<i>SLD3_fw</i>	CAGACCCTAAAGAGTACATAGAA
<i>SLD3_rev</i>	TTTGTAAGTGTCACTTCCGT
<i>SLD7_fw</i>	ACAACAATCTCAACAAGGAAG
<i>SLD7_rev</i>	GGAGGCCACCCAAAATTAG
<i>MCM10_fw</i>	CCGATAATCACAAACGAATTAGA
<i>MCM10_rev</i>	TAGGTGGGCGAATTTAGC

with 100 μ l of propidium iodide solution (50 μ g/ml in PBS; Calbiochem, San Diego, CA, USA) overnight at 4 °C in the dark. Just before FACS analysis of the DNA content, 900 μ l PBS was added to the cells, and cell suspensions were sonicated three times per 10 s in an ultrasonic bath, Branson 2800 (Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT, USA) to prevent cells clumping. Analysis was performed using a FACS Calibur (Becton–Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). A total of 10,000 cells were counted per sample. At least three independent experiments were performed for each strain and selected time points during the Chronological lifespan (CLS) assay. Cells were analyzed with respect to DNA content and cell size using FL2 and FSC channels, respectively. The representative histograms were shown.

Cell cycle analysis

The cell cycle analysis was performed for exponentially growing cells, as described previously (Stepien et al. 2022), with consideration given to the generation time.

Determination of budding lifespan

After overnight growth, cells were arrayed on a YPD solid medium plate using a micromanipulator. Budding lifespan was determined microscopically using a micromanipulator, as described previously (Molon and Zebrowski 2017).

Determination of the total lifespan

The total lifespan was calculated as the sum of reproductive (time between the first and last budding) and post-reproductive lifespans (time between the last budding and cell death), thus showing the length of life of a single mother yeast cell expressed in units of time. The total lifespan of the yeast was determined as previously described by (Minois et al. 2005) with small modifications from (Molon and Zebrowski 2017).

Chronological lifespan (CLS) assay

The CLS of cells incubated in SDC minimal medium supplemented with necessary amino acids and 2%

(w/v) glucose was measured as previously described (Czachor et al. 2020).

RNA isolation, reverse transcription and RT-qPCR

The extraction of RNA, reverse transcription, and RT-qPCR were performed as described previously (Stepien et al. 2022). Primers used for quantitative Real-Time PCR are listed in Table 2.

Determination of Rad52 and Rfa1 foci frequency by fluorescence microscopy

The Rad52-YFP foci formation assay was performed as in (Krol et al. 2018) with some modifications. The studied strains were transformed with the pWJ1344 plasmid carrying a *RAD52::YFP* fusion (Torres-Rosell et al. 2007). The transformants were grown to the exponential phase (about 7×10^6 cells/ml) in a YPD liquid medium at 28 °C with shaking. A 1.5 ml aliquot of each culture was collected, centrifuged (1000 \times g), and resuspended in 30 μ l of 1 \times PBS, and 3.5 μ l of cells' suspension was placed on microscope slides to assess the percentage of cells spontaneously forming Rad52-YFP foci. To the remaining culture, zeocin was added to the final concentration of 100 μ g/ml, and the cells were incubated for an additional hour under the same conditions. Then, an aliquot of zeocin-treated strains was collected to examine the percentage of cells forming stress-induced Rad52-YFP foci. Imaging was performed at 100-fold magnification in DIC and YFP channels of an Olympus BX-51 fluorescent microscope operated by cellSens Dimension software and documented using a DP-72 camera. The numbers of cells and Rad52 foci in the cells were counted, and the average percentage of cells with Rad52 foci was calculated after screening at least 300 cells in each of three biological repeats for a total count of at least 900 cells. The results are presented as the quartiles of data, with the mean, median, SD, and *p*-values calculated using a two-sample Welch *t*-test.

The Rfa1-YFP foci were analyzed using a similar experimental scheme as described above, except that the strains with *RFA1-YFP::LEU2* fusion in the genomic locus of *RFA1* were used. Imaging was performed using a Zeiss AxioCam MRc5 Digital Camera (Zeiss, Oberkochen, Germany), mounted on a Zeiss Axio Imager.M2 fluorescence microscope operated

by Zeiss Axio Vision 4.8 software, using DIC (for bright field) and 38HE filter set (for YFP).

Since, in opposite to Rad52-YFP foci, the Rfa1-YFP foci rarely occur single per cell, we adopted semi-automatic counting of their number according to the methodology applied for another repair foci, Rad51-YFP, and described in (Antoniuk-Majchrzak et al. 2023). In brief, the Rfa1-YFP foci number was counted using several image-processing software, as follows: (1) the binary masks of cells were obtained through Cellpose software (RRID:SCR_021716, (Stringer et al. 2021)); (2) the binary masks of Rfa1 foci were produced by image preprocessing in Fiji (RRID:SCR_002285, (Schindelin et al. 2012)) with the plugin MorphoLibJ (Legland et al. 2016); (3) the resulted images were used to generate probability masks using semantic segmentation in ilastik (Berg et al. 2019) (4) then, the occurrences of respective foci in the areas of individual cells were counted using CellProfiler software (Stirling et al. 2021). At least 600 cells were analyzed in each of the three biological repeats. The results are presented as the quartiles of data, with the mean, median and SD marked. The statistical significance of the results was tested by a two-sample Welch *t*-test.

DAPI staining of mitochondrial DNA in the in vivo assay

Cells grown in YPD medium to the exponential phase at 28 °C with shaking were per additional 1 h cultivated in the same conditions but in the dark with the addition of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen) to a final concentration 1 µg/ml. Then, cells were pelleted by centrifugation (800 g), washed twice in PBS, suspended in 50 µl PBS and placed on a microscope slide. Imaging was performed using a Zeiss AxioCam 807c Digital Camera (Zeiss, Oberkochen, Germany), mounted on a Zeiss Axio Imager.M2 fluorescence microscope operated by Zeiss ZEN software, using DIC (for bright field) and 49 filter set (for DAPI).

Analysis of mtDNA fluorescent signals was performed similarly to the Rfa1 foci analysis described above. After image deconvolution, the binary masks for cells and mtDNA signals were prepared and used for segmentation. Fluorescent signals' intensities were calculated by converting mtDNA binary masks to regions of interest in Fiji software and calculating

the mean integrated density value for each set of raw images. At least 900 cells were analyzed in each of the three biological repeats. Data for all mtDNA were counted for each strain. Statistical significance was calculated using the Welch *t*-test.

Raman spectroscopy

Lyophilized yeast samples of WT and lowPICC strains were used to analyze their chemical composition using the FT-Raman Nicolet NXR 9650 spectrometer equipped with a 1064 nm laser. FT-Raman spectra were measured at an aperture of 50 and a spectral resolution of 8 cm⁻¹. The spectra were recorded in the range of 300–3,500 cm⁻¹ with a laser power of 0.5 W, and the diameter of the laser beam was 50 µm. For each spectrum, 64 scans were collected. Measurements were made in eight replicates. Raman spectra were processed by the Omnic and OriginLab software.

The principal components analysis (PCA) was used to compare samples for similarities and differences in Raman ranges for lipids, polysaccharides, proteins, and RNA.

Statistical analysis

The results represent the mean ± SD values for all tested samples in two independent experiments. The differences between the WT and isogenic heterozygous diploid strains were estimated using one-way ANOVA and Dunnett's post hoc tests. The values were considered significant when *p* < 0.05. The statistical analysis was performed using the Statistica 10.0 software, and statistical and multidimensional analysis was conducted using PAST 3.0, Origin 2018 software (Raman spectroscopy), and OriginPro (fluorescence microscopy).

Results and discussion

Reducing the number of genes involved in the regulation of initiation of DNA replication causes disturbances in DNA content and growth rate

The way to resolve the role of essential genes in various biological processes without changing their molecular function, which excludes the usage of

the point mutants, is to use the conditions in which their expression would be limited. One of the ways to obtain such an experimental model is the usage of heterozygous strains that possess only one copy of the essential gene. For some time, we have been studying the far-reaching connections between proteins involved in the initiation of replication and the cell aging process, which also leave marks on cellular metabolism (Stepien et al. 2022, 2024). In the present project, we follow up on the influence on cells' lifespan and the factors involved in the initiation step of replication. This time, however, we are not interested in factors that recognize ARS sequence as the ORC complex does or that provide the ability to unwind the DNA helix as the CMG helicase complex does. We are interested in how the other factors involved in the initiation of the replication step, e.g., these modulating the molecular function of ORC and CMG, enabling the formation of functional pre-IC, thus, factors responsible for the control of the initiation of replication, influence the cells' lifespan. Thus, in the present study, we concentrated on the following genes: *CDC6*, *DBF4*, *SLD3*, *SLD7*, *SLD2*, and *MCM10*, and to be able to study phenotypes, we used the yeast strains heterozygous with respect to these genes. For ease of reference, we will refer to lower pre-IC control (lowPICC) strains when writing about strains: *CDC6/cdc6Δ*, *DBF4/dbf4Δ*, *SLD3/sld3Δ*, *SLD7/sld7Δ*, *SLD2/sld2Δ*, and *MCM10/mcm10Δ*.

We started by ensuring that, indeed, in the lowPICC strains, the expression level of respective genes was lowered. Using the quantitative-RT-PCR approach, we determined the expression levels of respective genes in all lowPICC heterozygous strains as compared to their expression in the WT (BY4743) strain. Results shown in Fig. 1A proved the significant reduction ($p < 0.05$) in the expression of all tested genes in the respective lowPICC strain compared with the expression level of the same gene in a WT strain. The most pronounced decrease in expression was observed for the *MCM10* gene in the *MCM10/mcm10Δ* strain. Thus, all heterozygous, lowPICC strains could serve in further experiments to follow the phenotypic effects of lower expression of assayed genes.

We compared the growth rate and the average doubling time of the set of analyzed heterozygous lowPICC strains on a rich medium with 2% glucose. Two methods were used to estimate the growth rate:

changes in optical density and the number of cells per mL in cultures during the experimental period. Both measurements results were shown because, in comparison to the growth rate analysis (Fig. 1B, C), the doubling time analysis revealed a statistically significant extension of the cell cycle (Fig. 1D). It has been suggested that this phenotype might be associated with changes in cell size, morphology, transparency or thickness of the cell wall of analyzed strains. As was shown in Fig. 1C, all tested strains presented a flatter steep growth curve than the WT control, which suggested expanded doubling time. The most pronounced effect was seen for *DBF4/dbf4Δ* and *SLD2/sld2Δ*. As shown in Fig. 1D, the mean cell doubling time increased significantly for all lowPICC strains compared to WT ($p < 0.001$). The average doubling time of a single cell was calculated during a routine reproductive potential analysis, which is the most accurate method of estimating doubling time in budding yeast. It disregards variations in cell size and minimizes the effect of virgin cells (constituting 50% of the population in the exponential phase).

In our previous studies, we documented that the lowered expression of genes encoding the ORC or CMG complexes' subunits results in a significant decrease in the growth rate (Stepien et al. 2022, 2024). Thus, the current results followed the previously shown rule that the exact controlled expression level of essential genes encoding proteins involved in the initiation of replication is necessary to maintain the WT growth rate phenotype.

We also examined sporulation efficiency in the lowPICC strains. As shown in Fig. 1E, most of the tested strains exhibited altered sporulation efficiency, except *SLD7/sld7Δ* and *SLD3/sld3Δ*, which behave exactly as WT. However, not all strains displayed the sporulation efficiency change in the same direction, e.g., in the *DBF4/dbf4Δ* strain, it increased by about 80%; in *SLD2/sld2Δ* and *CDC6/cdc4Δ* strains, mild growth in sporulation efficiency was noticed, while in the *MCM10/mcm10Δ* strain decrease by about 20% in the sporulation efficiency was observed. Those data suggest that aberrations in proper control of the initiation replication step also impact meiosis. Since the lowered level of expression of genes encoding factors influencing replication initiation does affect the effectiveness of the sporulation process, we can assume the mutations in the respective genes could impact yeast's ability to sporulate as well, if only by leading

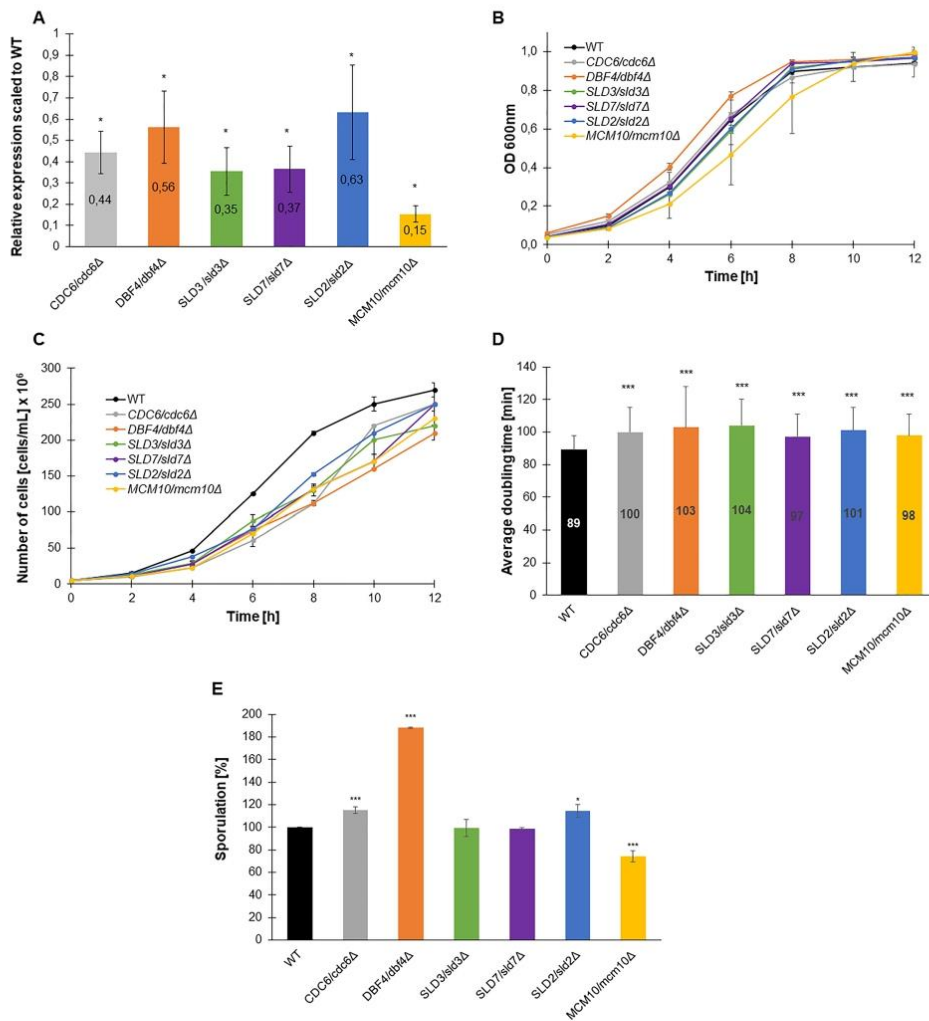


Fig. 1 Phenotypic characterization of lowPICC strains. Growth and sporulation efficiency phenotypes of strains lacking one copy of the gene encoding proteins are necessary for the control of the initiation of replication. The relative expression ratio of *CDC6*, *DBF4*, *SLD3*, *SLD7*, *SLD2*, and *MCM10* normalized to *ACT1* and to the expression level in WT in the respective heterozygous strains was calculated from five independent biological repetitions (A). Comparison of growth curves for respective heterozygous lowPICC strains and WT control (BY4743) determined by the optical density (B) or

number of cells per ml (C). An average doubling time of single yeast mother cells is estimated during the budding lifespan. The error bars indicate standard deviations from two independent experiments (D). Sporulation frequency of the BY4743 and lowPICC strains (E). Standard deviation was also counted. Data are expressed as mean \pm SD from three independent experiments. Bars indicate SD. Statistical significance was assessed using ANOVA and Dunnett's post hoc test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) compared to the WT

to changes in the speed of this process. Consequently, this observation may serve as a starting point for further research to understand these particular connections and reveal mechanisms controlling this process.

The initiation of replication must be tightly controlled in order to ensure that the entire genome is duplicated precisely in each cell cycle. This is realized by coordinating the first steps in DNA replication, contributing to the replication initiation: ARS recognition, the successive building of pre-IC, and activating the replicative DNA helicase. Therefore,

we investigated if and how the cell cycle changes in lowPICC strains' cells. We used flow cytometry analysis of propidium iodide-stained cells to reveal the potential cell cycle abnormalities. As shown in Fig. 2A (Fig. S1), a slight increase in the length of the G1 and S-phase of the cell cycle were detected in most of the assayed strains. Both cell cycle phases were prolonged in *CDC6/cdc6Δ*, *DBF4/dbf4Δ*, and *SLD2/sld2Δ* strains. In the *SLD3/sld3Δ* strain cells, the G1 phase was elongated significantly (by 27%), while the S phase increased the most of all tested

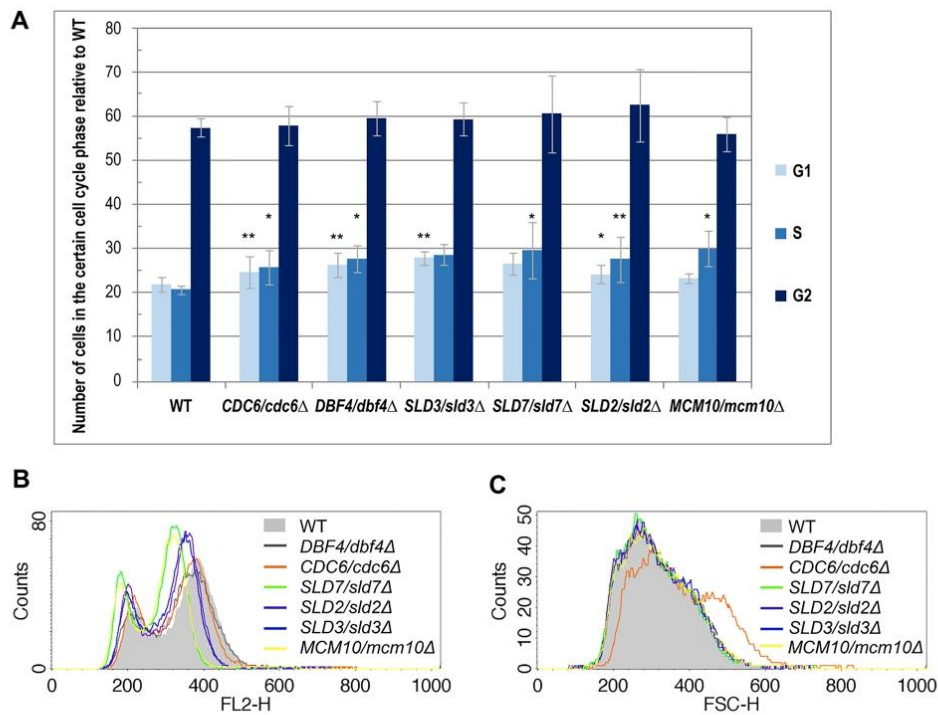


Fig. 2 Flow cytometry analysis revealed cell cycle aberrations in lowPICC strains. The cells of WT (BY4743) and the isogenic heterozygous strains *DBF4/dbf4Δ*, *CDC6/cdc6Δ*, *SLD7/sld7Δ*, *SLD2/sld2Δ*, *SLD3/sld3Δ*, and *MCM10/mcm10Δ* strains, grown at 28 °C in YPD medium to the exponential phase, were labeled with propidium iodide and their DNA content was tested using flow cytometry. **A** The quantification of the cell cycle analysis results. The percentage of cells in the specific cell cycle phase was calculated considering the strains'

generation time and shown with respect to WT. The mean of three biological replicates is shown. Bars indicate standard deviations. Statistical significance with respect to the cell cycle phase of the WT control was assessed using the Student's t-test ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$). For the gating conditions, see supplementary Fig. S1. The DNA content and **(B)** and cells' size **(C)** histograms (mean of three biological repetitions) of lowPICC strains versus WT were shown

strains in the *SLD7/sld7Δ* and *MCM10/mcm10Δ* strains, by 43% and 45%, respectively.

Interestingly, flow cytometry analysis also showed differences in the DNA content among tested strains (Fig. 2B). A significant increase in the size of the cells in the *CDC6/cdc6Δ* strain population was also noticed (Fig. 2C). These data suggest that the differences in the growth rate of the analyzed strains do not result simply from the cell cycle length changes, but other factors might play a role there. Considering the effect of decreased expression of genes encoding proteins engaged in the initiation of DNA replication on the cell cycle phases' length, we saw the following rule. The most significant impact on the G1 phase duration, i.e., its significant elongation, was observed when the ORC subunits gene expression level declined (Stepien et al. 2022); a lower effect was seen in the strains with a decreased expression of the CMG helicase subunits (Stepien et al. 2024), and the yet minor but more diverse (as concerning both, G1 and S phases of the cell cycle) effect, was shown in this work, for lowPICC strains.

In eukaryotes, chromosome replication starts from multiple origins, which are activated at different time points during the S phase and terminates when converging replication forks meet (Hyrien and Goldar 2010). Even though we already know there are early and late types of origins and that the origin chromosomal localization, active transcription, or occurrence of DNA damage might influence the origin usage during replication, the rules that guide the origin licensing and firing are far from being solved (Early et al. 2004; Eshaghi et al. 2007; Legouras et al. 2006; Zappulla et al. 2002). At present, we believe that differences in doubling times in analyzed heterozygous strains with limited availability of proteins involved in the control or activation of replication initiation may result from a changed pattern of replication start sites used. Previous research has proven that some factors involved in the initiation of DNA replication in yeast are also responsible for regulating both the origin sites chosen and the time activated in a replication round. Therefore, yeast origin firing is an important part of cell cycle regulation, and as was demonstrated previously, the proper programmed of origin firing prevents incorrect checkpoint activation and regulates the length of the S-phase in budding yeast (Mantiero et al. 2011). The activation efficiency of the origin

sites increased genome-wide when Sld2 and Dbf4 proteins were overexpressed simultaneously with Cdc45 and Sld7 proteins (McGuffee et al. 2013). Additionally, Tanaka et al. found that overexpression of only Sld3, Sld7, and Cdc45 could speed up the activation time of origins that would usually be fired as last (Tanaka et al. 2011a). The disturbed growth rates may also be related to disorders at the level of MCM helicase loading caused by a decrease in the level of, e.g., Cdc6 or ORC, which makes licensing difficult (Kotsantis et al. 2018).

The finding that some specific replication initiation factors, e.g., Sld2, Sld3, and Sld7, are expressed at levels significantly lower than the pre-RC and replisome components suggests that they are crucial for origin activation and successful initiation of replication (Mantiero et al. 2011). In the case of the analyzed set of lowPICC strains, changes in doubling time are also associated with slight cell cycle disorders; however, we should stress here that two cell cycle phases were affected in most of them, the G1 and S phases. These results are supported by the observation of similar effects for various deletions or conditional mutants in these genes. The prolongation of G1 and/or S phases was noticed, e.g., in *mcm10ΔC* (Douglas and Difley 2016), *sld7Δ* (Tanaka et al. 2011b), *sld3-5* (Kamimura et al. 2001), *sld2-5td* and *sld3-2A* (Tanaka et al. 2007), *cdc6^{K114A}* (Weinreich et al. 1999), and in strain carrying *TetO₇-DBF4* in the shut off conditions for *TetO* promoter (Yu et al. 2006).

Additionally, flow cytometry analysis showed the DNA content differences between some of lowPICC strains and WT control (Fig. 2B). The two groups with lower than WT control DNA content were visible; the *SLD2/sld2Δ* and *SLD3/sld3Δ* strains showed slight shifts, and the *SLD7/sld7Δ* and *MCM10/mcm10Δ* strains showed more significant shift on the FL2-H axis to the left, suggesting drop down in the fluorescence intensity of DNA intercalating dye (here, propidium iodide). Such a shift is usually interpreted as a decrease in the DNA content, e.g., due to increased DNA damage, the error-prone DNA repair leading to DNA rearrangement events resulting in the loss of part or even whole chromosomes. However, it can also be attributed to the higher DNA condensation or accumulation of single-stranded DNA regions that limit the intercalation of fluorescent dye into DNA. Another source of DNA content shift might be a lowered number of mitochondrial DNA (mtDNA).

The result was so striking that we decided to have a closer look at this issue.

Lowered expression of lowPICC genes leads to aberrant DNA damage response and affects mtDNA content

To reveal if lowPICC strains accumulate DNA damage or ssDNA regions, we combined fluorescence microscopy with the usage of fluorescently labeled proteins, Rad52-YFP (a recombinase involved in DNA damage repair via homologous recombination) and Rfa1-YFP (a subunit of the ssDNA binding RPA complex), that are widely used markers in such applications (Lisby et al. 2001; Ngo et al. 2020). The results of these experiments are shown in Fig. 3.

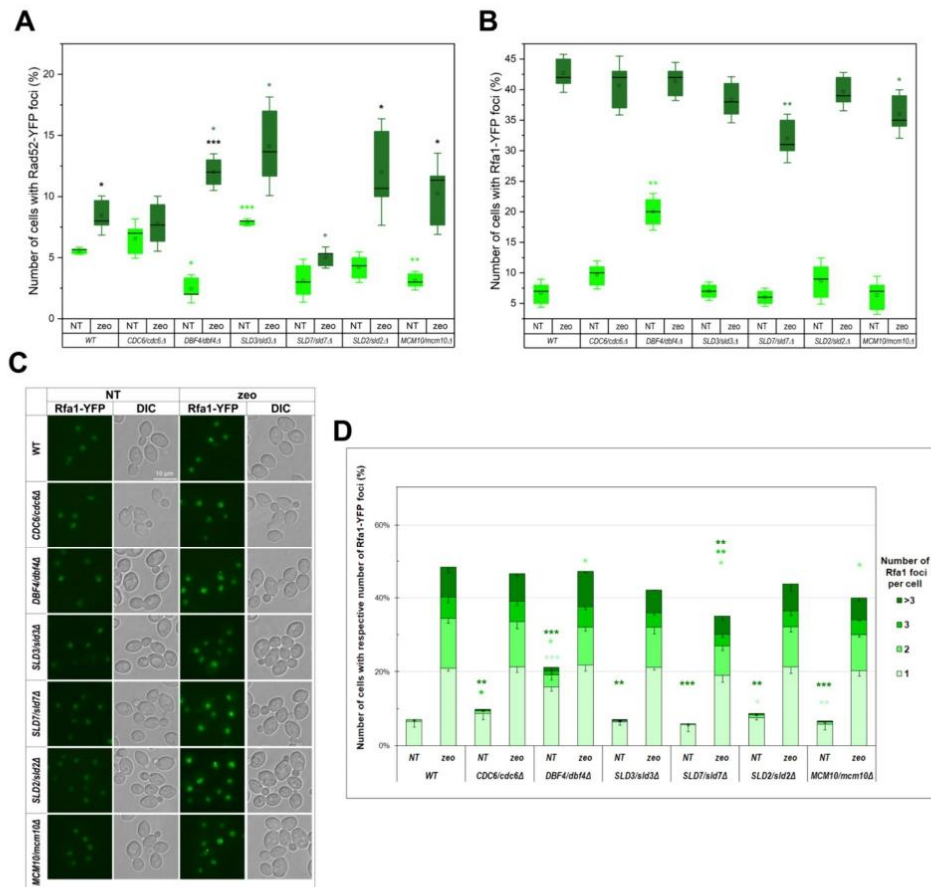
The number of cells with spontaneously formed Rad52-YFP foci increased significantly in the strain *SLD3/sld3Δ*, while it decreased significantly in *DBF4/dbf4Δ* and *MCM10/mcm10Δ* strains (Fig. 3A). Zeocin treatment, which results in double-strand stress, usually causes an increase in the percentage of cells with Rad52-YFP foci because the recombinase Rad52 is recruited to the damage site, where the DNA repair occurs. Indeed, that is what was observed for the WT control, as well as for most of the strains, but with some exceptions. The *CDC6/cdc6Δ* strain almost did not react to zeocin-stress. In the *SLD7/sld7Δ* strain, the increase in the number of cells with Rad52-YFP foci formed after zeocin treatment was neglectable, but what caught our attention was that the number of cells with the stress-induced foci in this strain was significantly lowered compared to their number in the control strain treated with zeocin. Altogether, the observed phenotypes were highly variable. In two strains, *DBF7/dbf4Δ* and *SLD3/sld3Δ*, the number of stress-induced Rad52-YFP foci rose significantly compared to zeocin-treated control. At the same time, the percentage of cells spontaneously forming Rad52 foci in those strains differed almost fourfold. In the other two strains, *SLD2/sld2Δ* and *MCM10/mcm10Δ*, the percentage of stress-induced Rad52-YFP foci rose significantly compared to non-treated control for respective strains, but the raising range varied (about two and four-folds, respectively).

As shown in Fig. 3B–D, in the control conditions, the number of cells with Rfa1-YFP foci was significantly increased in the *DBF4/dbf4Δ* strain compared to the WT. Moreover, in the population of cells

containing Rfa1-YFP foci, more cells containing several foci per cell were present (in contrast to Rad52-YFP foci, which mostly appear single and only rarely as two per cell). Such a phenotype frequently accompanies increased DNA damage (see Fig. 3D) or accumulation of ssDNA gaps. Interestingly, even if the frequency of cells with Rfa1-YFP foci did not change, all the rest of the lowPICC strains displayed an increased number of cells with a high number (more than three) Rfa1-YFP foci per cell, which was not observed in the control strain. The zeocin treatment, which causes the double-strand break induction, resulted in a significant increase in the Rfa1-YFP-containing cell population, including an increase in the foci number per cell. Furthermore, the number of cells containing zeocin-induced Rfa1-YFP foci decreased significantly in the *SLD7/sld7Δ* and *MCM10/mcm10Δ* strains, mainly those with multiple foci.

Described phenotypes helped us understand possible sources of DNA content shifts observed for some of the tested strains. For example, the accumulation of Rad52-YFP foci-containing cells in the *SLD3/sld3Δ* strain suggested more frequent DNA damage in those cells and subsequent higher requirements for homologous recombination. Since the Rfa1-YFP foci did not accumulate in this strain, we can assume the double-strand break repair pathway is activated in those cells. In the strains with increased double strand breaks (DSBs), the risk of loss of part of the repetitive sequence rises. One of the naturally occurring repetitive sequences in the genome is the region encoding rRNA, which in yeast is located on chromosome XII arm. Since repetitive sequences and highly expressed DNA are risk factors promoting genome instability, and rDNA unquestionably belongs to both groups, the rDNA region of chromosome XII is tough to maintain; thus, its aberration serves frequently as a marker for genome instability. The average number of rDNA repeats on this chromosome arm is around 125 in the WT strain. The length of individual rDNA units in *S. cerevisiae* is 9.1 kb, so an average rDNA array is more than 1.1 Mbp long. In the case of long repetitive sequences such as rDNA repeats, the loss of their part could be detectable even in DNA content analysis. The strains vary in the number of repetitions, and the lower rDNA array length results in generation time elongation.

We showed the *SLD3/sld3Δ* strain has prolonged generation time, displayed a high frequency of



recombinase Rad52 recruitment to the DNA damage sites, and that the DNA content of this strain decreased. These results are in line with the data shown in (Lynch et al. 2019), showing the association of *Sld3* depletion with chromosome XII instability. The authors showed a similar correlation with *Sld2* depletion, but while we do see the increase in generation time and a higher percentage of cells with Rad52-YFP foci after zeocin treatment, in contrast to *SLD3/sld3Δ*, the spontaneous forming Rad52-YFP foci number did not increase in the *SLD2/sld2Δ* strain. Therefore, the connection is not so obvious in this case and would require further

investigation to reveal the mechanism of rDNA array instability in that strain. However, it should be mentioned that a previous study has reported that yeast strains with reduction-of-function alleles of *SLD2* and *MCM10*, *SLD3*, *DBF4*, and *CDC6* displayed chromosome instability phenotypes (CIN) (Stirling et al. 2011). The increased frequency of gross chromosomal rearrangements (GRC) was shown for the first four strains, and increased chromosome transmission fidelity was shown for *cdc6-1*. Moreover, a strain with depleted *SLD2* level and *mcm10-1* mutant were qualified as strains with strong CIN phenotype.

Fig. 3 Analysis of the frequency of DNA double-strand breaks and ssDNA region in lowPICC strains. The Rad52-YFP and Rfa1-YFP foci were detected in WT and the isogenic heterozygous strains *DBF4/dbf4Δ*, *CDC6/cdc6Δ*, *SLD7/sld7Δ*, *SLD2/sld2Δ*, *SLD3/sld3Δ*, *MCM10/mcm10Δ* grown to exponential phase (see material and methods section for details). The Rad52-YFP (A) and Rfa1-YFP (B) foci frequency quantification. Three biological replicates were performed, each with at least 300 cells (for Rad52) or 600 cells (for Rfa1) counted for every strain and condition. Boxes represent the quartiles of data. Horizontal lines in the boxes represent the median values. The square represents the mean value. Whiskers represent standard deviation with a coefficient = 1.5. Statistical hypothesis testing was conducted using a two-sample Welch *t*-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. The light green stars reflect the statistical significance of observed difference with respect to the non-treated control strain, the dark green stars reflect the statistical significance with respect to the zeocin-treated control strain, and the black stars reflect the statistical significance of change observed for a single strain between treatment with zeocin and control conditions. For clarity, the statistically significant difference ($p < 0.001$) in the Rfa1 foci number between non-treated and zeocin-treated cells was omitted from the graph (B). C Rfa1-YFP foci were detected in the same strains as in (A and B). D The graph shows the quantification of the number of the cells with respective Rfa1-YFP foci number per cell. The mean (\pm SD) of the percentage of cells with one, two, three or more Rfa1-YFP foci in cells were counted in three independent biological repetitions. The statistical significance of the difference between the WT control strain and a given lowPICC strain was shown above the result for the given strain in control conditions. Alike was done for the results obtained for strains treated with zeocin. The difference in the percentage of cells with the particular number of Rfa1-YFP foci per cell between non-treated and zeocin-treated strains was statistically significant ($p < 0.01$) for each strain and thus was omitted from the graph. The stars representing the statistical significance of the results for the certain subpopulation of the cells are shown in the same color as this population

The *mcm10-1* strain is repetitively shown on the screens for genomic unstable mutants. For example (Su et al. 2015) showed in the *mcm10-1* mutant cells CAG tracts instability, which, as the authors believe, relies on the increased Slx5/8-dependent SUMOylation of Rad52 bound to the CAG tract, which targets this recombinase to degradation. Moreover, (Thu et al. 2016) showed, in the *mcm10-1* strain, increased sumoylation of several Slx5-Slx8 SUMO-targeted ubiquitin ligase (STUbL) substrates, among them Rad52, Rad59, Sgs1, i.e., proteins important for homologous recombination repair. As was shown lastly for another protein crucial for homologous recombination, recombinase Rad51, posttranslational modification with SUMO is crucial for Rad51 recruitment to DNA, while its

ubiquitination by STUbL E3, Slx5-Slx8 complex is indispensable for repair foci dissolution, which allows to finish repair (Antoniuk-Majchrzak et al. 2023). Thus, due to an imbalance in the SUMOylation level of homologous recombination involved protein in the *mcm10-1* strain, the faithful DNA damage repair could be staggered, leading to favor of the error-prone pathways of HR (e.g., SSA or BIR). In effect, in the *mcm10-1* strain, likewise in the strains lacking Slx5 or Slx8, the gross chromosomal rearrangements (in the case of *slx5Δ*, predominantly deletions) are elevated, and telomere length is affected (Nagai et al. 2008; Zhang et al. 2006).

Since mtDNA level might also affect total cellular DNA content, we performed an experiment that allowed the measurement of mtDNA content. We stained the lowPICC strains' cells with DAPI and analyzed the mtDNA-derived fluorescent signal. Figure 4 summarizes the results of this experiment. Only the *SLD3/sld3Δ* strain displayed mtDNA content close to that observed in the control strain. The *DBF4/dbf4Δ*, *SLD2/sld2Δ*, and *CDC6/cdc6Δ* strains showed mtDNA accumulation, whereas in *DBF4/dbf4Δ* strain the mtDNA content increased by 40%, and in the other two strains by 22 and 13.5% respectively (Fig. 4A, B). In the *MCM10/mcm10Δ* and *SLD7/sld7Δ* strains, we observed the opposite effect; the mtDNA content decreased by 17% and 11%, respectively. This result helps explain previously obtained results, such as shifts in DNA content histograms. The strains with the lowest DNA content are actually the same as those with the lowest mtDNA content. The higher mtDNA content masks to some extent the cellular DNA content aberrations resulting from, e.g., high frequency of ssDNA regions in *DBF4/dbf4Δ* strain cells or high number of DNA damage that may lead to DNA rearrangements or DNA loss in *SLD2/sld2Δ* strain cells. The changes in the mtDNA detected in the lowPICC strains are significant because the previously published data indicated the connection between mtDNA level and various biological processes contributing to genome stability (Puddu et al. 2019). For example, the mtDNA level increases in the strains that have activated the DNA damage response and are accumulating dNTPs. The loss of mtDNA was correlated to aneuploidy.

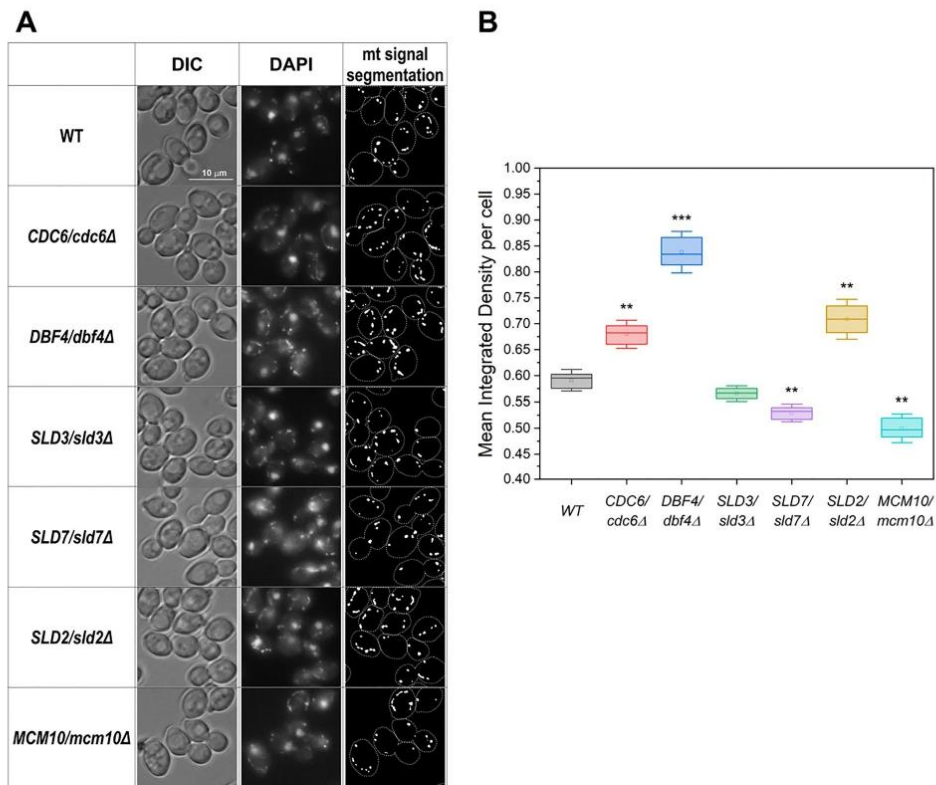


Fig. 4 Changes in the mtDNA content in the lowPICC strains' cells. The WT control and heterozygous strains *DBF4/dbf4Δ*, *CDC6/cdc6Δ*, *SLD7/sld7Δ*, *SLD2/sld2Δ*, *SLD3/sld3Δ*, *MCM10/mcm10Δ* grown to exponential phase were stained with DAPI in vivo. The DAPI signal was documented by fluorescent microscopy. Then, the segmentation of cells and mtDNA signals in the pictures obtained was performed, and the integrated density of mtDNA signals per cell was measured. **A** Illustration of DAPI staining results of lowPICC strains and an example of segmentation of both cells (marked with a line) and mtDNA signal (bright spots). **B** Graph show-

ing quantified results of mtDNA fluorescent signal intensity displayed as the mean integrated density of segmented mtDNA signal per cell (i.e., the sum of the values of the pixels in the area of segmented mtDNA). At least 300 cells per each from three independent biological repetitions were analyzed. Boxes represent the quartiles of data. Horizontal lines in the boxes represent the median values. The dot represents the mean value. Whiskers represent standard deviation with a coefficient=1.5. The statistical significance of the results was checked using the Welch t-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Lowered expression of respective essential genes in lowPICC strains affects cells' reproductive potential and aging

Our data clearly showed that heterozygous loci presence in the analyzed strains impacts the aging of both active mitotically and post-mitotic cells. As shown in

Fig. 5A, all strains had significantly extended reproductive potential ($p < 0.001$). In almost all heterozygous strains (except *SLD2/sld2Δ*), the mean budding lifespan exceeded 30 doublings performed by a single yeast mother cell. The highest average reproductive potential had the *SLD7/sld7Δ* (38.15), *MCM10/mcm10Δ* (37.9), *SLD3/sld3Δ* (37.9) and *DBF4/dbf4Δ*

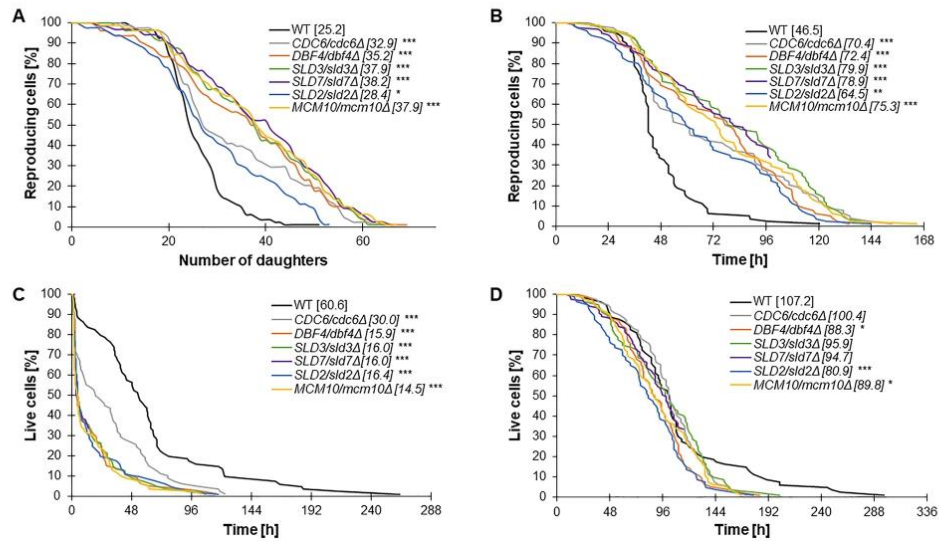


Fig. 5 Aging phenotypes of the lowPICC strains. Comparison of the reproductive potential (A), reproductive lifespan (B), post-reproductive lifespan (C) and total lifespan (D) of the diploid BY4743 (WT) and isogenic heterozygous strains. Statisti-

cal significances were assessed using ANOVA and Dunnett's post hoc test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). The mean value for a total of 90 cells from two independent experiments is shown in parentheses

(mean 35.2 doublings/cell) strains. In particular, it is worthwhile to highlight the maximum number of doublings performed by individual cells. The WT is the only strain that has performed a maximum of 50 doublings, while almost all of the analyzed heterozygotes have performed a maximum between 65 and 70 doublings (exception *CDC6/sld2Δ* and *SLD2/sld2Δ*) (Fig. 5A).

Based on Minois' concept, yeast cells do not die after the last doubling (Minois et al. 2005). This key observation allows the introduction of the time parameter in yeast aging analyses. The total lifespan was introduced and consists of two phases, reproductive and post-reproductive, which may be regulated differently. A significant increase in the reproductive potential (Fig. 5A) with an additional significant increase in the doubling time (Fig. 1D) leads to an increase in the reproductive time (reproductive lifespan). Figure 5B shows a significant increase in the reproductive lifespan in all analyzed strains compared to the WT. Post-reproductive lifespan refers to the last phase of a yeast cell's life, i.e., from endings of

budding to cell death. In Fig. 5C, we showed a significant decrease in the post-reproductive lifespan of all analyzed heterozygotes compared to WT ($p < 0.001$). The extremely short mean post-reproductive lifespan was observed in the case of *DBF4/dbf4Δ*, *SLD2/sld2Δ*, *SLD3/sld3Δ*, *SLD7/sld7Δ* and *MCM10/mcm10Δ* heterozygous strains: it was approximately four times shorter in comparison to WT. In turn, total lifespan is determined as the sum of time (hours) that cells spend in the reproductive and post-reproductive phases of life. Interestingly, as shown in Fig. 5D, only one copy of the respective gene in lowPICC strains led to a decrease in the total lifespan of all analyzed strains compared to WT. A statistically significant acceleration of aging was observed for the *SLD2/sld2Δ* ($p < 0.001$), *DBF4/dbf4Δ* ($p < 0.05$) and *MCM10/mcm10Δ* ($p < 0.05$). As shown in Fig. 5D, a significant difference was observed also in the maximal survival time of heterozygous cells compared to WT. We found that all tested strains had a shorter maximum lifespan (about 100 h) than WT. The previous analyses performed using strains heterozygous

with respect to genes encoding proteins involved in replication initiation showed no effect on total lifespan, making the obtained results surprising (Stepien et al. 2022). Here, we demonstrated that reduced expression of *DBF4*, *CDC6*, *SLD2*, *SLD3*, *SLD7* and *MCM10* genes also affects the total lifespan of mitotically active cells, which is a novelty in yeast aging research.

Then, we showed the correlation between the selected aging parameters (Fig. 6). As visible in Fig. 6A, a negative correlation between post-reproductive lifespan and the reproductive potential is evident. The trend line suggests a strong negative correlation between these parameters, and the value of the Pearson correlation coefficient is -0.76 . Here, we also presented a strong positive correlation between the reproductive lifespan and the reproductive potential (Pearson correlation coefficient is 0.946) (Fig. 6B). This suggests that there is a trade-off between the reproductive lifespan and post-reproductive lifespan. In other words, as the reproductive lifespan increases, the post-reproductive lifespan decreases. This is likely due to the fact that organisms are allocating more resources to reproduction and less to maintenance and repair. Even though yeast is a single-celled organism, the mechanisms of replicative aging share certain similarities with the aging processes in multicellular organisms, including humans. Therefore, understanding this process in yeast can provide insights into the general mechanisms of cellular aging and potential strategies to delay this process.

A different method to measure yeast lifespan has been called CLS (Fabrizio and Longo 2003; Longo et al. 1996). Therefore, this method assesses how long yeast cells can survive and remain active in a non-budding phase. Living cells (survival) are counted by measuring their ability to clonogenicity (CFU) during growth on a rich YPD solid medium. In synthetic dextrose media, cell density achieves its maximum after 2–3 days, but the metabolic state remains high for up to 6 days after that (Gray et al. 2004). With these methods, it has been demonstrated that yeast cells can survive up to a period of weeks in a non-budding state, which can provide a valuable source of knowledge in studies aimed at understanding aging biology. A CLS measures the survival of non-budding cells and can also be used as a model for aging in post-mitotic high eukaryote cells, including humans. This makes the CLS an ideal tool for studying aging in non-dividing cells such as human cells.

Overall, the CLS was found to be a useful tool for understanding the biological processes of aging and aging-related diseases. All lowPICC strains displayed slowed aging during the first 14 days of the experiment, as shown in Fig. S2. Statistically significant changes were observed on the 4th and seventh day of the experiment ($p < 0.001$). All analyzed strains showed higher survival than WT. It was observed that on the 14th day, *SLD3/sld3Δ* and *SLD7/sld7Δ* exhibited the highest survival rates, with values of $\sim 35\%$ and $\sim 25\%$, respectively. In turn, the lowest survival rate in the analyzed group

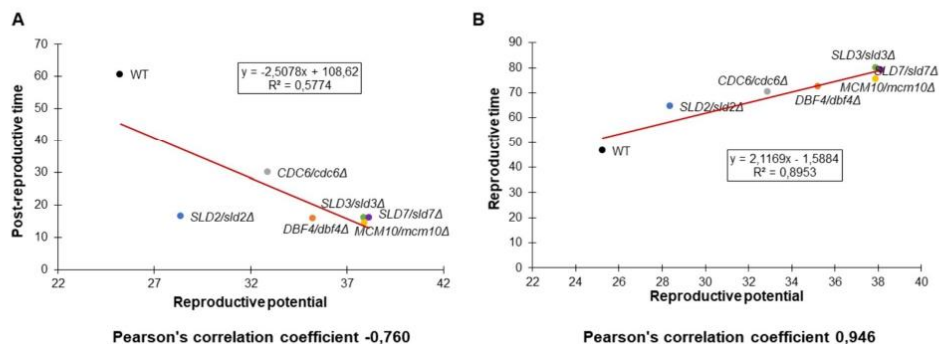


Fig. 6 Comparison between mean reproductive potential and mean reproductive lifespan according to Pearson's correlation coefficient (A) and between the mean reproductive poten-

tial and mean post-reproductive lifespan (B) of the WT strain (BY4743) and the isogenic heterozygous lowPICC strains

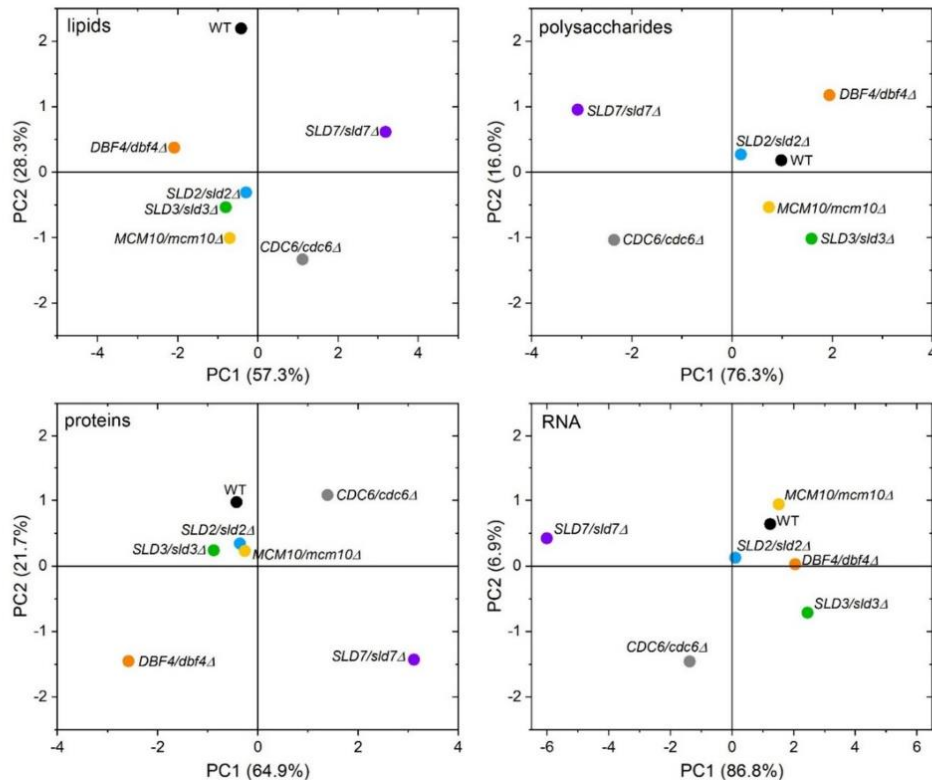


Fig. 8 The 2D score graphs for PCA of FT-Raman data show the relationships between analyzed yeast (WT and lowPICC strains) within the identified functional groups (lipids, polysaccharides, proteins, and RNA)

WT control (Fig. 7). This was indicated by both the Raman spectrum and the PCA analysis.

The correlations between the content of macromolecules in cells and aging appear interesting. We discovered a strong negative correlation between the content of lipids, proteins, RNA, and polysaccharides and the lifespan of cells (Fig. 9A–D). This means that maintaining the content of these macromolecules in the cell at a relatively low level ensures the maintenance of the aging rate at the level of the WT strain. On the other hand, the accumulation of these macromolecules in the cell leads to accelerated aging and cell death, which was observed in *SLD2/sld2Δ* and *DBF4/dbf4Δ* strains.

These results indicate the key importance of the content of proteins, lipids, polysaccharides, and RNA on aging in mitotically active yeast cells. These results also underline that maintaining the proper balance of macromolecules in the cell is necessary to maintain longevity.

Lipids perform a wide range of biological functions, from keeping membranes structurally intact to providing energy storage and signaling. Lipids also play a significant role in the aging process of yeast cells (Beach et al. 2013). The connection of lipids to cell death is complex, and so far, it is been poorly understood. Studies in yeast have revealed various aspects of lipotoxicity, including the toxicity of free

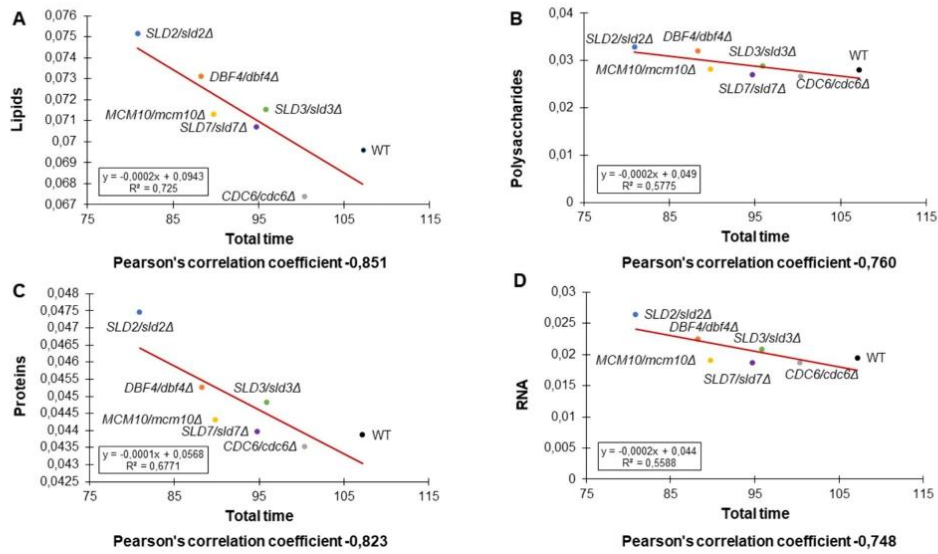


Fig. 9 Comparison between mean total lifespan and lipids (A), polysaccharides (B), proteins (C), and RNA (D) contents according to Pearson's correlation of the WT strain (BY4743) and the isogenic heterozygous lowPICC strains

fatty acids, cell death modulated by sphingolipids, as well as the involvement of lipid peroxidation in the mitochondrial pathways of apoptosis (Eisenberg and Büttner 2014). Some recent studies have demonstrated that the regulation of specific lipid species plays an important role in the process of human aging. It has been reported in several studies that senescent cells accumulate more lipid droplets than proliferating cells. Therefore, in senescent cells, deregulated lipid accumulation may be a result of increased lipid uptake, an increase in lipid biosynthesis pathways, or a deregulation of lipid breakdown pathways (Chee et al. 2021; Flor et al. 2017).

Polysaccharides in yeast are found mainly in the cell wall (Saadat et al. 2021). The role of polysaccharide content in yeast aging has not been analyzed so far. However, we have previously reported that the cell wall is a key factor determining the reproductive potential of the cell and probably longevity (Molon et al. 2020, 2018). Interestingly, the analyzed strains showed increased resistance to cell wall inhibitors (Congo red and Calcofluor White) compared to WT (Fig. 10). This indicates that the

proteins involved in the initiation of DNA replication also play a role in cell wall biogenesis and the adaptation of the yeast cells to changing environmental conditions, including stress.

The link between cellular protein levels and yeast aging is a topic of broad research. In yeast, prior studies have demonstrated that disruptions in ribosome structure, which slow down translation, contribute to the deceleration of aging (Borkiewicz et al. 2019; Steffen et al. 2008, 2012). Conversely, an increase in the quantity of ribosomal proteins accelerates aging and diminishes the cell's reproductive potential (Molon et al. 2023). Therefore, proteostasis, or protein homeostasis, refers to the healthy maintenance of the cellular proteome and involves highly complex and interconnected pathways that govern the fate of proteins from synthesis to degradation. It is well-recognized that the ability of cells to maintain proteostasis declines during aging (Sampaio-Marques and Ludovico 2018). We have a hypothesis that the accumulation of proteins in cells of accelerated aging strains may be related to the deregulation of two main degradation

	Control	Calcafluor white 10 µg/mL	Calcafluor white 50 µg/mL	Congo red 50 µg/mL	Congo red 100 µg/mL	Congo red 150 µg/mL	NaCl 500 mM	NaCl 1 M	SDS 0.03%
WT	++++	++++	+	++++	++++	++	++++	+++	+++
<i>CDC6/cdc6Δ</i>	++++	++++	++	++++	+++	+++	++++	++++	+++
<i>DBF4/dbf4Δ</i>	++++	++++	+	+++	++	++	++++	++++	++
<i>SLD3/sld3Δ</i>	++++	++++	+++	++++	++++	+++	++++	++	+++
<i>SLD7/sld7Δ</i>	++++	++++	++	++++	++++	+++	++++	++++	++++
<i>SLD2/sld2Δ</i>	++++	++++	++	++++	++++	+++	++++	+++	++++
<i>MCM10/mcm10Δ</i>	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++	+++

Fig. 10 Drug sensitivity analysis results were performed for lowPICC strains, using drop test assay

pathways, i.e., ubiquitin–proteasome system and autophagy.

The stability and metabolism of RNA, including its levels, have been linked to cell life and aging in yeast. However, it is important to note that the relationship between RNA levels and longevity in yeast is complex and multifaceted (Falcone and Mazzoni 2018). Exact mechanisms and relationships between RNA levels and longevity in yeast are still an active area of research. Interestingly, the analyzed strains exhibited a significantly prolonged doubling time, yet their lifespan was shorter compared to the WT. We have previously demonstrated that a decrease in metabolic rate, coupled with an increase in doubling time, is strongly correlated with longevity (Molon et al. 2016). Elevated RNA levels, in general, may suggest various factors, including potential impairment of ribosome assembly.

Among the analyzed strains, *SLD2/sld2Δ* is particularly noteworthy. Despite its reproductive potential being slightly higher than that of the WT, it exhibits the most rapid aging. The improper response to DNA damage (suggested by the increased number of Rad52 foci during genotoxic stress and accumulation of mtDNA in these cells) is visible even though among all tested lowPICC strains, the expression of a respective gene from heterozygous locus reached the highest level (63% of control strain level versus e.g., 15% observed for *MCM10* gene). Thus, the maintenance of cellular homeostasis is critical for yeast longevity, and

disruptions in this balance can accelerate the aging process.

There are many unknowns in the biology of aging. In a recently published article by Suresh Rattan, the author tried to tide up the knowledge concerning aging and indicate the gaps in the biogerontology field (Rattan 2024). We believe the yeast research may help answer some questions posed in that article, e.g., about the evolved public (universal) and private (species-specific) longevity assurance genes for the essential lifespan of a species. Our data demonstrated the necessity of the trade-off between reproductive lifespan and post-reproductive lifespan. Organisms seem to allocate more resources to reproduction and less to maintenance and repair. This strategy might explain the reset clock of reproductive potential in young cells and mitotic catastrophe in proliferatively old cells.

In summary, our data unequivocally show that a reduction in the copy number of genes encoding proteins involved in the regulation and/or initiation of DNA replication influences the acceleration of aging in mitotically active yeast cells and delays the aging of post-mitotic cells. All of the strains analyzed show a significantly extended reproductive potential, which may be associated with a subtle disruption of the cell cycle and an extension of the doubling time. Importantly, here we demonstrate a strong negative correlation between the content of cellular macromolecules (RNA, proteins, lipids, polysaccharides) and aging. The data we obtained show that disturbances in the

initiation of genomic DNA impact not only the cell cycle or the doubling time of the cell but also the entire biochemical profile of the cells.

Acknowledgements We would like to thank Michael Lisby for kindly providing the pWJ1344 (Rad52-YFP) plasmid.

Author contributions Conceptualization: Mateusz Moloń, Adrianna Skoneczna Methodology: Mateusz Moloń, Adrianna Skoneczna, Łukasz Jurczyk, Monika Kula-Maximenko, Tuguldur Enkhbaatar Statistical analysis: Karolina Stepień, Mateusz Moloń, Adrianna Skoneczna, Tuguldur Enkhbaatar Investigation: Karolina Stepień, Adrianna Skoneczna, Łukasz Jurczyk, Monika Kula-Maximenko, Mateusz Moloń, Tuguldur Enkhbaatar Writing: Mateusz Moloń, Adrianna Skoneczna, Karolina Stepień, Supervision: Mateusz Moloń, Adrianna Skoneczna. All authors read and approved the final manuscript.

Data availability No datasets were generated or analysed during the current study.

Declarations

Competing interest The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Antoniuk-Majchrzak J, Enkhbaatar T, Długajczyk A, Kamin-ska J, Skoneczny M, Klionsky DJ, Skoneczna A (2023) Stability of Rad51 recombinase and persistence of Rad51 DNA repair foci depends on post-translational modifiers, ubiquitin and SUMO. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1870:119526
- Beach A, Richard VR, Leonov A, Burstein MT, Bourque SD, Koupaki O, Juneau M, Feldman R, Iouk T, Titorenko VI (2013) Mitochondrial membrane lipidome defines yeast longevity. *Aging* 5:551–574
- Bell SP, Labib K (2016) Chromosome duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 203:1027–1067
- Berg S, Kutra D, Kroeger T, Straehle CN, Kausler BX, Haubold C, Schiegg M, Ales J, Beier T, Rudy M, Eren K, Cervantes JJ, Xu BT, Beuttenmueller F, Wolny A, Zhang C, Koethe U, Hamprecht FA, Kreshuk A (2019) Ilastik: interactive machine learning for (bio) image analysis. *Nat Methods* 16:1226–1232
- Borkiewicz L, Molon M, Molestak E, Grela P, Horbowicz-Drozdal P, Wawiora L, Tchorzewski M (2019) Functional analysis of the ribosomal uL6 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cells* 8:718
- Chee WY, Kurahashi Y, Kim J, Miura K, Okuzaki D, Ishitani T, Kajiwara K, Nada S, Okano H, Okada M (2021) β -catenin-promoted cholesterol metabolism protects against cellular senescence in naked mole-rat cells. *Commun Biol* 4:357
- Costa A, Diffley JFX (2022) The initiation of eukaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem* 91:107–131
- Coster G, Diffley JFX (2017) Bidirectional eukaryotic DNA replication is established by quasi-symmetrical helicase loading. *Science* 357:314–318
- Czachor J, Milek M, Galiniak S, Stepień K, Dzugan M, Molon M (2020) Coffee extends yeast chronological lifespan through antioxidant properties. *Int J Mol Sci* 21:9510
- de Cabo R, Carmona-Gutierrez D, Bernier M, Hall MN, Madeo F (2014) The search for antiaging interventions: from elixirs to fasting regimens. *Cell* 157:1515–1526
- Douglas ME, Diffley JFX (2016) Recruitment of Mcm10 to sites of replication initiation requires direct binding to the minichromosome maintenance (MCM) complex. *J Biol Chem* 291:5879–5888
- Douglas ME, Ali FA, Costa A, Diffley JFX (2018) The mechanism of eukaryotic CMG helicase activation. *Nature* 555:265–268
- Early A, Drury LS, Diffley JFX (2004) Mechanisms involved in regulating DNA replication origins during the cell cycle and in response to DNA damage. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 359:31–38
- Eisenberg T, Büttner S (2014) Lipids and cell death in yeast. *FEMS Yeast Res* 14:179–197
- Enkhbaatar T, Skoneczny M, Stepień K, Molon M, Skoneczna A (2023) Live while the DNA lasts. The role of autophagy in DNA loss and survival of diploid yeast cells during chronological aging. *Aging* 15:9967–9992
- Eshaghi M, Karuturi RKM, Li JT, Chu ZQ, Liu ET, Liu JH (2007) Global profiling of DNA replication timing and efficiency reveals that efficient replication/firing occurs late during S-Phase in *S. pombe*. *Plos One* 2:e722
- Fabrizio P, Longo VD (2003) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2:73–81
- Falcone C, Mazzoni C (2018) RNA stability and metabolism in regulated cell death, aging and diseases. *FEMS Yeast Res*. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy050>
- Flor AC, Wolfgeher D, Wu D, Kron SJ (2017) A signature of enhanced lipid metabolism, lipid peroxidation and aldehyde stress in therapy-induced senescence. *Cell Death Discov* 3:1–12
- Frenk S, Houseley J (2018) Gene expression hallmarks of cellular ageing. *Biogerontology* 19:547–566

- Gray JV, Petsko GA, Johnston GC, Ringe D, Singer RA, Werner-Washburne M (2004) "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:187–206
- Heller RC, Kang S, Lam WM, Chen S, Chan CS, Bell SP (2011) Eukaryotic origin-dependent DNA replication in vitro reveals sequential action of DDK and S-CDK kinases. *Cell* 146:80–91
- Hills SA, Diffley JFX (2014) DNA replication and oncogene-induced replicative stress. *Curr Biol* 24:R435–R444
- Hyrrien O, Goldar A (2010) Mathematical modelling of eukaryotic DNA replication. *Chromosome Res* 18:147–161
- Ilves I, Petojevic T, Pesavento JJ, Botchan MR (2010) Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol Cell* 37:247–258
- Jedrychowska M, Denkwicz-Kruk M, Alabrudzinska M, Skoneczna A, Jonczyk P, Dmowski M, Fijalkowska JI (2019) Defects in the GINS complex increase the instability of repetitive sequences via a recombination-dependent mechanism. *Plos Genet* 15:e1008494
- Kamimura Y, Tak YS, Sugino A, Araki H (2001) Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 20:2097–2107
- Kotsantis P, Petermann E, Boulton SJ (2018) Mechanisms of oncogene-induced replication stress: jigsaw falling into place. *Cancer Discov* 8:537–555
- Krol K, Antoniuk-Majchrzak J, Skoneczny M, Sienko M, Jendrysek J, Rumieniczek I, Halas A, Kurlandzka A, Skoneczna A (2018) Lack of G1/S control destabilizes the yeast genome via replication stress-induced DSBs and illegitimate recombination. *J Cell Sci*. <https://doi.org/10.1242/jcs.226480>
- Legland D, Arganda-Carreras I, Andrey P (2016) MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics* 32:3532–3534
- Legouras I, Xouri G, Dimopoulos S, Lygeros J, Lygerou Z (2006) DNA replication in the fission yeast: robustness in the face of uncertainty. *Yeast* 23:951–962
- Lewis JS, Gross MH, Sousa J, Henrikus SS, Greiwe JF, Nans A, Diffley JFX, Costa A (2022) Mechanism of replication origin melting nucleated by CMG helicase assembly. *Nature* 606:1007–1014
- Li NN, Lam WH, Zhai YL, Cheng JX, Cheng EC, Zhao YQ, Gao N, Tye BK (2018) Structure of the origin recognition complex bound to DNA replication origin. *Nature* 559:217–222
- Lisby M, Rothstein R, Mortensen UH (2001) Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8276–8282
- Longo VD, Gralla EB, Valentine JS (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae* - mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J Biol Chem* 271:12275–12280
- Lynch KL, Alvino GM, Kwan EX, Brewer BJ, Raghuraman MK (2019) The effects of manipulating levels of replication initiation factors on origin firing efficiency in yeast. *PLoS Genet*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008430>
- Macheret M, Halazonetis TD (2015) DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu Rev Pathol* 10:425–448
- Mantiero D, Mackenzie A, Donaldson A, Zegerman P (2011) Limiting replication initiation factors execute the temporal programme of origin firing in budding yeast. *EMBO J* 30:4805–4814
- McGuffee SR, Smith DJ, Whitehouse I (2013) Quantitative, genome-wide analysis of eukaryotic replication initiation and termination. *Mol Cell* 50:123–135
- 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* 102:402–406
- Miyazawa-Onami M, Araki H, Tanaka S (2017) Pre-initiation complex assembly functions as a molecular switch that splits the Mcm2-7 double hexamer. *EMBO Rep* 18:1752–1761
- Molon M, Zebrowski J (2017) Phylogenetic relationship and Fourier-transform infrared spectroscopy-derived lipid determinants of lifespan parameters in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *FEMS Yeast Res*. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox031>
- Molon M, Szajwaj M, Tchorzewski M, Skoczowski A, Niewiadomska E, Zadrąg-Teczka R (2016) The rate of metabolism as a factor determining longevity of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Age* 38:11
- Molon M, Woznicka O, Zebrowski J (2018) Cell wall biosynthesis impairment affects the budding lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Biogerontology* 19:67–79
- Molon M, Molestak E, Kula-Maximenko M, Grela P, Tchorzewski M (2020) Ribosomal protein uL11 as a regulator of metabolic circuits related to aging and cell cycle. *Cells* 9:1745
- Molon M, Zaciura M, Wojdyla D, Molestak E (2023) Increasing the number of ribosomal uL6 mRNA copies accelerates aging of the budding yeast. *Mol Biol Rep* 50:2933–2941
- Muramatsu S, Hirai K, Tak YS, Kamimura Y, Araki H (2010) CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol epsilon, and GINS in budding yeast. *Genes Dev* 24:602–612
- Nagai S, Dubrana K, Tsai-Pflugfelder M, Davidson MB, Roberts TM, Brown GW, Varela E, Hediger F, Gasser SM, Krogan NJ (2008) Functional targeting of DNA damage to a nuclear pore-associated SUMO-dependent ubiquitin ligase. *Science* 322:597–602
- Ngo K, Epum EA, Friedman KL (2020) Emerging non-canonical roles for the Rad51-Rad52 interaction in response to double-strand breaks in yeast. *Curr Genet* 66:917–926
- Puddu F, Herzog M, Selivanova A, Wang SY, Zhu J, Klein-Lavi S, Gordon M, Meirman R, Millan-Zambrano G, Ayestaran I, Salguero I, Sharan R, Li R, Kupiec M, Jackson SP (2019) Genome architecture and stability in the *Saccharomyces cerevisiae* knockout collection. *Nature* 573:416–420
- Randell JCW, Bowers JL, Rodriguez HK, Bell SP (2006) Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Mol Cell* 21:29–39
- Rao H, Stillman B (1995) The origin recognition complex interacts with a bipartite DNA-binding site within yeast replicators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2224–2228

- Rattan SIS (2024) Seven knowledge gaps in modern biogerontology. *Biogerontology* 25:1–8
- Remus D, Beuron F, Tolun G, Griffith JD, Morris EP, Diffley JFX (2009) Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell* 139:719–730
- Saadat YR, Khosroushahi AY, Gargari BP (2021) Yeast exopolysaccharides and their physiological functions. *Folia Microbiol* 66:171–182
- Sampaio-Marques B, Ludovico P (2018) Linking cellular proteostasis to yeast longevity. *FEMS Yeast Res*. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy043>
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682
- Sheu YJ, Kinney JB, Stillman B (2016) Concerted activities of Mcm4, Sld3, and Dbf4 in control of origin activation and DNA replication fork progression. *Genome Res* 26:315–330
- Steffen KK, MacKay VL, Kerr EO, Tsuchiya M, Hu D, Fox LA, Dang N, Johnston ED, Oakes JA, Tchao BN, Pak DN, Fields S, Kennedy BK, Kaerberlein M (2008) Yeast life span extension by depletion of 60S ribosomal subunits is mediated by Gcn4. *Cell* 133:292–302
- Steffen KK, McCormick MA, Pham KM, MacKay VL, Delaney JR, Murakami CJ, Kaerberlein M, Kennedy BK (2012) Ribosome deficiency protects against ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191:107–118
- Stepien K, Wojdyla D, Nowak K, Molon M (2020) Impact of curcumin on replicative and chronological aging in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Biogerontology* 21:109–123
- Stepien K, Skoneczna A, Kula-Maximenko M, Jurczyk L, Molon M (2022) Depletion of the origin recognition complex subunits delays aging in budding yeast. *Cells* 11:1252
- Stepien K, Skoneczna A, Kula-Maximenko M, Jurczyk L, Molon M (2024) Disorders in the CMG helicase complex increase the proliferative capacity and delay chronological aging of budding yeast. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1871:119621
- Stirling PC, Bloom MS, Solanki-Patil T, Smith S, Sipahimalani P, Li ZJ, Kofoed M, Ben-Aroya S, Myung K, Hieter P (2011) The complete spectrum of yeast chromosome instability genes identifies candidate CIN cancer genes and functional roles for ASTRA complex components. *PLoS Genet*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002057>
- Stirling DR, Swain-Bowden MJ, Lucas AM, Carpenter AE, Cimini BA, Goodman A (2021) Cell Profiler 4: improvements in speed, utility and usability. *BMC Bioinformatics* 22:433
- Stringer C, Wang T, Michaelos M, Pachitariu M (2021) Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat Methods* 18:100–106
- Su XFA, Dion V, Gasser SM, Freudenreich CH (2015) Regulation of recombination at yeast nuclear pores controls repair and triplet repeat stability. *Genes Dev* 29:1006–1017
- Tanaka S, Umemori T, Hirai K, Muramatsu S, Kamimura Y, Araki H (2007) CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* 445:328–332
- Tanaka S, Nakato R, Katou Y, Shirahige K, Araki H (2011a) Origin association of Sld3, Sld7, and Cdc45 proteins is a key step for determination of origin-firing timing. *Curr Biol* 21:2055–2063
- Tanaka T, Umemori T, Endo S, Muramatsu S, Kanemaki M, Kamimura Y, Obuse C, Araki H (2011b) Sld7, an Sld3-associated protein required for efficient chromosomal DNA replication in budding yeast. *EMBO J* 30:2019–2030
- Thu YM, Van Riper SK, Higgins L, Zhang TJ, Becker JR, Markowski TW, Nguyen HD, Griffin TJ, Bielinsky AK (2016) Slx5/Slx8 promotes replication stress tolerance by facilitating mitotic progression. *Cell Rep* 15:1254–1265
- Torres-Rosell J, Sunjevaric I, De Piccoli G, Sacher M, Eckert-Boulet N, Reid R, Jentsch S, Rothstein R, Aragon L, Lisby M (2007) The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nat Cell Biol* 9:923–931
- Weinreich M, Liang C, Stillman B (1999) The Cdc6p nucleotide-binding motif is required for loading Mcm proteins onto chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:441–446
- Yu L, Castillo LP, Mnaimneh S, Hughes TR, Brown GW (2006) A survey of essential gene function in the yeast cell division cycle. *Mol Biol Cell* 17:4736–4747
- Zappulla DC, Sternglanz R, Leatherwood J (2002) Control of replication timing by a transcriptional silencer. *Curr Biol* 12:869–875
- Zhang CY, Roberts TM, Yang J, Desai R, Brown GW (2006) Suppression of genomic instability by SLX5 and SLX8 in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 5:336–346

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary data

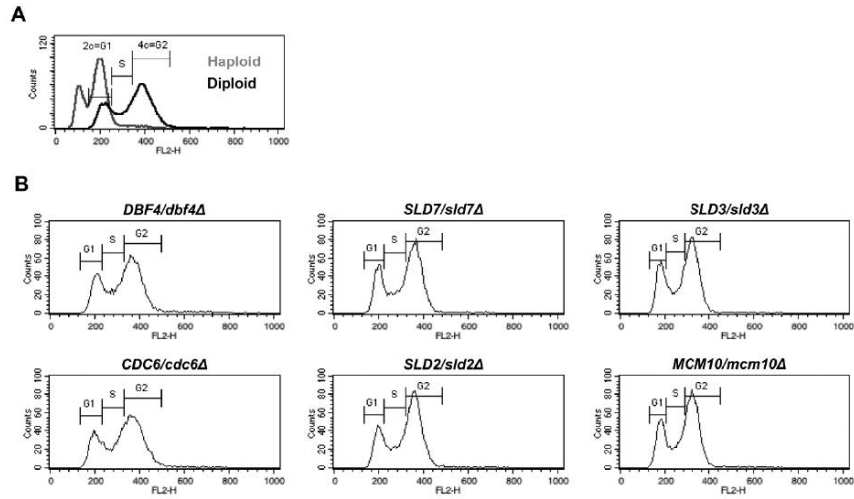


Figure S1. DNA content analysis of lowPICC strains. Flow cytometry analysis of the haploid (BY4741) and diploid (BY4743) WT strains used as controls (A) and the isogenic heterozygous strains *DBF4/dbf4Δ*, *CDC6/cdc6Δ*, *SLD7/sld7Δ*, *SLD2/sld2Δ*, *SLD3/sld3Δ*, *MCM10/mcm10Δ* (B) was performed. The representative histograms from three biological repetitions are presented. On the histograms, the gating conditions used to calculate the number of cells in the individual cell cycle phases were shown.

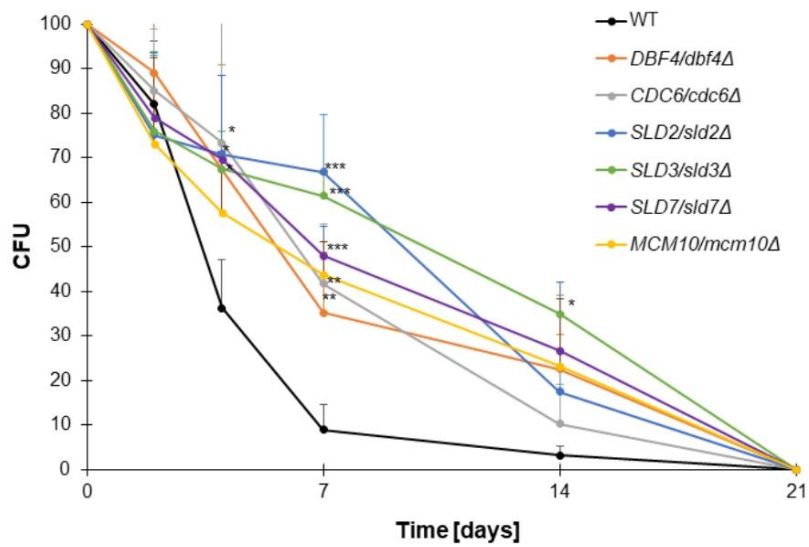


Figure S2. Chronological lifespan of the diploid WT (BY4743) and the isogenic heterozygous strains *CDC6/cdc6Δ*, *DBF4/dbf4Δ*, *SLD2/sld2Δ*, *SLD3/sld3Δ*, *SLD7/sld7Δ* and *MCM10/mcm10Δ*. Survival was determined by a colony-forming units (CFU) assay. Error bars represent standard deviations obtained from three independent experiments. Statistical significance was assessed using ANOVA and Dunnett's post hoc test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

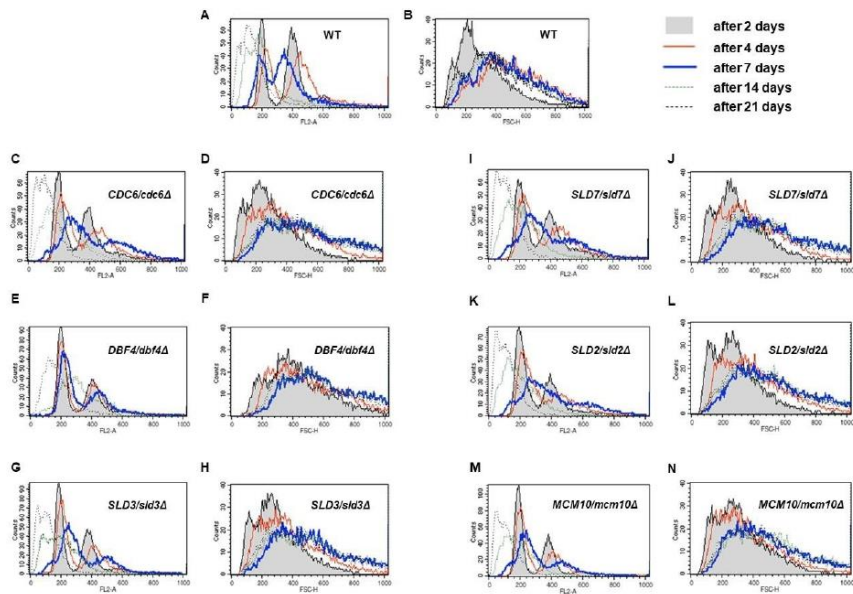


Figure S3. Ploidy reduction and cell size increase accompany chronological aging. Results of the DNA content analysis via flow cytometry during the chronological lifespan analysis at selected time points (A, C, E, G, I, K, M). For the DNA content analysis, yeast cells were stained with propidium iodide. The representative histograms are shown. Three independent experiments were performed. Cell size of the WT diploid (BY4743) strain and the isogenic *DBF4/dbf4Δ*, *CDC6/cdc6Δ*, *SLD7/sld7Δ*, *SLD2/sld2Δ*, *SLD3/sld3Δ*, *MCM10/mcm10Δ* strains during the chronological lifespan analysis in selected time points (B, D, F, H, J, L, N). Cell size as measured by forward scatter (FSC histogram reflects the cells size in the assayed population). The cells (10,000 cells per sample) were analyzed via flow cytometry as described in the Materials and Methods section.

12. Oświadczenia

Rzeszów, dnia 10.06.2024 r.

mgr Karolina Stępień

Jednostka: Instytut Biologii

Promotor: dr hab. Mateusz Mołoń, prof. UR

OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, 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. Karolina Stępień, Adrianna Skoneczna, Monika Kula-Maximenko, Łukasz Jurczyk, Mateusz Mołoń. Depletion of the Origin Recognition Complex Subunits Delays Aging in Budding Yeast, *Cells*. 2022 Apr 7;11(8):1252. doi: 10.3390/cells11081252.

- koncepcja badań: 15% - wyznaczenie celów
- metodyka: 30% - adaptacja metod do oznaczeń
- praca terenowa: nie dotyczy
- praca laboratoryjna: 60% wykonanych oznaczeń
- analiza i zestawienie wyników: 50%
- interpretacja wyników i dyskusja: 40%
- prace nad manuskrytem (draft, wersja końcowa): 30%
- analiza bibliograficzna: 80%
- proces publikacji (autor korespondencyjny): 0%

Zatem mój wkład pracy naukowej w przygotowanie manuskryptu wynosi 50%

Jako promotor akceptuję przedstawiony przez Panią Karolinę Stępień udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej.

Mateusz Mołoń



Rzeszów, dnia 10.06.2024 r.

mgr Karolina Stępień

Jednostka: Instytut Biologii

Promotor: dr hab. Mateusz Mołoń, prof. UR

OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowywaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, 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:

2. Karolina Stępień, Adrianna Skoneczna, Monika Kula-Maximenko, Łukasz Jurczyk, Mateusz Mołoń, Disorders in the CMG helicase complex increase the proliferative capacity and delay chronological aging of budding yeast. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2024 Jan;1871(1):119621. doi: 10.1016/j.bbamcr.2023.119621.

- koncepcja badań: 10% - wyznaczenie celów
- metodyka: 30% - adaptacja metod do oznaczeń
- praca terenowa: nie dotyczy
- praca laboratoryjna: 60% wykonanych oznaczeń
- analiza i zestawienie wyników: 50%
- interpretacja wyników i dyskusja: 45%
- prace nad manuskrytem (draft, wersja końcowa): 30%
- analiza bibliograficzna: 80%
- proces publikacji (autor korespondencyjny): 0%

Zatem mój wkład pracy naukowej w przygotowanie manuskryptu wynosi **50%**

Jako promotor akceptuję przedstawiony przez Panią Karolinę Stępień udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej:

Mateusz Mołoń



Rzeszów, dnia 10.06.2024 r.

mgr Karolina Stępień

Jednostka: Instytut Biologii

Promotor: dr hab. Mateusz Mołoń, prof. UR

OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowywaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, 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:

3. Karolina Stępień, Tuguldur Enkhbaatar, Monika Kula-Maximenko, Łukasz Jurczyk, Adrianna Skoneczna, Mateusz Mołoń. Restricting the level of the proteins essential for the regulation of the initiation step of replication extends the chronological lifespan and reproductive potential in budding yeast. *Biogerontology* 2024, doi: 10.1007/s10522-024-10113-x

- koncepcja badań: 15% - wyznaczenie celów
- metodyka: 30% - adaptacja metod do oznaczeń
- praca terenowa: nie dotyczy
- praca laboratoryjna: 60% wykonanych oznaczeń
- analiza i zestawienie wyników: 60%
- interpretacja wyników i dyskusja: 50%
- prace nad manuskrytem (draft, wersja końcowa): 30%
- analiza bibliograficzna: 70%
- proces publikacji (autor korespondencyjny): 0%

Zatem mój wkład pracy naukowej w przygotowanie manuskryptu wynosi 50%

Jako promotor akceptuję przedstawiony przez Panią Karolinę Stępień udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej:

Mateusz Mołoń



Rzeszów, 10.06.2024 r.

mgr Karolina Stępień
Zakład Histologii i Embriologii
Instytut Nauk Medycznych
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski
ul. Leszka Czarnego 4, 35 - 615 Rzeszów

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że mój udział w pracy

Stępień K., Skoneczna A., Kula-Maximenko M., Jurczyk Ł., Mołoń M. Depletion of the Origin Recognition Complex Subunits Delays Aging in Budding Yeast. *Cells*. 2022 Apr; 11(8): 1252. doi: 10.3390/cells11081252.

był następujący:

- Współtworzenie koncepcji badań (wyznaczanie celów)
- Adaptacja metod do oznaczeń
- Część eksperymentalna
 - Oznaczenie krzywych wzrostu
 - Sprawdzenie wzrostu na podłożu z fermentowalnym (glukoza) i niefermentowalnym (glicerol) źródłem węgla
 - Test wydajności sporulacji
 - Wyznaczenie średniego czasu podwojenia
 - Izolacja RNA i przygotowanie próbek do analizy RT-qPCR
 - Pomiar aktywności metabolicznej z wykorzystaniem sondy FUN-1
 - Transformacja komórek drożdży plazmidem pWJ1344 i ocena powstałych ognisk Rad52 z wykorzystaniem technik mikroskopii fluorescencyjnej
 - Określenie potencjału reprodukcyjnego, czasu reprodukcji, czasu po reprodukcji oraz całkowitego czasu życia komórek drożdży w modelu replikacyjnego starzenia, z wykorzystaniem technik mikromanipulacji
 - Analiza chronologicznej długości życia komórek drożdży w modelu chronologicznego starzenia z wykorzystaniem metody CFU oraz barwienia jodkiem propidyny
 - Przygotowanie próbek do analizy FACS w wybranych punktach czasowych podczas analizy chronologicznej długości życia komórek *Saccharomyces cerevisiae*
 - Przygotowania próbek do analiz spektroskopii Ramana
 - Wykonanie testów kropelkowych z wybranymi stresorami
- Analiza wyników oraz przygotowanie i oprawa graficzna rycin 1, 4, 5, 6 i 7
- Współtworzenie manuskryptu
- Przegląd i analiza literatury

Karolina Stępień



Rzeszów, 10.06.2024 r.

mgr Karolina Stępień

Zakład Histologii i Embriologii
Instytut Nauk Medycznych
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski
ul. Leszka Czarnego 4, 35 - 615 Rzeszów

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że mój udział w pracy

Stępień K., Skoneczna A., Kula-Maximenko M., Jurczyk Ł., Mołoń M. Disorders in the CMG helicase complex increase the proliferative capacity and delay chronological aging of budding yeast. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2024 Jan;1871(1):119621. doi: 10.1016/j.bbamcr.2023.119621.

był następujący:

- Współtworzenie koncepcji badań (wyznaczanie celów)
- Adaptacja metod do oznaczeń
- Część eksperymentalna
 - Oznaczenie krzywych wzrostu
 - Test wydajności sporulacji
 - Wyznaczenie średniego czasu podwojenia
 - Izolacja RNA i przygotowanie próbek do analizy RT-qPCR
 - Pomiar aktywności metabolicznej z wykorzystaniem sondy FUN-1
 - Określenie potencjału reprodukcyjnego, czasu reprodukcji, czasu po reprodukcji oraz całkowitego czasu życia komórek drożdży w modelu replikacyjnego starzenia, z wykorzystaniem technik mikromanipulacji
 - Analiza chronologicznej długości życia komórek drożdży w modelu chronologicznego starzenia z wykorzystaniem metody CFU oraz barwienia jodkiem propidyny
 - Przygotowanie próbek do analizy FACS w wybranych punktach czasowych podczas analizy chronologicznej długości życia komórek *Saccharomyces cerevisiae*
 - Przygotowania próbek do analiz spektroskopii Ramana
 - Wykonanie testów kroplekowych z wybranymi stresorami
- Analiza wyników oraz przygotowanie i oprawa graficzna rycin 1, 4, 5, 6, 10 i 11
- Współtworzenie manuskryptu
- Przegląd i analiza literatury

Karolina Stępień



Rzeszów, 10.06.2024 r.

mgr Karolina Stępień
Zakład Histologii i Embriologii
Instytut Nauk Medycznych
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski
ul. Leszka Czarnego 4, 35 - 615 Rzeszów

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że mój udział w pracy

Stępień K., Enkhbaatar T., Kula-Maximenko M., Jurezyk Ł., Skoneczna A., Mołoń M. Restricting the level of the proteins essential for the regulation of the initiation step of replication extends the chronological lifespan and reproductive potential in budding yeast. *Biogerontology*. 2024 Jun 6. doi: 10.1007/s10522-024-10113-x

był następujący:

- Współtworzenie koncepcji badań (wyznaczanie celów)
- Adaptacja metod do oznaczeń
- Część eksperymentalna
 - Oznaczenie krzywych wzrostu
 - Test wydajności sporulacji
 - Wyznaczenie średniego czasu podwojenia
 - Izolacja RNA i przygotowanie próbek do analizy RT-qPCR
 - Ocena powstałych ognisk Rad52 z wykorzystaniem technik mikroskopii fluorescencyjnej
 - Określenie potencjału reprodukcyjnego, czasu reprodukcji, czasu po reprodukcji oraz całkowitego czasu życia komórek drożdży w modelu replikacyjnego starzenia, z wykorzystaniem technik mikromanipulacji
 - Analiza chronologicznej długości życia komórek drożdży w modelu chronologicznego starzenia z wykorzystaniem metody CFU
 - Przygotowanie próbek do analizy FACS w wybranych punktach czasowych podczas analizy chronologicznej długości życia komórek *Saccharomyces cerevisiae*
 - Przygotowania próbek do analiz spektroskopii Ramana
 - Wykonanie testów kropelkowych z wybranymi stresorami
- Analiza wyników oraz przygotowanie i oprawa graficzna rycin 1, 5, 6, 9 i 10
- Współtworzenie manuskryptu
- Przegląd i analiza literatury

Karolina Stępień



Warszawa, 17.06.2024 r.

dr hab. Adrianna Skoneczna, prof. instytutu
Kierownik Pracowni Mechanizmów Stabilności Genetycznej
Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk
02-106 Warszawa, Pawińskiego 5A

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że mój udział w pracy:

Stępień K, Skoneczna A, Kula-Maximenko M, Jurczyk Ł, Mołoń M. Depletion of the Origin Recognition Complex Subunits Delays Aging in Budding Yeast. Cells. 2022 Apr 7;11(8):1252. doi: 10.3390/cells11081252. - polegał na przeprowadzeniu analiz cytometrycznych i współtworzeniu manuskryptu.

Stępień K, Skoneczna A, Kula-Maximenko M, Jurczyk Ł, Mołoń M. Disorders in the CMG helicase complex increase the proliferative capacity and delay chronological aging of budding yeast. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2024 Jan;1871(1):119621. doi: 10.1016/j.bbamcr.2023.119621. - polegał na przeprowadzeniu analiz cytometrycznych i współtworzeniu manuskryptu.

Stępień K, Enkhbaatar T, Kula-Maximenko M, Jurczyk Ł, Skoneczna A, Mołoń M. Restricting the level of the proteins essential for the regulation of the initiation step of replication extends the chronological lifespan and reproductive potential in budding yeast. Biogerontology. 2024 Jun 6. doi: 10.1007/s10522-024-10113-x. - polegał na przeprowadzeniu analiz cytometrycznych, analizie danych mikroskopowych oraz współtworzeniu manuskryptu.

Adrianna Skoneczna



dr Monika Kula-Maximenko
Zakład Biologii Rozwoju
Instytut Fizjologii Roślin
im. Franciszka Górskiego
Polskiej Akademii Nauk W Krakowie
Niezapominajek 21, 30-239 Kraków

Kraków, 17.06.2024 r.

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w pracy:

Stępień K, Skoneczna A, Kula-Maximenko M, Jurczyk Ł, Mołoń M. Depletion of the Origin Recognition Complex Subunits Delays Aging in Budding Yeast, *Cells*. 2022 Apr 7;11(8):1252. doi: 10.3390/cells11081252. – polegał na przeprowadzeniu analiz i opracowaniu wyników spektrometrii FT-Raman

Stępień K, Skoneczna A, Kula-Maximenko M, Jurczyk Ł, Mołoń M. Disorders in the CMG helicase complex increase the proliferative capacity and delay chronological aging of budding yeast. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2024 Jan;1871(1):119621. doi: 10.1016/j.bbamcr.2023.119621. – polegał na przeprowadzeniu analiz i opracowaniu wyników spektrometrii FT-Raman

Stępień K, Enkhbaatar T, Kula-Maximenko M, Jurczyk Ł, Skoneczna A, Mołoń M. Restricting the level of the proteins essential for the regulation of the initiation step of replication extends the chronological lifespan and reproductive potential in budding yeast. *Biogerontology* 2024, doi: 10.1007/s10522-024-10113-x – polegał na przeprowadzeniu analiz i opracowaniu wyników spektrometrii FT-Raman


Monika Kula-Maximenko

Rzeszów, 17.06.2024 r.

dr hab. inż. Łukasz Jurczyk, prof. UR

Zakład Gleboznawstwa, Chemii Środowiska i Hydrologii
Instytut Nauk Rolniczych, Ochrony i Kształtowania Środowiska
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Rzeszowski
ul. Zelwerowicza 8b, 35-601 Rzeszów

Oświadczenie

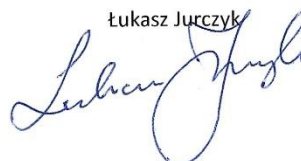
Niniejszym oświadczam, że mój udział w pracy:

Stępień K, Skoneczna A, Kula-Maximenko M, Jurczyk Ł, Mołoń M. Depletion of the Origin Recognition Complex Subunits Delays Aging in Budding Yeast, *Cells*. 2022 Apr 7;11(8):1252. doi: 10.3390/cells11081252. – polegał na przeprowadzeniu *real-time RT-qPCR* dla poszczególnych loci i analizie otrzymanych danych

Stępień K, Skoneczna A, Kula-Maximenko M, Jurczyk Ł, Mołoń M. Disorders in the CMG helicase complex increase the proliferative capacity and delay chronological aging of budding yeast. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2024 Jan;1871(1):119621. doi: 10.1016/j.bbamcr.2023.119621. – polegał na przeprowadzeniu *real-time RT-qPCR* dla poszczególnych loci i analizie otrzymanych danych

Stępień K, Enkhbaatar T, Kula-Maximenko M, Jurczyk Ł, Skoneczna A, Mołoń M. Restricting the level of the proteins essential for the regulation of the initiation step of replication extends the chronological lifespan and reproductive potential in budding yeast. *Biogerontology* 2024, doi: 10.1007/s10522-024-10113-x – polegał na przeprowadzeniu *real-time RT-qPCR* dla poszczególnych loci i analizie otrzymanych danych

Łukasz Jurczyk



Warszawa, 17.06.2024
Instytut Biochemii i Biofizyki
Pracownia Mechanizmów Stabilności Genetycznej
ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

Tuguldur Enkhbaatar
ul. Bernarda Wapowskiego 2/7
02-495 Warszawa
tel.: +48 668-849-619
email: tugdo@ibb.waw.pl

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy pt. „Restricting the level of the proteins essential for the regulation of the initiation step of replication extends the chronological lifespan and reproductive potential in budding yeast”, opublikowanej w czasopiśmie Biogerontology, o numerze doi: 10.1007/s10522-024-10113-x, oraz o identyfikatorze PMID: 38844751 wykonałem następujące czynności:

1. Obrazowanie za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej badanych szczepów niosących białko fuzyjne Rfa1-YFP.
2. Obrazowanie za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej badanych szczepów wybarwionych barwnikiem DAPI, w celu określenia ilości DNA mitochondrialnego.
3. Wykonanie analizy wyników eksperymentu z użyciem szczepów Rfa1-YFP.
4. Wykonanie analizy wyników eksperymentu mających za zadanie określenie ilości DNA mitochondrialnego.
5. Wizualizacja wyników ww. eksperymentów. W tym przygotowanie montażu zdjęć z przykładowymi komórkami.
6. Wykonanie analizy statystycznej w ww. eksperymentach.
7. Przygotowanie opisu metodologii do ww. eksperymentów.


Z poważaniem,

Tuguldur Enkhbaatar

dr hab. Mateusz Mołoń, prof. UR
Instytut Biologii
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Rzeszowski
ul. Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszów

Rzeszów, 17.06.2024 r.

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w pracy:

Stępień K, Skoneczna A, Kula-Maximenko M, Jurczyk Ł, Mołoń M. Depletion of the Origin Recognition Complex Subunits Delays Aging in Budding Yeast, *Cells*. 2022 Apr 7;11(8):1252. doi: 10.3390/cells11081252. – polegał na autorstwie koncepcji pracy, interpretacji i dyskusji otrzymanych wyników, projektowaniu starterów, dyssekcji tetrad, przygotowaniu wersji roboczej manuskryptu oraz końcowej pracy, korespondencji z wydawnictwem (recenzentami i redakcją), współfinansowaniu badań oraz opiece merytorycznej nad Doktorantką.

Stępień K, Skoneczna A, Kula-Maximenko M, Jurczyk Ł, Mołoń M. Disorders in the CMG helicase complex increase the proliferative capacity and delay chronological aging of budding yeast. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2024 Jan;1871(1):119621. doi: 10.1016/j.bbamcr.2023.119621. – polegał na autorstwie koncepcji pracy, interpretacji i dyskusji otrzymanych wyników, projektowaniu starterów, dyssekcji tetrad, przygotowaniu wersji roboczej manuskryptu oraz końcowej pracy, korespondencji z wydawnictwem (recenzentami i redakcją), współfinansowaniu badań oraz opiece merytorycznej nad Doktorantką.

Stępień K, Enkhbaatar T, Kula-Maximenko M, Jurczyk Ł, Skoneczna A, Mołoń M. Restricting the level of the proteins essential for the regulation of the initiation step of replication extends the chronological lifespan and reproductive potential in budding yeast. *Biogerontology* 2024, doi: 10.1007/s10522-024-10113-x – polegał na autorstwie koncepcji pracy, interpretacji i dyskusji otrzymanych wyników, projektowaniu starterów, dyssekcji tetrad, przygotowaniu wersji roboczej manuskryptu oraz końcowej pracy, korespondencji z wydawnictwem (recenzentami i redakcją), współfinansowaniu badań oraz opiece merytorycznej nad Doktorantką.

Mateusz Mołoń

