

Renata Zadrąg-Tęcza

AUTOREFERAT

**Potencjał reprodukcyjny a długość życia komórek drożdży
Saccharomyces cerevisiae – zasadność zastosowania drożdży
w badaniach gerontologicznych**

Katedra Biochemii i Biologii Komórki
Wydział Biologiczno-Rolniczy
Uniwersytet Rzeszowski

2016

1. IMIĘ I NAZWISKO

Renata Zadrag-Tęcza

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2006 r. – stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii

Nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego dnia 25.04.2006 r. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* jako organizm modelowy w badaniach mechanizmów starzenia się. Zależność replikacyjnej długości życia od wielkości komórki”. Promotorem w przewodzie doktorskim był prof. dr hab. Tomasz Biliński z Katedry Biochemii i Biologii Komórki Uniwersytetu Rzeszowskiego.

1997 r. – tytuł magistra biologii o specjalności biologia ogólna

Uzyskany na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie dnia 20.06.1997 r. Tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ Cd^{2+} na poziom peroksydacji lipidów w liściach fasoli wielokwiatowej traktowanej metalem w różnych fazach wzrostu”. Praca powstała pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Baszyńskiego z Zakładu Fizjologii Roślin Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.

od 2006 - do chwili obecnej Adiunkt w Katedrze Biochemii i Biologii Komórki na Wydziale Biologiczno-Rolniczym Uniwersytetu Rzeszowskiego.

2005 – 2006 Asystent w Katedrze Biochemii i Biologii Komórki na Wydziale Biologiczno-Rolniczym Uniwersytetu Rzeszowskiego.

2001 – 2005 Asystent w Instytucie Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Rzeszowskiego.

1999 – 2001 Asystent w Instytucie Biologii i Ochrony Środowiska Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Rzeszowie.

1998 – 1999 Asystent w Katedrze Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Rzeszowie.

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

IF, *impact factor* podano dla roku publikacji, z wyjątkiem najnowszych prac, dla których podano IF z roku 2015.

4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO/ARTYSTYCZNEGO

**Potencjał reprodukcyjny a długość życia komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
– zasadność zastosowania drożdży w badaniach gerontologicznych**

4.2. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

(autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

Osiągnięcie naukowe składa się z cyklu **9 prac**, których sumaryczny **IF** (*wg roku opublikowania*) jest równy **22,528**, natomiast liczba punktów **MNiSW** wynosi **211**.

Oświadczenia współautorów o udziale własnym w przygotowaniu wymienionych prac stanowiących osiągnięcie naukowe zostały przedstawione w Załączniku nr 7.

1. **Zadrag R.**, Bartosz G. and Bilinski T. (2008) Is the Yeast a Relevant Model for Aging of Multicellular Organisms? An Insight from the Total Lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Aging Science*. 1:159-165.

IF₂₀₀₈ – **0**; liczba punktów MNiSW₂₀₀₈ – **2**; liczba cytowań wg bazy *Web of science*, WoS (LC) – **14**

2. **Zadrag-Tecza R.**, Kwolek-Mirek M., Bartosz G., Bilinski T. (2009) Cell volume as a factor limiting the replicative lifespan of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biogerontology*. 10(4):481-488.

IF₂₀₀₉ – **2,816**; IF_{5-letni} – **3,054**; liczba punktów MNiSW₂₀₀₉ – **24**; LC – **15**

3. Biliński T., **Zadrag-Tęcza R.**, Bartosz G. (2012) Hypertrophy hypothesis as an alternative explanation of the phenomenon of replicative aging of yeast. *FEMS Yeast Research*. 12(1):97-101.

IF₂₀₁₂ – **2,462**; IF_{5-letni} – **2,608**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₂ – **30**; LC – **23**

4. **Zadrag-Tecza R.**, Molon M., Mamczur J., Bilinski T. (2013) Dependence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* post-reproductive lifespan on the reproductive potential. *Acta Biochimica Polonica*. 60(1):111-115. (*autor korespondujący*)

IF₂₀₁₃ – **1,389**; IF_{5-letni} – **1,534**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₃ – **15**; LC – **8**

5. Bilinski T., **Zadrag-Tecza R.** (2014) The rules of aging: are they universal? Is the yeast model relevant for gerontology? *Acta Biochimica Polonica*. 61(4):663-669. (*autor korespondujący*)

IF₂₀₁₄ – **1,153**; IF_{5-letni} – **1,534**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₄ – **15**; LC – **3**

6. Molon M., **Zadrag-Tecza R.**, Bilinski T. (2015) The longevity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A comparison of two approaches for assessment the lifespan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 460(3):651-656.

IF₂₀₁₅ – **2,371**; IF_{5-letni} – **2,392**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₅ – **20**; LC – **6**

7. Bilinski T., Paszkiewicz T., **Zadrag-Tecza R.** (2015) Energy excess is the main cause of accelerated aging of mammals. *Oncotarget*. 6(15):12909-12919.
IF₂₀₁₅ – **5,008**; IF_{5-letni} – **5,415**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₅ – **40**; LC – **4**
8. **Zadrag-Tecza R.**, Skoneczna A. (2016) Reproductive potential and instability of the rDNA region of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast: common or separate mechanisms of regulation? *Experimental Gerontology*. 84:29-39. (autor korespondujący)
IF₂₀₁₅ – **3,350**; IF_{5-letni} – **3,518**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₆ – **35**; LC – **0**
9. Bilinski T., Bylak A., **Zadrag-Tecza R.** (2016) Principles of alternative gerontology. *AGING*. 8(4):589-602.
IF₂₀₁₅ – **3,979**; IF_{5-letni} – **4,070**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₆ – **30**; LC – **0**

4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

Publikacje, których jestem współautorem zaznaczone są przez podkreślenie; te, które wchodzą w skład osiągnięcia naukowego zaznaczone są dodatkowo grubszą czcionką.

Potencjał reprodukcyjny a długość życia komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* – zasadność zastosowania drożdży w badaniach gerontologicznych

Wprowadzenie

Starzenie się jest procesem złożonym i wieloczynnikowym. Z biologicznego punktu widzenia można ten proces zdefiniować jako stopniową utratę sprawności funkcjonalnej komórek, tkanek, organów i całego organizmu wraz z upływem czasu, wynikającą z nagromadzenia wewnątrzkomórkowych uszkodzeń przerastających możliwości naprawcze organizmu. Nadmiar uszkodzeń prowadzi do utraty homeostazy wewnętrznej organizmu przez co obniża jego zdolność do regeneracji i odpowiedzi na stres, co w konsekwencji predysponuje do wystąpienia schorzeń określanych jako „zależne od wieku” jak: osteoporoza, choroby układu sercowo-naczyniowego, cukrzyca, nowotwory czy też choroby neurodegeneracyjne. Starzenie się w ujęciu indywidualnym bardzo mocno oddziałuje tak na sferę fizyczną jak i psychiczną człowieka. Biorąc pod uwagę społeczny aspekt starzenia się, to proces ten generuje szereg kosztów, związanych przede wszystkim z potrzebą zapewnienia świadczeń emerytalnych oraz odpowiedniej opieki medycznej osobom starszym. Ponadto analiza obecnego charakteru zmian demograficznych, dotyczących głównie struktury wiekowej społeczeństw i zdecydowany wzrost odsetka ludzi w podeszłym wieku, wskazują na wyraźną konieczność podejmowania działań zmierzających do poprawy jakości życia osób w podeszłym wieku. Przed takim wyzwaniem od wielu lat stoi gerontologia będąca nauką o procesie starzenia się i stanowiąca interdyscyplinarny splot biologii oraz medycyny. Stąd też wyjaśnienie mechanizmu procesu starzenia stało się celem badań prowadzonych w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie. Zrozumienie zarówno przyczyn jak i istoty zmian, jakim podlega organizm wraz

z wiekiem, daje bowiem możliwość podejmowania prób opracowania strategii terapeutycznych spowalniania tempa tych zmian, a w oczekiwaniach wielu ludzi, może nawet eliminujących wiele uciążliwych cech fenotypowych procesu starzenia się.

Analiza procesu starzenia się u ludzi jest zadaniem bardzo trudnym, zarówno ze względu na same ramy czasowe takiego badania, ale też ze względu na oczywiste przeszkody etyczne. Proces starzenia się może być analizowany w szerokim zakresie tzn. pod względem psychologicznym, społecznym, ekonomicznym oraz biologicznym. Biorąc jednak pod uwagę aspekt biologiczny, badania gerontologiczne mają wyraźny charakter eksperymentalny, co wyklucza możliwość wykorzystania człowieka jako obiektu tego typu badań. Dla zrozumienia podłoża oraz charakteru zmian dotyczących starzenia się na poziomie organizmowym, komórkowym i molekularnym, a także określenia udziału poszczególnych genów i zjawisk epigenetycznych w procesie starzenia się, niezbędne jest zastosowanie organizmów modelowych, które nie tylko nie stwarzałyby problemów metodycznych czy też technicznych, ale przede wszystkim pozwalały na ekstrapolację uzyskanych wyników na ogół organizmów w tym również, lub przede wszystkim na człowieka. Z pozoru wybór organizmu modelowego nie powinien przysparzać istotnych trudności, ponieważ proces starzenia się jest powszechnym zjawiskiem biologicznym. Jednak pomimo powszechności jego występowania w świecie organizmów żywych, nie jest on procesem uniwersalnym, którego mechanizm jest utrwalony ewolucyjnie w obrębie wszystkich grup systematycznych. Olbrzymie zróżnicowanie długości życia oraz znaczący wpływ środowiska, a przez to strategii życiowej poszczególnych grup systematycznych organizmów, w znacznym stopniu wpływają na heterogeniczność tego procesu. Organizm modelowy dla badania procesu starzenia się powinien zatem spełniać przynajmniej kilka ważnych kryteriów: (i) wykazywać wyraźne i mierzalne fenotypowe cechy starzenia się; (ii) wykazywać silną homologię do analogicznych procesów w komórkach człowieka, np. ewolucyjnie zachowane główne szlaki biochemiczne, które mogą mieć wpływ na proces starzenia się; (iii) być względnie łatwym w utrzymaniu, hodowli oraz pracy w warunkach laboratoryjnych; (iv) dodatkową zaletę stanowi również posiadanie zsekwencjonowanego genomu oraz dostęp do baz danych ułatwiających porównywanie wyników między różnymi laboratoriami. Przy wyborze odpowiedniego modelu doświadczalnego, ważnym kryterium powinien być również stopień złożoności budowy danego organizmu, głównie pod względem struktury tkanek i narządów, co może mieć wpływ na rodzaj zagadnień jakie mogłyby być badane przy użyciu danego modelu (Lees *i in.* 2016). Spośród organizmów określanych jako modelowe dla badania procesu starzenia się, najczęściej wykorzystywane są: drożdże pączkujące – *Saccharomyces cerevisiae*; bezkręgowce takie jak nicienie – *Caenorhabditis elegans* czy muszka owocowa *Drosophila melanogaster*; kręgowce takie jak mysz – *Mus musculus* czy naczelnie jak małpy z rodzaju *Rhesus* (*Macaca mulatta*).

Jednym z najprostszych organizmów, jaki został włączony do grupy organizmów modelowych dla badania procesu starzenia się, są jednokomórkowe drożdże pączkujące *Saccharomyces cerevisiae* należące do królestwa – grzybów (*Fungi*) i gromady – grzybów workowych (*Ascomycota*).

O włączeniu ich do tej grupy zdecydowało kilka istotnych czynników jak: (i) ograniczona liczba komórek potomnych (pączków) jakie może wytworzyć komórka „matka” w ciągu swojego życia (Mortimer i Johnston 1959) sugerująca, że przyczyną tego zjawiska jest proces starzenia się; (ii) asymetria wielkości między komórką „matką” a pączkiem (pączek jest zawsze mniejszy od komórki „matki”), co umożliwia śledzenie losów komórki od momentu jej powstania aż do śmierci, niezbędne w badaniach gerontologicznych (Mortimer i Johnston 1959); (iii) podobieństwo przebiegu krzywych przeżywalności między drożdżami a innymi organizmami takimi jak nicienie – *Caenorhabditis elegans*, mysz – *Mus musculus* czy też człowiek – *Homo sapiens* (Sinclair *i in.* 1998); (iv) utrwalone przekonanie, że nieuniknioność śmierci może być jedynie konsekwencją procesu starzenia się mającego charakter uniwersalny w szerokim zakresie gatunków (Jazwinski 1993; Kaeberlein *i in.* 2007; Polymenis i Kennedy 2012; Carmona-Gutierrez i Buttner 2014). Nie bez znaczenia w tym przypadku jest również łatwość prowadzenia hodowli, krótki czas generacji, w pełni zsekwencjonowany genom, dostęp do baz danych (m.in. *Saccharomyces* Genome Database, *SGD*) oraz możliwość prowadzenia szerokiego zakresu manipulacji genetycznych. Jako zaletę podkreśla się również występowanie u ludzi i drożdży homologii sekwencji znacznej liczby ważnych genów oraz fakt, że pojedyncza komórka drożdży umożliwia szybką, fenotypową charakterystykę wpływu mutacji mającej potencjalne odniesienie również do starzenia się człowieka.

Podstawą większości badań gerontologicznych jest analiza długości życia, a w związku z tym wszelkich czynników, które tę wartość mogą modulować. W przypadku badań prowadzonych z wykorzystaniem drożdży *S. cerevisiae* długość życia określana jest w dwojaki sposób, stanowiąc tym samym dwa modele badania procesu starzenia się. Pierwszym z nich jest replikacyjna długość życia (ang. *replicative lifespan*; RLS) wyrażana liczbą komórek potomnych wytwarzanych przez pojedynczą komórkę w ciągu jej życia. Jest to model badania starzenia się aktywnych mitotycznie komórek wyższych organizmów eukariotycznych. Drugim sposobem jest chronologiczna długość życia (ang. *chronological lifespan*; CLS) oznaczająca przeżywalność komórek w fazie stacjonarnej i wyrażana w jednostkach czasu (przede wszystkim jako liczba dni). Jest to z kolei model badania starzenia się post-mitotycznych (nie dzielących się) komórek wyższych organizmów eukariotycznych (Sinclair *i in.* 1998; Fabrizio i Longo 2003). Postuluje się, że te dwa podstawowe modele starzenia się drożdży dają niepowtarzalną możliwość porównywania mechanizmów starzenia się jak i czynników wpływających na proces starzenia się zarówno proliferujących jak i nie proliferujących komórek wyższych organizmów eukariotycznych. Wprowadzono również trzeci model eksperymentalny jakim jest starzenie się w kolonii (ang. *ageing in a colony*). Zaobserwowano, że podczas wzrostu i starzenia się, kolonie przechodzą różne fazy rozwojowe, czemu towarzyszą m.in. okresowe zmiany pH otoczenia i generowanie gradientu różnego typu metabolitów i substancji odżywczych wokół kolonii. Dlatego też przyjęto, że wyniki analiz fenotypów starzenia się zróżnicowanej kolonii drożdży mogą być wykorzystywane nie tylko do badania sposobów komunikacji między komórkami mikroorganizmów, ich odpowiedzi na stres czy wdrażania programowanej śmierci komórki, ale także

do modelowania bardziej szczegółowych fenotypów starzenia się organizmu wielokomórkowego (Carmona-Gutierrez i Buttner 2014).

Analiza replikacyjnej długości życia stanowi jedną z najpowszechniej wykorzystywanych form badania procesu starzenia się w oparciu o drożdże *S. cerevisiae*. Przyjmując założenie, że liczba wytworzonych przez pojedynczą komórkę pączków jest miarą jej wieku, przyjęto jednocześnie inne założenie, że czynniki prowadzące do zmiany tej liczby, zarówno w kierunku jej zwiększenia jak i zmniejszenia są regulatorami długości życia drożdży (replikacyjnej długości życia) i w podobny sposób mogą również regulować długość życia u innych organizmów. Taki pogląd w sposób jednoznaczny ukierunkował badania prowadzone z wykorzystaniem tego organizmu. Główne nurty tych badań, których celem było określenie przyczyny ograniczonej zdolności reprodukcyjnej komórek drożdży czyli *de facto* przyczyny starzenia się, to m.in. (i) badania koncentrujące się wokół poszukiwania związków czy też cząsteczek, które mogą pełnić rolę tzw. „czynnika starzenia”; (ii) badania dotyczące genetycznej regulacji replikacyjnej długości życia drożdży; (iii) badania dotyczące wpływu restrykcji kalorycznej na replikacyjną długość życia drożdży; (iv) poszukiwanie innych bezpośrednich lub pośrednich modulatorów tego procesu.

Hipoteza akumulacji „czynnika starzenia” jako przyczyny ograniczenia replikacyjnej długości życia komórek drożdży została zaproponowana w 1989 roku (Egilmez i Jazwinski 1989). Opierała się ona na założeniu istnienia cząsteczki, która preferencyjnie akumulowana jest w komórce „matce” i nie jest przekazywana do pączka. Dzięki temu komórki potomne zachowują pełny potencjał reprodukcyjny, niezależnie od wieku komórki „matki”. Dopiero pod koniec okresu reprodukcyjnego sprawność mechanizmu retencji „czynnika starzenia” w komórce „matce” słabnie co powoduje, że wytworzone wówczas komórki potomne nie wykazują pełnego potencjału reprodukcyjnego (Kennedy *i in.* 1994). Stopniowa akumulacja „czynnika starzenia” prowadzi do starzenia się komórki „matki” czego bezpośrednią konsekwencją jest utrata zdolności do dalszej reprodukcji i śmierć komórki. Badania prowadzone w tym kierunku pozwoliły na zaproponowanie kilku różnego typu cząsteczek i struktur mających podstawowe właściwości „czynnika starzenia” takie jak: stopniowa akumulacja wraz z wiekiem (ściślej z liczbą wytworzonych komórek potomnych) i asymetryczna segregacja między „matką” a pączkiem. Przykładem tego typu cząsteczek i organelli są m.in. pozachromosomowe koliste cząsteczki rDNA (ang. *extrachromosomal rDNA circles*; ERCs) (Sinclair i Guarente 1997); oksydacyjnie uszkodzone białka (Aguilaniu *i in.* 2003); agregaty białkowe związane z białkiem Hsp104 (Erjavec *i in.* 2007); uszkodzone mitochondria (McFaline-Figueroa *i in.* 2011). Do tej grupy włączono również wakuole, postuluje się bowiem, że zdolność do utrzymania kwaśnego środowiska wakuoli spada wraz z wiekiem komórki, co może prowadzić do dysfunkcji mitochondriów. Szereg danych wskazuje na funkcjonalny związek między tymi strukturami, dlatego też dysfunkcja mitochondriów w replikacyjnie starych komórkach drożdży może powstawać na skutek zmian pH wakuoli. Z kolei w pączkach następuje przywrócenie odpowiedniej wartości pH wakuoli dzięki czemu zachowują one pełny potencjał reprodukcyjny (Hughes i Gottschling 2012). Badania

dotyczące tego zagadnienia wykazały, że warunki sprzyjające szybszej akumulacji „czynnika starzenia” prowadzą do wyraźnego skrócenia replikacyjnej długości życia komórek drożdży, co doskonale wpisuje się w założenia hipotezy akumulacji „czynnika starzenia”.

Badania koncentrujące się na genetycznej regulacji replikacyjnej długości życia drożdży mają na celu poszukiwanie genów, szczególnie wśród homologów z genami człowieka, bezpośrednio lub pośrednio zaangażowanych w tę regulację. Badania te pozwoliły na wyróżnienie szerokiej grupy genów, których delecja prowadzi do wydłużenia bądź skrócenia replikacyjnej długości życia. Szczególne zainteresowanie dotyczyło możliwości wydłużenia replikacyjnej długości życia, a geny których delecja prowadziła do takiego efektu, określone zostały jako tzw. geny długowieczności (ang. *longevity genes*). W grupie tej znalazły się geny zaangażowane w regulację różnych aspektów funkcjonowania komórki m.in. takie jak: *FOBI* kodujący białko wymagane do blokady replikacji w miejscach genomu zawierających odpowiednią sekwencję, którego delecja prowadzi do obniżenia częstości rekombinacji w rejonie rDNA i w konsekwencji do zmniejszonej liczby ERC w komórkach (Defossez *i in.* 1999); geny związane z wykrywaniem i metabolizmem składników odżywczych jak *GPA2*, *GPR1*, *HXX2*, *SCH9* oraz regulacją wzrostu komórek w odpowiedzi na dostępność składników odżywczych takie jak *TOR1* (Kaeberlein i Kennedy 2005; Kaeberlein *i in.* 2005). Wydłużenie replikacyjnej długości życia w przypadku tych genów było zgodne zarówno z hipotezą akumulacji „czynnika starzenia” ($\Delta fob1$) jak i wyjaśniane wpływem restrykcji kalorycznej na długość życia. Bardzo szerokie badania obejmujące ponad 4500 genów przeprowadzone w 2015 roku wykazały wzrost replikacyjnej długości życia w przypadku delecji 238 genów. Dotyczyły one głównie genów kodujących białka rybosomalne oraz genów związanych z degradacją proteasomalną czy też funkcjonowaniem mitochondriów (McCormick *i in.* 2015).

Do wyraźnego skrócenia replikacyjnej długości życia przyczynia się natomiast delecja genów związanych głównie z systemem obrony antyoksydacyjnej komórek m.in. *SOD1* (cynkowo-miedziowa dysmutaza ponadtlenkowa, Cu/Zn-SOD), *SOD2* (manganowa dysmutaza ponadtlenkowa, Mn-SOD), *GRX5* (glutaredoksyna 5 – zależna od glutationu oksydoreduktaza), *PRX1*, *TSA1*, *TSA2*, *AHP1*, *DOT5* (peroksyredoksyny) (Wawryn *i in.* 1999; Zadrag *i in.* 2008). Ponadto geny związane z naprawą DNA jak *RAD52* kodujący białko zaangażowane w naprawę dwuniciowych pęknięć DNA na drodze rekombinacji homologicznej (Hoopes *i in.* 2002) czy *SGS1* kodujący helikazę DNA zaangażowaną w utrzymanie integralności genomu (Sinclair *i in.* 1997). Skrócenie replikacyjnej długości życia w przypadku obniżenia sprawności obrony antyoksydacyjnej wskazywało na zgodność uzyskiwanych wyników z założeniami jednej z najbardziej popularnych teorii wyjaśniających przyczynę procesu starzenia się, a mianowicie z teorią wolnorodnikową. Jej podstawę stanowi założenie, że reaktywne pochodne tlenowe stanowią główną przyczynę uszkodzeń prowadzących do starzenia się organizmów (Harman 1956).

Kolejny nurt badań koncentruje się na analizie restrykcji kalorycznej polegającej na obniżeniu zawartości glukozy w podłożu z 2% używanych standardowo w hodowli do 0,5%. Konsekwencją jej

stosowania był wzrost liczby wytwarzanych komórek potomnych czyli wydłużenie replikacyjnej długości życia (Lin *i in.* 2002), co potwierdzało wyniki uzyskane na podstawie badań z użyciem innych organizmów modelowych. Szczególny aspekt tego nurtu badań stanowią badania dotyczące sirtuin czyli NAD^+ zależnych deacetylaz histonów. Wykazano, że wydłużenie replikacyjnej długości życia (RLS) obserwowane przy restrykcji kalorycznej jest wynikiem aktywacji białka Sir2, która ma miejsce w tych warunkach (Lin *i in.* 2000). Rola białka Sir2 w regulacji długości życia drożdży pozostaje jednak nadal przedmiotem dyskusji (Kennedy *i in.* 2005; Wierman i Smith 2014).

Badania z wykorzystaniem drożdży dotyczą także poszukiwania związków, które mogą mieć wpływ na długość życia. Spośród badanych związków na szczególną uwagę zasługują te o charakterze antyoksydacyjnym, które poprzez obniżanie poziomu stresu oksydacyjnego mogą wywierać wpływ na długość życia np. askorbinian (Krzepilko *i in.* 2004) czy L-karnozyna (Kwolek-Mirek *i in.* 2016). Kolejną grupę stanowią związki, które mogą pełnić rolę tzw. mimetyków restrykcji kalorycznej i wywierać podobny wpływ na długość życia, przykładem tego typu związków może być resweratrol (Howitz *i in.* 2003) czy też metformina (Bulterijs 2011).

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* jako organizm modelowy od wielu lat stanowią ważny element badań biogerontologicznych, na co wskazują również najnowsze opracowania podkreślające ich rolę w kształtowaniu wiedzy na temat procesu starzenia się (Carmona-Gutierrez i Buttner 2014; Denoth Lippuner *i in.* 2014; Smith *i in.* 2015). W tym czasie utrwaliła się również przyjęta na początku badań terminologia oraz metodyka, które zostały powszechnie zaakceptowane przez środowisko naukowe. Niewątpliwie jest to bardzo popularny organizm modelowy dla badań prowadzonych w wielu dziedzinach nauki. Warto jednak postawić dosyć istotne pytanie: na ile jednokomórkowy organizm o szeregu specyficznych cech, do których należy m.in. obecność takich struktur komórkowych jak ściana komórkowa i wakuola, zamknięta mitoza oraz cytokineza na drodze pączkowania, może być przydatny dla wyjaśnienia mechanizmu starzenia się złożonych, wielokomórkowych organizmów w tym organizmie człowieka? Ponadto czy jest to model dla badania starzenia się komórek czy też całego organizmu? Najlepszą odpowiedź mogą dać wyniki badań, bowiem tylko w świetle faktów można formułować istotne wnioski i podejmować decyzje o zasadności czy też ograniczeniach w wykorzystaniu danego organizmu jako modelu badawczego.

Punktem wyjścia obranej przeze mnie drogi badawczej były wyniki badań dotyczące replikacyjnej długości życia mutantów drożdży *S. cerevisiae* pozbawionych wybranych genów kodujących enzymy antyoksydacyjne (Wawryn *i in.* 1999). Wyniki te nie pozwalały na wewnętrznę spójną interpretację w świetle dominujących poglądów, czyli wolnorodnikowej teorii starzenia (Harman 1956). Przykład stanowi mutant Δsod1 pozbawiony jednego z najważniejszych elementów systemu obrony antyoksydacyjnej czyli cynkowo-miedziowej dysmutazy nadadtlenkowej (Cu/Zn-SOD). Brak genu *SOD1* skutkuje wyraźnym wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) i skróceniem replikacyjnej długości życia, co jest w pełni zgodne z wolnorodnikową teorią starzenia, wskazującą na dominującą rolę RFT w regulacji długości życia. Zgodnie z tą teorią

usunięcie lub ograniczenie działania czynnika prowadzącego do wzrostu poziomu RFT powinno znieść ten efekt i przywrócić normalną długość życia. Jednak działania w postaci obniżania stężenia tlenu stanowiącego główne źródło RFT, czy też podawanie do podłoża w umiarkowanych stężeniach związków o charakterze antyoksydacyjnym (np. askorbinianu), nie dawały oczekiwanego rezultatu (Wawryn *i in.* 2002; Krzepilko *i in.* 2004), a zatem w świetle powszechnie przyjętej teorii były trudne do interpretacji. Stąd też przyjęcie hipotezy, że przyczyna sprzeczności uzyskiwanych wyników z obowiązującym powszechnie poglądem może leżeć w przyjętej metodologii badań. Pewnym wsparciem dla tak postawionej hipotezy były prace (Gershon i Gershon 2000; Gershon i Gershon 2001), w których autorzy zwracali uwagę nie tylko na swoiste cechy gatunku, ale również odnosili się do kwestii metodycznych, głównie do sposobu określania wieku drożdży liczbą wytworzonych pączków. Taka miara jest bowiem bliższa płodności aniżeli jednostce czasu w jakiej wyrażany jest wiek innych organizmów, co może stanowić istotne utrudnienie w interpretacji oraz porównywaniu wyników uzyskiwanych dla różnych organizmów.

Podjęte poszukiwania innych przyczyn wyjaśniających ograniczone możliwości reprodukcyjne komórek drożdży *S. cerevisiae* skupiły się na analizie cech, które charakteryzują komórki określane jako „stare”, czyli takie które wytworzyły dużą liczbę komórek potomnych i zakończyły okres reprodukcji. Jedną z tych cech jest wielkość komórki. Biorąc tę cechę pod uwagę, przeprowadzony został szereg eksperymentów opartych na komórkach o zwiększonych rozmiarach, uzyskiwanych przez czasowe zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. Zatrzymanie komórek w fazie G1 uzyskiwano poprzez podawanie do zawiesiny komórek o typie koniugacyjnym *MATa* feromon α . Pozwalało to na zatrzymanie cyklu komórkowego w warunkach pełnej dostępności składników odżywczych, która w standardowych warunkach jest wystarczającym czynnikiem dla rozpoczęcia cyklu. Na podstawie uzyskanych wyników, które stanowiły zasadniczą część mojej rozprawy doktorskiej wykazana została wyraźna zależność między wielkością komórki a jej możliwościami reprodukcyjnymi. Wzrost wielkości komórki skutkuje bowiem skróceniem jej replikacyjnej długości życia (tzn. mniejszą liczbą wytwarzanych pączków) (Zadrag *i in.* 2005; Zadrag *i in.* 2006). Obserwowana zależność oraz analiza kinetyki zmian wielkości komórki w czasie kolejnych cykli reprodukcyjnych pozwala na wnioskowanie, że istnienie limitu liczby cykli mitotycznych, utożsamianego z procesem starzenia się, może być związane ze stałym i nieuniknionym przyrostem wielkości komórek, będącym konsekwencją wyboru pączkowania jako mechanizmu cytokinezy. Taka interpretacja stanowiła zupełnie nowe podejście do kwestii regulacji replikacyjnej długości życia drożdży *S. cerevisiae* i pozostawała w sprzeczności z głównym nurtem badań gerontologicznych opartych o drożdże, zgodnie z którym limit cykli mitotycznych pojedynczej komórki jest konsekwencją akumulacji „czynnika starzenia”. Biorąc pod uwagę jak duże znaczenie dla interpretacji badań opartych o model drożdżowy może mieć ten fakt, niepozostawiającą wątpliwości kwestią była decyzja o kontynuacji tej tematyki, w celu uzyskania szerszego wyjaśnienia podstaw obserwowanych zależności oraz roli wielkości komórki w determinowaniu jej możliwości reprodukcyjnych.

Cel naukowy zbioru prac stanowiących osiągnięcie naukowe

Celem badawczym zbioru artykułów zaprezentowanych jako osiągnięcie naukowe było określenie przyczyn oraz konsekwencji zwiększania rozmiarów komórek drożdży *S. cerevisiae* w odniesieniu do ich możliwości reprodukcyjnych. Prezentowany cykl prac składa się z dwóch części. Pierwszą część stanowią prace eksperymentalne, w których skupiono się na następujących zagadnieniach:

- sprawdzenie przydatności hipotezy wielkości komórki jako czynnika regulującego możliwości reprodukcyjne komórek drożdży *S. cerevisiae* (z uwzględnieniem specyfiki wynikającej zarówno z tła genetycznego jak i mutacji, których konsekwencją są zmiany wielkości komórki);
- analiza długości życia komórek drożdży przywracająca prawidłowe rozumienie wieku oraz długowieczności;
- badania dotyczące roli akumulacji postulowanych „czynników starzenia” w determinowaniu replikacyjnej oraz przede wszystkim całkowitej długości życia komórek drożdży.

Drugą część stanowią prace teoretyczne, powstałe w większości w oparciu o wyniki badań eksperymentalnych. W pracach tych skupiono się na następujących zagadnieniach:

- sformułowanie ostatecznej wersji hipotezy hipertrofii;
- wskazanie ograniczeń modelu opartego na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* w badaniach z zakresu gerontologii;
- tworzenie podstaw alternatywnej wizji biogerontologii (gerontologii eksperymentalnej).

Wielkość komórki jako regulator potencjału reprodukcyjnego komórek drożdży

Wykazana w pracy doktorskiej negatywna korelacja między wielkością komórki a jej możliwościami reprodukcyjnymi (wzrost wielkości komórki prowadzi do spadku jej możliwości reprodukcyjnych) opierała się na wynikach analiz komórek drożdży stanowiących izogeniczną parę szczepów (szczep dziki oraz mutant $\Delta sod1$). Komórki te zatrzymywano okresowo w fazie G1, co skutkowało wzrostem ich wielkości i powodowało znaczący spadek możliwości reprodukcyjnych (zmniejszenie liczby wytwarzanych pączków). Wykazana zależność skłaniała do postawienia pytania: na ile zjawisko to jest uniwersalne? Dlatego też w pracy **Zadrąg-Tęcza i in. 2009** jako materiał badawczy zostały wybrane komórki drożdży szczepów dzikich reprezentujące trzy różne tła genetyczne takie jak SP4, BY4741, W303-1A, z czego dwa ostatnie szczepy są najczęściej stosowanymi szczepami w wielu laboratoriach badawczych. Wybrane szczepy, pomimo tego że określane są jako szczepy dzikiego typu, różnią się między sobą zarówno replikacyjną długością życia jak i średnią wielkością komórek w populacji. Ponadto biorąc pod uwagę, że najczęściej postulowaną teorią starzenia się jest teoria wolnorodnikowa, w każdym tle genetycznym do analiz wybrany został mutant pozbawiony określonego genu, kodującego istotny enzym obrony antyoksydacyjnej taki jak:

$\Delta sod1$ – pozbawiony cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej; Δprx – pozbawiony pięciu peroksyredoksyn; $\Delta grx5$ – pozbawiony glutaredoksyny 5. Uzyskane wyniki wskazują, że w każdej z analizowanych par szczepów pomimo znaczących różnic w replikacyjnej długości życia czyli liczbie wytworzonych komórek potomnych (wyraźnie skrócona replikacyjna długość życia komórek wszystkich analizowanych mutantów w stosunku do odpowiedniego szczepu kontrolnego), wielkość jaką uzyskują komórki po ostatnim cyklu mitotycznym jest bardzo podobna. Wynika to przede wszystkim z różnic w kinetyce zmian tego parametru w ciągu całego okresu reprodukcyjnego oraz wartości przyrostu wielkości komórki przypadającej na pojedynczy cykl mitotyczny. Na obserwowane różnice niewątpliwie wpływ ma czas trwania pojedynczego cyklu, który dla komórek analizowanych mutantów ulegał znacznemu wydłużeniu w porównaniu do komórek izogenicznego szczepu kontrolnego. Biorąc pod uwagę charakter mutacji, wydłużenie cyklu może być w tym przypadku konsekwencją błędów wynikających m.in. z obniżonego poziomu obrony antyoksydacyjnej. Jest to jedna z prawdopodobnych przyczyn choć niewykluczone, że zjawisko to może mieć również bardziej złożony charakter. Pomimo tego, iż wydłużeniu ulega cały cykl, szczególne znaczenie ma w tym przypadku wydłużenie fazy G1, ponieważ przyrost wielkości w tej fazie prowadzi do zwiększania jedynie rozmiarów komórki „matki”. Pączek pojawia się dopiero w fazie S cyklu komórkowego i stopniowo zwiększa swoje rozmiary przez pozostałą część cyklu. Zatem fakt, że komórki szczepu z mutacją osiągają podobne wielkości jak komórki izogenicznego szczepu kontrolnego, ale po wykonaniu zdecydowanie mniejszej liczby cykli mitotycznych, wynika głównie z wydłużenia czasu pojedynczego cyklu, a nie wzrostu tempa procesów biosyntetycznych. Podobne zachowanie komórek reprezentujących trzy niezależne tła genetyczne wskazuje, że zjawisko to nie ma charakteru unikatowego i nie jest konsekwencją delekcji wybranego genu czy też określonych warunków środowiskowych. Zjawisko to wydaje się mieć charakter bardziej ogólny, przynajmniej w obrębie gatunku. Zatem można wnioskować, że wielkość komórki i tempo zmian tego parametru w kolejnych cyklach reprodukcyjnych mogą stanowić istotny czynnik regulujący liczbę wytwarzanych komórek potomnych – replikacyjną długość życia. Przedstawiony w tej pracy główny wniosek wynikający z przeprowadzonych badań został potwierdzony trzy lata później przez zespół Profesora Schneidera z Texas Tech University, który analizując szereg mutantów o zróżnicowanej wielkości komórek, wskazał na wyraźną zależność liczby możliwych do wykonania cykli mitotycznych od początkowej wielkości komórki (Yang *in. 2011*; Wright *in. 2013*).

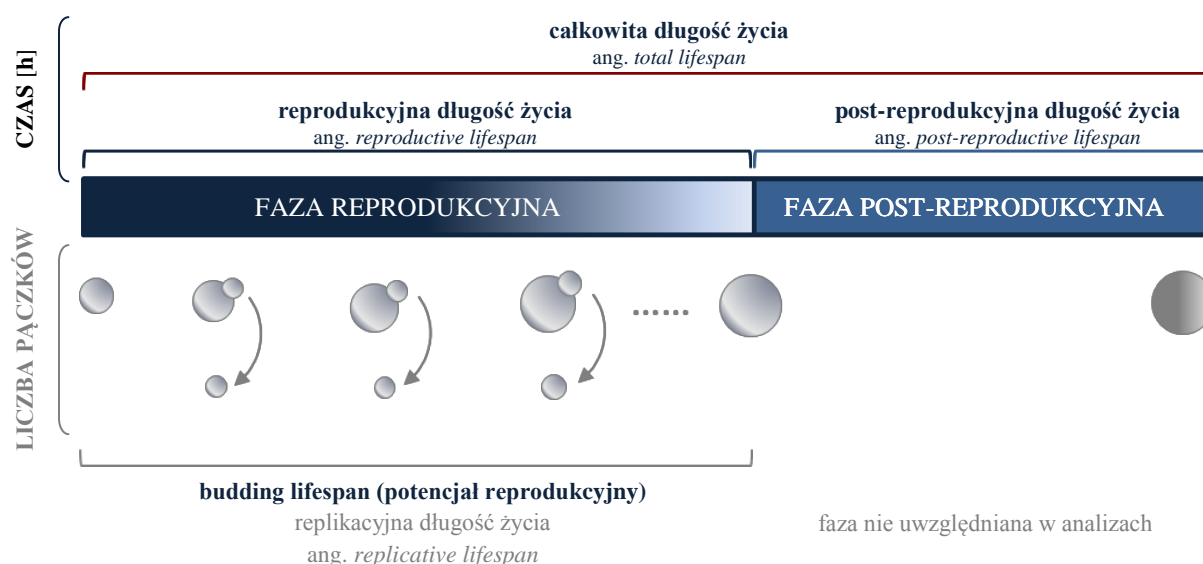
Zależność między długością życia a potencjałem reprodukcyjnym komórek drożdży

Kolejny etap realizacji wybranej tematyki badawczej dotyczył zagadnienia długości życia, która w badaniach gerontologicznych wydaje się być kluczowa. Wprowadzając drożdże *S. cerevisiae* do grupy organizmów modelowych dla badań dotyczących mechanizmów starzenia się, przyjęto równocześnie swoistą metodykę oraz terminologię. Określanie długości życia w przypadku tego

organizmu opiera się na dwóch pojęciach: replikacyjna oraz chronologiczna długość życia (Sinclair *i in.* 1998). Odnoszą się one jednak do dwu różnych podejść metodycznych wyznaczania długości życia. Chronologiczna długość życia wyrażana jest w jednostkach czasu, ale dotyczy całej populacji komórek i określa czas jej życia w fazie stacjonarnej, nie zaś czas życia osobnika (pojedynczej komórki). Z kolei replikacyjna długość życia dotyczy pojedynczych komórek, jednak wyrażana jest nie w jednostkach czasu, ale w liczbie wyprodukowanych komórek potomnych (pączków) przez komórkę „matkę” w ciągu jej życia. Ten sposób określania wieku oraz różnicowania komórek na „młode” oraz „stare” na podstawie liczby wytworzonych pączków, został powszechnie zaakceptowany i stosowany jako podstawowa miara długości życia komórek drożdży, nawet mimo pewnych głosów krytycznych, wskazujących zarówno na swoistość tej jednostki jak również trudności porównywania wyników badań uzyskanych na innych organizmach modelowych (Gershon i Gershon 2000; Gershon i Gershon 2001). Ponadto wiąże się on jednoznacznie z przyjęciem założenia, że życie komórki kończy się wraz z utratą zdolności do reprodukcji i po wytworzeniu ostatniego pączka może ona zostać uznana za martwą. Założenie to budziło jednak uzasadnione wątpliwości. Dowodu uzasadniającego kwestionowanie tego założenia dostarczyły badania opublikowane w pracy (Minois *i in.* 2005), w której wykorzystując podawany do podłoża przyżyciowy barwnik - floksynę B, wykazano że większość komórek nie umiera po wytworzeniu ostatniego pączka, ale może żyć jeszcze przez wiele godzin. Ten okres życia został nazwany przez autorów postreplikacyjną fazą życia. Tym samym stało się oczywistym, że należy wprowadzić nowy termin określający długość życia osobnika (komórki drożdży) wyrażoną w jednostkach czasu, jako miarę jego wieku i długowieczności populacji.

W pracy **Zadrag *i in.* 2008** opierając się na opisanej metodyce (Minois *i in.* 2005) dla szczepów drożdży znacząco różniących się replikacyjną długością życia czyli liczbą wytwarzanych pączków, wykonana została analiza długości życia przedstawiona w jednostkach czasu. Wykorzystano do tego celu pary izogenicznych szczepów (szczep dziki oraz mutant pozbawiony genu kodującego istotny enzym obrony antyoksydacyjnej) reprezentujących trzy różne tła genetyczne takie jak: SP4 i $\Delta sod1$, BY4741 i Δprx , W303-1A i $\Delta grx5$. Ponieważ w każdej z analizowanych par szczepów znajdował się mutant wykazujący zwiększoną wrażliwość na stres oksydacyjny, co wynikało z braku określonego enzymu należącego do systemu obrony antyoksydacyjnej, konieczne było wprowadzenie do metody pewnej modyfikacji. Wynikała ona z faktu, że przyżyciowy barwnik – floksyna B, stosowana jako marker dla oceny momentu śmierci komórki, w określonych warunkach może generować reaktywne formy tlenu (Mutoh *i in.* 2005). Zastosowana modyfikacja polegała na wprowadzeniu w drogę światła w mikroskopie (pomiędzy źródłem światła a kondensorem) filtra interferencyjnego, który absorbuje światło w zakresie obejmującym maksimum absorpcji barwnika. Przeprowadzone testy kontrolne wykazały, że komórki szczepów nadwrażliwych na stres oksydacyjny wykonywały tyle samo cykli reprodukcyjnych jak w przypadku braku obecności barwnika w podłożu, co potwierdzało protekcyjny charakter zastosowanego filtra. Uzyskane wyniki badań pokazały, że pomimo znaczących różnic

w liczbie wytwarzanych przez komórki pączków czyli replikacyjnej długości życia, długość ich życia wyrażona w jednostkach czasu jest bardzo podobna oraz że jest to cecha niezależna od tła genetycznego. Ponadto wyniki przeprowadzonych analiz dały nam podstawę do wyróżnienia określonych faz życia komórek drożdży i wprowadzenia odpowiedniej terminologii. Cały okres życia komórek drożdży można zatem podzielić na dwie fazy: reprodukcyjną – kiedy komórka wytwarza kolejne pączki oraz post-reprodukcyjną – obejmującą okres od wytworzenia ostatniego pączka aż do śmierci komórki. Taki podział wymagał wprowadzenia nowej terminologii. I tak wprowadzony termin „budding lifespan” jest odpowiednikiem powszechnie stosowanego terminu „replicative lifespan” – replikacyjna długość życia. Wprowadzenie tego określenia miało na celu rozróżnienie dwóch sposobów określania reprodukcyjnej fazy życia to znaczy, wyrażanego liczbą wytworzonych pączków oraz wyrażanego w jednostkach czasu, czemu odpowiada wprowadzony termin „reproductive lifespan” – reprodukcyjna długość życia. Z kolei okres życia po zakończeniu reprodukcji w odróżnieniu od terminu „post-replicative lifespan” – postreplikacyjna długość życia, wprowadzonego w pracy (Minois *i in.* 2005), określony został dla zachowania jednolitej konwencji jako „post-reproductive lifespan” – post-reprodukcyjna długość życia. Bardzo istotnym elementem tej terminologii stało się wprowadzenie po raz pierwszy przez nasz zespół określenia „total lifespan” – całkowita długość życia, będącego sumą długości trwania reprodukcyjnej i post-reprodukcyjnej fazy życia. Była to pierwsza próba pokazania całkowitej długości życia drożdży wyrażonej w jednostkach czasu i obejmującej okres od momentu powstania aż do rzeczywistej śmierci komórki. Taka forma jest wyraźnie bliższa tej, jaka stosowana jest w przypadku innych organizmów wykorzystywanych w badaniach gerontologicznych. Poza tym daje ona zdecydowanie większe możliwości porównywania wyników, niezależnie od rodzaju użytego do badań organizmu modelowego.



Ryc. 1. Schemat podziału życia pojedynczej komórki drożdży na dwie odrębne fazy z uwzględnieniem wprowadzonej terminologii. Kolorem szarym zaznaczono używaną dotychczas terminologię zaś kolorem granatowym wprowadzoną terminologię

Dalsze badania miały na celu ustalenie relacji pomiędzy długością życia wyrażaną liczbą wytworzonych komórek potomnych a wyrażaną w jednostkach czasu. Biorąc pod uwagę genetyczny aspekt regulacji długości życia, jednym z istotnych osiągnięć badań gerontologicznych opartych o model drożdżowy była identyfikacja genów, których delecja prowadzi do znaczącego wydłużenia replikacyjnej długości życia, wyrażanej liczbą wytwarzanych pączków. Geny te zostały określone wspólnym terminem – geny długowieczności (ang. *longevity genes*) (Kaeberlein i Kennedy 2005; Kaeberlein *i in.* 2005; McCormick *i in.* 2015). W świetle wyników pochodzących z wcześniej opisywanych prac naszego zespołu, pojawiło się zasadnicze pytanie: czy długowieczność wyrażona liczbą pączków oraz w jednostkach czasu będzie dawała spójny wynik? Wyniki badań stanowiące odpowiedź na tak postawione pytanie zostały przedstawione w pracy **Zadrag-Tęcza *i in.* 2013**. W pracy tej do analiz wybrano trzy izogeniczne szczepy drożdży tj. szczep dziki oraz szczep pozbawiony jednego z najczęściej postulowanych genów długowieczności, a mianowicie genu *FOB1* (mutant $\Delta fob1$) (Defossez *i in.* 1999), który dodatkowo skonfrontowano ze szczepem charakteryzującym się wyjątkowo krótką replikacyjną długością życia (mutant $\Delta sod1$) (Wawryn *i in.* 1999). Uzyskane wyniki pokazały, że pomimo bardzo dużych różnic w liczbie komórek potomnych wytwarzanych przez poszczególne szczepy, ich całkowita długość życia jest bardzo podobna. Na taki wynik bardzo duży wpływ ma czas trwania fazy post-reprodukcyjnej, który w mniejszym stopniu jest zależny od natury analizowanej mutacji, a zdecydowanie bardziej zależy od potencjału reprodukcyjnego komórek. Komórki o wysokim potencjale reprodukcyjnym charakteryzuje krótki czas życia w fazie post-reprodukcyjnej (mutant $\Delta fob1$) i na odwrót, niższy potencjał reprodukcyjny pozwala na dłuższy czas trwania fazy post-reprodukcyjnej (mutant $\Delta sod1$). Dla przetestowania tego wniosku do analiz włączone zostały dane pochodzące z innych, wcześniej badanych szczepów jak szczepy dzikiego typu: D1CSP4-8C, BY4741, W303-1A oraz mutanty: Δprx , $\Delta grx5$. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano istnienie wyraźnej negatywnej korelacji między liczbą wytwarzanych pączków (RLS) a post-reprodukcyjną długością życia.

Kontynuacją tego tematu była analiza całkowitej długości życia komórek, dla których jednym z fenotypowych efektów mutacji był wzrost replikacyjnej długości życia czyli liczby wytwarzanych pączków. Wyniki tych analiz zostały przedstawione w pracy **Molon *i in.* 2015**. Do analiz wykorzystano szczep dzikiego typu BY4741 oraz izogeniczne względem niego mutanty pozbawione wybranych genów określanych jako geny długowieczności (ang. *longevity genes*) m.in.: *FOB1* kodujący białko wymagane do blokady replikacji w miejscach genomu zawierających odpowiednią sekwencję, którego brak prowadzi do obniżenia liczby ERCs w komórce, *SCH9*, *HXX2* – geny związane z wykrywaniem i metabolizmem składników odżywczych, *TOR1* – gen związany z regulacją wzrostu komórek w odpowiedzi na dostępność składników odżywczych, *RPL20B* – gen kodujący białko dużej podjednostki rybosomu oraz *SFPI* kodujący czynnik transkrypcyjny związany z regulacją ekspresji około 60 genów zaangażowanych w montaż rybosomu. Uzyskane wyniki

wskazały na brak istotnych różnic w całkowitej długości życia wyrażonej w jednostkach czasu, między komórkami analizowanych mutantów a izogenicznym szczepem dzikim. Dla większości spośród analizowanych genów, nawet przy dużych różnicach potencjału reprodukcyjnego, całkowita długość życia mutantów była zbliżona do wartości szczepu dzikiego. Przedstawione w tej pracy wyniki wskazują na zasadnicze rozbieżności interpretacyjne w zależności od sposobu wyrażania wieku i długości życia. Wyrażając długość życia komórek drożdży liczbą wytworzonych pączków możemy w odniesieniu do analizowanych genów wyciągnąć wniosek, że ich delecja prowadzi do wydłużenia życia, natomiast jeśli wyrazimy ją w jednostkach czasu, wnioskiem będzie brak ich wpływu na długość życia. Ponadto analiza relacji między liczbą wytwarzanych pączków (replikacyjną długością życia) a post-reprodukcyjną i całkowitą długością życia pozwala na wyciągnięcie kolejnych istotnych wniosków: (i) istnieje wyraźny wpływ liczby wytworzonych pączków na czas trwania fazy post-reprodukcyjnej (dłuższy czas trwania fazy post-reprodukcyjnej w przypadku komórek o niskim potencjale reprodukcyjnym), (ii) całkowita długość życia wykazuje znacznie większą stabilność wartości, niezależnie od potencjału reprodukcyjnego komórek. Wyniki tych badań dostarczają bardzo ważnych argumentów do dyskusji nad zasadnością poszukiwania kolejnych genów prowadzących do tzw. długowieczności drożdży oraz uogólniania na szerszą grupę organizmów, wniosków formułowanych na podstawie badań prowadzonych z wykorzystaniem jednokomórkowych drożdży *S. cerevisiae*. Ta zdecydowana rozbieżność interpretacyjna wpływu genów określanych jako „longevity genes” na długość życia w zależności od jednostki w jakiej jest ona wyrażana, prowadzi do wysunięcia kolejnego istotnego wniosku wskazującego, że poszczególne fazy życia, to jest reprodukcyjna oraz post-reprodukcyjna, mogą wykazywać odmienny sposób regulacji. Fenotypowy efekt delecji wybranego genu może zatem dotyczyć tylko fazy reprodukcyjnej jak w przypadku analizowanych genów z grupy „longevity genes” (*FOB1*, *SCH9*, *HXK2*, *TOR1*, *RPL20B*) bez wpływu na całkowitą długość życia lub też regulować obie fazy jak w przypadku genu *SFPI*, którego delecja prowadzi zarówno do zwiększenia potencjału reprodukcyjnego jak i wydłużenia post-reprodukcyjnej fazy życia, a przez to i całkowitej długości życia.

Wpływ akumulacji „czynnika starzenia” na potencjał reprodukcyjny i całkowitą długość życia komórek drożdży

Analiza całkowitej długości życia komórek drożdży stała się inspiracją do podejmowania kolejnych badań. Można bowiem zadać pytanie: jak w świetle zaprezentowanych wyników i sformułowanych na ich podstawie wniosków interpretować wyniki badań dotyczące akumulacji „czynnika starzenia” jako głównego czynnika sprawczego ograniczenia replikacyjnej długości życia komórek drożdży? Czy akumulacja ta ma wpływ na całkowitą długość życia, czy też selektywnie może wpływać na reprodukcyjną bądź post-reprodukcyjną fazę życia? Jeden z postulowanych „czynników starzenia” stanowią uszkodzone białka, głównie w procesach z udziałem reaktywnych

form tlenu, które akumulują się wraz z wiekiem komórki (tzn. liczbą cykli reprodukcyjnych) (Aguilaniu *i in.* 2003). Zwiększona ich akumulacja obserwowana jest także w warunkach indukujących wzrost poziomu stresu oksydacyjnego (Kwolek-Mirek *i in.* 2014). Opierając się na prezentowanych wcześniej wynikach badań dotyczących zarówno roli wielkości komórki w regulacji potencjału reprodukcyjnego jak i całkowitej długości życia, można wnioskować, że nie negują one akumulacji tego typu uszkodzeń, jednak nie potwierdzają również ich bezpośredniego wpływu na możliwości reprodukcyjne komórek drożdży. Można jedynie wskazać na ich działanie pośrednie, poprzez ewentualny wpływ na wydłużenie pojedynczego cyklu i tym samym szybsze osiągnięcie przez komórkę stanu hipertrofii. Podobnie jeśli weźmiemy pod uwagę całkowitą długość życia, wpływ akumulacji tego typu uszkodzeń jest niezauważalny **Zadrag *i in.* 2008**. Taki sposób interpretacji potwierdzają rozważania prezentowane w pracy (Blagosklonny 2008) wskazujące, że reaktywne formy tlenu nie wydają się być głównym determinantem długości życia i regulatorem procesu starzenia się. Podobne wnioski wynikają również z badań prowadzonych m.in. na nicieniu *C. elegans*, u którego delecja wszystkich 5 genów kodujących dysmutazy ponadtlenkowe nie prowadziła do skrócenia długości życia (Van Raamsdonk i Hekimi 2012). Ważnego argumentu dostarczają w tej kwestii także badania prowadzone na gołcach (*Naked mole-rat*), u których obserwuje się stały wysoki poziom reaktywnych form tlenu co nie ma wpływu na długość ich życia (Andziak *i in.* 2006). Głębsza analiza zagadnienia związanego z wpływem akumulacji „czynnika starzenia” na długość życia komórek drożdży została podjęta w pracy **Zadrag-Tęcza i Skoneczna 2016**. Dotyczyła ona kolejnego, bardzo ważnego i najczęściej postulowanego „czynnika starzenia” jakim są pozachromosomalne kółka rDNA (ang. *extrachromosomal rDNA circles*, ERCs). Stopniowy wzrost ich liczby wraz z „wiekiem” czyli liczbą wytworzonych pączków, wynika z jednej strony z możliwości autoreplikacji, a z drugiej jest konsekwencją zamkniętej mitozy występującej u drożdży, co uniemożliwia redukcję ich liczby przy kolejnych cyklach mitotycznych. Przez długi czas uznawano, że sama akumulacja ERCs jest głównym determinantem replikacyjnej długości życia (Sinclair i Guarente 1997). Obecnie postulowany jest pogląd, że nie tyle sama akumulacja, ale również niestabilność genetyczna tego regionu DNA może istotnie regulować replikacyjną długość życia (Ganley i Kobayashi 2014). Dla sprawdzenia jaki jest wpływ akumulacji ERCs na całkowitą długość życia przeprowadzone zostały analizy na szczepach charakteryzujących się zwiększonym (Δ *sgs1*) i obniżonym (Δ *rad52*) poziomem ERCs. Uzyskane wyniki pokazały w sposób jednoznaczny, że oba szczepy mają wyraźnie i jednakowo (niezależnie od mutacji) obniżony potencjał reprodukcyjny, stanowiący zaledwie 30% wartości izogenicznego szczepu kontrolnego. Natomiast całkowita długość życia jest również jednakowa dla obu szczepów, nie osiąga jednak wartości szczepu dzikiego. Warto podkreślić, że w przypadku obu analizowanych szczepów, niezależnie od obserwowanego u nich poziomu ERCs, charakter mutacji prowadzi do znacznego wydłużenia czasu przypadającego na pojedynczy cykl mitotyczny, co pociąga za sobą duży przyrost wielkości komórki w każdym cyklu. Konsekwencją tego jest szybsze osiągnięcie stanu hipertrofii i przez to wyraźne obniżenie potencjału

reprodukcyjnego. Stanowi to niewątpliwie potwierdzenie roli wielkości komórki w regulacji potencjału reprodukcyjnego komórek. Analiza całkowitej długości życia wskazuje w tym przypadku na jeszcze jeden ważny aspekt, który przy badaniu jedynie potencjału reprodukcyjnego nie mógł być brany pod uwagę. Akumulacja „czynnika starzenia” jakim są ERCs i/lub niestabilność genomu oraz hipertrofia nie wykluczają się wzajemnie, ale mogą mieć różny wpływ na komórki drożdży na różnych etapach ich życia. W świetle uzyskanych wyników należy wziąć pod uwagę, że poziom ERCs może mieć niewielki lub żaden wpływ zarówno na liczbę wytwarzanych pączków (reprodukcyjną długość życia) jak i całkowitą długość życia. Tymczasem, niestabilność genomu i hipertrofia mogą determinować spadek potencjału reprodukcyjnego. Jednak pytanie, czy hipertrofia może być jedną z konsekwencji niestabilności genetycznej jest nadal otwarta. Jest bowiem wysoce prawdopodobne, że zaburzenie procesów konserwacji genomu może prowadzić do opóźnień w przebiegu procesów cyklu komórkowego, a następnie do wydłużenia czasu trwania pojedynczego cyklu. Ponadto zwiększając tempo wzrostu wielkości komórek w czasie pojedynczego cyklu może tym samym przyspieszać osiągnięcie stanu hipertrofii. Poza tym niestabilność genomu może również bezpośrednio wpływać na całkowitą długość życia, zwiększając podatność na uszkodzenia DNA, nieskuteczność naprawy i późniejsze problemy dotyczące cyklu mitotycznego. Istnienie możliwości odrębnej regulacji poszczególnych faz życia komórek drożdży daje zdecydowanie większe możliwości interpretacji wyników, szczególnie wtedy, gdy nie są one zbyt oczywiste.

W kolejnych badaniach realizowanych w ramach tego tematu wzięta została również pod uwagę akumulacja agregatów białkowych związanych z białkiem Hsp104, które uważane są za „czynnik starzenia” (Erjavec *i in.* 2007). Wyniki badań wskazują, że są one akumulowane wraz z wiekiem, ale głównym induktorem ich powstawania jest stres termiczny. W pracy (Molon i Zadrag-Tęcza 2016) zastosowano jako kontrolę standardową dla wzrostu komórek drożdży *S. cerevisiae* temperaturę 28°C a także warunki indukujące – hodowla komórek w temperaturze 37°C oraz niesprzyjające takiej indukcji – hodowla komórek w temperaturze 22°C, sprawdzając zarówno poziom agregatów związanych z białkiem Hsp104 jak i całkowitą długość życia komórek. Uzyskane wyniki wskazują, że pomimo wyraźnie zwiększonej akumulacji analizowanych agregatów białkowych w temperaturze 37°C możliwości reprodukcyjne komórek są niemal takie same jak w przypadku kiedy ich poziom jest znacznie niższy (temperatura 22°C). Zatem nie potwierdza to ich znaczącej roli jako „czynnika starzenia”. Wyraźny jest jednak ich wpływ na całkowitą długość życia poprzez skrócenie czasu trwania fazy post-reprodukcyjnej. Potwierdza to wykazane w poprzednio opisywanej pracy **Zadrag-Tęcza i Skoneczna 2016** istnienie możliwości odrębnej regulacji poszczególnych faz życia komórek drożdży.

Wykorzystanie drożdży *S. cerevisiae* w badaniach ogólnych mechanizmów procesu starzenia się

Wyniki badań eksperymentalnych zaprezentowane w pracach włączonych w cykl tematyczny stanowiący osiągnięcie naukowe, stały się także podstawą dla prac nie mających charakteru czysto eksperymentalnego. Prace te nie stanowią jednak przeglądu literatury danego tematu, ale są swoistym uzupełnieniem i rozwinięciem prac eksperymentalnych. Zostały one przedstawione jako cykl artykułów prezentujących spojrzenie na drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, będące od wielu lat organizmem modelowym w badaniach gerontologicznych, z nieco innej perspektywy, uwzględniając ich realną przydatność dla postępu wiedzy na temat mechanizmu starzenia się organizmu człowieka. Ponadto wykraczając poza model drożdżowy przedstawiają nowe spojrzenie na przyczyny starzenia się człowieka oraz wskazują nowe podejście do badań z zakresu gerontologii.

Bardzo ważną pracą w tym cyklu jest bez wątpienia praca **Bilinski i in. 2012**, w której zawarte zostało sformułowanie ostatecznej wersji hipotezy hipertrofii. Hipoteza ta stanowi alternatywne wyjaśnienie przyczyn ograniczonej możliwości reprodukcyjnej komórek drożdży *S. cerevisiae* w stosunku do obowiązującej i szeroko propagowanej hipotezy akumulacji tzw. „czynnika starzenia” (Egilmez i Jazwinski 1989). Zaproponowana hipoteza stawia osiągnięcie przez komórkę nadmiernej wielkości – określanej mianem stanu hipertrofii, jako przyczynę uniemożliwiającą jej dalszą proliferację, niezależnie od tzw. wieku generacyjnego, czyli liczby wykonanych cykli mitotycznych. Praca ta wyjaśnia także przyczynę osiągnięcia stanu hipertrofii. W przypadku komórek drożdży *S. cerevisiae* jest to proces pączkowania jako wybrany ewolucyjnie mechanizm cytokinezy. Wybór takiego sposobu cytokinezy eliminuje możliwość redukcji wielkości komórki „matki” co ma miejsce w przypadku podziałów większości komórek eukariotycznych, u których cytokineza prowadzi do powstania dwóch komórek potomnych o rozmiarach odpowiadających połowie komórki przystępującej do podziału. U drożdży pączkujących *S. cerevisiae* znamienne jest to, że pączek powstaje poza obrębem komórki „matki” i stopniowo zwiększa swoje rozmiary aż do momentu rozdzielenia się obu komórek na etapie cytokinezy. Nie ma więc możliwości redukcji wielkości komórki „matki”, a wręcz przeciwnie, następuje stopniowy wzrost jej wielkości. Wynika to również z tego, że pączek pojawia się w fazie S cyklu mitotycznego, zatem intensywne procesy biosyntetyczne jakie mają miejsce w fazie G1, decydują jedynie o wzroście rozmiarów komórki „matki”. Brak redukcji wielkości komórki skutkuje osiągnięciem po kilkudziesięciu cyklach mitotycznych stanu hipertrofii, który ogranicza dalszą reprodukcję. Ograniczenie reprodukcji wynikające z osiągnięcia stanu hipertrofii może być związane z faktem, że wielkość komórki jest nie tylko cechą fizyczną, ale również ważną cechą fizjologiczną, oddziałującą na szereg wewnątrzkomórkowych procesów biochemicznych. Wzrost wielkości pociąga bowiem za sobą konieczność dostosowania poszczególnych składników komórkowych (organelle, makrocząsteczki) dla utrzymania ich odpowiedniej proporcji względem rozmiarów komórki. Uważa się, że komórki mogą przystosować się do zwiększonego obciążenia biosyntetycznego wynikającego ze wzrostu wielkości komórek

(Schmoller i Skotheim 2015; Kafri *i in.* 2016). Jednak przypuszczalnie, może się to odbywać w pewnym zakresie, zależnym również od możliwości genomu (wzrost liczby kopii genomu może zwiększyć możliwości biosyntetyczne komórek). Przekroczenie pewnej granicy wielkości może generować problem natury fizycznej dotyczący m.in. wytrzymałości ściany komórkowej. Problem może również dotyczyć transportu wewnątrzkomórkowego, a także zapewnienia odpowiedniego poziomu cząsteczek sygnałowych czy regulatorowych (np. poziomu cyklin fazy G1), niezbędnych dla kontynuowania reprodukcji. Tempo osiągnięcia stanu hipertrofii może być modyfikowane zarówno przez mutacje genomu, ale także warunki środowiska czy też czynniki fizyczne lub chemiczne. Zatem główne założenia przedstawionej w tej pracy hipotezy hipertrofii obejmują następujące punkty: (i) osiągnięcie stanu hipertrofii uniemożliwia dalszą proliferację; (ii) hipertrofia komórek drożdży jest konsekwencją pączkowania jako mechanizmu cytokinezy; (iii) tempo przyrostu wielkości komórki w czasie pojedynczego cyklu decyduje o potencjalnych możliwościach reprodukcyjnych komórki; (iv) eliminacja komórek „matek” w wyniku tego procesu nie ma wpływu na tempo wzrostu populacji. Komórki „matki”, określane jako „stare generacyjne” stanowią bowiem niewielki odsetek całej populacji (Adams *i in.* 1981).

Wielkość komórki włączona była w katalog cech fenotypowych opisujących komórki „stare” czyli po wielokrotnych cyklach mitotycznych (Powell *i in.* 2000). Cecha ta nie wydaje się jednak być konsekwencją procesu starzenia się, choć podejmowano próby zaklasyfikowania hipertrofii jako jednej z konsekwencji procesu starzenia się (Ganley *i in.* 2012), nie zyskały one jednak szerszego poparcia. Jest to niewątpliwie konsekwencją wyboru pączkowania jako sposobu cytokinezy, który uniemożliwia redukcję wielkości komórki jak ma to miejsce w przypadku innych komórek eukariotycznych. Niezależna od procesu starzenia się przyczyna utraty zdolności do reprodukcji oraz poważne wątpliwości wobec hipotezy akumulacji „czynnika starzenia” jako głównego determinanta możliwości reprodukcyjnych komórek drożdży, skłania do podejmowania dyskusji na temat zasadności używania drożdży w badaniach gerontologicznych, możliwości ekstrapolacji wniosków formułowanych na podstawie tych badań i ich realnego wpływu na wyjaśnienie mechanizmu procesu starzenia się człowieka.

Argumenty do dyskusji na ten temat zostały przedstawione w pracy **Bilinski i Zadrag-Tęcza 2014**. Włączenie drożdży *S. cerevisiae* do grupy organizmów modelowych dla badań gerontologicznych oparte było głównie o założenie uniwersalności procesu starzenia się oraz zachowania jego mechanizmów u wszystkich *Eucaryota*, począwszy od drożdży aż po człowieka (Jazwinski 1993; Sinclair *i in.* 1998; Ganley *i in.* 2012; Polymenis i Kennedy 2012). Te dwa założenia nie są jednak tak oczywiste jak chcieliby autorzy przywołanych tu publikacji, a wyniki dotychczasowych badań dostarczają szeregu argumentów, które mogą poddać je w wątpliwość. Starzenie się uważane jest za proces destrukcyjny, wynikający w dużej mierze z akumulacji uszkodzeń. Akumulacja uszkodzeń występuje u większości organizmów, może zatem przemawiać za uniwersalnością mechanizmu odpowiedzialnego za starzenie się. Jednak głębsza analiza

uwzględniająca zarówno czynniki odpowiedzialne za powstawanie uszkodzeń jak i elementy będące celem tychże uszkodzeń, a w końcu i mechanizmy ochronne, wskazuje na istotne różnice między organizmami. Nie daje to zatem podstaw do stwierdzenia uniwersalności przyczyn prowadzących do starzenia się drożdży i pozostałych organizmów. Pomimo przynależności do tej samej domeny – *Eucaryota* i wielu wspólnych cech łączących wszystkie komórki eukariotyczne, komórki drożdży *S. cerevisiae* mają szereg istotnych różnic zarówno strukturalnych jak i funkcjonalnych, które mogą generować zupełnie odrębne problemy, skutkujące akumulacją specyficznych jedynie dla tej grupy składników. Często stosowanym argumentem przemawiającym za uniwersalnością procesu starzenia się są uwarunkowania genetyczne. Delecja wielu genów skutkuje bowiem u drożdży zmianą replikacyjnej długości życia czyli liczby wytworzonych pączków (może to być zarówno spadek jak i wzrost tej wartości) a fakt, że niektóre z tych genów posiadają homologi u innych wyższych organizmów sugeruje możliwość formułowania bardzo uogólnionych wniosków. Nie można jednak w tym przypadku pominąć dwóch istotnych faktów. Po pierwsze postulowanie równoznaczności liczby generacji z wiekiem, po drugie, że konsekwencje delecji danego genu mogą różnić się w zależności od typu organizmu oraz przyjętej przez niego strategii życiowej. Kolejną ważną kwestią, na którą została zwrócona uwaga jest problem różnic wynikających ze stopnia poziomu organizacji to jest organizm jednokomórkowy vs. organizm wielokomórkowy. Wielokomórkowość prowadzi do powstania zupełnie nowych problemów, które nie występują u jednokomórkowców. W tym celu wprowadzone zostały nowe określenia jak: środowisko wewnętrzne (ang. *internal environment*; IE) oraz środowisko zewnętrzne (ang. *external environment*; EE). Określenie – środowisko wewnętrzne odnosi się jedynie do organizmów wielokomórkowych i obejmuje wszelkie mechanizmy zapewniające utrzymanie homeostazy całego ciała. Najważniejszą różnicą między organizmami jedno- i wielokomórkowymi jest ta, że jednokomórkowce nie mogą kontrolować i utrzymywać na stałym poziomie parametrów swojego środowiska. Mogą je jedynie monitorować, co pozwala na szybką adaptację do zmiennych warunków. W odróżnieniu, wielokomórkowce mogą prawidłowo funkcjonować tylko jeśli precyzyjnie kontrolują swoje środowisko wewnętrzne. Warto także podkreślić, że pewne, wydawałoby się istotne podobieństwa, przy głębszej analizie mogą okazać się jedynie pozornymi. Przykład może stanowić starzenie komórkowe i potencjał reprodukcyjny drożdży. Z pozoru mogą wskazywać na podobieństwo, natomiast jeśli weźmiemy pod uwagę konsekwencje obu zjawisk wskażą one wyraźne różnice. Starzenie komórkowe, którego konsekwencją jest terminalna niezdolność do podziałów, z jednej strony może być dla organizmu specyficznym zabezpieczeniem przed kancerogenezą a z drugiej, ze względu na nabywanie cech fenotypu wydzielniczego (ang. *senescence-associated secretory phenotype*; SASP) stanowi podłoże wielu dysfunkcji organizmu i licznych jednostek chorobowych stanowiących realne zagrożenie dla organizmu. Z kolei ten sam okres w życiu komórek drożdży nie był zupełnie brany pod uwagę z racji przyjętego założenia, że komórka po wytworzeniu ostatniego pączka może być uznana za martwą. Poza tym starzenie komórkowe u organizmów wyższych jest bezpośrednio zależne od skracania

telomerów, co jest efektem braku aktywnej telomerazy w większości dzielących się komórek (poza komórkami linii generatywnej). Tymczasem u drożdży telomeraza jest stale aktywna (Cohn i Blackburn 1995), co jednak nie stanowi dla nich zabezpieczenia przed utratą zdolności do reprodukcji.

Szereg argumentów, które wskazują na istotne różnice przyjętych strategii życiowych i sposobów utrzymania prawidłowej struktury i funkcji organizmu między drożdżami a człowiekiem, zawartych zostało również w książce pt. *The Evolution of Senescence in the Tree of Life* w rozdziale pt. *Yeast aging: Reproduction Strategies Determine the Longevity of Budding and Fission Yeasts*, (Bilinski i Zadrag-Tęcza - data publikacji luty 2017 roku). Praca ta przedstawia spojrzenie na główne założenia jakie zostały przyjęte w metodyce badania procesu starzenia się u drożdży i uzyskane na ich podstawie wyniki przez pryzmat specyficznych cech gatunku, nie mających odpowiednika u organizmów wyższych. Odnosi się również do alternatywnych koncepcji wyjaśniających przyczyny utraty możliwości reprodukcyjnych komórek drożdży co utożsamiane jest z procesem starzenia się. Takie podejście miało przede wszystkim na celu zwrócenie uwagi na ważny problem badań eksperymentalnych, jakim jest jak najlepsze dostosowanie modelu doświadczalnego do założonego celu badawczego oraz możliwość ekstrapolacji uzyskanych wyników na szeroką grupę organizmów o różnym stopniu komplikacji ich budowy. Warto również podkreślić, że powierzenie naszemu zespołowi, jako jedynemu, przygotowania rozdziału na temat starzenia się drożdży, świadczy o akceptacji przez środowisko biogerontologów prezentowanych przez nasz zespół poglądów.

Nowe perspektywy badań gerontologicznych

Zarówno przedstawione wyniki badań jak i argumenty rozważań teoretycznych pozwoliły na wyciągnięcie wniosków wykraczających poza grupę drożdży pączkujących. Poddały one w wątpliwość podstawowe założenie, na którym opierało się użycie tego jednokomórkowca jako organizmu modelowego gerontologii tj. uniwersalność mechanizmów odpowiedzialnych za proces starzenia się. Ponadto hipoteza hipertrofii wskazując na niezwiązaną bezpośrednio z procesem starzenia się przyczynę ograniczonych możliwości reprodukcyjnych drożdży, rozpoczęła tym samym dyskusję na temat zasadności stosowania modelu drożdżowego w badaniach gerontologicznych. Jednak każda hipoteza, która stawiana jest w toku prowadzonych badań może, a nawet powinna podlegać weryfikacji. Ważnym jest, aby ta weryfikacja opierała się w jak największym stopniu na faktach czy danych empirycznych, nie zaś na przekonaniach, które nie mogą być przedmiotem dyskusji. Brak naukowych argumentów przemawiających za uniwersalnością procesu starzenia między drożdżami a organizmami wyższymi nie broni w sposób przekonujący postulowanej zasadności stosowania drożdży w badaniach gerontologicznych (Ganley *i in.* 2012). Podważenie roli drożdży jako organizmu modelowego gerontologii, oznacza jedynie wyłączenie grzybów z grupy organizmów, których starzenie się może mieć uniwersalny charakter. Nie neguje natomiast

wykorzystania tego organizmu w analizach fizjologicznych, biochemicznych, genetycznych czy molekularnych jako modelu komórki eukariotycznej.

Konsekwencją argumentacji kwestionującej uniwersalność mechanizmów starzenia się między tak odległymi ewolucyjnie grupami jak grzyby i zwierzęta było skupienie się wyłącznie na zwierzętach. Wyrazem poszukiwania argumentów i dyskusji na temat zasadności tezy o uniwersalności zjawiska starzenia wśród *Metazoa*, jest praca **Bilinski i in. 2016**. Analiza występowania tego zjawiska wśród różnych grup systematycznych zwierząt wykazała, że dominująca opinia o uniwersalności starzenia jest wynikiem jedynie pobieżnej obserwacji, dotyczącej głównie zwierząt lądowych. Organizmy wodne nie spełniają tego warunku, a to z nich wyewoluowały formy lądowe. Konsekwencją tego stwierdzenia jest poddanie w wątpliwość zasadności postulatu istnienia uniwersalnych mechanizmów starzenia się. To z kolei stawia pod znakiem zapytania podstawę ekstrapolacji wniosków płynących z badań prowadzonych na prostych organizmach zwierzęcych na organizm ludzki.

Przeprowadzona analiza zachowania się długowiecznych gatunków zwierząt i konfrontacja uzyskanych wyników z niektórymi teoriami dotyczącymi czynników ją determinujących, doprowadziła do sformułowania następujących wniosków:

1. Nieuniknioność śmierci dotyczy jedynie tych gatunków, które utraciły zdolność rozmnażania agametycznego (wegetatywnego). Inaczej mówiąc dotyczy gatunków lub stadiów rozwojowych gatunków biologicznie nieśmiertelnych lub śmiertelnych, terminalnie wyspecjalizowanych w rozmnażaniu płciowym.
2. Senescencja rozumiana jako pojawianie się fenotypowych cech starzenia, występuje jedynie u tych z nich, które utraciły zdolność do wzrostu po osiągnięciu dojrzałości płciowej. Wiąże się to z całkowitą (jak w przypadku *Drosophila*) lub częściową (jak w przypadku ptaków i ssaków) utratą zdolności do regeneracji i naprawy uszkodzeń zachodzących na poziomie dojrzałego płciowo organizmu.
3. Genetycznie uwarunkowana długowieczność danego gatunku została zdeterminowana głównie przez dwa zasadnicze czynniki środowiskowe: dostępność pokarmu i presję wywieraną przez drapieżniki.
4. Możliwość wpływu człowieka na jego długowieczność jest ograniczona do unikania szkodliwych nawyków, w tym nadmiaru pobieranej energii.

Obserwowane duże zróżnicowanie długości życia wśród organizmów zamieszkujących różne typy środowisk wynika z realizacji określonego programu czy też przyjętej strategii życiowej, natomiast wyraźne objawy starzenia się są konsekwencją braku lub bardzo ograniczonych możliwości regeneracyjnych. Należy podkreślić, że równie istotną rolę w determinowaniu długości życia różnych gatunków odgrywa środowisko w jakim one żyją i presją jaką wywiera ono na organizm. Problem długości życia i modulowania tej wartości został podjęty w pracy **Bilinski i in. 2015**, gdzie

przeanalizowano wpływ ogólnie pojętego poziomu energii na długość życia. Problem ten jest podejmowany głównie w kontekście badań koncentrujących się na restrykcji kalorycznej, która prowadzi do wydłużenia życia w szerokim zakresie gatunków (Roth i Polotsky 2012), jednak efekt ten w przypadku naczelnych wydaje się być zdecydowanie mniej spektakularny (Austad 2012). Przedstawiona propozycja wyjaśnienia tego faktu, opiera się na zmianie interpretacji próby kontrolnej, którą zazwyczaj jest nadmiar kalorii, określany w literaturze jako żywienie *ad libitum*. W takiej sytuacji ograniczenie dopływu kalorii prowadzi do wydłużenia życia. Jeśli jednak jako punkt odniesienia potraktujemy liczbę kalorii zgodną z rzeczywistym zapotrzebowaniem, pozytywny efekt stosowania restrykcji kalorycznej przestaje być widoczny. Te rozbieżności nie są efektem różnic w mechanizmie działania restrykcji kalorycznej a raczej wynikiem stosowania różnych punktów odniesienia (kontroli). Dlatego też można wnioskować, że to nie tyle restrykcja kaloryczna prowadzi do wydłużenia życia co nadmiar spożywanych kalorii i wszelkie związane z tym konsekwencje jak chociażby gliko- i lipotoksyczność prowadzą do wyraźnego skrócenia życia. Taki sposób interpretacji nawiązuje do hipotezy hiperfunkcji proponowanej przez Mikhaila Blagosklonnego (Blagosklonny 2012) i rozwiniętej w pracy Gems and de la Guardia (Gems i de la Guardia 2013), która wskazuje, że brak terminacji wybranych procesów biosyntetycznych po zaprzestaniu wzrostu dorosłego organizmu, prowadzi do hipertrofii komórek i szeregu towarzyszących jej negatywnych konsekwencji. Długość życia poszczególnych gatunków jest zatem pewną wypadkową przyjętej strategii dotyczącej wprowadzenia mechanizmów umożliwiających zapobieganie skutkom nadmiaru energii.

Szeroka analiza różnych grup systematycznych zwierząt pod względem zarówno ich strategii życiowych jak i długości życia, przedstawiona w pracach składających się na osiągnięcie naukowe, wskazuje na potrzebę odejścia od traktowania procesu starzenia się jako zjawiska uniwersalnego w świecie organizmów żywych. Skłania również do podjęcia dyskusji nad zasadnością postulatu dotyczącego uniwersalności mechanizmów starzenia w świecie ożywionym. To z kolei pociąga za sobą potrzebę zmian w podejściu do problemów jakimi zajmuje się gerontologia, nawet jeśli wiązałoby się to z ograniczeniem stosowania organizmów modelowych. Konsekwentnie, obiektem badań eksperymentalnych w dziedzinie gerontologii winny być zwierzęta najbliższe ewolucyjnie naszemu gatunkowi. Ważnym aspektem wspomnianych zmian byłoby natomiast skoncentrowanie się na poszukiwaniu czynników ograniczających negatywne skutki starzenia się, co szczególnie w przypadku człowieka, a przecież jest on pośrednio celem większości badań gerontologicznych, mogłoby poprawić jakość naszego życia. Podstawowym celem gerontologii winno być maksymalne spowolnienie procesu senescencji, nie zaś dążenie do wydłużenia maksymalnej długości życia gatunku. Takie podejście stanowi podstawę opracowanej przez nasz zespół tzw. alternatywnej wizji biogerontologii (czyli gerontologii eksperymentalnej), której założenia zostały przedstawione w pracach **Bilinski i in. 2015**; **Bilinski i in. 2016**.

Bibliografia:

- Adams J., Rothman E.D., Beran K. (1981) The age structure of populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mathematical Biosciences*, 53:249-263.
- Aguilaniu H., Gustafsson L., Rigoulet M., Nystrom T. (2003) Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science*, 299:1751-1753.
- Andziak B., O'Connor T.P., Qi W., DeWaal E.M., Pierce A., Chaudhuri A.R., et al. (2006) High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Aging Cell*, 5:463-471.
- Austad S.N. (2012) Ageing: Mixed results for dieting monkeys. *Nature*, 489:210-211.
- Bilinski T., Bylak A., Zadrąg-Tęcza R. (2016) Principles of alternative gerontology. *Aging*, 8:589-602.
- Bilinski T., Paszkiewicz T., Zadrąg-Tęcza R. (2015) Energy excess is the main cause of accelerated aging of mammals. *Oncotarget*, 6:12909-12919.
- Bilinski T., Zadrąg-Tęcza R. (2014) The rules of aging: are they universal? Is the yeast model relevant for gerontology? *Acta Biochimica Polonica*, 61:663-669.
- Bilinski T., Zadrąg-Tęcza R., Bartosz G. (2012) Hypertrophy hypothesis as an alternative explanation of the phenomenon of replicative aging of yeast. *FEMS Yeast Research*, 12:97-101.
- Blagosklonny M.V. (2008) Aging: ROS or TOR. *Cell Cycle*, 7:3344-3354.
- Blagosklonny M.V. (2012) Answering the ultimate question "what is the proximal cause of aging?". *Aging*, 4:861-877.
- Bulterijs S. (2011) Metformin as a geroprotector. *Rejuvenation Research*, 14:469-482.
- Carmona-Gutierrez D., Buttner S. (2014) The many ways to age for a single yeast cell. *Yeast*, 31:289-298.
- Cohn M., Blackburn E.H. (1995) Telomerase in yeast. *Science*, 269:396-400.
- Defossez P.A., Prusty R., Kaerberlein M., Lin S.J., Ferrigno P., Silver P.A., et al. (1999) Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells. *Molecular cell*, 3:447-455.
- Denoth Lippuner A., Julou T., Barral Y. (2014) Budding yeast as a model organism to study the effects of age. *FEMS Microbiology Reviews*, 38:300-325.
- Egilmez N.K., Jazwinski S.M. (1989) Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 171:37-42.
- Erjavec N., Larsson L., Grantham J., Nystroem T. (2007) Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes & Development*, 21:2410-2421.
- Fabrizio P., Longo V.D. (2003) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*, 2:73-81.
- Ganley A.R., Breitenbach M., Kennedy B.K., Kobayashi T. (2012) Yeast hypertrophy: cause or consequence of aging? Reply to Bilinski et al. *FEMS Yeast Research*, 12:267-268.
- Ganley A.R., Kobayashi T. (2014) Ribosomal DNA and cellular senescence: new evidence supporting the connection between rDNA and aging. *FEMS Yeast Research*, 14:49-59.
- Gems D., de la Guardia Y. (2013) Alternative Perspectives on Aging in *Caenorhabditis elegans*: Reactive Oxygen Species or Hyperfunction? *Antioxidants & Redox Signaling*, 19:321-329.
- Gershon H., Gershon D. (2000) The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. *Mechanisms of Ageing and Development*, 120:1-22.
- Gershon H., Gershon D. (2001) Critical assessment of paradigms in aging research. *Experimental Gerontology*, 36:1035-1047.
- Harman D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11:298-300.
- Hoopes L.L., Budd M., Choe W., Weitao T., Campbell J.L. (2002) Mutations in DNA replication genes reduce yeast life span. *Molecular and Cellular Biology*, 22:4136-4146.
- Howitz K.T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W., Lavu S., Wood J.G., et al. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425:191-196.
- Hughes A.L., Gottschling D.E. (2012) An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast. *Nature*, 492:261-265.
- Jazwinski S.M. (1993) The genetics of aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetica*, 91:35-51.

- Kaeberlein M., Burtner C.R., Kennedy B.K. (2007) Recent developments in yeast aging. *PLoS genetics*, 3:e84.
- Kaeberlein M., Kennedy B.K. (2005) Large-scale identification in yeast of conserved ageing genes. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126:17-21.
- Kaeberlein M., Kirkland K.T., Fields S., Kennedy B.K. (2005) Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126:491-504.
- Kafri M., Metzl-Raz E., Jona G., Barkai N. (2016) The Cost of Protein Production. *Cell Reports*, 14:22-31.
- Kennedy B.K., Austriaco N.R., Jr., Guarente L. (1994) Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *The Journal of Cell Biology*, 127:1985-1993.
- Kennedy B.K., Smith E.D., Kaeberlein M. (2005) The enigmatic role of Sir2 in aging. *Cell*, 123:548-550.
- Krzepilko A., Swiecilo A., Wawryn J., Zadrąg R., Koziol S., Bartosz G., et al. (2004). Ascorbate restores lifespan of superoxide-dismutase deficient yeast. *Free Radical Research*, 38:1019-1024.
- Kwolek-Mirek M., Molon M., Kaszycki P., Zadrąg-Tęcza R. (2016) L-carnosine enhanced reproductive potential of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast growing on medium containing glucose as a source of carbon. *Biogerontology*, 17:737-747.
- Kwolek-Mirek M., Zadrąg-Tęcza R., Bednarska S., Bartosz G. (2014) Acrolein-Induced Oxidative Stress and Cell Death Exhibiting Features of Apoptosis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Deficient in SOD1. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 71:1525-1536.
- Lees H., Walters H., Cox L.S. (2016) Animal and human models to understand ageing. *Maturitas*, 93:18-27.
- Lin S.J., Defossez P.A., Guarente L. (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 289:2126-2128.
- Lin S.J., Kaeberlein M., Andalis A.A., Sturtz L.A., Defossez P.A., Culotta V.C., et al. (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*, 418:344-348.
- McCormick M.A., Delaney J.R., Tsuchiya M., Tsuchiyama S., Shemorry A., Sim S., et al. (2015) A Comprehensive Analysis of Replicative Lifespan in 4,698 Single-Gene Deletion Strains Uncovers Conserved Mechanisms of Aging. *Cell Metabolism*, 22:895-906.
- McFaline-Figueroa J.R., Vevea J., Swayne T.C., Zhou C., Liu C., Leung G., et al. (2011) Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast. *Aging Cell*, 10:885-895.
- Minois N., Frajnt M., Wilson C., Vaupel J.W. (2005) Advances in measuring lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:402-406.
- Molon M., Zadrąg-Tęcza R. (2016) Effect of temperature on replicative aging of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biogerontology*, 17:347-357.
- Molon M., Zadrąg-Tęcza R., Bilinski T. (2015) The longevity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A comparison of two approaches for assessment the lifespan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460:651-656.
- Mortimer R.K., Johnston J.R. (1959) Life span of individual yeast cells. *Nature*, 183:1751-1752.
- Mutoh N., Kawabata M., Nakagawa C.W., Kitajima S. (2005) Pro-oxidant action of phloxine B on fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 22:91-97.
- Polymenis M., Kennedy B.K. (2012) Chronological and replicative lifespan in yeast: Do they meet in the middle? *Cell Cycle*, 11:3531-3532.
- Powell C.D., Van Zandycke S.M., Quain D.E., Smart K.A. (2000) Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentations. *Microbiology*, 146 (Pt 5):1023-1034.
- Roth L.W., Polotsky A.J. (2012) Can we live longer by eating less? A review of caloric restriction and longevity. *Maturitas*, 71:315-319.
- Schmoller K.M., Skotheim J.M. (2015) The Biosynthetic Basis of Cell Size Control. *Trends in Cell Biology*, 25:793-802.

- Sinclair D., Mills K., Guarente L. (1998) Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Microbiology*, 52:533-560.
- Sinclair D.A., Guarente L. (1997) Extrachromosomal rDNA circles - A cause of aging in yeast. *Cell*, 91:1033-1042.
- Sinclair D.A., Mills K., Guarente L. (1997) Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast *sgs1* mutants. *Science*, 277:1313-1316.
- Smith J., Wright J., Schneider B.L. (2015) A budding yeast's perspective on aging: the shape I'm in. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 240:701-710.
- Van Raamsdonk J.M., Hekimi S. (2012) Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109:5785-5790.
- Wawryn J., Krzepilko A., Myszka A., Bilinski T. (1999) Deficiency in superoxide dismutases shortens life span of yeast cells. *Acta Biochimica Polonica*, 46:249-253.
- Wawryn J., Swiecilo A., Bartosz G., Bilinski T. (2002) Effect of superoxide dismutase deficiency on the life span of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. An oxygen-independent role of Cu,Zn-superoxide dismutase. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1570:199-202.
- Wierman M.B., Smith J.S. (2014) Yeast sirtuins and the regulation of aging. *FEMS Yeast Research*, 14:73-88.
- Wright J., Dungrawala H., Bright R.K., Schneider B.L. (2013) A growing role for hypertrophy in senescence. *FEMS Yeast Research*, 13:2-6.
- Yang J., Dungrawala H., Hua H., Manukyan A., Abraham L., Lane W., et al. (2011) Cell size and growth rate are major determinants of replicative lifespan. *Cell Cycle*, 10:144-155.
- Zadrąg-Tęcza R., Kwolek-Mirek M., Bartosz G., Bilinski T. (2009) Cell volume as a factor limiting the replicative lifespan of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biogerontology*, 10:481-488.
- Zadrąg-Tęcza R., Molon M., Mamczur J., Bilinski T. (2013) Dependence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* post-reproductive lifespan on the reproductive potential. *Acta Biochimica Polonica*, 60:111-115.
- Zadrąg-Tęcza R., Skoneczna A. (2016) Reproductive potential and instability of the rDNA region of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast: Common or separate mechanisms of regulation? *Experimental Gerontology*, 84:29-39.
- Zadrąg R., Bartosz G., Bilinski T. (2005) Replicative aging of the yeast does not require DNA replication. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333:138-141.
- Zadrąg R., Bartosz G., Bilinski T. (2008) Is the yeast a relevant model for aging of multicellular organisms? An insight from the total lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Aging Science*, 1:159-165.
- Zadrąg R., Kwolek-Mirek M., Bartosz G., Bilinski T. (2006) Relationship between the replicative age and cell volume in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochimica Polonica*, 53:747-751.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH

Moje zainteresowania naukowe od początku działalności akademickiej koncentrowały się na problematyce związanej z regulacją zdolności reprodukcyjnej komórek na przykładzie drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Dlatego też szereg podejmowanych w tym zakresie działań dotyczył analizy czynników zewnątrzkomórkowych, zarówno fizycznych jak i chemicznych, jak również wewnątrzkomórkowych wynikających ze strukturalnych i fizjologicznych zmian komórek, w kontekście ich wpływu na potencjał reprodukcyjny. Jest to zatem główny nurt tematyczny większości prac, których jestem współautorem oraz realizowanych z moim udziałem projektów badawczych. W prowadzonych badaniach wykorzystuję głównie metody mikroskopowe, opierając się na doświadczeniu zdobytym m.in. w trakcie realizacji pracy doktorskiej oraz podczas realizacji projektu w ramach programu Marie Curie Training Site “Multidisciplinary Training at Göteborg Yeast Centre” w Goteborg University. W szczególności jest to mikroskopia fluorescencyjna połączona z komputerową analizą obrazu. Uwzględniając ponadto metody biochemiczne/analizyczne oraz techniki biologii molekularnej, pozwala mi to na szeroką analizę wielu aspektów dotyczących struktury i funkcji komórek, które mogą mieć wpływ na możliwości komórek w zakresie ich zdolności reprodukcyjnej czy też odpowiedzi na stres.

Mój dorobek naukowy odzwierciedlający dotychczasową aktywność naukową można podzielić według kilku grup tematycznych:

5.1. Stres oksydacyjny i konsekwencje braku dysmutazy nadadtlenkowej CuZnSOD

Badania dotyczące tego zagadnienia rozpoczęłam jeszcze przed uzyskaniem stopnia doktora. Dotyczyły one możliwości zastosowania niskocząsteczkowych antyoksydantów w celu zniesienia negatywnych konsekwencji wynikających z braku białka Sod1p (cynkowo-miedziowej dysmutazy nadadtlenkowej, Cu/Zn-SOD). Do testów wybrany został jeden ze związków o charakterze antyoksydacyjnym tj. kwas askorbinowy, który analizowany był pod kątem jego możliwości w zakresie przywracania potencjału reprodukcyjnego komórek drożdży (liczby wytwarzanych pączków) do wartości szczepu dzikiego oraz auktrofii wynikającej bezpośrednio z braku białka Sod1p. Uzyskane wyniki badań stały się podstawą do opracowania prostych testów służących do szybkich badań przesiewowych w kierunku poszukiwania związków o potencjalnych właściwościach antyoksydacyjnych.

Badania dotyczące tego tematu kontynuowałam także po uzyskaniu stopnia doktora. Wykorzystując techniki mikroskopowe, głównie oparte o zjawisko fluorescencji, prowadziłam badania dotyczące zmian na poziomie komórkowym a obejmujących zarówno aspekty strukturalne jak i metaboliczne czy też szeroko rozumianą fizjologię komórek. Analiza tych parametrów stała się pomocna dla opracowania pewnych schematów działania związków o charakterze toksycznym, których toksyczność związana była z generowaniem stresu oksydacyjnego.

Rezultaty powyższych badań zostały opublikowane w formie kilku prac doświadczalnych.

Po uzyskaniu stopnia doktora:

1. Maslanka R., **Zadrag-Tecza R.**, Kwolek K., Kwolek-Mirek M. (2016) The effect of berry juices on the level of oxidative stress in yeast cells exposed to acrylamide. *Journal of Food Biochemistry*, 40:686-695. (IF₂₀₁₅ – **0,83**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₆ – **20**)
2. Kwolek-Mirek M., **Zadrag-Tecza R.**, Bednarska S., Bartosz G. (2015) Acrolein-Induced Oxidative Stress and Cell Death Exhibiting Features of Apoptosis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Deficient in SOD1. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 71(3):1525-1536. (IF₂₀₁₅ – **1,627**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₅ – **20**)
3. Kwolek-Mirek M., **Zadrag-Tecza R.** (2013) Effects of antioxidants on acrolein-induced oxidative protein damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Animal welfare, ethology and housing systems*, 9(3): 545-550 /Special Issue.
4. Kwolek-Mirek M., **Zadrag-Tecza R.**, Bartosz G. (2012) Ascorbate and thiol antioxidants abolish sensitivity of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to disulfiram. *Cell Biology and Toxicology*, 28(1):1-9. (IF₂₀₁₂ – **2,338**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₂ – **25**)
5. Kwolek-Mirek M., **Zadrag-Tęcza R.**, Bednarska S., Bartosz G. (2011) Yeast *Saccharomyces cerevisiae* devoid of Cu,Zn-superoxide dismutase as a cellular model to study acrylamide toxicity. *Toxicology In Vitro*, 25(2):573-579. (IF₂₀₁₁ – **2,775**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₁ – **30** pkt)

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. Krzepilko A., Swiecilo A., Wawryn J., **Zadrag R.**, Koziol S., Bartosz G., Bilinski T. (2004) Ascorbate restores lifespan of superoxide-dismutase deficient yeast. *Free Radical Research*, 38(9):1019-1024. (IF₂₀₀₄ – **2,774**; liczba punktów MNiSW₂₀₀₄ – **16**)
2. Zyracka E., **Zadrag R.**, Koziol S., Krzepilko A., Bartosz G., Bilinski T. (2005) Yeast as a biosensor for antioxidants: simple growth tests employing a *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in superoxide dismutase. *Acta Biochimica Polonica*, 52(3):679-84. (IF₂₀₀₅ – **1,863**; liczba punktów MNiSW₂₀₀₅ – **10**)
3. Zyracka E., **Zadrag R.**, Koziol S., Krzepilko A., Bartosz G., Bilinski T. (2005) Ascorbate abolishes auxotrophy caused by the lack of superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* Yeast can be a biosensor for antioxidants. *Journal of Biotechnology*, 115(3):271-278. (IF₂₀₀₅ – **2,687**; liczba punktów MNiSW₂₀₀₅ – **20**)

5.2. Aplikacje metod mikroskopowych w badaniach mikroorganizmów

Znajomość technik mikroskopowych wykorzystują również w badaniach dotyczących szeroko rozumianej biologii komórek drożdży. Terminologia stosowana w odniesieniu do stanu metabolicznego i żywotności komórek drożdży nie zawsze jest wystarczająco precyzyjna, a nierzadko stosowana zamiennie, mimo iż dotyczy różnych stanów fizjologicznych komórki. Celem badań podejmowanych w tym zakresie było opracowanie zestawu metod pozwalających na precyzyjne określanie parametrów dotyczących dwu różnych aspektów tj. witalności komórek opierającej się na

parametrach określających ich stan metaboliczny oraz żywotności komórek opierającej się na zdolności do przeżycia. Przedstawiony zestaw metod może mieć szerokie zastosowanie, ponieważ wydaje się być przydatny zarówno dla badań charakteryzujących wpływ czynników fizycznych bądź chemicznych na komórki, jak i dla oceny stanu mikroorganizmów wykorzystywanych w technologiach przemysłowych. Metody te można również wykorzystać do oceny skutków toksycznego działania wielu związków chemicznych na poziomie komórkowym.

Rezultaty powyższych badań zostały opublikowane w formie prac doświadczalnych:

1. Kwolek-Mirek M. and **Zadrag-Tecza R.** (2014) Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research*, 14(7):1068-1079. (*autor korespondujący*) (IF₂₀₁₄ – **2,818**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₄ – **30**)
2. **Zadrag-Tecza R.**, Kwolek-Mirek M. (2013) Assessment of acrolein-induced cellular damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells using microscopy techniques. *Animal welfare, ethology and housing systems*, 9(3): 633-639 /Special Issue.
3. Kwolek-Mirek M., Bednarska S., **Zadrag-Tecza R.**, Bartosz G. (2011) Hydrolytic activity of esterases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is strain-dependent. *Cell Biology International*, 35(11):1111-1119. (IF₂₀₁₁ – **1,482**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₁ – **15**)

5.3. Długość życia a potencjał reprodukcyjny komórek drożdży *S. cerevisiae*

Jednym z bardzo ważnych tematów badań realizowanych z moim udziałem jest analiza długości życia w odniesieniu do drożdży *S. cerevisiae* jako organizmu modelowego w badaniach gerontologicznych. Długość życia komórek drożdży *S. cerevisiae* wyrażana jest głównie przez podawanie liczby pączków wytwarzanych przez pojedynczą komórkę, co określane jest jako replikacyjna długość życia (ang. *replicative lifespan*). Wprowadzony przez nas sposób określania całkowitej długości życia (ang. *total lifespan*) wyrażonej w jednostkach czasu (Zadrag et. al., 2008), zwracał uwagę na ważny problem przy porównywaniu wyników badań między drożdżami a innymi organizmami w sytuacji stosowania całkowicie odrębnych jednostek określających długość życia. Czynniki, które mogą być uważane za potencjalne regulatory długości życia oceniane są jedynie przez pryzmat wpływu na potencjał reprodukcyjny komórek. Wydaje się jednak, że pełne określenie ich roli może odzwierciedlać analiza całkowitej długości życia wyrażonej w jednostkach czasu. Ponadto wprowadzenie jednostki czasu dla określenia długości życia wydaje się szczególnie istotne w przypadku tej części badań gerontologicznych, która związana jest z tzw. genami długowieczności (ang. *longevity genes*), czyli genami, których delecja prowadzi do zwiększenia liczby wytwarzanych przez komórkę pączków (określane jest to jako wydłużenie replikacyjnej długości życia). W naszym przekonaniu stosowanie terminu „*longevity genes*” bezwzględnie wymaga zastosowania jednostki czasu. Otrzymane w toku prowadzonych badań wyniki wskazały, że dla większości spośród analizowanych genów, nawet przy dużych różnicach potencjału reprodukcyjnego, całkowita długość życia mutantów była zbliżona do wartości szczepu dzikiego. Część z prac dotyczących analizy

długości życia została włączona do osiągnięcia naukowego. Ponadto prowadzone w tym zakresie analizy dotyczą również ustalenia relacji pomiędzy wielkością komórki a długością życia wyrażaną zarówno liczbą paczków jak i w jednostkach czasu.

Rezultaty powyższych badań zostały opublikowane w formie prac doświadczalnych:

1. Molon M., **Zadrag-Tecza R.** (2016) The links between hypertrophy, reproductive potential and longevity in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. * *Acta Biochimica Polonica*, 63(1):329-334. (IF₂₀₁₅ – **1,187**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₅ – **15**)

5.4. Mechanizm regulacji potencjału reprodukcyjnego komórek drożdży *S. cerevisiae*

Istotną częścią realizowanych przeze mnie badań jest także analiza czynników, które mogą regulować potencjał reprodukcyjny komórek drożdży, a zatem stanowić również wyjaśnienie dla ograniczonych możliwości jakie wykazuje ten jednokomórkowy organizm. Podejmowane w tym zakresie działania dotyczą czynników, które w sposób pośredni bądź bezpośredni oddziałują na metabolizm komórki, jej możliwości biosyntetyczne i potencjał energetyczny. Ważną część tych badań stanowi również prowadzona obecnie, w ramach realizacji projektu Narodowego Centrum Nauki, szczegółowa analiza restrykcji kalorycznej, metabolizmu glukozy oraz sprawności działania wewnątrzkomórkowych systemów degradacji białek (system degradacji proteosomalnej i autofagia) w zakresie regulacji zarówno możliwości reprodukcyjnych komórek drożdży jak i długości życia wyrażanej w jednostkach czasu.

Rezultaty powyższych badań zostały opublikowane w formie prac doświadczalnych:

Po uzyskaniu stopnia doktora:

1. Molon M., **Zadrag-Tecza R.** (2016) Effect of temperature on replicative aging of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biogerontology*, 17(2):347-357. (IF₂₀₁₅ – **3,252**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₆ – **30**)
2. Molon M., Szajwaj M., Tchorzewski M., Skoczowski A., Niewiadomska E., **Zadrag-Tecza R.** (2016) The rate of metabolism as a factor determining longevity of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *AGE*, 38(1):11 (IF₂₀₁₅ – **2,5**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₆ – **25**)
3. Kwolek-Mirek M., Molon M., Kaszycki P., **Zadrag-Tecza R.** (2016) L-carnosine enhanced reproductive potential of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast growing on a glucose as a source of carbon. *Biogerontology*, 17(4):737-747. (IF₂₀₁₅ – **3,252**; liczba punktów MNiSW₂₀₁₆ – **30**)
4. Zadrag R., Kwolek-Mirek M., Bartosz G., Bilinski T. (2006) Relationship between the replicative age and cell volume in *Saccharomyces cerevisiae*. * *Acta Biochimica Polonica*, 53(4):747-751. (IF₂₀₀₆ – **1,363**; liczba punktów MNiSW₂₀₀₆ – **10**)

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. **Zadrag R.**, Bartosz G., Bilinski T. (2005) Replicative aging of the yeast does not require DNA replication. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(1):138-141. (IF₂₀₀₅ – **3**; liczba punktów MNiSW₂₀₀₅ – **20**)

5.5. Konsekwencje hipertrofii komórki na poziomie komórkowym i molekularnym


Bardzo ważnym elementem realizowanej przez mnie tematyki jest analiza wewnątrzkomórkowych zmian będących konsekwencją osiągnięcia stanu hipertrofii. Temat ten stanowi część realizowanego obecnie projektu Narodowego Centrum Nauki DEC-2013/09/B/NZ3/01352. Wzrost wielkości komórki, prowadzący niekiedy do 10-krotnej zmiany w stosunku do wielkości początkowej, pociąga za sobą szereg zmian zarówno na poziomie komórkowym jak i molekularnym. W efekcie może to powodować niezdolność do podejmowania kolejnego cyklu reprodukcyjnego. Szczegółowa charakterystyka komórek na obu tych poziomach organizacji pozwala na wskazanie potencjalnych przyczyn tego zjawiska. Przede wszystkim są to: analizy oparte na obrazowaniu struktur wewnątrzkomórkowych przy pomocy barwienia fluorescencyjnego i techniki immunocytochemicznej; analizy biochemiczne dotyczące zmian parametrów fizjologicznych komórek m.in. aktywność wybranych enzymów związanych z procesem glikolizy oraz poziom ATP; analizy wskazujące na zmiany na poziomie molekularnym m.in. poziom ekspresji genów dla kluczowych białek cyklu komórkowego oraz genów związanych z monitorowaniem poziomu glukozy w środowisku i odpowiedzią na zmiany tego składnika. Materiał do badań stanowią komórki, u których zmiany wielkości indukowane są różnymi czynnikami m.in. zatrzymaniem komórek w fazie G1 cyklu, wzrostem liczby kopii genomu (poliploidyzacja), delecją wybranych genów, dla których jedną z fenotypowych cech jest zmiana wielkości komórki, zmianą składu podłoża hodowlanego. Do tej pory rezultaty prowadzonych w tym zakresie badań zostały opublikowane w formie trzech prac, natomiast w przygotowaniu są dwie kolejne prace.

1. Maślanka R., **Zadrag-Tęcza R.**, (2015) Duplikacja materiału genetycznego – mechanizm rozwoju nowej funkcjonalności genów. *Postępy Biochemii* 61(4):388-397. (liczba punktów MNiSW₂₀₁₅ – 5)
2. Maślanka R., **Zadrag-Tęcza R.** (2015) Monografia Naukowa: „Wyzwania Naukowców We Współczesnym Świecie”, ISBN 978-83-943111-0-0. Rozdział pt. „Morfologiczne zmiany struktur wewnątrzkomórkowych, jako efekt delecji genów kodujących białka rybosomalne w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*” s. 42-50. (liczba punktów MNiSW₂₀₁₅ – 4)
3. **Zadrag R.**, Wojnar L., Bartosz G., Bilinski T. (2006) Does yeast shmooing mean a commitment to apoptosis? *Cell Biology International*. 30(3):205-209. (IF₂₀₀₆ – 1,363; liczba punktów MNiSW₂₀₀₆ – 10)

6. PODSUMOWANIE AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ

- Całkowita liczba publikacji naukowych – **26**
 - Prace opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* – **24**
 - Przed uzyskaniem stopnia doktora – **4**
 - Po uzyskaniu stopnia doktora – **20**
 - Prace opublikowane w czasopismach spoza bazy *Journal Citation Reports* – **2**
 - Przed uzyskaniem stopnia doktora – **0**
 - Po uzyskaniu stopnia doktora – **2**
- Rozdziały w monografiach – **1**
- Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism *impact factor* IF, w których ukazały się wszystkie publikacje habilitanta, zgodnie z rokiem opublikowania (dla prac opublikowanych w roku 2016 wykorzystano ostatnią dostępną w bazach wartość IF₂₀₁₅) – **57,611**
 - Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora – **10,294**
 - Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora – **47,317**
- Sumaryczna liczba punktów **MNiSW** – **546**
 - Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora – **66**
 - Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora – **480**
- Liczba cytowań publikacji wg bazy *Web of Science*: **170**; bez autocytowań: **111**
- Indeks Hirscha wg bazy *Web of Science*: **8**

Rzeszów, 14.12.2016 r.


Dr Renata Zadrag-Tęcza